

**UJI EFEK ANTIPROLIFERASI EKSTRAK METANOL
DAUN PARRANG ROMANG (*Boehmeria virgata*
(Forst) Guill) TERHADAP SEL HeLa SECARA IN
VITRO**

**NURDAYA
H51104005**



28-2-08
Fak. Farmasi
Uls
Habib
32

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008**

**UJI EFEK ANTIPROLIFERASI EKSTRAK METANOL DAUN PARRANG
ROMANG (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) TERHADAP SEL HeLa
SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**N U R D A Y A
H51104005**

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008**

UJI EFEK ANTIPROLIFERASI EKSTRAK METANOL DAUN PARRANG
ROMANG (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) TERHADAP SEL HeLa
SECARA IN VITRO

NURDAYA

H51104005

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt
NIP. 132 010 567

Pembimbing Pertama,



Dr. Gemini Alam, MSi, Apt
NIP. 131876917

Pembimbing Kedua,



Mufidah, SSi, MSi, Apt
NIP. 13240180

Pada tanggal 18 Februari 2008

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kita panjatkan khadirat allah SWT karena berkat rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini sebagai salah syarat agar dapat memperoleh gelar sarjana.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga besarnya kepada kedua orang tuaku yang telah menghadirkanku ke dunia ini dengan penuh rasa cinta dan kasih sayang serta senantiasa mendoakan, memberikan dukungan moril dan materil sehingga penulis mampu menjadi seperti saat ini. Dan terima kasih pula kepada adikku Sulfikar dan seluruh keluarga besarku yang tidak dapat aku sebut satu persatu yang telah menaruh harapan yang besar untukku.

Selama penulis menempuh jenjang pendidikan, tentu banyak rintangan yang dihadapi, namun adanya dukungan dari berbagai pihak rintangan itu menjadi terasa ringan, oleh karena itu penulis ingin melayangkan rasa terima kasih yang begitu besar kepada Dekan, Ketua jurusan, Staf Dosen, dan Staf Pegawai fakultas farmasi yang selama ini dengan sabar mendidik, membimbing, dan membantu penulis selama menempuh pendidikan Strata satu (S1).

Kepada Ibu Dr.rer.nat. Marianti A. Manggau, selaku pembimbing utama, sekaligus merangkap penasehat akademik, terima kasih banyak penulis haturkan atas kepercayaan, ketabahan, dan kasabarannya dalam

membimbing dan mengarahkan penulis hingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Kepada Bapak Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt selaku pembimbing pertama dan Ibu Mufidah, S.Si, M.Si, Apt selaku pembimbing kedua, terima kasih banyak atas waktu, kesempatan, ketabahannya dalam mengarahkan, membimbing dan memberikan masukan yang positif bagi penulis dalam menulis skripsi ini.

Terima kasih pula kepada bapak Prof. dr. Supargyono, DTM&H., SU., Ph.D., SpParK (Direktur Pusat Kedokteran Tropis FK. UGM) dan Ibu Rumbiwati (Laboran Lab. Parasitologi FK.UGM) yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian di laboratorium pusat kedokteran Tropis Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Madā, Yogyakarta.

Saudaraku Febby Tamia (Hubungan Internasional '04) terima kasih yang tak terhingga penulis haturkan atas segala dukungan dan fasilitas yang tidak terhitung jumlahnya yang telah engkau berikan selama penulis menempuh jenjang pendidikan strata satu (S1).

Terima kasih penulis sampaikan kepada teman-teman terbaikku (Rachmawati, A. Sartika, Jumriani K., Jumriani, Nur Azizah A., Asriani, Lismawati, Nanik T., Safaruddin), dan teman-teman angkatan '04 yang penulis tak dapat sebutkan satu persatu thank's Guys!!! Kalian telah memberikan warna dalam hidup penulis dalam rangkaian CAPSULE '04. And for all crew Radio Kampus EBS Unhas thank's for everything.

Teman-teman seperjuanganku selama melakukan penelitian di laboratorium Parasitologi FK UGM (Kak Citra Alam, Kak Iriani Asmi, Kak Herland Astuh, Kak Oktoviatius Rudy T., Kak Didi Riady, dan Andi Rahman) Thanks ya atas bantuan dan dukungannya selama penulis melakukan penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini. Tak lupa saya ucapkan banyak terima kasih kepada Mbak Yanti dan Mbak Nur atas tumpiangannya selama penulis berada di kota Yogyakarta.

Spesial thanks buat Kak Yusriadi, S.Si, Apt yang selama ini dengan sabar dan tabah memberikan bantuan, masukan, arahan, pinjaman literatur kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Penulis sadar bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritikan dari pembaca agar skripsi ini bisa lebih baik lagi.

Makassar, 22 Desember 2007

penulis

ABSTRAK

Tanaman Parrang Romang (*Boehmeria virgata* Forst (Guill)) secara empiris telah digunakan oleh masyarakat Tana Toraja sebagai antikanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas ekstrak metanol daun parrang romang terhadap sel HeLa secara invitro dengan melihat aktivitasnya terhadap penurunan proliferasi HeLa *cell line*. Penelitian ini menggunakan sel HeLa yang dikulturkan dalam media RPMI 1640. Konsentrasi sampel dan Doksorubisin yang digunakan adalah 1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml. Suspensi sel (2×10^4 sumuran) diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂ kemudian diberi MTT 10 µl dilanjutkan dengan inkubasi selama 4 jam. Setelah inkubasi suspensi sel yang ditambahkan MTT kemudian diberi 100 µl larutan sodium dodesil sulfat (SDS) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Serapan kristal formazan diukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Dan IC₅₀ dihitung metode analisis probit. Hasil analisis diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak metanol daun parrang romang yaitu 158.4 µg/ml dan kontrol positif doksorubisin 77.9 µg/ml. Sehingga disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun parrang romang memiliki efek antiproliferasi.

Kata kunci: *Boehmeria virgata* , sel HeLa, MTT assay

ABSTRACT

The leaves of parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) empirically have been used by Tana Torajan peoples as anticancer drug. The aim of this research is to determine of the antiproliferative effect of parrang romang leaves methanol extract by measuring the decrease of HeLa cell line proliferation. HeLa cell line was cultured in RPMI 1640 medium. The concentration of sample and doxorubisin were 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$. The cell suspension (2×10^4 cell/well) were incubated with sample overnight at 37°C with 5% CO_2 flow and after that MTT $10 \mu\text{l}$ were added and then incubated for 4 hours. After incubation the cell were than added with stop solution sodium dodecyl sulphate $100 \mu\text{l}$. The absorption was read by ELISA Reader at wavelength of 550 nm. By probit analysis we obtained the IC_{50} value of leaf methanol extract of parang romang leaves were, 158.4 $\mu\text{g/ml}$ and doxorubisin 77.9 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, the methanol extract of parrang romang leaves have an antiproliferative effect.

Key word: *Boehmeria virgata*, HeLa cell, MTT assay

DAFTAR ISI

	Halaman
Ucapan terima kasih	iv
Abstrak	vii
Abstract	viii
Daftar isi	ix
Daftar tabel	xii
Daftar gambar	xiii
Daftar lampiran	xiv
Daftar lambang dan singkatan.....	xv
Bab I: Pendahuluan	1
Bab II: Tinjauan Pustaka	4
II.1 Uraian tanaman Parrang Romang	4
II.1.1 Klasifikasi tanaman	4
II.1.2 Nama Asing dan Daerah.....	4
II.1.3 Morfologi Tanaman.....	4
II.1.4 Tempat Tumbuh.....	5
II.1.5 Kegunaan.....	5
II.2 Tinjauan Umum.....	6
II.2.1 Kanker.....	6
II.2.2 karsinogenesis.....	7
II.2.3 Siklus Sel.....	11

II.2.4 Kanker Serviks.....	14
II.2.5 Kultur Sel.....	15
II.2.6 HeLa <i>cell line</i>	19
II.2.7 Uji Antiproliferasi Sel.....	21
II.3 Ekstrak dan Ekstraksi.....	23
II.3.1 Defenisi ekstrak dan ekstraksi.....	23
II.3.2 Metode Maserasi.....	23
Bab III: Pelaksanaan Penelitian.....	25
III.1 Alat yang digunakan.....	25
III.2 Cara Penelitian.....	26
III.2.1 Penyiapan sampel.....	26
III.2.1.1 Pengambilan Sampel.....	26
III.2.1.2 Pengolahan Sampel.....	26
III.3 Ekstraksi	26
III.5 Pengadaan Sel HeLa.....	29
III.5.1 Perbanyakkan Sel HeLa.....	29
III.5.2 Pemanenan Sel HeLa.....	29
III.5.3 Perhitungan Sel.....	30
III.6 Penyiapan Bahan Uji.....	30
III.6.1 Pembuatan Larutan MTT dalam PBS.....	30
III.6.2 Pembuatan <i>Stop Solution</i> SDS.....	30
III.6.3 Pembuatan Larutan Uji.....	31
III.7 Pengujian Antiproliferasi.....	31

