

SKRIPSI

FITRIAH ARDIANI

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETER
DAN METANOL LUMUT HATI (*Marchantia
cataractarum* SCHIFFN.) TERHADAP KULTUR SEL
MIELOMA MENCIT**



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2004**

Lembar Pengesahan

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKTRAK ETER DAN
EKSTRAK METANOL TUMBUHAN LUMUT HATI
(*Marchantia cataractarum* Schiffn.) TERHADAP
KULTUR SEL MIELOMA MENCIT DENGAN
METODE VIABILITAS SEL**

SKRIPSI

**Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2004**

Oleh :

Fitriah Ardiani
NIM: 050012235

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

Drs. Sukardiman, MS.
NIP: 131801629

Dr. Bambang Prajogo EW, MS.
NIP: 131470933

KATA PENGANTAR

Assalamu'alikum wr.wb.

Segala puji dan syukur penulis persembahkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya serta sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad saw sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETER DAN METANOL LUMUT HATI (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) TERHADAP KULTUR SEL MIELOMA MENCIT DENGAN METODE VIABILITAS SEL”.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan dan pendidikan serta dapat berguna bagi penelitian selanjutnya. Penulis menyadari tanpa bantuan dari berbagai pihak sulit untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu dengan setulus hati penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. DR. H. Noor Cholies Zaini selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
2. Drs. Sukardiman, MS selaku dosen pembimbing utama yang senantiasa memberikan bimbingan, saran, arahan serta dorongan yang tidak terhitung nilainya kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Dr. Bambang Prajoga EW, MS selaku dosen pembimbing serta yang telah banyak memberikan saran dan masukan yang bermanfaat untuk kesempurnaan penyusunan skripsi ini.
4. Drs. Abdul Rahman, MSi dan Drs. Herra Studiawan, Ms selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dan kritik kepada penulis
5. Drh. Darmawan sebagai Kepala Laboratorium Vaksin Mamalia Pusvetma yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk dapat dilaksanakannya penelitian ini hingga selesai.
6. Staf Laboratorium Zoonosis (Bu Sri Susilowati, Bu Panca, Bu Nurul Qomariah, Bu Istiqomah, Bu Nanik dan Pak Edi) terima kasih yang tak terhingga penulis ucapkan atas bantuannya selama ini yang dengan penuh

kesabaran dan kasih sayang membimbing penulis selama melakukan percobaan.

7. Staf Laboratorium Zoonosis lainnya yang telah banyak membantu penulis mempersiapkan alat-alat yang dibutuhkan selama percobaan.
8. Drs. Noor Erma, MS atas bantuannya dalam rangka menyelesaikan skripsi ini.
9. Seluruh anggota keluarga (ayah, ibu , Mbak Ifa) tercinta yang telah memberikan segala sesuatu baik yang bersifat moril maupun materiil serta do'a yang senantiasa dipanjatkan.
10. Seluruh staf dan karyawan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga terutama Mas Mahfudz, Mas Iwan, Pak Jarwo, Pak Miskun yang telah banyak membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.
11. Teman-teman seperjuangan di “ *LUMUT PEPAYA 2000* “ (Arie, Rina, Putri, Fika, Rice, Umi dan Nadia) yang telah memberikan tempat berbagi baik suka maupun duka, juga bantuannya baik waktu, tenaga dan pikirannya selama ini. Makasih atas dukungannya teman!
12. Mbak Nina terima kasih atas dorongan semangatnya kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
13. Dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu kelancaran skripsi ini.

Semoga Allah SWT selalu memberikan perlindungan-Nya, selalu melimpahkan rahmat dan berkah-Nya serta membalas semua kebaikan mereka dengan kebaikan yang lebih banyak lagi.

Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu kefarmasian pada khususnya dan ilmu pengetahuan pada umumnya.

Wassalamu'alikum wr.wb.

Surabaya, Agustus 2004

Penulis

RINGKASAN

Kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular di negara maju. Perkembangan jumlah penderita penyakit kanker sangatlah pesat. Salah satu jenis pengobatan yang banyak digunakan adalah kemoterapi.

Sebagian besar obat-obatan yang ada saat ini, komponen aktifnya bersumber dari tumbuhan. Oleh karena itu pencarian senyawa bioaktif baru pada tumbuhan guna menemukan obat kanker baru terus dilakukan.

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia catarctarum* Schiffn.) pada kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.

Pada penelitian ini tahap pertama yang dilakukan yaitu membuat ekstrak eter yang kemudian dilanjutkan dengan pembuatan ekstrak metanol dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia catarctarum* Schiffn.). Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut eter dan pelarut metanol dengan cara maserasi.

Selanjutnya dilakukan identifikasi ekstrak untuk mengetahui kandungan kimia dari bahan uji tersebut. Metode yang digunakan untuk identifikasi ekstrak ini adalah KLT-Densitometri. Analisis KLT ekstrak eter dan ekstrak metanol ditotolkan pada 1 lempeng KLT. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 GF₂₅₄ dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4 : 1. Penampak noda yang digunakan adalah sinar UV dan anisaldehyd-asam sulfat pekat.

Pada ekstrak eter dengan penampak noda sinar UV didapatkan 2 noda dengan nilai Rf 0,63 dan 0,84. Hasil diatas dapat dilihat pada profil kromatogram ekstrak eter pada λ 254 nm yang menunjukkan adanya puncak pada jarak migrasi 50 mm dan 67 mm. Sedangkan pada ekstrak metanol didapatkan 1 noda dengan nilai Rf 0,84. Profil kromatogram menunjukkan adanya puncak pada jarak migrasi 67 mm.

Analisis KLT ekstrak eter dan ekstrak metanol dengan pemberian penampak noda anisaldehyd-asam sulfat didapatkan noda yang berwarna merah keunguan pada Rf 0,63. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak eter dan ekstrak metanol terdapat senyawa sterol karena jika dibandingkan dengan standar sterol yang diperoleh dari isolat lumut hati (*Marchantia geminata* Reinw.,Bl.,Ness) didapatkan nilai Rf yang sama. Profil kromatogram ekstrak eter dan ekstrak metanol setelah pemberian penampak noda anisaldehyd-asam sulfat pada λ 521 nm menunjukkan adanya puncak pada migrasi 50 mm. Namun profil kromatogram pada ekstrak eter terdapat 2 puncak lain yaitu pada jarak migrasi 35 mm dan 40 mm dimana pada ekstrak metanol tidak terdapat puncak tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kandungan kimia antara ekstrak eter dan ekstrak metanol.

Ekstrak eter dibuat dalam empat konsentrasi larutan uji yaitu 1,002 ppm; 10,02 ppm; 100,2 ppm dan 1002 ppm. Sedangkan ekstrak metanol dibuat dalam konsentrasi larutan uji 1 ppm; 10 ppm; 100 ppm dan 250 ppm. Sebagai kontrol positif digunakan etoposida yang dibuat dalam 3 macam konsentrasi yaitu 1 ppm, 10 ppm dan 100 ppm, sementara media RPMI digunakan sebagai kontrol negatifnya. Untuk membantu meningkatkan kelarutan dalam media maka

ditambahkan DMSO dengan konsentrasi akhir maksimum 10 %. Larutan uji yang telah dibuat selanjutnya ditambahkan ke dalam biakan kultur sel mieloma dan diinkubasi pada inkubator CO₂ (5% CO₂ , 95% O₂) pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengamatan efek antikanker ditentukan dengan metode pewarnaan tripan biru dengan menggunakan parameter viabilitas sel. Sel yang mati akan terwarnai biru sedangkan sel yang masih hidup tidak akan terwarnai. Untuk menghitung % viabilitas sel (jumlah sel yang hidup dibandingkan dengan jumlah sel total) digunakan alat hemositometer.

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji anava satu arah dan probit. Hasil penelitian uji aktivitas antikanker menunjukkan ada perbedaan bermakna antar kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif sehingga membuktikan ada pengaruh pemberian ekstrak eter dan ekstrak metanol terhadap aktivitas antikanker pada kultur sel mieloma mencit secara bermakna, dimana harga LC₅₀ yang diperoleh untuk ekstrak eter sebesar 68,32 ppm dan ekstrak metanol 92,24 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak eter mempunyai aktivitas antikanker lebih baik daripada ekstrak metanol.

Disarankan untuk melakukan uji aktivitas antikanker ekstrak eter pada jenis sel kanker yang berbeda untuk mengetahui sensitifitas ekstrak eter tersebut. Selain itu untuk mengetahui pengaruh metabolisme dalam tubuh terhadap aktivitas antikanker dapat dilakukan uji aktivitas antikanker secara *in vivo*. Selanjutnya perlu dilakukan isolasi kandungan aktif dari ekstrak eter tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.)

ABSTRACT

A research has been done to determine the anticancer activity of the aether and methanol extracts of livewort (*Marchantia cataractarum* Schiffn.). The anticancer activity was determined on the myeloma cell culture using cell viability test which is based on the cell resistance ability against cytotoxic materials. Trypan blue 0,4 % staining is used to differ the morphology between the death and live cells. The death ones would be stained blue while the live remain unstained.

The myeloma cell were incubated in RPMI media contained 10 % of Fetal Bovine Serum (FBS). The concentration of aether and methanol extracts of *Marchantia cataractarum* Schiffn. were 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm and 1 ppm. Etoposide was used as positive control in three different concentration (100 ppm, 10 ppm and 1 ppm) while RPMI 1640 was used as negative control. Their solution were added into myeloma cell culture in microwell plate and then incubated for 24 hours, at 37°C in CO₂ incubator.

The extracts effect on the myeloma cell culture was examined to find out the number of viable myeloma cells using a hemocytometer. The cell viability data were analyzed statistically using one way annova and probit.

The result on the myeloma cell culture by cell viability test indicated that aether and methanol extracts of *Marchantia cataractarum* Schiffn significantly have anticancer activity with LC₅₀ of aether extract was 68,32 ppm and LC₅₀ of methanol extract was 92,24 ppm. Futher characterization and isolation are still needed for development in the future.

Keywords : The aether and methanol extracts of *Marchantia cataractarum* Schiffn., myeloma cell culture, cell viability test, anticancer activity.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	i
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan Tentang Tumbuhan	6
2.1.1 Klasifikasi Tumbuhan	6
2.1.2 Nama Daerah	6
2.1.3 Morfologi Tumbuhan	6
2.1.4 Penyebaran Tumbuhan	7
2.1.5 Habitat Tumbuhan	7
2.1.6 Khasiat Tumbuhan	8
2.1.7 Kandungan Tumbuhan	8
2.2 Tinjauan Tentang Kanker	8
2.3 Tinjauan Tentang Antikanker	9
2.4 Tinjauan Tentang Kultur Sel Mieloma	10
2.5 Tinjauan Tentang Metode Viabilitas Sel	12
2.6 Tinjauan Tentang Etoposida	13

BAB III	KERANGKA KONSEPTUAL	16
BAB IV	METODE PENELITIAN	17
	4.1 Bahan Penelitian	17
	4.1.1 Bahan Tumbuhan	17
	4.1.2 Kultur Sel Mieloma	18
	4.1.3 Media	18
	4.1.4 Bahan Lain	18
	4.2 Alat Penelitian	18
	4.3 Rancangan Penelitian	18
	4.4 Tahapan Percobaan	19
	4.5 Prosedur Kerja	20
	4.5.1 Penyiapan Bahan	20
	4.5.2 Pembuatan Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol	20
	4.5.3 Identifikasi Kandungan Kimia	21
	4.5.4 Pembuatan Larutan Uji	22
	4.5.5 Pembuatan Larutan Kontrol Positif	24
	4.5.6 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif	25
	4.5.7 Preparasi Kultur Sel Mieloma	26
	4.5.8 Perhitungan Sel dengan Hemositometer.	26
	4.5.9 Uji Aktivitas Antikanker.	27
	4.6 Analisis Data	27
	4.6.1 Anava Satu Arah	27
	4.6.2 Analisis Probit	28
BAB V	HASIL PENELITIAN	29
	5.1 Pembuatan Ekstrak Eter dan Metanol	29
	5.2 Pembuatan Larutan Uji	29
	5.2.1 Larutan Uji Eter	29
	5.2.2 Larutan Uji Metanol	29
	5.3 Pembuatan Larutan Kontrol Positif	29

5.4 Identifikasi Ekstrak	30
5.5 Uji Aktivitas Antikanker	31
5.6 Analisis Data	34
5.5.1 Anava Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol	34
5.5.2 Analisis Probit Ekstrak Eter, Ekstrak Metanol dan Kontrol Positif	35
BAB VI PEMBAHASAN	39
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	45
7.1 Kesimpulan	45
7.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

	Halaman	
Tabel IV.1	Kelompok perlakuan pada kultur sel mieloma mencit	18
Tabel IV.2	Rancangan penelitian	19
Tabel V.1	Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan ekstrak eter dan diinkubasi selama 24 jam	31
Tabel V.2	Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan ekstrak metanol dan diinkubasi selama 24 jam	32
Tabel V.3	Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan etoposida sebagai kontrol positif dan diinkubasi selama 24 jam	34
Tabel V.4	Analisis Varian satu arah data hasil penelitian uji aktivitas antikanker ekstrak eter <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.	34
Tabel V.5	Analisis Varian satu arah data hasil penelitian uji aktivitas antikanker ekstrak metanol <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.	34
Tabel V.6	Hasil analisis uji LSD ekstrak eter <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn	35
Tabel V.7	Hasil analisis uji LSD ekstrak metanol <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn	35
Tabel V.8	Harga LC ₅₀ hasil analisis probit ekstrak eter, ekstrak metanol dan kontrol positif	36

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Struktur Etoposida	14
Gambar 3.1	Skema kerangka konseptual	16
Gambar 4.1	Tumbuhan lumut hati (<i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.)	17
Gambar 4.2	Skema pembuatan ekstrak eter dan ekstrak metanol	21
Gambar 4.3	Skema pembuatan larutan uji ekstrak eter	23
Gambar 4.4	Skema pembuatan larutan uji ekstrak metanol	24
Gambar 4.5	Skema pembuatan kontrol positif	25
Gambar 5.1	Hasil KLT ekstrak eter dan ekstrak metanol <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.	30
Gambar 5.2	Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak eter vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	32
Gambar 5.3	Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak metanol vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	33
Gambar 5.4	Grafik hubungan antara konsentrasi larutan etoposida vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	34
Gambar 5.5	Kurva probit log konsentrasi ekstrak eter <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.	36
Gambar 5.6	Kurva probit log konsentrasi ekstrak metanol <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.	36
Gambar 5.7	Kurva probit log konsentrasi etoposida (kontrol positif)	37
Gambar 5.8	Gambar sel mieloma mencit sebelum pewarnaan	38
Gambar 5.9	Gambar sel mieloma mencit setelah pewarnaan dengan tripan biru	38

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran-1	Komposisi Media RPMI 49
Lampiran-2	Alat Hemositometer 50
Lampiran-3	Profil kandungan kimia ekstrak eter <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn dengan KLT-Densitometri pada λ 254 nm 51
Lampiran-4	Profil kandungan kimia ekstrak metanol <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn dengan KLT-Densitometri pada λ 254 nm 52
Lampiran-5	Profil kandungan kimia ekstrak eter <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn dengan KLT-Densitometri pada λ 521 nm 53
Lampiran-6	Profil kandungan kimia ekstrak metanol <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn dengan KLT-Densitometri pada λ 521 nm 54
Lampiran-7	Analisis Varian satu arah ekstrak eter 55
Lampiran-8	Analisis Varian satu arah ekstrak metanol 56
Lampiran-9	Analisis probit ekstrak eter 57
Lampiran-10	Analisis probit ekstrak metanol 59
Lampiran-11	Analisis probit etoposida (kontrol positif) 61
Lampiran-12	Surat keterangan determinasi 63

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Di negara maju kanker merupakan penyebab kematian terbesar kedua setelah penyakit kardiovaskular (Nafrialdi and Ganiswara,1995). Perkembangan jumlah penderita penyakit kanker sangatlah pesat. Menurut National Cancer Institute (NCI), di Amerika Serikat diperkirakan akan ada 1.268.000 kasus kanker baru pada tahun 2001, termasuk diantaranya 198.000 merupakan penderita kanker prostrat, 192.200 penderita kanker payudara, 169.500 penderita kanker paru dan 135.400 penderita kanker usus besar/*rectum*. Keempat jenis penyakit kanker tersebut merupakan penyakit kanker yang paling banyak dialami oleh sebagian besar penduduk. Pada tahun 1998, diperhitungkan bahwa lebih dari setengah penderita kanker yang meninggal dikarenakan oleh keempat jenis penyakit kanker tersebut. Selain itu NCI juga memperkirakan bahwa tahun 2001 jumlah penderita kanker yang meninggal sebesar 553.400 (Merill, *et al*,www.cancer.gov,2001)

Sementara itu di Indonesia, menurut catatan Depertemen Kesehatan (Depkes), penderita kanker setiap tahunnya diperkirakan mencapai 100 penderita baru diantara 100.000 penduduk. Dengan jumlah penduduk 200 juta, maka diperkirakan setiap tahunnya ditemukan sekitar 200.000 penderita kanker baru di Indonesia (Dalimartha,2003).

Bahan/agen penyakit kanker (karsinogenik) dapat berasal dari luar tubuh (eksogen) ataupun dari dalam tubuh (endogen). Contoh senyawa karsinogenik antara lain adalah virus-virus tertentu; senyawa kimia hidrokarbon polisiklik aromatik, seperti: benzo(a)piren, amina aromatik (2-naftilamin), zat warna azo, aflatoksin, dialkilnitrosamin; beberapa produk kimia alami, seperti: safrol, sikasin dan alkaloida pirolisidin; serta radiasi senyawa radioaktif, sinar ultra violet atau sinar x.

