

LAPORAN PENELITIAN TAHUN TAHUN KE-2

Judul Penelitian

**PENGEMBANGAN FITOFARMAKA UNTUK ANTIKANKER KOLON
DENGAN BASIS FORMULA CAMPURAN EKSTRAK TERPURIFIKASI
DARI RIMPANG KENCUR (*KAEMPFERIA GALANGA* LINN) DAN HERBA
SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* NESS)**

KK
KKB
LP. 09/12
Suk
P

PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN

No. Pendaftaran On-Line : RT-2011-0164

Fokus Bidang Prioritas

2. Teknologi Kesehatan dan Obat

Kode Produk Target

**2.04. Obat herbal dari tanaman Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto
untuk pengobatan sindrom metabolit dan penyakit lainnya**

Kode Kegiatan

**2.04.17. Uji Klinis terbatas sediaan obat herbal terstandar baik tunggal maupun
campuran tanaman obat : Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto , di
rumah sakit atau puskesmas . Indikasi sindrome metabolik dan penyakit lainnya**

Peneliti Utama

Prof.Dr.Sukardiman, Apt., MS.

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Universitas Airlangga

Kampus C Mulyorejo Surabaya ,

Telp 5995246, Fax 5962066

September, 2011

Lembar Pengesahan

Judul Penelitian

PENGEMBANGAN FITOFARMAKA UNTUK ANTIKANKER KOLON DENGAN BASIS FORMULA CAMPURAN EKSTRAK TERPURIKAFIKASI DARI RIMPANG KENCUR (*KAEMPFERIA GALANGA LINN*) DAN HERBA SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA NESS*)

Fokus Bidang Prioritas : Teknologi kesehatan dan obat
 Kode Produk Target : Obat herbal dari tanaman Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto untuk pengobatan sindrom metabolit dan penyakit lainnya
 Kode Kegiatan : Uji Klinis terbatas sediaan obat herbal terstandar baik tunggal maupun campuran tanaman obat : Temulawak, Jahe, Kencur, Pegagan dan Sambiloto , di rumah sakit atau puskesmas . Indikasi sindrome metabolik dan penyakit lainnya
 Lokasi Penelitian : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya
 Penelitian Tahun Ke : 1

Keterangan Lembaga Pelaksana / Pengelola Penelitian	
A. Lembaga Pelaksana Penelitian	
Nama Peneliti Utama	Prof.Dr.Sukardiman,Apt.,MS.
Nama Lembaga / Institusi	Departemen Farmakognosi - Fitokimia Fakultas Farmasi
Unit Organisasi	Universitas Airlangga
Alamat	Jl.Darmawangsa Dalam Surabaya
Telepone / Faksimile / e-mail	5033710 / 5020514 / maman_ht@yahoo.com
B. Lembaga lain yang terlibat	
Nama Pimpinan	dr.Arijanto Jonosewojo, SpD
Nama Lembaga / Institusi	Poli Obat Tradisional
Unit Organisasi	RSUD Dr.Soetomo
Alamat	Jl. Prof.Dr.Mostopo, Surabaya
Telepone / Faksimile / e-mail	031-5020251 / 031 – 5022472 fk_unair@geocities.com

Jangka Waktu Kegiatan : 3 tahun
 Biaya Tahun-1 : Rp 250.000.000,-
 Biaya Tahun-2 : Rp 241.075.000,-

Rekapitulasi Biaya Tahun yang Diusulkan :

No	Uraian	Jumlah (Rp)
1	Gaji dan Upah	Rp. 78.500.000,-
2	Bahan Habis Pakai	Rp.152.575.000,-
3	Perjalanan	-
4	Lain-lain	Rp. 10.000.000,-
Jumlah biaya tahun yang diusulkan		Rp. 241.075.000,-

Ketua
LPPM
Universitas Airlangga Surabaya

Dr.Djoko Agus Purwanto,Apt.,MSi
NIP : 19590805 198701 1 001

Peneliti Utama

Prof.Dr.Sukardiman,Apt.,MS.
NIP : 19630109 198810 1 001

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
RINGKASAN.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN	42
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	115
DAFTAR PUSTAKA	116

ABSTRAK

Pengembangan Fitofarmaka untuk Antikanker Kolon dengan Basis Campuran Ekstrak Terpurifikasi dari Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga*) Dan Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Sukardiman*, Retno Sari*, Hanni Plumeriastuti**
*Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
**Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Tujuan penelitian ini adalah pengembangan produk fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) sebagai obat fitofarmaka antikanker kolon .

Metodologi dari penelitian ini adalah pengumpulan bahan uji, standarisasi simplisia, pembuatan ekstrak terpurifikasi kencur dengan senyawa marker etil-parametoksinamat (EPMS) dan ekstrak terpurifikasi sambiloto dengan senyawa markernya andrografolida, standarisasi ekstrak terpurifikasi, uji antikanker secara in vitro dengan sel kanker kolon WiDr, desain formulasi , studi bioavailabilitas dari kapsul , uji toksisitas kapsul campuran ekstrak terpurifikasi kencur dan sambiloto, yang meliputi toksisitas akut, sub akut, teratogenik serta uji aktivitas antikanker secara in vivo pada kanker kolon mencit hasil induksi DMBA dan uji klinik terbatas pada pasien kanker kolon di RSUD Dr Sutomo Surabaya.

Hasil penelitian tahun pertama menunjukkan bahwa sampel simplisia herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan rimpang kencur (*Kaempferia pandurata* Roxb) telah dapat di dibuat formulasi farmasetik dalam bentuk kapsul, yang memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia. Serta kapsul campuran fraksi aktif tersebut telah di uji efek toksisitas akut, sub akut dan teratogenik dimana kapsul tersebut tidak menunjukkan efek toksik. Sedangkan pada pengujian antikanker secara in vivo pada hewan coba mencit yang diinduksi dengan DMBA menunjukkan aktivitas antikanker yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Keywords : Antikanker, Ekstrak terpurifikasi , sambiloto, kencur

RINGKASAN PENELITIAN

Kanker kolorektal adalah kanker primer yang berasal dari kolon dan atau rektum. Secara global kanker kolorektal merupakan penyakit keganasan terbanyak urutan ketiga pada wanita dan keempat pada pria, tiap tahunnya dapat diperkirakan terjadi 800.000 kasus baru. Kanker kolon banyak dijumpai di negara industri, sedangkan di negara berkembang insidennya cenderung meningkat. Di Indonesia kanker kolorektal termasuk penyakit keganasan saluran cerna yang paling banyak dijumpai. Kanker kolorektal termasuk juga dalam 10 jenis kanker terbanyak dan menempati urutan ke 6 dari penyakit keganasan yang ada. Usaha penanggulangan terhadap penyakit ini telah banyak dilakukan, utamanya dengan obat-obatan kemoterapi antikanker yang beredar saat ini, tetapi bahaya efek samping yang ditimbulkan oleh obat-obatan tersebut tidak dapat dihindarkan. Oleh karena itu penelitian dan pencarian obat baru khususnya yang berasal dari bahan alam atau tanaman obat terus dikembangkan, baik dalam bentuk obat herbal terstandar (OHT) atau obat fitofarmaka. Kombinasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) banyak digunakan secara tradisional sebagai obat antikanker.

Seiring dengan itu ternyata data ilmiah tentang penelitian antikanker dari kedua tanaman tersebut baik secara in vitro maupun in vivo sudah cukup lengkap, di mana telah diketahui kandungan etil-parametoksinamat (EPMS) dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan kandungan andrografolida dari sambiloto sebagai senyawa bioaktifnya. Senyawa andrografolida dari sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) menunjukkan aktivitas antikanker secara in vitro terhadap sel kanker kolon HT-29 dan melalui mekanisme induksi apoptosis dan hambatan siklooksigenase-2 secara in vitro, serta menghambat kanker kolon mencit hasil induksi DMBA secara in vivo. Senyawa etil-parametoksinamat (EPMS) menunjukkan aktivitas antioksidan, antikanker dan antiinflamasi dengan menghambat enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Dimana pada kanker kolon terjadi peningkatan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang berperan pada proses proliferasi sel, sehingga campuran ekstrak terpurifikasi dari kencur dan sambiloto sangat potensial untuk dikembangkan menjadi sediaan fitofarmaka untuk antikanker kolon, dengan menghambat proliferasi sel kanker melalui mekanisme hambatan siklooksigenase-2 (COX-2).

Hipotesis penelitian ini adalah campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dapat dibuat formula obat fitofarmaka untuk antikanker kolon yang potensial, melalui berbagai rangkaian proses standarisasi bahan baku dan produk akhir, melakukan uji toksisitas, uji praklinik dengan hewan coba serta melakukan uji klinik pada pasien penderita kanker kolon.

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan landasan ilmiah tentang pengembangan produk bahan obat yang berasal dari tanaman khususnya yang berasal dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dengan senyawa marker etil-parametoksinamat (EPMS) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dengan senyawa marker andrografolida, sehingga akan diperoleh sediaan obat fitofarmaka antikanker kolon yang potensial, aman, selektif dan akhirnya dapat digunakan untuk pengobatan kanker kolon di dalam pelayanan kesehatan formal.

Metodologi dari penelitian ini adalah pengumpulan bahan uji, standarisasi simpilisia, pembuatan ekstrak terpurifikasi kencur dengan senyawa marker etil-parametoksinamat (EPMS) dan ekstrak terpurifikasi sambiloto dengan senyawa markernya andrografolida, standarisasi ekstrak terpurifikasi, uji antikanker secara in vitro dengan sel kanker kolon WiDr, desain formulasi, studi bioavailabilitas dari kapsul, uji toksisitas kapsul campuran ekstrak terpurifikasi kencur dan sambiloto, yang meliputi toksisitas akut, sub akut, teratogenik serta uji aktivitas antikanker secara in vivo pada kanker kolon mencit hasil induksi DMBA dan uji klinik terbatas pada pasien kanker kolon di RSUD Dr Sutomo Surabaya.

Hasil penelitian tahun ke dua adalah Dari penelitian uji mutu fisik dan disolusi sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- a. Pada keseragaman bobot kapsul, rata-rata % penyimpangan bobot isi kapsul adalah $1,08\% \pm 0,94$ dengan bobot 0,4170-0,4773 gram dan tidak terdapat kapsul yang isinya

menyimpang di atas 7,5% sampai 15% dari rata-rata isi kapsul. Kapsul memenuhi persyaratan keseragaman bobot.

- b. Hasil rata-rata pengujian waktu hancur kapsul campuran fraksi etil asetat ekstrak herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur adalah $317 \pm 5,29$ detik atau 5 menit lebih 17 detik. Hal ini berarti waktu hancur untuk kapsul memenuhi persyaratan.
- c. Untuk keseragaman kandungan, rata-rata kandungan andrografolida sebesar 105,73% dengan SD sebesar 5,23%, dan rata-rata kandungan etil *p*-metoksisinamat sebesar 98,43% dengan SD sebesar 5,74%, maka keseragaman kandungan andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat dalam kapsul campuran fraksi etil asetat ekstrak herba sambiloto telah memenuhi persyaratan yang telah ditentukan.
- d. Hasil uji disolusi menunjukkan bahwa pada menit ke-120, pelepasan andrografolida sebesar 28,88 mg/L atau 87,01% dengan efisiensi disolusi sebesar 51,39%. Sedangkan pelepasan etil *p*-metoksisinamat sebesar 41,82 mg/L atau 126,11% dengan efisiensi disolusi sebesar 85,66 %.

2. Dari penelitian uji toksisitas akut dan teratogenik yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a. Kapsul campuran fraksi etil asetat diterpen lakton sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dengan perbandingan andrografolida : etil *p*-metoksi sinamat (1:1) mempunyai LD50 21,5 g/kgBB mencit peroral dan termasuk kategori praktis tidak toksik.
- b. Campuran fraksi etil asetat diterpen lakton sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dengan perbandingan andrografolida : etil *p*-metoksi sinamat (1:1) pada dosis 20 mg/kg BB mencit (dosis lazim), 60 mg/kg BB mencit (3 x dosis lazim), dan 100 mg/kgBB mencit (5 x dosis lazim) tidak mempunyai efek teratogenik pada mencit.

3. Dari hasil penelitian uji toksisitas sub akut dapat disimpulkan bahwa campuran fraksi diterpen lakton herba sambiloto dan fraksi minyak rimpang kencur dengan perbandingan kadar andrografolida dan EPMS 1:1 pada 0,54 mg andrografolida/200 g BB tikus dan 0,54 mg EPMS/200 g BB tikus; 1,62mg andrografolida/200 g BB tikus dan 1,62 mg EPMS/200 g BB tikus; serta 2,70 mg andrografolida/200 g BB tikus dan 2,70 mg EPMS/200 g BB tikus yang diberikan selama 95 hari dapat disimpulkan bahwa :

- a. Tidak menyebabkan efek toksisitas pada hati berdasarkan parameter SGOT, SGPT dan pengamatan pada preparat histopatologi hati.
- b. Tidak menyebabkan efek toksisitas pada ginjal menurut parameter BUN, dan kreatinin, tetapi pada pengamatan histopatologi ginjal kelompok dosis III sudah mulai menunjukkan kerusakan.
- c. Tidak menyebabkan efek toksisitas berdasarkan parameter hematologi darah dan peningkatan kadar glukosa

4. Dari hasil penelitian tentang pengaruh pemberian bahan uji campuran fraksi diterpen lakton yang mengandung andrografolida dan fraksi minyak ekstrak etanol yang mengandung etil *p*-metoksisinamat (EPMS) secara peroral pada mencit dengan kanker kolon yang diinduksi DMBA, setelah 7 minggu dari induksi terakhir, berdasarkan parameter derajat inti hiperkromatik, mitosis, dan pleomorfisme dapat disimpulkan bahwa :

- a. Dosis 1 (andrografolida dan EPMS masing-masing 3,9 mg/kgBB mencit) dan dosis 2 (andrografolida dan EPMS masing-masing 11,7 mg/kgBB mencit) memiliki bioaktivitas antikanker, dimana dosis 2 memiliki potensi bioaktivitas antikanker lebih besar dari dosis 1 ($p < 0,05$).
- b. Dosis 1 memiliki bioaktivitas lebih kecil dari kontrol positif (Capecitabine) ($p < 0,05$) sedangkan dosis 2 memiliki bioaktivitas yang sama dengan kontrol positif ($p > 0,05$).



**Departemen Pendidikan Nasional
BADAN PERTIMBANGAN FAKULTAS
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Kampus B – UNAIR: Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286. Telp. (031) 503 3710, Fax (031) 502 0514.

Website : <http://www.unair.ac.id> ; e-mail : farmasi@unair.ac.id

Nomor : 010/BPF.FFUA/XI /2011

07 November 2011

Lamp. : 1 berkas

Perihal : **Rapat Pleno BPF**

Usulan (1) Perpanjangan Guru Besar Emeritus a.n. Prof. Dr. Hj. Siti Sjamsiah, Apt.

Kepada Yang Terhormat :

Pimpinan dan Anggota BPF
Fakultas Farmasi UNAIR
Surabaya

Sehubungan dengan surat Dekan FFUA No. 3016/H3.1.5/KP/2011, perihal sesuai dengan pokok surat, maka dengan ini kami mengundang pimpinan dan anggota BPF FFUA dalam rapat pleno, insya Allah akan diselenggarakan pada :

Hari : Rabu

Tanggal : 09 November 2011

Jam : 10.00 Wib

Tempat : Ruang Sidang FFUA

Acara : Memberi Pertimbangan Usulan

(1) Perpanjangan Guru Besar Emeritus a.n. Prof. Dr. Hj.Siti Sjamsiah., Apt.

Mengingat pentingnya acara, dimohon hadir tepat waktu.

Demikian atas perhatian dan kehadirannya diucapkan terima kasih.

Ketua,

Prof. Dr. Amirudin Prawita, Apt
NIP. 19450101 197603 1 001

Tembusan : Yth. Dekan FFUA



UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS FARMASI

Kampus B UNAIR Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286, Telp. (031-5083710), Faks. (031-5020514)
Website : <http://www.ff.unair.ac.id> - E-mail : farmasi@unair.ac.id



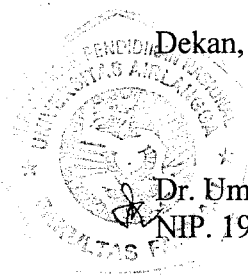
Nomor : 3016 /H3.1.5/KP/2011
Lampiran : 1 (satu) lembar
Hal : **Usulan perpanjangan Guru Besar Emeritus
a.n. Prof. Dr. Siti Sjamsiah,Apt**

19 Oktober 2011

Kepada Yth:
Ketua Badan Pertimbangan Fakultas
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
Surabaya.

Bersama ini kami sampaikan surat dari Ketua Departemen Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Nomor :199/H3.1.5/F.Klin/KP/2011 tanggal 18 Oktober 2011 perihal usulan perpanjangan Guru Besar Emeritus a.n. **Prof. Dr. Siti Sjamsiah,Apt** (foto kopi terlampir) sebagai bahan pertimbangan untuk mendapat persetujuan dalam rapat Badan Pertimbangan Fakultas (BPF) Fakultas Farmasi Unair.

Demikian atas perhatiannya disampaikan terima kasih .



Dekan,

Dr. Umi Athiyah,MS.,Apt

NIP. 19560407 198103 2 001

Tembusan Yth:
Ketua Departemen Farmasi Klinik
Fakultas Farmasi Unair



Universitas Airlangga
Fakultas Farmasi
Departemen Farmasi Klinik

Nomor : 199/H3.1.5/F.Klin/PPD/2011 Surabaya, 18 Oktober 2011
Lampiran : 1 (satu) lembar
Perihal : Kelengkapan persyaratan Perpanjangan
Guru Besar Emeritus
a.n. Prof. Dr. Siti Sjamsiah, Apt.

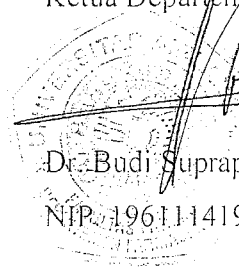
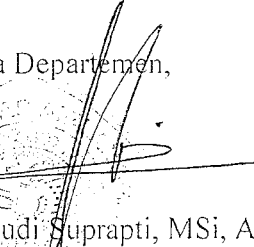
Kepada Yang Terhormat :
Wakil Dekan II
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
Surabaya

Menindaklanjuti surat Saudara No. 2705/H3.1.5/KP/2011 tanggal 22
September 2011, perihal perpanjangan Guru Besar Emeritus a.n Prof. Dr.
Siti Sjamsiah, Apt, maka bersama ini kami kirimkan :

1. Karya ilmiah berupa Modul Farmakoterapi Praktis
 2. Daftar bimbingan Tesis tahun 2010 dan 2011
- Untuk kelengkapan usulan perpanjangan tersebut.

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya, kami sampaikan terima kasih

Ketua Departemen,



Dr. Budi Suprpti, MSi, Apt
NIP. 19611141987012001

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Menurut data dari *American Cancer Society* (ACS), kanker adalah penyebab kematian kedua di Amerika Serikat dengan insiden rata-rata sebesar 2.000 orang per 100.000 penduduk. Serta diperkirakan insiden kanker di Amerika Serikat pada tahun 2007 adalah sebesar 1.440.920 dengan tingkat kematian sebesar 559.650 (Jemal *et al.*, 2007). Lebih dari 70% kematian yang dikarenakan kanker terdapat di negara dengan pendapatan rendah dan menengah, dan bahkan pada negara berkembang masih tinggi. Terjadi peningkatan angka kematian akibat kanker sebesar 30% di negara berkembang (Mathers *et al.*, 2001).

Kanker merupakan suatu penyakit sel yang ditandai dengan pergeseran pada mekanisme kontrol yang mengatur pertahanan, proliferasi dan diferensiasi sel. Sel - sel yang mengalami perubahan tadi berkembang dengan cepat dan membentuk tumor lokal yang dapat menekan atau menyerang struktur jaringan normal di sekitarnya (Chu & Sartorelli, 2007). Istilah kanker sebenarnya digunakan untuk menyebut neoplasma ganas. Neoplasma merupakan kumpulan dari sel kanker yang mengalami perubahan genetik sehingga mengalami dediferensiasi dan invasif terhadap jaringan sekitar (Frizzel, 2001). Kasus kanker yang paling sering ditemui antara lain adalah kanker paru, prostat, payudara dan kolorektal (Balmer *et al.*, 2006).

Kanker kolorektal adalah kanker yang primer berasal dari kolon dan atau rektum. Secara global kanker kolorektal merupakan penyakit keganasan terbanyak urutan ketiga pada wanita dan keempat pada pria, tiap tahunnya dapat diperkirakan terdapat 800.000 kasus baru. Insiden pada pria sedikit lebih banyak dibanding pada wanita. Kanker ini banyak dijumpai di negara industri, sedangkan di negara berkembang insidennya cenderung meningkat (Adi, 2007). Di Indonesia kanker kolorektal termasuk penyakit keganasan saluran cerna yang paling banyak dijumpai. Kanker kolorektal termasuk juga dalam 10 jenis kanker terbanyak dan menempati urutan ke 6 dari penyakit keganasan yang ada (Sutadi, 2003).

Munculnya kanker kolorektal diperkirakan akibat mutasi genetik, perubahan epigenetik, dan instabilitas genomik yang memungkinkan tumbuhnya sel kanker, fungsi inhibisi tidak bekerja, apoptosis menurun dan replikasi, angiogenesis, serta proliferasi menjadi tidak terkendali. Patogenesis kanker kolorektal melibatkan pula faktor lingkungan, di antaranya ialah pola makan yang berinteraksi dengan perubahan genetik tersebut (Adi, 2007).

Terdapat beberapa faktor risiko timbulnya kanker kolorektal, yakni umur, polip adenoma, riwayat keluarga kanker kolon, IBD (*inflammatory bowel disease*) (Adi, 2007; Bresalier, 2002) riwayat kanker indung telur, rahim atau payudara, riwayat *Chron's colitis*, obesitas, merokok, gaya hidup yang tidak sehat (Young, 2003; Medina & Davis, 2006) serta konsumsi lemak dan daging yang berlebihan (Boyle & Langman, 2001; Chao *et al.*, 2005).

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain pembedahan, radiasi, kemoterapi, endokrinopati, imunoterapi, dan terapi hormon (Diyah & Hardjono, 2000; Frizzel, 2001). Obat anti kanker atau kemoterapi yang ideal adalah obat yang mampu membunuh sel kanker tanpa membahayakan sel normal. Sampai sekarang belum dapat ditemukan obat antikanker yang dapat memenuhi kriteria tersebut diatas disamping itu dilaporkan adanya beberapa jenis kanker yang resisten terhadap obat antikanker. Sehingga dewasa ini telah dilakukan usaha-usaha penelitian terhadap pencarian bahan obat antikanker yang lebih selektif yaitu melalui penapisan ataupun isolasi bahan obat dari tanaman, desain rasional senyawa obat baru ataupun penggunaan terapi gen (Chu & Sartorelli, 2007). Oleh karena itu penelitian dan pencarian obat baru khususnya yang berasal dari bahan alam atau tanaman obat terus dikembangkan, baik dalam bentuk obat herbal terstandar (OHT) atau obat fitofarmaka. Kombinasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) banyak digunakan secara tradisional sebagai obat antikanker.

Seiring dengan itu ternyata data ilmiah tentang penelitian antikanker dari kedua tanaman tersebut baik secara *in vitro* maupun *in vivo* sudah cukup lengkap, di mana telah diketahui kandungan etil-parametoksinamat (EPMS) dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan kandungan andrografolida dari sambiloto sebagai senyawa bioaktifnya. Senyawa andrografolida dari sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) menunjukkan aktivitas antikanker secara *in vitro* terhadap sel kanker kolon HT-29 serta menghambat kanker kolon mencit hasil induksi DMBA secara *in vivo* (Matsuda, 1994; Ganguly *et al.*, 2000; Sukardiman, 2003; Kumar, 2004; Satyanarayana *et al.*, 2005). Andrografolida juga memiliki aktivitas antikanker secara *in vivo* pada kanker fibrosarcoma mencit hasil induksi dengan benzopirena dimana dosis 20 mg/kg BB memiliki aktivitas persen hambatan 71,04 %, dosis 40 mg/kg BB aktivitas hambatan sebesar 45 % sedangkan pada dosis 40 mg/kgBB memiliki aktivitas hambatan sebesar 78,15% (Sukardiman, 2005). Hasil penelitian Sukardiman (1999-2000) tersebut juga telah diketahui bahwa senyawa andrografolida (*Andrographis paniculata* Nees) dapat menghambat enzim DNA Topoisomerase sel kanker payudara manusia, dimana enzim DNA Topoisomerase mempunyai fungsi yang penting dalam proses intraseluler, yaitu berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker. Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA Topoisomerase oleh senyawa inhibitor, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi fragmentasi/kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses didalam sel khususnya proses replikasi sel yang diakhiri dengan kematian sel kanker secara apoptosis. Demikian juga kurkumin mampu menginduksi kematian apoptosis dari sel kanker payudara, dengan melalui jalur penurunan level protein Bcl-2 dan kenaikan p53 serta Bax, hal ini ada kemungkinan berhubungan dengan penghambatan terhadap COX (Khar, *et al.*, 1999). Keuntungan penggunaan senyawa antikanker yang memiliki mekanisme kematian secara apoptosis, maka dalam pemakaian klinik nanti diharapkan akan tidak menimbulkan efek samping yang besar dan selain memiliki aktivitas antikanker juga memiliki aktivitas kemopreventif.

Senyawa etil-parametoksinamat (EPMS) menunjukkan aktivitas antioksidan, antikanker (Xue *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 1993) dan antiinflamasi dengan (Haniastuti dkk, 2003) dengan menghambat enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Dimana pada kanker kolon terjadi peningkatan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang berperan pada proses proliferasi sel, sehingga campuran ekstrak terpurifikasi dari kencur dan sambiloto sangat potensial untuk dikembangkan

menjadi sediaan fitofarmaka untuk antikanker kolon, dengan menghambat proliferasi sel kanker melalui mekanisme hambatan siklooksigenase-2 (COX-2).

Ekstrak terpurifikasi adalah hasil proses fraksinasi dari crude ekstrak dengan metode partisi dengan pelarut yang sesuai sehingga akan diperoleh fraksi aktif dengan konsentrasi senyawa bioaktif yang lebih tinggi dan diharapkan memiliki aktivitas yang lebih poten. Ekstrak terpurifikasi dari sambiloto adalah fraksi diterpen lakton dengan kandungan utama andrografolida, sedangkan ekstrak terpurifikasi dari kencur adalah fraksi etil-parametoksinamat (EPMS). Obat fitofarmaka adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, di mana bahan baku dan produk jadinya telah terstandarisasi. Sebagai upaya meningkatkan status obat tradisional dari campuran kencur dan sambiloto menjadi sediaan fitofarmaka maka sediaan tersebut harus dibuat dalam bentuk ekstrak terpurifikasi yang tersandar, serta memenuhi beberapa persyaratan antara lain: (1) jaminan quality (kualitas), di mana bahan simplisia dan produk akhir harus memenuhi persyaratan tentang kejegan dari kandungan aktif (senyawa marker), (2) jaminan safety (keamanan), di mana produk akhir harus aman atau tidak toksik pada hewan coba yang dipersyaratkan dan (3) jaminan efficacy (manfaat), di mana produk akhir campuran kunyit dan sambiloto harus menunjukkan aktivitas antikanker pada uji praklinik dengan hewan coba, dan menunjukkan aktivitas antikanker pada uji klinik dengan manusia.

Pada penelitian ini digunakan formula kombinasi dengan alasan untuk meningkatkan potensi antikankernya, karena kedua senyawa bioaktif dari etil-parametoksinamat (EPMS) dan andrografolida memiliki aktivitas antikanker yang sama terhadap kanker kolon manusia baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Serta mekanisme antikankernya adalah dengan menginduksi apoptosis sehingga diharapkan adanya efek yang lebih poten, selektif, memiliki efek samping yang lebih kecil dan diharapkan juga penggunaan dosis pemakaiannya juga relatif lebih kecil.

Berdasarkan tinjauan state of the art review atas paten / riset terdahulu, ternyata formula kombinasi dari campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) menjadi obat fitofarmaka untuk antikanker kolon; sampai saat proposal ini ditulis belum ada penelitian sejenis serta belum ada paten yang terdaftar di Direktorat Jenderal Hak Kekayaan Intelektual - Departemen Hukum dan Hak Asasi Manusia RI. Sehingga masih terbuka untuk dilakukan usaha mengajukan paten terhadap proses fraksinasi maupun formula kombinasi dari campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur dan sambiloto.

Tujuan umum penelitian ini adalah membuat formula campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) menjadi obat fitofarmaka untuk antikanker kolon yang potensial, melalui berbagai rangkaian proses standarisasi bahan baku dan produk akhir, melakukan uji toksisitas, uji praklinik dengan hewan coba serta melakukan uji klinik pada pasien penderita kanker kolon.

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan landasan ilmiah tentang pengembangan produk bahan obat yang berasal dari tanaman khususnya yang berasal dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dengan senyawa marker etil-parametoksinamat (EPMS) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dengan senyawa marker andrografolida, sehingga

akan diperoleh sediaan obat fitofarmaka antikanker kolon yang potensial, aman, selektif dan akhirnya dapat digunakan untuk pengobatan kanker kolon di dalam pelayanan kesehatan formal.

Metodologi dari penelitian ini adalah pengumpulan bahan uji, standarisasi simplisia, pembuatan ekstrak terpurifikasi kencur dengan senyawa marker etil-parametoksinamat (EPMS) dan ekstrak terpurifikasi sambiloto dengan senyawa markernya andrografolida, standarisasi ekstrak terpurifikasi, uji antikanker secara *in vitro* dengan sel kanker kolon WiDr, desain formulasi, studi bioavailabilitas dari kapsul, uji toksisitas kapsul campuran ekstrak terpurifikasi kencur dan sambiloto, yang meliputi toksisitas akut, sub akut, teratogenik serta uji aktivitas antikanker secara *in vivo* pada kanker kolon mencit hasil induksi DMBA dan uji klinik terbatas pada pasien kanker kolon di RSUD Dr Sutomo Surabaya.

1.2. Rumusan Masalah

Kanker kolorektal adalah kanker yang primer berasal dari kolon dan atau rektum. Secara global kanker kolorektal merupakan penyakit keganasan terbanyak urutan ketiga pada wanita dan keempat pada pria, tiap tahunnya dapat diperkirakan terdapat 800.000 kasus baru. Insiden pada pria sedikit lebih banyak dibanding pada wanita. Kanker ini banyak dijumpai di negara industri, sedangkan di negara berkembang insidennya cenderung meningkat. Di Indonesia kanker kolorektal termasuk penyakit keganasan saluran cerna yang paling banyak dijumpai. Kanker kolorektal termasuk juga dalam 10 jenis kanker terbanyak dan menempati urutan ke 6 dari penyakit keganasan yang ada. Oleh karena itu penelitian dan pencarian obat baru khususnya yang berasal dari bahan alam atau tanaman obat terus dikembangkan, baik dalam bentuk obat herbal terstandar (OHT) atau obat fitofarmaka. Kombinasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) banyak digunakan secara tradisional sebagai obat antikanker.

Dari uraian tersebut diatas maka dapat dirumuskan masalahnya sebagai berikut :

1. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki aktivitas antikanker secara *in vitro* dan *in vivo* ?
2. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki efek toksik pada hewan coba yang meliputi toksisitas akut, sub akut, efek teratogenik ?
3. Apakah sediaan fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki aktivitas antikanker terhadap pasien kanker kolon pada uji klinik ?

1.3. Tujuan Umum Penelitian

Membuat produk fitofarmaka campuran ekstrak terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) sebagai obat antikanker kolon.

1.3.1. Tujuan Khusus Penelitian

1. Menentukan standarisasi simplisia rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).
2. Melakukan fraksinasi ekstrak dan standarisasi fraksi terpurifikasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).
3. Menentukan uji aktivitas antikanker dan uji induksi apoptosis campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap sel kanker kolon manusia WiDr secara in vitro.
4. Studi pembuatan formula kapsul campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan penentuan mutu fisik dan disolusinya.
5. Penentuan uji toksisitas produk fitofarmaka dari campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yang meliputi toksisitas akut, toksisitas sub-akut, uji teratogenik.
6. Penentuan uji aktivitas antikanker produk fitofarmaka dari campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) secara in vivo pada hewan coba yang diinduksi dengan DMBA .
7. Penentuan uji klinik produk fitofarmaka dari campuran ekstrak terpurifikasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap pasien kanker kolon.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Tinjauan Tentang *Kaempferia galanga* Linn.

1.1.1 Klasifikasi Tanaman

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Kaempferia</i>
Spesies	: <i>Kaempferia galanga</i> Linn.

(Backer, 1968)



(a)



(b)

Gambar 2.2 (a) *Kaempferia galanga* Linn (Abdullah, 2009)

(b) Rimpang kencur

1.1.2. Nama Daerah *Kaempferia galanga* Linn.

- Indonesia : Kencur (Heyne, 1987)
- Malaysia : Cekur
- Myanmar : Kunzah gamon
- Filipina : Gisol
- Vietnam : Dia Lien
- Thailand : Proh Hom (Sae-wong *et al.*, 2008)
- Inggris : East Indies Galangale

1.1.3. Morfologi *Kaempferia galanga* Linn.

Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) termasuk suku tumbuhan Zingiberaceae dengan ciri-ciri terana yang hampir menutupi tanah, tidak berbatang, berdesak-desakan, akar-akarnya berbentuk gelendong, kadang-kadang berumbi. Terdapat dua tipe pertumbuhan, yang pertama berdaun lebar dan terhampar di atas tanah, yang kedua berdaun sempit dan agak tegak.

Rimpang kencur mempunyai aroma yang spesifik. Daging buah berwarna putih dan kulit luarnya berwarna coklat. Jumlah helaian daun tidak lebih dari 2-3 lembar dengan susunan berhadapan. Bunganya tersusun setengah duduk dengan mahkota bunga berjumlah antara 4 – 12 buah, bibir bunga berwarna lembayung dengan warna putih lebih dominan. Kencur tumbuh dan berkembang pada musim tertentu, yaitu pada musim penghujan. Kencur dapat ditanam dalam pot

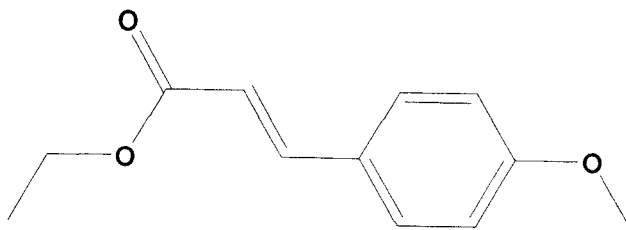
atau di kebun yang cukup sinar matahari, tidak terlalu basah dan di tempat terbuka (Departemen Kesehatan RI, 1977).

1.1.4. Penyebaran *Kaempferia galanga* Linn.

Penyebaran pertumbuhannya meliputi Indonesia, Malaysia, dan India. Kencur dapat tumbuh subur di dataran rendah atau pegunungan yang tanahnya gembur dan tidak terlalu banyak air (Departemen Kesehatan RI, 1977).

