

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN KEMBANG
BULAN (*Tithonia diversifolia*) TERHADAP LIMBAL
MESENCHYMAL STEM CELL KELINCI
DENGAN METODE MTT ASSAY**



KKC
KH. 231/19
Zah
u

Oleh:

VIDA SEANITA ZAHRO
NIM. 061511133037

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN KEMBANG BULAN (*Tithonia diversifolia*) TERHADAP LIMBAL MESENCHYMAL STEM CELL
KELINCI DENGAN METODE MTT ASSAY**

Skripsi
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh:

VIDA SEANITA ZAHRO
NIM. 061511133037



Menyetujui
Komisi Pembimbing,

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'N' followed by a cursive flourish.

(Dr. Nurdianto Triakoso MP.,drh.)
Pembimbing Serta

A handwritten signature in black ink, featuring a stylized 'H' and 'P' followed by a cursive flourish.

(Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.)
Pembimbing Utama

PERNYATAAN

Dengan ini saya mengatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN KEMBANG BULAN (*Tithonia diversifolia*) TERHADAP LIMBAL MESENCHYMAL STEM CELL KELINCI DENGAN METODE MTT ASSAY

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.



Surabaya, 30 Juli 2019



[Signature]
Vida Seanita Zahro
NIM. 061511133037

Telah dinilai pada Seminar Hasil

Tanggal : 22 Juli 2019

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH.
Sekertaris : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
Anggota : Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si.
Pembimbing Utama : Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.
Pembimbing Serta : Dr. NUSDianto Triakoso MP., drh.

Telah diuji pada

Tanggal: 30 Juli 2019

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH.

Anggota : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.

Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si.

Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.

Dr. Nurdianto Triakoso MP., drh.

Surabaya, 30 Juli 2019

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes.

NIP. 19560105 198601 1 001

RINGKASAN

Vida Seanita Zahro. “Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap Limbal Mesenchymal Stem Cell Kelinci dengan Metode MTT Assay.” Penelitian ini dilakukan dibawah bimbingan Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes selaku pembimbing utama, Dr.Nusdianto Triakoso MP., drh selaku pembimbing serta dan Dr. Mustofa Helmi Effendi, DTAPH., drh selaku dosen pemilik penelitian.

Daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) merupakan tanaman yang dikenal dengan sebutan “daun insulin”. Daun insulin telah turun temurun digunakan untuk menyembuhkan konstipasi, sakit perut, penyakit hepar, anti malaria, anti inflamasi, analgesik, antibiotik, anti mikroba dan lain-lain. Daun Kembang bulan berkhasiat sebagai obat diabetes, malaria dan penyakit infeksi lainnya. senyawa metabolit sekunder di antaranya tanin, alkaloid, steroid, terpenoid, dan fenol serta mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol yang terdapat pada bagian daun, kulit batang dan akar tumbuhan daun Kembang bulan. Ekstrak daun Kembang bulan yang mengandung flavonoid merupakan senyawa aktif bahan alam yang telah diteliti memiliki aktivitas antihiperglikemik sebagai obat diabetes. Senyawa toksis dalam ekstrak daun Kembang bulan yang diduga bertanggung jawab menimbulkan efek toksis adalah *sesquiterpene lactones* dan turunan asam klorogenik. Sesquiterpene lactones merupakan senyawa melimpah hasil metabolit sekunder tanaman yang merupakan bagian besar dari kelompok terpenoid. Senyawa ini ditemukan terutama pada family *asteraceae* diantaranya

Tithonia diversifolia. Mekanisme toksis senyawa ini disebabkan mayoritas *sesquiterpene lactones* menyebabkan menipisnya *glutathione* dan alkilasi protein, menghasilkan peningkatan stres oksidatif dan perubahan fungsional protein teralkilasi. Khasiat dan efek sitotoksitas yang dimiliki daun Kembang bulan banyak mendorong pengembangannya menjadi obat herbal terstandart (OHT) dan obat fitofarmaka agar terjamin khasiat dan keamanannya.

Mesenchymal Stem Cell merupakan salah satu sel yang sedang dikembangkan untuk dimanfaatkan sebagai salah satu sumber alternatif terapi sel, terutama pada beberapa penyakit degeneratif. Potensi *Mesenchymal Stem Cell* yang bersifat *multipotent*, yaitu dapat berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel, seperti osteosit, kondrosit, adiposit. *Mesenchymal Stem Cell* dapat berdiferensiasi menjadi sel syaraf, kardiomyosit, hepatosit, dan sel islet pankreas. *Mesenchymal Stem Cell* dapat diisolasi dari berbagai jaringan dewasa, seperti sumsum tulang, darah tepi dan cairan amnion, meskipun dalam jumlah sel terbatas .