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai cara, yaitu pembedahan, terutama untuk tumor padat yang terlokalisasi; radiasi, sebagai

pengobatan penunjang sesudah pembedahan; kemoterapi, terutama untuk pengobatan tumor yang tidak terlokalisasi; endokrinoterapi yang menggunakan hormon tertentu untuk pengobatan tumor dan imunoterapi yang berperan penting dalam pencegahan mikrometastasis (Siswandono dan Soekardjo,2000).

Salah satu jenis pengobatan yang banyak digunakan adalah kemoterapi. Namun obat-obat yang digunakan pada kemoterapi pada umumnya belum sepenuhnya memenuhi persyaratan terutama ditinjau dari segi keamanannya. Hal ini dikarenakan obat-obat kanker tersebut kurang selektif dimana selain membunuh sel kanker juga membunuh sel normal. Akibatnya dapat menimbulkan efek samping yang merugikan bagi penderita kanker (Sukardiman,1997).

Sel kanker sendiri merupakan bagian dari sel tubuh manusia yang mengalami pertumbuhan abnormal dikarenakan adanya kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi atau ada pengaturan kembali, adanya adisi dan integrasi bahan genetik virus ke dalam gen dan adanya perubahan ekspresi genetik (Siswandono dan Soekardjo,2000).

Sebagian besar obat-obatan yang ada saat ini, komponen aktifnya bersumber dari tumbuhan. Oleh karena itu pencarian senyawa bioaktif baru pada tumbuhan guna menemukan obat kanker baru terus dilakukan.

Indonesia sebagai salah satu negara yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar di dunia, merupakan negara yang sangat potensial dalam upaya pencarian senyawa bioaktif baru tersebut.

Alam tumbuhan yang ditaksir meliputi 300.000 jenis tumbuhan dalam klasifikasinya dibagi menjadi sejumlah divisi, salah satunya adalah tumbuhan lumut (*Bryophyta*) yang banyak tersebar di seluruh dunia (Hernawan,2002).

Pencarian senyawa bioaktif baru untuk obat kanker selama ini banyak difokuskan pada tumbuhan tingkat tinggi. Sedangkan pada tumbuhan tingkat rendah seperti lumut (*Bryophyta*) kurang mendapat perhatian. Hal ini dikarenakan tumbuhan lumut mempunyai rasa dan aroma yang tidak enak sewaktu diremas. Namun setelah dilakukan penelitian lebih lanjut oleh Asakawa (1984) diketahui bahwa beberapa species tumbuhan lumut memiliki aktivitas sebagai antikanker.

Salah satu tumbuhan lumut yang memiliki senyawa bioaktif sebagai antikanker adalah lumut hati (*Marchantia spp*). Penelitian yang dilakukan oleh Asakawa (1984) terhadap ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia polymorpha* L, *Marchantia paleacea* Bertol var. *diptera* (Mont) dan *Marchantia tosana* Steph. Menunjukkan bahwa tumbuhan thalus ini mempunyai aktivitas antikanker terhadap KB Cell.

Aktivitas yang sama juga ditunjukkan pula oleh spesies lain dari suku Marchantiaceae yaitu *Marchantia geminata* Reinw.,Bl.,Ness. Penelitian yang telah dilakukan oleh Hernawan (2002) terhadap ekstrak metanol tumbuhan tersebut menunjukkan aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit.

Salah satu metode yang digunakan untuk mencari senyawa kandungan antikanker dari tumbuhan yaitu dengan pendekatan kemotaksonomi. Tumbuhan yang termasuk dalam takson yang sama, disamping memiliki kemiripan ciri-ciri anatomi, histologi dan morfologi yang sama juga mempunyai kemiripan dalam zat kandungannya (Sukardiman,1997).

Oleh karena itu berdasarkan persamaan genus, serta mengacu pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, dilakukan penelitian yang sama terhadap spesies lain dari suku Marchantiaceae yaitu *Marchantia cataractarum* Schiffn.

Dalam penelitian kali ini dilakukan uji aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) pada kultur sel mieloma mencit. Sel mieloma adalah salah satu jenis sel kanker. Kematian sel yang terjadi setelah pemberian ekstrak uji dapat digunakan sebagai indikasi yang menunjukkan kemampuan ekstrak tersebut membunuh sel kanker. Metode yang digunakan ialah metode viabilitas sel, yaitu metode yang didasarkan pada kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan-bahan yang bersifat toksik.

Selanjutnya, dilakukan perhitungan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati setelah dilakukan pewarnaan tripan biru memakai alat hemositometer dibawah mikroskop.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan suatu masalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak eter dan ekstrak metanol dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel ?
2. Berapakah nilai LC_{50} ekstrak eter dan ekstrak metanol dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) ?

1.3 Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini antara lain :

1. Melakukan uji aktivitas antikanker ekstrak eter ekstrak metanol dan dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.
2. Mengetahui LC_{50} dari ekstrak eter dan ekstrak metanol tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel

1.4 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak eter dari lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.
2. Ekstrak metanol dari lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan agar *Marchantia cataractarum* Schiffn. sebagai salah satu tumbuhan yang memiliki kandungan senyawa bioaktif sebagai

antikanker pemanfaatannya dapat lebih optimal. Selain itu diharapkan pula penelitian ini dapat digunakan sebagai data ilmiah untuk masukan bagi penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Tumbuhan

2.1.1 Klasifikasi Tumbuhan

Divisi	: Bryophyta
Kelas	: Hepaticae
Bangsa	: Marchantiales
Suku	: Marchanticeae
Marga	: <i>Marchantia</i>
Jenis	: <i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.

(Tjitrosoepomo,1986)

2.1.2 Nama Daerah

Jawa	: Lumut ati
Madura	: Lomot ateh
Toraja	: Limulun

(Tjitrosoepomo,1986)

2.1.3 Morfologi Tumbuhan

Habitus :

Lumut dengan thallus (belum terlihat diferensiasi dari bagian-bagian tanaman), berbentuk lembaran-lembaran merayap seperti daun dengan rhizoid berbentuk benang kadang-kadang memang telah menyerupai akar (Tjitrosoepomo,1986).

Ukuran dari lumut biasanya kecil, kira-kira 2 cm. Rhizoidnya kadang-kadang tampak tidak berwarna, terdiri atas satu sel. Lumut hati kadang hanya tampak seperti selebar daun (Raven,1994).

Thalus :

Seperti pita, lebarnya $\pm 0,5 - 1$ cm, agak tebal berdaging, bercabang-cabang menggarpu dan mempunyai satu rusuk tengah yang menonjol. Pada sisi bawah thalus terdapat rhizoid-rhizoid yang bersifat

fototrop negatif. Permukaan atas Thalus mempunyai lapisan kutikula, oleh sebab itu hampir tidak mungkin untuk dilalui oleh air. Jika dilihat dari atas thalus itu terlihat berpetak-petak. Dibawah tiap petak tersebut terdapat satu ruang udara , ditengahnya terdapat liang udara.

Liang udara :

Liang udara menghubungkan ruang udara dengan lingkungan. Dinding liang udara terdiri dari empat cincin yang masing-masing terdiri dari empat sel. Pada dasar liang udara terdapat sel-sel yang mengandung kloroplas dan jaringan asimilasi.

Gametangium :

Gametangium didukung oleh suatu cabang thalus yang tumbuh tegak. Bagian bawah thalus ini tergulung, merupakan suatu tangkai. Di dalam gulungan ini terdapat saluran dengan benang-benang rhizoid. Bagian tersebut mengadakan percabangan menggarpu hingga akhirnya membentuk suatu badan seperti bintang. (Tjitrosoepomo,1986)

2.1.4 Penyebaran Tumbuhan

Lumut hati tersebar luas di seluruh dunia. Merupakan species kosmopolitan, dapat tumbuh mulai dari daerah tropis sampai ke daerah kutub, umumnya tumbuh di tempat-tempat yang lembab (Anonim,www.rook.org,2003)

2.1.5 Habitat Tumbuhan

Pada umumnya tumbuhan ini banyak ditemukan pada tanah yang lembab atau basah, terutama pada area yang baru saja terbakar. Pertumbuhan terbaik pada tanah dengan kondisi pH 6,0 dengan mendapatkan sinar matahari secara baik. Koloni tumbuhan lumut ini dapat membantu pembaharuan humus dan menyiapkan tanah sehingga dapat ditumbuhi oleh vegetasi lain (Tjitrosoepomo,1986)

2.1.6 Khasiat Tumbuhan

Khasiat tumbuhan lumut (Bryophyta) secara umum mempunyai aktivitas antimikroba dan antijamur, antikanker, diuretic, pembunuh serangga dan pengatur pertumbuhan tanaman (Asakawa, 1984).

2.1.7 Kandungan Tumbuhan

Asakawa dan kawan-kawan telah berhasil mengumpulkan data mengenai kandungan dan struktur kimia dari sejumlah tumbuhan lumut yang tumbuh di beberapa negara. Kandungan kimia tumbuhan lumut (*Bryophyta*) antara lain terpenoid, aromatis lipofilik dan glikosida flavonoid. Selain itu dari penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Widyawaruyanti,dkk (1993) terhadap kandungan kimia dari lumut hati (Hepaticae) didapatkan senyawa terpenoid dan sterol. Asakawa (1984) melaporkan bahwa senyawa kimia yang menyebabkan aktivitas biologis dari Hepaticae adalah senyawa terpenoid dan aromatis lipofilik.

2.2 Tinjauan Tentang Kanker

Kanker dapat didefinisikan secara luas sebagai penyakit dimana terjadi multiplikasi sel yang tidak terkontrol dan menyebar dalam tubuh(H.P. Rang et all,1995). Sel kanker sendiri merupakan bagian dari sel tubuh manusia yang mengalami pertumbuhan abnormal dikarenakan adanya kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi atau ada pengaturan kembali, adanya adisi dan integrasi bahan genetik virus ke dalam gen dan adanya perubahan ekspresi genetik (Siswandono dan Soekardjo,2000).

Sifat umum sel kanker ialah sebagai berikut :

1. Pertumbuhan berlebihan umumnya berbentuk tumor.
2. Gangguan diferensiasi dari sel dan jaringan sehingga mirip jaringan yang ada di sekitarnya dan menyebabkan rusaknya jaringan yang ditempati. Invasi terjadi karena motilitas sel yang abnormal, kurangnya kohesi seluler dan produksi enzim proteolitik.
3. Metastatik merupakan proses pembentukan tumor sekunder yang letaknya jauh, atau dapat dikatakan sebagai kemampuan sel kanker untuk menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru.

4. Memiliki hereditas bawaan (*acquired heredity*), yaitu turunan sel kanker juga memiliki kemungkinan menimbulkan kanker.
5. Pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995, Underwood, J.C.E., 1999).

2.3 Tinjauan Tentang Antikanker

Antikanker diharapkan memiliki toksisitas yang selektif, artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak jaringan normal. Pada umumnya antikanker menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas karena menghambat sel normal yang proliferasinya cepat. Terapi hanya dikatakan berhasil jika dosis yang digunakan dapat mematikan sel kanker dan tidak mengganggu sel normal yang berproliferasi (Nafrialdi and Ganiswara, 1995).

Pada umumnya kerja antikanker berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses yang essential. Antikanker dibagi menjadi 5 kelompok antara lain : (Nafrialdi and Ganiswara, 1995, Siswandono dan Soekardjo, 2000).

1. Alkilator

Cara kerjanya melalui pembentukan ion karbonium atau kompleks lain yang sangat reaktif. Efek sitotoksik maupun efek sampingnya berhubungan langsung dengan terjadinya alkilasi DNA.

Golongan alkilator : mustar nitrogen, alkil sulfonat, nitrosurea.

2. Anti metabolit

Senyawa yang menghambat jalur metabolik yang penting untuk kehidupan dan reproduksi sel kanker melalui penghambatan folat, purin, pirimidin dan asam amino serta jalur nukleosida pirimidin yang diperlukan untuk sintesis DNA. Penghambatan replikasi DNA terjadi secara langsung maupun tidak langsung sehingga menyebabkan sel tidak berkembang biak dan mengalami kematian.

Golongan anti metabolit : 5-fluorourasil, antagonis pirimidin, antagonis folat (metotreksat).

3. Produk alamiah

Antikanker produk alam dibagi menjadi dua kelompok yaitu antibiotika antikanker, antikanker produk tanaman dan antikanker produk hewan

- Antibiotik antikanker

Beberapa antibiotik yang mula-mula dikembangkan sebagai senyawa antibakteri ternyata didapatkan mempunyai efek sitotoksik tinggi. Bekerja dengan mengikat DNA dan menghambat sintesis RNA, DNA, atau keduanya sehingga mengganggu proses replikasi sel.

Golongan antibiotik antikanker : doksorubisin, daunorubisin, daktinomisin, mitomisin, bleomisin

- Antikanker produk tanaman

Senyawa antitumor yang berhasil diisolasi dari antara lain dari golongan terpenoid dan alkaloid.

Golongan produk terpenoid : allamandin dari *Allamanda cathartica*, baccharin dari *Baccharis megapotamica*.

Golongan produk alkaloid : vinblastin, vinkristin, etoposid, teniposid, camptothecin, taxan.

4. Hormon

Bekerja dengan mempengaruhi keseimbangan hormon dalam tubuh, baik dengan menghambat sintesisnya maupun dengan memblok reseptornya.

Golongan hormon : hormon androgen (testosteron propionat), hormon estrogen (diethylbestrol), glukokortikoid (prednison), antiandrogen (flutamid)

5. Isotop radioaktif

Golongan isotop radioaktif : Iodium/Natrium iodida (I^{131})

2.4 Tinjauan Tentang Kultur Sel Mieloma

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi sel jaringan hidup. Jaringan yang akan digunakan dipecah-pecah melalui proses enzimatik,

kimiawi ataupun secara mekanis untuk menghasilkan susupensi sel yang kemudian ditanam ke dalam media yang sesuai. Kultur sel semacam ini disebut sebagai kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang-ulang ataupun hasil transformasi kultur sel primer disebut *cell lines* (Fresney, 1987).

Sel mieloma adalah salah satu jenis sel tumor hasil transformasi sel-sel pembentuk antibodi yang akhirnya menjadi malignan. Pemunculan sel mieloma pada hewan coba seperti mencit, dapat dilakukan dengan pemberian senyawa karsinogen golongan hidrokarbon aromatis seperti minyak mineral melalui rute intraperitoneal secara berturut-turut selama tiga hari dengan harapan akan muncul tumor atau kanker satu tahun kemudian.

Jenis sel mieloma yang sering digunakan untuk uji *in vitro* adalah galur mineral oil plasmacytoma-21 (MPOC-21), sedangkan turunannya yang banyak dimanfaatkan adalah galur X 63 yang merupakan hasil seleksi kultur *cell lines* mieloma. Sel mieloma tersebut banyak dikembangkan untuk keperluan uji *in vitro* (Indrawati, 1999).

Keuntungan penggunaan sistem kultur adalah segi kontrol lingkungan fisiko kimia yang lebih tepat serta kondisi biologis yang relatif konstan. Selain itu karakteristik dan homogenitas sampel sistem kultur lebih baik dibandingkan jaringan hidup sel hewan. Replikasi sel selama percobaan dapat identik.

Secara ekonomi penggunaan sistem kultur sel juga lebih menguntungkan karena pereaksi yang digunakan lebih sedikit sehingga lebih menghemat bahan. Komponen-komponen penting dalam kultur juga telah diidentifikasi sehingga membuat penggantian media kultur dengan bahan lain lebih praktis (Fresney, 1987).

Sampai saat ini baik kultur sel primer maupun kultur *cell lines* mamalia telah banyak dikembangkan untuk keperluan berbagai penelitian secara *in vitro*, termasuk penelitian tentang antikanker yang menggunakan kultur sel mieloma, selain itu juga untuk menghindari penggunaan hewan coba serta untuk memberikan informasi tentang toksisitas bahan-bahan kimia dan obat-obatan (Jaime, 1999).

2.5 Tinjauan Tentang Metode Viabilitas Sel

Adanya pemaparan bahan-bahan toksik terhadap sel dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan-bahan yang bersifat toksik inilah yang digunakan sebagai dasar dilakukannya uji sitotoksitas dan salah satunya dengan menggunakan metode *cell viability test* (Fresney, 1987). Secara garis besar metode penentuan viabilitas sel digolongkan menjadi 2, yaitu berdasarkan penentuan respon singkat atau respon jangka pendek dan penentuan respon jangka panjang atau respon yang bersifat permanen.

Penentuan viabilitas sel berdasarkan adanya respon jangka pendek atau respon singkat digunakan untuk menentukan sel yang hidup setelah dilakukannya prosedur penelitian yang berpotensi menyebabkan terjadinya kerusakan sel. Sedangkan penentuan viabilitas sel berdasarkan adanya respon yang bersifat permanen digunakan jika efek yang dihasilkan oleh sebuah perlakuan pada tahapan penelitian hanya akan ditunjukkan beberapa jam atau beberapa hari setelah perlakuan (Fresney, 1987).

Kerusakan atau kematian sel diikuti oleh adanya perubahan integritas membran dan ini dapat diketahui dengan menggunakan pewarnaan. Sel yang mati bersifat permeabel terhadap zat warna tertentu sehingga dapat menyerap warna, sedangkan sel yang hidup bersifat impermeable dan tidak dapat menyerap warna. Viabilitas sel dinyatakan sebagai prosentase sel yang hidup atau yang tidak terwarnai terhadap jumlah sel total. Zat warna yang dapat digunakan antara lain tripan biru, nigosin dan eritrosin (Fresney, 1987, Suntoro, 1983).