1.1.5. Kandungan *Kaempferia galanga* Linn.

Rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) mengandung 1,11% minyak atsiri yang terdiri dari komponen α -pinena (1.28%), camphene (2.47%), karvon (11.13%), benzene (1.33%), eucalyptol (9.59%), borneol (2.87%), metil sinamat (23.23%), pentadekana (6.41%), dan etil-*p*-metoksisinamat (31.77%) (Tewtrakul *et al.*, 2005).



Gambar 2.3 Etil *p*-metoksisinamat

1.1.6. Kegunaan *Kaempferia galanga* Linn.

Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) secara ekstensif telah digunakan untuk treatment berbagai macam penyakit antara lain hipertensi, rematik, dan asma. Di Thailand, rimpang kencur digunakan untuk mengurangi sakit gigi, nyeri abdomen, inflamasi pada otot, dan rematik (Sirirugsa, 1997). Indikasi lain yang sering digunakan dari tanaman ini selain untuk hipertensi adalah untuk rematik, asma, sakit kepala, batuk, sakit gigi, dan terapi untuk luka dan memar (Perry & Metzger, 1980). Di Malaysia dan Indonesia, tanaman ini digunakan untuk obat kumur, daun dan rimpangnya dikunyah untuk mengobati batuk, obat gosok, dan digunakan sebagai lotion untuk mengobati berbagai penyakit. Hasil sari dari rimpang kencur digunakan sebagai ekspektoran dan karminatif, dan biasanya merupakan bagian dari pengobatan untuk anak-anak

(Othman *et al.*, 2006). Di Cina, tanaman ini digunakan untuk mengobati sakit gigi, sebagai stimulan, karminatif untuk kolera, mengatasi luka memar, sakit di dada, sakit kepala, dan konstipasi (Ibrahim & Rahman, 1988; Mustafa *et al.*, 1995).

Beberapa aktivitas farmakologi dari *Kaempferia galanga* Linn. telah dilaporkan, sebagai contoh adalah untuk *muscle relaxant* (Hidir & Ibrahim, 1991) dan *vasorelaxant* (Othman *et al.*, 2006; Mustafa *et al.*, 1996).

Ekstrak methanol dari *Kaempferia galanga* Linn. yang mengandung etil *p*-metoksisinamat dilaporkan memiliki aktivitas antinosisepsi dengan penghambatan terhadap enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) (Sae-wong *et al.*, 2008) dan sitotoksitas yang besar terhadap sel HeLa (Kosuge *et al.*, 1985). Pada studi terbaru, *Kaempferia galanga* Linn. dipilih karena merupakan salah satu tanaman obat yang banyak digunakan untuk mengobati nyeri abdomen, sakit gigi, bengkak, dan rematik (Sae-wong *et al.*, 2008).

2.2 Tinjauan tentang Tanaman *Andrographis paniculata* Nees.

2.2.1 Klasifikasi Sambiloto (*A. paniculata* Nees)

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak Kelas	: Sympetalae
Bangsa	: Tubiflorae
Suku	: Acanthaceae
Marga	: <i>Andrographis</i>
Jenis	: <i>Andrographis paniculata</i> Nees.

(Backer dan Van der Brink Jr., 1965; Depkes RI, 1979; Sugiarti dan Johny, 1991)

2.2.2 Nama Daerah Sambiloto (*A. paniculata* Nees.)

Ki oray, Ki peurat, takilo (Sunda), bidara, sadilata, sambilata, takila (Jawa), pepaitan (Sumatra), yi jian xi, lan he lian (China), xuyen tem liem, cong cong (Vietnam), kirata, mahatitka (India/Pakistan), creat, green chiretta, halviva, kariyat (Inggris) (Depkes RI, 1979; Sugiarti dan Johny, 1991).

2.2.3 Morfologi Sambiloto (*A. paniculata* Ness.)

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) merupakan tanaman terna, tumbuh tegak, tinggi 40 cm sampai 90 cm, percabangan banyak dengan letak yang berlawanan, cabang berbentuk segi empat dan tidak berambut. Bentuk daun lanset, ujung daun dan pangkal daun tajam atau agak tajam, tepi daun rata, panjang daun 3 cm sampai 12 cm dan lebar 1 cm sampai 3 cm, panjang tangkai 5 mm sampai 25 mm; daun bagian atas bentuknya seperti pelindung.

Perbungaan tegak bercabang-cabang, gagang bunga 3 mm sampai 7 mm, panjang kelopak bunga 3 mm sampai 4 mm. Bunga berbibir tabung, panjang 6 mm, bibir bunga bagian atas berwarna putih dengan warna kuning di bagian atasnya, ukurannya 7 mm sampai 8 mm, bibir bunga bawah lebar berbentuk biji, berwarna ungu dan panjang 6 mm. Tangkai sari sempit dan melebar pada bagian pangkal, panjang 6 mm.

Bentuk buah jorong dengan ujung yang tajam, panjang lebih kurang 2 cm, bila tua akan pecah terbagi menjadi empat keping (Depkes RI, 1979, 2003).

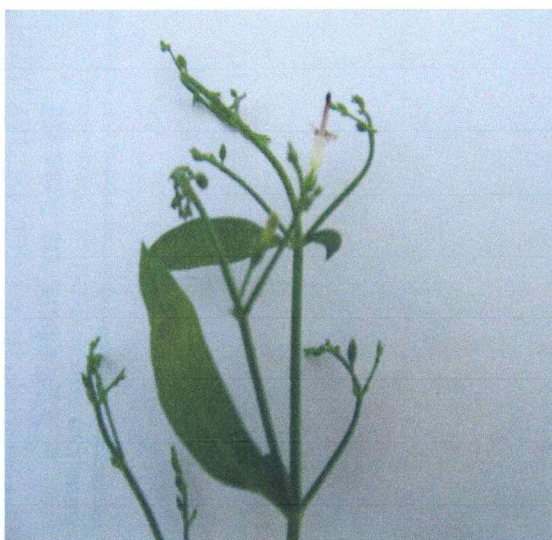
2.2.4 Tinjauan tentang Herba Sambiloto (*A. paniculata* Ness.)

Herba sambiloto adalah bagian di atas tanah tanaman *Andrographis paniculata* Nees. Tidak berbau, rasa sangat pahit. Batang tidak berambut, tebal 2 mm sampai 6 mm, jelas persegi empat, batang bagian atas seringkali dengan sudut agak berusuk. Daun bersilang berhadapan, umumnya terlepas dari batang, bentuk lanset sampai bentuk lidah tombak, panjang 2 cm sampai 7 cm, lebar 1 cm sampai 3 cm, rapuh, tipis, tidak berambut, pangkal daun runcing, tepi daun rata. Permukaan atas berwarna hijau tua atau hijau kecoklatan, permukaan bawah berwarna hijau pucat. Tangkai daun pendek.

Kelopak bunga terdiri dari lima helai daun kelopak, panjang 3 mm sampai 4 mm, berambut. Daun mahkota berwarna putih sampai keunguan. Buah berbentuk jorong, pangkal dan ujung tajam, panjang lebih kurang 2 cm, lebar lebih kurang 4 mm, kadang-kadang pecah secara membujur menjadi lima keping. Permukaan luar kulit buah berwarna putih atau putih kelabu. Biji agak keras, panjang 1,5 mm sampai 3 mm, lebar lebih kurang 2 mm; permukaan luar berwarna coklat muda bertonjol-tonjol. Pada penampang melintang biji terlihat endosperm berwarna kuning kecoklatan, lembaga berwarna putih kekuningan.

Pada daun, epidermis atas terdiri atas satu lapis sel berbentuk polygonal, tidak mempunyai stomata, dan pada epidermis terdapat sistolit berbentuk jorong atau bulat telur panjang. Bentuk

sistolit mirip rangkaian anggur. Rambut kelenjar banyak, rambut penutup sedikit. Pada epidermis bawah banyak ditemukan stomata tipe bidiasitik dan diasitik, rambut kelenjar dan litosis lebih banyak. Berkas pembuluh tipe bikolateral. Pada batang terdapat epidermis yang terdiri dari satu lapis sel, rambut kelenjar dan litosis. Di bawah epidermis ada jaringan kolenkim, parenkim korteks, xylem, floem, kambium dan empulur. Pada batang sambiloto masih terdapat warna hijau seperti pada daun karena masih mengandung kloroplas yang disebut klorenkim (Depkes RI, 1979; Standard of ASEAN Herbal Medicine, 1993).



Gambar 2.5 *Andrographis paniculata* Nees.

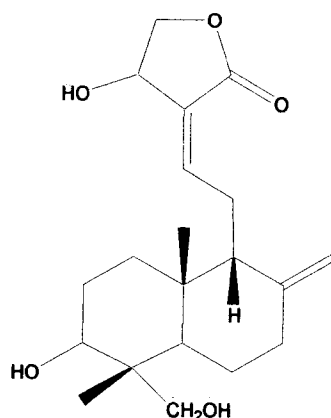
2.2.5 Penyebaran Tanaman

Tumbuh di India, semenanjung Malaya dan hampir di seluruh Indonesia pada tempat terbuka, di kebun, di tepi sungai, pada tanah yang gembur, seringkali tumbuh berkelompok. Tumbuh pada ketinggian tempat 1 m sampai 700 m di atas permukaan laut (Depkes RI, 1979).

2.2.6 Kandungan Kimia

Komponen utama sambiloto adalah andrografolida yang berguna sebagai bahan obat. Kandungan lakton lain adalah neoandrografolida, deoksiandrografolida, androneoandrografolida, 14-deoksi 11,12-didehidroksiandrografolida (dehidroandrografolida), homo andrographolide, andrographan, andrographon, andrographosterin, β -sitosterol-D-glucoside. Disamping itu, daun

sambiloto mengandung saponin, flavonoid meliputi polimetoksi flavon, andrografin, panicolin, mono-o-metilwightin dan apigenin-7,4-dimetil eter, alkaloid dan tanin. Kandungan kimia lain terdapat pada daun dan batang adalah lakton, kalmegin dan hablur kuning yang memiliki rasa pahit (Chang, 1987; Depkes RI, 1979; Matsuda, dkk, 1994; Yusron dkk, 2005).



Gambar 2.6 Struktur Andrografolida

2.2.7 Kegunaan Sambiloto (*Andrograpis paniculata* Ness.)

Hepatitis, infeksi saluran empedu, disetri basiler, tifoid, diare, influenza, radang amandel (tonsilitis), abses paru, malaria, radang paru (pneumonia), radang saluran napas (bronkhitis), radang ginjal akut (pielonefritis), radang telinga tengah (OMA), Radang usus Buntu, sakit gigi, demam, kencing nanah (gonore), kencing manis (DM), TB paru, skrofuloderma, batuk rejan (pertusis), sesak nafas (asma), leptospirosis, darah tinggi, (hipertensi), kusta, keracunan oleh jamur, singkong, tempe bongkreng, makanan laut, kanker: penyakit trofoblas, kehamilan anggur (molahidatidosa), trofoblas ganas (tumor trofoblas), tumor paru, obat HIV dan kanker (Depkes RI, 1979; Yusron, dkk, 2005). Obat HIV dan kanker (Yusron, dkk, 2005), anti kanker (Rajagopal, 2003; Sukardiman, 1997), anti kanker payudara (Sukardiman, 2002), malaria (Suyanto, 1995; Kusumawardhani, 2005), sebagai imunostimulan (Puri *et al.*, 1993), hepatoprotektif (Handa dan Sharma, 1990), dan antidiare (Gupta *et al.*, 1990), anti piretik (Madav *et al.*, 1995), dll.

2.3. Tinjauan Tentang Standardisasi

Standardisasi simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang akan digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan yang tercantum dalam monografi terbitan resmi pemerintah sebagai pihak pembina dan pengawasan (Materia Medika Indonesia) yang meliputi makroskopis, mikroskopis (irisan dan serbuk) serta kimia (Depkes RI, 1989).

2.4. Tinjauan Tentang Simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang digunakan sebagai obat, belum mengalami pengolahan apapun, umumnya dalam keadaan kering, langsung digunakan sebagai obat dalam atau banyak digunakan sebagai obat dalam sediaan galenik tertentu atau digunakan sebagai bahan dasar untuk memperoleh bahan baku obat. Sedangkan sediaan galenik berupa ekstrak total mengandung 2 atau lebih senyawa kimia yang mempunyai aktifitas farmakologi dan diperoleh sebagai produk ekstraksi bahan alam serta langsung digunakan sebagai obat atau digunakan setelah dibuat bentuk formulasi sediaan obat tertentu yang sesuai (Depdikbud, 1984).

Dalam buku "Materia Medika Indonesia" ditetapkan definisi bahwa simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 2000).

2.4.1 Klasifikasi Simplisia

Simplisia dibagi menjadi 3 golongan yaitu: simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral) (Midian dkk, 1985).

2.4.1.1 Simplisia Nabati

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman/eksudat tanaman (Depkes RI, 1979). Yang dimaksud dengan eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya (Midian dkk, 1985).

2.4.1.2 Simplisia Hewani

Simplisia hewani ialah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni (Midian dkk, 1985).

2.4.1.3 Simplisia Pelikan (Mineral)

Simplisia pelikan atau mineral ialah simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Midian dkk, 1985).

2.5. 2. Pembuatan simplisia secara umum

2.4.2.1 Pengumpulan bahan baku

Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda antara lain tergantung pada :

1. Bagian tanaman yang digunakan
2. Umur tanaman atau bagian tanaman pada saat panen
3. Waktu panen
4. Lingkungan tempat tumbuh

Waktu panen sangat erat hubungannya dengan pembentukan senyawa aktif di dalam bagian tanaman yang akan dipanen. Waktu panen yang tepat pada saat bagian tanaman tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah terbesar. Senyawa aktif terbentuk secara maksimal di dalam bagian tanaman atau tanaman pada umur tertentu. Penentuan waktu panen dalam sehari juga perlu dipertimbangkan karena kestabilan kimia dan fisik senyawa aktif dari beberapa simplisia yang mengandung minyak atsiri dipengaruhi oleh sinar matahari.

Panen dilakukan dengan tangan, menggunakan alat atau mesin. Ketrampilan memetik sangat diperlukan agar diperoleh simplisia yang benar, tidak tercampur dengan bagian tanaman lain dan tidak merusak tanaman induk. Alat yang terbuat dari logam sebaiknya tidak digunakan bila diperkirakan akan merusak senyawa aktif simplisia seperti : fenol, glikosida dan sebagainya.

Tanaman yang pada saat panen diambil rimpangnya, pengambilan dilakukan pada musim kering dengan tanda-tanda mengeringnya bagian atas tanaman. Dalam keadaan ini, rimpang dalam keadaan besar maksimum. Cara pengumpulan simplisia yang berupa rimpang yaitu ; rimpang dicabut, dibersihkan dari akar, dipotong dengan ketebalan tertentu (Depkes RI, 1985).

2.4.2.2. Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk menghilangkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Misalnya pada simplisia yang dibuat dari akar suatu tanaman obat, bahan-bahan asing seperti tanah, serta pengotoran lainnya harus dibuang. Tanah mengandung bermacam-macam mikroba dalam jumlah yang tinggi, oleh karena itu pembersihan simplisia dari tanah yang terikut dapat mengurangi jumlah mikroba awal (Depkes RI, 1985).

2.4.2.3. Pencucian

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotoran lainnya yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur atau air PAM. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut di dalam air yang mengalir, pencucian agar dilakukan dalam waktu sesingkat mungkin. Cara sortasi dan pencucian sangat mempengaruhi jenis dan jumlah mikroba awal simplisia. Misalnya jika air yang digunakan untuk pencucian kotor, maka akan menambah jumlah mikroba dan air pada permukaan bahan simplisia yang akan mempercepat pertumbuhan mikroba (Depkes RI, 1985).

2.4.2.4. Perajangan

Beberapa jenis bahan simplisia perlu mengalami proses perajangan. Perajangan bahan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Tanaman yang baru diambil jangan langsung dirajang tetapi dijemur dalam keadaan utuh selama 1 hari. Hal ini diperlukan untuk menghindari pewarnaan akibat reaksi antara bahan dengan logam pisau. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki. Semakin tipis bahan yang akan dikeringkan, semakin cepat penguapan air, sehingga mempercepat waktu pengeringan. Akan tetapi irisan yang terlalu tipis juga dapat menyebabkan berkurangnya atau hilangnya zat berkhasiat yang mudah menguap, sehingga mempengaruhi komposisi, bau dan rasa yang diinginkan (Depkes RI, 1985).

2.4.2.5. Pengeringan

Tujuan pengeringan ialah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Dengan mengurangi kadar air dan

menghentikan reaksi enzimatik akan dicegah penurunan mutu atau perusakan simplisia. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan sinar matahari atau menggunakan suatu alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama proses pengeringan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan.

Pada dasarnya dikenal dua cara pengeringan, yaitu pengeringan secara alamiah dan buatan. Pengeringan alamiah dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan panas sinar matahari langsung dan dengan diangin-anginkan. Pengeringan dengan sinar matahari langsung dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu, kulit kayu, biji, dan mengandung senyawa aktif yang relatif stabil. Kecepatan pengeringan dari cara ini sangat tergantung pada keadaan iklim, sehingga baik jika dilakukan di daerah yang udaranya panas atau kelembabannya rendah, serta tidak turun hujan. Pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan tidak dipanaskan dengan sinar matahari langsung digunakan untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga, daun dan bagian tanaman yang mengandung senyawa aktif mudah menguap. Pada pengeringan buatan digunakan suatu alat yang suhu, kelembaban, tekanan dan aliran udaranya dapat diatur. Dengan menggunakan alat ini dapat diperoleh simplisia dengan mutu yang lebih baik karena pengeringan akan lebih merata dan waktu pengeringan lebih cepat tanpa dipengaruhi oleh keadaan cuaca (Depkes RI, 1985).

2.4.2.6. Sortasi kering

Sortasi setelah pengeringan sebenarnya merupakan tahap akhir pembuatan simplisia. Tujuan sortasi untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Proses ini dilakukan sebelum simplisia dibungkus untuk kemudian disimpan. Seperti halnya pada sortasi awal, sortasi disini dapat dilakukan dengan atau secara mekanik. Pada simplisia bentuk rimpang, jumlah akar yang melekat pada rimpang terlampau besar dan harus dibuang (Depkes RI, 1985).

2.4.2.7 Pengepakan dan Penyimpanan

Simplisia dapat rusak, mundur atau berubah mutunya karena berbagai faktor luar dan dalam, antara lain : cahaya, oksigen udara, reaksi kimia intern, dehidrasi, penyerapan air, pengotoran, serangga, dan kapang. Selama penyimpanan ada kemungkinan terjadi kerusakan

pada simplisia. Kerusakan tersebut dapat mengakibatkan kemunduran mutu, sehingga simplisia bersangkutan tidak lagi memenuhi syarat yang diperlukan atau yang ditentukan. Oleh karena itu pada penyimpanan simplisia perlu diperhatikan beberapa hal yang dapat mengakibatkan kerusakan simplisia, yaitu cara pengepakan, pembungkusan dan pewadahan, persyaratan gudang simplisia, cara sortasi dan pemeriksaan mutu, serta cara pengawetannya. Penyebab kerusakan pada simplisia yang utama adalah air dan kelembaban.

Cara pengemasan simplisia tergantung pada jenis simplisia dan tujuan penggunaan pengemasan. Bahan dan bentuk pengemasannya harus sesuai, dapat melindungi dari kemungkinan kerusakan simplisia, dan memperhatikan segi pemanfaatan ruang untuk keperluan pengangkutan maupun penyimpanan. Wadah harus bersifat tidak beracun dan tidak bereaksi (inert) dengan isinya sehingga tidak menyebabkan terjadinya reaksi serta penyimpangan warna, bau, rasa dan sebagainya pada simplisia. Selain itu wadah harus melindungi simplisia dari cemaran mikroba, kotoran dan serangga serta mempertahankan senyawa aktif yang mudah menguap atau mencegah pengaruh sinar, masuknya uap air dan gas-gas lain yang dapat menurunkan mutu simplisia (Depkes RI, 1985).

2.4.2.8 Pemeriksaan Mutu

Pemeriksaan mutu simplisia dilakukan pada waktu penerimaan atau pembeliannya dari pengumpul atau pedagang simplisia. Simplisia yang diterima harus berupa simplisia murni dan memenuhi persyaratan umum untuk simplisia seperti yang disebutkan dalam buku Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia ataupun Materia Medika Indonesia edisi terakhir. Apabila untuk simplisia yang bersangkutan terdapat paparannya dalam salah satu atau ketiga buku tersebut, maka simplisia tadi harus memenuhi persyaratan yang disebutkan pada paparannya. Suatu simplisia dapat dinyatakan bermutu Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia, atau Materia Medika Indonesia, apabila simplisia bersangkutan memenuhi persyaratan yang disebutkan dalam buku-buku yang bersangkutan. Pada pemeriksaan mutu simplisia pemeriksaan dilakukan dengan cara organoleptik, makroskopik dan atau cara kimia. Beberapa jenis simplisia tertentu ada yang perlu diperiksa dengan uji mutu secara biologi. Sebelum disortir simplisia diayak dulu untuk membuang debu pasir yang terikut (Depkes RI, 1985).

2.5 Tinjauan tentang Ekstrak

2.5.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. (Farmakope Indonesia IV, 1995)

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara, atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal ataupun tetap sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita. (Sutarjadi dan Noor Cholies, 1992).

2.5.2 Faktor Yang Berpengaruh pada Mutu Ekstrak

2.5.2.1 Faktor Biologi

Mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan asal yaitu tanaman obatnya dan khusus dipandang dari segi biologi. Faktor biologi baik untuk bahan dari tumbuhan obat hasil budidaya (kultivar), maupun dari tumbuhan liar (wild crop) yang meliputi beberapa hal, yaitu :

1. Identitas jenis (spesies)

Jenis tanaman dari sudut keragaman hayati dapat dikonfirmasi sampai informasi genetik sebagai faktor internal untuk validasi jenis (spesies).

2. Lokasi tanaman asal

Lokasi berarti faktor eksternal, yaitu lingkungan (tanah dan atmosfer) dimana tanaman berinteraksi berupa energi (cuaca, temperatur, cahaya) dan materi (air, senyawa organik, dan senyawa anorganik).

3. Periode pemanenan hasil tanaman

Faktor ini merupakan dimensi waktu dari proses kehidupan tanaman terutama metabolisme sehingga menentukan senyawa kandungan. Kapan senyawa kandungan mencapai kadar optimal dari proses biosintesis dan sebaliknya kapan sebelum senyawa tersebut dikonversi atau dibiotransformasi atau biodegradasi menjadi senyawa lain.

4. Penyimpanan bahan tanaman

Merupakan faktor eksternal yang dapat diatur karena berpengaruh pada stabilitas bahan serta adanya kontaminasi (biotik dan abiotik).

5. Umur tanaman dan bagian yang digunakan.

Selain kelima faktor diatas, maka untuk bahan dari tanaman obat hasil budidaya (kultivar) adalah faktor GAP (*Good Agriculture Practice*) sedangkan untuk bahan dari tumbuhan liar ada faktor kondisi proses pengeringan yang umumnya dilakukan di lapangan (Depkes RI, 2000).

2.5.2.2 Faktor Kimia

Mutu ekstrak dipengaruhi oleh bahan asal yaitu tanaman obatnya, khususnya dipandang dari segi kandungan kimianya. faktor kimia baik untuk bahan dari tanaman obat hasil budidaya (kultivar) ataupun dari tumbuhan liar (*wildcrop*), meliputi beberapa hal, yaitu :

Faktor internal: 1. Jenis senyawa aktif dalam bahan

2. Komposisi kualitatif senyawa aktif
3. Komposisi kuantitatif senyawa aktif
4. Kadar total rata-rata senyawa aktif

Faktor eksternal: 1. Metode ekstraksi

2. Perbandingan ukuran alat ekstraksi (diameter dan tinggi alat)
3. Ukuran, kekerasan, dan kekeringan bahan
4. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi
5. Kandungan logam berat
6. Kandungan pestisida

Senyawa kimia dalam ekstrak ditinjau dari asalnya dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok, yaitu :

1. Senyawa kandungan asli dari tanaman asal

Senyawa asli sebenarnya berarti senyawa yang memang sudah ada sejak masa tanaman tersebut hidup. Jika proses preparasi simplisia dan ekstraksi dijamin tidak tidak menyebabkan perubahan kimia, maka hasil analisis kimia terhadap ekstrak mencerminkan komposisi senyawa kandungan asli.

2. Senyawa dari hasil perubahan senyawa asli

Dari kajian dan riset memang sudah dapat diprediksi terjadi perubahan kimia senyawa asli karena memang sifat fisika kimia senyawa asli dan proses penstabilan yang sulit.

3. Senyawa kontaminasi

Senyawa kontaminasi merupakan senyawa eksogen yang tercampur pada ekstrak baik polusi yang tidak terhindari atau sebagai sisa atau residu proses.

4. Senyawa hasil interaksi kontaminasi dengan senyawa asli atau senyawa perubahan.

Pengertian dan kesadaran akan adanya 4 kelompok senyawa yang terkandung dalam ekstrak akan meningkatkan validasi standarisasi dan parameter mutu ekstrak. Kelompok pertama dan kedua terkait dengan parameter standard umum yang bersifat spesifik sedangkan kelompok tiga dan empat merupakan parameter standard nonspesifik (Depkes RI, 2000).

2.5.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu :Pembuatan serbuk simplisia dan klasifikasinya, menentukan cairan pengestraksi, separasi dan pemurnian, pemekatan dan penguapan, pengeringan ekstrak (Depkes RI, 2000).

2.5.3.1 Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering. Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan beberapa hal, yaitu :

- Makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi makin efektif-efisien namun makin halus serbuk maka makin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi.
- Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras (logam, dan lain-lain) yang dapat berpengaruh pada senyawa kandungan. Namun hal ini dapat dikompensasi dengan penggunaan nitrogen cair.

2.5.3.2. Menentukan cairan pengestraksi

Cairan pengestraksi dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya

mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pengestraksi dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung.

Faktor utama untuk pertimbangan dalam pemilihan cairan pengestraksi adalah :

- Selektifitas
- Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
- Ekonomis
- Ramah lingkungan
- Keamanan

Pada prinsipnya cairan pengkstraksi harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalaam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi “Pharmaceutical grade” (Depkes RI, 2000).

2.5.3.3 Separasi dan Pemurnian

Tujuan dari tahapan ini adalah menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses-proses pada tahapan ini adalah pengendapan, pemisahaan dua cairan tidak campur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses adsorbsi dan penukar ion (Depkes RI, 2000).

2.5.3.4. Pemekatan atau penguapan (vaporasi dan evaporasi)

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partial solut (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering. Ekstrak hanya menjadi kental atau pekat (Depkes RI, 2000). Alat yang sering digunakan yaitu dengan menggunakan Konsentrator Tradisional Tipe Robert , *Descending-Film Evaporator* dan *Horizontal- Film Evaporator*. Pada evaporator lapis tipis, pelarut menguap pada lapisan yang berisi larutan ekstrak dalam jumlah sedikit, sehingga pemekatan dengan menggunakan alat ini membutuhkan waktu yang singkat. Dengan penggunaan vakum/penghisap dan suhu evaporasi yang cukup rendah, sangat mungkin menjamin perlakuan yang hati-hati dari produk yang termosensitif (Wijisekera, 1991).

2.5.3.5. Pengeringan Ekstrak

Pengeringan berarti menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk, massa kering rapuh, tergantung proses dan peralatan yang digunakan. Ada beberapa proses pengeringan ekstrak, yaitu dengan cara:

- Pengeringan evaporasi
 - Pengeringan kontak
 - Pengeringan vaporasi
 - Pengeringan radiasi
 - Pengeringan sublimasi
 - Pengeringan dielektrik
 - Pengeringan konveksi
- (Depkes RI, 2000).

2.5.4. Metode Ekstraksi

2.5.4.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

1. Cara dingin.

1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000).

2. Cara panas

2.1 Refluks

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000).

2.3 Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yang secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (Depkes RI, 2000).

2.4 Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup ke dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15- 20 menit) (Depkes RI, 2000).

2.5 Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^{\circ}\text{C}$) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000).

2.6 Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan partial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dan ketel secara kontinyu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama sentawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian.

Pada destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinyu ikut terdestilasi (Depkes RI, 2000).

2.5.4.2. Cara ekstraksi lainnya.

1. Ekstraksi berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Depkes RI, 2000).

2. Superkritikal karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel temperatur dan tekanan akan diperoleh

spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Depkes RI, 2000).

3. Ekstraksi ultrasonik

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekwensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Depkes RI, 2000).

4. Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "electric-discharges" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelembung tekanan berkecepatan ultrasonik (Depkes RI, 2000).

2.6 Tinjauan tentang Parameter Standar Umum Simplisia dan Ekstrak

2.6.1 Parameter Non Spesifik

Parameter non spesifik merupakan tolak ukur baku yang dapat berlaku untuk semua jenis simplisia maupun ekstrak, tidak khusus untuk jenis simplisia atau ekstrak dari tanaman tertentu, ataupun jenis proses yang telah dilalui (Depkes RI, 2000).

2.6.1.1 Susut Pengerinan.

Pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai prosen. Dalam hal khusus (bahan tidak mengandung minyak menguap/etsiri dan sisa pelarut menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena kandungan air berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Depkes RI, 2000).

2.6.1.2 Kadar Air

Pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat diantara cara titrasi, destilasi atau gravimetri. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air dalam bahan (Depkes RI, 2000)

2.6.1.3 Kadar Abu

Dilakukan dengan memanaskan bahan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (Depkes RI, 2000).

2.6.1.4. Cemaran Logam Berat

Penentuan kandungan logam berat secara spektroskopi serapan atom atau lainnya yang lebih valid. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg, Pb, Cd dan lain-lain) melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan (Depkes RI, 2000)

2.6.1.6 Cemaran Mikroba

1. Parameter Cemaran Mikroba

Penentuan /identifikasi adanya mikroba yang patogen secara analisis mikrobiologis. Penentuan parameter ini untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba nonpatogen melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya (toksik) bagi kesehatan.

2. Parameter Cemaran Kapang, Khamir dan Aflatoksin.

Penentuan adanya jamur secara mikrobiologis dan adanya aflatoksin dengan KLT. Penentuan parameter ini untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan (Depkes RI, 2000).

2.6.2 Parameter Spesifik

Parameter spesifik merupakan tolak ukur khusus yang dapat dikaitkan dengan jenis tanaman asal ekstrak atau proses ekstraksi tertentu. Umumnya yang spesifik adalah komposisi kandungan dalam ekstrak yang dapat diartikan sebagai komponen utama, dalam hal ini kurkumin (Depkes RI, 2000).

2.6.2.1 Identitas

Parameter identitas ekstrak meliputi deskripsi tata nama meliputi nama ekstrak (generik, dagang, paten), nama latin tumbuhan (sistematika botani), bagian tumbuhan yang digunakan (rimpang, daun, dan sebagainya) dan nama Indonesia tumbuhan. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan identitas obyektif dari nama dan spesifik dari senyawa identitas, yaitu senyawa tertentu yang menjadi petunjuk spesifik dengan metode tertentu (Depkes RI, 2000).

2.6.2.2 Organoleptik

Parameter organoleptik ekstrak merupakan pendeskripsian bentuk, warna, bau, rasa dengan menggunakan pancaindera. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan pengenalan awal yang sederhana dan seobyektif mungkin (Depkes RI, 2000).

2.6.2.3 Senyawa Terlarut Dalam Pelarut Tertentu

Parameter senyawa terlarut dalam pelarut tertentu ditentukan dengan cara melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa yang terlarut dalam pelarut lain, misalnya heksana, diklorometan, metanol. Penentuan parameter ini dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan (Depkes RI, 2000).

2.6.2.4 Kadar Senyawa Kimia Tertentu

Dengan tersedianya suatu kandungan kimia yang berupa senyawa identitas atau senyawa kimia utama ataupun kandungan kimia lainnya, maka secara kromatografi instrumental dapat dilakukan penetapan kadar kandungan kimia tersebut. Instrumen yang dapat digunakan adalah

Densitometer, Kromatografi Gas, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau instrumen lain yang sesuai. Metode penetapan kadar harus diuji dulu validitasnya, yaitu batas deteksi, selektivitas, linieritas, ketelitian, ketepatan dan lain-lain. Penentuan kadar senyawa identitas ini dapat memberikan data kadar kandungan kimia tertentu sebagai senyawa identitas atau senyawa yang diduga bertanggung jawab pada efek farmakologi (Depkes RI, 2000).

2.5 Tinjauan tentang Kromatografi

2.6.1 Kromatografi secara Umum

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan yang memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi, memisahkan, dan memurnikan komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Pemisahan dalam kromatografi ditunjang oleh adanya fase diam dan fase gerak. Prinsip dari kromatografi adalah proses penarikan komponen zat berkhasiat dan zat lain yang ada di fase diam oleh fase gerak yang berdasarkan proses partisi, adsorpsi, dan pertukaran ion. Kromatografi terbagi menjadi kromatografi kolom dan kromatografi planar. Berdasar fase geraknya kromatografi kolom terbagi menjadi kromatografi cair dan kromatografi gas (Skoog, 1985).

2.6.2 Kromatografi lapis tipis

Digunakan pada pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari zat penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut (Markham, 1988). Pada dasarnya teknik KLT adalah sebagai berikut : larutan sampel ditotolkan di dekat ujung fase diam, yaitu lapisan tipis penyerap, sebagai zona awal. Sampel kemudian dikeringkan. Fase diam yang sudah mengandung totolan sampel tersebut kemudian dieluasi dengan fase geraknya, biasanya merupakan campuran dari 2 sampai 4 pelarut murni, di dalam bejana tertutup. Jika lapisan penyerap dan fase geraknya tepat, komponen – komponen dalam campuran pelarut akan bermigrasi dari fase gerak melewati fase diam. Jika fase gerak telah bermigrasi pada jarak yang ditentukan, fase diam diangkat dan dikeringkan, dan zona bercak di deteksi dengan penglihatan langsung atau dengan lampu ultraviolet, dengan atau tanpa penampak noda yang sesuai. Macam–macam fase diam yang

sering digunakan di KLT adalah silika gel, selulosa, alumina, silikon dioksida inert, poliamida dan sephadex (Sherma, 2003).

Mekanisme partisi adalah campuran yang akan dipisahkan, didistribusikan diantara dua fase cair yang tidak saling campur. Hal ini berdasarkan perbedaan kelarutan relatif dari masing-masing komponen dan fase gerak.

Sebagai parameter untuk menentukan letak noda pada KLT adalah harga R_f yaitu hasil bagi jarak noda dari titik awal dengan jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal.