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) memiliki efek sitotoksitas terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci. *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci diperoleh dari koleksi sel milik Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell Universitas Airlangga yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan (kontrol media, kontrol sel, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%) dengan masing-masing 6 kali pengulangan.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell Universitas Airlangga selama 2 hari. Sel yang telah siap

diberikan perlakuan, dibagikan ke tiap 36 *well*. Kelompok kontrol sel berisi *Limbal Mesenchymal Stem Cell* dan media *eagle*, kelompok kontrol media hanya berisi media *eagle*, dan kelompok berisi *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci yang diberi ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625% yang kemudian diinkubasi selama 24 jam di inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C.

Sel yang dipapar ekstrak daun Kembang bulan selama 24 jam, kemudian dihitung viabilitas selnya menggunakan metode *MTT Assay*. Enzim *dehidrogenase* dari mitokondria *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci yang masih hidup akan mereduksi garam MTT yang berwarna kuning menjadi garam formazan yang berwarna biru-ungu yang dikuantifikasi dengan spektrofotometer yang disebut *ELISA reader* dengan panjang gelombang 595nm, hingga didapat hasil berupa densitas optis (OD). Nilai *Optical Density* (OD) yang dapat digunakan untuk menghitung presentase kehidupan sel pada tiap perlakuan. Data-data yang telah terkumpul kemudian dianalisis menggunakan One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test*, nilai LC₅₀ dianalisa menggunakan program SPSS versi 21 *for windows*.

Berdasarkan hasil pengamatan pada uji sitotoksitas ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi 0,5%, 0,25%, 0,125%, dan 0,0625% yang dikontakkan langsung dengan *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci yang kemudian diinkubasi 24 jam, menunjukkan presentase sel hidup yang berbeda pada setiap perlakuannya.

Hasil penelitian yang didapat dari pemberian konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci menggunakan MTT Assay pada konsentrasi 0,0625% menunjukkan jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci yang hidup sebesar 50%, pada konsentrasi 0,125% menunjukkan jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup sebesar 33%, pada konsentrasi 0,25% menunjukan jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup sebesar 29%, dan pada konsentrasi 0,5% menunjukan jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup sebesar 14%. Hasil pengamatan yang didapat menunjukan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan, maka semakin rendah jumlah presentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup, yang berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan, maka semakin tinggi pula efek sitotoksisitas terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci, sehingga pada konsentrasi terendah 0,0625% menghasilkan viabilitas sel tertinggi, sedangkan ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi 0,5% menghasilkan viabilitas sel terendah. Nilai LC_{50} ekstrak daun Kembang bulan terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci terletak pada konsentrasi 0,059%.

CITOTOXICITY TEST OF KEMBANG BULAN LEAF EXTRACT (*Tithonia diversifolia*) ON LIMBAL MESENCHYMAL STEM CELL OF RABBITS USING MTT ASSAY METHOD

VIDA SEANITA ZAHRO



ABSTRACT

Kembang bulan leaf extract (*Tithonia diversifolia*) is known as a herbal plant which have many utilities to cure disease, such as : diabetic, malaria, and other infection. Instead of many usefulness of this plant, *Tithonia diversifolia* have main biological properties which may induce toxicity of this plant known as sesquiterpene lactones. Aim of this study was to identify the cytotoxicity effect of Kembang bulan leaf extract (*Tithonia diversifolia*) on limbal mesenchymal stem cell of rabbits using MTT Assay. Sample of this research using limbal mesenchymal stem cell of rabbits. Kembang bulan leaf extract (*Tithonia diversifolia*) divide into 4 concentration (0,5%, 0,25%, 0,125%, and 0,0625%) and given to limbal mesenchymal stem cell of rabbits in 96 well and would be incubated for 24 hours. The citotoxicity result was obtained using MTT Assay method. Every well would be observed to see cell life level of each concentration. The optical density absorbancy calculated using ELISA reader. Kembang bulan leaf extract with concentration of 0,0625% has the biggest viability with level of existence of limbal mesenchymal stem cell 50% and the others Kembang bulan leaf concentration 0,5%, 0,25%, and 0,125% have less than 50% level of existence limbal mesenchymal stem cell.

Keywords : *Tithonia diversifolia*, MTT Assay, cytotoxicity, limbal mesenchymal stem cell

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Uji Sitotoksisitas Ekstrak Daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Limbal Mesenchymal Stem Cell Kelinci dengan Metode MTT Assay.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan skripsi ini, antara lain:

Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.kes. selaku pembimbing utama dan Dr. Nusdianto Triakoso MP., drh. selaku dosen pembimbing serta atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Dr. Mustofa Helmi Effendi, drh., DTAPH. selaku ketua penguji, Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. selaku sekretaris penguji dan Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si. selaku anggota penguji atas segala saran, koreksi dan arahan yang telah diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc selaku dosen wali yang memberikan bimbingan selama menempuh kegiatan perkuliahan dan memberikan

masukannya yang bermanfaat bagi penulis selama menempuh S1 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh staf pengajar dan laboran Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Terima kasih yang terdalem kepada kedua orang tua penulis. Bapak Saji S.Pd, M.Si dan Ibu Sriani atas kasih sayang dan doanya. Terima kasih kepada Rio Arufianto S.E. yang bersedia membantu penulis selama proses penulisan skripsi dan seluruh keluarga besar yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu atas doa, kasih sayang, cinta, perhatian, motivasi, dan semangatnya.