Untuk perhitungan jumlah sel dapat digunakan metode atau alat antara lain (Fresney, 1987, Jaime, 1999) :

1. *Cell Counting*

Metode *cell counting* ada 3 macam :

- Metode Hemositometer
- Metode *Electronic Particle Counting*
- Metode *Cuolter Cell Counter*

Dalam penelitian ini digunakan metode *Cell Counting* dengan hemositometer karena cara ini lebih mudah dilaksanakan dan tidak

membutuhkan banyak biaya dibandingkan dengan metode *Cell Counting* yang lainnya.

2. *DNA Content*

DNA bisa diuji dengan beberapa metode fluoresensi, termasuk reaksi dengan DAPI atau Hoechst 33258. Karena halangan dari isi sel lainnya maka metode tersebut hanya menggunakan DNA murni.

a. Menentukan DNA content dari sel dengan metode Hoechst 33258.

Sel dihomogenkan pada dapar pH 7,4 dan disentrifuse. Endapan sel dicampur dengan Hoechst 33258 dan emisi fluoresensinya diukur. Metode ini membutuhkan DNAdouble helix yang masih utuh.

b. Menentukan DNA content dari sel dengan metode DAPI

Sel lisis dicampur dengan DAPI pada kondisi gelap dan fluoresensinya diukur pada panjang gelombang UV panjang dengan fluorometer.

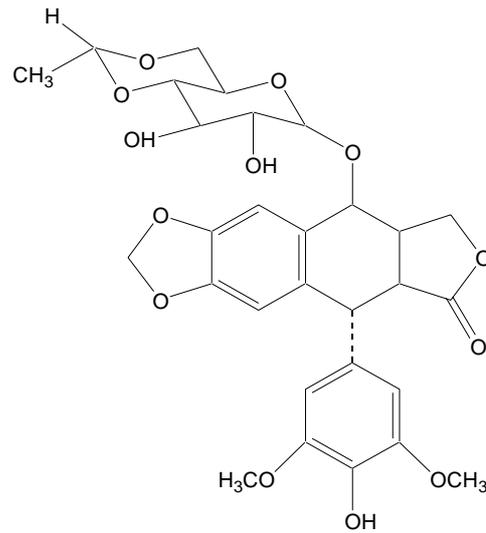
2.6 Tinjauan Tentang Etoposida

Etoposida banyak digunakan dalam kemoterapi pengobatan kanker terutama kanker testis, kanker paru, leukemia mielogenous akut dan limfoma (Siswandono dan Soekardjo,2000;Anonim,www.tevaeu-oncology.com.,2004).

Etoposida bekerja sebagai antineoplastik melalui interaksi dengan enzim Topoisomerase II. Akibat dihambatnya aktivitas enzim Topoisomerase II, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Selanjutnya akan terbentuk *Protein Link DNA Breaks* (PLDB) atau fragmentasi DNA yang mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA sel kanker. Kerusakan DNA sel kanker berpengaruh terhadap proses dalam sel khususnya proses replikasi dan diakhiri dengan kematian sel kanker. Kematian sel kanker dengan terbentuknya fragmentasi DNA adalah kematian secara apoptosis, dimana pada aplikasi klinik dari penggunaan senyawa tersebut lebih selektif (Sukardiman,2001; Anonim,www.tevaeu-oncology.com.,2004).

Penggunaan etoposida pada pasien yang telah menjalani pengobatan dengan radiasi atau obat-obatan kanker lainnya dapat meningkatkan efek terapi radiasi atau efek dari obat-obatan tersebut. Kombinasi dengan obat lainnya perlu diperhatikan aturan pemakaiannya karena pemakaian yang tidak sesuai dapat

meningkatkan efek samping dari etoposid. Efek samping dari pemakaian etoposid antara lain mual, muntah, hilang nafsu makan dan kerontokan rambut. Namun beberapa efek tersebut dapat tidak timbul sampai berbulan-bulan atau bertahun-tahun setelah pemakaian senyawa tersebut (Anonim, www.nlm.nih.gov, 2004).



Gambar 2.1 Struktur Etoposida (Siswandono, 2000)

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Di negara maju kanker merupakan penyebab kematian terbesar kedua setelah penyakit kardiovaskular (Nafrialdi and Ganiswara,1995).

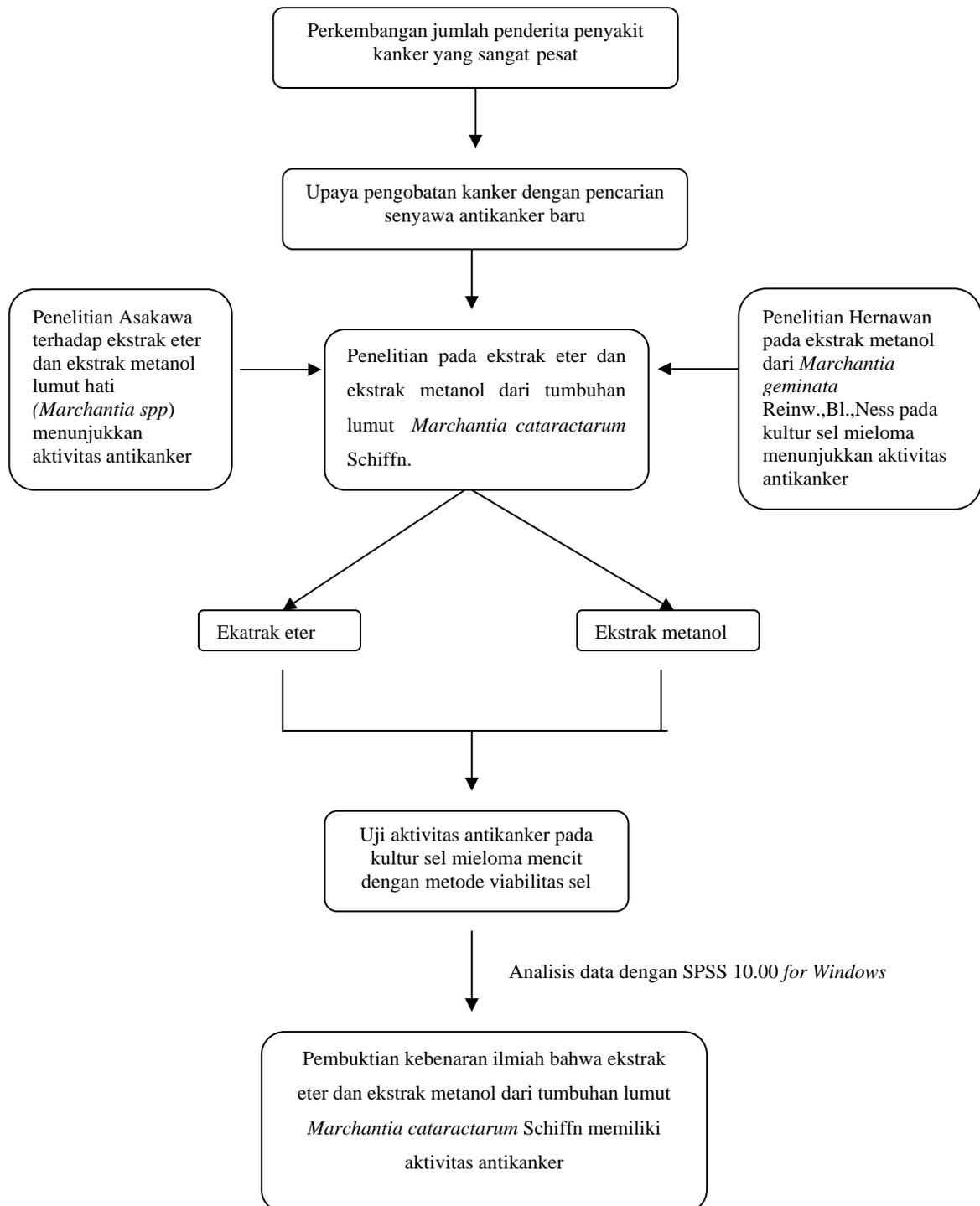
Salah satu jenis pengobatan yang banyak digunakan adalah kemoterapi. Sebagian besar obat-obatan yang ada saat ini, komponen aktifnya bersumber dari tumbuhan. Oleh karena itu pencarian senyawa bioaktif baru pada tumbuhan guna menemukan obat kanker baru terus dilakukan.

Salah satu tumbuhan lumut yang memiliki senyawa bioaktif sebagai antikanker adalah lumut hati (*Marchantia spp*). Penelitian yang dilakukan oleh Asakawa (1984) terhadap ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia polymorpha* L, *Marchantia paleacea* Bertol var. *diptera* (Mont) dan *Marchantia tosana* Steph. Menunjukkan bahwa tumbuhan thalus ini mempunyai aktivitas antikanker terhadap KB Cell. Aktivitas yang sama juga ditunjukkan pula oleh spesies lain dari suku Marchantiaceae yaitu *Marchantia geminata* Reinw.,Bl.,Ness. Penelitian yang telah dilakukan oleh Hernawan (2002) terhadap ekstrak metanol tumbuhan tersebut menunjukkan aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit.

Oleh karena itu berdasarkan persamaan genus, serta mengacu pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, dilakukan penelitian yang sama terhadap spesies lain dari suku Marchantiaceae yaitu *Marchantia cataractarum* Schiffn.

Dalam penelitian kali ini dilakukan uji aktivitas antikanker ekstrak eter ekstrak metanol dan dari tumbuhan *Marchantia cataractarum* Schiffn pada kultur sel mieloma mencit. Uji aktivitas tersebut dilakukan dengan menggunakan metode viabilitas sel dan selanjutnya dilakukan pengolahan data dengan menggunakan program SPSS 10.00 for Windows

Dari penelitian ini diharapkan agar pemanfaatan tumbuhan *Marchantia cataractarum* Schiffn sebagai salah satu alternatif dalam pengobatan kanker dapat menjadi lebih optimal.



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Tumbuhan

Sampel yang akan diuji merupakan ekstrak eter dan ekstrak metanol dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) Tumbuhan lumut tersebut dikumpulkan dari daerah Gunung Bromo, Probolinggo, Jawa Timur. Determinasi tanaman diperoleh dari *Herbarium Bogoriense*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, Bogor.



Gambar 4.1 Tanaman lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn)

4.1.2 Kultur Sel Mieloma

Kultur sel mieloma yang digunakan yaitu sel mieloma mencit tipe P₃UI yang diperoleh dari Laboratorium Vaksin Mamalia Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

4.1.3 Media

Media yang digunakan untuk menumbuhkan sel mieloma yaitu Media RPMI 1640.

4.1.4 Bahan Lain

Fetal Bovine Serum (FBS), dimetil sulfoksida (DMSO), Eter teknis, Metanol teknis, *n*-Heksana, Etil Asetat, larutan Tripan Biru, HEPES, Aquadest, Etoposida “EBEWE” PT. Ferron Par Pharmaceutical.

4.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain : bejana, corong Buchner, pompa vakum, rotavapour, pipet tetes, pipet ukur, mikropipet, vial, spatel, spuit, *disposable tube*, botol kultur, tabung reaksi, *microwell plate*, otoklaf, inkubator CO₂, mikroskop cahaya, hemositometer, Vortex, Rotavapour.

4.3 Rancangan Penelitian

Dari tiap percobaan kultur sel mieloma mencit terdapat 3 kelompok perlakuan seperti yang tercantum dalam table di bawah ini :

Tabel IV.1 Kelompok perlakuan pada kultur sel mieloma mencit

Ekstrak Eter		Ekstrak Metanol	
Kelompok I	Bahan Uji	Kelompok I	Bahan Uji
Kelompok II	Kontrol Positif	Kelompok II	Kontrol Positif
Kelompok III	Kontrol Negatif	Kelompok III	Kontrol Negatif

Ekstrak eter dan ekstrak metanol yang akan diuji aktivitas antikankernya masing-masing dibuat dalam 4 macam konsentrasi yaitu 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm.

Sebagai kontrol positif digunakan etoposida. Fungsi kontrol positif untuk membuktikan bahwa cara kerja atau metode kerja yang dilakukan adalah benar.

Sebagai kontrol negatif digunakan media RPMI yang ditambah DMSO. Fungsi kontrol negatif untuk memastikan bahwa apabila terdapat aktivitas antikanker, maka hal tersebut tidak disebabkan oleh medianya.

Pengujian tiap macam ekstrak akan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Percobaan tiap bahan uji dapat digambarkan sebagai berikut :

Tabel IV.2 Rancangan Penelitian

Ekstrak eter		Ekstrak metanol	
Kelompok I	Kontrol Negatif	Kelompok III	Kontrol Negatif
Kelompok II	Bahan uji 1000 ppm Bahan uji 100 ppm Bahan uji 10 ppm Bahan uji 1 ppm	Kelompok I	Bahan uji 1000 ppm Bahan uji 100 ppm Bahan uji 10 ppm Bahan uji 1 ppm
Kelompok III (Kontrol Positif)	Etoposida 100 ppm Etoposida 10 ppm Etoposida 1 ppm	Kelompok II (Kontrol Positif)	Etoposida 100 ppm Etoposida 10 ppm Etoposida 1 ppm

4.4 Tahapan Percobaan

1. Penyiapan bahan
2. Pembuatan ekstrak bahan uji
3. Identifikasi kandungan kimia
4. Pembuatan larutan uji
5. Pembuatan larutan kontrol positif
6. Pembuatan larutan kontrol negatif

7. Preparasi kultur sel mieloma
8. Perhitungan sel dengan hemositometer
9. Uji aktivitas antikanker
10. Analisis data

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Penyiapan Bahan

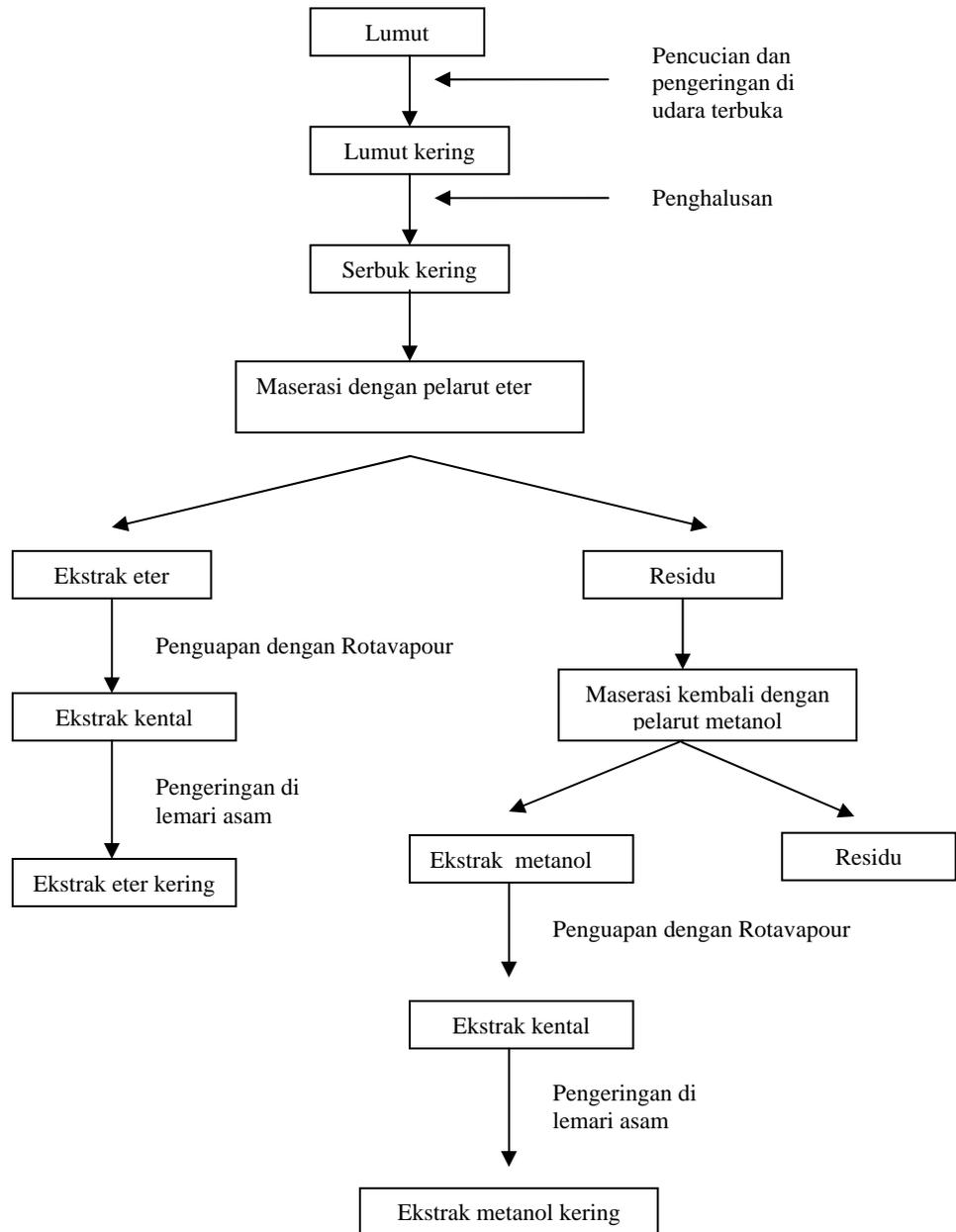
Tumbuhan lumut hati yang akan diteliti dan telah dideterminasi, dicuci bersih dengan air dan dilanjutkan pengeringan. Pengeringan tidak dilakukan dibawah sinar matahari langsung melainkan cukup diangin-anginkan saja. Jika bahan sudah cukup kering, bahan tersebut diserbuk hingga menjadi serbuk yang halus.