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda dari titik awal}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Setiap zat akan memiliki nilai R_f yang spesifik dengan fase gerak dan fase diam tertentu (Skoog, 1985)

2.6.3. Tinjauan tentang Densitometer

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda pada KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) pendar fluor atau pemadaman pendar fluor dari radiasi semula. Densitometri lebih dititik beratkan untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar yang sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT. Prinsip analisis kuantitatif dengan metoda densitometri hampir sama dengan spektrofotometri. Penentuan kadar analit yang dikorelasikan dengan area noda pada KLT akan lebih terjamin kesahihannya dibanding metode KCKT (Kromatografi cair kinerja tinggi) atau KGC (Kromatografi Gas) sebab area noda kromatogram diukur pada posisi diam atau zigzag menyeluruh. Korelasi kadar analit pada noda kromatogram yang dirajah terhadap area tidak menunjukkan garis lurus tetapi merupakan garis lengkung mendekati parabola (Stahl, 1969).

2.7 Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis

2.7.1 Selektivitas

Langkah pertama yang harus dilakukan ialah memastikan bahwa puncak/noda kromatogram KLT tidak terganggu dengan zat pengotor tertentu, seperti eksipien obat, hasil degradasi analit, blanko cairan biologis atau metabolit lainnya maupun zat lain yang strukturnya mirip. Jika puncak analit terkontaminasi dengan zat lain, maka hasil analisis yang diperoleh akan menyimpang dari keadaan sebenarnya. Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya kurang lebih 1,5. Bila resolusinya kecil ($< 1,2$) perlu dilakukan optimalisasi lagi dari kondisi kromatografi yang dilakukan (Indrayanto, 1994).

2.7.2 Linearitas dan Homogenitas

Linieritas dari suatu prosedur analisis adalah kemampuan (dalam range yang diberikan) untuk menunjukkan hasil analisa secara langsung dan proporsional dengan konsentrasi (jumlah) analit dalam sampel. Penentuan linieritas dilakukan minimum 5 konsentrasi. Linieritas suatu metode harus diuji untuk menentukan adanya hubungan korelasi antara konsentrasi analit dengan respon detektor. Untuk menyatakan adanya korelasi atau tidak menggunakan parameter koefisien korelasi (r), pada analisis regresi $y = bx + a$. Parameter lain yang perlu ditentukan untuk mengevaluasi linieritas menurut Funk et al.(1992) adalah deviasi rata-rata dari garis regresi (S_y), standar deviasi fungsi (S_{xo}) dan koefisien variasi dari fungsi (V_{xo}).

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{N - 2}} \quad \text{dimana } y_i = a + b x_i$$

$$S_{xo} = \frac{S_y}{b} \quad V_{xo} = \frac{S_{xo}}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Selain itu perlu dibuktikan homogenitas dari kurva linier dengan melakukan analisis ($n = 10$) pada konsentrasi analit tertinggi dan konsentrasi analit terkecil. Kemudian dilakukan perhitungan harga F hitung. Harga F hitung harus lebih kecil dari F tabel. Bila harga F hitung lebih besar dari F tabel, maka percobaan harus diulang untuk meneliti kesalahan yang dilakukan (Indrayanto, 1994).

$$F = \frac{S_N^2}{S_I^2} ; F < F \text{ tabel}$$

$$S^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N - 1} \text{ (Harmita, 2004)}$$

dimana; N = Konsentrasi terbesar; I = Konsentrasi terkecil; \bar{y} = rata-rata area

2.7.3 LOD dan LOQ

Limit deteksi (LOD) merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat memberikan respon yang signifikan dibandingkan blanko. Sedang yang dimaksud dengan Limit kuantitasi (LOQ) adalah jumlah analit terkecil yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi tertentu. LOD dan LOQ mutlak ditentukan pada analit yang mempunyai konsentrasi yang relatif kecil.

Untuk penentuan LOD dan LOQ pada suatu metode analisis, maka pertama kali harus ditentukan harga S/N dahulu (S=signal, N=noise). Menurut Wahlich dan Carr (1990), harga S/N dapat dihitung dengan mengukur fluktuasi kromatogram blanko yang terbesar pada daerah 20 x lebar puncak pada ½ tinggi dari puncak analit (N) dan mengukur tinggi puncak analit (S). Untuk membedakan antara puncak analit dan blanko maka harga S/N harus tidak boleh kurang dari 5. Kemudian membuat suatu seri konsentrasi analit (4-5 konsentrasi) yang relatif kecil dan dihitung tinggi kromatogramnya, dan kemudian dibuat kurva regresinya (Slopenya = *Sl*). Menurut Warlich dan Carr, harga LOD dan LOQ dapat dihitung menurut rumus:

$$Q = \frac{k \cdot sb}{Sl} ; \text{dimana harga } sb = N/5, k = 3 \text{ untuk LOD dan } k = 10 \text{ untuk LOQ (Indrayanto, 1994).$$

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (*Sy*).

$$Q = \frac{k \cdot Sy}{Sl} ; k = 3 \text{ untuk LOD dan } k = 10 \text{ untuk LOQ (Harmita, 2004).$$

2.7.4. Presisi

Presisi suatu metode dapat ditentukan dengan melakukan analisis sampel yang sama berulang kali. Edwardson et al. (1990) menyarankan analisis dilakukan 10 kali dan harga RSD (Relative Standard Deviation)/KV (Koefisien Variasi) tidak boleh lebih besar dari 2 %. Bila suatu metode harga RSD-nya lebih besar dari 2 % maka metode ini perlu divalidasi lagi (Indrayanto, 1994).

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

2.7.5. Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan kedekatan hasil analisis dengan nilai sebenarnya. Akurasi dihitung dengan persen rekovery yang dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit yang telah diketahui kadarnya pada sampel. Untuk analisis sediaan obat sebaiknya % rekovery berkisar antara 98 -102 %, tetapi angka 95-105 % sudah cukup memadai untuk suatu laboratorium QC di industri farmasi (Indrayanto, 1994).

2.8 Tinjauan tentang kanker payudara

Kanker payudara merupakan tumor ganas dan menduduki peringkat kedua setelah kanker leher rahim di antara kanker yang menyerang wanita Indonesia. Di Indonesia, prevalensi kanker payudara meningkat, jumlahnya mencapai 11,6 % dari seluruh keganasan. Prevalensi ini cenderung meningkat disebabkan perubahan pola hidup di antaranya perubahan pola makanan dengan mengkonsumsi lemak tinggi dan peningkatan kesadaran masyarakat tentang kesehatan serta kemajuan teknologi kedokteran di bidang diagnosis dini (www.pitapink.com, 2005).

Pada tahun 2006, kurang lebih 212.980 wanita di Amerika Serikat didiagnosis menderita kanker payudara. Meskipun kanker payudara pada pria jarang terjadi dan jumlahnya kurang dari satu persen, tahun ini telah terdiagnosa sebanyak 1300 pria menderita kanker payudara (www.sciencedirect.com, 2003).

Kanker payudara tergolong tumor ganas. Tumor ganas mempunyai sifat yang khas yaitu dapat menyebar luas ke bagian lain di seluruh tubuh untuk berkembang menjadi tumor yang baru. Penyebaran ini disebut metastase. Kanker memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Ada yang tumbuh secara cepat, ada yang tumbuh tidak terlalu cepat, seperti kanker payudara. Khusus

untuk kasus kanker payudara, sel kanker yang pertama dapat tumbuh menjadi tumor sebesar 1 cm pada waktu 8-12 tahun. Sel kanker tersebut diam pada kelenjar payudara (www.sciencedirect.com, 2003).

Sel-sel kanker payudara ini dapat menyebar melalui aliran darah ke seluruh tubuh. Sel kanker payudara dapat bersembunyi di dalam tubuh selama bertahun-tahun tanpa diketahui dan tiba-tiba aktif menjadi tumor ganas atau kanker. Pada tahap awal kanker payudara, penderita tidak merasakan sakit atau tidak ada tanda-tandanya sama sekali. Namun, ketika tumor semakin membesar, akan timbul gejala-gejala seperti : benjolan yang tidak hilang atau permanen, biasanya tidak sakit dan terasa keras bila disentuh atau penebalan pada kulit payudara atau di sekitar ketiak; perubahan ukuran atau bentuk payudara; kerutan pada kulit payudara; keluarnya cairan dari payudara, umumnya berupa darah, nanah, cairan encer atau keluar air susu pada ibu yang tidak hamil atau tidak sedang menyusui; serta adanya pembengkakan atau tarikan pada puting susu (www.pitapink.com, 2005).

2.9 Tinjauan tentang antikanker

Obat antikanker adalah senyawa kemoterapeutik yang digunakan untuk pengobatan tumor yang membahayakan kehidupan. Obat antikanker sering dinamakan pula sebagai obat sitotoksik, sitostatik atau antineoplasma (Soekardjo, 2000). Obat antikanker yang ideal adalah yang mampu membunuh sel-sel kanker saja tanpa membahayakan sel-sel yang normal. Sampai saat ini belum ada obat yang mampu memenuhi kriteria tersebut. Oleh karena itu, penggunaan kliniknya dilakukan dengan memperhitungkan keuntungan atau kemanfaatannya dibandingkan efek toksisitasnya untuk dapat mencapai terapi yang optimal (Katzung, 1995).

Obat antikanker banyak yang bekerja dengan cara mempengaruhi metabolisme asam nukleat, terutama DNA atau biosintesis protein. Antikanker diharapkan memiliki toksisitas yang selektif, artinya menghancurkan tanpa merusak jaringan normal. Pada umumnya antineoplastik menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas karena menghambat sel yang proliferasinya cepat seperti sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran cerna dan folikel rambut. Antikanker berhasil baik bila dosis yang digunakan dapat mematikan sel kanker dan tidak terlalu mengganggu sel normal yang berproliferasi (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995).

Obat antikanker dapat mempengaruhi proses kehidupan sel. Proses kehidupan sel merupakan suatu siklus yang terdiri dari beberapa fase sebagai berikut :

1. Fase mitotik (M) : fase pembelahan sel aktif

Setelah melalui fase ini ada dua alternatif yaitu :

- a. Menuju fase G1 dan melalui proses proliferasi
- b. Masuk ke fase istirahat (Go), kemampuan sel untuk berproliferasi hilang dan sel meninggalkan siklus secara tak terpulihkan.

2. Fase post mitotik (G1), pada fase ini tidak terjadi sintesis DNA tetapi terjadi sintesis RNA dan protein. Pada akhir fase G1 terjadi sintesis RNA yang optimum.

3. Fase sintetik (S), pada fase ini terjadi replikasi DNA sel

4. Fase post sintetik (G2), fase ini dimulai bila sel sudah tetraploid dan mengandung 2 DNA, kemudian sintesis RNA dan protein dilanjutkan. Selanjutnya sel kembali ke fase mitotik, demikian seterusnya sehingga merupakan suatu siklus.

Obat antikanker dibagi menjadi lima kelompok yaitu senyawa pengalkilasi, antimetabolit, antikanker produk alam, hormon dan golongan lain.

1. Senyawa pengalkilasi

Senyawa pengalkilasi adalah senyawa reaktif yang dapat mengalkilasi ADN, ARN dan enzim-enzim tertentu. Senyawa ini terutama digunakan untuk pengobatan kanker pada jaringan limfoid dan sistem retikuloendotel, seperti limfosarkoma dan penyakit Hodgkin, leukemia limfositik dan mieloma.

Contoh : mekloretamin, klorambusil, melfalan, busulfan.

2. Antimetabolit

Antimetabolit adalah senyawa yang dapat menghambat jalur metabolit yang penting untuk kehidupan dan reproduksi sel kanker, melalui penghambatan asam folat, purin, pirimidin dan asam amino, serta jalur nukleosida pirimidin, yang diperlukan pada sintesis ADN.

Contoh : antagonis pirimidin (5-fluorourasil, tegafur, sitarabin), antagonis purin (6-merkaptopurin, azatioprin, 6-tioguanin), antagonis asam folat (aminopterin, metotreksat, ketotreksat), antagonis asam amino (azaserin, DON).

3. Antikanker Produk Alam

Antikanker produk alam adalah senyawa yang dihasilkan dari produk alam dan berkhasiat sebagai antikanker.

Contoh : antibiotika antikanker (mitomisin C, daktinomisin, plikamisin), antikanker produk tanaman (vinblastin sulfat, vinkristin sulfat, etoposida), antikanker produk rekayasa genetika (antineoplaston, avaron, interferon α -2a).

4. Hormon

Beberapa neoplasma dapat dikontrol dengan baik oleh hormon seks, seperti hormon androgen, progestin dan estrogen serta hormon adrenokortikoid. Biasanya untuk pengobatan tambahan sesudah pembedahan, dikombinasi dengan obat antikanker yang lain.

Contoh : tamoksifen sitrat, flutamid, megestrol asetat.

5. Golongan Lain-Lain

Contoh : mitotan, L-Asparaginase, sisplatinum, hidroksiurea (Soekardjo, 2000).

2.10 Tinjauan tentang kultur sel

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi sel jaringan hidup. Jaringan yang akan digunakan dipecah-pecah melalui proses enzimatis, kimiawi ataupun secara mekanis untuk menghasilkan suspensi sel, yang kemudian ditanam ke dalam media yang sesuai. Kultur ini disebut sebagai kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang-ulang ataupun hasil transformasi dari kultur sel primer disebut *cell line*. Pemisahan kultur *cell line* berdasarkan karakteristik tertentu akan menghasilkan kelompok-kelompok tertentu yang disebut *strain cell* (Freshney, 1987).

Pada kultur sel, sel yang akan diteliti ditempatkan dalam wadah kultur yang memiliki permukaan pertumbuhan dan nutrisi yang cukup sebagai media kultur, 37°C, lingkungan gas (5 % CO₂ / 95 % O₂) dan pH 7,4-7,7 (Spector, 1998).

Keuntungan penggunaan sistem kultur ini antara lain terletak pada segi kontrol lingkungan fisika kimia yang lebih tepat dan kondisi biologis yang relatif konstan. Selain itu karakteristik dan homogenitas sampel dari sistem kultur sel jauh lebih baik dibandingkan jaringan hidup dari hewan. Secara ekonomi, penggunaan sistem kultur sel ini juga lebih menguntungkan karena pereaksi yang digunakan lebih sedikit, konsentrasi larutan uji lebih kecil dan bahan uji yang digunakan lebih sedikit (Freshney, 1987).

Di sisi lain, kerugian yang ditimbulkan dari kultur sel ini tidak sedikit. Diantaranya karena teknik ini harus dikerjakan pada kondisi aseptik sehingga memerlukan keahlian khusus.

Selain itu, biaya yang dihabiskan dalam penelitian menggunakan kultur sel lebih banyak daripada bila dilakukan pada hewan coba (Freshney, 1987).

2.11 Tinjauan tentang metode MTT

Salah satu metode pewarnaan pada viabilitas sel yang berkembang saat ini adalah metode MTT atau 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (www.bmrservice.com, 2007). Metode ini pada mulanya berkembang dari metode cepat untuk pertumbuhan dan kehidupan dari sel limfoma mamalia berdasarkan perubahan dan pemeriksaan kolorimetri (Freimoser, et al, 1999).

Metode kolorimetri dengan MTT ini digunakan untuk mengetahui kemampuan sel hidup dengan cara mengubah garam tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yang larut menjadi tidak larut. Pada proses reaksi akan terjadi perubahan dari garam berwarna kuning menjadi kristal berwarna biru formazan yang memisah dan dapat diamati dengan spektrofotometer (www.bdbiosciences.com, 2007). Dehidrogenase mitokondria yang aktif pada sel hidup diyakini yang dapat menyebabkan perubahan ini. Formazan yang tidak larut air dapat dilarutkan menggunakan DMSO atau isopropanol dan bahan-bahan yang terpisah dapat diamati dengan spektrofotometer yang menghasilkan serapan sebagai fungsi dari konsentrasi warna yang berubah (www.bmrservice.com, 2007). Dari hasil tersebut akan dapat ditaksir jumlah mitokondria dan jumlah sel yang hidup dalam sampel. Cara ini dapat memberikan keuntungan pada uji sitotoksitas atau metode proliferasi sel yang digunakan secara luas pada imunologi, toksikologi dan biologi sel (Freimoser, et al, 1999).

Larutan MTT ditambahkan ke dalam kultur sebanyak 1/20 atau 1/40 dari jumlah volume media dan dinkubasi selama 20-30 menit. Serapan dari perubahan warna diamati pada panjang gelombang 550 - 600 nm (www.atcc.com, 2001).

Metode MTT ini memiliki beberapa keuntungan, antara lain cepat dan mempunyai reproduibilitas yang tinggi sesuai untuk skrining pada skala besar, artinya relevan untuk hampir semua sel, MTT berhubungan dengan protein seluler dan jumlah sel hidup serta metode MTT lebih sensitif.

2.12 Tinjauan tentang viabilitas sel

Adanya pemaparan bahan-bahan toksik terhadap sel dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan-bahan toksik inilah yang digunakan sebagai dasar dilakukannya uji sitotoksitas dan salah satunya dengan *cell viability test*. Kerusakan atau kematian sel diikuti dengan adanya perubahan integritas membran yang diketahui dengan menggunakan pewarnaan. Sel yang mati bersifat permeabel terhadap warna tertentu sehingga dapat menyerap warna sedangkan sel yang hidup bersifat impermiabel dan tidak dapat menyerap warna. Viabilitas sel dinyatakan sebagai prosentase sel yang hidup atau yang tidak terwarnai (Freshney, 1987).

Secara garis besar, metode penentuan viabilitas sel digolongkan menjadi dua, yaitu berdasarkan :

1. Penentuan respon singkat atau respon jangka pendek
2. Penentuan respon jangka panjang atau respon yang bersifat permanen

Penentuan viabilitas sel berdasarkan adanya respon jangka pendek atau respon singkat digunakan untuk menentukan jumlah sel yang hidup setelah dilakukannya prosedur penelitian yang berpotensi menyebabkan terjadinya kerusakan sel, seperti disagregasi jaringan, pemisahan sel serta pembekuan dan pengaktifan kembali kultur sel yang telah dibekukan. Sedangkan penentuan viabilitas sel berdasarkan respon jangka panjang atau respon yang bersifat permanen digunakan jika efek yang dihasilkan oleh sebuah perlakuan pada tahapan penelitian hanya akan ditunjukkan setelah beberapa jam atau hari setelah perlakuan (Freshney, 1987).

Zat warna yang dapat digunakan untuk mengindikasikan kematian sel antara lain nigrosin, tripan biru dan eritrosin (Freshney, 1987). Untuk menghitung jumlah sel dapat digunakan metode atau alat, antara lain :

1. *cell counting*

ada beberapa metode *cell counting* yang dapat digunakan, antara lain :

- hemositometer
- *electronic particle counting*
- *coulter counting*

2. *cell weight*

3. *DNA content*

2.13 Tinjauan tentang etoposida

Etoposida merupakan derivat semisintetik podophyllostoksin yang berasal dari tanaman *Podophyllum peltatum*. Etoposida merupakan salah satu obat kemoterapi kelompok *DNA Topoisomerase II Inhibitor*. *DNA Topoisomerase II Inhibitor* merupakan kelompok obat sitotoksik poten yang banyak digunakan dan dikenal sebagai penginduksi apoptosis. Tahapan pertama dari apoptosis yang disebabkan oleh induksi etoposida diketahui berawal dari interaksi obat ini dengan *DNA Topoisomerase II*. Namun, mekanisme detilnya belum diketahui. Penghambatan *DNA Topoisomerase II* terjadi pada fase G2 dan fase S akhir sehingga etoposida menghentikan siklus sel dan membunuh sel pada fase G2 dan akhir fase S. Interaksi ini menyebabkan rusaknya DNA. Efek sitotoksik etoposida diduga berkaitan dengan perusakan DNA tersebut (www.drugbank.com, 2006).

Etoposida digunakan untuk pengobatan karsinoma paru, kanker testis, kariokarsinoma, leukemia mielogenous akut dan limfoma. Etoposida dapat meningkatkan kerja antikoagulan oral, selain itu phenylbutazon, sodium salisilat dan asam salisilat dapat mempengaruhi ikatan protein etoposida. Etoposida dapat memberikan efek potensiasi sitotoksik dan supresi batang otak. Kandungan etoposida mempunyai efek genotoksik yang bisa menyebabkan kecacatan pada pertumbuhan embrio dan terbukti mengakibatkan teratogenik dan mempunyai efek mutagenik pada hewan (Siswandono, 2000).

2.14 Tinjauan Tentang Apoptosis.

Apoptosis merupakan program bunuh diri dari sebuah sel. Program ini memiliki peran yang penting untuk menjaga homeostatis perkembangan – biakan sel dan dengan adanya disregulasinya bisa berakibat timbulnya macam-macam penyakit (Evan dan Littlewood, 1998). Salah satu peran pentingnya adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang sekiranya akan dapat menyebabkan kanker. Pada sel-sel kanker program apoptosis ini telah mengalami gangguan sehingga sel akan mengalami metastasis (Peter *et al*, 1997).

Apoptosis merupakan mekanisme alamiah yang dialami oleh sel. Ada dua alasan utama mengapa sel melakukan mekanisme itu. Pertama apoptosis memang diperlukan untuk proses pertumbuhan atau perkembangan sel, jaringan atau organ lebih lanjut. Hal ini dapat dilihat pada peristiwa pemutusan ekor kecebong sebelum menjadi katak atau penghilangan selaput diantara jari-jari tangan pada janin di dalam rahim. Alasan kedua adalah untuk menghancurkan sel-sel

yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus, sel dengan kerusakan DNA maupun sel kanker (Meier, 2000; Nagata, 1977).

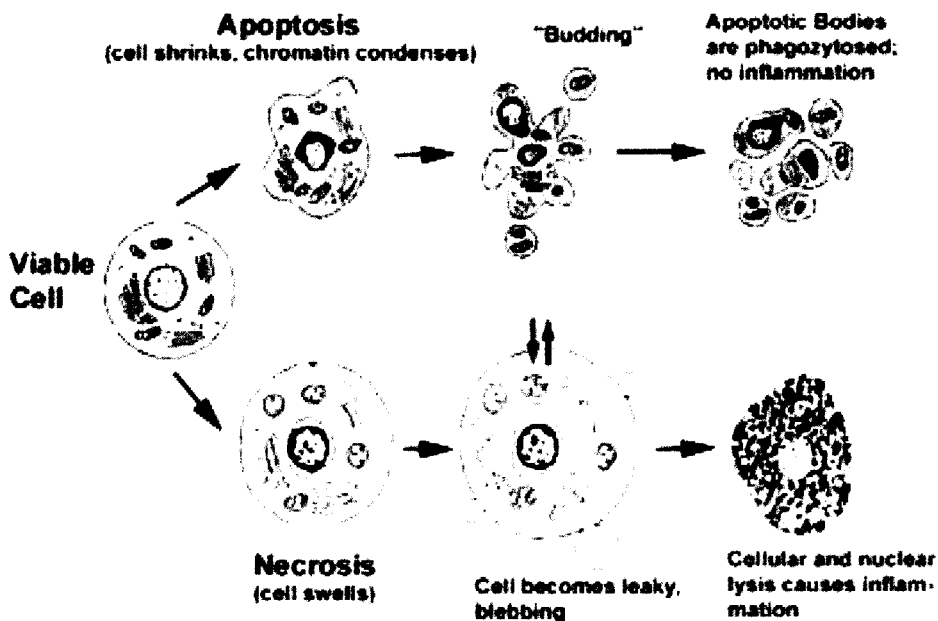
Proses apoptosis memiliki kegunaan yang luas dalam proses biologi, seperti pada proses perkembangan, diferensiasi, proliferasi atau homeostatis, regulasi, fungsi sistem imun, perbaikan kecacatan karena pengaruh sel yang berbahaya. Kelainan fungsi ataupun disregulasi dari program apoptosis dapat berimplikasi pada beberapa kondisi patologis atau penyakit. Disregulasi dari apoptosis dapat menyebabkan berbagai penyakit antara lain: penyakit kanker, penyakit autoimmune, penyebaran infeksi virus, *neurodegenerative disorders*, AIDS dan penyakit *ischemia* karena proses apoptosis yang meningkat dan berlebihan (Fadeel, 1999).

Apoptosis memiliki arti penting dalam proses biologi, kematian sel terprogram menunjukkan fenomena yang luas, termasuk terjadi pada semua *metazoans* (Tittel, 2000) seperti pada mamalia, insekta (Richardson, 2002), nematoda (Liu, 1999b) dan cnidaria (Cikala, 1999). Selain itu, kematian sel terprogram berperan juga dalam biologi tanaman (Solomon, 1999) dan kematian sel yang mirip kematian sel terprogram bisa diamati pada model atau sistem ragi (Frohlich, 2000; Skulachev, 2002). Pada perkembangannya apoptosis bisa terjadi evolusi dari keadaan asal, di mana kematian sel terprogram menjadi bagian integral dari siklus hidup eukaryota seperti pada parasit kinetoplastida yaitu *Trypanosoma brucei brucei*, *Tetrahymena thermophila*, *Dictyostelium discoideum* dan bahkan terjadi pada prokaryota seperti *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* and *Myxobacteria*) yang kadang-kadang mengarah pada kematian sel yang diatur (Ameisen, 2002).

2.14.1 Bentuk Morfologi dari Apoptosis

Sel yang mengalami apoptosis dapat dikenali dari perubahan stereotipikal morfologinya, seperti sel mengkerut, terlihat adanya perubahan bentuk dan terjadi kehilangan kontak antar sel tetangga. Terjadi kondensasi atau pepadatan kromatin dan terjadinya peminggiran pada membran inti, terjadi *blebbing* atau *budding* pada membran plasma, dan akhirnya sel terbagi-bagi kedalam struktur yang kompak dengan membran yang *enclosed* (kepingan sel mati), yang disebut dengan '*apoptotic bodies*' atau badan apoptotik dengan kandungan sitosol, kromatin yang memadat dan organel-organel. Selanjutnya *apoptotic bodies* ditelan oleh makrofag, dan

akan dipindahkan dari jaringan tersebut tanpa menyebabkan respon inflamasi. Sehingga perubahan morfologi merupakan konsekuensi dari karakteristik molekular dan proses biokimia yang terjadi di dalam sel apoptosis, yang secara khusus mengaktifkan enzim-enzim proteolitik yang menyebabkan terjadinya pemotongan DNA kedalam bentuk fragmen-fragmen *oligonucleosomal* , seperti halnya dalam pemotongan substrat protein spesifik yang akan menentukan integritas dan bentuk sitoplasma atau organel-organel (Saraste, 2000).



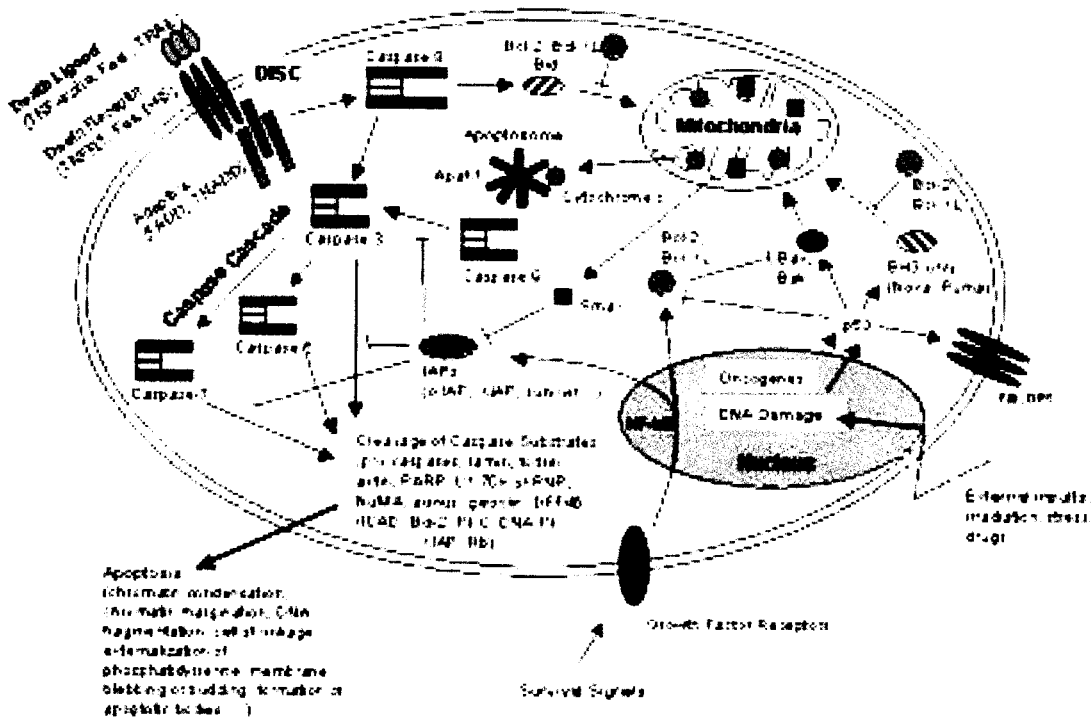
Gambar 2.7 Perbedaan morfologi sel apoptosis dan nekrosis (Saraste, 2000 ; Leist, 2001a).

Apoptosis beda dengan kematian nekrosis di mana sel akan kehilangan integritas membran , *swelling* atau mengembang dan *disrupture* dari sel. Selama nekrosis, kandungan sel akan terlepas secara tidak terkontrol kedalam lingkungan sel dan akibatnya menimbulkan kerusakan sekitar sel dan menyebabkan respon inflamasi yang sangat kuat di dalam jaringan (Leist, 2001a).

2.14.2 Jalur ekstrinsik dan instrinsik apoptosis

Beberapa faktor yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis dapat diklasifikasi menjadi dua kelompok besar, yaitu rangsangan instrinsik dan ekstrinsik. Kerusakan DNA, stress

oksidatif dan hipoksia dapat merangsang terjadinya apoptosis dari dalam sel itu sendiri sehingga mengaktifkan apoptosis melalui jalur mitokondria (jalur instrinsik). Sedangkan dari luar sel adalah *death factor*, seperti TNF- α (*Tumor Necrosis Factor -alpha*), limfotoksin dan *Fas ligand* (FasL) serta kurang atau tidak adanya survival factor, seperti interleukin-2 dan interleukin-3, dapat mengaktifkan apoptosis melalui jalur *growth factor* (jalur ekstrinsik). Obat kemoterapi antikanker yang bersifat *genotoxic* seperti etoposida dan radiasi sinar gamma dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sel kanker maka gen p53 sebagai gen supresor tumor akan terakumulasi, menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan kepada DNA untuk memperbaiki diri. Bila proses perbaikan gagal, p53 akan merangsang mitokondria mengeluarkan sitokrom c ke sitosol, dan dalam hal ini akan dihalangi oleh *anti-apoptosis member* yaitu gen bcl-2. Di dalam sitosol sitokrom c bersama dengan *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) dan pro-caspase 9 membentuk caspase 9, kompleks ini disebut *apoptosome*. Terbentuk caspase 9 sebagai caspase awal akan mengaktifkan caspase eksekusioner, yaitu caspase 3, 6 dan 7 sehingga dapat menyebabkan kematian sel secara apoptosis (Nagata, 1998; Cotran, 1999).



Gambar 2.8 Skema sinyal tranduksi dari apoptosis (Nagata, 1997)

Hubungan antara p53 dengan apoptosis diatas memang memiliki peran besar dalam timbulnya apoptosis , dimana p53 sendiri dikenal sebagai *tumor suppressor gene* dimana telah dibuktikan bahwa p53 mengalami mutasi pada lebih 50% tumor dan mengalami hambatan fungsi pada sebagian tumor yang lain. Hal itu terjadi karena p53 berperan besar dalam mengatur siklus sel, perbaikan DNA dan aktivasi bax. Struktur p53 terdiri dari gugus N-terminal transaktivasi, gugus kaya prolin , gugus *DNA-binding* spesifik, gugus tetramerisasi, dan ekor *basic C-terminal*. Gugus N-terminal transaktivasi berguna untuk pengaturan stabilitas p53 di dalam sel sel, gugus kaya prolin berguna untuk menekan pertumbuhan sel, gugus *DNA-binding* spesifik berguna untuk menempelnya p53 pada DNA di mana penempel ini berefek menghambat proses transkripsi, dan gugus ekor *basic C-terminal* berfungsi untuk menempelnya p53 pada rantai tunggal DNA di mana hal ini menyebabkan p53 dapat berfungsi lebih lanjut pada proses berhentinya siklus sel, aktivasi GADD45 pada proses perbaikan DNA, dan aktivasi bax pada apoptosis. Serangkaian fungsi inilah yang membuat p53 dinobatkan sebagai *tumor suppressor gene* (Burn & El-Deirey, 1999 ; Cotran, 1999). Dalam sel yang tenang kadar p53 akan dijaga untuk tetap stabil rendah dan tidak aktif. Pada dasarnya jenis p53 ini (*wildtype* p53) memiliki waktu paruh yang sangat singkat , sekitar 20-30 sehingga jarang terdeteksi pada sel yang tidak mengalami stress. Bila sel mengalami stress akibat bahan-bahan – bahan perusak DNA seperti radiasi, hipoksia, hipoglikemia, obat-obat kemoterapi maka p53 akan mengalami stabilisasi sehingga masa hidup lebih lama guna mengatur berhentinya siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis (Burn & El-Deirey, 1999).

BAB III.

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Bahan

Bahan rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) diperoleh dari Mojokerto, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa kecuali metanol. Bahan kimia dapat dilihat pada rincian anggaran bahan kimia.

3.2. Alat

Maserator, rotavapour, inkubator CO₂, elektroforesa, water bath inkubator, sentrifuse, mikroskop biasa dan flouresent, HPLC, spektrofotometer : UV, FTIR, NMR, MS dan densitometer

3.3. Tahapan Penelitian

3.3.1. Penelitian Formulasi Produk Fitofarmaka

Produk fitofarmaka yang diteliti terdiri dari campuran ekstrak terpurifikasi tanaman yang dikombinasikan yaitu rimpang kencur dan herba sambiloto dengan perbandingan (1 : 1). Melakukan studi formulasi bahan uji untuk menjadi sediaan fitofarmaka yang akan diterapkan pada pengujian pra klinik maupun klinik, yaitu dalam bentuk kapsul. Dibuat formula kapsul dengan penambahan berbagai variasi dan perbandingan bahan pengisi seperti Ca-bosil dan laktosa. Melakukan penilaian karakteristik farmasetik antara lain : identitas, kadar, waktu hancur / disolusi, keragaman bobot dan kemudian dilakukan penilaian karakteristik farmasetik antara lain identitas, kadar, waktu hancur / disolusi.

3.3.2. Pengujian Toksisitas Produk Fitofarmaka, meliputi :

a. Uji Toksitas Akut (LD₅₀).