Teman-teman penelitian Agesti, Niken, Aji, terimakasih atas semangat dan kerjasamanya. Sahabat saya, Lucky Dwi Andini, Brian Ratno, Andita Nurma, Aden Kusuma, Amalia, Warda terimakasih menjadi hari hariku lebih baik. Seluruh teman-teman kelas A dan teman-teman angkatan 2015 atas persahabatan, doa dan semangatnya. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat untuk kemajuan ilmu pengetahuan.

Surabaya, 1 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN PENILAIAN	iv
RINGKASAN	vi
ABSTRACT	x
UCAPAN TERIMA KASIH	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xviii
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Landasan Teori	6
1.6 Hipotesis	9
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 10
2.1 Tanaman Kembang Bulan (<i>Tithonia diversifolia</i>)	10
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kembang Bulan (<i>Tithonia diversifolia</i>)	10
2.1.2 Morfologi Daun Kembang Bulan	10
2.1.3 Asal dan Penyebaran Tanaman Kembang Bulan	11
2.1.4 Kandungan Daun Kembang Bulan	12
2.1.5 Kegunaan Daun Kembang Bulan	12
2.2 Tinjauan Umum Ekstraksi	13
2.3 Uji Sitotoksitas	14
2.4 MTT Assay	15
2.5 Kultur Sel	16
2.5.1 Definisi Kultur Sel	16
2.5.2 Limbus dan Epitel Limbal	17

2.5.3	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>	18
2.6	Perhitungan.....	20
BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN		22
3.1	Rancangan Penelitian	22
3.2	Sampel dan Besar Sampel	22
3.2.1	Sampel.....	22
3.2.2	Besar Sampel	23
3.3	Variabel Penelitian	23
3.3.1	Variabel Bebas.....	23
3.3.2	Variabel Terikat	24
3.3.3	Variabel Kendali	24
3.4	Definisi Operasional Variabel.....	24
3.5	Waktu dan Tempat Penelitian	26
3.6	Bahan dan Materi Penelitian	26
3.6.1	Bahan Penelitian	26
3.6.2	Alat Penelitian.....	27
3.7	Prosedur Penelitian.....	27
3.7.1	Persiapan Penelitian.....	27
3.7.1.1	Pembuatan Ekstrak Daun Kembang Bulan	27
3.7.1.2	Persiapan <i>Limbal Mesenchymal Stem Cell</i> Kelinci.....	28
3.7.1.3	Tahap Perlakuan.....	29
3.7.2	Tahap Pengamatan dan Pembacaan Hasil Perlakuan.....	30
3.7.3	Perhitungan.	30
3.8	Analisis Data	31
3.9	Diagram Alir Penelitian	32
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		33
BAB V PEMBAHASAN		40
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		45
DAFTAR PUSTAKA		46
LAMPIRAN.....		51

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Rerata dan Simpang Baku Persentase <i>Limbal Mesenchymal Stem Cell</i> hidup setelah diberi ekstrak daun Kembang bulan (<i>Tithonia diversifolia</i>) selama 24jam.....	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Tanaman Kembang bulan (<i>Tithonia diversifolia</i>).....	11
3.1. Diagram Alir Penelitian	32
4.1. Hasil pengamatan <i>Limbal Mesenchymal Stem Cell</i> Kelinci dengan mikroskop cahaya: 40-100x (a) kontrol sel (b) konsentrasi ekstrak 0,5%, (c) konsentrasi ekstrak 0,25% (d) konsentrasi ekstrak 0,125%, dan (e) konsentrasi ekstrak 0,0625%.....	34
4.2. Grafik Persentase Sel Hidup berdasarkan Konsentrasi <i>Limbal Mesenchymal Stem Cell</i> Kelinci.....	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Uji Statistik Kelompok Perlakuan.....	51
2. Dokumentasi Bahan dan Alat Penelitian.....	55
3. Dokumentasi Penelitian.....	58
4. Hasil <i>Optical Density</i>	59
5. Tabel Persentase Arcsin.....	60



SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

%	=	Persen
°C	=	Derajat Celcius
μL	=	<i>Microliter</i>
αMEM	=	<i>Minimum Essential Medium Eagle-Alpha Modification</i>
BSC	=	<i>Biological Safety Cabinets</i>
cm	=	<i>Centimeter</i>
CO ₂	=	Karbon Dioksida
DMSO	=	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
EDTA	=	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	=	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Kg	=	<i>Kilogram</i>
mg	=	<i>Miligram</i>
ml	=	<i>Mililiter</i>
MTT	=	<i>Microculture Tetrazolium</i>
NaCL	=	Natrium Klorida
nm	=	<i>Nanometer</i>
OD	=	<i>Optical Density</i>
PBS	=	<i>Phospat Buffer Saline</i>
rpm	=	<i>Revolutions per Minute</i>
ANOVA	=	<i>Analysis of Variance</i>
CD	=	<i>Cluster of Differentiation</i>
FBS	=	<i>Foetal Bovine Serum</i>
LC ₅₀	=	<i>Lethal Concentration</i>
MSC	=	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>

BAB I

PENDAHULUAN



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati terbesar di dunia dengan 30 ribu spesies tumbuhan yang memiliki khasiat sebagai obat yang menjadikan alasan masyarakat untuk memanfaatkan tanaman tersebut sebagai obat (Hermanto, dkk., 2014). Menurut (Nuria, dkk., 2009) pemanfaatan bahan alam yang berasal dari tumbuhan telah lama dilakukan oleh masyarakat Indonesia untuk menangani berbagai masalah kesehatan. Obat yang berasal dari tumbuhan memiliki berbagai keuntungan dibandingkan obat konvensional (Capasso, *et al.*, 2003).

Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman karena memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit daripada obat modern (Raina, 2011). Salah satu tanaman yang sering digunakan dalam pengobatan tradisional adalah daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) merupakan spesies tumbuhan yang termasuk dalam family Asteraceae yang telah lama digunakan oleh masyarakat di Asia selatan untuk mengobati berbagai macam penyakit (Wayuni, dkk., 2015). Tanaman ini juga telah banyak dikenal oleh masyarakat Indonesia dengan sebutan “daun insulin” (Amanatie, dkk., 2015). Tanaman daun Kembang bulan berkhasiat sebagai obat diabetes, malaria dan penyakit infeksi lainnya (Zirconia, dkk., 2015). Daun Kembang bulan mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya tanin, alkaloid, steroid, terpenoid, dan fenol (Omoboyowa, 2015) serta mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol pada bagian daun, kulit batang dan akar tumbuhan daun Kembang bulan (Desriyanti, dkk., 2017). Ekstrak

daun Kembang bulan yang mengandung flavonoid merupakan senyawa aktif bahan alam yang telah diteliti memiliki aktivitas antihiperglikemik sebagai obat diabetes (Sasmita, dkk., 2017). Pengobatan menggunakan daun Kembang bulan telah turun temurun di gunakan oleh masyarakat namun diperlukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui kadar toksisitasnya (Muaja, dkk., 2013).

Daun Kembang bulan sebagai salah satu tanaman obat untuk dapat dikonsumsi dan terjamin keamanannya maka harus dikembangkan menjadi obat herbal berstandar dan fitofarmaka. Salah satu tahapan pengembangan obat herbal menjadi fitofarmaka adalah tahapan uji preklinik yang terdiri atas uji toksisitas yang dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo* (Dewoto, 2007). Metode pengujian toksisitas *in vitro* (secara harfiah “dalam gelas”) digunakan terutama untuk mengidentifikasi bahan biologi atau kimia yang berpotensi berbahaya pada tahap awal pengembangan zat baru yang berpotensi berguna, seperti obat terapeutik, bahan kimia pertanian dan aditif makanan (Roggen, 2011). Tes yang digunakan untuk evaluasi biologis dan tes skrining yang menggunakan sel-sel jaringan secara *in vitro* disebut uji sitotoksitas. Keunggulan uji sitotoksitas *in vitro* sebagai tes skrining yaitu lebih sederhana, lebih cepat, memiliki sensitivitas tinggi dan menyelamatkan hewan coba dari toksisitas (Li *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini akan dilakukan percobaan terhadap uji sitotoksitas ekstrak daun Kembang bulan terhadap sel limbal kelinci, menggunakan salah satu metode menggunakan pereaksi Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium (MTT) merupakan salah satu metode yang tepat untuk penelitian yang berhubungan dengan uji toksisitas suatu bahan. Dasar uji pada metode MTT assay yakni berupa