4.5.2 Pembuatan ekstrak eter dan ekstrak metanol

Bahan yang sudah dikeringkan dan diserbuk ,kemudian diekstraksi dengan menggunakan pelarut eter dan pelarut metanol dengan cara maserasi. Tujuan pemilihan pelarut ini adalah untuk memisahkan komponen non polar dengan komponen polar.

Serbuk tanaman sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam bejana, ditambahkan eter hingga terendam seluruhnya, kemudian ditutup dan dibiarkan pada suhu kamar selama 2x24 jam sambil sesering mungkin diaduk. Kemudian disaring dengan penyaring Bochner dengan bantuan pompa vakum.. Ampas dimaserasi lagi beberapa kali dengan pelarut yang baru hingga filtrat jernih atau sampai filtrat memberikan reaksi negatif pada pelat KLT dengan pemberian penampak noda anisaldehyd-asam sulfat pekat. Setelah itu residu dikeringkan untuk kemudian dilanjutkan proses maserasi dengan mengganti pelarut dengan metanol. Perlakuan yang sama dilakukan pada pelarut metanol.

Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan rotavapour hingga diperoleh massa ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental tersebut dikeringkan dalam lemari asam sampai diperoleh ekstrak kering.



Gambar 4.2 Skema pembuatan ekstrak eter dan ekstrak metanol

4.5.3 Identifikasi Kandungan Kimia

Untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam bahan uji di dilakukan identifikasi ekstrak dengan menggunakan metode KLT-Densitometri. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 GF₂₅₄, sedangkan fase geraknya adalah *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4 : 1.

4.5.4 Pembuatan Larutan Uji

1. Pembuatan larutan induk (5000 ppm)

Ekstrak kering eter dan metanol masing-masing ditimbang 50,0 mg kemudian keduanya dilarutkan dengan bantuan 1,0 ml DMSO sampai larut. Selanjutnya ditambah dengan media sampai tepat 10,0 ml dan dicampur sampai homogen. Larutan yang diperoleh kemudian dimasukkan tabung tertutup steril.

Konsentrasi larutan ekstrak eter yang diperoleh : $50 \text{ mg} / 10 \text{ ml} = 5000 \text{ ppm}$.

Konsentrasi larutan ekstrak metanol yang diperoleh : $50 \text{ mg} / 10 \text{ ml} = 5000 \text{ ppm}$.

2. Pembuatan larutan baku kerja

2.1 Larutan baku kerja ekstrak eter dibuat dengan konsentrasi 5 ppm, 50 ppm dan 500 ppm.

Larutan baku kerja dibuat dengan cara mengencerkan larutan induk 5000 ppm. Dari larutan induk 5000 ppm dipipet 0,1 ml kemudian dimasukkan dalam vial ditambah dengan 0,9 media, didapatkan konsentrasi 500 ppm. Selanjutnya dari konsentrasi 500 ppm diambil 0,1 ml dimasukkan dalam vial berikutnya dan ditambah dengan media sampai 1 ml, didapatkan konsentrasi 50 ppm, demikian seterusnya hingga didapatkan konsentrasi 5 ppm.

2.2 Larutan baku kerja ekstrak metanol dibuat dengan konsentrasi 1250 ppm, 500 ppm, 50 ppm dan 5 ppm.

Dari larutan induk 5000 ppm dipipet 0,5 ml kemudian dimasukkan dalam vial ditambah 1,5 ml media, didapatkan konsentrasi 1250 ppm. Dari larutan induk 5000 ppm dipipet 0,2 ml ditambah 1,8 ml media, didapatkan konsentrasi 500 ppm. Selanjutnya dari konsentrasi 500 ppm diambil 0,1 ml dimasukkan dalam vial dan ditambah dengan media sampai 1 ml, didapatkan konsentrasi 50 ppm. Kemudian dari konsentrasi 50 ppm diambil 0,1 ml dimasukkan dalam vial dan ditambah dengan media sampai 1 ml, didapatkan konsentrasi 5 ppm.

3 Pembuatan larutan uji

3.1 Larutan uji ekstrak eter dibuat dengan seri pengenceran sebagai berikut :

Dari larutan induk 5000 ppm dan larutan baku kerja 5 ppm, 50 ppm, 500 ppm, selanjutnya masing-masing dipipet 0,2 ml dan diletakkan dalam *microwell plate*. Selanjutnya ditambahkan media yang mengandung sel mieloma hingga 1,0 ml dan dihomogenkan.

3.2 Larutan uji ekstrak metanol dibuat dengan seri pengenceran sebagai berikut :

Dari larutan larutan baku kerja 5 ppm, 50 ppm, 500 ppm dan 1250 ppm masing-masing dipipet 0,2 ml dan diletakkan dalam *microwell plate*. Selanjutnya ditambahkan media yang mengandung sel mieloma hingga 1,0 ml dan dihomogenkan.

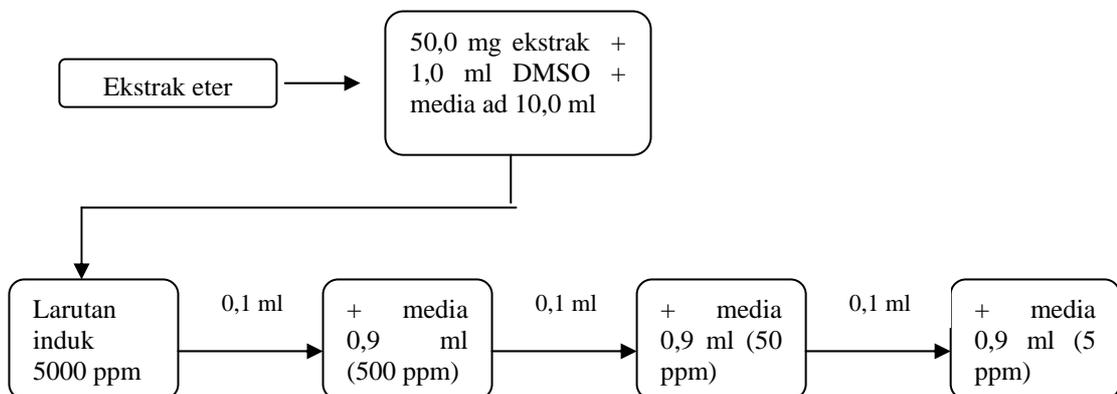
Perhitungan konsentrasi larutan uji ekstrak eter :

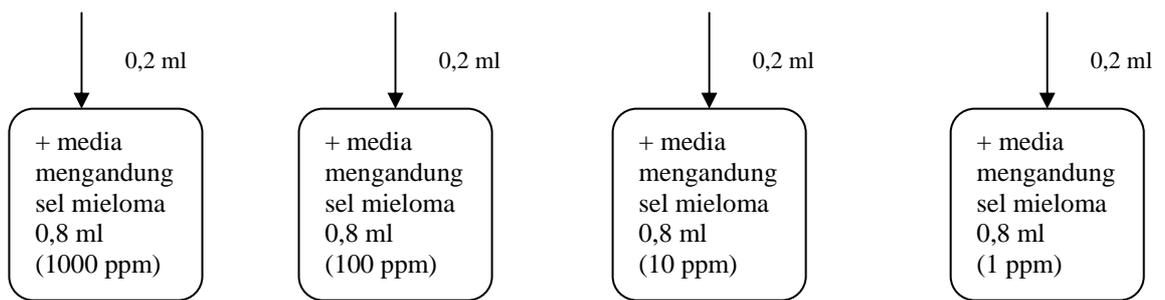
- $(0,2 \text{ ml} / 1,0 \text{ ml}) \times 5000 \text{ ppm} = 1000 \text{ ppm}$
- $(0,2 \text{ ml} / 1,0 \text{ ml}) \times 500 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$
- $(0,2 \text{ ml} / 1,0 \text{ ml}) \times 50 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$
- $(0,2 \text{ ml} / 1,0 \text{ ml}) \times 5 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}$

Perhitungan konsentrasi larutan uji ekstrak metanol :

- $(0,2 \text{ ml} / 1,0 \text{ ml}) \times 1250 \text{ ppm} = 250 \text{ ppm}$
- $(0,2 \text{ ml} / 1,0 \text{ ml}) \times 500 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$
- $(0,2 \text{ ml} / 1,0 \text{ ml}) \times 50 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$
- $(0,2 \text{ ml} / 1,0 \text{ ml}) \times 5 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}$

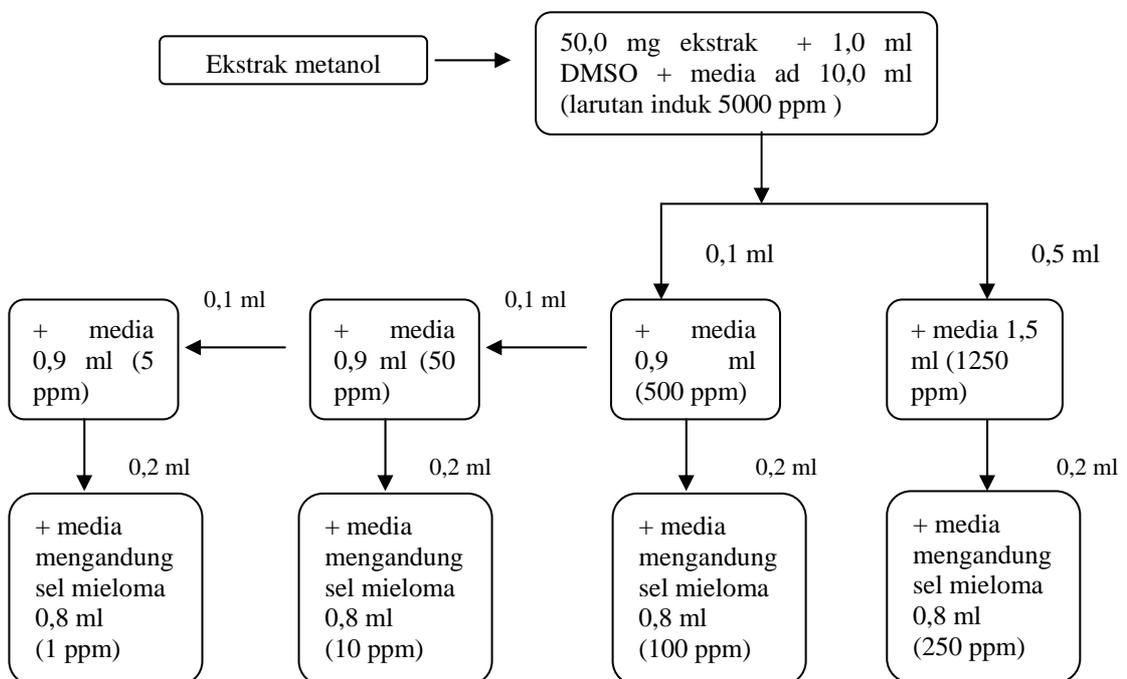
Skema Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Eter





Gambar 4.3 Skema pembuatan larutan uji ekstrak eter

Skema Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol



Gambar 4.4 Skema pembuatan larutan uji ekstrak metanol

4.5.5 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

1. Dari sediaan larutan injeksi etoposida 100mg/5ml dipipet 2,5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Selanjutnya ditambah dengan 1,0 ml DMSO dan media RPMI sampai garis tanda, lalu dikocok sampai homogen.

Konsentrasi yang diperoleh :

$$(2,5 \text{ ml}/5 \text{ ml}) \times 100 \text{ mg} = 50 \text{ mg}$$

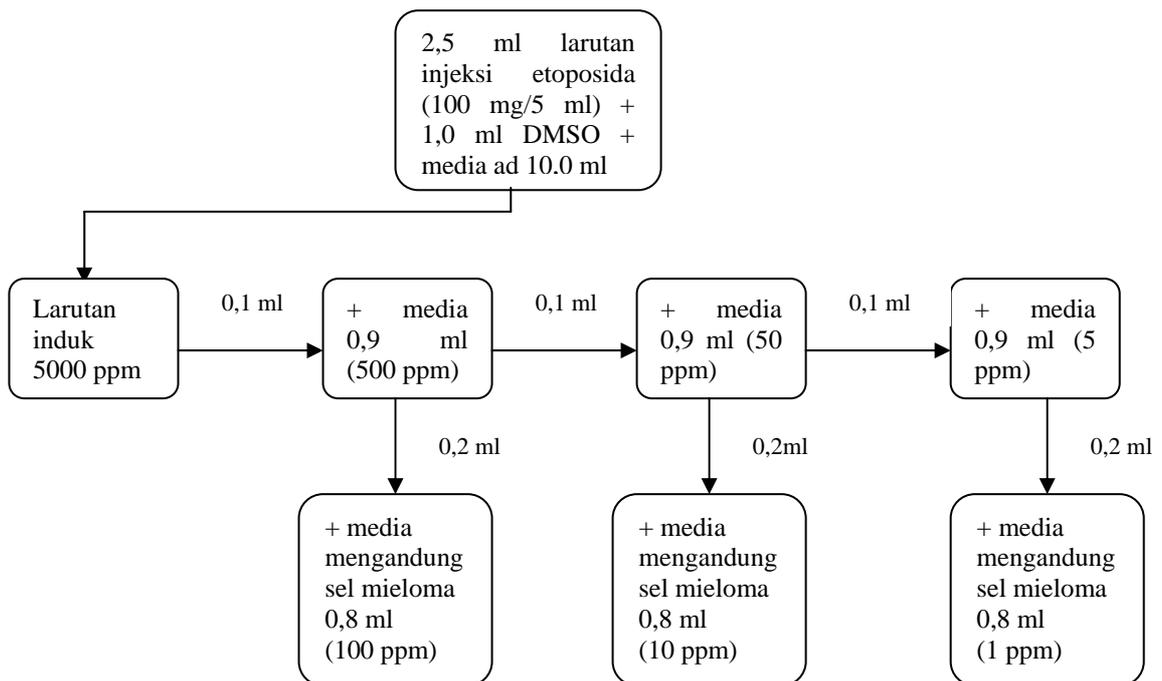
$$50 \text{ mg}/10,0 \text{ ml} = 5000 \text{ ppm}$$

2. Dari larutan induk 5000 ppm dipipet 0,1 ml kemudian dimasukkan dalam vial ditambah dengan 0,9 media, didapatkan konsentrasi 500 ppm. Selanjutnya dari konsentrasi 500 ppm diambil 0,1 ml dimasukkan dalam vial berikutnya dan ditambah dengan media sampai 1 ml, didapatkan konsentrasi 50 ppm, demikian seterusnya hingga didapatkan konsentrasi 5 ppm. Setelah itu masing-masing tabung tersebut diambil 0,2 ml dan diletakkan dalam *microwell plate* kemudian ditambahkan media yang mengandung sel mieloma hingga 1,0 ml dan dihomogenkan.

Konsentraasi yang didapat :

- $(0,2 \text{ ml} / 0,8 \text{ ml}) \times 500 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$
- $(0,2 \text{ ml} / 0,8 \text{ ml}) \times 50 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$
- $(0,2 \text{ ml} / 0,8 \text{ ml}) \times 5 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}$

Skema Pembuatan Larutan Kontrol Positif



Gambar 4.5 Skema pembuatan kontrol positif

4.5.6 Pembuatan Larutan Kontrol negatif

Larutan kontrol negatif dibuat dengan cara :

Larutan DMSO dipipet 1 ml dan dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml kemudian ditambah media RPMI sampai dengan garis tanda dan dikocok homogen. Selanjutnya larutan kontrol negatif tersebut dipipet 0,2 ml dan dimasukkan dalam *microwell plate* dan ditambah media RPMI yang mengandung sel mieloma 0,8 ml dan dihomogenkan. Konsentrasi larutan uji = 0 ppm.

4.5.7 Preparasi Kultur Sel Mieloma Mencit

1. Sel mieloma yang terdapat di botol kultur dirontokkan dengan bantuan pipet. Kemudian sel mieloma tersebut dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi.
2. Media berisi sel mieloma disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.
3. Hasil sentrifus berupa endapan sel dan supernatan, kemudian supernatan dipisahkan dari endapan sel (dikerjakan di ruang LAFC)
4. Selanjutnya ditambah media RPMI 1,0 ml, kemudian ditambah dengan tripan biru 1,0 ml dan dihomogenkan.
5. Campuran diambil secukupnya dan diletakkan di hemositometer
6. Jumlah sel yang terdapat dalam campuran tersebut dihitung. Rentang jumlah sel yang optimal untuk dilakukan penghitungan yaitu antara 1×10^5 sampai dengan 2×10^6 sel/ ml.

4.5.8 Perhitungan Sel Dengan Hemositometer

Jumlah sel kanker yang terdapat dalam daerah 1,2,3,4 dihitung (lihat lampiran 2). Tiap daerah mempunyai 16 daerah A. Luas daerah A = $0,0625 \text{ mm}^2$, kedalaman 0,1 mm. Volume dari 16 A = $16 \times 0,0625 \times 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4}$ ml. Dari satu lapang pandang (A), misalnya terhitung B sel, maka jumlah sel/ml adalah $(16 \times B \times \text{pengenceran} \times 10^4)$ sel/ml.

Sel-sel yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kiri dan atas dihitung ,sedangkan yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kanan dan bawah tidak dihitung atau sebaliknya. Perhitungan dilakukan dengan perbesaran 100 x.