Digunakan 4 kelompok percobaan dan tiap kelompok digunakan 10 ekor mencit betina, kemudian diberikan secara peroral sediaan andrografolid dalam CMC-Na dengan dosis awal yang digunakan relatif tidak berbahaya, kemudian diamati jumlah mencit yang mati. Dari hasil tersebut dosis dinaik / turunkan untuk mendapatkan dosis yang membunuh mencit kurang dari 50% tetapi tidak 0%, dan membunuh lebih dari 50% tetapi tidak 100% (Gosh, 1971). Pengamatan tanda-tanda keracunan dilakukan 4 jam setelah pemberian bahan uji dan total jumlah hewan yang mati, diamati dalam waktu 24 jam setelah pemberian bahan uji. Analisis data yang diperoleh dalam penelitian ini diolah dengan *Probit Analysis*, untuk menentukan harga LD₅₀.

b. Uji Toksitas Sub-Akut,

Pengamatan uji toksisitas sub-akut dengan cara hewan coba diberikan dosis sehari satu kali pada hewan coba tikus selama waktu 3 bulan terhadap data darah lengkap (Hb, SGOT, SGPT, Ureum dan Kreatinin, dll) dan histopatologi organ penting (GIT, hepar, jantung, ginjal, pankreas).

c. Uji Teratogenik

Pertama dilakukan perkawinan dari mencit betina dan mencit jantan dengan perbandingan : 4 betina dan 1 jantan. Setelah 24 jam diamati sumbat kopulasi, yaitu sumbat kekuningan pada vagina yang merupakan sekret vesikula seminalis betina dengan ejakulat jantan yang mengeras. Adanya sumbat kopulasi pada vagina dihitung sebagai kehamilan hari ke-0.

Sebanyak 40 ekor mencit hamil dikelompokkan masing-masing 10 ekor. Perlakuan yang diberikan adalah kelompok I diberi kontrol negatif. Kelompok II diberi dosis lazim, kelompok III diberi dosis : 3 x dosis lazim, dan kelompok IV diberi dosis : 5 x dosis lazim . Bahan uji diberikan secara peroral sebanyak 1 ml setiap hari dan dimulai pada kehamilan hari ke-6 sampai ke 15 (fase organogenesis).

Pembedahan kandungan dilakukan dengan cara anestesi, untuk mengeluarkan pada hari ke-18 kehamilan. Selanjutnya terhadap janin dilakukan pengamatan: jumlah seluruh janin, jumlah janin mati, jumlah tempat implantasi, berat janin dan kelainan fisik pada organ kepala, organ ekstermitas dan jari-jari, perut, punggung serta ekor janin. Analisis data yang diperoleh dalam penelitian ini diolah dengan ANAVA.

3.2.4. Pengujian Aktivitas Antikanker Produk Fitofarmaka secara *In Vivo*.

Pengujian dilakukan terhadap mencit dibuat kanker kolon dahulu dengan memberikan DMBA (7,1dimetilbenz(a)anthracene) dengan konsentrasi 15mg/kg BB mencit dilarutkan dalam 0,2ml oleum sesami secara peroral , selama kurang lebih 3 bulan. Kanker akan mulai tumbuh kurang lebih 3 bulan setelah diinjeksi DMBA.

Penelitian dilakukan dalam empat kelompok tikus yang telah menderita kanker payudara. Satu kelompok kontrol negatif dan tiga kelompok perlakuan dimana tiap kelompok digunakan 10 ekor mencit . Pelaksanaan uji dilakukan dengan menyuntikan sampel uji berupa campuran ekstrak terpurifikasi kencur - sambiloto (dengan perbandingan optimal – dari hasil uji in vitro dengan sel kanker payudara manusia) ; digunakan dengan dosis 100mg/kgBB; 200 mg/kgBB dan 400mg/kgBB (dilarutkan dalam 1%CMC-Na) ; dan diberikan secara peroral sebanyak 20 kali. Sedang untuk kelompok kontrol negatif tidak diberikan bahan uji.

Pengamatan efek terapi digunakan parameter berat kanker dan irisan histopatologi jaringan kanker dengan diamati perubahan bentuk sel kanker menjadi sel normal. Analisis data dilakukan dengan analisis statistik dengan one way anava dan analisis non parametrik Kruskal Wallis, sehingga akan diketahui pengaruh penambahan andrografolida terhadap pertumbuhan kanker kolon mencit .

BAB IV

HASIL PENELITIAN FORMULASI PRODUK FITOFARMAKA

4.1 Hasil Pembuatan Fraksi Etil Asetat Herba Sambiloto

Dari hasil maserasi 1 kg serbuk herba sambiloto dengan 4 liter etanol 96% sebanyak tiga kali pengulangan didapatkan \pm 16 liter ekstrak sambiloto. Ekstrak etanol yang didapat diuapkan dengan Rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak pekat \pm 1300 mL. Kemudian dilakukan fraksinasi dengan aquades dan etil asetat dengan perbandingan ekstrak etanol sambiloto : aquades : etil asetat 1:3:3, kemudian fraksi etil asetat hasil fraksinasi diuapkan sehingga didapatkan fraksi etil asetat \pm 450 mL. Fraksi etil asetat kemudian dikeringkan dengan menggunakan pengering laktosa : cab-o-sil dengan perbandingan 4:1 sebanyak 25%, etil asetat diuapkan. Total serbuk yang dihasilkan adalah 160 gram.

4.2 Penetapan Kadar Andrografolida dalam Fraksi Etil Asetat Herba Sambiloto dalam Pengering Laktosa : Cab-O-Sil dengan KLT-Densitometri

Dilakukan penetapan kadar andrografolida dalam fraksi etil asetat herba sambiloto dalam pengering laktosa: cab-o-sil dengan metode KLT-Densitometri. Hasil luas area larutan baku standar andrografolida dan persamaan garis regresi serta hasil penetapan kadar andrografolida dalam fraksi etil asetat herba sambiloto dapat dilihat pada Gambar 5.1 serta hasil perhitungannya dapat dilihat pada Tabel 5.1 dan Tabel 5.2

Substance: Andrografolida @ 232 nm

Regression via area: Linear $Y = 900.2 + 2.322 * X$ $r = 0.99421$ $sdv = 4.61$

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0.55	404.00 ng			1679.55		
2	1	0.53	606.00 μ g			2468.35		
3	1	0.51	808.00 ng			2782.31		
4	1	0.50	1.212 μ g			3774.02		
5	1	0.49	1.616 μ g			4582.92		
6	1	0.48				2608.59	735.87 ng	
7	1	0.47				2605.99	734.75 ng	
8	1	0.49				2572.91	720.50 ng	

Gambar 4.1 Hasil penetapan kadar andrografolida dalam fraksi etil asetat herba sambiloto dalam pengering laktosa: cab-o-sil dengan KLT-Densitometri

Tabel 4.1 Luas area larutan baku andrografolida dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Kadar (μg)	Luas Area
0,404	1679,55
0,606	2468,35
0,808	2782,31
1,212	3774,02
1,616	4582,92

$$y = 2,322x + 900,2$$

$$r = 0,994$$

Tabel 4.2 Penetapan kadar andrografolida dalam fraksi etil asetat herba sambiloto dalam pengering Laktosa : Cab-O-Sil dengan KLT-Densitometri

Replikasi	Berat sampel (mg)	Luas area	Kadar		Kadar (%b/b)
			dalam 2 μL (ng)	dalam 5 mL (mg)	
1	50,0	2608,59	735,87	1,839	3,68
2	50,1	2605,99	734,75	1,837	3,67
3	50,2	2572,91	720,50	1,801	3,59
Kadar rerata					3,65 \pm 0,05

4.3 Hasil Pembuatan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur

Dari hasil maserasi 2 kg serbuk rimpang kencur dengan 8 liter etanol 96% sebanyak tiga kali pengulangan didapatkan \pm 18 liter ekstrak etanol rimpang kencur. Ekstrak etanol yang didapat diuapkan dengan Rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak pekat \pm 1300 mL. Kemudian dilakukan fraksinasi dengan perbandingan ekstrak pekat : aquades 3:1, sehingga didapatkan fraksi minyak \pm 150 mL. Fraksi minyak kemudian dikeringkan dengan menggunakan pengering laktosa : cab-o-sil dengan perbandingan 4:1 sebanyak 65%. Total serbuk yang dihasilkan adalah 206 gram.

4.4 Penetapan kadar EPMS dalam Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur dalam Pengering Laktosa : Cab-O-Sil dengan KLT-Densitometri

Dilakukan penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dalam pengering laktosa: cab-o-sil dengan metode KLT-Densitometri. Hasil luas area larutan baku standar etil *p*-metoksisinamat dan persamaan garis regresi serta hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dapat dilihat pada Gambar 5.2 dan hasil perhitungannya dapat dilihat pada Tabel 5.3 dan Tabel 5.4

Substance: EPMS @ 309 nm

Regression via area		Linear	Y = 20062.0544 + 5.6902 * X		r = 0.98738 sdv = 3.78			
Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0.28	900.00 ng			24627.72		
2	1	0.27	1.200 μ g			26149.81		
3	1	0.26	1.600 μ g			29350.93		
4	1	0.27	2.400 μ g			35527.74		
5	1	0.27	3.200 μ g			38842.16		
6	1	0.27	4.000 μ g			41553.12		
7	2	0.28				35440.96	2.703 μ g	
8	3	0.28				36696.37	2.923 μ g	
9	4	0.28				37771.05	3.112 μ g	

Gambar 4.2 Hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dalam pengering laktosa: cab-o-sil dengan KLT-Densitometri

Tabel 4.3 Luas area larutan baku standar EPMS dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Kadar (μg)	Luas Area
0,800	24627,72
1,200	26149,81
1,600	29350,93
2,400	35527,74
3,200	38842,16
4,000	41553,12

$$y = 5,5927x + 20371,4144$$

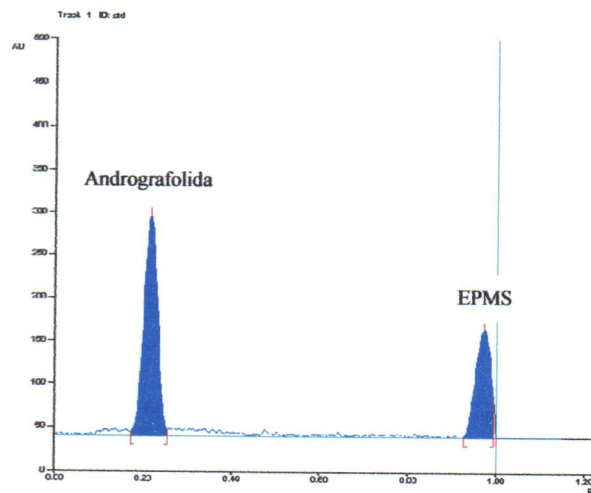
$$r = 0,988$$

Tabel 4.4 Penetapan kadar EPMS dalam fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dalam pengering Laktosa : Cab-O-Sil dengan KLT-Densitometri

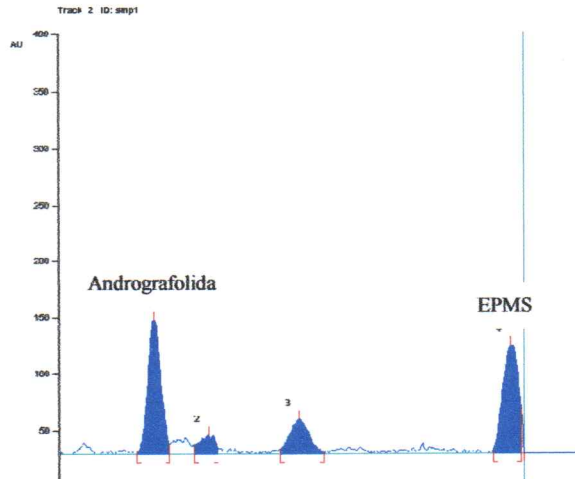
Replikasi	Berat sampel (mg)	Luas Area	Kadar		Kadar (%b/b)
			Dalam 2 μL	Dalam 5 mL	
1	20,4	35440,96	2,695	6,7375	33,03
2	20,1	36696,37	2,919	7,2975	36,31
3	20,3	37771,05	3,111	7,7775	38,31
	Kadar rerata				35,88 \pm 2,67

4.5 Hasil optimasi eluen untuk analisis andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat dalam campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur

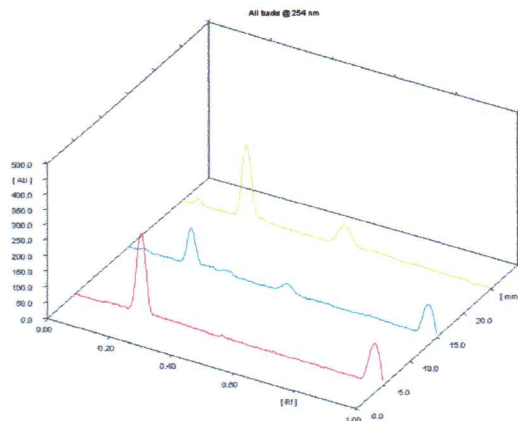
Andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat dapat dipisahkan dengan menggunakan eluen kloroform:metanol (9:1). Hasil pemisahan pada panjang gelombang 254 nm dapat dilihat pada Gambar 5.3, 5.4 dan 5.5 berikut ini. Sedangkan untuk profil *Match Factor* dari andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat masing-masing dapat dilihat pada Gambar 5.6 dan Gambar 5.7.



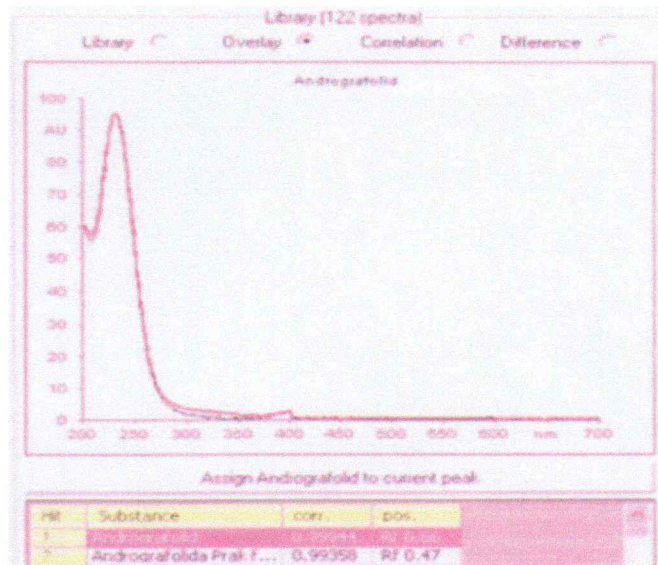
Gambar 4.3 Kromatogram standar andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat dengan KLT-Densitometri



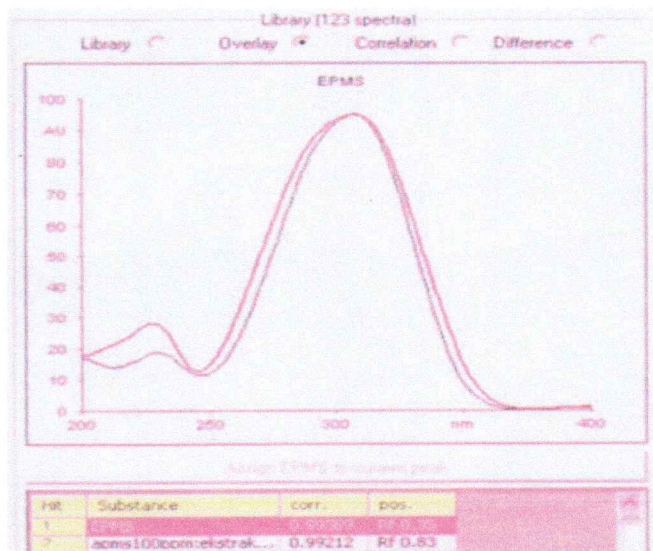
Gambar 4.4 Kromatogram andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat dalam campuran serbuk fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri



Gambar 4.5 Profil 3D (tiga dimensi) dari standar andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat, serta andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat dalam campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri



Gambar 4.6 Profil *Match factor* dari andrografolida dengan KLT-Densitometri



Gambar 5.7 Profil *Match Factor* dari etil *p*-metoksisinamat dengan KLT-Densitometri

Dengan fase gerak kloroform:metanol 9:1, dilakukan *match factor* dan didapatkan bahwa puncak tersebut (ditunjukkan pada Gambar 5.6) adalah senyawa andrografolida dengan nilai kecocokan 0,99944. Sedangkan untuk nilai

match factor dari etil *p*-metoksisinamat (ditunjukkan pada Gambar 5.6) adalah 0,99389.

4.6. Hasil Pembuatan Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Herba Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur

Berikut ini adalah perhitungan jumlah serbuk fraksi etil asetat herba sambiloto dan serbuk fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur yang diperlukan untuk setiap kapsul. Sedangkan untuk formula kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol kencur dapat dilihat pada Tabel 5.5. Tiap kapsul mengandung 15 mg andrografolida dan 15 mg etil *p*-metoksisinamat. Fraksi etil asetat sambiloto yang telah dikeringkan dengan

$$\text{laktosa:cab-o-sil} = \frac{100}{3,65} \times 15\text{mg} = 411,0\text{mg}$$

Fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur yang telah dikeringkan dengan

$$\text{laktosa:cab-o0sil} = \frac{100}{35,88} \times 15\text{mg} = 41,8\text{mg}$$

Tabel 4.5 Formula Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Herba Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur

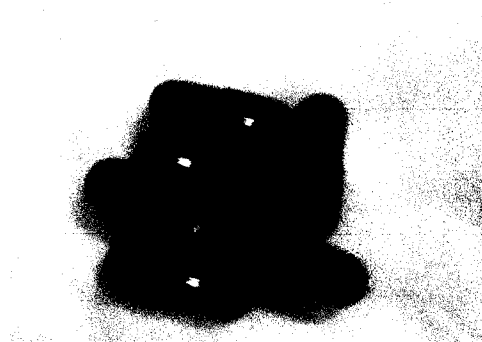
Nama Bahan	Jumlah	
	Tiap kapsul (mg)	100 kapsul (g)
fraksi etil asetat herba sambiloto yang telah dikeringkan dengan laktosa:cab-o-sil	411,0	41,10
fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur yang telah dikeringkan dengan laktosa:cab-o-sil	41,8	4,18

4.6.1 Cara Pembuatan Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Herba Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur

Cara pembuatan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur adalah sebagai berikut :

1. Fraksi etil asetat herba sambiloto yang telah dikeringkan dengan laktosa: cab-o-sil + fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur yang telah dikeringkan dengan laktosa: cab-o-sil aa → digerus ad homogen
2. (1) + sisa fraksi etil asetat herba sambiloto yang telah dikeringkan dengan laktosa: cab-o-sil → digerus ad homogen
3. (2) → dimasukkan cangkang kapsul no. 0

Di bawah ini adalah hasil pembuatan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur



Gambar 4.8 Kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur.

4.7 Hasil Pengujian Mutu Fisik Kapsul

Hasil pengujian mutu fisik kapsul ini meliputi keseragaman bobot, keseragaman kandungan, dan waktu hancur.

4.7.1 Keseragaman Bobot

Hasil Penimbangan 20 kapsul = 10,8020 gram

Hasil uji keseragaman bobot isi kapsul campuran fraksi etil asetat ekstrak sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dapat dilihat pada Tabel 5.6

Tabel 4.6 Hasil Uji Keseragaman Bobot Isi Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Herba Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur

No	Cangkang + isi (g)	Cangkang (g)	Isi (g)	% Penyimpangan bobot isi kapsul
1	0,5444	0,0997	0,4447	0,15
2	0,5294	0,0939	0,4355	1,92
3	0,5439	0,0976	0,4463	0,51
4	0,5464	0,0968	0,4496	1,25
5	0,5432	0,0954	0,4478	0,85
6	0,5408	0,0961	0,4447	0,15
7	0,5411	0,0975	0,4436	0,10
8	0,5367	0,0950	0,4417	0,53
9	0,5324	0,0963	0,4361	1,79
10	0,5401	0,0958	0,4443	0,06
11	0,5410	0,0965	0,4445	0,10
12	0,5312	0,0970	0,4342	2,22
13	0,5384	0,0949	0,4435	0,12
14	0,5334	0,0964	0,4370	1,59
15	0,5307	0,0973	0,4334	2,40
16	0,5524	0,0951	0,4573	2,99
17	0,5457	0,0970	0,4487	1,05
18	0,5473	0,0971	0,4502	1,39
19	0,5522	0,0978	0,4544	2,33
20	0,5377	0,0943	0,4434	0,15
		Rata-rata	0,4440	1,08
		SD	0,0065	0,94

Berdasarkan hasil uji keseragaman bobot kapsul pada Tabel 5.6, diketahui bahwa tidak terdapat kapsul yang isinya menyimpang di atas 7,5% sampai 15% dari rata-rata isi kapsul. Hal ini berarti kapsul memenuhi persyaratan keseragaman bobot. Rentang yang diperbolehkan yaitu 0,4170 – 0,4773 gram.

4.7.2 Keseragaman Kandungan

Dilakukan penetapan kadar andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat dalam kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol

rim pang kencur dengan metode KLT-Densitometri. Hasil luas area larutan baku standar andrografolida dan persamaan garis regresi untuk penetapan kadar andrografolida dalam kapsul no. 1-5 dan no. 6-10 dapat dilihat pada Gambar 5.9 dan 5.10 serta pada Tabel 5.7 dan Tabel 5.9, dan hasil penetapan kadar andrografolida dalam kapsul no. 1-5 dan no. 6-10 dapat dilihat pada Tabel 5.8 dan Tabel 5.10. Hasil pemeriksaan keseragaman kandungan untuk andrografolida dapat dilihat pada Tabel 5.11.

Substance: Andrografolida @ 232 nm

Regression via area: Linear $Y = 2539 + 1779 \cdot X$ $r = 0.99473$ $sdv = 4.09$

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0.34	816.00 ng			3856.56		
2	1	0.33	1.224 µg			4631.87		
3	1	0.33	1.632 µg			5575.09		
4	1	0.33	2.448 µg			7214.98		
5	1	0.34	3.624 µg			8623.87		
6	1	0.34	4.080 µg			9929.13		
7	1							Not used
8	1							Not used
9	1							Not used
10	1							Not used
11	1							Not used
12	1							Not used
13	1	0.34				7935.42	3.033 µg	
14	1	0.33				7828.96	2.973 µg	
15	1	0.34				7876.19	2.999 µg	
16	1	0.34				8133.83	3.144 µg	
17	1	0.35				8071.43	3.109 µg	

Gambar 4.9 Hasil penetapan kadar andrografolida dalam sediaan kapsul (no.1-5) campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri

4.7.2.1 Penetapan kadar andrografolida pada λ 232 nm

(untuk kapsul no. 1-5)

Tabel 5.7 Luas area larutan baku andrografolida dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (μg)	Luas Area
0,816	3856,56
1,224	4631,87
1,632	5575,09
2,448	7214,98
3,624	8623,87
4,080	9929,13

Persamaan regresi

$$y = 1,779x + 2539$$

$$r = 0,994$$

Tabel 5.8 Penetapan kadar andrografolida dalam kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri

No	Luas Area	Kadar dalam 2 μL (μg)	Kadar dalam 10 mL (μg)	% andrografolida dalam kapsul
1	7935,42	3,033	15,165	101,10
2	7828,96	2,973	14,865	99,10
3	7876,19	2,999	14,995	99,97
4	8133,83	3,144	15,720	104,80
5	8071,43	3,109	15,545	103,63

Substance: Andrografolida @ 232 nm

Regression via area: Linear Y = 2214 + 1.814 * X r = 0.99697 sdv = 3.27

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0.34	816.00	ng		3545.59		
2	1	0.33	1.224	µg		4398.89		
3	1	0.33	1.632	µg		5298.97		
4	1	0.33	2.448	µg		6899.29		
5	1	0.34	3.624	µg		8522.59		
6	1	0.34	4.080	µg		9693.74		
7	1							Not used
8	1							Not used
9	1							Not used
10	1							Not used
11	1							Not used
12	1							Not used
13	1	0.34				8046.44	3.215 µg	
14	1	0.33				7929.08	3.151 µg	
15	1	0.34				8147.87	3.271 µg	
16	1	0.34				8387.35	3.403 µg	
17	1	0.35				8421.10	3.422 µg	

Gambar 5.10 Hasil penetapan kadar andrografolida dalam sediaan kapsul (no.6-10) campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri

5.7.2.2 Penetapan kadar andrografolida pada λ 232 nm (untuk kapsul no. 6-10)

Tabel 5.9 Luas area larutan baku andrografolida dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (µg)	Luas Area
0,816	3545,59
1,224	4398,89
1,632	5298,97
2,448	6899,29
3,624	8522,59
4,080	9693,74

Persamaan regresi

$$y = 1,814x + 2214$$

$$r = 0,996$$

Tabel 5.10 Penetapan kadar andrografolida dalam kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri

No	Luas Area	Kadar dalam 2 μ L (μ g)	Kadar dalam 10 mL (μ g)	% andrografolida dalam kapsul
6	8046,44	3,215	16,075	107,17
7	7929,08	3,151	15,755	105,03
8	8147,87	3,271	16,355	109,03
9	8387,35	3,403	17,015	113,43
10	8421,10	3,422	17,110	114,07

Tabel 5.11 Hasil Pemeriksaan Keseragaman Kandungan Andrografolida dalam Sediaan Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur dengan KLT-Densitometri

Kapsul No.	Bobot isi kapsul (g)	Luas Area	Kadar dalam 2 μ L (μ g)	Kandungan Andrografolida dalam Kapsul (mg)	Kandungan Andrografolida terhadap dosis (%)
1	0,4531	7935,42	3,033	15,165	101,10
2	0,4423	7828,96	2,973	14,865	99,10
3	0,4546	7876,19	2,999	14,995	99,97
4	0,4595	8133,83	3,144	15,720	104,80
5	0,4524	8071,43	3,109	15,545	103,63
6	0,4467	8046,44	3,215	16,075	107,17
7	0,4518	7929,08	3,151	15,755	105,03
8	0,4555	8147,87	3,271	16,355	109,03
9	0,4615	8387,35	3,403	17,015	113,43
10	0,4563	8421,10	3,422	17,110	114,07
			Rata-rata	15,860	105,73
			SD	0,78	5,23
			% KV	4,92	4,95

Berikut ini adalah hasil luas area larutan baku standar etil *p*-metoksisinamat dan persamaan garis regresi untuk penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam kapsul no. 1-5 dan no. 6-10 dapat dilihat pada Gambar 5.11 dan 5.12 serta pada Tabel 5.12 dan Tabel 5.14, dan hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam kapsul no. 1-5 dan no. 6-10 dapat dilihat pada Tabel 5.13 dan Tabel 5.15. Hasil pemeriksaan keseragaman kandungan untuk etil *p*-metoksisinamat dapat dilihat pada Tabel 5.16.

Substance: EPMS @ 309 nm

Regression via area: Linear $Y = 1.615e+004 + 5.669 * X$ $r = 0.99142$ $sdv = 3.62$

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1							Not used
2	1							Not used
3	1							Not used
4	1							Not used
5	1							Not used
6	1							Not used
7	1	0.96	808.00 ng			19509.38		
8	1	0.95	1.212 µg			23905.52		
9	1	0.96	1.616 µg			26042.39		
10	1	0.96	2.424 µg			30279.53		
11	1	0.96	3.232 µg			33358.88		
12	1	0.96	4.040 µg			39415.30		
13	1	0.96				32554.69	2.891 µg	
14	1	0.96				32860.84	2.947 µg	
15	1	0.96				32763.05	2.930 µg	
16	1	0.96				34199.61	3.183 µg	
17	1	0.96				31950.47	2.786 µg	

Gambar 5.11 Hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam sediaan kapsul (no.1-5) campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri

5.7.2.3 Penetapan kadar EPMS pada λ 309 nm

(untuk kapsul no. 1-5)

Tabel 5.12 Luas area larutan baku etil *p*-metoksisinamat dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (μg)	Luas Area
0,816	19509,38
1,224	23905,52
1,632	26042,39
2,448	30279,53
3,624	33358,88
4,080	39415,30

Persamaan regresi

$$y = 5,669x + 1,615e + 004$$

$$r = 0,991$$

Tabel 5.13 Penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri

No	Luas Area	Kadar dalam 2 μL (μg)	Kadar dalam 10 mL (μg)	% EPMS dalam kapsul
1	32544,69	2,891	14,455	96,37
2	32860,84	2,947	14,735	98,23
3	32763,05	2,930	14,650	97,67
4	34199,61	3,183	15,915	106,10
5	31950,47	2,786	13,930	92,87

Substance: EPMS @ 309 nm

Regression via area Linear Y = 1.524e+004 + 5.986 * X r = 0.99320 s.d.v = 3.42

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1							Not used
2	1							Not used
3	1							Not used
4	1							Not used
5	1							Not used
6	1							Not used
7	1	0.96	808.00 ng			18860.46		
8	1	0.85	1.212 µg			22752.45		
9	1	0.96	1.616 µg			25915.68		
10	1	0.96	2.424 µg			30597.03		
11	1	0.96	3.232 µg			33863.58		
12	1	0.96	4.040 µg			39263.88		
13	1	0.96				33805.45	3.101 µg	
14	1	0.96				33554.68	3.059 µg	
15	1	0.97				31255.26	2.675 µg	
16	1	0.97				31946.93	2.791 µg	
17	1	0.97				34199.61	3.167 µg	

Gambar 5.12 Hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam sediaan kapsul (no.6-10) campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dengan KLT-Densitometri

5.7.2.4 Penetapan kadar EPMS pada λ 309 nm

(untuk kapsul no. 6-10)

Tabel 5.14 Luas area larutan baku etil *p*-metoksisinamat dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (µg)	Luas Area
0,816	18860,46
1,224	22752,45
1,632	25915,68
2,448	30597,03
3,624	33863,58
4,080	39263,88

Persamaan regresi

$$y = 5,986x + 1,524e + 004$$

$$r = 0,993$$

Tabel 5.15 Penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat dalam kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimfang kencur dengan KLT-Densitometri

No	Luas Area	Kadar dalam 2 μ L (μ g)	Kadar dalam 10 mL (μ g)	% EPMS dalam kapsul
6	33805,45	3,101	15,505	103,37
7	33554,68	3,059	15,295	101,97
8	31255,26	2,675	13,375	89,17
9	31946,93	2,791	13,955	93,03
10	34199,61	3,167	15,835	105,56

Tabel 5.16 Hasil Pemeriksaan Keseragaman Kandungan Etil *p*-metoksisinamat dalam Sediaan Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur dengan KLT-Densitometri.

Kapsul No.	Bobot isi kapsul (g)	Luas Area	Kadar dalam 2 μ L (μ g)	Kandungan EPMS dalam Kapsul (mg)	Kandungan EPMS terhadap dosis (%)
1	0,4531	32544,69	2,891	14,455	96,37
2	0,4423	32860,84	2,947	14,735	98,23
3	0,4546	32763,05	2,930	14,650	97,67
4	0,4595	34199,61	3,183	15,915	106,10
5	0,4524	31950,47	2,786	13,930	92,87
6	0,4467	33805,45	3,101	15,505	103,37
7	0,4518	33554,68	3,059	15,295	101,97
8	0,4555	31255,26	2,675	13,375	89,17
9	0,4615	31946,93	2,791	13,955	93,03
10	0,4563	34199,61	3,167	15,835	105,56
			Rata-rata	14,765	98,43
			SD	0,86	5,75
			% KV	5,82	5,84

Persyaratan keseragaman kandungan dipenuhi jika jumlah zat aktif terletak setara 85,0% hingga 115,0% dari yang tertera pada etiket dan tidak ada satuan terletak di luar rentang 75,0% hingga 125,0% yang tertera pada etiket dan simpangan baku relatif dari 10 satuan sediaan kurang dari atau sama dengan 6,0% (DepKes RI, 1995).

Dari data di atas didapatkan bahwa untuk per satuan kapsul, baik andrografolida maupun etil *p*-metoksisinamat berada dalam rentang 75,0% hingga 125,0%. Dengan rata-rata kandungan andrografolida di antara 85,0%-115,0% yaitu 105,73% dan KV < 6% yaitu 4,95% dan dengan rata-rata kandungan etil *p*-metoksisinamat di antara 85,0%-115,0% yaitu 98,43% dan KV < 6% yaitu 5,84% maka keseragaman kandungan andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat telah memenuhi persyaratan yang ditentukan.

5.7.3 Waktu Hancur

Hasil pengujian waktu hancur kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dapat dilihat pada Tabel 5.17 sebagai berikut

Tabel 5.17 Hasil Uji Waktu Hancur Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur dengan *Disintegration Tester Erweka Type ZT 501*

Replikasi	Waktu hancur (detik)
I	323
II	313
III	315
Rata-rata	$317 \pm 5,29$

Persyaratan waktu hancur untuk kapsul adalah semua kapsul harus hancur, kecuali bagian dari cangkang kapsul dan uji waktu hancur tidak menyatakan bahwa sediaan atau bahan aktifnya terlarut sempurna. Sediaan dinyatakan hancur sempurna bila sisa sediaan yang tertinggal pada kasa alat uji merupakan massa lunak yang tidak mempunyai inti yang jelas, kecuali bagian dari penyalut atau cangkang kapsul yang tidak larut (DepKes RI, 1995).

Waktu pengujian sediaan waktu hancur kapsul tidak boleh lebih dari 15 menit. Hasil rata-rata pengujian waktu hancur untuk kapsul campuran fraksi etil asetat sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol kencur adalah $317 \pm 5,29$ detik atau 5 menit lebih 17 detik. Hal ini berarti waktu hancur kapsul campuran fraksi etil asetat sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol kencur memenuhi persyaratan.

5.8 Hasil Pengujian Disolusi Kapsul

Dilakukan uji disolusi dengan tiga kali replikasi. Untuk hasil penetapan kadar andrografolida hasil disolusi pada replikasi 1, 2 dan 3 masing-masing dapat dilihat

pada Gambar 5.13, 5.14 dan 5.15 serta pada Tabel 5.17, 5.18, 5.19, 5.20, 5.21 dan 5.22 serta profil disolusi untuk andrografolida dapat dilihat pada Gambar 5.16.

Replikasi ke- 1

Substance: andrografolid @ 232 nm

Regression via area. Linear $Y = 1696 + 1.771 \cdot X$ $r = 0.99792$ $sdv = 2.57$

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0.53	800.00 ng			3170.70		
2	1	0.47	1.200 µg			3724.37		
3	1	0.47	1.600 µg			4479.18		
4	1	0.46	2.400 µg			6110.71		
5	1	0.45	3.200 µg			7284.54		
6	1	0.46				490.76	<720.00 ng	1
7	1	0.45				1591.65	<720.00 ng	
8	1	0.46				2499.99	<720.00 ng	
9	1	0.46				2529.05	<720.00 ng	
10	1	0.45				2656.59	<720.00 ng	
11	1	0.45				3188.70	843.10 ng	

Gambar 5.13 Hasil penetapan kadar andrografolida hasil disolusi dari sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-1 dengan KLT-Densitometri.