jumlah pembentukan kristal formazan yang memiliki korelasi positif dengan jumlah dan aktivitasnya, serta nilai absorbansi kolimetrinya menunjukkan banyaknya sel yang masih hidup termasuk aktivitas metabolik yang dilakukan oleh sel tersebut. (Li, *et al.*, 2012). Parameter yang umum digunakan untuk uji sitoksisitas yaitu nilai LC_{50} . Nilai LC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai LC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik, semakin besar harga LC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. (Djajanegara, dkk., 2009). Penelitian sebelumnya disebutkan pemberian ekstrak daun Kembang bulan pada tikus dengan konsentrasi 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB menunjukkan penebalan dinding tubular dengan adanya kerusakan inti sel tubular dan pembuluh darah mulai tidak tampak, sedangkan pada dosis 1600 mg/kgBB menunjukkan nekrosis tubular ginjal yang meluas, pada hati konsentrasi 400 mg/kgBB sudah menunjukkan kerusakan hepatosit periportal yang signifikan pada vakuola seluler dengan tingkat keparahan yang lebih tinggi yaitu 1600 mg/kgBB (Elufioye, *et al.*, 2009). Uji toksisitas yang dilanjutkan untuk mengetahui senyawa toksik pada ekstrak daun Kembang bulan diketahui senyawa yang bertanggung jawab menimbulkan efek sitotoksitas adalah *sequiterpene lactone* dan chlorogenic Acid, diketahui pula dosis aman konsumsi ekstrak daun Kembang bulan yaitu ≤ 100 mg/kgBB (Passoni, *et al.*, 2013).

Berdasarkan pernyataan tersebut diatas penulis ingin melakukan penelitian mengenai uji toksisitas ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci sebagai hewan coba untuk mengetahui toksisitas berdasarkan banyaknya mortalitas pada sel. Tanaman Kembang bulan memiliki efek sebagai gastroproektif yang dapat mengobati peptik ulcer (Mendoza, *et al.*, 2011). Namun, penggunaan obat ini dalam pengobatan belum didasarkan pada bukti-bukti yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Supaya obat tradisional ini lebih berguna dan dapat dimasukan ke dalam pelayanan kesehatan formal, maka perlu dilakukan penelitian yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah (Amanatie, dkk., 2015). Penelitian terhadap bahan alam ini masih berlanjut untuk memenuhi beberapa kriteria sebagai fitoforma yaitu harus memiliki efek samping ringan dan toksisitas yang rendah untuk dapat dikonsumsi sebagai obat (BPOM,2004).

Mesenchymal Stem Cell merupakan salah satu sel yang sedang dikembangkan untuk dimanfaatkan sebagai salah satu sumber alternatif terapi sel, terutama pada beberapa penyakit degeneratif. Potensi *Mesenchymal Stem Cell* yang bersifat *multipotent*, yaitu dapat berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel, seperti osteosit, kondrosit, adiposit, *Mesenchymal Stem Cell* dapat berdiferensiasi menjadi sel syaraf, kardiomiosit, hepatosit, dan sel islet pankreas. *Mesenchymal Stem Cell* dapat di isolasi dari berbagai jaringan dewasa, seperti sumsum tulang, darah tepi dan cairan amnion, meskipun dalam jumlah sel terbatas (Rif'ati, 2012).

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, maka perlu dilakukan uji sitotoksitas ekstrak daun Kembang bulan terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang berguna untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) sehingga dapat diketahui efek sitotoksik dan nilai LC_{50} sebelum dapat digunakan dalam sistem pelayanan kesehatan formal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- Apakah ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) bersifat toksik terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci ?
- Berapakah tingkat sitotoksitas ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci berdasarkan *Lethal Concentration* (LC_{50}) ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, penelitian ini bertujuan untuk :

- Menentukan tingkat sitotoksitas ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci.
- Menentukan *Lethal Concentration* (LC_{50}) ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai keamanan dan penggunaan ekstrak tanaman daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*). Sehingga tanaman daun Kembang bulan dapat dimanfaatkan sebagai salah satu pengobatan herbal atau fitofarmaka setelah dilakukan uji sitotoksitas dari tanaman tersebut.

1.5 Landasan Teori

Tanaman Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) merupakan tanaman yang berasal dari Mexico dan Amerika Tengah yang saat ini telah menyebar ke kawasan Asia Tenggara, Afrika bagian Selatan, Amerika Selatan dan Australia (Alien, 2011). Di bidang kesehatan tanaman ini memiliki kegunaan dalam menyembuhkan konstipasi, sakit perut, penyakit hepar, anti malaria, anti inflamasi, analgesik, antibiotik, anti mikroba, dan lain-lain (Kandungu, *et al.*, 2013).