III.8 Pengumpulan dan Pengolahan Data.....	32
Bab IV: Hasil dan Pembahasan.....	33
IV.1 Hasil Penelitian.....	33
IV.2 Pembahasan.....	33
Bab V: Penutup.....	40
V.1 Kesimpulan.....	40
V.2 Saran.....	40
Daftar pustaka.....	41
Lampiran	

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Data hasil pengukuran viabilitas sel dengan Elisa reader.....	33
2. Data hasil absorbansi Elisa Reader	45
3. Harga probit sesuai prosentasinya.....	51

DAFTAR GAMBAR

gambar	halaman
1. Siklus sel pada eukariotik	12
2. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase.....	22
3. Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak methanol dengan persentase kematian sel HeLa.....	46
4. Grafik hubungan antara konsentrasi doksorubisin dengan persentase kematian sel HeLa.....	47
5. Grafik hubungan antara log konsentrasi versus nilai probit ekstrak methanol daun parrang romang terhadap sel HeLa.....	49
6. Grafik hubungan antara log konsentrasi versus nilai probit Doksorubisin terhadap sel HeLa.....	50
7. Foto sel HeLa pada kontrol negatif dan setelah perlakuan dengan ekstrak methanol daun parrang romang pada beberapa konsentrasi uji diamati setelah inkubasi 24 jam	52
8. Foto sel HeLa setelah perlakuan dengan Doksorubisin pada beberapa konsentrasi uji diamati setelah inkubasi 24 jam	53
9. Foto sel HeLa setelah pemberian MTT pada berbagai konsentrasi ekstrak metanol daun parrang romang (<i>Boehmeria virgata</i>).....	54
10. Foto sel HeLa setelah pemberian MTT pada berbagai konsentrasi Doksorubisin.....	55
11. Foto alat-alat yang digunakan.....	56
12. Gambar daun parrang romang (<i>Boehmeria virgata</i> (Forst) Guill).	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja.....	44
2. Hasil perhitungan IC_{50}	46

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang / singkatan	Arti
BSS	Balance Salt Solution
DMSO	Dimetil Sulfoksida
ELISA	Enzim linked immunosorbant assay
FBS	Fetal Bovin Serum
HPV	Human Papiloma Virus
IC ₅₀	Inhibitory Concentration - 50
LAF	Laminar Air Flow
MTT	(3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
PBS	Posphat Buffer Saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SDS	Sodium Dodesil Sulfhat

BAB I

PENDAHULUAN

Tanaman yang telah secara empiris digunakan sebagai anti kanker oleh masyarakat Tana Toraja adalah tanaman parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill). Tanaman ini termasuk dalam suku Urticaceae, kandungan dan efek tanaman ini belum banyak diteliti orang. Sebagai pembandingan dengan genus yang sama, tanaman Rami (*Boehmeria nivea*) mengandung beta-sitosterol, daucosterol, 19- α -hidroksi ursolik serta mineral, protein, lisin dan karoten (1). Data ilmiah tentang tanaman ini belum diketahui namun telah dilakukan penelitian uji efek toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* dengan LC_{50} ekstrak metanol, n-hexan, etil asetat dan n-butanol masing-masing 2089,296 $\mu\text{g/ml}$; 118, 304 $\mu\text{g/ml}$; 17,498 $\mu\text{g/ml}$ dan 3,357 $\mu\text{g/ml}$ (2).

Neoplasma adalah pertumbuhan massa baru, reproduksi seluler abnormal. Neoplasma benigna (tumor jinak) merupakan suatu massa jaringan abnormal, yang pertumbuhannya bersifat autonom dan melebihi jaringan normal. Tidak seperti proliferasi non neoplastik, pertumbuhan tumor menetap setelah hilangnya rangsang yang mencetuskan perubahan tersebut. Neoplasma maligna (tumor ganas) merupakan pertumbuhan maligna disertai dengan pembelahan sel abnormal, invasi sel sekitar, dan metastasi ke daerah yang jauh. Perbedaan neoplasma benigna dan maligna didasarkan pada penampakan morfologi secara mutlak pada

perilakunya (perjalanan klinis), dengan empat kriteria: (a) diferensiasi dan anaplasia (hilangnya diferensiasi sel), (b) laju pertumbuhan, (c) invasi lokal, (d) metastasis (3)

Sel kanker dapat berkembang dan berproliferasi secara autonom. Sifat-sifat umum dari tumor adalah dapat tumbuh di luar ukuran normal. Pada kenyataannya istilah tumor yang digunakan secara luas menggambarkan suatu struktur abnormal dalam tubuh manusia, termasuk cairan pengisi kista. Lebih jauh lagi, kanker termasuk tumor yang disebabkan oleh peningkatan proliferasi sel, seperti peningkatan jumlah sel yang permanen dan berkelanjutan. Peningkatan jumlah sel dalam jaringan disebut hiperplasia. Hiperplasia dengan perubahan diferensiasi (displasia) dikenal sebagai bakal tumor. Displasia sering memacu tumor maligna dalam beberapa kasus dikenal sebagai perubahan fenotipik. Hiperproliferasi dalam kanker disebabkan oleh respon terhadap sinyal regulasi pertumbuhan eksogen. Kanker sering kali hipersensitif terhadap sinyal pertumbuhan, namun beberapa jenis kanker berkembang tanpa ada pengaruh dari sinyal tersebut (4).

Selama beberapa tahun terakhir ini uji *in vitro* menggunakan kultur sel mamalia telah dikembangkan untuk mencegah penggunaan hewan coba di laboratorium secara meluas. Salah satu kultur sel mamalia yang sering digunakan dalam pengujian aktivitas antikanker secara *in vitro* ialah sel HeLa (*Hela cell line*) (5)

Dalam penelitian ini digunakan sel HeLa (*HeLa cell line*) yang merupakan *continuous cell line* yang tumbuh sebagai sel semi melekat. *HeLa cell line* diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (*cervix*) manusia (6). Tidak seperti kebanyakan sel kanker, *tumor suppressor gen* (Gen p53 dan pRb) pada sel HeLa tidak mengalami mutasi. Pada sel HeLa degradasi gen p53 dan inaktivasi pRb diperantarai oleh protein E6 dan E7. protein E6 mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. Protein p53 merupakan suatu faktor transkripsi yang mengaktifkan transkripsi bermacam-macam gen misalnya gen p21. protein p53 bertanggung jawab dalam penghentian siklus sel ketika terjadi kerusakan DNA. Jika kerusakan DNA tersebut tidak diperbaiki, p53 akan menginduksi apoptosis dengan menginaktivasi protein-protein pro apoptosis. Pada sel HeLa p53 menjadi tidak aktif karena terikat pada protein E6. (7)

Tujuan penelitian ini adalah menentukan aktivitas ekstrak metanol daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst)Guill) terhadap sel HeLa secara *in vitro* dengan melihat aktivitasnya terhadap penurunan proliferasi *HeLa cell line*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill)

II.1.1 Klasifikasi Tanaman (8)

Kingdom	: Plantae
Divisió	: Spermatophyta
Class	: Angiospermae
Subclass	: Dicotyledoneae
Ordo	: Urticales
Familia	: Urticaceae
Genus	: <i>Boehmeria</i>
species	: <i>Boehmeria virgata</i> (Forst)Guill

II.1.2 Nama Asing dan Daerah

Makassar	: Parrang romang
Toraja	: Bo'to laki

II.1.3 Morfologi Tanaman (1)

Boehmeria virgata merupakan tumbuhan dikotil, herba, tegak, tinggi 1-3 meter, berakar tunggang, tangkai umumnya tidak bercabang dan cekung, garis tengah 8-16 mm, tangkai muda pada awalnya berbulu dan berwarna hijau, kulit pohon berserat dan berwarna kecoklat-coklatan. Daun berbentuk sederhana, berhadapan atau tersebar dengan daun-daun penumpu yang sering kali tidak sama besar, dengan 3 urat daun pada

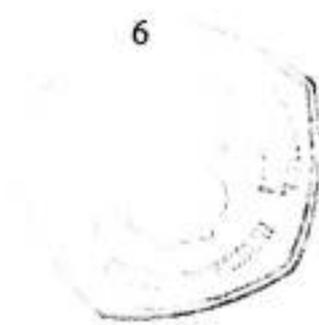
bagian belakang dan muka, berbentuk *stipules axillary*, dasar daun berbentuk *linear-lanceolate*, tepi daun begerigi, permukaan kasar, apeks berwarna hijau atau putih, panjang petiola 6-12 cm, berbentuk *pubescent*. Bunga uniseksual, berwarna hijau sampai merah jambu, berkelamin tunggal dengan satu tenda bunga, berbilangan 4-5 atau 2-3, induk benang sari berhadapan dengan tenda bunga. Buahnya berupa buah batu atau buah keras, berbentuk ovoid, berdiameter 1 mm, terlindung kuat oleh periantum, berbulu, berwarna coklat kekuningan, garis tengah buah kurang dari 1 mm, berwarna coklat tua, biji dengan endosperm dengan lembaga yang lurus.