Tabel 5.17 Luas area larutan baku andrografolida dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (µg)	Luas Area
0,800	3170,70
1,200	3724,37
1,600	4479,18
2,400	6110,71
3,200	7284,54

Persamaan regresi

$$y = 1696 + 1,771 x$$

$$r = 0,997$$

Tabel 5.18 Penetapan kadar andrografolida hasil disolusi kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-1 dengan KLT-Densitometri

Sampel menit ke-	Luas Area	Kadar dalam 8 μ L	Kadar dalam 1 mL etanol ~ 5 mL media disolusi	Kadar andrografolida terlarut (mg/L)
5	490,76	0,000	0,00	0,00
15	1591,65	0,000	0,00	0,00
30	2499,99	0,454 μ g	56,75 μ g	11,35
60	2529,05	0,470 μ g	58,75 μ g	11,75
90	2656,59	0,542 μ g	67,75 μ g	13,55
120	3188,70	0,843 μ g	105,39 μ g	21,08

Replikasi ke- 2

Substance: andrografolid @ 232 nm

Regression via area: Linear

$$Y = 925.2 + 2.335 \cdot X$$

r = 0.99878 sdv = 2.09

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0.44	400.00 ng			1872.21		
2	1	0.42	600.00 ng			2260.38		
3	1	0.42	800.00 ng			2820.70		
4	1	0.42	1.200 μ g			3798.24		
5	1	0.43	1.600 μ g			4615.85		
6	1	0.44				867.26	<360.00 ng	1
7	1	0.43				1555.71	<360.00 ng	
8	1	0.41				2653.65	740.21 ng	
9	1	0.42				2967.53	874.63 ng	
10	1	0.42				3275.14	1.006 μ g	
11	1	0.42				3650.75	1.167 μ g	

Gambar 5.14 Hasil penetapan kadar andrografolida hasil disolusi dari sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-2 dengan KLT-Densitometri.

Tabel 5.19 Luas area larutan baku andrografolida dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (μg)	Luas Area
0,400	1872,21
0,600	2260,38
0,800	2820,70
1,200	3798,24
1,600	4615,85

Persamaan regresi

$$y = 925,2 + 2,335 x$$

$$r = 0,998$$

Tabel 5.20 Penetapan kadar andrografolida hasil disolusi kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-2 dengan KLT-Densitometri

Sampel menit ke-	Luas Area	Kadar dalam 8 μL	Kadar dalam 1 mL etanol ~ 5 mL media disolusi	Kadar andrografolida terlarut (mg/L)
5	867,26	0,000	0,00	0,00
15	1555,71	0,270 μg	33,75 μg	6,75
30	2653,65	0,740 μg	92,53 μg	18,51
60	2967,53	0,874 μg	109,33 μg	21,87
90	3275,14	1,006 μg	125,75 μg	25,15
120	3650,75	1,167 μg	145,88 μg	29,18

Replikasi ke-3

Substance: andrografolid @ 232 nm

Regression via area Linear

$$Y = 878,2 + 2,208 \cdot X$$

r = 0,99633 s.d.v = 3,63

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0,44	400,00 ng			1870,59		
2	1	0,40	600,00 ng			2057,98		
3	1	0,40	800,00 ng			2654,56		
4	1	0,40	1,200 µg			3544,29		
5	1	0,40	1,600 µg			4421,48		
6	1	0,41				1174,66	<360,00 ng	1
7	1	0,41				1652,93	<360,00 ng	
8	1	0,40				1663,41	<360,00 ng	
9	1	0,40				2910,22	920,20 ng	
10	1	0,39				3438,16	1,159 µg	
11	1	0,40				4092,02	1,455 µg	

Gambar 5.15 Hasil penetapan kadar andrografolida hasil disolusi dari sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-3 dengan KLT-Densitometri.

Tabel 5.21 Luas area larutan baku andrografolida dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (µg)	Luas Area
0,400	1870,59
0,600	2057,98
0,800	2654,56
1,200	3544,29
1,600	4421,48

Persamaan regresi

$$y = 878,2 + 2,208 x$$

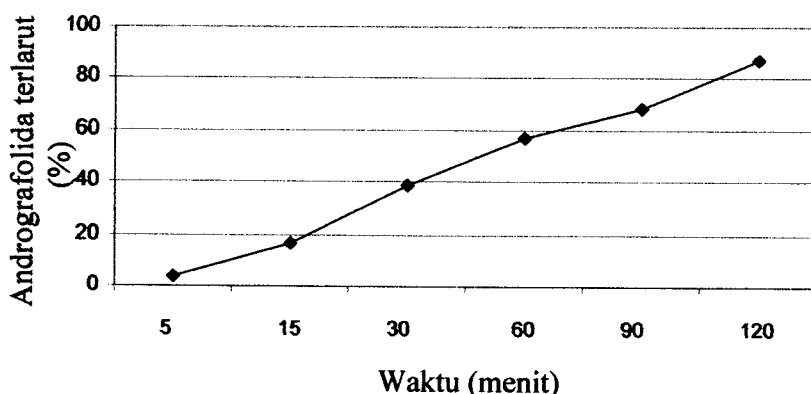
$$r = 0,996$$

Tabel 5.22 Penetapan kadar andrografolida hasil disolusi kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-3 dengan KLT-Densitometri

Sampel menit ke-	Luas Area	Kadar dalam 8 μ L	Kadar dalam 1 mL etanol ~ 5 mL media disolusi	Kadar andrografolida terlarut (mg/L)
5	1174,66	0,134 μ g	16,75 μ g	3,35
15	1652,93	0,351 μ g	43,88 μ g	8,78
30	1663,41	0,356 μ g	44,50 μ g	8,90
60	2910,22	0,920 μ g	115,03 μ g	23,00
90	3438,16	1,159 μ g	144,88 μ g	28,97
120	4092,02	1,455 μ g	181,88 μ g	36,38

Tabel 5.23 Hasil Kadar Andrografolida yang terlarut dalam disolusi Sediaan Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Ekstrak Herba Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur

Waktu (menit)	Kadar andrografolida yang terlarut (mg/L)			Prosen (%) Andrografolida terlarut			Rata-rata \pm SD
	I	II	III	I	II	III	
5	0,00	0,00	3,35	0,00	0,00	10,05	3,35 \pm 5,80
15	0,00	6,75	8,78	0,00	20,25	26,39	15,55 \pm 13,81
30	11,35	18,51	8,90	34,05	55,64	26,85	38,85 \pm 14,98
60	11,75	21,87	23,00	35,44	65,92	69,15	56,84 \pm 18,60
90	13,55	25,15	28,97	40,84	75,81	87,29	67,98 \pm 24,19
120	21,08	29,18	36,38	63,46	87,96	109,62	87,01 \pm 23,09
AUC ₍₁₂₀₎				4064,63	7090,40	7347,85	6167,63 \pm 1825,79
% ED ₍₁₂₀₎				33,87	59,09	61,23	51,39 \pm 15,22



Gambar 5.16 Kurva jumlah andrografolida yang terlarut dalam cairan lambung buatan tanpa pepsin dengan pH 1,2, pada suhu $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

Berikut ini adalah hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat hasil disolusi dari sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol kencur pada replikasi 1, 2 dan 3 yang masing-masing dapat dilihat pada Gambar 5.17, 5.18 dan 5.19 serta pada Tabel 5.24, 5.25, 5.26, 5.27, 5.28 dan 5.29 serta profil disolusi untuk etil *p*-metoksisinamat dapat dilihat pada Gambar 5.20. Replikasi ke-1

Substance: EPMS @ 309 nm

Regression via area Linear

$$Y = 8411 + 8.163 \cdot X$$

$r = 0.97028$ $sdv = 9.66$

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	1.05	800.00 ng			12813.91		
2	1	1.01	1.200 µg			18179.06		
3	1	1.00	1.600 µg			24229.22		
4	1	1.00	2.400 µg			28940.46		
5	1	1.00	3.200 µg			32992.70		
6	1	1.00				7944.18	<720.00 ng	
7	1	1.00				12383.58	<720.00 ng	
8	1	0.99				15215.18	833.51 ng	
9	1	1.00				16660.04	1.011 µg	
10	1	0.99				18211.41	1.201 µg	
11	1	0.99				18375.99	1.221 µg	

Gambar 5.17 Hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat hasil disolusi dari sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-1 dengan KLT-Densitometri.

Tabel 5.24 Luas area larutan baku etil *p*-metoksisinamat dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (μg)	Luas Area
0,800	12813,91
1,200	18179,06
2,400	28940,46
3,200	32992,70

Persamaan regresi

$$y = 7290 + 8,390 x$$

$$r = 0,989$$

Tabel 5.25 Penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat hasil disolusi kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-1 dengan KLT-Densitometri

Sampel menit ke-	Luas Area	Kadar dalam 8 μL	Kadar dalam 1 mL etanol ~ 5 mL media disolusi	Kadar etil <i>p</i> - metoksisinamat terlarut (mg/L)
5	7944,18	0,078 μg	9,75 μg	1,95
15	12383,58	0,607 μg	75,88 μg	15,18
30	15215,18	0,944 μg	157,43 μg	31,49
60	16660,04	1,116 μg	186,00 μg	37,20
90	18211,41	1,301 μg	216,83 μg	43,37
120	18375,99	1,321 μg	220,17 μg	44,03

Replikasi ke-2

Substance: EPMS @ 309 nm

Regression via area: Linear

$$Y = 1.045e+004 + 8.198 * X$$

r = 0.97319 sdv = 8.44

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	1.00	800.00 ng			15371.00		
2	1	0.95	1.200 µg			19710.19		
3	1	0.94	1.600 µg			25994.84		
4	1	0.94	2.400 µg			31589.16		
5	1	0.94	3.200 µg			34985.39		
6	1	0.94				12480.76	<720.00 ng	
7	1	0.94				16534.80	742.74 ng	
8	1	0.94				19632.92	1.121 µg	
9	1	0.94				20655.04	1.245 µg	
10	1	0.94				22317.26	1.448 µg	
11	1	0.94				23374.42	1.577 µg	

Gambar 5.18 Hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat hasil disolusi dari sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-2 dengan KLT-Densitometri.

Tabel 5.26 Luas area larutan baku etil *p*-metoksisinamat dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (µg)	Luas Area
0,800	15371,00
1,200	19710,19
2,400	31589,16
3,200	34985,39

Persamaan regresi

$$y = 9456,88 + 8,398 x$$

$$r = 0,988$$

Tabel 5.27 Penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat hasil disolusi kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-2 dengan KLT-Densitometri

Sampel menit ke-	Luas Area	Kadar dalam 8 μ L	Kadar dalam 1 mL etanol ~ 5 mL media disolusi	Kadar etil <i>p</i> - metoksisinamat terlarut (mg/L)
5	12480,76	0,360 μ g	45,00 μ g	9,00
15	16534,80	0,843 μ g	92,84 μ g	18,57
30	19632,92	1,217 μ g	140,13 μ g	28,03
60	20655,04	1,333 μ g	155,63 μ g	31,13
90	22317,26	1,531 μ g	181,00 μ g	36,20
120	23374,42	1,657 μ g	197,13 μ g	39,43

Replikasi ke-3

Substance: EPMS @ 309 nm

Regression via area: Linear

$$Y = 1.028e+004 + 7.164 \cdot X$$

r = 0.96870 sdv = 8.70

Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	1.03	800.00 ng			13903.32		
2	1	0.98	1.200 μ g			19246.88		
3	1	0.97	1.600 μ g			24000.01		
4	1	0.97	2.400 μ g			28384.36		
5	1	0.97	3.200 μ g			31789.47		
6	1	0.97				10502.92	<720.00 ng	
7	1	0.97				12367.72	<720.00 ng	
8	1	0.97				12502.13	<720.00 ng	
9	1	0.97				16573.84	878.06 ng	
10	1	0.97				17768.44	1.045 μ g	
11	1	0.96				18231.25	1.109 μ g	

Gambar 5.19 Hasil penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat hasil disolusi dari sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-3 dengan KLT-Densitometri.

Tabel 5.28 Luas area larutan baku etil *p*-metoksisinamat dalam berbagai konsentrasi dengan KLT-densitometri

Konsentrasi (μg)	Luas Area
0,800	13903,32
1,200	19246,88
2,400	28384,36
3,200	31789,47

Persamaan regresi

$$y = 9367,04 + 7,349 x$$

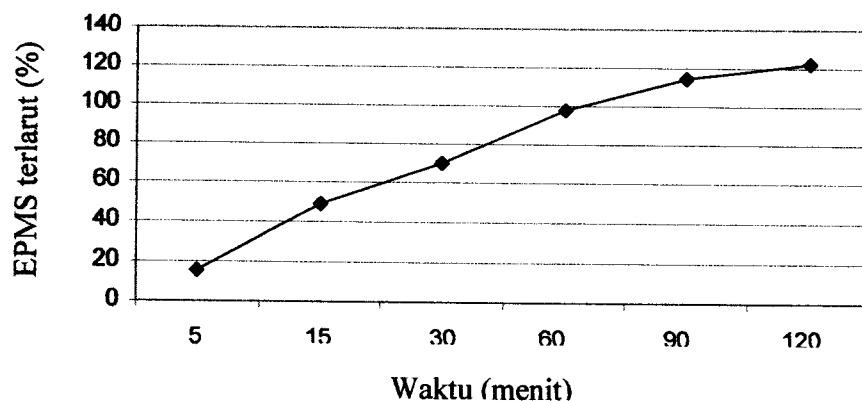
$$r = 0,985$$

Tabel 5.29 Penetapan kadar etil *p*-metoksisinamat hasil disolusi kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur pada replikasi ke-3 dengan KLT-Densitometri

Sampel menit ke-	Luas Area	Kadar dalam 8 μL	Kadar dalam 1 mL etanol ~ 5 mL media disolusi	Kadar etil <i>p</i> - metoksisinamat terlarut (mg/L)
5	10502,92	0,154 μg	19,25 μg	3,85
15	12367,72	0,408 μg	51,00 μg	10,20
30	12502,13	0,426 μg	53,25 μg	10,65
60	16573,84	0,981 μg	163,44 μg	32,69
90	17768,44	1,143 μg	190,50 μg	38,10
120	18231,25	1,206 μg	210,00 μg	42,00

Tabel 5.30 Hasil Kadar Etil *p*-metoksisinamat yang terlarut dalam Disolusi Sediaan Kapsul Campuran Fraksi Etil Asetat Ekstrak Herba Sambiloto dan Fraksi Minyak Ekstrak Etanol Rimpang Kencur

Waktu (menit)	Kadar EPMS yang terlarut (mg/L)			Prosen (%) EPMS terlarut			Rata-rata \pm SD
	I	II	III	I	II	III	
5	1,95	9,00	3,85	5,85	27,00	11,55	14,80 \pm 10,94
15	15,18	18,57	10,20	45,57	55,86	30,66	44,03 \pm 12,67
30	31,49	28,03	10,65	35,08	84,40	32,12	50,53 \pm 29,37
60	37,20	31,13	32,69	112,12	93,86	98,25	101,41 \pm 9,53
90	43,37	36,20	38,10	130,73	109,12	114,84	118,23 \pm 11,19
120	44,03	39,43	42,00	132,81	118,89	126,64	126,11 \pm 6,97
AUC ₍₁₂₀₎				10680,45	10672,50	9484,88	10279,28 \pm 687,98
% ED ₍₁₂₀₎				89,00	88,94	79,04	85,66 \pm 5,73



Gambar 5.20 Kurva jumlah etil *p*-metoksisinamat yang terlarut dalam cairan lambung buatan tanpa pepsin dengan pH 1,2, pada suhu 37°C \pm 0,5°C

Dari data di atas diketahui bahwa pelepasan andrografolida pada menit ke-120 sebesar $28,88 \text{ mg/L} \pm 7,65$ dengan prosen (%) andrografolida terlarut pada menit ke-120 sebesar $87,01 \pm 23,09$ serta efisiensi disolusi andrografolida $(_{120}) 51,39 \pm 15,22$. Sedangkan untuk etil *p*-metoksisinamat yang terlarut pada menit ke-120 sebesar $41,82 \text{ mg/L} \pm 2,31$ dengan prosen (%) etil *p*-metoksisinamat terlarut pada menit ke-120 sebesar $126,11 \pm 6,97$ serta efisiensi disolusi etil *p*-metoksisinamat $(_{120}) 85,66 \pm 5,73$.

HASIL PENELITIAN UJI TOKSISITAS AKUT DAN TERATOGENIK DARI CAMPURAN KAPSUL CAMPURAN FRAKSI DITERPEN LAKTON DAN EPMS

5.1. Perhitungan dan Pemberian Dosis

Hasil perhitungan dosis untuk uji toksisitas akut dan teratogenik masing-masing ditunjukkan pada tabel 5.1 dan 5.2. Sedangkan cara perhitungannya tercantum pada lampiran 2.

Tabel 5.1

Dosis Uji Toksisitas Akut

Kelompok	Dosis Campuran Fraksi
Dosis I	16 g/kg BB mencit
Dosis II	21 g/kg BB mencit
Dosis III	22 g/kg BB mencit
Dosis IV	23 g/kg BB mencit

Tabel 5.2

Dosis Uji Teratognik

Kelompok	Dosis Campuran Fraksi
Dosis I	20 mg/kg BB mencit
Dosis II	60 mg/kg BB mencit
Dosis III	100 mg/kg BB mencit

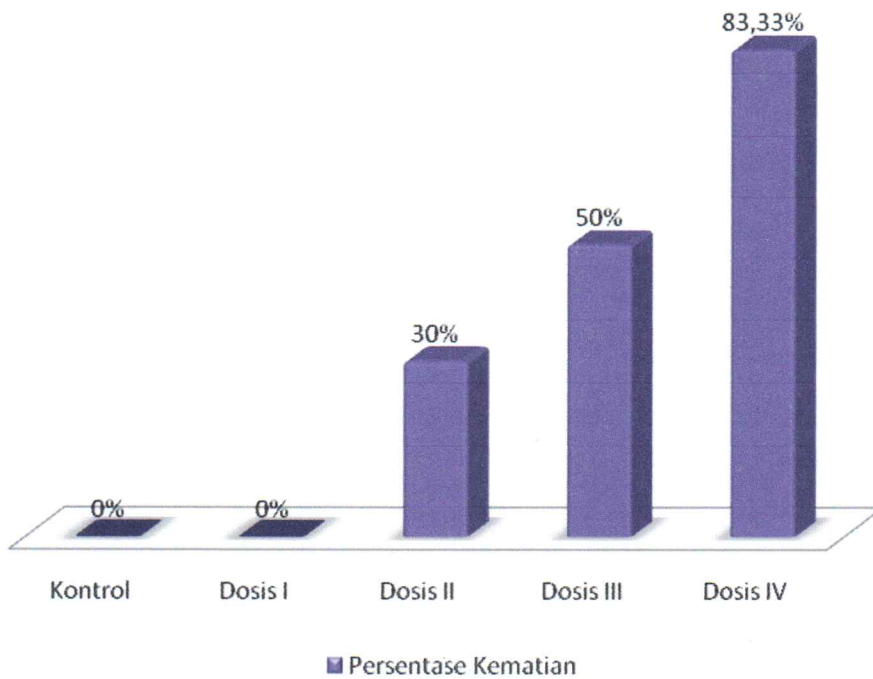
5.2 Hasil Uji Toksisitas Akut

Hasil toksisitas akut campuran fraksi etil asetat diterpen lakton sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* Linn) pada mencit dapat dilihat pada tabel 5.3 dan gambar 5.1 berikut:

Tabel 5.3

Hasil Uji Toksisitas Akut

Kelompok	Dosis (g/kg BB)	Jumlah Mencit	Mencit Hidup	Mencit Mati	Persentase Kematian
Kontrol	0	10	10	0	0%
I	0,16	10	10	0	0%
II	0,21	10	7	3	30%
III	0,22	6	3	3	50%
IV	0,23	6	1	5	83,33%



Gambar 5.1 Grafik Hasil Uji Toksisitas Akut Setelah Perlakuan

Gejala-gejala yang teramati pada mencit selama uji toksisitas akut ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel 5.4
Gejala-gejala Mencit pada Uji Toksisitas Akut

Gejala	KK	K I	K II	K III	K IV
Tidur	–	√	√	√	√
Penurunan aktivitas motorik	–	√	√	√	√
Gangguan Keseimbangan	–	–	√	√	√

Keterangan:

KK : Kelompok kontrol

K I : Kelompok perlakuan dosis I

K II : Kelompok perlakuan dosis II

K III : Kelompok perlakuan dosis III

K IV : Kelompok dosis IV

√ : Terjadi

– : Tidak terjadi

5.3 Analisis Data Uji Toksisitas Akut

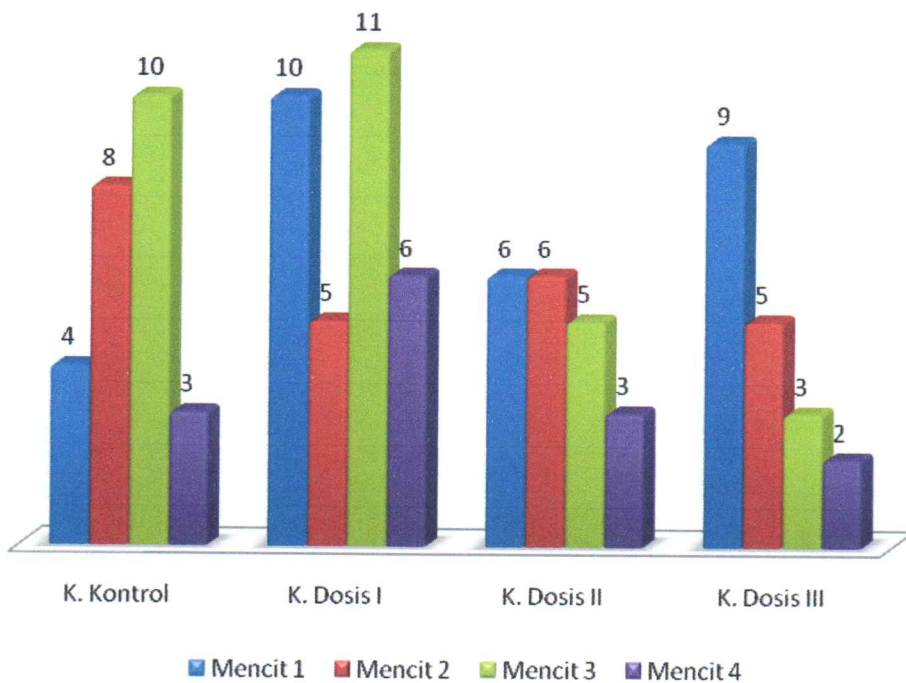
Data hasil toksisitas akut dianalisis dengan analisis statistik probit (lampiran 3) dan didapatkan LD_{50} sebesar 21,50 g/kg BB mencit (0,43 g/20 g BB mencit). Dosis tersebut dikonversikan ke dosis tikus untuk mengetahui kategori toksisitasnya. Diketahui faktor konversi dari mencit (20 g) ke tikus (200 g) adalah 7,0 (Gosh, 1971), sehingga LD_{50} campuran fraksi etil asetat diterpen lakton sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* Linn) pada tikus = $0,43 \times 7,0 = 3,01$ g/200 g BB tikus atau 15,05 g/kg BB tikus. Dengan demikian campuran fraksi ini dikategorikan dalam praktis tidak toksik (Loomis, 1978).

5.4 Hasil Uji Teratogenik

Hasil pengamatan uji teratogenik menunjukkan tidak ada janin yang mengalami kecacatan. Hasil pengamatan jumlah total janin, jumlah janin mati, jumlah resorpsi janin, dan rata-rata bobot janin mencit kelompok kontrol, kelompok dosis I, kelompok dosis II, dan kelompok dosis III ditunjukkan dalam tabel 5.5-5.10 gambar 5.2-5.5 berikut ini:

Tabel 5.5
Jumlah Total Janin Mencit

No. Mencit	Jumlah Janin			
	K. Kontrol	K. Dosis I	K. Dosis II	K. Dosis III
1.	4	10	6	9
2.	8	5	6	5
3.	10	11	5	3
4.	3	6	3	2

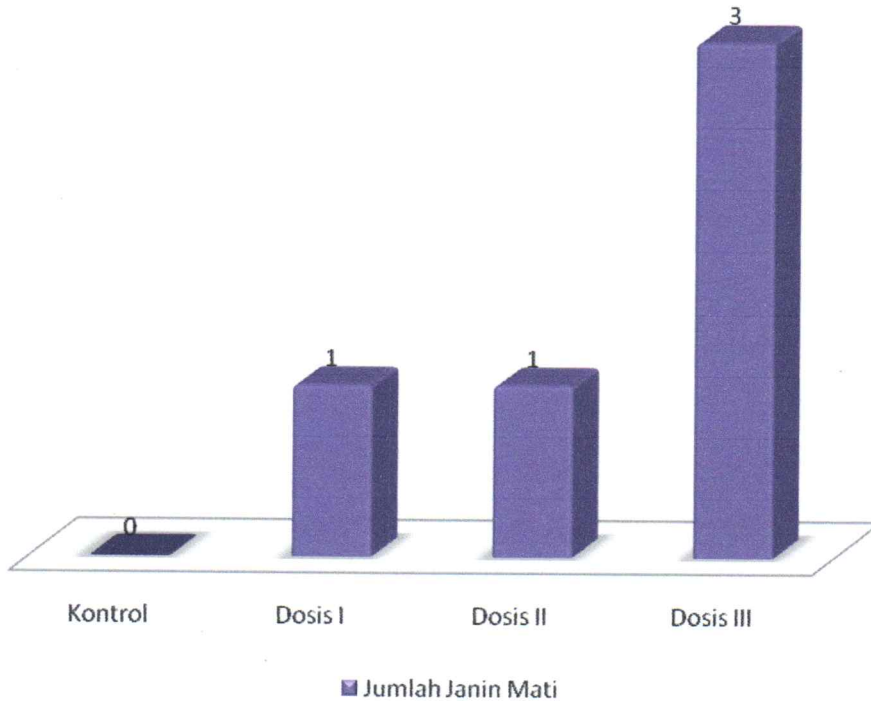


Gambar 5.2 Jumlah Total Janin Mencit

Tabel 5.6

Jumlah Janin Mati

Kelompok	Jumlah Induk	Jumlah Total Janin	Jumlah Janin Mati
Kontrol	4	25	0
Dosis I	4	32	1
Dosis II	4	20	1
Dosis III	4	19	3

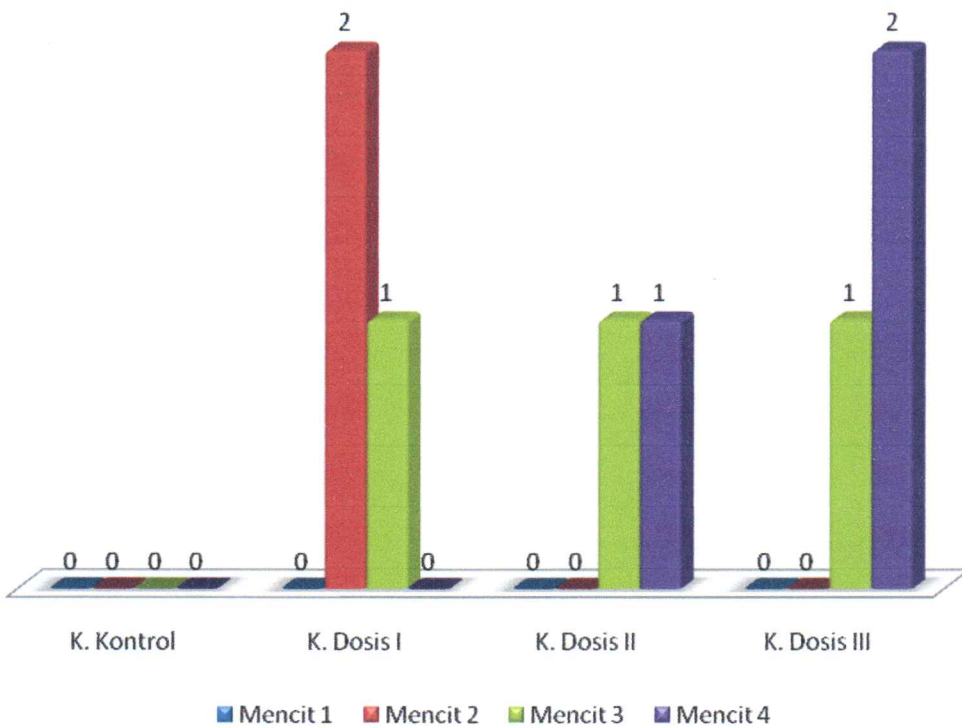


Gambar 5.3 Grafik Jumlah Janin Mati

Tabel 5.7

Jumlah Resorpsi Janin Mencit

No. Mencit	Jumlah Resorpsi Janin			
	K. Kontrol	K. Dosis I	K. Dosis II	K. Dosis III
1.	0	0	0	0
2.	0	2	0	0
3.	0	1	1	1
4.	0	0	1	2

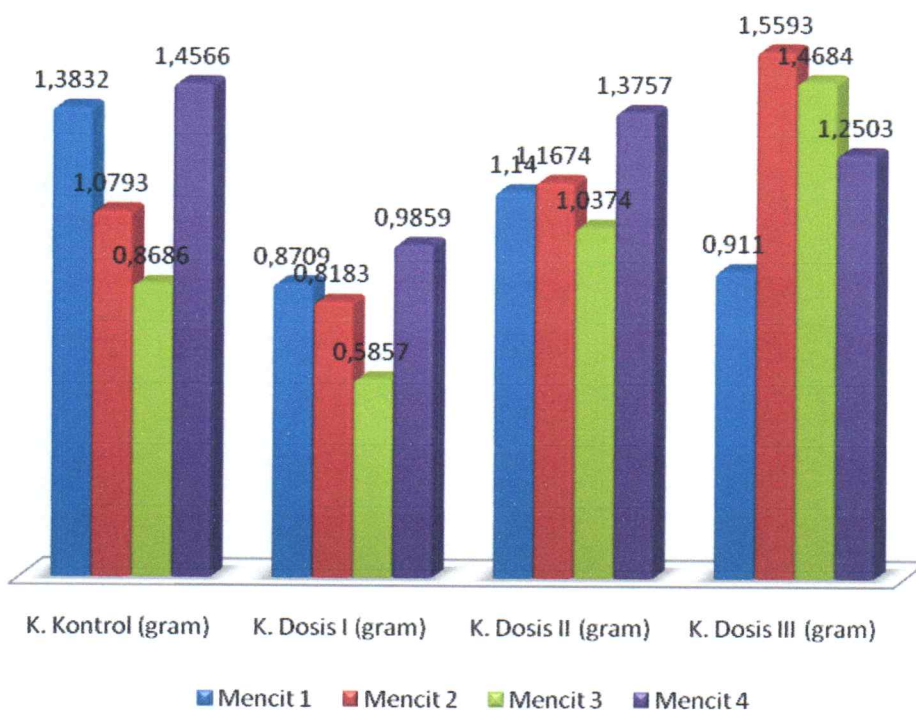


Gambar 5.4 Grafik Jumlah Resorpsi Janin Mencit

Tabel 5.8

Rata-rata Bobot Janin Mencit

No. Mencit	Rata-rata Bobot Janin			
	K. Kontrol (gram)	K. Dosis I (gram)	K. Dosis II (gram)	K. Dosis III (gram)
1.	1,3832	0,8709	1,1400	0,9110
2.	1,0793	0,8183	1,1674	1,5593
3.	0,8686	0,5857	1,0374	1,4684
4.	1,4566	0,9859	1,3757	1,2503

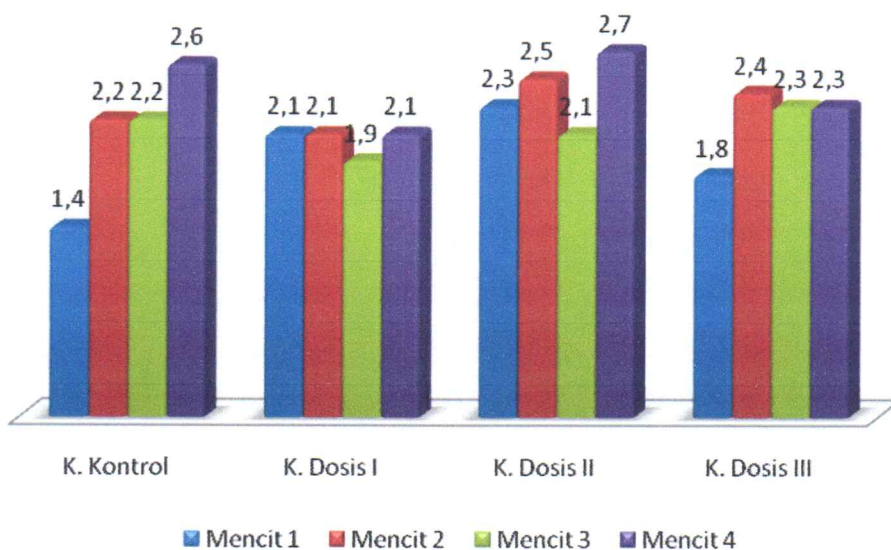


Gambar 5.5 Grafik Rata-rata Bobot Janin Mencit

Tabel 5.9

Rata-rata Panjang Janin Mencit

No. Mencit	Rata-rata Panjang Janin			
	K. Kontrol (cm)	K. Dosis I (cm)	K. Dosis II (cm)	K. Dosis III (cm)
1.	1,4	2,1	2,3	1,8
2.	2,2	2,1	2,5	2,4
3.	2,2	1,9	2,1	2,3
4.	2,6	2,1	2,7	2,3



Gambar 5.6 Grafik Rata-rata Panjang Janin Mencit

Tabel 5.10

Jumlah Cacat Makroskopik Janin Mencit

Kelompok	Jumlah Janin Cacat Makroskopik
Kontrol	0
Dosis I	0
Dosis II	0
Dosis III	0

5.5 Analisis Data Uji Teratogenik

a. Analisis jumlah janin menci

Data total jumlah kematian janin (Tabel 5.5) dianalisis dengan menggunakan Chi-Square pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan menghasilkan Asymp. Sig. $0,540 > 0,05$ (lampiran 4), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan berdasar jumlah janin atau tidak ada hubungan kelompok perlakuan dengan jumlah janin.

b. Analisis jumlah janin mati

Data total jumlah kematian janin (Tabel 5.6) dianalisis dengan menggunakan Chi-Square pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan menghasilkan Asymp. Sig. $0,238 > 0,05$ (lampiran 5), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan berdasar jumlah janin mati atau tidak ada hubungan kelompok perlakuan dengan jumlah janin mati.

c. Analisis jumlah resorpsi menci

Data total jumlah resorpsi janin (Tabel 5.7) dianalisis dengan menggunakan Chi-Square pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan menghasilkan Asymp. Sig. $0,518 > 0,05$ (lampiran 6), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara masing-masing kelompok perlakuan berdasar jumlah resorpsi atau tidak ada hubungan antar kelompok perlakuan dengan jumlah resorpsi.

d. Analisis rata-rata bobot janin menci

Data rata-rata bobot janin menci dianalisis dengan ANAVA satu arah pada tingkat kepercayaan 95% dan ditunjukkan pada tabel 5.8.

Tabel 5.11

Hasil analisis rata-rata bobot janin mencit dengan ANAVA satu arah

Sumber Variasi	Derajat Bebas (DF)	Jumlah Kuadrat (SS)	Kuadrat Rata-rata (MS)	F _{hitung}	Asymp. Sig.
Antar Perlakuan	3	0,535	0,178	3,460	0,051
Dalam Perlakuan	12	0,619	0,052		
Total	15	1,154			

Dari perhitungan ANAVA satu arah diketahui $F_{hitung} = 3,460$, sedangkan harga $F_{tabel} = 6,39$; sehingga dapat disimpulkan tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan.

e. Analisis rata-rata panjang janin mencit

Data rata-rata bobot janin mencit dianalisis dengan ANAVA satu arah pada tingkat kepercayaan 95% dan ditunjukkan pada tabel 5.9.