4.5.9 Uji Aktivitas Antikanker

1. Dari larutan induk 5000 ppm dan larutan baku kerja 500 ppm, 50 ppm dan 5 ppm, masing-masing dipipet 0,2 ml kemudian dimasukkan dalam *microwell plate*.
2. Selanjutnya ditambahkan 0,8 ml media yang berisi sel mieloma (antara 1×10^5 sampai dengan 2×10^6 sel/ml)
3. Kultur sel tersebut diinkubasi dalam inkubator CO₂ dengan suhu 37° C selama 24 jam.
4. Setelah diinkubasi, diambil *microwell plate* dari dalam inkubator.
5. Tiap-tiap konsentrasi diambil 0,1 ml, dipindahkan ke vial. Kemudian ditambahkan 0,1 ml larutan tripan biru dan dihomogenkan.
6. Larutan dalam vial tersebut dipipet dengan mikropipet dan letakkan di hemositometer. Gelas penutup diletakkan di atasnya. Cara meletakkannya, pipet diletakkan dibawah gelas penutup kemudian Socorex ditekan dan larutan dalam pipet dimasukkan pelan-pelan ke bawah gelas penutup.
7. Hemositor diletakkan di bawah mikroskop dan dilakukan penghitungan terhadap sel yang hidup dan sel yang mati dengan perbesaran 100x.
8. Viabilitas sel dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{viabilitas sel} = \left(\frac{\text{jumlah sel hidup}}{\text{jumlah sel hidup} + \text{jumlah sel mati}} \right) \times 100\%$$
9. Selanjutnya dilakukan analisis data yang diperoleh dengan Anava satu arah dan Probit.

4.6 Analisis Data

4.6.1 Anava Satu Arah

Data hasil percobaan dianalisis dengan program SPSS *for Windows* 10.00 menggunakan uji Anava satu arah untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak eter dan ekstrak metanol terhadap viabilitas sel mieloma mencit.

Hipotesis statistik yang diajukan ialah :

H₀ = Tidak ada perbedaan bermakna minimal 1 pasang hambatan pertumbuhan sel kanker mieloma mencit antar kelompok uji.

H_a = Ada perbedaan bermakna hambatan pertumbuhan sel kanker mieloma mencit minimal 1 pasang antar larutan uji.

Untuk menilai hipotesis statistik terlebih dahulu dihitung harga signifikansi. Harga signifikansi hitung akan dibandingkan dengan harga ($\alpha = 0,05$) atau pada tingkat kepercayaan 95%.

Bila harga signifikansi hitung $<$ harga $\alpha = 0,05$, maka H_0 ditolak dan H_a diterima yang berarti ada perbedaan bermakna minimal 1 pasang hambatan pertumbuhan sel mieloma antar kelompok uji. Bila harga signifikansi hitung $>$ harga $\alpha = 0,05$, maka H_0 diterima dan H_a ditolak yang berarti tidak ada perbedaan bermakna hambatan pertumbuhan sel mieloma antar kelompok uji.

Selanjutnya untuk mengetahui kelompok uji mana saja yang berbeda maka dilakukan uji LSD.

4.6.2 Analisis Probit

Analisis probit dilakukan untuk mengetahui sejauh mana potensi lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) sebagai antikanker, yaitu dilihat dengan harga LC_{50} -nya. Harga LC_{50} menunjukkan konsentrasi larutan uji yang membunuh 50 % jumlah sel mieloma mencit.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Pembuatan Ekstrak Eter dan Metanol

Tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) yang telah dikeringkan dan dihaluskan, kemudian ditimbang sebanyak 486 gram. Serbuk kering tersebut diekstraksi dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut eter. Dari hasil ekstraksi ini diperoleh 2,7183 gram ekstrak kental berwarna hiaju kehitaman. Selanjutnya ampasnya dimaserasi kembali dengan menggunakan pelarut metanol dan didapatkan ekstrak metanol kering sebanyak 3,7131 gram.

5.2 Pembuatan Larutan Uji

5.2.1 Larutan Uji Eter

Ekstrak kental 50,1 mg dilarutkan dengan bantuan 0,1 ml DMSO dan ditambah media RPMI sampai 10,0 ml. Konsentrasi larutan induk yang didapat adalah 5010 ppm. Dari larutan ini kemudian dibuat lima macam larutan uji dengan konsentrasi 1,002 ppm; 10,02 ppm; 100,2 ppm dan 1002 ppm.

5.2.2 Larutan Uji Metanol

Ekstrak kering 50,0 mg dilarutkan dengan bantuan 0,1 ml DMSO dan ditambah media RPMI sampai 10,0 ml. Konsentrasi larutan induk yang didapat adalah 5000 ppm. Dari larutan ini kemudian dibuat lima macam larutan uji dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 250 ppm.

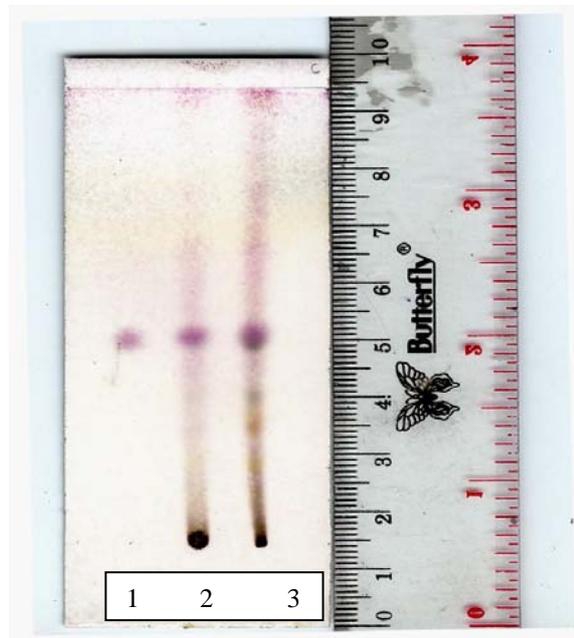
5.3 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Larutan injeksi etoposida dengan kadar 100 mg/5 ml, dipipet 2,5 ml kemudian ditambah 1,0 ml DMSO dan media RPMI sampai 10,0 ml. Konsentrasi induk yang didapat 5000 ppm. Dari larutan ini kemudian dibuat lima macam larutan uji dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm.

5.4 Identifikasi Ekstrak

Untuk mengetahui kandungan kimia di dalam bahan uji dilakukan identifikasi ekstrak. Identifikasi ini dilakukan dengan metode KLT-Densitometri. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 GF₂₅₄, sedangkan fase geraknya adalah *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4 : 1. Sampel dari ekstrak eter dan ekstrak metanol ditotolkan dalam 1 lempeng KLT, kemudian dieluasi dengan fase geraknya. Penampak noda yang digunakan yaitu sinar UV dan anisaldehyd asam sulfat pekat. Selanjutnya dilihat profilnya dengan menggunakan Densitometer.

Hasil yang diperoleh dari analisis dengan KLT dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat pekat dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 5.1 Hasil KLT Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia catarctarum* Schiffn.

Keterangan :

1. Standar sterol (isolat *Marchantia geminata* Reinw.,Bl.Ness.)
2. Ekstrak metanol
3. Ekstrak eter

Penampak noda : anisaldehyd-asam sulfat

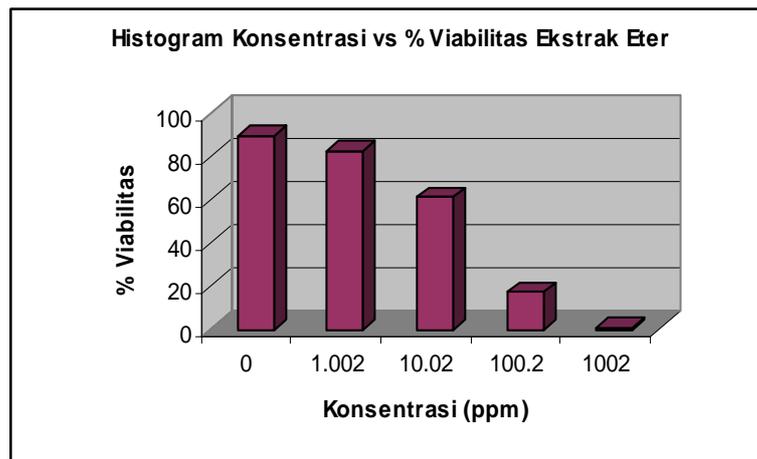
Harga Rf : 0,63

5.5 Uji Aktivitas Antikanker

Setelah dilakukan percobaan dengan penambahan larutan uji terhadap kultur sel mieloma, selanjutnya dilakukan perhitungan persen viabilitas. Data hasil pengamatan terlihat pada tabel berikut :

Tabel V. 1 Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan ekstrak eter dan diinkubasi selama 24 jam.

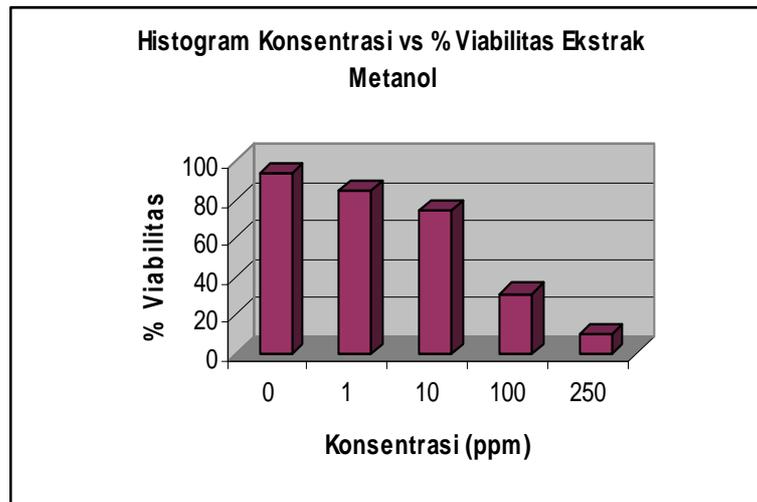
Nama bahan	Konsentrasi	Replikasi	Jumlah sel (x 10 ⁴ / ml)			% viabilitas sel	% viabilitas rata-rata
			Sel mati	Sel hidup	Sel total		
Larutan Uji	0 ppm	1	134	12	146	91,78	89,34
		2	142	18	160	88,71	
		3	140	20	160	87,54	
	1,002 ppm	1	122	24	146	83,60	82,07
		2	118	24	142	83,11	
		3	124	32	156	79,49	
	10,02 ppm	1	108	58	166	65,06	60,97
		2	100	58	158	63,29	
		3	84	70	154	54,55	
	100,2 ppm	1	22	104	126	17,46	16,99
		2	24	114	138	17,39	
		3	20	104	124	16,13	
	1002 ppm	1	1	161	162	0,62	0,45
		2	1	255	256	0,39	
		3	1	285	286	0,35	



Gambar 5.2 Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak eter vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan

Tabel V. 2 Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan ekstrak metanol dan diinkubasi selama 24 jam.

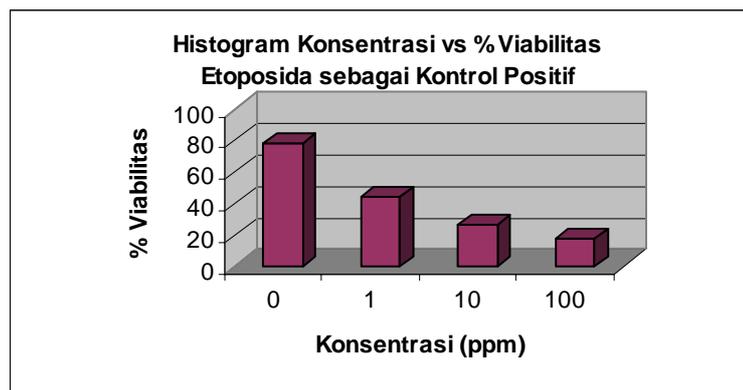
Nama bahan	Konsentrasi	Replikasi	Jumlah sel (x 10 ⁴ / ml)			% viabilitas sel	% viabilitas rata-rata
			Sel mati	Sel hidup	Sel total		
Larutan Uji	0 ppm	1	78	7	85	91,76	94,1371
		2	89	9	90	98,89	
		3	100	9	109	91,74	
	1 ppm	1	71	12	83	85,53	84,80
		2	74	12	86	86,05	
		3	82	17	99	82,83	
	10 ppm	1	50	19	69	72,46	74,13
		2	62	18	80	77,50	
		3	58	22	80	72,44	
	100 ppm	1	20	42	62	32,26	31,26
		2	30	58	88	34,09	
		3	17	45	62	27,42	
	250 ppm	1	8	68	76	10,53	10,18
		2	8	72	80	10,00	
		3	8	72	80	10,00	



Gambar 5.3 Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak metanol vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan

Tabel V.3 Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan etoposida sebagai kontrol positif dan diinkubasi selama 24 jam

Nama Bahan	Konsentrasi	Replikasi	Jumlah Sel ($\times 10^4$)			% viabilitas sel	% viabilitas rata-rata
			Sel hidup	Sel mati	Sel total		
Kontrol Negatif	0	1	32	10	42	76,19	78,46
		2	35	8	43	81,41	
		3	35	10	45	77,78	
Larutan Etoposida	1	1	23	28	51	45,10	44,69
		2	22	29	51	43,14	
		3	22	26	48	45,83	
	10	1	12	39	51	23,53	26,72
		2	15	37	52	28,85	
		3	15	39	54	27,78	
	100	1	9	45	54	16,67	17,61
		2	10	42	52	19,23	
		3	11	54	65	16,92	



Gambar 5.4 Grafik hubungan antara konsentrasi larutan etoposida vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan

5.6. Analisis Data

5.6.1 Anava Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol

Data hasil pengamatan persen viabilitas dari ekstrak eter dan ekstrak metanol dianalisis dengan program SPSS *for Windows* menggunakan uji Anava satu arah. Hasil perhitungan tertera pada tabel berikut :

Tabel V.4 Analisis Varian satu arah data hasil penelitian uji aktivitas antikanker ekstrak eter *Marchantia cataractarum* Schiffn.

Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	db	Kuadrat rata-rata	F Hitung	Harga p
Perlakuan	18722,228	4	4680,557	556,156	0,000
Galat	84,159	10	8,416		
Total	18806,387	14			

($\alpha = 0,05$)

Tabel V.5 Analisis Varian satu arah data hasil penelitian uji aktivitas antikanker ekstrak metanol *Marchantia cataractarum* Schiffn.

Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	db	Kuadrat rata-rata	F Hitung	Harga p
Perlakuan	15846,921	4	3961,73	489,68	0,000
Galat	80,906	10	8,091		
Total	15927,828	14			

($\alpha = 0,05$)

Dari hasil analisis terhadap ekstrak eter dan ekstrak metanol pada tabel diatas diperoleh harga signifikan masing-masing lebih kecil dari 0,05. Dengan demikian H_0 ditolak dan H_a diterima yang berarti ada perbedaan bermakna minimal satu pasang hambatan pertumbuhan sel mieloma antar kelompok uji.

Selanjutnya untuk mengetahui kelompok larutan uji mana saja yang berbeda maka dilakukan uji LSD. Hasil yang diperoleh dengan uji LSD tertera pada tabel berikut :

Tabel V.6 Hasil analisis uji LSD ekstrak eter *Marchantia catarctarum* Schiffn.

Konsentrasi (ppm)	0	1,0	10,0	100,2	1002
0	-	7,2767*	28,3767*	72,3500*	88,8900*
1,0		-	21,1000*	65,0733*	81,6133*
10,0			-	43,9733*	60,5133*
100,2				-	16,5400*
1002					-

* Ada perbedaan bermakna

Tabel V.7 Hasil analisis uji LSD ekstrak metanol *Marchantia catarctarum* Schiffn.