II.1.4 Tempat Tumbuh (1)

Tumbuh secara liar pada semak-semak belukar di daerah bukit.

II.1.5 Kegunaan (1)

Secara tradisional daun *Boehmeria virgata* masyarakat kabupaten Tana Toraja Sulawesi Selatan digunakan untuk pengobatan pembengkakan payudara. Sedangkan daun *Boehmeria nivea* digunakan sebagai antifatulen, tapal borok (kudis), bahan jamu, daun digunakan sebagai tonik untuk penyakit disentri, dan obat untuk maag. Di vietnam digunakan sebagai diuretik, emolient, penyakit disuria, inflamasi urogenital dan kejang uterus.



II.2 Tinjauan Umum

II.2.1 Kanker

Neoplasia didefinisikan sebagai perkembangan massa jaringan abnormal yang tidak responsif terhadap mekanisme kontrol pertumbuhan normal. Istilah ini biasanya sinonim dengan tumor. Tumor dibedakan menjadi dua kelompok yaitu benigna (jinak) dan maligna (ganas), tumor ganas dapat berasal dari epitel (kulit, kolon, dan sebagainya) ini disebut karsinoma. Bila tumor berasal dari jaringan ikat disebut sarkoma. Bila berasal dari kelenjar getah bening disebut limfoma. Semua tumor ganas di sebut kanker (9, 10). Sifat umum dari kanker ialah sebagai berikut:

1. pertumbuhan berlebihan umumnya berbentuk tumor
2. gangguan diferensiasi dari sel dan jaringan
3. bersifat infasif, mampu tumbuh di jaringan sekitarnya (perbedaan pokok dengan jaringan normal)
4. Bersifat metastatik, menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru
5. memiliki hereditas bawaan (*acquired heredity*) yaitu keturunan kanker dapat menimbulkan kanker
6. pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (11).

Sel kanker dapat mengganggu tuan rumah karena menyebabkan (1) desakan akibat pertumbuhan tumor; (2) penghancuran jaringan tempat

tumor berkembang dan bermetastasis; dan (3) gangguan sistemik lain sebagai akibat sekunder dari pertumbuhan sel kanker (11).

Pada karsinoma terjadi pembelahan dan perbanyakan sel yang tidak terbatas sehingga massa jaringan tumor bertambah dengan cepat. Selain daripada itu jaringan tumor dapat mengadakan invasi ke dalam jaringan sekitarnya yang dapat merusak jaringan sehat, merusak jaringan syaraf dengan jalan infiltrasi yang menyebabkan nyeri hebat, dapat merusak pembuluh darah, termasuk pembuluh darah tumor sendiri, sehingga terjadi perdarahan atau nekrosis iskemik dari jaringan tumor (10).

Dalam proses metastasis terjadi invasi tumor ke pembuluh limfe, pembuluh darah, dan rongga tubuh diikuti oleh transport dan pertumbuhan massa sel tumor sekunder yang terpisah dari tumor primer. Gambaran terpenting untuk membedakan tumor jinak dari yang ganas. Kecuali tumor dalam otak dan karsinoma sel basal kulit, hampir semua tumor ganas mempunyai kemampuan metastasis (12).

II.2.2 Karsinogenesis

Kanker berkembang melalui serangkaian proses yang disebut karsinogenesis.. Zat karsinogen adalah zat yang dapat mengakibatkan tumor pada kontak dengannya (lokal, inhalasi) atau secara oral (usus). Analisis molekuler menyebutkan bahwa akumulasi mutasi gen dapat menyebabkan pertumbuhan tumor. Mutasi ini dapat menyebabkan replikasi DNA yang tidak sempurna, kerusakan oksidatif DNA, atau

kerusakan DNA yang disebabkan oleh lingkungan yang karsinogen (13,14).

Diketahui bahwa radiasi dan banyak zat-zat kimia yang karsinogenik terhadap binatang dan manusia. Virus diduga kuat juga demikian. Transformasi neoplastik yang disebabkan kimia merupakan proses dinamis. Secara luas dibagi menjadi tiga stadium: inisiasi, promosi, dan progresi (10).

(a) Fase inisiasi : DNA dirusak akibat radiasi atau zat karsinogen (radikal bebas). Zat-zat inisiator ini mengganggu proses reparasi normal, sehingga terjadi mutasi DNA dengan kelainan pada kromosomnya. Kerusakan DNA diturunkan kepada anak-anak sel dan seterusnya. (b) Fase promosi : zat karsinogen tambahan (*co-carcinogens*) diperlukan sebagai promotor untuk mencetuskan proliferasi sel. Dengan demikian, sel-sel rusak menjadi ganas. (c) *fase progresi* : gen-gen pertumbuhan yang diaktivasi oleh kerusakan DNA mengakibatkan mitosis dipercepat dan pertumbuhan liar dari sel-sel ganas. Tumor menjadi manifes (14).

a. Apoptosis

Apoptosis adalah kematian sel yang telah diprogram. Pada perkembangan di dalam embrio, praktis setiap sel menerima secara genetis suatu program khas, yang mematakannya sesuai sejumlah pembelahan tertentu. Begitu pula bila cara berfungsinya terganggu hebat seperti halnya pada sel-sel kanker, yang demikian akan mati pada waktunya. Akibat apoptosis, sel kehilangan cairannya, mengkerut dan

pecah dalam bentuk gelembung-gelembung kecil, yang diserap oleh sel-sel sekitarnya. Kalsium berperan penting pada proses ini. Berbeda dengan nekrosis sel, pada apoptosis tidak timbul reaksi peradangan (14).

Sel-sel tumor telah menemukan cara untuk mengelakkan apoptosis ini, antara lain melalui mutasi dalam gen p-53. Dengan demikian, gen ini tidak bereaksi lagi terhadap kerusakan DNA dan proses reparasi tidak terwujud. Mekanisme yang mengatur apoptosis terganggu dan mutasi DNA yang sudah ada menjadi kekal dan diturunkan kepada sel-sel turunannya, sehingga akhirnya akan terbentuk sel-sel tumor ganas (14).

b. Gen p-53

Disebut juga gen-apoptosis atau *tumor-suppressor gene* memegang peranan esensial pada lebih dari separuh dari semua kanker. Protein ini berfungsi sebagai gen bunuh diri, karena berdaya mencetuskan apoptosis dan bekerja sebagai faktor transkripsi didalam intisel. Oleh karena itu, jumlah total dari pembelahan sel adalah tetap bagi setiap jenis sel. Bila gen p-53 dihambat atau dirusak, maka pertumbuhan sel (ganas) dapat berlangsung secara tak terbatas (14).

Sebagai contoh dapat disebut virus HPV-16 (*human papillomavirus*) yang bertanggung jawab untuk kanker *cervix* (leher rahim). Virus ini mampu memadamkan isyarat darurat sel dengan jalan menginaktivasi gen p-53, sehingga sel-sel tidak mati pada waktunya, tetapi membelah terus-menerus (14).

c. Telomer-telomer

Telomer-telomer juga memegang peranan penting pada terjadinya kanker. Sel-sel sehat memiliki sebuah rantai dari strip DNA kecil (telomer) pada ujung setiap kromosomnya. Sesuai setiap pembelahan, rantai sel telomer ini menjadi semakin pendek dan proses ini merupakan bagian dari proses penuaan. Setelah membelah sekian kali, telomer habis terpakai, pembelahan sel berhenti, dan sel mati. Sel-sel kanker dapat membentuk enzim telomerase yang berdaya mencegah penyingkatan rantai telomer, sehingga sel tumor dimungkinkan untuk membelah terus menerus (14).

d. Faktor lingkungan

Menurut perkiraan, sekitar 80% dari semua kanker yang menerpa manusia diakibatkan oleh pengaruh lingkungan dalam arti seluas-luasnya, yakni pengaruh zat-zat karsinogen dari luar (*exogen*) misalnya pengotoran udara, sinar ultraviolet, radiasi, tembakau dan makanan yang kaya akan lemak hewan dan miskin serat nabati. Untuk sisanya yang bertanggung jawab adalah virus dan radiasi (14).

Faktor-faktor eksogen yang penting adalah pengotoran udara oleh gas-gas buangan mobil, pesawat udara, pabrik dan sebagainya. Sinar ultraviolet dari matahari juga dapat menyebabkan kanker kulit atau melanoma. Radiasi yang terlalu sering dengan dosis tinggi oleh sinar-sinar ionisasi yang kaya akan energi (sinar rontgen dan radio aktif). Salah satu faktor lingkungan yang berperan yaitu tembakau rokok (14).

e. Faktor keturunan

Sejumlah kanker ternyata dapat diturunkan. Sebagai contoh adalah tumor buah dada 10 – 20 % dapat diturunkan ibu kepada anak perempuannya (14).