Kandungan ekstrak daun Kembang bulan hasil metabolit sekundernya dalam uji fitokimia ekstrak etanol kasar mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, steroid, saponin dan kandungan ekstrak fraksi n-heksananya mengandung alkaloid dan steroid, sedangkan ekstrak fraksi etanolnya mengandung alkaloid, etanol, dan saponin (Wahyuni, dkk., 2015). Penelitian sebelumnya (Phan, *et al.*, 2013) menyebutkan bahwa kandung flavonoid memiliki aktivitas antihiperglikemik dan pada penelitian berikutnya disebutkan bahwa ekstrak fraksi-n heksana memiliki efek antihiperglikemik pula (Sasmita, dkk., 2017). Penelitian lain yang dilakukan

(Oloruntola, *et al.*, 2017) menyebutkan efek ekstrak hydro-ethanol daun Kembang bulan memiliki efek antiplasmodial. Berdasarkan penelitian (Oludare, *et al.*, 2016) minyak atsiri daun Kembang bulan juga memiliki efek sebagai antibakteria terhadap bakteri positif maupun bakteri negatif tergantung konsentrasi ekstrak yang diberikan, dalam penelitian tersebut juga disebutkan efek antifungal ekstrak daun Kembang bulan yang memberikan efek berbanding lurus dengan semakin tingginya pemberian konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan yang diberikan. Penelitian sebelumnya disebutkan pemberian ekstrak daun Kembang bulan pada tikus dengan konsentrasi 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB menunjukkan penebalan dinding tubular dengan adanya kerusakan inti sel tubular dan pembuluh darah mulai tidak tampak, sedangkan pada dosis 1600 mg/kgBB menunjukkan nekrosis tubular ginjal yang meluas, pada hati konsentrasi 400 mg/kgBB sudah menunjukkan kerusakan hepatosit periportal yang signifikan pada vakuola seluler dengan tingkat keparahan yang lebih tinggi yaitu 1600 mg/kgBB (Elufioye, *et al.*, 2009). Senyawa toksis dalam ekstrak daun Kembang bulan yang diduga bertanggung jawab menimbulkan efek toksis adalah *sesquiterpene lactones* dan turunan asam klorogenik yang menyebabkan kerusakan pada hati dan ginjal menurut penelitian (Passoni, *et al.*, 2013), juga menyebutkan ekstrak dengan konsentrasi turunan asam klorogenik yang lebih tinggi pada tikus dengan pemberian selama 90 hari menyebabkan cedera hati sedangkan ekstrak kaya *sesquiterpene lactones* menyebabkan kerusakan ginjal, disebutkan pula dosis aman pemberian ekstrak daun Kembang bulan yaitu $\leq 100\text{mg/kg}$.

Penelitian ini didasarkan pada dua senyawa yang memunculkan berbagai aktivitas biologis dari daun Kembang bulan yaitu, senyawa *sesquiterpene lactone* dan senyawa *chlorogenic acid*. Pemberian polar ekstrak daun Kembang bulan yang kaya akan *chlorogenic acid* tanpa senyawa *sesquiterpene lactone* dan pemberian ekstrak kaya *sesquiterpene lactone* pada tikus menunjukkan *sesquiterpene lactones* mengarahkan toksisitas pada glomerulus dan tubulus distal ginjal dan sedikit mengarahkan toksisitas pada timus dan limpa, sedangkan *chlorogenic acid* mengarahkan toksisitas pada sel hati yang menyebabkan stenosis hati pada dosis yang lebih tinggi, namun beberapa penelitian menyebutkan *chlorogenic acid* dalam dosis yang tepat berperan sebagai *hepatoprotective*, dengan kata lain *sesquiterpene lactone* lebih memegang peran penyebab toksisitas bila dikonsumsi.

Mekanisme toksisitas daun Kembang bulan terkait dengan mekanisme *sesquiterpene lactone* yang meliputi mekanisme alkilasi dan non-alkilasi. Mekanisme toksisitas alkilasi *sesquiterpene lactone* diketahui menginduksi akumulasi *reactive oxygen species* dan mekanisme non-alkilasi *sesquiterpene lactone* diketahui menghambat kelas enzim pengangkut CA^{2+} (pompa serca) yang menyebabkan kadar kalsium sitosol meningkat yang mengarah pada kerusakan DNA oksidatif (Amorim, *et al.*, 2013).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini berfokus meneliti apakah ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) memiliki efek sitotoksitas terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci.

1.6 Hipotesis

Berdasarkan uraian latar belakang diatas , hipotesis dalam penelitian ini adalah :

- Ekstrak daun Kembang bulan memiliki efek toksik pada *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci
- Didapatkan *Lethal Concentration* (LC_{50}) ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*)

Menurut Tjitrosoepomo (2004), klasifikasi tanaman Kembang bulan (*T. diversifolia*) adalah :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Superdivisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: <i>Tithonia</i>
Spesies	: <i>Tithonia diversifolia</i>



2.1.2 Morfologi Daun Kembang Bulan

Kembang bulan (*T. diversifolia*) merupakan tanaman semak dengan tinggi 1,2-3 meter. Daun tanaman ini berbentuk menjari yang berjumlah ganjil 3-5 buah dan berukuran 5-17 x 3,5-12 cm. Bunga dari Kembang bulan berwarna kuning, kuntum bunga berukuran 3-6 cm x 5-18 mm. Setiap batang memiliki beberapa kuntum bunga di atasnya. Bunga dari Kembang bulan menghasilkan biji-biji yang dapat disebarkan oleh angin, air dan hewan (Orwa, *et al.*, 2009).