Tabel 5.12

Hasil analisis rata-rata panjang janin mencit dengan ANAVA satu arah

Sumber Variasi	Derajat Bebas (DF)	Jumlah Kuadrat (SS)	Kuadrat Rata-rata (MS)	F _{hitung}	Asymp. Sig.
Antar Perlakuan	3	0,288	0,096	0,950	0,447
Dalam Perlakuan	12	1,210	0,101		
Total	15	1,498			

Dari perhitungan ANAVA satu arah diketahui $F_{hitung} = 0,950$, sedangkan harga $F_{tabel} = 6,39$; sehingga dapat disimpulkan tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan.

f. Analisis cacat makroskopik

Cacat makroskopik merupakan pengamatan adanya cacat luar tubuh janin, yaitu meliputi kepala (telinga, mata dan mulut), organ ekstremitas (tangan dan kaki) dan jari-jari, perut, punggung, serta ekor. Pengamatan dilakukan dengan bantuan lup (kaca pembesar), yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.10 yang menunjukkan tidak ada satu pun janin yang mengalami cacat makroskopik pada janin yang hidup maupun pada janin yang mati. Hal Ini berarti pemberian campuran fraksi etil asetat sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* Linn) tidak memberikan pengaruh pada pembentukan organ pada janin yang tampak dari luar.

HASIL PENELITIAN TOKSISITAS SUB AKUT

5.2 Perhitungan dan Pemberian Dosis Terhadap Tikus Coba

Dosis bahan uji yang diberikan untuk uji toksisitas subkronik tercantum dalam Tabel V.5 Sedangkan cara perhitungan dan volume yang disondegan dapat dilihat pada Lampiran

Tabel V.5 Dosis Campuran Fraksi Diterpen Lakton Herba Sambiloto Dan Fraksi Minyak Rimpang Kencur

Kelompok Uji	Dosis Campuran Fraksi Yang Diberikan	
	Fraksi Diterpen Lakton (kadar andrografolida 89,30%)	Fraksi Minyak Rimpang Kencur (kadar EPMS 24,70%)
Kontrol Negatif	-	-
Dosis I	0,60 mg/200 g BB tikus	2,19 mg/200 g BB tikus
Dosis II	1,81 mg/200 g BB tikus	6,56 mg/200 g BB tikus
Dosis III	3,02 mg/200 g BB tikus	10,93 mg/200 g BB tikus

5.3 Penimbangan Berat Badan Tikus Coba

Hewan coba tikus setiap hari selama 95 hari perlakuan ditimbang berat badannya. Dengan mengetahui berat badan tikus coba maka dapat ditentukan jumlah bahan uji yang akan diberikan sesuai dengan dosis setiap kelompok. Berat badan tikus coba setiap minggunya ditunjukkan pada Tabel V.6 :

Tabel V.6 Berat badan Tikus Coba

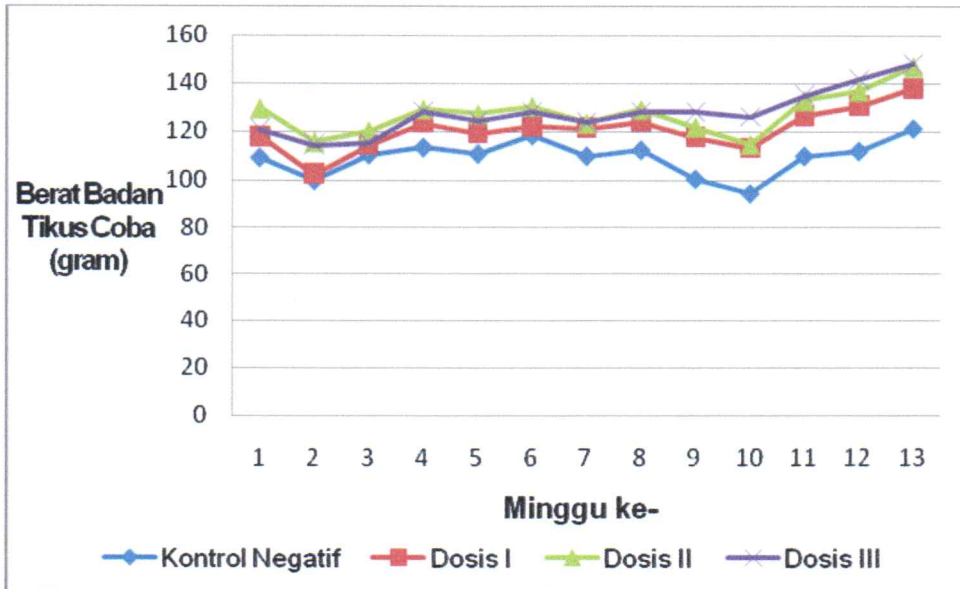
Kode Tikus Coba	Berat Badan (gram)												
	Minggu ke-												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
K-1	103	100	116	115	119	123	118	116	92	71	97	101	110
K-2	102	85	103	111	112	115	106	105	96	85	106	110	127
K-3	97	91	103	110	103	103	92	92	85	81	85	84	84
K-4	113	117	103	100	98	117	110	116	108	105	122	125	133
K-5	118	110	133	120	107	119	106	113	103	108	122	125	132
K-6	123	110	115	131	129	141	135	139	125	119	132	134	144
K-7	108	85	100	106	107	110	102	105	94	92	105	104	117
DI-1	113	100	108	108	97	97	112	112	99	91	112	115	133
DI-2	123	107	116	125	124	130	127	122	121	115	123	134	141
DI-3	115	103	121	135	128	133	128	135	130	121	138	144	153
DI-4	119	104	113	120	115	113	115	123	116	113	123	126	133
DI-5	121	105	117	136	137	141	132	136	128	125	139	139	148
DI-6	107	89	103	111	111	116	115	119	114	113	130	135	147
DI-7	126	108	120	129	121	124	120	121	115	113	119	121	130
DII-1	121	115	113	134	133	132	124	140	132	116	150	164	183
DII-2	109	103	120	133	139	146	136	134	126	118	152	165	177
DII-3	134	114	121	127	124	127	119	121	113	109	112	115	123

DII-4	136	119	123	130	129	137	125	137	127	121	140	136	142
DII-5	143	127	133	139	132	130	128	132	129	123	133	137	144
DII-6	121	98	100	102	98	99	97	96	91	86	97	95	107
DII-7	141	131	129	138	135	141	134	143	133	127	145	145	152
DIII-1	132	118	121	143	145	153	157	155	159	165	177	185	196
DIII-2	109	100	97	100	102	106	98	91	98	91	91	100	102
DIII-3	119	101	117	132	124	132	138	130	138	138	149	165	173
DIII-4	122	140	89	101	92	95	87	93	92	87	88	93	116
DIII-5	120	108	122	135	131	127	121	135	127	121	139	141	146
DIII-6	111	109	121	138	131	132	126	145	139	138	150	150	158
DIII-7	132	123	138	148	145	150	138	148	142	141	149	156	145

Keterangan :

- K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%
- DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.
- DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.
- DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Untuk mengetahui profil pengaruh bahan uji terhadap berat badan hewan coba, dibuat grafik yang menggambarkan berat badan tikus pada setiap minggunya, seperti yang ditampilkan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Grafik Profil Berat Badan Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Berdasarkan Gambar 5.1, diketahui bahwa berat badan hewan coba tikus selama masa perlakuan mengalami kenaikan dan penurunan. Untuk memastikan apakah kenaikan dan penurunan berat badan tersebut akibat pengaruh bahan uji, maka dihitung perubahan berat badan hewan coba tikus setiap minggunya, seperti yang ditampilkan pada tabel berikut:

Tabel V.7 Perubahan Berat Badan Tikus Coba

Interval Waktu (antar minggu)	Perubahan Berat Badan (gram)			
	K	DI	DII	DIII
1 dan 2	-9,43	-15,43	-14,00	-6,57
2 dan 3	10,71	11,71	4,57	0,86
3 dan 4	2,86	9,43	9,14	13,14
4 dan 5	-2,57	-4,43	-1,86	-3,86
5 dan 6	7,57	3,00	3,14	3,57

6 dan 7	-8,43	-0,71	-7,00	-4,29
7 dan 8	2,43	2,71	5,71	4,57
8 dan 9	-11,86	-6,43	-7,43	-0,29
9 dan 10	-6	-4,57	-7,29	-2,00
10 dan 11	15,43	13,29	18,43	8,86
11 dan 12	2,00	4,29	4,00	6,71
12 dan 13	9,29	7,29	10,14	6,57
Rata-rata Perubahan Berat Badan Tikus (gram)	1,00 ± 8,77	1,68 ± 8,40	1,46 ± 9,23	2,27 ± 5,97

Keterangan :

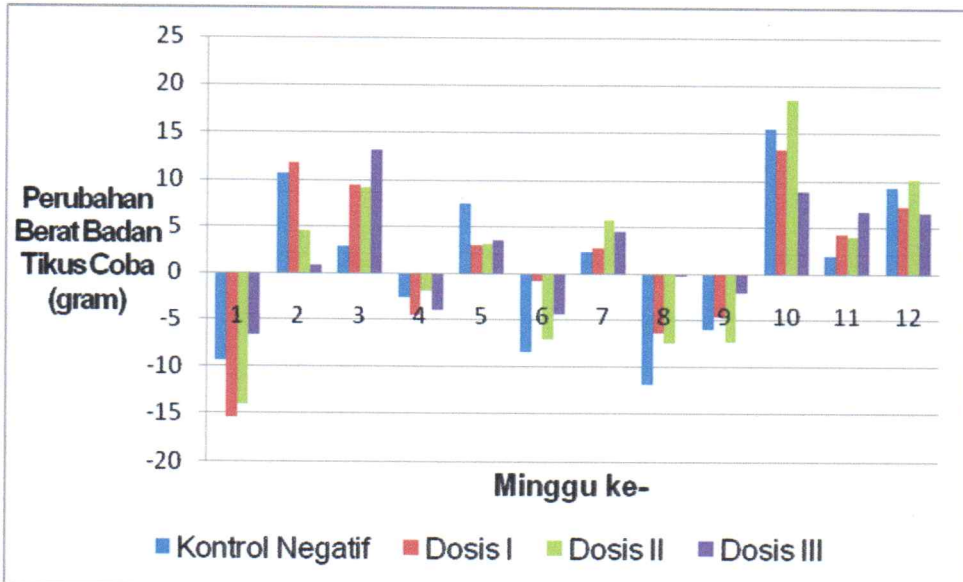
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

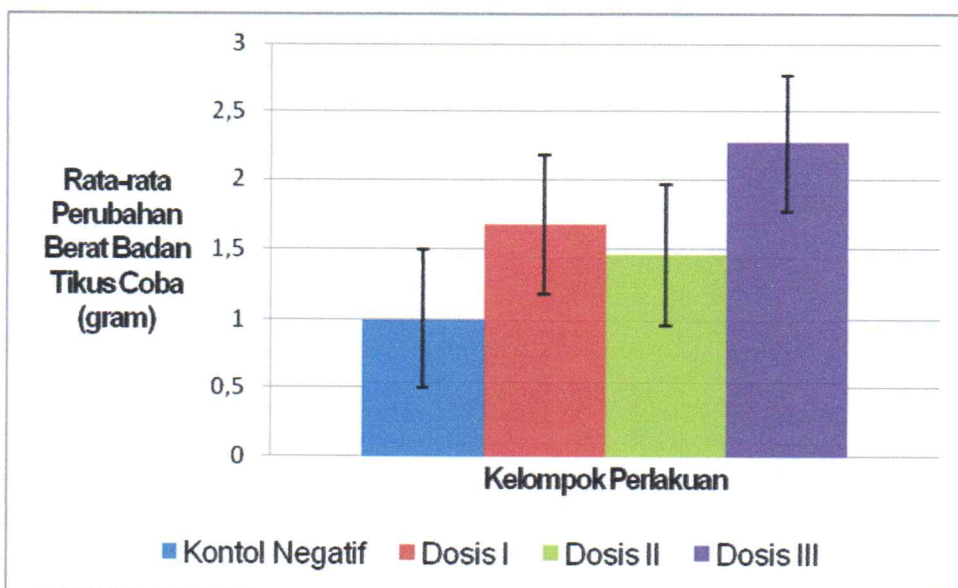
DIII = Kelompok dosis III, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Kemudian perubahan tersebut dibandingkan untuk mengetahui pengaruh pemberian campuran fraksi diterpen lakton herba sambiloto dan fraksi minyak rimpang kencur terhadap berat badan tikus coba, histogram perbandingan ditampilkan pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Histogram Perubahan Berat Badan Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Berdasarkan Gambar 5.2, dapat diketahui bahwa terjadi kenaikan penurunan perubahan berat badan seiring dengan masa perlakuan. Namun berdasarkan histogram tersebut sulit untuk disimpulkan mengenai perbedaan perubahan berat badan antar kelompok. Oleh karena itu selanjutnya dibuat histogram perubahan berat badan rata-rata hewan coba tikus (Gambar 5.3), sehingga akan lebih mudah untuk membandingkan perubahan berat badan antar kelompok.



Gambar 5.3 Histogram Rata-rata Perubahan Berat Badan Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Berdasarkan Gambar 5.3, diketahui bahwa perubahan berat badan hewan coba tikus selama masa perlakuan tidak dipengaruhi oleh bahan uji yang diberikan.

5.4 Pemeriksaan Kimia Klinik Tikus Coba

Pemeriksaan parameter kimia klinik merupakan salah satu cara untuk mengetahui efek toksisitas subkronik campuran fraksi diterpen lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dan fraksi minyak rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.). Parameter tersebut meliputi SGOT, SGPT, BUN, kreatinin serta glukosa darah dalam serum darah hewan coba tikus. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik, Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya (Lampiran 7).

Adapun data hasil pemeriksaan SGOT pada serum darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.8 Hasil Pemeriksaan SGOT Pada Serum Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar SGOT (U/L)			
	K	DI	DII	DIII
1	205	104	116	127
2	110	146	135	112
3	185	139	131	137
4	110	100	107	149
5	105	75	121	93
6	85	70	129	139
7	85	70	130	80
Rata-rata	126,43 ± 48,37	100,57 ± 31,82	124,14 ± 9,94	119,57 ± 25,59

Keterangan :

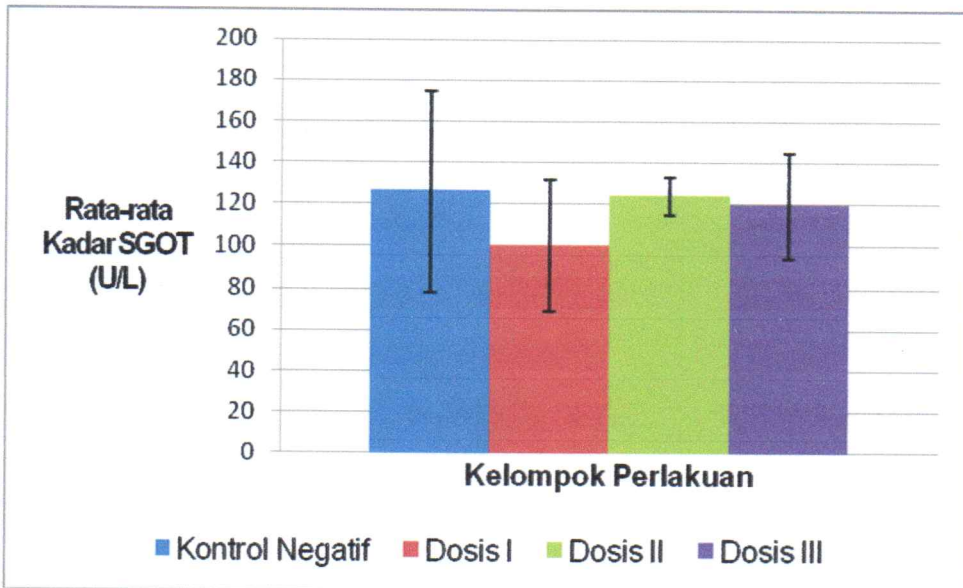
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis III, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata SGOT serum darah hewan coba tikus (Gambar 5.4), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata SGOT antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.4 Histogram Rata-rata Kadar SGOT Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan SGPT pada serum darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.9 Hasil Pemeriksaan SGPT Pada Serum Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar SGPT (U/L)			
	K	DI	DII	DIII
1	35	51	52	54
2	45	48	45	62
3	61	49	53	101
4	36	46	40	67
5	50	45	45	56
6	35	25	56	47
7	40	40	58	60
Rata-rata	43,14 ± 9,69	43,43 ± 8,85	49,86 ± 6,62	63,86 ± 17,56

Keterangan :

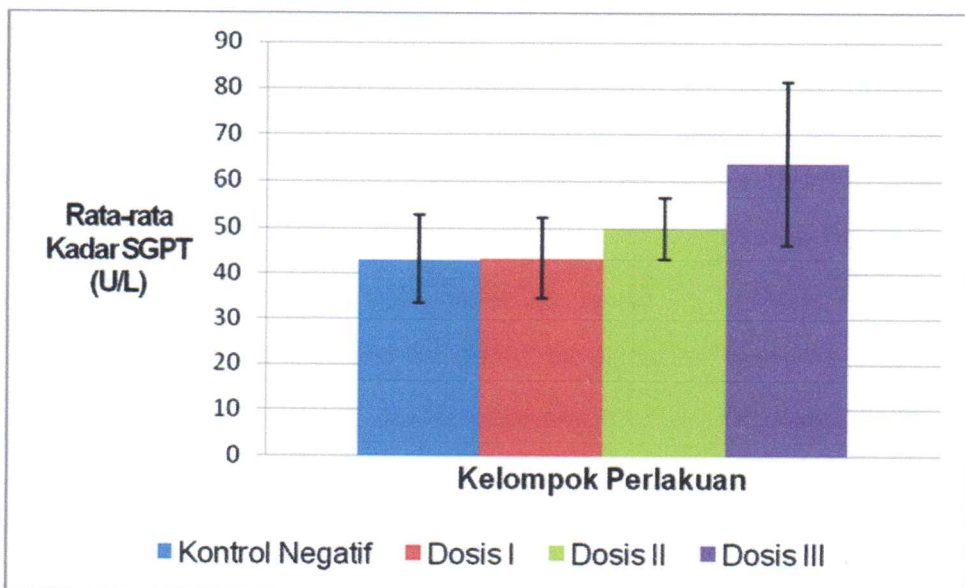
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata SGPT serum darah hewan coba tikus (Gambar 5.5), sehingga lebih mudah membandingkan perubahan kadar rata-rata SGPT antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.5 Histogram Rata-rata Kadar SGPT Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan BUN pada serum darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.10 Hasil Pemeriksaan BUN Pada Serum Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar BUN (mg/dl)			
	K	DI	DII	DIII
1	20	9	16	21
2	17	13	13	18
3	26	12	23	27
4	15	22	16	18
5	18	21	19	25
6	19	16	25	15
7	22	22	21	16
Rata-rata	19,57 ± 3,59	16,43 ± 5,32	19,00 ± 4,28	20,00 ± 4,55

Keterangan :

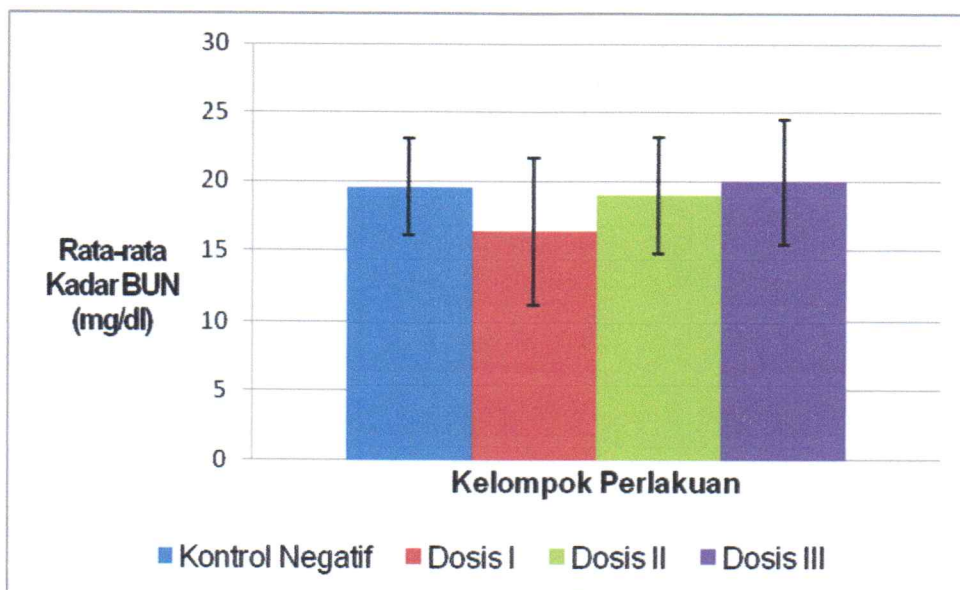
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis III, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata BUN serum darah hewan coba tikus (Gambar 5.6), sehingga lebih mudah membandingkan perubahan kadar rata-rata BUN antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.6 Histogram Rata-rata Kadar BUN Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan kreatinin pada serum darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

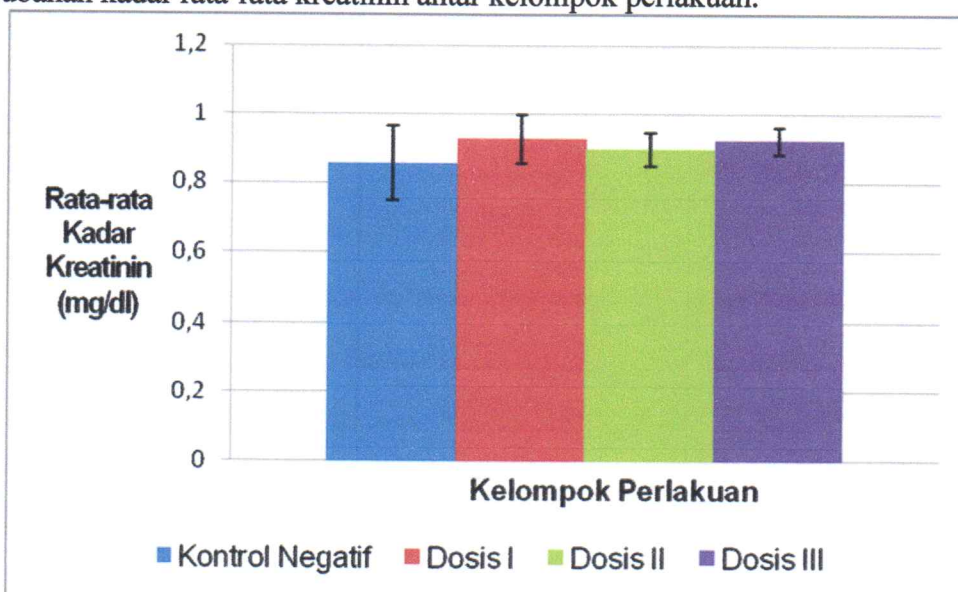
Tabel V.11 Hasil Pemeriksaan Kreatinin Pada Serum Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Kreatinin (mg/dl)			
	K	DI	DII	DIII
1	0,62	0,80	0,83	0,89
2	0,84	0,89	0,83	0,89
3	0,97	0,92	0,94	0,90
4	0,89	0,94	0,93	0,93
5	0,88	0,94	0,95	0,99
6	0,87	1,03	0,88	0,95
7	0,93	0,97	0,93	0,91
Rata-rata	0,86 ± 0,11	0,93 ± 0,07	0,90 ± 0,05	0,92 ± 0,04

Keterangan :

- K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%
 DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.
 DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.
 DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata kreatinin serum darah hewan coba tikus (Gambar 5.7), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata kreatinin antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.7 Histogram Rata-rata Kadar Kratinin Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan glukosa pada serum darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.12 Hasil Pemeriksaan Glukosa Darah Pada Serum Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Glukosa Darah (mg/dl)			
	K	DI	DII	DIII
1	89	101	93	140
2	144	104	143	175
3	162	140	74	191
4	151	84	149	91
5	156	85	122	183
6	147	185	127	131
7	173	168	142	110
Rata-rata	146,00 ± 26,97	123,86 ± 40,75	121,43 ± 28,10	145,86 ± 38,33

Keterangan :

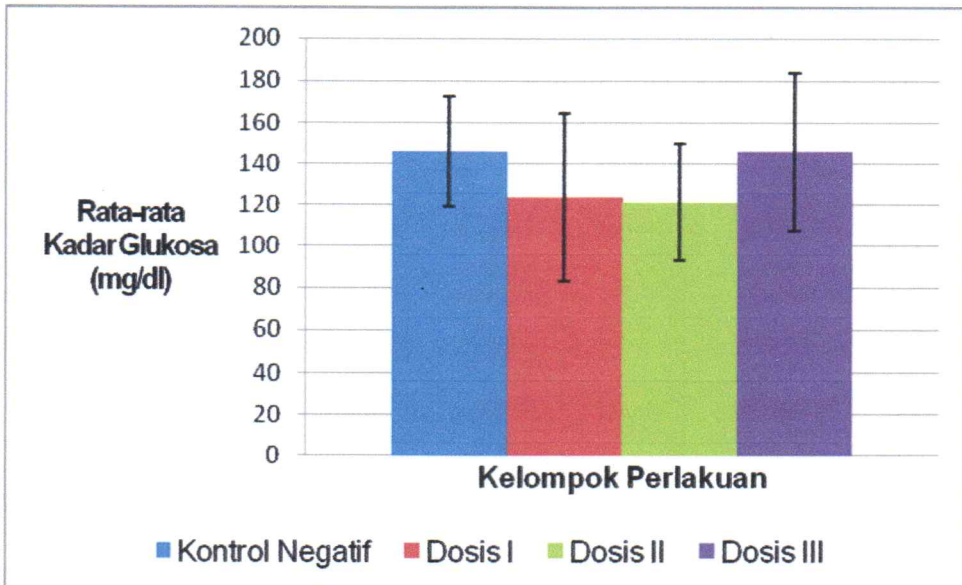
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis III, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata glukosa serum darah hewan coba tikus (Gambar 5.8), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata glukosa antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.8 Histogram Rata-rata Kadar Glukosa Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Kemudian data parameter kimia klinik tersebut dianalisis dengan menggunakan *One-Way* ANOVA pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan hasilnya ditunjukkan pada Lampiran. Nilai signifikansi masing-masing parameter hematologi ditunjukkan pada Tabel V.13

Tabel V.13 Nilai Signifikansi Parameter Kimia Klinik Berdasarkan Analisis dengan *One-Way* ANOVA

Parameter Kimia Klinik	Nilai Signifikasi	Keterangan ($\alpha = 0,05$)
SGOT	0,434	$\square \alpha$
SGPT	0,008	$< \alpha$
BUN	0,458	$\square \alpha$
Kreatinin	0,290	$\square \alpha$
Glukosa	0,370	$\square \alpha$

Pada parameter SGOT, BUN, kreatinin, dan glukosa didapatkan nilai signifikansi $> \alpha$, sehingga H_0 diterima dan dapat disimpulkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan berdasarkan parameter SGOT, BUN, kreatinin dan glukosa. Sedangkan pada parameter SGPT diperoleh nilai signifikansi $< \alpha$, sehingga H_0 ditolak dan dapat disimpulkan ada perbedaan kadar SGPT yang bermakna antara kelompok perlakuan. Untuk mengetahui ada tidaknya efek perlakuan antar pasangan kelompok, analisis dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* (Uji LSD). Diperoleh hasil nilai signifikansi antara kelompok dosis III dengan kelompok kontrol negatif adalah 0,002, nilai signifikansi kelompok dosis III dengan kelompok dosis I adalah 0,003 serta nilai signifikansi dosis III dengan kelompok dosis II adalah 0,031. Ketiga nilai signifikansi tersebut $< \alpha$, artinya ada pengaruh pemberian bahan uji dosis III terhadap kadar SGPT pada hewan coba tikus. Bahan uji pada dosis III menghasilkan peningkatan kadar SGPT bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, dosis I, dan dosis II. Dan peningkatan kadar SGPT tersebut di luar rentang parameter normal.

5.5 Pemeriksaan Hematologi Tikus Coba

Pemeriksaan parameter hematologi merupakan salah satu cara untuk mengetahui efek toksisitas subkronik campuran fraksi diterpen lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dan fraksi minyak rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.). Parameter hematologi yang diperiksa pada darah hewan coba tikus diantaranya adalah hitung jumlah hemoglobin, hitung jumlah platelet, hitung jumlah dan jenis leukosit, serta laju endap darah. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Hematologi, Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya (Lampiran 9).

Adapun data hasil pemeriksaan hemoglobin pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.14 Hasil Pemeriksaan Hemoglobin Pada Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Hemoglobin (G/dl)			
	K	DI	DII	DIII
1	11,0	12,4	13,9	11,7
2	10,1	14,1	14,0	15,7
3	13,3	14,2	13,9	12,6
4	13,4	13,0	13,3	12,6
5	13,4	13,6	13,5	13,8
6	13,2	13,6	12,7	12,9
7	13,2	14,2	14,5	12,4
Rata-rata	12,51 ± 1,37	13,59 ± 0,68	13,69 ± 0,58	13,10 ± 1,30

Keterangan :

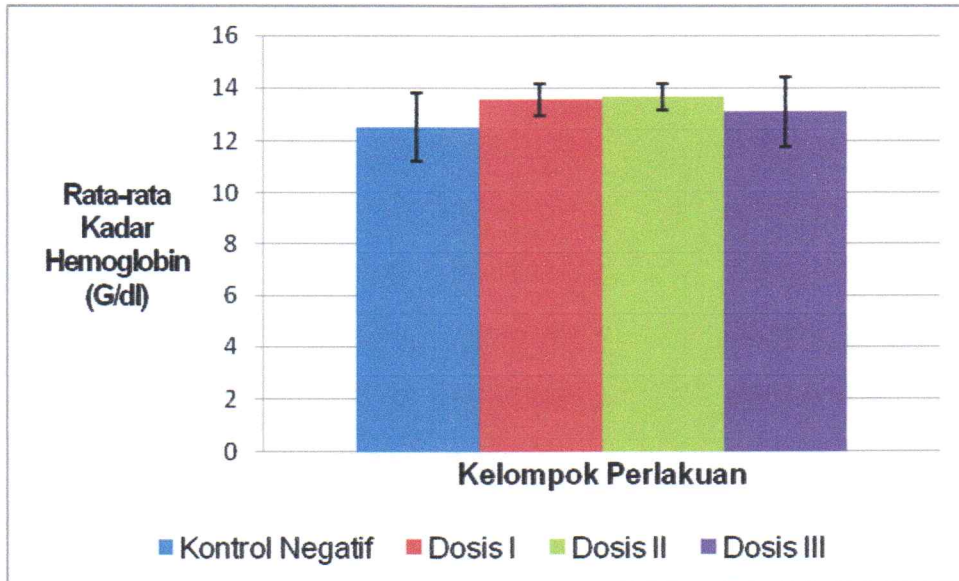
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis III, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata hemoglobin plasma darah hewan coba tikus (Gambar 5.9), sehingga lebih mudah membandingkan perubahan kadar rata-rata hemoglobin antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.9 Histogram Rata-rata Kadar Hemoglobin Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan platelet pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.15 Hasil Pemeriksaan Platelet Pada Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Platelet ($10^3/\mu\text{l}$)			
	K	DI	DII	DIII
1	817	936	1204	931
2	817	1156	974	1021
3	969	1085	1088	950
4	829	1040	850	1113
5	831	1012	934	1563
6	825	1077	794	1016
7	1039	789	996	1130
Rata-rata	875,29 ± 90,38	1013,57 ± 120,11	977,14 ± 138,86	1103,43 ± 215,91

Keterangan :

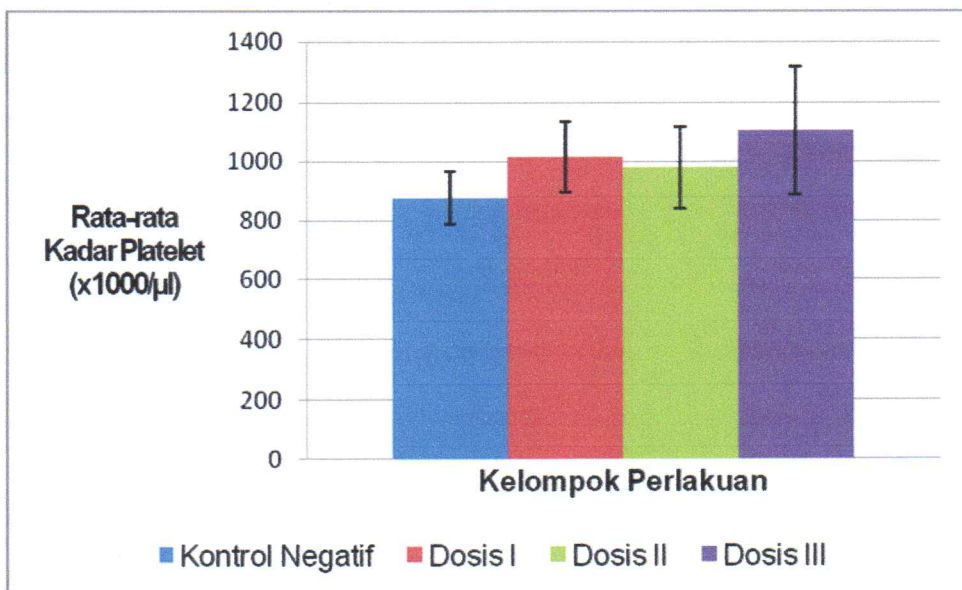
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata platelet plasma darah hewan coba tikus (Gambar 5.10), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata platelet antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.10 Histogram Rata-rata Kadar Platelet Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan leukosit pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.16 Hasil Pemeriksaan Leukosit Pada Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Leukosit ($10^3/\mu\text{l}$)			
	K	DI	DII	DIII
1	5,4	12,0	5,5	13,9
2	8,9	11,7	17,2	9,9
3	5,8	14,5	11,7	6,9
4	9,5	7,2	12,6	8,5
5	12,3	6,4	7,0	10,8
6	5,5	8,6	8,5	15,4
7	6,3	5,9	10,6	6,8
Rata-rata	$7,67 \pm 2,63$	$9,47 \pm 3,29$	$10,44 \pm 3,92$	$10,31 \pm 3,33$

Keterangan :