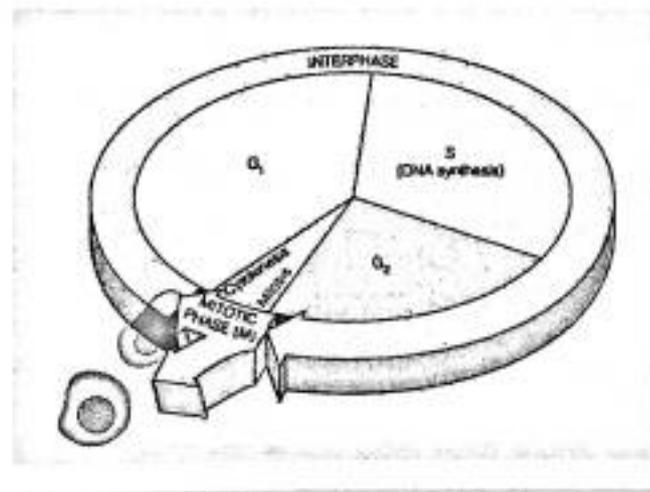
f. Hormon

Merupakan suatu yang mengejutkan bahwa substansi yang terjadi secara alamiah dalam tubuh dan sangat diperlukan untuk fungsi normal tubuh ternyata diikutsertakan paling sedikit ko-faktor dalam karsinogenesis. Estrogen mempunyai kemampuan merangsang pembentukan karsinoma payudara dan endometrium. Steroid androgenik dan anabolik diketahui merangsang terjadinya tumor hepatoseluler pada manusia (15).

II.2.3 Siklus sel

Sifat replikasi dari sel mamalia dijelaskan dalam siklus sel. Secara morfologi pembelahan sel mamalia terjadi dalam dua keadaan dasar yaitu pembelahan sel (mitosis) dan periode interfase. Proses mitosis dimungkinkan untuk diamati dan fase-fase aktivitas kromosom dapat diberi nama. Selama profase membran sel mengalami disintegrasi dan kromosom berkondensasi, kromosom ini membelah sepanjang satu titik pusat sel (metafase) dan kemudian berpisah menuju kutub yang berlawanan (anafase). Akhirnya pembelahan sel terjadi oleh pembelahan membran plasma dan pembentukan membran nukleus baru (telofase) (16).

Periode intermitosis telah diketahui sebagai kejadian biokimia. Penggandaan DNA selama mitosis terjadi hanya dalam bagian interfase. Periode ini disebut fase S (Sintesis), periode setelah kelahiran sel baru dan sebelum fase S disebut fase G_1 dan periode sesudah fase S dan sebelum mitosis disebut fase G_2 . sebagai aktifitas biokimia G_1 terbukti merupakan bagian dari periode intermitosis yang melibatkan enzim-enzim penting untuk sintesa DNA dan makromolekul yang memiliki fungsi khusus dalam sel yang dihasilkan. Fase G_2 dicirikan dengan produksi makromolekul yang dibutuhkan selama mitosis. Siklus sel dapat di gambarkan sebagai berikut:



Gambar 1. Siklus sel pada eukariot: Interfase dan mitosis (sumber: Cambell *et al*, 1999)

Jika fase S mengandung 30 % dari waktu total siklus sel, maka dalam populasi acak siklus sel dianggap 30% dari seluruh sel berada pada fase S pada setiap waktu. Di bawah kondisi kultur optimal tertentu sel

mamalia dapat membelah setiap 10-12 jam. Pembelahan sel memerlukan waktu 1-2 hari (16).

Informasi sel dan kinetika sel-sel kanker menjelaskan efektivitas terbatas sebagian besar obat antikanker yang ada. Informasi ini relevan dengan cara kerja, indikasi, dan penjadwalan obat-obat spesifik siklus sel (CCS= Cell Cycle Specific) dan obat-obat non spesifik siklus sel (NCCS= Non Cell Cycle Specific) (17).

Secara umum obat CCS terbukti paling efektif untuk mengatasi keganasan hematologis dan tumor lain yang sebagian besar sel sedang berproliferasi atau mencapai fase fraksi pertumbuhan. Obat NCCS (sebagian obat ini mengikat DNA dan merusak makromolekul) berguna untuk mengobati tumor padat fraksi pertumbuhan rendah serta tumor fraksi pertumbuhan tinggi (17).

Sebuah tumor yang memiliki proporsi sel yang besar yang aktif dalam siklus sel akan lebih sensitif terhadap obat fase siklus sel spesifik dibandingkan dengan tumor yang memiliki sejumlah sel tidak bersiklus. Disisi lain bahan obat non spesifik bersifat efektif pada kedua keadaan tersebut. Bahan obat spesifik dapat dianggap menguntungkan dalam hal periode pemberian dosis ganda dari obat dapat memberikan akses yang lebih baik terhadap organ target dibandingkan hanya satu kali dosis besar. Sedangkan bahan obat nonspesifik tidak tergantung jadwal pemberian (15).

II.2.4 Kanker Serviks

Serviks uteri terdiri dari ektoserviks yang ditutupi dengan epitel kaya glikogen dan endoserviks, yang dibatasi dengan selapis sel epitel columnar yang mengandung musin. Kedua selapis epitel ini dihubungkan oleh lautan squamocolumnar. Pada sebagian wanita muda epitel columnar banyak ditemui pada ektoserviks yaitu area yang dikenal dengan ektoprian endoservikal, lautan terdapat pada ektoserviks. Dengan berkembangnya usia, epitel columnar ektoservikal kemudian digantikan oleh epitel squamous. Proses ini dikenal sebagai metaplasia squamosa, menghasilkan lautan baru pada tulang internal. Daerah antara lautan baru dan lautan lama disebut daerah transformasi yang merupakan tempat terjadinya lesi servikal premalignan berkembang (7).

Kanker serviks adalah kanker yang disebabkan oleh infeksi HPV (*Human Papilloma Virus*). Papilloma virus adalah virus DNA yang kecil yang infeksiya dapat menyebabkan lesi pada kulit atau sel epitel pipih. HPV dapat mengkode pembentukan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7 yang dapat mengubah keratonisit yang berinteraksi dengan regulator daur sel. Protein E6 berikatan dengan regulator protein p53 dan mendegradasinya. Sedangkan protein E7 berinteraksi dengan anggota kelompok pRb, namun sebenarnya ekspresi viral onkogen ini tidak cukup untuk menimbulkan kanker (18).

Untuk menimbulkan kanker diperlukan peristiwa lain yaitu integrasi viral DNA pada genom sel inang. Peristiwa ini terjadi pada HPV 18 yang berhubungan dengan karsinoma serviks dan biasanya hanya bagian genom viral yang berintegrasi ke dalam genom seluler. mRNA mengkode onkogen E6 dan E7 secara aktif ditranskripsi dari viral DNA yang terintegrasi. Selain E6 dan E7 ada gen-gen lain yang terdapat dalam DNA virus diantaranya E1 dan E2. pada viral DNA yang terintegrasi, ekspresi E1 dan E2 dengan promotor awal HPV 18, sehingga terjadi ikatan dua faktor transkripsi esensial (18).

Sifat umum dari papiloma virus adalah merupakan virus DNA kecil dalam kelas papoviridae dalam bentuk kapsid, genomnya berukuran $\pm 7,9$ KB dan terkode dalam satu galur DNA yang menjadi pembeda antara virus yang satu dengan virus yang lainnya. Partikel virus ini terdiri dari kopi genom sirkuler, terdapat dalam kapsid dengan diameter $\pm 5,5$ nm (7).

II.2.5 Kultur Sel

Kultur sel merupakan proses penumbuhan sel di bawah kondisi terkontrol yang dapat berasal dari jaringan prokariotik atau eukariotik. Dalam praktek, kultur sel yang digunakan hanya berasal dari derivat multiseluler eukariotik, khususnya sel hewan (19).

Kultur sel hewan telah menjadi teknik yang lazim dilakukan dalam laboratorium sejak tahun 1950, tetapi metode pemeliharaan kehidupan

cell line yang telah dipisahkan dari jaringan aslinya diketahui setelah abad ke 19 (19).

Dengan berbagai cara, sel dapat diisolasi dari jaringan untuk kepentingan kultur *ex vivo*. Sel dengan mudah dimurnikan dari darah, walaupun hanya sel darah putih yang dapat tumbuh dalam medium kultur. Sel mononuklear dapat dikeluarkan dari jaringan lembut dengan menggunakan enzim pencernaan misalnya enzim kolagen, tripsin yang dapat memecah matriks ekstraseluler. Sebagai alternatif, sejumlah kecil jaringan dapat ditumbuhkan dalam medium penumbuh, dan sel yang tumbuh siap untuk dikultur. Metode ini dikenal dengan *explant cultur* (19).

Sel yang secara langsung dikulturkan dari jaringan dikenal sebagai kultur sel primer. Kultur sel primer pada beberapa jenis tumor mempunyai jangka waktu hidup yang terbatas. *Cell line* dapat bertahan hidup karena mempunyai kemampuan berproliferasi secara terus-menerus dengan bermutasi secara acak atau dapat memodifikasi diri misalnya mengadakan modifikasi pada gen telomerasi (19).