Konsentrasi (ppm)	0	1	10	100	250
0	-	9,3267*	19,9967*	62,8733*	83,9533*
1		-	10,6700*	53,5467*	74,6267*
10			-	42,8767*	63,9567*
100				-	21,0800*
250					-

* Ada perbedaan bermakna

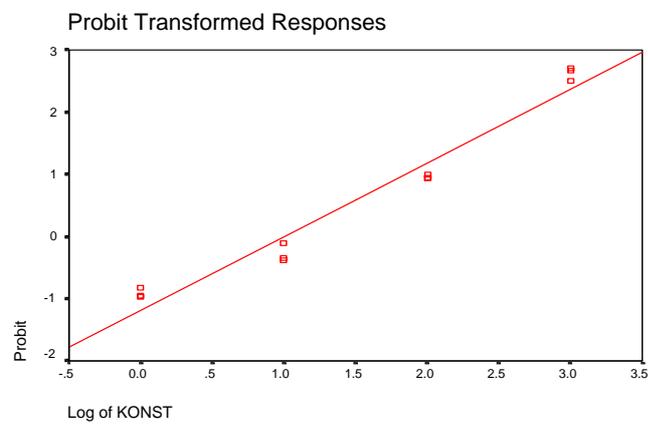
5.6.2 Analisis Probit Ekstrak Eter, Ekstrak Metanol dan Kontrol Positif

Melalui perhitungan dengan analisis Probit pada program SPSS *for Windows*, diperoleh harga LC_{50} dari ekstrak eter, ekstrak metanol dan kontrol

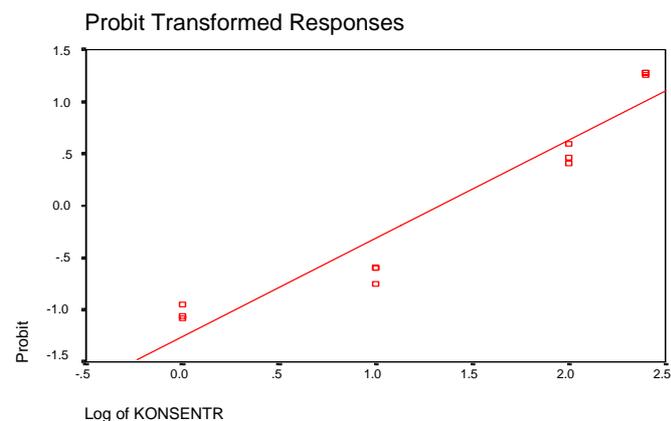
positif. Harga LC_{50} masing-masing ekstrak dan kontrol positif dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel V.8 Harga LC_{50} hasil analisis probit ekstrak eter, ekstrak metanol dan kontrol positif

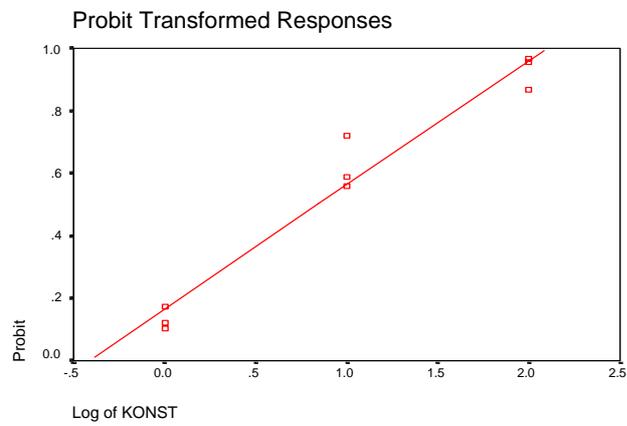
Nama Bahan	LC_{50} (ppm)
Ekstrak Eter	68,32
Ekstrak Metanol	92,24
Kontrol Positif	5,29



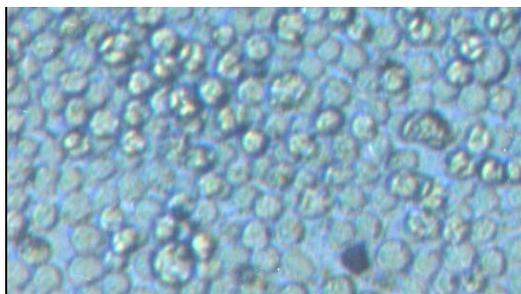
Gambar 5.5 Kurva probit log konsentrasi ekstrak eter *Marchantia catarctarum* Schiffn.



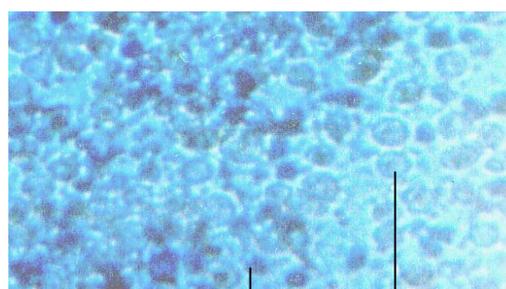
Gambar 5.6 Kurva probit log konsentrasi ekstrak methanol *Marchantia catarctarum* Schiffn.



Gambar 5.7 Kurva probit log konsentrasi etoposida (kontrol positif)



Gambar 5.8 Gambar sel mieloma mencit sebelum pewarnaan



Sel mati

Sel hidup

Gambar 5.9 Gambar sel mieloma mencit setelah pewarnaan dengan tripan biru

BAB VI

PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini uji aktivitas antikanker dilakukan dengan menggunakan metode viabilitas sel, yaitu dihitung persentase dari jumlah sel yang hidup dibandingkan dengan jumlah sel total. Adanya pemaparan bahan-bahan toksik terhadap sel dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan-bahan yang bersifat toksik inilah yang digunakan sebagai dasar dilakukannya uji sitotoksitas dan salah satunya dengan menggunakan metode *cell viability test* (Freshney, 1987).

Untuk membedakan antara sel yang masih hidup dengan sel yang telah mati dilakukan dengan menggunakan teknik penyerapan zat warna, yaitu menggunakan tripan biru. Sel yang mati bersifat permeabel terhadap zat warna tertentu sehingga dapat menyerap warna, sedangkan sel yang hidup bersifat impermeable dan tidak dapat menyerap warna. Zat warna lain yang dapat digunakan antara lain nigosin dan eritrosin (Freshney, 1987, Suntoro, 1983).

Pada penelitian ini tahap pertama yang dilakukan yaitu membuat ekstrak eter yang kemudian dilanjutkan dengan pembuatan ekstrak metanol dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia catartarum* Schiffn.). Tumbuhan lumut hati yang diperoleh dicuci bersih dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Pengeringan tidak dilakukan dibawah sinar matahari langsung melainkan cukup diangin-anginkan saja. Hal ini untuk menghindari rusaknya zat-zat yang terkandung dalam tumbuhan tersebut yang tidak stabil terhadap pemanasan. Jika bahan sudah cukup kering, bahan tersebut diserbuk hingga menjadi serbuk yang halus. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan menggunakan pelarut eter dan pelarut metanol dengan cara maserasi. Serbuk tanaman dimasukkan ke dalam bejana, ditambahkan eter hingga terendam seluruhnya, kemudian ditutup dan dibiarkan pada suhu kamar selama 2x24 jam sambil sesering mungkin diaduk. Kemudian disaring dengan penyaring Bochner dengan bantuan pompa vakum.. Ampas dimaserasi lagi beberapa kali dengan pelarut yang baru hingga filtrat jernih atau sampai filtrat memberikan reaksi negatif pada pelat KLT dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat = (4:1) dengan pemberian penampak noda

anisaldehid-asam sulfat pekat. Setelah itu residu dikeringkan untuk kemudian dilanjutkan proses maserasi dengan mengganti pelarut dengan metanol. Perlakuan yang sama dilakukan pada pelarut metanol.

Tujuan dari penggunaan pelarut yang berbeda adalah untuk menarik senyawa yang terkandung dalam tumbuhan yang berbeda tingkat kepolarannya. Senyawa yang bersifat non polar akan tertarik dalam pelarut eter sedangkan senyawa yang bersifat polar akan tertarik pada pelarut metanol.

Setelah pembuatan ekstrak, dilakukan identifikasi ekstrak untuk mengetahui kandungan kimia dari bahan uji tersebut. Metode yang digunakan untuk identifikasi ekstrak ini adalah KLT-Densitometri. Analisis KLT ekstrak eter dan ekstrak metanol ditotolkan pada 1 lempeng KLT. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 GF₂₅₄ dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4 : 1. Penampak noda yang digunakan adalah sinar UV dan anisaldehyd-asam sulfat pekat.

Pada ekstrak eter dengan penampak noda sinar UV didapatkan 2 noda dengan nilai Rf 0,63 dan 0,84. Hasil diatas dapat dilihat pada profil kromatogram ekstrak eter pada λ 254 nm yang menunjukkan adanya puncak pada jarak migrasi 50 mm dan 67 mm (lampiran 3). Sedangkan pada ekstrak metanol didapatkan 1 noda dengan nilai Rf 0,84. Profil kromatogram menunjukkan adanya puncak pada jarak migrasi 67 mm (lampiran 4).

Analisis KLT ekstrak eter dan ekstrak metanol dengan pemberian penampak noda anisaldehyd-asam sulfat didapatkan noda yang berwarna merah keunguan pada Rf 0,63. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak eter dan ekstrak metanol terdapat senyawa sterol karena jika dibandingkan dengan standar sterol yang diperoleh dari isolat lumut hati (*Marchantia geminata* Reinw.,Bl.,Ness) didapatkan nilai Rf yang sama. Profil kromatogram ekstrak eter dan ekstrak metanol setelah pemberian penampak noda anisaldehyd-asam sulfat pada λ 521 nm menunjukkan adanya puncak pada migrasi 50 mm (lampiran 5 dan 6). Namun profil kromatogram pada ekstrak eter terdapat 2 puncak lain yaitu pada jarak migrasi 35 mm dan 40 mm dimana pada ekstrak metanol tidak terdapat puncak tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kandungan kimia antara ekstrak eter dan ekstrak metanol.

Alasan pemilihan panjang gelombang pada 254 nm dan 521 nm adalah dikarenakan absorbansi maksimum terletak pada kedua panjang gelombang tersebut.

Pada identifikasi ini digunakan standar sterol, karena berdasarkan penelitian pendahuluan tentang kandungan lumut hati (*Weisnerella cf. denudate* (Miten) Steph.) yang telah dilakukan oleh Widyawaruyanti (1993) serta hasil penelitian yang dilakukan Sukardiman (2004) terhadap lumut hati (*Marchantia geminata* Reinw., Bl., Ness) didapatkan senyawa sterol didalam tumbuhan tersebut.

Penelitian *in vitro* menggunakan *cell lines* tumor manusia menunjukkan adanya efek penghambatan (inhibitor) dari β -sitosterol terhadap pertumbuhan sel tumor HT-29 (Awad, 2000). β -sitosterol merupakan salah satu dari 4 jenis senyawa sterol. Hal ini membuktikan bahwa senyawa sterol juga memiliki aktivitas antikanker.

Ekstrak yang didapat selanjutnya dibuat larutan uji, yaitu dengan cara melarutkan sejumlah ekstrak dalam media RPMI. Untuk membantu meningkatkan kelarutan ekstrak dalam media maka ditambahkan DMSO dengan konsentrasi akhir maksimum 10 % (Swanson dan Pezzuto, 1990). Konsentrasi larutan uji yang dibuat untuk ekstrak eter, yaitu 1,002 ppm; 10,02 ppm; 100,2 ppm dan 1002 ppm. Sedangkan untuk ekstrak metanol konsentrasi larutan uji yang dibuat yaitu 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 250 ppm. Konsentrasi larutan uji untuk ekstrak metanol tidak dibuat mencapai 1000 ppm seperti rancangan konsentrasi untuk ekstrak eter, hal ini dikarenakan pada konsentrasi 1000 ppm persen viabilitas yang didapat 0 % yang berarti ekstrak telah bersifat toksik pada konsentrasi tersebut sehingga konsentrasi diturunkan menjadi 500 ppm. Akan tetapi pada konsentrasi 500 ppm persen viabilitas yang didapat tetap 0 % sehingga konsentrasi diturunkan kembali menjadi 250 ppm.

Pembuatan larutan kontrol negatif dan kontrol positif dilakukan dengan perlakuan yang sama dengan saat pembuatan larutan uji. Kedua kontrol tersebut juga ditambahkan DMSO dengan kadar yang sama dengan larutan uji, yaitu konsentrasi akhir maksimum 10 %. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan variasi hasil akibat adanya perbedaan perlakuan antara larutan uji dengan larutan kontrol.

Larutan kontrol negatif dibuat dengan cara menambahkan 1 ml DMSO ke dalam media RPMI 9 ml. Sedangkan larutan kontrol positif dibuat dengan cara memipet 2,5 ml larutan injeksi etoposida (100 mg/5 ml), kemudian ditambah 1 ml DMSO dan ditambah media RPMI ad 10 ml. Fungsi kontrol negatif adalah untuk memastikan bahwa apabila terdapat aktivitas antikanker, maka hal tersebut tidak disebabkan oleh media dan bahan lain yang diberikan pada kultur. Sedangkan fungsi kontrol positif adalah untuk membuktikan bahwa cara kerja atau metode kerja yang dilakukan adalah benar.

Sel mieloma yang digunakan pada penelitian ini, yaitu sel mieloma mencit tipe P₃UI yang diperoleh dari Laboratorium Vaksin Mamalia Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Kultur sel mieloma merupakan salah satu jenis sel tumor hasil transformasi sel-sel pembentuk antibodi yang diambil dari jaringan limpha yang akhirnya menjadi malignant. Sel mieloma diperoleh dengan cara sentrifugasi sel dari penyimpanan, kemudian dibiakkan dalam media RPMI lalu disimpan dalam botol kultur dan diinkubasi di inkubator CO₂ (5% CO₂, 95% O₂) pada suhu 37°C. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C, karena suhu tersebut merupakan suhu yang optimal untuk pertumbuhan sel mieloma. Selain itu lingkungan sel mengandung 5% CO₂ karena CO₂ diperlukan sebagai dapar (bersama-sama dengan NaHCO₃ yang terdapat dalam media) untuk menjaga pH optimal pertumbuhan sel. Alasan penggunaan dapar bikarbonat, karena lebih rendah toksisitasnya terhadap sel, bersifat nutrisi pada sel serta harganya lebih murah. (Freshney, 1987).

Kultur sel dari sel tumor lebih membutuhkan media yang spesifik. Media yang digunakan pada percobaan ini adalah media RPMI 1640 karena media ini umum digunakan untuk kultur sel mieloma. Media RPMI 1640 mengandung campuran kompleks dari : karbohidrat, asam amino, garam-garam inorganik, dan vitamin. Untuk membantu pertumbuhan sel maka ke dalam media ditambahkan hormon dan faktor pertumbuhan yang terdapat dalam FBS (*Fetal Bovin Serum*), selain itu juga ditambahkan antibiotik, antara lain kanamycin 105 mg/L, streptomycin 150 mg/L, penicillin 101 mg/L. Penambahan antibiotik ini bertujuan untuk mengatasi adanya kontaminasi yang berasal dari media (selama penyimpanan media), sedangkan untuk mencegah kontaminasi selama proses perlakuan maka bekerja dilakukan dengan teknik aseptis. Kadar garam dalam

media adalah isotonik, hal ini untuk menjaga ketidakseimbangan osmotik. *Phenol red* yang terdapat dalam media berfungsi sebagai indikator adanya penurunan pH (karena kontaminasi bakteri). Media akan berwarna merah pada pH 7,4, menjadi oranye pada pH 7,0 dan kuning pada pH 6,5, sedikit merah keunguan pada pH 7,6 dan menjadi ungu pada pH 7,8. pH yang optimal untuk pertumbuhan sel mieloma adalah 7,2-7,4 (Freshney, 1987).

Hasil penelitian uji aktivitas antikanker menunjukkan persen viabilitas sel untuk ekstrak eter, ekstrak metanol dan etoposida sebagai kontrol positif semakin menurun dengan meningkatnya konsentrasi uji. Untuk ekstrak eter persen viabilitas rata-rata dari konsentrasi 1,002 ppm sampai 1002 ppm berturut-turut adalah 89,34%; 82,07%; 60,97%; 16,99%; 0,45%, sedangkan untuk ekstrak metanol persen viabilitas rata-rata dari konsentrasi 1 ppm sampai 250 ppm berturut-turut adalah 94,13%; 84,80%; 74,13%; 31,26% dan 10,18%. Harga persen viabilitas rata-rata larutan kontrol positif dari konsentrasi 1 ppm sampai 100 ppm berturut-turut adalah 78,46%; 44,69%; 26,72%; 17,61%.

Untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) terhadap viabilitas kultur sel mieloma mencit maka data hasil penelitian diolah dengan menggunakan uji anava satu arah. Dari hasil perhitungan diperoleh harga signifikansi untuk ekstrak eter dan ekstrak metanol keduanya = 0,000 yang berarti lebih kecil daripada harga $\alpha = 0,05$, sehingga menunjukkan adanya perbedaan bermakna minimal satu pasang hambatan pertumbuhan sel mieloma antar kelompok uji. Hal ini membuktikan bahwa ada pengaruh pemberian ekstrak eter dan ekstrak metanol terhadap aktivitas antikanker pada kultur sel mieloma mencit.

Selanjutnya untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan bermakna, maka dilakukan analisis statistik dengan uji LSD. Dari hasil analisis LSD didapatkan bahwa pada ekstrak eter dan ekstrak metanol ada perbedaan bermakna antar kelompok uji dengan kelompok kontrol negatif, sehingga membuktikan bahwa ada pengaruh pemberian ekstrak eter dan ekstrak metanol terhadap aktivitas antikanker pada kultur sel mieloma mencit. Selain itu juga ada perbedaan bermakna antar tiap kelompok uji itu sendiri. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ada hubungan antara kenaikan konsentrasi

larutan uji dengan semakin meningkatnya aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit.

Untuk mengetahui pada konsentrasi berapa larutan uji dapat membunuh 50 % populasi sel, maka dilakukan pengolahan data dengan menggunakan analisis probit. Hasil pengolahan diperoleh hasil LC_{50} untuk ekstrak eter adalah 68,32 ppm dan untuk ekstrak metanol diperoleh hasil LC_{50} 92,24 ppm. Harga LC_{50} untuk etoposida sebagai kontrol positif adalah 5,29 ppm.

Dari harga LC_{50} ekstrak eter dan ekstrak metanol dapat diketahui bahwa ekstrak eter dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) memiliki aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit tipe P₃UI lebih baik dibandingkan dengan ekstrak metanol sehingga ekstrak eter tersebut cukup potensial sebagai antikanker khususnya terhadap kultur sel mieloma mencit tipe P₃UI.

Selanjutnya perlu dilakukan penelitian dengan jenis sel kanker yang berbeda untuk mengetahui sensitifitas jenis sel kanker tertentu terhadap ekstrak eter. Selain itu untuk mengetahui pengaruh metabolisme dalam tubuh terhadap aktivitas antikanker dapat dilakukan uji aktivitas antikanker secara *in vivo*.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat ditarik kesimpulan :

1. Ekstrak eter dan ekstrak metanol dari tumbuhan lumut hati (*Marchantia cataractarum* Schiffn.) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit tipe P₃UI
2. Harga LC₅₀ masing-masing sebesar 68,32 ppm untuk ekstrak eter dan 92,24 ppm untuk ekstrak metanol .