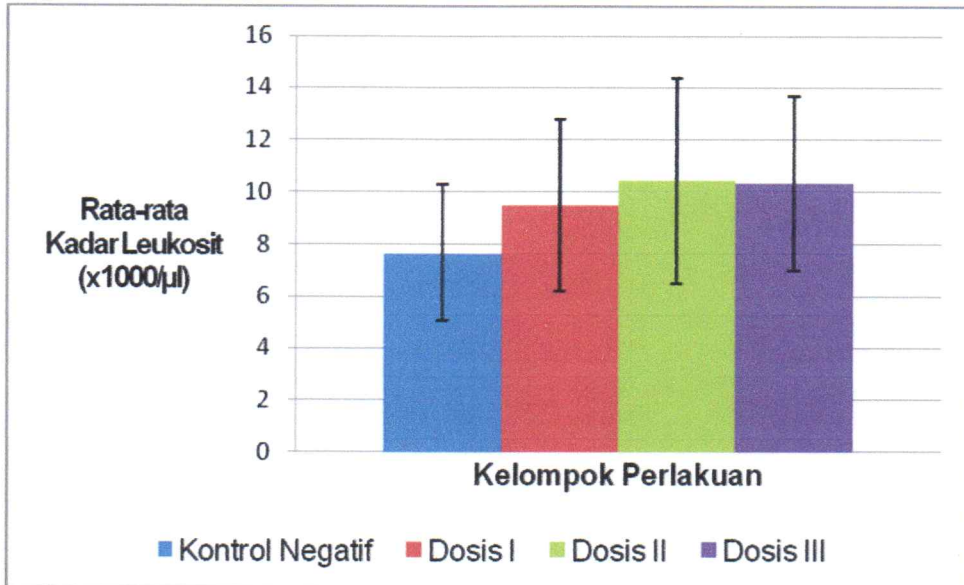
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata leukosit plasma darah hewan coba tikus (Gambar 5.11), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata leukosit antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.11 Histogram Rata-rata Kadar Leukosit Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan eosinofil pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.17 Hasil Pemeriksaan Eosinofil Pada Darah Tikus Coba

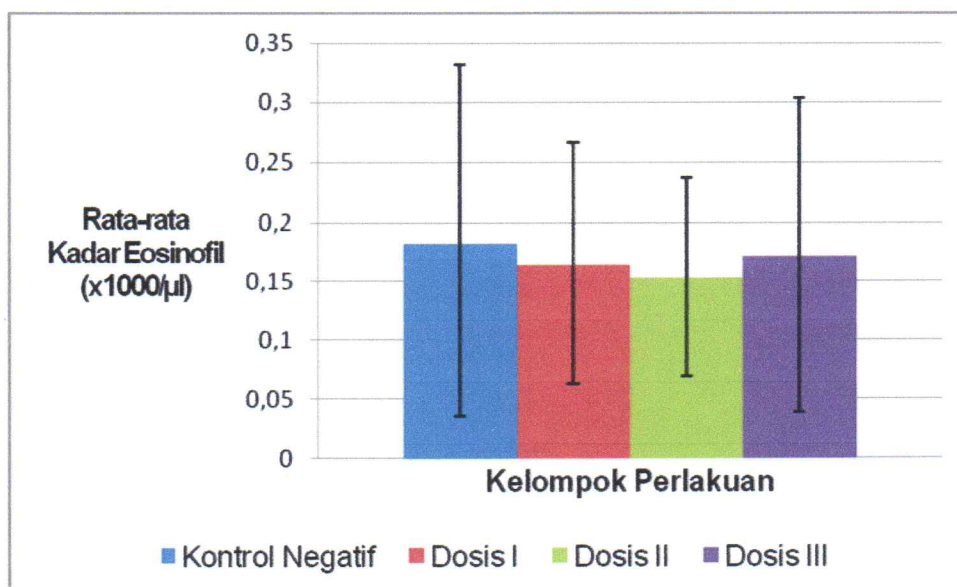
Replikasi	Kadar Eosinofil ($10^3/\mu\text{l}$)			
	K	DI	DII	DIII
1	0,054	0,240	0,165	0,417
2	0,089	0,117	0,172	0,099
3	0,174	0,290	0,234	0,138
4	0,475	0	0	0,255
5	0,246	0,128	0,140	0
6	0,055	0,258	0,255	0,154
7	0,189	0,118	0,106	0,136
Rata-rata	$0,183 \pm 0,148$	$0,164 \pm 0,102$	$0,153 \pm 0,085$	$0,171 \pm 0,132$

Keterangan :

K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

- DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.
- DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.
- DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata eosinofil plasma darah hewan coba tikus (Gambar 5.12), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata eosinofil antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.12 Histogram Rata-rata Kadar Eosinofil Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan basofil pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.18 Hasil Pemeriksaan Basofil Pada Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Basofil ($10^3/\mu\text{l}$)			
	K	DI	DII	DIII
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
Rata-rata	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Keterangan :

K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis III, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Adapun data hasil pemeriksaan stab neutrofil pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.19 Hasil Pemeriksaan Stab Neutrofil Pada Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Stab Neutrofil ($10^3/\mu\text{l}$)			
	K	DI	DII	DIII
1	0,108	0	0	0
2	0,089	0,117	0	0,198
3	0	0	0,117	0,069
4	0,095	0	0	0
5	0,123	0,064	0,070	0
6	0	0	0,170	0,154
7	0,126	0	0,106	0,068
Rata-rata	$0,077 \pm 0,054$	$0,026 \pm 0,047$	$0,066 \pm 0,068$	$0,069 \pm 0,079$

Keterangan :

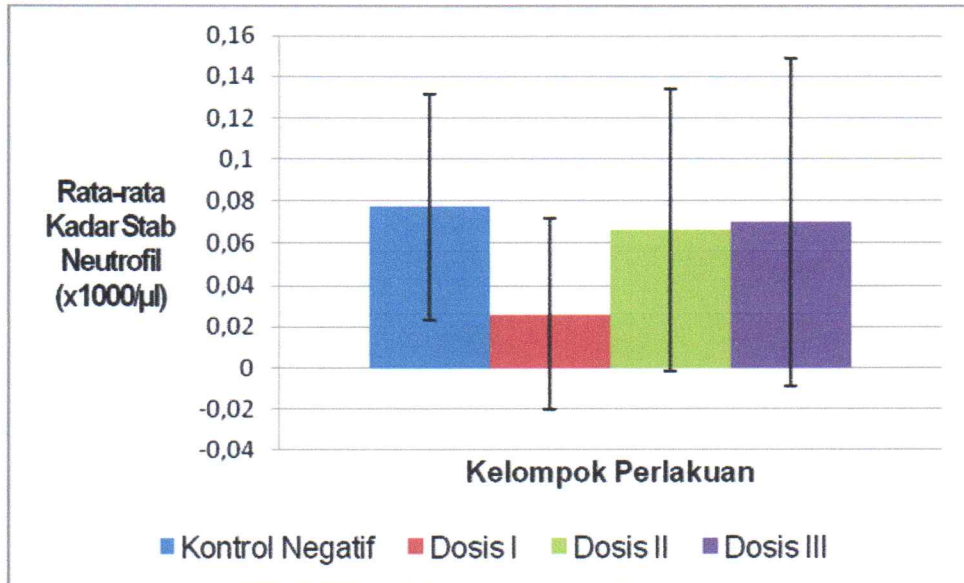
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata stab neutrofil plasma darah hewan coba tikus (Gambar 5.13), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata stab neutrofil antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.13 Histogram Rata-rata Kadar Stab Neutrofil Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan segmen neutrofil pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.20 Hasil Pemeriksaan Segmen Neutrofil Pada Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Segmen Neutrofil ($10^3/\mu\text{l}$)			
	K	DI	DII	DIII
1	1,458	2,040	1,155	1,946
2	1,157	1,755	1,892	1,188
3	0,986	2,175	2,457	1,656
4	1,520	1,080	1,890	1,105
5	2,460	0,832	0,840	1,728
6	0,495	1,462	1,530	1,540
7	1,008	1,121	1,378	1,088
Rata-rata	1,298 \pm 0,615	1,495 \pm 0,513	1,592 \pm 0,537	1,464 \pm 0,339

Keterangan :

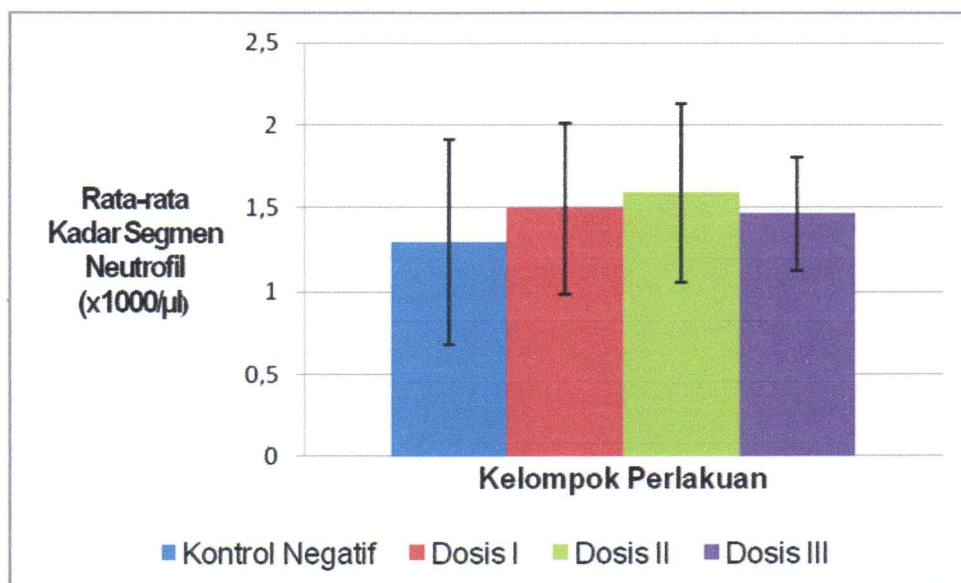
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata segmen neutrofil plasma darah hewan coba tikus (Gambar 5.14), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata segmen neutrofil antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.14 Histogram Rata-rata Segmen Neutrofil Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan limfosit pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

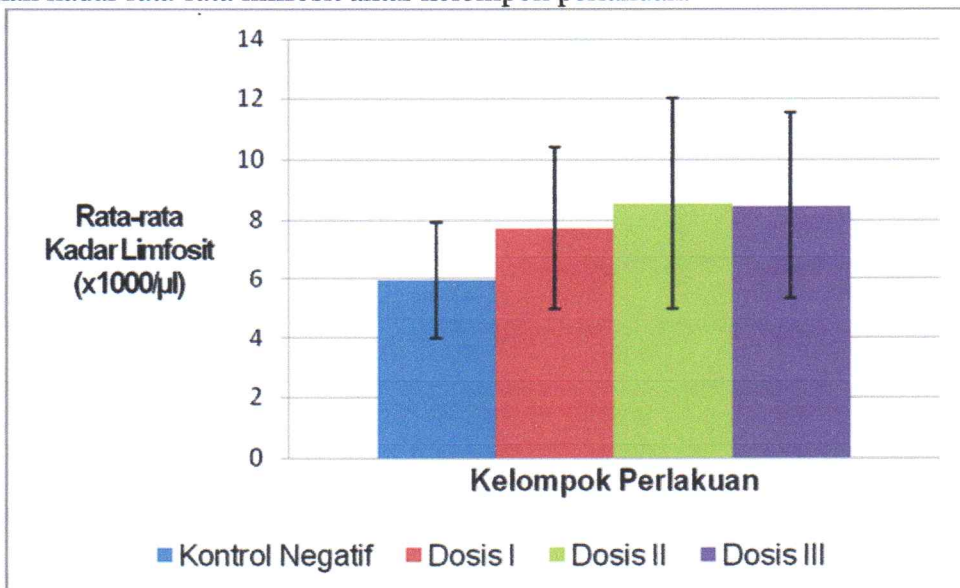
Tabel V.21 Hasil Pemeriksaan Limfosit Pada Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Limfosit ($10^3/\mu\text{l}$)			
	K	DI	DII	DIII
1	3,618	9,600	4,015	11,537
2	7,387	9,711	14,792	8,217
3	4,466	11,890	8,658	4,761
4	7,125	6,120	10,710	6,800
5	9,102	5,312	5,950	9,072
6	4,950	6,622	6,375	13,244
7	4,851	4,602	8,904	5,304
Rata-rata	5,928 ± 1,967	7,694 ± 2,713	8,486 ± 3,554	8,419 ± 3,140

Keterangan :

- K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%
 DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.
 DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.
 DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata limfosit plasma darah hewan coba tikus (Gambar 5.15), sehingga lebih mudah memandangkan perubahan kadar rata-rata limfosit antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.15 Histogram Rata-rata Kadar Limfosit Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Adapun data hasil pemeriksaan monosit pada plasma darah tikus coba ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel V.22 Hasil Pemeriksaan Monosit Pada Darah Tikus Coba

Replikasi	Kadar Monosit (103/ μ l)			
	K	DI	DII	DIII
1	0,162	0,120	0,165	0
2	0,178	0	0,344	0,099
3	0,116	0	0,117	0,276
4	0,285	0	0	0,340
5	0,369	0,064	0	0
6	0	0,258	0,170	0,308
7	0,126	0,059	0,106	0,204
Rata-rata	0,177 \pm 0,120	0,071 \pm 0,094	0,129 \pm 0,118	0,175 \pm 0,143

Keterangan :

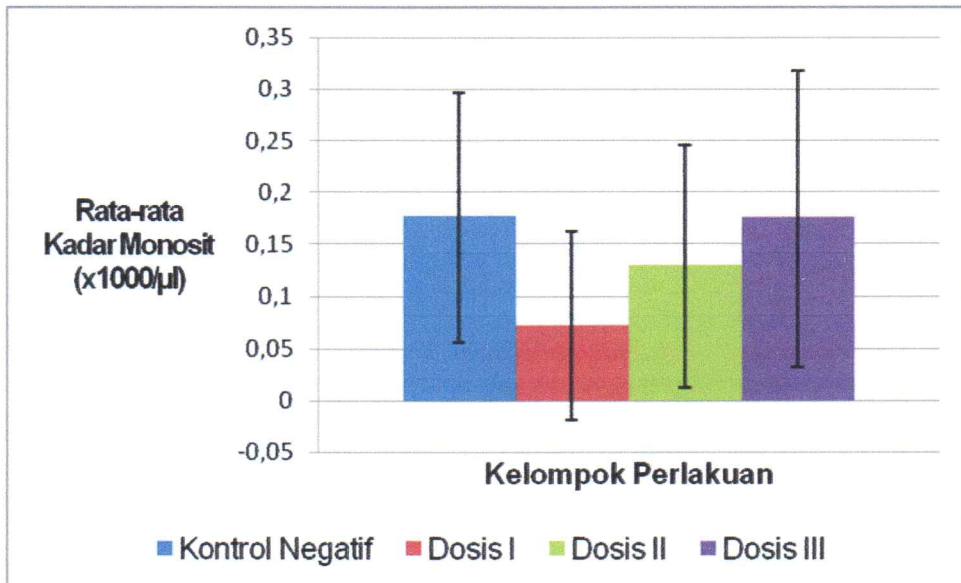
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis III, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Selanjutnya dibuat histogram perubahan kadar rata-rata monosit plasma darah hewan coba tikus (Gambar 5.16), sehingga lebih mudah membandingkan perubahan kadar rata-rata monosit antar kelompok perlakuan.



Gambar 5.16 Histogram Rata-rata Kadar Monosit Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Kemudian data parameter hematologi tersebut dianalisis dengan menggunakan *One-Way* ANOVA pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan hasilnya ditunjukkan pada Lampiran. Nilai signifikansi masing-masing parameter hematologi ditunjukkan pada tabel V.23.

Tabel V.23 Nilai Signifikansi Parameter Hematologi Berdasarkan Analisis *One-Way* ANOVA

Parameter Hematologi	Nilai Signifikansi	Keterangan ($\alpha = 0,05$)
Hemoglobin	0,167	$> \alpha$
Platelet	0,061	$> \alpha$
Leukosit	0,395	$> \alpha$
Eosinofil	0,972	$> \alpha$
Basofil	-	-
Stab Neutrofil	0,445	$> \alpha$
Segmen Neutrofil	0,754	$> \alpha$
Limfosit	0,339	$> \alpha$
Monosit	0,332	$> \alpha$

Pada parameter hematologi hemoglobin, platelet, leukosit, eosinofil, stab neutrofil, segmen neutrofil, limfosit, dan monosit didapatkan nilai signifikansi $> \alpha$, sehingga H_0 diterima dan dapat disimpulkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan berdasarkan parameter hematologi yang disebutkan.

5.6 Penimbangan Organ Tikus Coba

5.6.1 Penimbangan Organ Hati Tikus

Untuk mengetahui pengaruh bahan uji terhadap organ hati, salah satu parameter yang dapat ditinjau adalah persentase berat hati terhadap berat badan hewan coba tikus. Hasil perhitungan persentase berat hati terhadap berat badan tikus ditampilkan pada tabel berikut:

Tabel V.24 Berat Organ Hati Tikus Coba

Replikasi	Kelompok Perlakuan							
	K		DI		DII		DIII	
	Berat Hati (gram)	Persen Berat Hati	Berat Hati (gram)	Persen Berat Hati	Berat Hati (gram)	Persen Berat Hati	Berat Hati (gram)	Persen Berat Hati
1	4,705	4,43	7,731	7,19	8,911	6,59	6,840	4,43
2	6,322	6,00	5,487	4,44	8,238	6,09	6,782	6,86
3	3,268	3,51	6,486	5,01	4,355	3,63	4,128	3,06
4	6,149	5,45	4,781	4,05	5,659	4,32	4,416	4,43
5	6,227	5,34	6,191	4,72	6,828	5,13	6,243	4,85
6	6,071	4,70	6,134	5,28	4,605	4,65	7,210	5,36
7	5,504	5,36	4,369	3,62	6,855	4,97	5,506	3,86
Rata-rata	5,463 ± 1,122	4,970 ± 0,824	5,883 ± 1,125	4,901 ± 1,155	6,493 ± 1,730	5,054 ± 1,014	5,875 ± 1,224	4,692 ± 1,202

Keterangan :

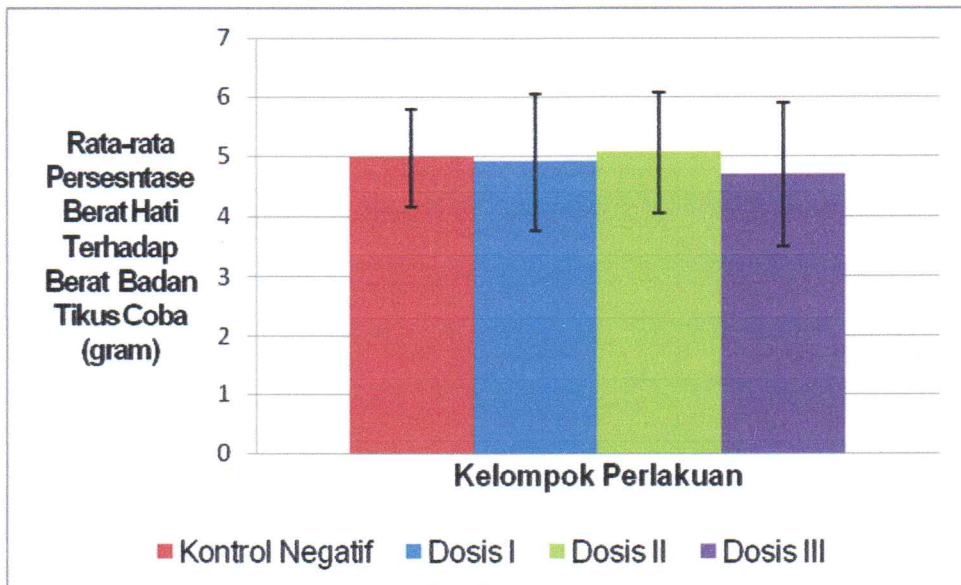
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis III, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Dari data Tabel V.24 diatas, dapat dibuat histogram rata-rata persentase berat hati terhadap berat badan hewan coba masing-masing kelompok perlakuan seperti pada Gambar 5.17 berikut ini:



Gambar 5.17 Histogram Rata-rata Persentase Berat Hati Terhadap Berat Badan Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan persentase berat hati hewan coba masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan analisis *One-Way* ANOVA terhadap persentase berat hati hewan coba masing-masing kelompok perlakuan. Analisis dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan hasilnya ditunjukkan pada Lampiran 13. Diperoleh nilai signifikansi $> \alpha$, yaitu sebesar 0,929 sehingga H_0 diterima dan dapat disimpulkan tidak ada perbedaan persentase berat hati hewan coba tikus yang bermakna antara kelompok perlakuan.

5.6.2 Penimbangan Organ Ginjal Tikus

Untuk mengetahui pengaruh bahan uji terhadap organ ginjal, salah satu parameter yang dapat ditinjau adalah persentase berat ginjal terhadap berat badan hewan coba tikus. Hasil perhitungan persentase berat ginjal terhadap berat badan tikus ditampilkan pada tabel berikut:

Tabel V.25 Berat Organ Ginjal Tikus Coba

Replikasi	Kelompok Perlakuan							
	K		DI		DII		DIII	
	Berat Ginjal (gram)	Persen Berat Ginjal	Berat Ginjal (gram)	Persen Berat Ginjal	Berat Ginjal (gram)	Persen Berat Ginjal	Berat Ginjal (gram)	Persen Berat Ginjal
1	1,315	1,24	1,383	1,29	2,610	1,93	1,437	0,94
2	1,407	1,34	1,575	1,27	1,643	1,22	1,659	1,68
3	0,938	1,01	1,454	1,12	1,299	1,08	1,147	0,85
4	1,163	1,03	1,189	1,01	1,658	1,27	1,205	1,20
5	1,660	1,42	1,318	1,01	1,543	1,16	1,690	1,31
6	1,795	1,40	1,361	1,17	1,242	1,25	1,989	1,48
7	1,364	1,32	1,318	1,10	1,523	1,10	1,918	1,34
Rata-rata	1,377 ± 0,288	1,251 ± 0,169	1,371 ± 0,120	1,139 ± 0,113	1,645 ± 0,454	1,287 ± 0,293	1,578 ± 0,329	1,257 ± 0,290

Keterangan :

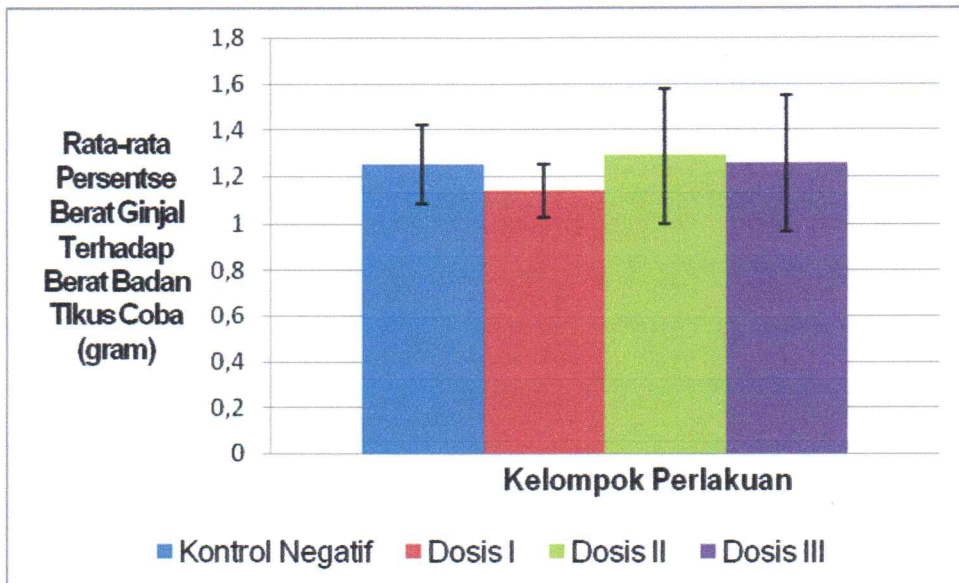
K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Dari data Tabel V.25 diatas, dapat dibuat histogram rata-rata persentase berat ginjal terhadap berat badan hewan coba masing-masing kelompok perlakuan seperti pada Gambar 5.18 berikut ini:



Gambar 5.19 Histogram Rata-rata Persentase Berat Ginjal Terhadap Berat Badan Tikus Coba Pada Setiap Kelompok Perlakuan (Kontrol Negatif: diberikan larutan CMC-Na 0,5% . Dosis I: diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 0,54 mg/200 g BB. Dosis II: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB. Dosis III: diberikan campuran larutan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB).

Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan persentase berat ginjal hewan coba masing-masing kelompok perlakuan, dilakukan analisis *One-Way* ANOVA terhadap persentase berat ginjal hewan coba masing-masing kelompok perlakuan. Analisis dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan hasilnya ditunjukkan pada Lampiran 14. Diperoleh nilai signifikansi $> \alpha$, yaitu sebesar 0,644 sehingga H_0 diterima dan dapat disimpulkan tidak ada perbedaan persentase berat ginjal hewan coba tikus yang bermakna antara kelompok perlakuan.

5.7 Pemeriksaan Histopatologi Tikus Coba

5.7.1 Pemeriksaan Histopatologi Hati Tikus

Pemeriksaan histopatologi dilakukan untuk mengetahui kondisi kerusakan sel organ hati. Dilakukan pengamatan terhadap preparat jaringan hati yang telah diwarnai dengan pewarnaan HE, sehingga pada pengamatan mikroskopis akan tampak inti sel berwarna biru dan bagian sitoplasma berwarna merah.

Pengamatan tersebut dilakukan melalui lima lapang pandang yang berbeda dalam satu irisan jaringan. Penilaian kerusakan hepar dilakukan berdasarkan 3 kriteria kerusakan yang mempresentasikan klasifikasi kerusakan hati, yaitu kongesti (kerusakan ringan), degenerasi sel (kerusakan sedang) dan nekrosis (kerusakan berat).

Persentase kerusakan sel yang teramati pada setiap kriteria kemudian diratarata dan diberikan skor terhadap rata-rata kerusakan sel tersebut. Skor perubahan histopatologi hati tikus coba disajikan dalam Tabel V.26

Tabel V.26 Data Skoring Pengamatan Preparat Histopatologi Hati Tikus Coba

Replikasi	Skoring			
	K	DI	DII	DIII
1	0	1	2	0
2	1	0	1	0
3	0	1	1	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	1
7	0	0	1	0

Keterangan :

Kategori skoring :

Kategori 0 untuk jumlah rata-rata skoring perubahan neoplastik < 2

Kategori 1 untuk jumlah rata-rata skoring perubahan neoplastik 2-3

Kategori 2 untuk jumlah rata-rata skoring perubahan neoplastik 4-6

Kategori 3 untuk jumlah rata-rata skoring perubahan neoplastik 7-9

Keterangan :

K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Untuk mengetahui adanya perbedaan hasil skoring pengamatan preparat histopatologi hati tikus coba pada masing-masing kelompok uji dilakukan analisa statistik *Kruskall-Wallis* pada hasil skoring masing-masing kelompok perlakuan. Hasil perhitungan dapat dilihat dalam Tabel V.27.

Tabel V.27 Hasil Uji *Kruskall-Wallis* Perubahan Neoplastik

	Skoring
Chi-Square	4.495
df	3
Asymp. Sig.	.213

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Dosis

Dari tabel diatas menunjukkan hasil Asymp.Sig = 0,213 Sig. Tersebut $> \alpha$ (0,05). Hal ini menunjukkan bahwa tidak adanya perbedaan bermakna terjadinya bentukan sel hati yang mengalami kongesti, degenerasi dan nekrosis sel hati tikus coba antar kelompok perlakuan .

5.7.2 Pemeriksaan Histopatologi Ginjal Tikus

Pemeriksaan histopatologi dilakukan untuk mengetahui kondisi kerusakan sel organ ginjal. Dilakukan pengamatan terhadap preparat jaringan ginjal yang telah diwarnai dengan pewarnaan HE, sehingga pada pengamatan mikroskopis akan tampak inti sel berwarna biru dan bagian sitoplasma berwarna merah. Pengamatan tersebut dilakukan melalui lima lapang pandang yang berbeda dalam satu irisan jaringan. Penilaian kerusakan hepar dilakukan berdasarkan 3 kriteria kerusakan yang mempresentasikan klasifikasi kerusakan ginjal, yaitu kongesti (kerusakan ringan), degenerasi sel (kerusakan sedang) dan nekrosis (kerusakan berat).

Persentase kerusakan sel yang teramati pada setiap kriteria kemudian diratarata dan diberikan skor terhadap rata-rata kerusakan sel tersebut. Skor perubahan histopatologi ginjal tikus coba disajikan pada Tabel V.28

Tabel V.28 Data Skoring Pengamatan Preparat Histopatologi Ginjal Tikus Coba

Replikasi	Skoring			
	K	DI	DII	DIII
1	0	0	1	0
2	0	0	0	1
3	0	0	0	1
4	0	0	0	1
5	0	0	0	1
6	0	0	1	0
7	0	0	0	0

Keterangan :

Kategori skoring :

Kategori 0 untuk jumlah rata-rata skoring perubahan neoplastik < 2

Kategori 1 untuk jumlah rata-rata skoring perubahan neoplastik 2-3

Kategori 2 untuk jumlah rata-rata skoring perubahan neoplastik 4-6

Kategori 3 untuk jumlah rata-rata skoring perubahan neoplastik 7-9

Keterangan :

K = Kelompok kontrol negatif, diberi larutan CMC-Na 0,5%

DI = Kelompok dosis I, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding Masing-masing 0,54 mg/200 g BB.

DII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 1,62 mg/200 g BB.

DIII = Kelompok dosis II, diberikan campuran larutan bahan uji Andrografolida dan EPMS yang sebanding masing-masing 2,70 mg/200 g BB.

Untuk mengetahui adanya perbedaan hasil skoring pengamatan preparat histopatologi hati tikus coba pada masing-masing kelompok uji dilakukan analisa statistik *Kruskall-Wallis* pada hasil skoring masing-masing kelompok perlakuan. Hasil perhitungan dapat dilihat dalam Tabel V.29 – V.30

Tabel V.29 Harga rata-rata histopatologi sel hati tiap kelompok berdasarkan perubahan neoplastik

Ranks		
Dosis	N	Mean Rank
Ginjal Kontrol Negatif	7	11.50
Dosis I	7	11.50
Dosis II	7	15.50
Dosis III	7	19.50
Total	28	

Tabel V.30 Hasil Uji *Kruskall-Wallis* Perubahan Neoplastik

Test Statistics ^{a,b}	
	Skoring
Chi-Square	9.000
df	3
Asymp. Sig.	.029

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Dosis

Dari tabel diatas dapat dilihat hasil analisis yang diperoleh Asymp.Sig = 0,029 Sig tersebut $< \alpha$ (0,05). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada terjadinya bentukan sel hati yang mengalami kongesti, degenerasi, dan nekrosis. Oleh karena itu dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Uji Z) untuk mengetahui urutan tingkat perubahan neoplas pada gambaran histopatologi hati antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif.

Dari hasil analisa *Kruskall Wallis* menunjukkan perbedaan bermakna diantara kelompok perlakuan. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji lanjutan dengan uji perbandingan berganda (Uji Z) 5% (Daniel, 1989).

Rumus :

$$Z = \frac{|R_{i1} - R_{i2}|}{\sqrt{\frac{K[n(n^2 - 1) - \sum(t^3 - t)]}{6n(n - 1)}}$$

Keterangan :

R_i = rata-rata pada kelompok perlakuan ke-i

R_j = rata-rata pada kelompok perlakuan ke-j

Z = nilai z tabel

K = banyaknya perlakuan

n = jumlah seluruh preparat histopatologi

t = banyaknya nilai pengamatan yang sama dalam sekelompok skor yang berangka sama.

Agar dapat menghitung Z_{hitung} , terlebih dahulu mengetahui $\sum(t^3 - t)$ dengan cara sebagai berikut :

$$\begin{array}{r} T_0 = 22^3 - 22 = 10626 \\ T_1 = 6^3 - 6 = 210 \quad + \\ \hline = 10416 \end{array}$$

$$Z = \frac{|R_{i1} - R_{i2}|}{\sqrt{\frac{4[28(28^2 - 1) - 10416]}{6 \times 28(28 - 1)}}$$

$$Z = \frac{|R_{i1} - R_{i2}|}{\sqrt{10,1481}}$$

$$Z = \frac{|R_{i1} - R_{i2}|}{3,1856}$$

Dari rumus diatas, dapat dilakukan perhitungan Z_{hitung} untuk pengamatan kerusakan pada hati berdasarkan terjadinya sel yang mengalami kongesti, degenerasi dan nekrosis antar kelompok uji dapat dilihat pada tabel V.

Tabel V.31 Perhitungan Z_{hitung} dengan selisih ranking rata-rata untuk pengamatan kerusakan ginjal

Kelompok Perlakuan	$R_{i_1}-R_{i_2}$	Z_{hitung}	P
K-DI	0	0	0,5000
K-DII	-4	-1,26	0,1038
K-DIII	-8	-2,51	0,0060*
DI-DII	-4	-1,26	0,1038
DI-DIII	-8	-2,51	0,0060*
DII-DIII	-4	-1,26	0,1038

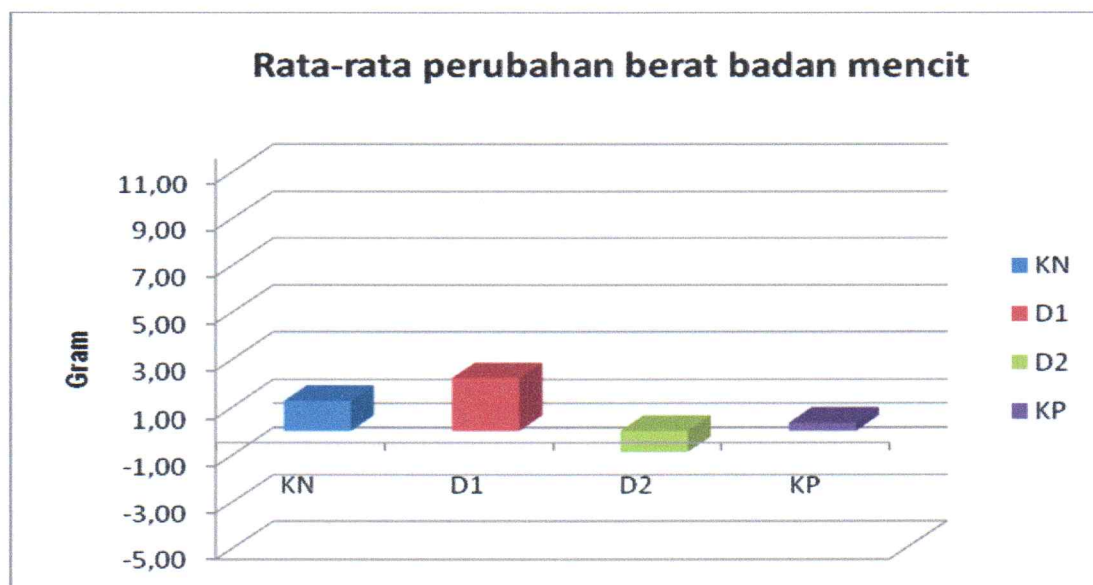
*) Menunjukkan perbedaan bermakna berdasarkan tabel Z

Dari hasil perhitungan Z_{hitung} pada Tabel V.31 diperoleh hasil bahwa antara kelompok kontrol negatif - dosis III ($p = 0,0060$), dan antara kelompok dosis I – dosis III ($p = 0,0060$) mempunyai perbedaan bermakna karena harga $p < \alpha$ ($0,05$). Sedangkan antara kelompok kontrol negatif – dosis I ($p = 0,5000$), antara kelompok kontrol negatif – dosis II ($p = 0,1038$), antara kelompok dosis I – dosis II ($p = 0,1038$), dan antara kelompok dosis II – dosis III ($p = 0,1038$) tidak terdapat perbedaan yang bermakna karena harga $p > \alpha$ ($0,05$).