Sel dapat tumbuh dan terjaga pada temperatur dan campuran gas yang sesuai (idealnya pada suhu 37°C, 5 % CO₂) dalam inkubator sel. Kondisi kultur bervariasi untuk masing-masing tipe sel, dan variasi kondisi untuk tipe-tipe sel tersebut dapat menghasilkan penotipik yang berbeda (19).

Disamping temperatur dan campuran gas, masih banyak komponen lain yang umumnya digunakan sebagai faktor penumbuh dalam medium. Komponen tersebut terdiri dari pH, kadar glukosa, faktor penumbuh dan suplemen nutrisi lainnya. Faktor penumbuh yang biasa digunakan sebagai suplemen dalam medium berasal dari darah hewan, misalnya serum darah sapi. Serum tersebut sangat berpotensi untuk terkontaminasi dengan bakteri atau virus. Untuk menghindari dan mengurangi tingkat kontaminasi, maka penggunaan serum dapat ditiadakan (19).

pH ideal dalam media kultur antara 7,2-7,4 dan selama mengkultur pH dijaga agar tidak turun menjadi 7,0 ke bawah, walaupun banyak sel hibridoma yang masih dapat hidup pada pH 7,0. pH di bawah 6.8 sudah menghambat pertumbuhan sel. Faktor yang mempengaruhi stabilitas pH medium yaitu: kapasitas buffer dan tipe pembuffer, serta kadar glukosa dalam medium. Kapasitas buffer dalam medium dapat ditingkatkan oleh adanya fosfat yang diperoleh dari BSS (Balance Salt Solution). Medium dialiri dengan aliran gas CO₂ 5% yang merupakan komponen Earle's BSS (25 nM NaHCO₃). CO₂ 5% dibutuhkan untuk mempertahankan stabilitas pH medium kultur, walaupun sel yang masih hidup juga mengeluarkan gas CO₂. Sehingga terjadi peningkatan kadar CO₂ dalam headspace yang akan mencegah terjadinya difusi CO₂ keluar dari medium. Akibatnya terjadi pengikatan lemah oleh NaHCO₃ yang menghasilkan H⁺ sehingga dapat menurunkan pH dalam medium.

Kultur sel yang pertumbuhannya cepat misalnya *continuous cell line* seperti HeLa mediumnya harus diganti setelah 3-4 hari karena telah terjadi penurunan pH di bawah 7,0 (20).

Mengganti media sangat penting untuk mengisi kembali nutrisi dan menghindari penimbunan hasil metabolit yang dihasilkan oleh sel yang telah mati. Dalam masalah suspensi kultur ini, sel dapat dipisahkan dari medium dengan cara disentrifuse dan disuspansikan kembali dengan medium yang baru. Untuk kultur yang sifatnya lengket, media dapat dipindahkan secara langsung menggunakan wadah yang baru (19).

Medium RPMI 1640-serum, mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan sel, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel, albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim. Seluruh komponen dalam medium RPMI 1640-serum berguna untuk memberikan nutrisi yang cukup pada sel supaya sel dapat bertahan hidup dan memperbanyak diri (20).

Untuk mengurangi kontaminasi mikroba dapat dilakukan dengan menambahkan antibiotik ke dalam medium dan dikerjakan di dalam laminar air flow (LAF). Banyaknya kontaminasi dapat dilihat dari kecepatan perubahan pH (biasanya terjadi penurunan tetapi beberapa

fungi dapat meningkatkan pH), kekeruhan medium, terdapat granul di bagian luar sel, atau adanya benda asing yang mengapung pada medium. Jika kontaminasi tersebut terlihat maka segera pindahkan gelas kultur dalam keadaan tertutup dan masukkan dalam autoklaf (20).

II.2.6 HeLa Cell Line

Sel HeLa (Hela atau sel hela) merupakan *cell line* yang tidak pernah mati yang digunakan dalam penelitian medis. Sel ini diperoleh dari sel kanker serviks Henrietta Lacks, yang meninggal karena kanker rahimnya pada tahun 1951 (21).

Sel ini dikumpul oleh George Otto Gey tanpa sepengetahuan dan izin dari Lacks, dan kemudian dikomersialkan meskipun tidak pernah dipatenkan dalam bentuk aslinya. Kemudian hingga sekarang tidak pernah diinformasikan kepada pasien atau keluarganya tentang sel ini karena semua bahan yang digunakan selama proses operasi, diagnosa, atau terapi adalah milik pribadi dokter atau institut kesehatan. Isu dan masalah tentang nyonya lacks telah dibahas dalam pengadilan tertinggi di California oleh John Moore v. Pengadilan tersebut membuat keputusan bahwa jaringan atau sel seseorang yang telah diangkat, tidak menjadi milik mereka lagi dan dapat dikomersialkan (21).

Mulanya sel ini dikenal dengan "Helen Lane" atau "Helen Larson", untuk menghindari anonim. Nama asli HeLa digunakan oleh wartawan dalam beberapa tahun setelah kematiannya. Sel ini diperlakukan

sebagai sel kanker yang diperoleh dari biopsi dari luka yang terlihat pada serviks nyonya Lacks yang mengalami kanker. Tetapi perdebatan masih berlanjut dalam mengklasifikasikan sel ini (21).

Sel HeLa disebut *immortal* karena dapat membelah terus menerus dalam kultur sel selama kondisi pertahanan sel dipenuhi (lingkungan yang sesuai dijaga dan dipertahankan), terdapat banyak galur sel HeLa yang terus ditumbuhkan dalam kultur sel namun kesemuanya berasal dari sel yang sama dari nyonya Lacks. Diperkirakan bahwa jumlah total massa sel HeLa yang dikumpulkan dalam sel kultur telah melebihi jumlah sel yang ada dalam tubuh nyonya Henrietta Lacks (21).

HeLa *cell line* dikumpulkan untuk penelitian kanker, sel ini berproliferasi secara abnormal dengan sangat cepat dibandingkan sel kanker lain. Sel HeLa memiliki bagian aktif enzim telomerase selama pembelahan sel yang mencegah pemotongan telomer yang menyebabkan penuaan dan kematian sel. Dengan cara ini sel HeLa mengalami siklus yang mana sejumlah besar sel dapat dihasilkan sebelum mengalami kematian dalam kultur sel (21).

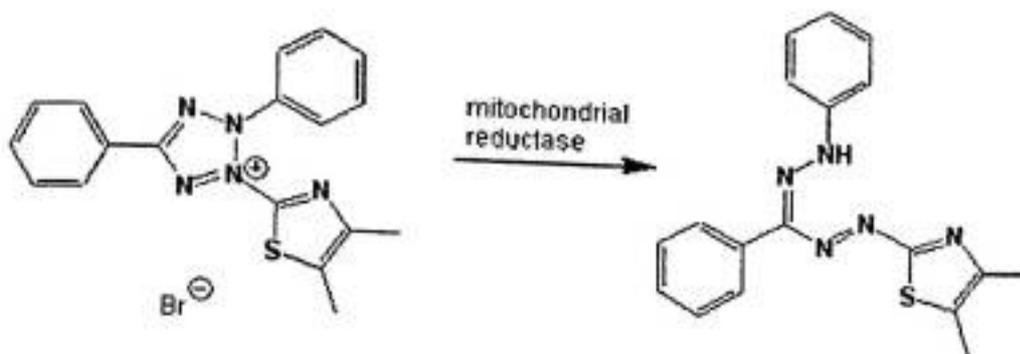
Transfer gen horisontal dari HPV 18 ke sel-sel serviks manusia menghasilkan genom HeLa yang memiliki sifat berbeda dari genom asalnya dengan berbagai variasi termasuk jumlah kromosomnya. Sel

HeLa mempunyai jumlah kromosom sebanyak 82. yang terdiri dari empat kopi kromosom 12 dan tiga kopi kromosom 6, 8, dan 17 (21)

II.2.7 Uji Antiproliferasi Sel

pada tahun 1983 Mosmann memperkenalkan metode kolorimatrik untuk menguji laju proliferasi dan ketahanan sel mamalia yang bersifat kuantitatif. Metode ini berdasarkan reduksi garam tetrazolium MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida} oleh dehidrogenase mitokondria sel membentuk formazan berwarna ungu. Metode ini mengukur respirasi sel dan jumlah formazan yang dihasilkan sebanding dengan jumlah sel hidup dalam kultur. Metode ini sederhana dan merupakan alternatif yang sangat cepat untuk menghitung jumlah sel, memantau pelepasan ^{51}Cr dari sel yang mengalami lisis atau penggabungan (3H)-thymidin ke dalam DNA sel. Metode MTT telah digunakan untuk sel hidup termasuk sel kultur (22).