7.2 Saran

Dari hasil penelitian ini masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang :

1. Uji aktivitas antikanker ekstrak eter lumut hati *Marchantia cataractarum* Schiffn pada jenis sel kanker yang lain seperti sel limfoma, sarkoma dan leukimia dan uji secara *in vivo*.
2. Isolasi kandungan aktif dari ekstrak eter lumut hati *Marchantia cataractarum* Schiffn.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J. E., C.M. and J.L. Mc Laughin, 1991. *Blind Comparison of simple Bench-top Bioassay and Human Tumor Cytotoxicities Antitumors Prescreens*, Phytochemical analysis, 2nd edition, p.107-111.
- Anonim, 1999, *Bryophytes*, <http://www.rook.org/earl/bwca/index.html>, 11 Oktober 2003.
- Anonim, 2004. *Etoposide (Systemic)*, <http://nim.nih.gov/medlineplus/druginfo/uspdi/202234.html>, 24 Januari 2004.
- Asakawa, Y., 1981. *Biologically Active Substances Obtained from Bryophytes*, Journ. Hattori Bot. Lab. No.50, p. 123-142.
- Asakawa, Y., Toyota, M., Bischler, H., Campbell, O., and Hattori, S., 1984. *Comparative Study of Chemical Constituents of Marchantia Species*, Journ. Hattori Bot. Lab. No.57, p. 383-389.
- Asakawa, Y., 1984. *Some Biologically Active Substance Isolated from Hepaticae : Terpenoids and Lipophilic Aromatic Compounds*, Journ. Hattori Bot. Lab. No.56, p. 215-219.
- Awad, A.B.; Fink, C.S., 2000. *Phytosterol as Anticancer Dietary Components : Evidence and Action*, <http://www.nutrition.org/cgi/content/full/130/9/2127>, 16 Mei 2004.
- Bangun, A., 1990. *Antibodi Monoklonal*, Karya Aksara, Jakarta, hal. 16-48.
- Dalimartha, S., 2003. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker*, Seri Agrisehat, Penebar Swadaya, Jakarta, hal 1-52.
- Freshney, I.R., 1987. *Culture of Animal Cell : A Manual Basic of Technique*, 2nd edition, Alan R. Liss inc., New York, p. 227-292.
- Hernawan, P., 2002. *Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Metanol Lumut Hati (Marchantia geminata Reinw., Bl., Nees) Terhadap Kultur Sel Mieloma Mencit Dengan Metode Viabilitas Sel*, Bagian Ilmu Bahan Alam, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Indrawati, R., Lazuardi, M., Ratna, S.M., 1999. *Pengkajian Hambat Pertumbuhan Sel Kanker Mieloma secara In Vitro antara Maserasi Benalu Duku dan Maserasi Benalu Teh dibandingkan dengan*

- Metotreksat*, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 8-9.
- Jaime, A.R. and Marcella Haun, 1999. *Cytotoxicity of trans-Dehydrocrotinin from Croton cajucara on V 79 Cells and Rat Hepatocytes*, in : *Planta Medica*, vol 65, p. 522.
- Krosnick,S., Indoe, K.E., 2004, *What is a Bryophyte Anyway?*, <http://www.nybg.org/bsci/hcol/bryo/bryogen.html>, 12 Januari 2004.
- Katzung, B.G., 1995. *Basic and Clinical Pharmacology*, 7th edition, Prentice Hall International, p. 881.
- Ma'at, S., 1999, *Obat antikanker berasal dari tumbuhan dan cara-cara pengujiannya*, Surabaya : Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Nafrialdi, Ganiswara, 1995, *Farmakologi dan Terapi*, edisi 4, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal. 686–701.
- National Institutes of Health, 2004, *Cancer Overview*, <http://portofoloi.mvm.ed.ac.uk/studentwebs/session2/group/cancer.html>, 11 Desember 2004.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 1995. *Pharmacology*, 3rd edition, Churchill Livingstone, Newyork and Tokyo, p. 696–713.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. *Kimia Medisinal*, edisi kedua, Airlangga University Press, Surabaya, hal. 163–183.
- Siswandono, 1983, *Mekanisme Obat-obat Antikanker*, Buletin ISFI Jatim, Tahun x, nomor 1-2, hal 696-697.
- Spector, W.G., 1989. *An Introduction to General Pathology*, 3rd edition, Churchill Livingstone, Newyork, p. 278.
- Sukardiman, 2001, *Potensi dan Mekanisme Antikanker Senyawa Andrografolid dari Herba Sambiloto (Andrographis paniculata Ness.) secara in vitro dan in vivo*, Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Sukardiman, 1997, *Uji Sitotoksik dan Identifikasi Isolat Murni Daun Benalu (Dendrophoe petandra L.(MIQ)) yang Tumbuh pada PohonKedawung (Parkia bioglobosa)*, Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.

- Sontoro, H., 1983. *Metode Pewarnaan :Histology dan Histokimia*, Jakarta : Brata Karya Aksara, hal 80-88.
- Swanson, S.M; Pezzuto, J.M, 1990.*Bioscreening Technique for Cytotoxic Potential and Ability to Inhibit Macromolecule Biosynthesis*, in : Thompson, E.B., Drug Bioscreening : Drug Elevation Technique I Pharmacology, VCH Publisher Inc., New York, p. 273-295.
- Teva Pharmaceutical Europe, 2004. *Etoposide*, <http://www.tevaeuoncology.com/products/index.cfm>, 24 Januari 2004.
- Tjitrosoepomo, G., 1986. *Taksonomi Tumbuhan (Taksonomi Khusus)*, Bhratara Karya Aksara, Jakarta. hal. 168–176.
- Widyawaruyanti, A., 1994. *Studi Pendahuluan Kandungan Kimia dari Lumut Hati (Hepaticae)*, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, hal.1-26.
- Wilson, A.P., 1988. *Cytotoxicity and Viability Assay Animal Cell Culture*, A Practical Approach, Washington, IRL Press, p. 183-215.
- Under wood, J.C.E., 1999. *Patology Umum dan Sistemik*, edisi kedua, Jakarta : Kedokteran EGC, hal.258-304.

LAMPIRAN 1**Komposisi Media RPMI 1640 (mg/L)**

(1) Asam amino, antara lain :

(1) L-arginine (free base)	200	(11) L-leucine	50
(2) L-asparagine	50	(12) L-lysine HCl	40
(3) L-aspartic acid	20	(13) L-methionine	15
(4) L-cystine	50	(14) L-phenylalanine	15
(5) L-glutamic acid	20	(15) L-proline	20
(6) L-glutamine	300	(16) L-serine	30
(7) Glycine	10	(17) L-threonine	20
(8) L-histidine (free base)	15	(18) L-tryptophan	5
(9) L-hidroxy-proline	20	(19) L-tyrosine	20
(10) L-isoleucine	50	(20) L-valine	20

(2) Vitamin, antara lain :

(1) Biotine	0,200	(7) Riboflavin	0,20
(2) D-Ca pantothenate	0,250	(8) Thiamin HCl	1,00
(3) Choline chloride	3,00	(9) Vitamin B ₁₂	0,005
(4) Folic acid	1,00	(10) Pyridoxine HCl	1,00
(5) i-inositol	35,00	(11) P-aminobenzoic acid	1,00
(6) Nicotinamide	1,00		

(3) Garam-garam anorganik, antara lain :

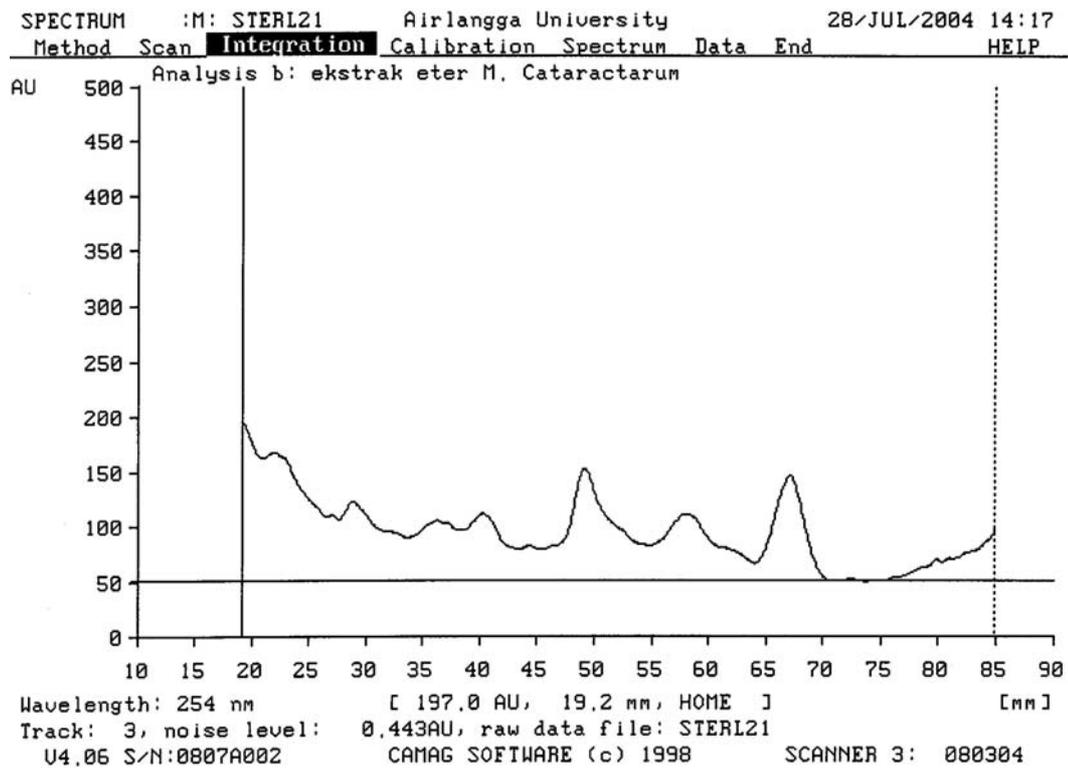
(1) KCl	400	(4) NaHCO ₃	2.200
(2) MgSO ₄ . 7H ₂ O	100	(5) Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	1,512
(3) NaCl	6.000	(6) CaNO ₃ . 4H ₂ O	100

(4) Komponen lain, antara lain :

(1) D-glucose	2,000
(2) Phenol red	5,00
(3) Gluthatione (reduced)	1,00
(4) CO ₂ (gas phase)	5 %

Lampiran 3

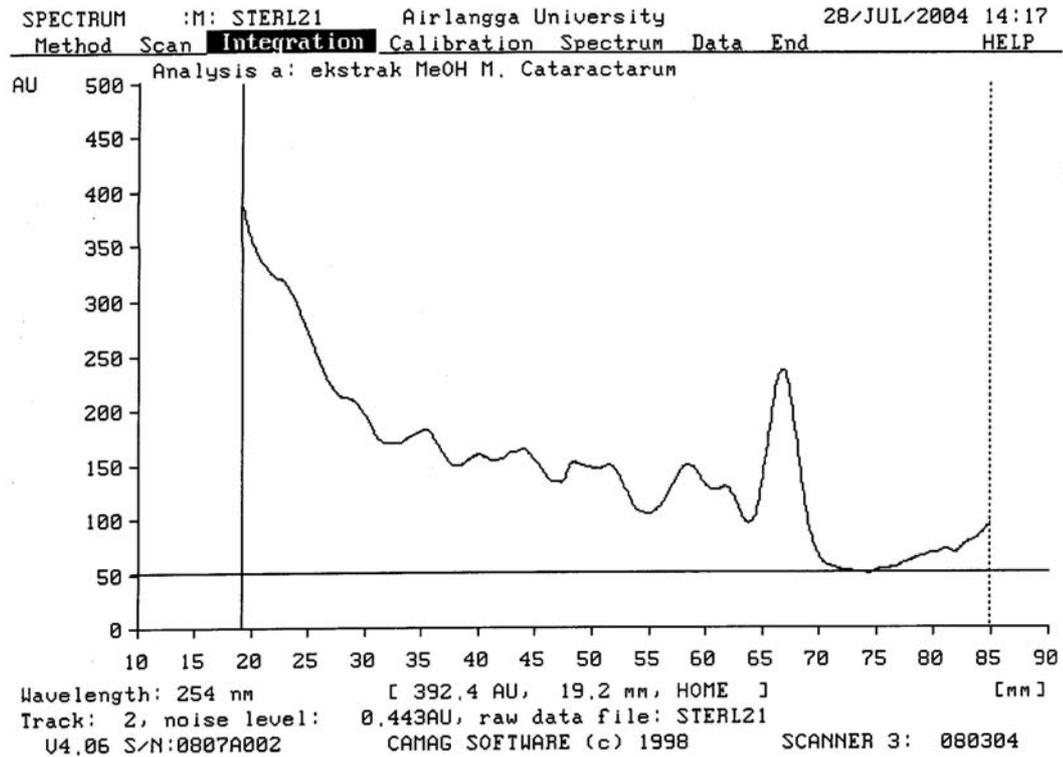
Profil Kandungan Kimia Ekstrak Eter *Marchantia cataractarum* Schiffn dengan KLT-densitometri pada λ 254 nm



Fase diam : silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : n-heksana : etil asetat (4 : 1)
 Penampak noda : sinar UV

Lampiran 4

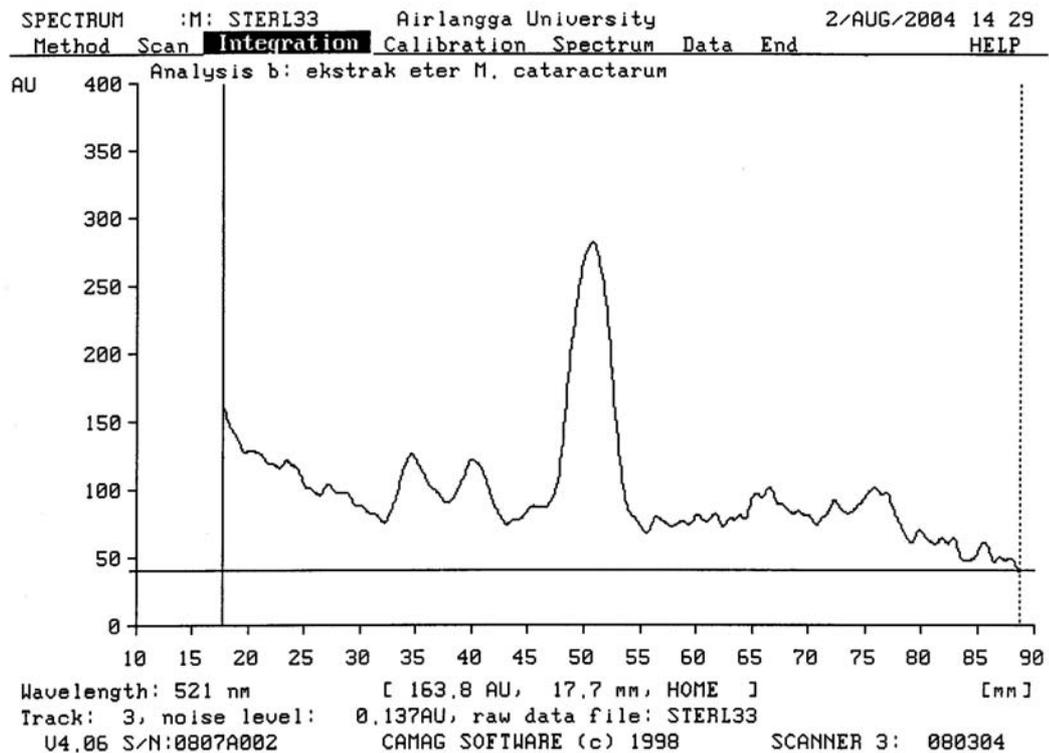
Profil Kandungan Kimia Ekstrak Metanol *Marchantia cataractarum* Schiffn dengan KLT-densitometri pada λ 254 nm



Fase diam : silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : n-heksana : etil asetat (4 : 1)
 Penampak noda : sinar UV

Lampiran 5

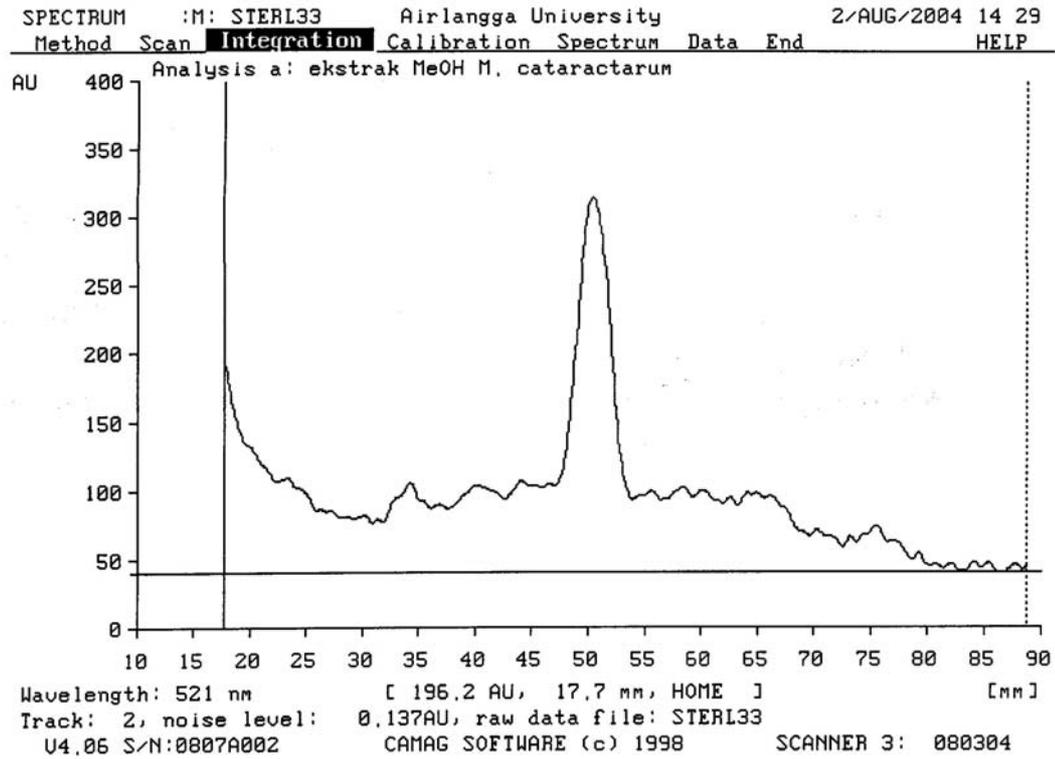
Profil Kandungan Kimia Ekstrak Eter *Marchantia cataractarum* Schiffn dengan KLT-densitometri pada λ 521 nm