HASIL PENELITIAN UJI AKTIVITAS ANTIKANKER SECARA IN VIVO KAPSUL CAMPURAN FRAKSI DITERPEN LAKTON DAN FRAKSI EPMS

Hasil Pengamatan Berat Badan Mencit terhadap Pengaruh Pemberian Bahan Uji

Untuk mengetahui pengaruh pemberian bahan uji terhadap perubahan berat badan mencit, dilakukan penimbangan mencit selama pemberian bahan uji. Pengamatan dilakukan setiap satu minggu selama tiga minggu. Hasil pengamatan disajikan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Histogram rata-rata perubahan berat badan mencit selama pemberian bahan uji (KN: diberi larutan CMC-Na 0,5%; D1: diberi campuran bahan uji yang mengandung andrografolida dan EPMS masing-masing 3,9 mg/kgBB mencit; D2: diberi campuran bahan uji yang mengandung andrografolida dan EPMS masing-masing 11,7 mg/kgBB mencit; KP: diberi larutan Capecitabine 11,18 mg/20 gBB mencit).

Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan nyata perubahan berat badan hewan coba antar kelompok perlakuan, maka dilakukan analisa statistik ANAVA satu arah. Hasil analisa ANAVA satu arah disajikan dalam Tabel 5.5

Tabel 5.5 Data perhitungan ANAVA satu arah pengaruh pemberian bahan uji terhadap perubahan berat badan hewan coba

	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F	Sig.
Antar kelompok	30.641	3	10.214	2.205	.123
Dalam kelompok	83.382	18	4.632		
Total	114.023	21			

Keterangan:

KN: diberi larutan CMC-Na 0,5%

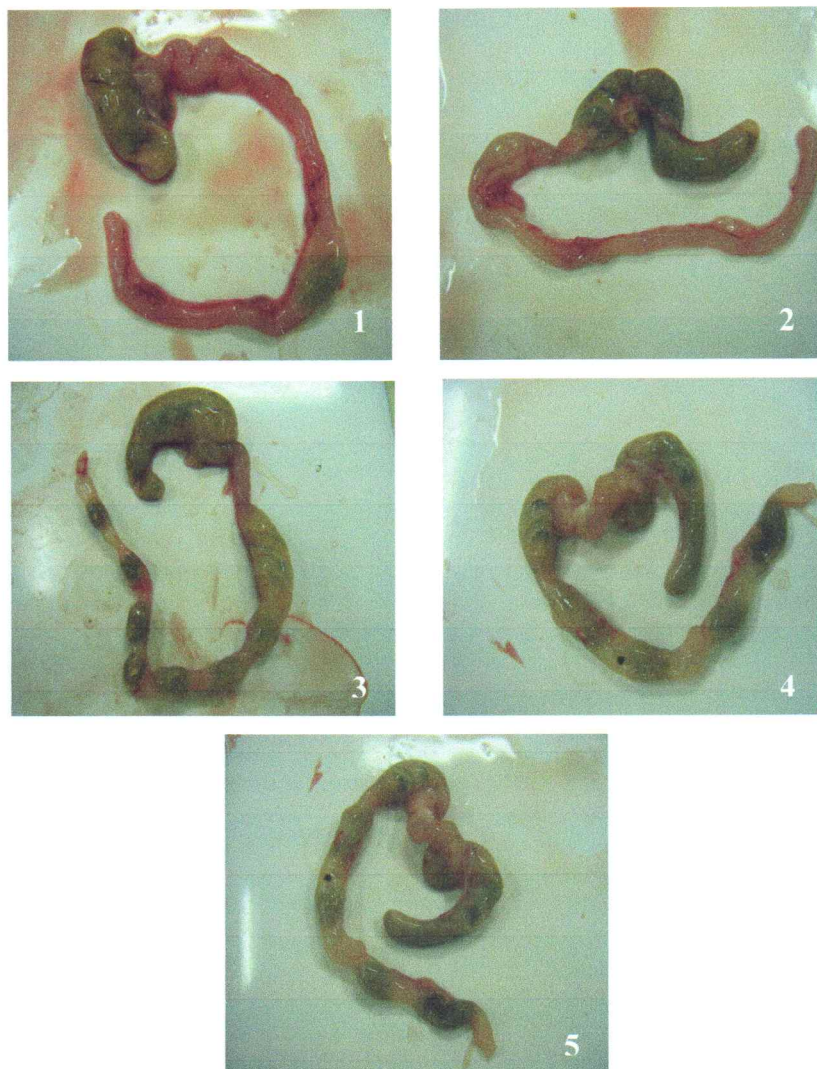
KP: diberi larutan Capecitabine 11,18 mg/20 gBB

D1: diberi larutan bahan uji campuran fraksi diterpen lakton sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol kencur dengan kadar masing-masing 3,9 mg/kg BB

D2: diberi larutan bahan uji campuran fraksi diterpen lakton sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol kencur dengan kadar masing-masing 11,7 mg/kg BB.

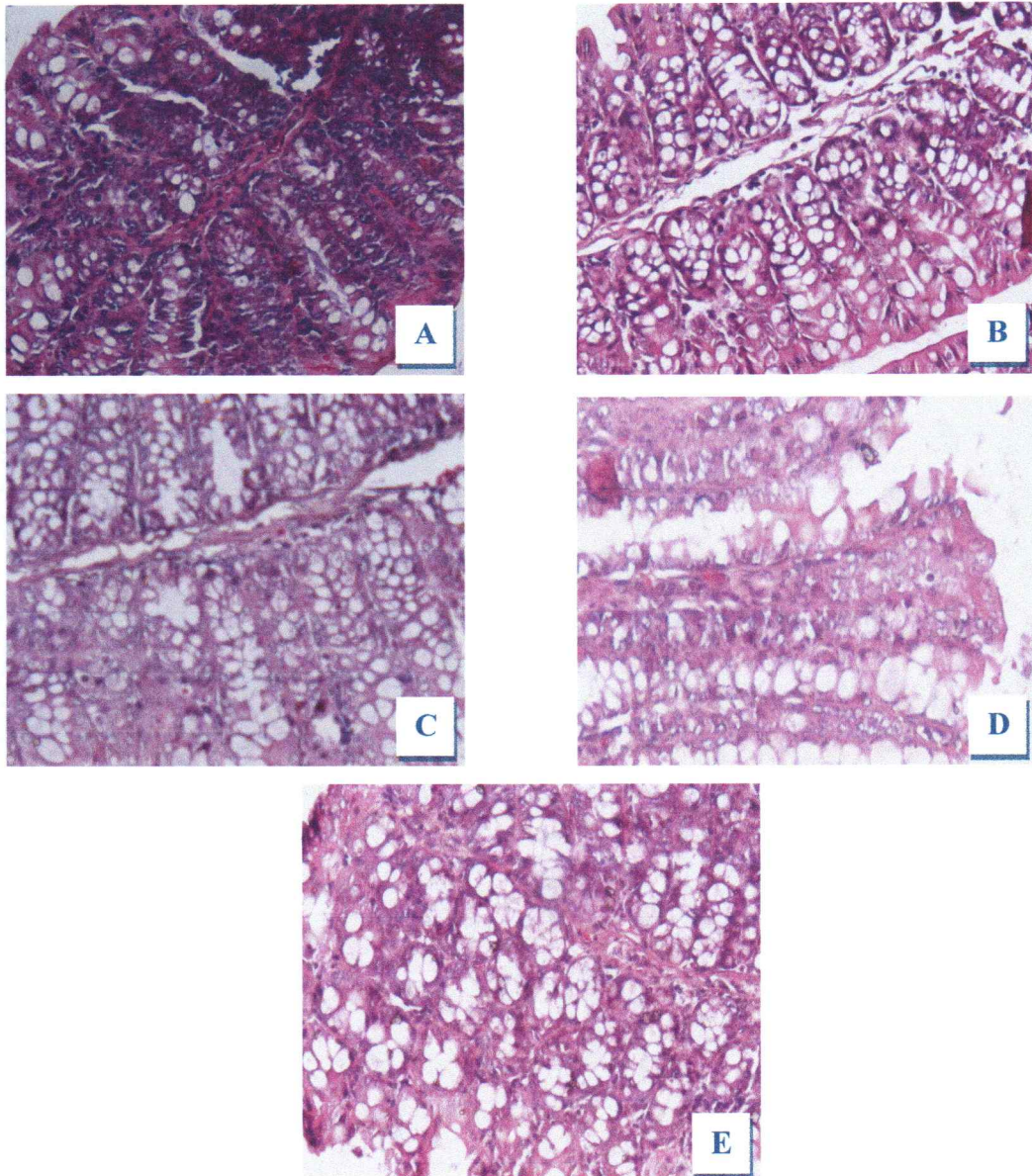
5.1 Hasil Pemeriksaan Histopatologi Sel Epitel Kolon Mencit

Pemeriksaan histopatologi untuk melihat adanya kerusakan pada kolon, dilakukan berdasarkan perubahan morfologi sel epitel kolon pada jaringan. Irisan organ kolon dipotong dengan batas atas sekum dan batas bawah rectum, selanjutnya dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan Hematoksislin-Eosin (HE). Gambaran organ kolon pada berbagai macam kelompok perlakuan ditunjukkan pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Organ kolon pada berbagai macam kelompok perlakuan (1= kelompok kontrol negatif, 2= kelompok dosis 1, 3= kelompok dosis 2, 4= kelompok kontrol positif, 5= kontrol environment).

Kolon yang telah diambil selanjutnya dibuat irisan dan dilakukan pengamatan preparat histopatologi untuk melihat kerusakan-kerusakan yang terjadi. Gambaran histopatologi sel epitel kolon hewan coba pada masing-masing kelompok perlakuan ditunjukkan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Struktur sel epitel kolon pada berbagai kelompok perlakuan (A= kelompok kontrol negatif, B= kelompok dosis 1, C= kelompok dosis 2, D= kelompok kontrol positif, E= mencit normal).

5.2 Analisa Data Statistik

Pemeriksaan terhadap perubahan morfologi sel epitel kolon terhadap aktivitas antikanker dilakukan dengan cara mengamati preparat histopatologi sel epitel kolon mencit secara mikroskopis. Pengamatan dilakukan melalui 10 lapang pandang yang berbeda dengan perbesaran 400 kali. Kerusakan sel dibagi menjadi tiga kriteria yaitu inti hiperkromatik, mitosis, dan pleumorfisme jaringan atau inti sel. Kerusakan sel yang teramati kemudian dijumlah dan dianalisa dengan ANAVA satu arah. Hasil perhitungan ANAVA satu arah disajikan dalam Tabel 5.6 sampai Tabel 5.9.

Tabel 5.6 Data perhitungan ANAVA satu arah pengamatan inti hiperkromatik

	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F	Sig.
Antar kelompok	153222.073	3	51074.024	55.499	.000
Dalam kelompok	16564.700	18	920.261		
Total	169786.773	21			

Tabel 5.7 Data perhitungan ANAVA satu arah pengamatan mitosis

	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F	Sig.
Antar kelompok	30087.130	3	10029.043	19.801	.000
Dalam kelompok	9116.733	18	506.485		
Total	39203.864	21			

Tabel 5.8 Data perhitungan ANAVA satu arah pengamatan pleumorfisme

	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F	Sig.
Antar kelompok	934.767	3	311.589	42.255	.000
Dalam kelompok	132.733	18	7.374		
Total	1067.500	21			

Tabel 5.9 Data uji LSD pengamatan histopatologi sel epitel kolon mencit

Parameter ↓	DMBA	Bahan Uji		Capecitabine	
	KN	D1	D2	KP	
Hiperkromatik		.000	.000	.000	KN
	.000		.000	.000	D1
	.000	.000		.070	D2
	.000	.000	.070		KP
KESIMPULAN →	Mean: 273.0	Mean: 184.5	Mean: 88.0	Mean: 52.6	
	%CV : 16,64	%CV : 14,32	%CV : 33,64	%CV : 19,83	
		< KN > D2 > KP	< KN < D1 > KP (S=0.93)	< KN	
Mitosis		.000	.000	.000	KN
	.000		.035	.000	D1
	.000	.035		.412	D2
	.000	.000	.412		KP
KESIMPULAN →	Mean: 123,4	Mean: 65,5	Mean: 35,8	Mean: 24,4	
	%CV: 31,46	%CV: 30,29	%CV: 38,32	%CV: 27,28	
		< KN > D2 > KP	< KN < D1 (S=96,5) > KP (S=58,8)	< KN	
Pleumorfisme		.000	.000	.000	KN
	.000		.000	.000	D1
	.000	.000		.218	D2
	.000	.000	.218		KP
KESIMPULAN →	Mean: 21,4	Mean: 14,2	Mean: 6,5	Mean: 4,4	
	%CV: 7,09	%CV: 25,02	%CV: 49,37	%CV: 34,47	
		< KN > D2 > KP	< KN < D1 > KP (S=78,2)	< KN	

Dari hasil uji ANAVA satu arah pada Tabel 5.6, Tabel 5.7, dan Tabel 5.8, diperoleh hasil bahwa dengan parameter inti hiperkromatik, mitosis, dan pleumorfisme terdapat perbedaan bermakna antar kelompok yang ditunjukkan

dengan harga $p=0,000$. Untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda makna, dilakukan uji *Least Significant Different* (LSD). Hasil uji LSD ditunjukkan pada Tabel 5.9.

Dari uji LSD diketahui berdasarkan ketiga parameter, antara kelompok kontrol positif-kontrol negatif, dosis 1-kontrol negatif dan dosis 2-kontrol negatif ($p=0,000$) memiliki perbedaan bermakna karena harga p lebih kecil dari derajat kepercayaan ($\alpha=0,05$). Selain itu, antara kelompok dosis 1-dosis 2 memiliki perbedaan bermakna karena harga p lebih kecil dari derajat kepercayaan ($\alpha=0,05$) yaitu 0,000 (dengan parameter jumlah inti hiperkromatik); 0,035 (dengan parameter mitosis); dan 0,000 (dengan parameter pleumorfisme).

Berdasarkan ketiga parameter, antara kelompok dosis 1-kontrol positif menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,000$). Sedangkan antara kelompok dosis 2-kontrol positif tidak menunjukkan perbedaan bermakna karena harga p lebih besar dari derajat kepercayaan ($\alpha=0,05$) yaitu 0,070 (berdasarkan parameter jumlah inti hiperkromatik); 0,412 (berdasarkan parameter mitosis); dan 0,218 (berdasarkan parameter pleumorfisme).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Dari penelitian uji mutu fisik dan disolusi sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- a. Pada keseragaman bobot kapsul, rata-rata % penyimpangan bobot isi kapsul adalah $1,08\% \pm 0,94$ dengan bobot 0,4170-0,4773 gram dan tidak terdapat kapsul yang isinya menyimpang di atas 7,5% sampai 15% dari rata-rata isi kapsul. Kapsul memenuhi persyaratan keseragaman bobot.
- b. Hasil rata-rata pengujian waktu hancur kapsul campuran fraksi etil asetat ekstrak herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol rimpang kencur adalah $317 \pm 5,29$ detik atau 5 menit lebih 17 detik. Hal ini berarti waktu hancur untuk kapsul memenuhi persyaratan.
- c. Untuk keseragaman kandungan, rata-rata kandungan andrografolida sebesar 105,73% dengan SD sebesar 5,23%, dan rata-rata kandungan etil *p*-metoksisinamat sebesar 98,43% dengan SD sebesar 5,74%, maka keseragaman kandungan andrografolida dan etil *p*-metoksisinamat dalam kapsul campuran fraksi etil asetat ekstrak herba sambiloto telah memenuhi persyaratan yang telah ditentukan.
- d. Hasil uji disolusi menunjukkan bahwa pada menit ke-120, pelepasan andrografolida sebesar 28,88 mg/L atau 87,01% dengan efisiensi disolusi sebesar 51,39%. Sedangkan pelepasan etil *p*-metoksisinamat sebesar 41,82 mg/L atau 126,11% dengan efisiensi disolusi sebesar 85,66 %.

2. Dari penelitian uji toksisitas akut dan teratogenik yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a. Kapsul campuran fraksi etil asetat diterpen lakton sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dengan perbandingan andrografolida : etil p-metoksi sinamat (1:1) mempunyai LD50 21,5 g/kgBB mencit peroral dan termasuk kategori praktis tidak toksik.
- b. Campuran fraksi etil asetat diterpen lakton sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan fraksi minyak kencur (*Kaempferia galanga* Linn) dengan perbandingan andrografolida : etil p-metoksi sinamat (1:1) pada dosis 20 mg/kg BB mencit (dosis lazim), 60 mg/kg BB mencit (3 x dosis lazim), dan 100 mg/kgBB mencit (5 x dosis lazim) tidak mempunyai efek teratogenik pada mencit.

3. Dari hasil penelitian uji toksisitas sub akut dapat disimpulkan bahwa campuran fraksi diterpen lakton herba sambiloto dan fraksi minyak rimpang kencur dengan perbandingan kadar andrografolida dan EPMS 1:1 pada 0,54 mg andrografolida/200 g BB tikus dan 0,54 mg EPMS/200 g BB tikus; 1,62mg andrografolida/200 g BB tikus dan 1,62 mg EPMS/200 g BB tikus; serta 2,70 mg andrografolida/200 g BB tikus dan 2,70 mg EPMS/200 g BB tikus yang diberikan selama 95 hari dapat disimpulkan bahwa :

- a. Tidak menyebabkan efek toksisitas pada hati berdasarkan parameter SGOT, SGPT dan pengamatan pada preparat histopatologi hati.
- b. Tidak menyebabkan efek toksisitas pada ginjal menurut parameter BUN, dan kreatinin, tetapi pada pengamatan histopatologi ginjal kelompok dosis III sudah mulai menunjukkan kerusakan.
- c. Tidak menyebabkan efek toksisitas berdasarkan parameter hematologi darah dan peningkatan kadar glukosa

4. Dari hasil penelitian tentang pengaruh pemberian bahan uji campuran fraksi diterpen lakton yang mengandung andrografolida dan fraksi minyak ekstrak etanol yang mengandung etil p-metoksisinamat (EPMS) secara peroral pada mencit

dengan kanker kolon yang diinduksi DMBA, setelah 7 minggu dari induksi terakhir, berdasarkan parameter derajat inti hiperkromatik, mitosis, dan pleomorfisme dapat disimpulkan bahwa :

- a. Dosis 1 (andrografolida dan EPMS masing-masing 3,9 mg/kgBB mencit) dan dosis 2 (andrografolida dan EPMS masing-masing 11,7 mg/kgBB mencit) memiliki bioaktivitas antikanker, dimana dosis 2 memiliki potensi bioaktivitas antikanker lebih besar dari dosis 1 ($p < 0.05$).
- b. Dosis 1 memiliki bioaktivitas lebih kecil dari kontrol positif (Capecitabine) ($p < 0,05$) sedangkan dosis 2 memiliki bioaktivitas yang sama dengan kontrol positif ($p > 0.05$).

7.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka disarankan :
Perlu dilakukan uji klinik pada pasien kanker kolon terhadap sediaan kapsul campuran fraksi etil asetat herba sambiloto dan fraksi minyak ekstrak etanol kencur.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, F., 2009. Cytotoxic and Wild Type P53-Promoting Activities of Selected Zingiberaceae Species in Colon Cancer Cell Lines. **Thesis**, Kuala Lumpur: University of Malaya.
- Abraham, David, M.P., Flexer, 1992. Cancer the Misguided Cell. *In*: Martoprawiro, S.S., Sjahjeny, M.P.H., Darmawan, D., Lintong, P., Regina, W.H., Yusani, A., Ratna, L.M., **Kanker Kegagalan Pengendalian Sel**. Surabaya: Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Hal. 1.
- Adi, P., 2007. Anti-oksidan pada Kanker Kolorektal. *Dalam*: S. Adi, Nasronudin, A. Sutahjo, A. Tjokroprawiro, J. Soeroso, A. Pranoto, dan C. Irwanadi (Eds). **Naskah Lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan XXII Ilmu Penyakit Dalam**, Surabaya: Bagian-SMF Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, hal. 597-604.
- Backer, C.A. and Backhuizen Van Den Brink, B.C., 1968. **Flora of Java**, jilid II The Auspices of The Rujksher Bariu, Leyden, hal. 346.
- Bahmudah, H., 2008. Uji Aktivitas Antikanker Kolon Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) Pada Mencit yang Diinduksi DMBA. **Skripsi**, Surabaya: Universitas Airlangga.
- Balmer, C.M., Valley A.W. and Iannucci, A. 2006. Cancer Treatment and Chemotherapy. *In*: J.T. DiPiro, R.L. Talbert, G.C. Yee, G.R. Matzke, B.G. Wells, and L.M. Posey (Eds.). **Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach**, Sixth Edition, New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Banerjee, S., Ramos, C.B., Aggrawal, B.B., 2002. Suppression of 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Mammary Carcinogenesis in Rats by Resveratrol: Role of Nuclear Factor B, Cyclooxygenase 2 and Matrix Metalloprotease 9. **Cancer Research** Vol 62, pp. 4945-54.
- Boyle, P. and Langman, M.J.S., 2001. Epidemiology. *In*: D.J. Kerr, A.M. Young, F.D.R. Hobbs (Eds). **ABC of Colorectal Cancer**, First Edition, London: BMJ Books.
- Bresailer, R.S., 2002. Malignant and Premalignant Lesions of The Colon. *In*: S.L. Friedman, K.R. McQuaid, J.H. Grendell (Eds). **Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology**, Second Edition, New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Caceres, D.D., Hancke, J.L., Burgos, R.A., Sandberg F., Wikman, G.K., 1999. Use of Visual Analog Measurement (VAS) to assess the effectiveness of standardized *Andrographis paniculata* extract SHA-10 in reducing the symptoms of common cold. A randomized double blind placebo study. **Phytomedicine** Vol.6:217-23
- Chang, H.M., 1987. Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica. Volume 2. World Scientific Publishing Co. Ptd. Ltd., Singapore. P. 918-24.

- Chao, A., Thun, M.J., Connell, C.J., McCullough, M.L., Jacobs, E.J., Flanders, W.D., Rodriguez, C., Sinha, R. and Calle, E.E., 2005. Meat Consumption and Risk of Colorectal Cancer. **Journal of the American Medical Association** Vol.293 No.2, pp.172-82.
- Chen, L.X., Qu, G.X. and Qiu, F., 2006. Studies on Diterpenoid from *Andrographis paniculata*, **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi** Vol. 31 No. 19, pp.1594-7.
- Chu, E. and Sartorelli, A.C., 2007. Cancer Chemotherapy. *In*: B.G. Katzung (Eds.). **Basic Clinical Pharmacology**, Tenth Edition, New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Departemen Kesehatan RI, 1977. **Material Medika Indonesia Jilid I**, Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI, 1979. **Material Medika Indonesai Jilid II**, Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI, 2000. **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**, Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Diyah, N.W. dan Hardjono, S., 2000. Hubungan Struktur-Aktivitas Obat Antikanker. *Dalam*: Siswandono, dan B. Soekardjo (Eds.). **Kimia Medisinal 2**, Edisi Kedua, Surabaya: Airlangga University Press, hal 163-81.
- Dua, V.K., Roy, R., Joshi, B.C., Valecha, N., Devi, C.U., Bhatnagar, M.C., Sharma, V.P. and Subbarao, S.K., 2004. Anti-malaria Activity of Some Xanthones Isolated from the Roots of *Andrographis paniculata*. **J Ethnopharmacol** Vol.95 No.2-3, pp 247-51.
- Frizzle, J. P., 2001. **Handbook of Pathophysiology**, Philadelphia: Springhouse Corporation.
- Gabrielian, E., Shukarian, A.K., Goukasova, G., Chandanian, G.L., Panossian, A.G., Wikman, G., 2002. A double blind, placebo controlled study of *Andrographis paniculata* in fixed combination Kang Jan in the treatment of acute upper respiratory track infections including sinusitis. **Phytomedicine** Vol 9: 589-97.
- Gold, L.S., 2007. **The Carcinogenic Data Project**, 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. Barkeley: Carcinogenic Potency Database Project.
- Greens, R.J., Harris, N.D., Goodyer, L. I., 2000. Pathology and Terapeutics for Pharmacists. **A Basic for Clinical Pharmacy Practice**. 2nd edition. London: Pharmaceutical Press (PhP). p. 619-69.
- Guyton, C.A., Hall, J.E., 1997. *In*: Setiawan, I. **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9**. Jakarta: EGC. Hal. 47-8.
- Hancke, J.L., Burgos, R.A., Caceres, D.D., Wikman, G., 1995. A double blind study with a new monodrug Kan Jang: decrease of symptoms and

- improvement in the recovery from common colds. **Phytotherapy research** Vol.9: 559-62.
- Hidir, S.M. and Ibrahim, H., 1991. Anti-inflammatory Activity of the Aqueous Extract of the Rhizome of *K. galanga* L. Eighth National Seminar and UNESCO Regional Workshop on Natural Products, University of Malaya Kuala Lumpur.
- Ibrahim, H. and Rahman, A.A., 1988. Several Ginger Plants (Zingiberaceae) of Potential Value. *Proceedings of The Seminar on Malaysian Traditional Medicine*. University of Malaya, Kuala Lumpur.
- Izzotti, A., Camoirano, A., Cartiglia, C., Grubbs, C.J., Lubet, R.A., Kelloff, G.J. and De Flora, S., 1999. Patterns of DNA Adduct Formation in Liver and Mammary Epithelial Cells of Rats Treated With 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene, and Selective Effects of Chemopreventive Agents. **Cancer Research** Vol.59, pp: 4285-90.
- Jae, J.K., Wallig, M.A., and Singletary, K.W., 2005. Purple Grape Juice Inhibits 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-Induced Rat Mammary Tumorigenesis and In vivo DMBA-DNA Adduct Formation. **Cancer Letters** Vol.20, pp. 1-10.
- Jarukamjorn, K. and Nemoto, N., 2008. Pharmacological Aspects of *Andrographis paniculata* on Health and Its Major Diterpenoid Constituent Andrographolide. **Journal of Health Science** Vol.54 No.4, pp. 370-81.
- Jenie, R.I., Meiyanto, E, 2007. Ko-kemoterapi ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dan Doxorubicin pada sel kanker payudara. **Majalah Farmasi Indonesia** Vol 18(2), hal.81-7.
- Kintzios, S.E. and Barberaki, M.G., 2004. **Plant That Fight Cancer**, Boca Raton: CRC Press, pp. 1-18.
- Kosuge, T., Yokota, M. and Sugiyama, K., 1985. Studies of anticancer principles in Chinese medicines II. Cytotoxic principles in *Biota orientalis* (L.) ENDL and *Kaempferia galanga* L. **chem. Pharm. Bull** Vol 33, p. 5565-7.
- Kumar, R.A., Sridevi, K. and Kumar, N.V., 2004. Anticancer and Immunostimulatory Compounds from *Andrographis paniculata* Nees. **Journal Ethnopharmacol** Vol. 92 No. 2-3, pp. 291-5.
- Latifah, S.Y., Armania, N., Tze, T.H., Azhar, Y., Nordiana, A.H., Norazalina, S., Hairuszah, I., Saidi, M., Maznah, I., 2010. Germinated Brown Rice (GBR) Reduces the Incidence of Aberrant Crypt Foci with the Involvement of β -catenin and COX-2 in Azoxymethane-Induced Colon Cancer in Rats. **Nutrition Journal** 9:16.
- Martoprawiro, S.S., 2000. **Neoplasma dan Deteksi Dini Kanker**. Surabaya: Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Hal.4.
- Matsuda, T., Kuroyanagi, M., Sugiyama, S., Umehara, K., Ueno, A. and Nishi, K., 1994. Cell Differentiation-Inducing Diterpenes from *Andrographis*

- paniculata* Nees. **Chemical Pharmaceutical Bull** Vol. 42 No. 6, pp. 1216-25.
- McEvoy, G.K., 2004. **AHFS Drug Information**, Bethesda: American Society of Health-System Pharmacist Inc.
- Medina, P.J. and Fausel, C., 2008. Cancer Treatment and Chemotherapy. *In*: J.T. DiPiro, R.L. Talbert, G.C. Yee, G.R. Matzke, B.G. Wells, and L.M. Posey (Eds.). **Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach**, 7th Edition, New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Melchior, J., Spasov, A.A., Ostrovskij, O.V., Bulanov, A.E., Wikman, G., 2000. Double blind, placebo control pilot and phase III study of activity of standardized *Andrographis paniculata* Herba Nees.extract fixed combination (Kan Jang) in the treatment of uncomplicated upper respiratory track infection. **Phytomedicine** Vol 7: 341-50
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell V.W., 1999. **Biokimia Harper edisi 24**. Jakarta: EGC. hal. 779-800.
- Mustafa, A.M., Shahuddin, H. and Ibrahim, H., 1995. Mechanism of the Vasorelaxant Effect of the Chloroform Extract of *Kaempferia galanga* L. Rhizomes on Rat Thoracic Aorta. 11th Annual Scientific Conference on the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology.
- National Cancer Institute, 2006. www.nci.gov
- Neuro, 2002. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/histol/h&e.htm>, diakses 30 Januari 2008.
- Nicol, C.J., Yoon, M., Ward, J.M., Yamashita, M., Fukamachi, K., Peters, J.M. and Gonzales, F.J., 2004. PPAR γ Influences Susceptibility to DMBA-Induced Mammary, Ovarian and Skin Carcinogenesis. **Carcinogenesis** Vol.25 No.9, pp. 1747-55.
- Othman, R., Ibrahim, H. and Mohd, M.A., 2006. Bioassay-guided Isolation of a Vasorelaxant Compound from *Kaempferia galanga* L. **Phytomedicine** Vol. 13, p.61-66
- Perry, M. and Metzger, J., 1980. Medicinal Plants of East and Southeast Asia. Attributed Properties and Uses. Cambridge, MIT Press, pp. 442.
- Phee Mac, S.J., Lingappa, V.R., Ganong, W.F., Lange, J.D., 1995. **Pathophysiology of Disease an Introduction to Clinical Medicine**. 1st ed. A LANGE medical book. p. 49-68.
- Rajagopal, S., Kumar, R.A., Deevi, D.S., Satyanarayana, C. and Rajagopalan, R., 2003. Andrografolide, A Potential Cancer Therapeutic Agent Isolated from *Andrographis paniculata*. **J Exp Ther Oncol** Vol.3 No.3, pp. 147-58.
- Romano, M. and Joan, C., 2003. Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase Converging Function of Cell Proliferation and Tumor Angiogenesis: Implication for Cancer Therapy, **Faseb Journal** Vol.17, pp.1986-95

- Sae-wong, C., Ridditid, W., Reanmongkol, W. and Wongnawa, M., 2008. Antinociceptive Activity of the Methanolic Extract of *Kaempferia galanga* and Its Possible Mechanisms In Experimental Animals. **Thai J Pharmacol** Vol.30 No.2, pp. 26-35.
- Satyanarayana, C., Dhanavanthri, S.D., Rajagopalan, R., Nanduri, S. and Sriram, R., 2004. DCFR 3188 A Novel Semi Synthetic Analog Andrographolide: Cellular Response to MCF-7 Breast Cancer Cells. **BMC Cancer** Vol. 4 No. 26, pp 1-8.
- Shukla, B., Visen, P.K., Patnaik, G.K. and Dhawan, B.N., 1992. Choleric Effect of Andrographolide in Rats and Guinea Pigs. **Planta Med** Vol.58 No.2, pp. 146-9.
- Siriruga, P., 1997. Thai Zingiberaceae: Species Diversity and Their Uses. The International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conversation and Utilization. 23-27 November, Phuket, Thailand.
- Sugarbaker, P.H., Van der Speeten, K., Stuart, O.A., 2010. Pharmacologic rationale for treatments of peritoneal surface malignancy from colorectal cancer. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**. Vol.2, pp.19-31.
- Sukardiman, Rahman, A., Ekasari, W. dan Sismindari, 2005. Induksi Apoptosis Senyawa Andrografolida dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) terhadap Kultur Sel Kanker. **Media Kedokteran Hewan** Vol. 21 No. 3, hal 105-10.
- Sukardiman, 2007. Mekanisme Induksi Apoptosis Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* ROXB dan Andrografolida dari *Andrographis paniculata* Nees. Terhadap Sel Kanker Manusia Secara *in vitro* dan Implikasinya pada Penggunaan Secara *in vivo*. **Disertasi**, Surabaya: Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Suntoro, H.S., 1983, **Metode Pewarnaan Histologi-Histokimia**, Jakarta: Bhatara Karya Aksara, hal 22-7.
- Sutadi, S.M., 2003. **Pola Keganasan Saluran Cerna Bagian Atas dan Bawah Secara Endoskopi di H. Adam Malik-Medan**, Medan: Fakultas Kedokteran Bagian Ilmu Penyakit Dalam Universitas Sumatra Utara.
- Syamsuhidayat, S.S. dan Hutapea, J.R., 1991, **Inventaris Tanaman Obat Indonesia**, Jilid I, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal 54-5.
- Tewtrakul, S., Yuenyongsawad, S., Kumee, S., Atsawajaruwan, L., 2005. Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn. **Journal of Science and Technology** Vol. 27, pp. 503-7.
- Tjen, K.J., 1994. Uji efek analgesik etil para metoksi sinamat yang diisolasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) pada mencit dengan metode Witkin. **Skripsi**, Surabaya: Universitas Surabaya.
- Twelves, M.D.C. and Wong, M.D.A., 2003. Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer. **N Eng J Med** Vol.352, pp. 2696-704

- Varma, A., Padh, H., Shrivastava, N., 2009. Andrographolide: A New Plant-Derived Antineoplastic Entity on Horizon. *eCAM* 2009; 10:1093-165.
- WHO, 2002. **WHO Monographs on Selected Medicinal Plants Volume 2**, Geneva: World Health Organization.
- WHO, 2008. **The Impact of Cancer In Your Country**.
<http://www.WHO.Int/infobase/report>. 28 Desember 2008
- Winarsunu, T., 2004. **Statistic Dalam Penelitian Psikologi dan Pendidikan**, Malang: Universitas Muhammadiyah Malang Press, hal. 101-12.
- Young, M.C., 2003. Prevention of Cancer Colon. *In*: D. Rakel (Eds). **Integrative Medicine**, First Edition, Philadelphia: Elsevier Science.
- Yu, B.C., Hung, C.R., Chen, W.C. and Cheng, J.T., 2003. Antihyperglycemic Effect of Andrographolide in Streptozocin-Induced Diabetic Rats. **Planta Med** Vol.69 No.12, pp. 1075-79.
- Yusron, M., Januati, M. dan Pribadi, E.R., 2005. Budidaya Tanaman Sambiloto. **Sirkuler** No. 11, hal 1-5.
- Zoha, M.S., Hussain, A.H. and Choudhury, S.A., 1989. Antifertility Effects of *Andrographis paniculata* in mice. **Bangladesh Med. Res. Counc. Bull** Vol.15, p.34-7.