Pengukuran viabilitas sel dan proliferasi memberikan dasar bagi pengujian populasi sel secara invitro terhadap faktor eksternal. Pengukuran reduksi garam tetrazolium kini diterima secara luas sebagai jalan untuk memeriksa proliferasi sel. Garam kuning tetrazolium MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida} direduksi secara metabolik oleh sel aktif, sebagian oleh aksi enzim dehidrogenase melepaskan NADH dan NADPH. Formazan ungu intraseluler yang dihasilkan bersifat larut dan dapat diukur dengan spektro (22).



Gambar 2. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase (23)

Metode MTT mengukur laju proliferasi sel, ketika proses metabolit yang mengarah ke apoptosis atau nekrosis terjadi, maka terjadi pengurangan viabilitas sel. Pereaksi MTT memberikan absorbansi yang rendah dengan ketidakberadaan sel. Untuk setiap tipe sel, hubungan linier antara jumlah sel dan nilai absorbansi dapat ditentukan, yang dapat memberikan perhitungan akurat terhadap perubahan laju proliferasi (24).

Keuntungan menggunakan metode MTT yaitu proses yang cepat, sederhana, ekonomis karena beberapa tes dapat dilaksanakan sekaligus tanpa masalah radioisotop dan kontaminasi bahan terlarut. Sensifitas MTT tergantung pada tipe sel, status metabolit rata-rata, dan pelarut yang digunakan. Kelemahannya, metode MTT tidak dapat dipakai untuk sampel yang berwarna, karena warna sampel yang akan menyerap sinar UV sehingga absorbansi yang diperoleh menjadi lebih besar dari yang seharusnya dan hasil pengamatan uji sitotoksitas menjadi tidak valid (24)

II.2.8 Ekstrak dan Ekstraksi

II.2.8.1 Definisi Ekstrak dan Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (25).

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan dan termasuk biota laut. Sel tanaman dan hewan berbeda terutama ketebalannya sehingga diperlukan metode ekstraksi dan pelarut tertentu dalam mengekstraksi zat aktif yang berada dalam sel tersebut (26,27).

Umumnya, zat aktif yang terkandung dalam tanaman maupun hewan lebih larut dalam pelarut organik. Proses terekstraksinya zat aktif dalam tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan terlarut sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan pelarut organik diluar sel. Maka larutan terpekat akan berdifusi ke luar sel, dan proses ini berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam sel dan di luar sel (26).

II.2.8.2 Metode Maserasi (26)

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari.

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam larutan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, sitraks dan lain-lain.

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan Yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah ELISA reader (Bio-Rad), hemositometer (Marienfield), inkubator CO₂ (Heraeus-Hera Cell), Laminar Air Flow (LAF) (Gelman Sciences), mikropipet ukuran 5 µl – 50 µl, 50µl - 200 µl, 200 – 1µl (Gylson), mikroskop inverted (Zeiss), otoklaf (Hirayama), pembakar bunsen, pH meter, pipet pasteur, sentrifus (Sorval-Legend RT), shaker (VRN-200), syringe filter 0,2 µm (Sartorius), tabung konikal steril (Nunc), timbangan analitik (Sartorius) dan *waterbath*.

Bahan-bahan yang digunakan adalah botol kultur steril 75 cm² (Nunc), Dimetil Sulfoksida (DMSO) (Fluka), doksorubisin, ekstrak metanol daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco), Fungison (Gibco)0,5%, HCl 0,1 N (Merck), *HeLa cell line* yang diperoleh dari stok LPTT UGM, media RPMI-1640 (sigma), mikroplate 96 sumuran (Nunc), methanol (Merck), NaHCO₃, MTT (3-4-5-dimethyl thiazol-2yl-2-5 difenil tetrazolium bromide) (sigma), Penisilin streptomisin 2% (Gibco), Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) (Merck), Tip steril.

III.2 Cara Penelitian

III.2.1 Penyiapan Sampel

III.2.1.1 Pengambilan Sampel

Sampel daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) diambil dari Desa Lonjoboko, Kecamatan Parangloe, Malino, Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan.

III.2.1.2 Pengolahan Sampel

Daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst).Guill) disortasi basah lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan terhindar dari sinar matahari langsung, setelah kering dipotong-potong.

III.3 Ekstraksi (26)

Sampel yang telah kering kemudian ditimbang sebanyak 500 g, dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan direndam selama 3 hari dengan menggunakan 5 liter pelarut metanol redestilasi sambil sesekali diaduk. Wadah maserasi ditutup rapat dan disimpan di tempat yang tidak terkena sinar matahari langsung. Kemudian disaring, setelah disaring lalu ditambahkan cairan penyari metanol yang baru dan dilakukan maserasi kembali sebanyak 3 kali. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak cair. Ekstrak cair diuapkan dengan cara disimpan dalam eksikator hingga diperoleh ekstrak kental metanol

III.4 Uji Antiproliferasi

Untuk melakukan uji antiproliferasi perlu dilakukan hal sebagai berikut:

1. Sterilisasi Alat (28)

Alat-alat yang digunakan dicuci dengan detergen sintetik dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas perkamen dan disterilkan dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

2. Pembuatan Medium

a. Media RPMI 1640 (28)

Komposisi :

RPMI 1640	10,4 g
NaHCO ₃	2,0 g
Hepes	2,0 g
HCl 0,1 N	
Aqua bidestilata hingga	1 liter
pH	7,2-7,4

Cara pembuatan :

RPMI 1640 dilarutkan dalam aqua bidestillata ± 800 ml, ditambah 2,0 g natrium bikarbonat (NaHCO₃) dan 2,0 g hepès, kemudian ditambah aqua bidestillata sampai volume 1 L. larutan selanjutnya distirer sampai homogen kemudian dibuffer dengan HCl 0,1 N hingga pH-nya 7,2-7,4.

Dengan menggunakan membran filter polietilen sulfon steril berdiameter 0,2 μm media pencuci disaring secara aseptis. Disimpan pada suhu 4°C.

b. Media Kultur Sel (28)

Komposisi :

Media RPMI 1640	175 ml
FBS 10%	20 ml
Penisilin-streptomisin	4,0 ml
Fungison	1,0 ml

Cara pembuatan :

Media kultur sel dibuat dengan cara mencampurkan larutan RPMI 1640 dengan 20 ml Fetal Bovine Serum (FBS) 10%; 4,0 ml penisilin-streptomisin dan 1,0 ml fungison. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilen sulfon steril berdiameter 0,2 μm secara aseptis. Media disimpan pada suhu 4°C.

c. Pembuatan Phosphat Buffered Saline (PBS) (28)

Serbuk PBS (Phosphat buffer saline) tanpa kalsium klorida dan MgCl_2 dilarutkan dalam aquadest kira-kira 800 ml, dicampur dengan menggunakan stirrer sampai semua serbuk larut. Di buat pH 7,2 dengan alat pH meter dan ditambahkan aquadest.

III.5 Pengadaan Sel HeLa

III.5.1 Perbanyak Sel HeLa (20)

Sel diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan dalam penangas air dengan suhu 37°C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan kedalam tabung konikal steril yang berisi medium RPMI 1640. suspensi sel disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, diganti dengan medium RPMI 1640 baru, kemudian diresuspensikan perlahan hingga homogen. Suspensi sel disentrifus lagi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang. Sel ditambah 1 ml medium kultur yang mengandung 20% FBS (Fetal Bovine Serum) dan diresuspensikan hingga homogen. Kemudian sel ditumbuhkan dalam beberapa buah tissue kultur flask kecil, diinkubasikan pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂, setelah 24 jam medium diganti dan sel ditumbuhkan hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian lebih lanjut,

III.5.2 Pemanenan Sel HeLa (20)

Setelah jumlah sel cukup, medium diganti dengan medium RPMI 1640 baru sebanyak 5 ml dan dilepaskan dari dinding tabung. Sel dipindahkan dalam tabung konikal steril dan ditambahkan medium RPMI 1640 sampai volume 10 ml dan disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan medium yang sama.

III.5.3 Perhitungan Sel

Sel yang telah dipanen kemudian dihitung jumlahnya dengan menggunakan hemasitometer di bawah mikroskop inverted. Sebanyak 10 μ l suspensi sel diletakkan di atas hemasitometer kemudian dihitung jumlahnya di bawah mikroskop inverted. Cara perhitungan selnya adalah sebagai berikut : (28)

$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik}}{4} \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

Dari perhitungan diperoleh jumlah sel sebanyak $82,25 \times 10^4$ /ml sel. Untuk mendapatkan konsentrasi sel 2×10^4 sel/sumuran, dapat dihitung dengan:

$$\frac{2 \times 10^4 \times 100 \text{ well}}{82,25 \times 10^4} = 2,43 \text{ ml suspensi sel}$$

Jumlah sel yang diperoleh 2,43 ml kemudian di cukupkan hingga 10 ml dengan menggunakan media kultur. Ke dalam tiap sumuran dimasukkan 100 μ l suspensi sel.

III.6 Penyiapan Bahan Uji

III.6.1 Pembuatan Larutan MTT dalam PBS (24)

Serbuk MTT sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 15 ml PBS, sehingga konsentrasinya 3,33 mg/ml. Tiap sumuran diberi larutan MTT tersebut sebanyak 10 μ l.