Benih atau biji tanaman Kembang bulan (*achenes*) berukuran 5-8 mm dan pada bagian atas benih terdapat bentuk yang melingkar (*pappus*). Kembang bulan menghasilkan benih sepanjang tahun yang kemudian pada musim hujan benih-benih tersebut akan tersebar ke beberapa tempat lain (Kandungu, 2013). Tanaman Kembang bulan yang dapat dilihat pada Gambar 2.1 di bawah ini.



Gambar 2.1 Tanaman Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) (Sumber: Alien, 2001)

2.1.3 Asal dan Penyebaran Tanaman Kembang Bulan

Kembang bulan (*Mexican Flower*) merupakan tanaman yang berasal dari Meksiko dan Amerika Tengah yang saat ini telah menyebar ke kawasan Asia Tenggara, Afrika bagian selatan, Amerika Selatan dan Australia (Alien, 2001). Tanaman ini dikenal dengan beberapa istilah lain seperti *Mexican Sun-flower*, *tree marigold*, *shrub sunflower* or *Japanese sun-flower* (English), “*sepeleba*” (Yoruba), *pua renga* (Cook Island) (Oyewole, *et al.*, 2008). Kembang bulan/kipahit/pahitan merupakan nama Indonesia dari (*T. Diversifolia*).

2.1.4 Kandungan Daun Kembang Bulan

Tanaman Kembang bulan (*T. diversifolia*) mengandung minyak atsiri yang sangat kompleks dan mengandung 20 sampai 60 senyawa minyak atsiri dengan konsentrasi yang berbeda. Minyak atsiri pada tanaman Kembang bulan banyak terkandung pada daun, buah, biji, kulit kayu, batang dan bunga. Minyak atsiri pada daun Kembang bulan dapat dikelompokkan berdasarkan jumlah atom karbon seperti monoterpen, monoterpen oxygenated, seskuiterpen dan seskuiterpen oxygenated (Kuroda *et al.*, 2007). Komponen monoterpen yang terkandung dalam Kembang bulan adalah 44,44%, seskuiterpen adalah 26,27% dan minyak atsiri lainnya adalah 28,89% (Chukwuka, 2014).

Berdasarkan hasil analisis fitokimia, tanaman Kembang bulan kaya akan flavonoid dan tiga sub tipe dari *sesquiterpen lactones* (heliangolides, furanoheliangolides dan eudesmanolides) (Ambrosio, 2008). Hasil penelitian (Taofik, dkk., 2010) menyatakan bahwa ekstrak daun Kembang bulan positif mengandung flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Tanaman Kembang bulan berpotensi sebagai insektisida nabati karena mengandung senyawa aktif seperti *sesquiterpen lactones*, tagitinin A, tagitinin C, hispidulin, dan (z) beta ocimene. Senyawa-senyawa ini dapat mempengaruhi reproduksi, menghambat perkembangan serangga, dan bersifat anti makan.

2.1.5 Kegunaan Daun Kembang Bulan

Tanaman Kembang bulan (*T. diversifolia*) memiliki kandungan seskuiterpen lakton dan diterpenoid yang memiliki aktifitas biologis terhadap serangga. Sedangkan dibidang kesehatan tanaman ini memiliki kegunaan dalam

menyembuhkan konstipasi, sakit perut, penyakit hepar, anti malaria, anti inflamasi, analgesik, antibiotik, antimikroba dan lain-lain (Kandungu, *et al.*, 2013). Tanaman Kembang bulan sering digunakan untuk pengobatan tradisional sebagai terapi diabetes dan penyakit infeksi (Duarte, *et al.*, 2012).

Tanaman Kembang bulan memiliki efek sebagai gastroprotektif yang dapat mengobati peptik ulser (Mendoza, *et al.*, 2011). Menurut penelitian (Wardhana, dkk., 2014), ekstrak metanol tanaman Kembang bulan memiliki efek larvasida sebagai racun cerna dan racun kontak terhadap larva lalat *Chrysomya bezziana* secara invitro. Daun Kembang bulan juga dapat digunakan sebagai pupuk atau penyubur tanah karena memiliki unsur hara (N, P dan K) (Achieng, *et al.*, 2010).

2.2 Tinjauan Umum Ekstraksi

Ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang ditetapkan (BPOM RI, 2005)

Maserasi merupakan metode ekstraksi bahan alam sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut

dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memerlukan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhrani, 2014).