Fase diam : silika gel GF₂₅₄
 Fase gerak : n-heksana : etil asetat (4 : 1)
 Penampak noda : anisaldehyd-asam sulfat

Lampiran 6

Profil Kandungan Kimia Ekstrak Metanol *Marchantia cataractarum* Schiffn dengan KLT-densitometri pada λ 521 nm



- Fase diam : silika gel GF₂₅₄
- Fase gerak : n-heksana : etil asetat (4 : 1)
- Penampak noda : anisaldehyd-asam sulfat

Lampiran 7. Analisis Varian Satu Arah Ekstrak Eter

Oneway

Descriptives

VIAB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
,00	3	89,3433	2,18980	1,26428	83,9036	94,7831	87,54	91,78
1,00	3	82,0667	2,24487	1,29608	76,4901	87,6432	79,49	83,60
10,02	3	60,9667	5,62703	3,24877	46,9884	74,9450	54,55	65,06
100,20	3	16,9933	,74849	,43214	15,1340	18,8527	16,13	17,46
1002,00	3	,4533	,14572	,08413	,0914	,8153	,35	,62
Total	15	49,9647	36,65124	9,46331	29,6679	70,2614	,35	91,78

ANOVA

VIAB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18722,23	4	4680,557	556,156	,000
Within Groups	84,159	10	8,416		
Total	18806,39	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VIAB

LSD

(I) KONS	(J) KONS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
,00	1,00	7,2767*	2,36867	,012	1,9989	12,5544
	10,02	28,3767*	2,36867	,000	23,0989	33,6544
	100,20	72,3500*	2,36867	,000	67,0723	77,6277
	1002,00	88,8900*	2,36867	,000	83,6123	94,1677
1,00	,00	-7,2767*	2,36867	,012	-12,5544	-1,9989
	10,02	21,1000*	2,36867	,000	15,8223	26,3777
	100,20	65,0733*	2,36867	,000	59,7956	70,3511
	1002,00	81,6133*	2,36867	,000	76,3356	86,8911
10,02	,00	-28,3767*	2,36867	,000	-33,6544	-23,0989
	1,00	-21,1000*	2,36867	,000	-26,3777	-15,8223
	100,20	43,9733*	2,36867	,000	38,6956	49,2511
	1002,00	60,5133*	2,36867	,000	55,2356	65,7911
100,20	,00	-72,3500*	2,36867	,000	-77,6277	-67,0723
	1,00	-65,0733*	2,36867	,000	-70,3511	-59,7956
	10,02	-43,9733*	2,36867	,000	-49,2511	-38,6956
	1002,00	16,5400*	2,36867	,000	11,2623	21,8177
1002,00	,00	-88,8900*	2,36867	,000	-94,1677	-83,6123
	1,00	-81,6133*	2,36867	,000	-86,8911	-76,3356
	10,02	-60,5133*	2,36867	,000	-65,7911	-55,2356
	100,20	-16,5400*	2,36867	,000	-21,8177	-11,2623

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 8. Analisis Varian Satu Arah Ekstrak Metanol

Oneway

Descriptives

VIAB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
,00	3	94,1300	4,12229	2,38001	83,8897	104,3703	91,74	98,89
1,00	3	84,8033	1,72862	,99802	80,5092	89,0975	82,83	86,05
10,00	3	74,1333	2,91564	1,68334	66,8905	81,3762	72,44	77,50
100,00	3	31,2567	3,44634	1,98974	22,6955	39,8178	27,42	34,09
250,00	3	10,1767	,30600	,17667	9,4165	10,9368	10,00	10,53
Total	15	58,9000	33,72984	8,70901	40,2210	77,5790	10,00	98,89

ANOVA

VIAB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15846,92	4	3961,730	489,668	,000
Within Groups	80,906	10	8,091		
Total	15927,83	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VIAB

LSD

(I) KONS	(J) KONS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
,00	1,00	9,3267*	2,32245	,002	4,1519	14,5014
	10,00	19,9967*	2,32245	,000	14,8219	25,1714
	100,00	62,8733*	2,32245	,000	57,6986	68,0481
	250,00	83,9533*	2,32245	,000	78,7786	89,1281
1,00	,00	-9,3267*	2,32245	,002	-14,5014	-4,1519
	10,00	10,6700*	2,32245	,001	5,4953	15,8447
	100,00	53,5467*	2,32245	,000	48,3719	58,7214
	250,00	74,6267*	2,32245	,000	69,4519	79,8014
10,00	,00	-19,9967*	2,32245	,000	-25,1714	-14,8219
	1,00	-10,6700*	2,32245	,001	-15,8447	-5,4953
	100,00	42,8767*	2,32245	,000	37,7019	48,0514
	250,00	63,9567*	2,32245	,000	58,7819	69,1314
100,00	,00	-62,8733*	2,32245	,000	-68,0481	-57,6986
	1,00	-53,5467*	2,32245	,000	-58,7214	-48,3719
	10,00	-42,8767*	2,32245	,000	-48,0514	-37,7019
	250,00	21,0800*	2,32245	,000	15,9053	26,2547
250,00	,00	-83,9533*	2,32245	,000	-89,1281	-78,7786
	1,00	-74,6267*	2,32245	,000	-79,8014	-69,4519
	10,00	-63,9567*	2,32245	,000	-69,1314	-58,7819
	100,00	-21,0800*	2,32245	,000	-26,2547	-15,9053

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 9. Analisis Probit Ekstrak Eter

***** PROBIT ANALYSIS *****
 DATA Information

15 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 3 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 13 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONST	-.00845	.00062	-13.57712

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.58797	.04330	13.57892

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 1.414E+13 DF = 13 P = .000

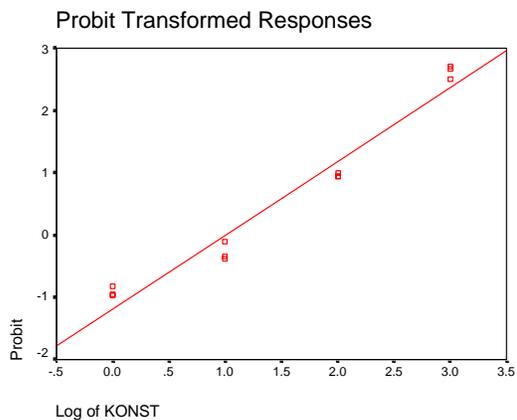
Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

KONST	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	100.0	91.8	72.173	19.607	.72173
.00	100.0	88.7	72.173	16.537	.72173
.00	100.0	87.5	72.173	15.367	.72173
1.02	100.0	83.6	71.882	11.718	.71882
1.02	100.0	83.1	71.882	11.228	.71882
1.02	100.0	79.5	71.882	7.608	.71882
10.20	100.0	65.1	69.207	-4.147	.69207
10.20	100.0	63.3	69.207	-5.917	.69207
10.20	100.0	54.6	69.207	-14.657	.69207
102.00	100.0	17.5	39.190	-21.730	.39190
102.00	100.0	17.4	39.190	-21.800	.39190
102.00	100.0	16.1	39.190	-23.060	.39190
1020.00	100.0	.6	4.6612E-14	.620	4.7E-16
1020.00	100.0	.4	4.6612E-14	.390	4.7E-16
1020.00	100.0	.4	4.6612E-14	.350	4.7E-16

Confidence Limits for Effective KONST

Prob	KONST	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	344.71263	.	.
.02	312.46900	.	.
.03	292.01146	.	.
.04	276.62205	.	.
.05	264.10395	.	.
.06	253.44908	.	.
.07	244.10684	.	.
.08	235.74198	.	.
.09	228.13448	.	.
.10	221.13176	.	.
.15	192.13862	.	.
.20	169.09580	.	.
.25	149.32711	.	.
.30	131.57422	.	.
.35	115.12352	.	.
.40	99.51341	.	.
.45	84.41045	.	.
.50	69.54694	.	.
.55	54.68343	.	.
.60	39.58047	.	.
.65	23.97037	.	.
.70	7.51966	.	.
.75	-10.23323	.	.
.80	-30.00192	.	.
.85	-53.04474	.	.
.90	-82.03787	.	.
.91	-89.04059	.	.
.92	-96.64810	.	.
.93	-105.01296	.	.
.94	-114.35519	.	.
.95	-125.01006	.	.
.96	-137.52816	.	.
.97	-152.91758	.	.
.98	-173.37512	.	.
.99	-205.61874	.	.



Lampiran 10. Analisis Probit Ekstrak Metanol

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

DATA Information

15 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 3 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 12 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONST	-.01021	.00047	-21.61855

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.94182	.04751	19.82254

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 82.758 DF = 13 P = .000

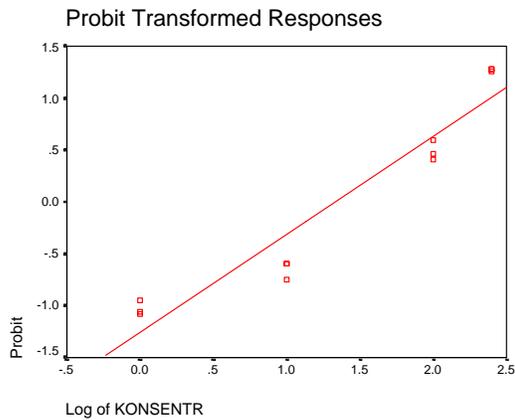
Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

KONST	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	100.0	91.8	82.686	9.074	.82686
.00	100.0	98.9	82.686	16.204	.82686
.00	100.0	91.7	82.686	9.054	.82686
1.00	100.0	85.5	82.423	3.107	.82423
1.00	100.0	86.1	82.423	3.627	.82423
1.00	100.0	82.8	82.423	.407	.82423
10.00	100.0	72.5	79.947	-7.487	.79947
10.00	100.0	77.5	79.947	-2.447	.79947
10.00	100.0	72.4	79.947	-7.507	.79947
100.00	100.0	32.3	46.842	-14.582	.46842
100.00	100.0	34.1	46.842	-12.752	.46842
100.00	100.0	27.4	46.842	-19.422	.46842
250.00	100.0	10.5	5.361	5.169	.05361
250.00	100.0	10.0	5.361	4.639	.05361
250.00	100.0	10.0	5.361	4.639	.05361

Confidence Limits for Effective KONST

Prob	KONST	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	320.07829	264.48890	411.05048
.02	293.38049	242.82918	375.68964
.03	276.44159	229.04718	353.29392
.04	263.69912	218.65431	336.47171
.05	253.33410	210.18168	322.80696
.06	244.51184	202.95487	311.19139
.07	236.77644	196.60533	301.01985
.08	229.85032	190.90855	291.92397
.09	223.55129	185.71710	283.66209
.10	217.75302	180.92871	276.06667
.15	193.74663	160.98452	244.73855
.20	174.66712	144.95479	220.01868
.25	158.29859	131.02609	198.98786
.30	143.59915	118.32965	180.28956
.35	129.97793	106.35450	163.17282
.40	117.05272	94.74876	147.17319
.45	104.54743	83.23391	131.97953
.50	92.24041	71.56002	117.36836
.55	79.93339	59.47836	103.16495
.60	67.42810	46.72150	89.21330
.65	54.50289	32.98425	75.34518
.70	40.88167	17.89548	61.34205
.75	26.18223	.96025	46.88255
.80	9.81370	-18.57188	31.45515
.85	-9.26581	-42.03081	14.16448
.90	-33.27220	-72.28879	-6.84984
.91	-39.07047	-79.68737	-11.83507
.92	-45.36950	-87.75647	-17.21930
.93	-52.29563	-96.66262	-23.10581
.94	-60.03102	-106.64619	-29.64332
.95	-68.85328	-118.07379	-37.05811
.96	-79.21830	-131.54791	-45.72136
.97	-91.96077	-148.17242	-56.31193
.98	-108.89967	-170.35450	-70.30758
.99	-135.59747	-205.46149	-92.22114



Lampiran 11. Analisis Probit Etposida (Kontrol Positif)

***** PROBIT ANALYSIS *****

DATA Information

12 unweighted cases accepted.
 0 cases rejected because of missing data.
 3 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 6 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONST	-.01064	.00099	-10.71770

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.05635	.04356	1.29367

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 145.691 DF = 10 P = .000

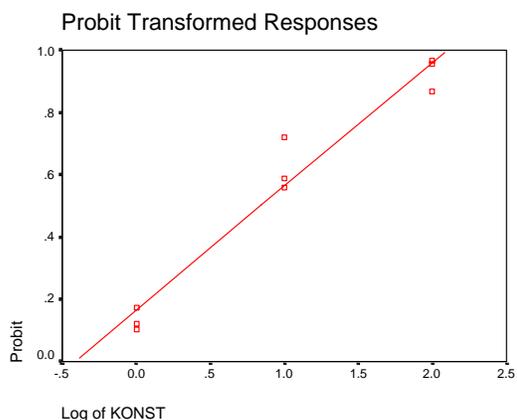
Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

KONST	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	100.0	76.2	52.247	23.943	.52247
.00	100.0	81.4	52.247	29.163	.52247
.00	100.0	77.8	52.247	25.533	.52247
1.00	100.0	45.1	51.823	-6.723	.51823
1.00	100.0	43.1	51.823	-8.683	.51823
1.00	100.0	45.8	51.823	-5.993	.51823
10.00	100.0	23.5	48.003	-24.473	.48003
10.00	100.0	28.9	48.003	-19.153	.48003
10.00	100.0	27.8	48.003	-20.223	.48003
100.00	100.0	16.7	15.673	.997	.15673
100.00	100.0	19.2	15.673	3.557	.15673
100.00	100.0	16.9	15.673	1.247	.15673

Confidence Limits for Effective KONST

Prob	KONST	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	223.86922	131.70021	1002.73705
.02	198.25685	117.01251	879.10278
.03	182.00662	107.62701	800.72743
.04	169.78221	100.52036	741.81500
.05	159.83859	94.70236	693.93158
.06	151.37502	89.71791	653.20769
.07	143.95411	85.31797	617.53035
.08	137.30958	81.35050	585.61340
.09	131.26664	77.71537	556.61309
.10	125.70411	74.34279	529.94469
.15	102.67373	60.00118	419.90861
.20	84.36992	47.87181	333.18653
.25	68.66687	36.41079	259.84182
.30	54.56506	24.36230	195.73213
.35	41.49762	9.87349	139.64905
.40	29.09790	-10.57551	93.13222
.45	17.10103	-41.71766	59.48416
.50	5.29437	-84.02659	38.03009
.55	-6.51230	-133.41951	23.66003
.60	-18.50917	-187.08986	12.54016
.65	-30.90889	-244.34544	2.82991
.70	-43.97632	-305.70573	-6.38169
.75	-58.07814	-372.57896	-15.66664
.80	-73.78118	-447.51409	-25.53724
.85	-92.08500	-535.23409	-36.66869
.90	-115.11538	-645.94846	-50.33201
.91	-120.67791	-672.72832	-53.59313
.92	-126.72085	-701.83429	-57.12260
.93	-133.36538	-733.85201	-60.98930
.94	-140.78628	-769.62618	-65.29241
.95	-149.24986	-810.44408	-70.18286
.96	-159.19348	-858.42006	-75.90830
.97	-171.41789	-917.42569	-82.92174
.98	-187.66812	-995.89873	-92.20956
.99	-213.28049	-1119.64519	-106.78506



Lampiran 12

Determinasi Tanaman



Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

(Indonesian Institute of Sciences)

PUSAT PENELITIAN BIOLOGI

(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16002, Indonesia P.O Box 208 Bogor
Telp. (0251) 321038 - 321041 Fax. 325854

Bogor, 6 Juni 2002

Nomor : 310 /IPH.1.02/If.8/2002
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Sdr. **Drs. Sukardiman, Apt., MS.**
 Jur. Farmasi Univ. Airlangga
 SURABAYA

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol./ Nama daerah	Jenis	Suku
1	Tengger 1	<i>Marchantia geminata</i> Reinw., Bl., Nees	Marchantiaceae
2	Tengger 2	<i>Marchantia</i> cf. <i>treubii</i> Schiffner	Marchantiaceae
3	Tengger 3	<i>Marchantia geminata</i> Reinw., Bl., Nees	Marchantiaceae
4	Tengger 4	<i>Marchantia</i> sp.	Marchantiaceae
5	Tengger 5	<i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.	Marchantiaceae
6	Tengger 6	<i>Marchantia</i> sp.	Marchantiaceae
7	Tengger 7	<i>Marchantia polymorpha</i> L.	Marchantiaceae
8	Tengger 8	<i>Marchantia nitida</i> Lehn. et. Lindenb.	Marchantiaceae
9	Tengger 9	<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.	Marchantiaceae

Demikian, semoga berguna bagi saudara.

a.n. Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

 Warsita Mahyar
 LIPI 320003382