III.6.2 Pembuatan Stop Solution SDS (24)

Larutan yang dipakai adalah 10% SDS dalam HCl 0,01 N. Tiap sumuran diberi stop solution sebanyak 100 μ l.

III.6.3 Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak metanol daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) ditimbang sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan dengan DMSO 50 μ l ditambah media biakan sebanyak 1950 μ l. Dari stok senyawa uji dibuat kadar 1000, 500, 250, 125, dan 62,5 μ g/ml.

Pembuatan stok kontrol positif dilakukan dengan melarutkan serbuk doksorubisin dalam aqua proinjeksi seperti yang tertera dalam etiket, kemudian dibuat dengan 5 seri kadar : 1000; 500; 250, 125 dan 62,5 μ g/ml.

III.7 Pengujian Antiproliferasi (24)

Untuk menguji efek antiproliferasi suatu bahan, perlu dilakukan uji viabilitas sel dengan cara dibuat serial dosis terhadap isolat uji yang akan diuji pada sel HeLa yang telah dikulturkan pada 96 well plate, diinkubasi dalam inkubator dengan aliran CO₂ 5% pada suhu 37° C selama 24 jam , supernatan dibuang, ke dalam tiap sumuran ditambahkan 10 μ l larutan MTT dan sumuran diinkubasi selama 4 jam. Di masukkan SDS 10 % dalam HCl 0,01 N sebanyak 100 μ l kemudian dicampur dengan menggoyang-goyangkan di atas shaker. Densitas optik di ukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm, sebagai kontrol blanko digunakan 200 μ l medium tanpa sel dan kontrol negatif digunakan sel yang tidak diberi isolat uji. Kontrol positif digunakan doksorubisin.

III.8 Pengumpulan dan Pengolahan Data

Semua data pengamatan yang telah terkumpul diolah berdasarkan jumlah sel yang mengalami kematian baik kontrol positif maupun perlakuan akan dihitung persentase kematiannya. Persentase kematian merupakan selisih jumlah sel kontrol dengan jumlah sel perlakuan dibagi dengan jumlah sel kontrol dikalikan seratus persen.

$$\% \text{ Kematian} = \frac{(\text{Absorban kontrol negatif} - \text{Absorban blanko}) - (\text{Absorban sampel} - \text{Absorban blanko})}{(\text{Absorban kontrol negatif} - \text{Absorban blanko})} \times 100\%$$

Untuk menentukan daya sitosoksisitas pada penelitian ini digunakan analisa probit, yaitu menghitung harga IC_{50} hasil regresi linear dengan grafik log kadar *versus* probit dimana harga konversi probit sebanding dengan harga persentase kematian sel. Harga IC_{50} (harga 5 pada probit) merupakan harga yang menunjukkan kadar yang dapat mematikan 50 % jumlah sel.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Data hasil pengukuran dengan menggunakan Elisa reader

Tabel I: Data hasil pengukuran viabilitas sel dengan Elisa reader

Ekstrak metanol ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi	Kematian sel HeLa (%)	Probit	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1000	0,227	95,9	6,75	158,4
500	0,349	75,8	5,71	
250	0,536	45,0	4,87	
125	0,561	40,9	4,77	
62,5	0,596	35,2	4,61	
Doksorubisin ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi	Kematian sel HeLa (%)	Probit	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1000	0,339	77,5	5,77	77,9
500	0,421	63,9	5,36	
250	0,442	60,5	5,28	
125	0,449	60,0	5,25	
62,5	0,529	46,2	4,90	

IV.2 Pembahasan

Kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh terganggunya kontrol regulasi pertumbuhan sel-sel normal dalam tubuh. Sel kanker mempunyai kemampuan yang sangat hebat dalam memperbanyak dirinya sendiri (proliferasi) meski seharusnya ia sudah

tidak dibutuhkan dan jumlahnya sudah melebihi kebutuhan yang seharusnya.

Salah satu tanaman yang dipercaya berkhasiat sebagai antikanker adalah daun tanaman parrang romang (*Boehmeria Virgata* (Forst) Guill) yang telah secara empiris digunakan oleh masyarakat Tana Toraja sebagai antikanker.

Metode pengukuran yang digunakan yaitu metode kolorimetrik MTT, metode yang dapat membedakan antara sel yang hidup dan sel yang telah mati. Prinsipnya sel yang masih hidup berarti masih aktif melakukan aktivitas metabolisme sehingga adanya MTT (*3-4-5-dimethyl thiazol-2-yl-2-5 difenil tetrazolium bromide*) pada lingkungannya akan segera dipecah oleh enzim reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat di dalam mitokondria sel tersebut membentuk kristal formazan berwarna ungu. Kristal formazan ini tidak larut dalam air tetapi dapat larut dalam detergen sintetik tertentu misalnya SDS 10% , alcohol dan DMSO. Intensitas warna ini selanjutnya dapat dibaca dengan *ELISA Reader*.

MTT dalam hal ini bersifat sebagai substrat kromogenik. Substrat kromogenik akan bereaksi dengan enzim yang dimiliki oleh sel dan dapat menimbulkan perubahan warna (ungu). Perubahan warna yang terjadi sesuai dengan jumlah sel yang hidup. Aktivitas enzim inilah yang terbaca oleh *ELISA reader*. Semakin banyak enzim, perubahan warna semakin intensif. Semakin intensif warna ungu semakin banyak sel yang masih hidup.

Metode MTT ini lebih sensitif daripada metode trypan blue dan banyak diaplikasikan untuk uji sensitivitas obat, sitotoksisitas, respon terhadap faktor-faktor pertumbuhan dan aktifitas sel. Keuntungan dari metode ini adalah dapat dilakukan dengan mudah dan cepat, reagen-reagen yang digunakan cukup aman, dan hasilnya akurat dan bisa diadaptasikan untuk *High Through Put screening*. Kelemahannya, metode MTT tidak dapat dipakai untuk sampel yang berwarna, karena warna sampel yang akan menyerap sinar UV sehingga absorbansi yang diperoleh menjadi lebih besar dari yang seharusnya dan hasil pengamatan uji sitotoksisitas menjadi tidak valid

Pada pengamatan dibawah mikroskop (kualitatif) yang dilakukan setelah inkubasi overnight, sel Hela yang hidup terlihat berbentuk bulat, bening, cemerlang, tidak keruh pada bagian inti dan sel yang menempel pada dasar sumuran berbentuk lonjong. Sedangkan sel HeLa yang mati terlihat mengapung pada media, bulat, keruh tidak cemerlang dan mempunyai bintik hitam ditengah sel yang menunjukkan adanya kondensasi kromatin. Sedangkan sel yang mengalami nekrosis (perubahan morfologik yang mengikuti kematian sel pada jaringan atau organ hidup (12)) terlihat lonjong dan bagian ujungnya agak terbuka. Hal ini disebabkan karena bagian dalam sitoplasma terbongkar dan menyebabkan hancurnya membran sel.

Uji antiproliferasi (kuantitatif) dilakukan dengan menggunakan seri kadar ekstrak metanol daun parrang romang dengan konsentrasi masing-

masing 1000; 500; 250; 125 dan 62,5 µg/ml. Sampel dilarutkan menggunakan DMSO. Dari masing-masing seri kadar dimasukkan ke dalam 96 sumuran yang berisi 100 µl suspensi sel. Dokсорubisin digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi yang digunakan sama dengan konsentrasi sampel. Dokсорubisin digunakan sebagai kontrol positif karena dokсорubisin merupakan antikanker golongan produk alamiah antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan sel dengan cara mengikat DNA sehingga tidak dapat membentuk RNA. Tanpa produksi RNA, maka sintesis protein tidak dapat terjadi. Dokсорubisin juga bereaksi dengan sitokrom P₄₅₀ reduktase yang dengan adanya MADPH membentuk zat perantara, yang kemudian bereaksi dengan oksigen membentuk radikal bebas yang menghancurkan sel. Pembentukan radikal bebas ini dirangsang oleh adanya Fe (II). Kontrol negatif (kontrol sel tanpa perlakuan) terdiri dari 100 µl suspensi sel dan 900 µl suspensi media. Kontrol blanko terdiri dari medium tanpa sel dan sampel. Jumlah sel yang digunakan yaitu $2 \cdot 10^4$ dalam tiap sumuran (20). Kemudian mikroplate 96 sumuran yang telah berisi sampel uji, kontrol positif, kontrol negative, dan blanko diinkubasi dalam inkubator dengan aliran CO₂ 5% suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah inkubasi 24 jam supernatan dibuang, ditambahkan MTT sebanyak 10 µl dalam tiap sumuran, kemudian diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Garam formazan yang terbentuk selama inkubasi, tidak larut air sehingga dilarutkan dengan penambahan larutan stopper

(stop solution) berisi SDS (sodium dodecyl sulphate) 10% dalam HCl 0,01N sekaligus berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik MTT. Intensitas warna yang terbentuk dapat ditetapkan secara spektrofotometri dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Absorbansi yang diperoleh berbanding lurus dengan sel yang hidup, semakin tinggi absorbansinya semakin banyak pula sel yang masih hidup. Absorbansi yang terukur selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase kematian sel.

Dari data absorbansi ELISA reader dihitung persentase kematian sel. Absorbansi menggambarkan sel yang hidup setelah diberi perlakuan. Persentase kematian sel dihitung dengan selisih jumlah absorbansi sel kontrol dengan jumlah absorbansi sel perlakuan dibagi dengan jumlah absorbansi sel kontrol dikalikan seratus persen.

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan persen kematian sel setelah penambahan ekstrak daun parrang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) pada konsentrasi (1000, 500, 250, 125, dan 62,5 µg/ml) berturut-turut 95,9%, 75,8%, 45%, 40,9%, dan 35,2%. Sedangkan doksorubisin dengan konsentrasi yang sama menghasilkan persen kematian masing-masing 77,5%, 63,9%, 60,5%, 60%, dan 46,2%. Dari data tersebut terlihat bahwa persen kematian berbanding lurus dengan kadar konsentrasi. Makin tinggi konsentrasi yang digunakan makin besar persen kematiannya (terlihat pada gambar 3 dan 4),

Untuk menentukan daya sitotoksitas pada penelitian ini digunakan analisa probit, yaitu menghitung harga IC_{50} hasil regresi linear dengan grafik \log kadar versus probit dimana harga konversi probit sebanding dengan harga persentase kematian sel. Harga IC_{50} merupakan harga yang menunjukkan kadar yang dapat mematikan 50% jumlah sel. Semakin kecil konsentrasi yang dibutuhkan untuk mematikan 50% jumlah sel berarti senyawa tersebut semakin toksik.

Dari hasil perhitungan IC_{50} dengan metode probit diperoleh harga IC_{50} untuk ekstrak metanol daun parrang romang sebesar 158,4 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan untuk Doksorubisin sebesar 77,9 $\mu\text{g/ml}$ (Lampiran perhitungan). Dengan hasil perhitungan IC_{50} ini, dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol daun parrang romang memiliki efek antiproliferasi terhadap sel HeLa namun tidak terlalu poten. Tetapi dokorubisin memiliki efek antiproliferasi yang lebih kuat dibandingkan ekstrak methanol daun parrang romang.

Sumastuti dan sunlimar melaporkan bahwa IC_{50} ekstrak buah dan daun mahkota dewa masing-masing sebesar 196,74 $\mu\text{g/ml}$ dan 812,45 $\mu\text{g/ml}$ memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan sel HeLa, yang diperoleh dengan menggunakan metode penelitian yang sama. Dari data tersebut di atas dapat dilihat bahwa ekstrak metanol daun parrang romang lebih berpotensi dalam penghambatan pertumbuhan sel HeLa dibandingkan ekstrak buah maupun daun mahkota dewa (31)

Perolehan hasil ini disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya masih banyaknya zat-zat yang terkandung dalam ekstrak sehingga perlu dilakukan isolasi senyawa murni yang berefek antiproliferasi. Lama kontak antara sampel dengan sel hanya 24 jam sehingga belum optimal dalam menghambat pertumbuhan sel. Pada penelitian selanjutnya waktu inkubasi diperpanjang sampai jam ke-48 dan jam ke-72.

BAB V

PENUTUP

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil uji efek antiproliferasi terhadap sel HeLa dan analisis data dengan analisa probit dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun pampang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill) memiliki efek antiproliferasi terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 158,4 $\mu\text{g/ml}$ yang lebih besar dibanding doksorubisin dengan nilai IC_{50} sebesar 77,9 $\mu\text{g/ml}$.

V.2 Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan uji antiproliferasi senyawa aktif ekstrak dengan menggunakan sel kanker yang lain dengan menggunakan metode MTT atau dengan metode pewarnaan Trypan blue

DAFTAR PUSTAKA

1. Brink, M and Escotin R.P. 2003. " *Plant Resources of South East Asia*, No 17", Backhuys Publisher, Leiden. (86-91)
2. Hartina. 2005, " *Uji toksisitas Fraksi n-Butanol Daun Parang Romang (Boehmaeria virgata F. Guill) terhadap Larva Udang*" Skripsi jurusan Farmasi, FMIPA. Universitas Hasanuddin
3. Djarta, A. 2000. *Dasar Patologi Penyakit*. Penarbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. (125-127)
4. Schulz, W.A. 2005. *Molecular Biology of Human Cancers*. Department of Urology and Centet for Biological and Medical Reearch. Heinrich Heine University Dusseldorf. Germany . (11)
5. Snell, K., dan Mullock, B., 1987. *Biochemical Toxicology and Approach*. IRL Press. Oxford. (89)
6. Labwork Study Guide and Lecture Note. 2002^a. *Hanrietta Lacks* (Online), (<http://www-micro.msb.le.ac.uk/labworks/lacks/lacks1.htm>, diakses 28 Agustus 2007)
7. Cromme, F.V. 1994. *Expression Of MHC Class I and II Antigens In HPV Associated Cervical Neoplasia*. Vrije University. Amsterdam. (1, 5, 8)
8. Brands, S.J. 2007. *Systēma Nātūrāe 2000. The Taxonomicōn*. Universal Taxonomic Services. Amsterdam. The Netherlands. (online), (<http://sn2000.taxonomy.nl/taxonomicōn/>), diakses 21 Maret 2007.
9. Tambayong, J. 2000,. *Patofisiologi Untuk Keperawatan*, Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. (65)
10. Sibuea, H.W. 1992. *Ilmu Penyakit Dalam*. Rineka Cipta, Jakarta. (217-218)
11. Ganiswarna, N. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. (686-688)

12. Robbins. 1994. *Dasar Patologi Penyakit*. Binarupa aksara. Jakarta Barat. (135)
13. Hodgson, E. 2004. *A Textbook of Modern Toxicology 3rd Edition*. Hoboken. New Jersey. (225)
14. Tjay, T. H., dan Rahardja, K., 2002. *Obat-Obat Penting : khasiat, penggunaan dan efek sampingnya*. Elex Media Komputindo. Jakarta (197-199, 206-211)..
15. Underwood, J.C.E. 2003. *Patologi Umum dan Sistematis*. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta. (283-284)
16. Buick, R.N. 1995. *The cellular Basis of Cancer Chemotherapy*. Vrije University. Amsterdam. (3, 5-9)
17. Katzung, B. G., 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Buku III. Edisi 8. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Salemba Medika. Jakarta (301-302).
18. Desaintes, C., Goyat, S., Yaniv, M., Thierry, F., 1999. *Papilloma Virus E2 Induce p53 Independent Apoptosis in Hela cells*, dalam *Oncogen* (18, 4538-4545).
19. GNU Free Documentation Licence. 2007. *Cell Culture*. (online). http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_Culture. diakses 28 Agustus 2007
20. Freshney, R. I., 1986. *Animal Cell Culture, a Practical Approach*, 1st Edition, IRL Press. Washington DC. (7-10, 39)
21. Anonim. 2007. *HeLa – wikipedia, the free encyclopedia* (online). <http://en.wikipedia.org/wiki/HeLa>. diakses 28 Agustus 2007.
22. Dash, P. 2001. *Nitric Oxide Research Group* (online). file://AMTT_assay.htm. diakses 4 Agustus 2007.
23. GNU Free Documentation License. 2007. *MTT assay* (online), http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay ., diakses 28 Agustus 2007
24. ATCC News Archive. 2006. *MTT cell Proliferation Assay* (Online), <http://www.atcc.org/product/mttcell.cfm>, diakses 2 Juni 2006
25. Direktorat Jenderal, Badan Pengawasan obat dan Makanan. 1979. *"Farmakope Indonesia"*. Edisi III. Jakarta. (9)
26. Direktorat Jenderal, Badan Pengawasan Obat dan Makanan. 1979. *"Sediaan Galenik"*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. (11)

27. Gennaro, A.R., Chase G.D., Rippie, E.G., (eds.), 1990, *Remington's Pharmaceutical Science*, 18th Edition, Mack Publishing Company, Easton-Pensylvania, (1047).
28. Sigma,. 1999. *Biochemical and Reagents*. Sigma-Aldrich.co. South East. USA.(723, 1795)
29. Langdom, S.P. 2005. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Humana Press Inc. Totowa, NJ.
30. Musyidi, A., 1984, *Statistik Farmasi dan Biologi*, Cetakan 1, Ghalia,Indonesia, Jakarta, (157)
31. Sumastuti, R., Sonlimar, M. 2005. *Artikel: Efek Sitotoksik Ekstrak Buah dan Daun Mahkotadewa (Phaleria macrocarpa) Terhadap Sel HeLa*. (Online). <http://www.art-3.go.id/utama.cgi?artikel&&1>. Di akses 15 Desember 2007