2.3 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah salah satu metode bioassay *in vitro* pertama yang digunakan untuk memprediksi toksisitas zat pada berbagai jaringan (Tolosa, 2015). Tes uji sitotoksitas dapat dilakukan secara *in vivo* pada hewan maupun secara *in vitro* pada kultur sel. Uji sitotoksitas pada kultur sel secara luas digunakan untuk evaluasi toksisitas bahan kimia, bahan obat, dan senyawa penghambat pertumbuhan sel tumor. Penggunaan kultur sel dalam uji sitotoksitas digunakan karena efek sitotoksitas diketahui dengan cepat, lebih hemat biaya, menghindari toksisitas pada hewan, potensi otomatisasi (Li *et al.*, 2015). Uji sitotoksitas *in vitro* berguna dan perlu untuk mendefinisikan sitotoksitas basal, misalnya kemampuan intrinsik suatu senyawa untuk menyebabkan kematian sel sebagai konsekuensi dari kerusakan fungsi seluler dasar, uji sitotoksitas juga diperlukan untuk menentukan rentang konsentrasi untuk pengujian *in vitro* lebih lanjut dan lebih rinci untuk memberikan informasi yang bermakna tentang parameter seperti genotoksitas, induksi mutasi atau kematian sel terprogram (Eisenbrand *et al.*, 2002). Sitotoksitas suatu senyawa dapat diketahui dengan beberapa metode,

diantaranya yang paling banyak digunakan adalah metode MTT Assay (Berridge *et al.*, 2005). Ukuran yang dipakai untuk menentukan toksisitas *in vitro* adalah LC_{50} yaitu, konsentrasi zat yang diberikan mematikan 50% dari sel. Jumlah ini tergantung pada waktu inkubasi dengan agen. (Zhang *et al.*, 2007). Pada uji toksisitas *in vitro* pada sel primer, umumnya digunakan *Lethal Concentration* (LC_{50}) dimana untuk uji sensitivitas obat diukur sebagai peningkatan sel mati pada sel yang diberi paparan dibanding penurunan jumlah sel hidup pada sel yang tidak diberi paparan, dan pada sel line *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) dianggap lebih tepat dimana konsentrasi obat yang diperlukan untuk penghambatan pertumbuhan mencapai 50% disbanding dengan pertumbuhan dari kontrol yang tidak diberi paparan (Meerlo *et al.*, 2011).

2.4 MTT Assay

MTT Assay merupakan uji kalorimetri menggunakan pereaksi MTT, reaksinya berdasarkan reaksi redoks yang terjadi di dalam sel, dalam hal ini didasarkan pada kemampuan sel hidup mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu dan tidak larut. Prinsip dari pewarnaan MTT adalah mengubah cincin tetrazolium oleh aktivitas dari mitokondria pada sel hidup namun tidak terjadi perubahan cincin tetrazolium pada sel yang mati. Pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya

dengan menggunakan *ELISA reader*. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ungu yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader (scanning multiwell spectrophotometer)* (Siregarr, dkk., 2000). Intensitas warna ungu yang terbentuk akan berjumlah proporsional dengan jumlah sel hidup. Intensitas warna ungu yang semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak. Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme atau dengan cara lain sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Semakin kuat intensitas warna ungu yang diperoleh absorbansi akan semakin besar, hal ini menandakan bahwa banyak sel yang hidup dan bereaksi dengan garam tetrazolium, sehingga formazan yang terbentuk banyak. Absorbansi yang didapat kemudian digunakan untuk menghitung persentase kematian (Dona, dkk., 2016).

2.5 Kultur Sel

2.5.1 Definisi Kultur Sel

Kultur sel merupakan suatu proses saat sel hidup ditempatkan ke dalam suatu media yang dapat membuat sel tersebut berkembang biak atau tumbuh secara *in vitro*. Media kultur buatan yang digunakan untuk menumbuhkan sel di luar tubuh organisme dibuat semirip mungkin dengan cairan biologis pada saat sel berada dalam tubuh organisme. Kultur sel dapat berupa kultur sel primer maupun *cell line*. Kultur sel primer merupakan kultur yang dimulai dari sel, jaringan, organ yang diperoleh langsung dari organisme asalnya, sedangkan *cell line* ialah kultur yang diperoleh dari sub kultur pertama dari kultur primer (Freshney, 2010).

Kultur sel merupakan sebuah metode untuk mempelajari aktivitas sel hidup yang bebas dari variasi sistem yang mungkin timbul oleh karena ketidakseimbangan sistem tubuh atau karena adanya stres yang dialami oleh hewan coba selama perlakuan (Freshney, 2010).

Pada kultur sel terdapat empat fase, yaitu, *lag phase* yaitu fase yang terjadi sesaat setelah proses *seeding* dan pada fase ini sel-sel beradaptasi dengan kondisi kultur; *log phase* yaitu fase sel-sel aktif berkembang biak dan mengadakan pertumbuhan eksponensial yang berlangsung sampai memenuhi seluruh permukaan pertumbuhan atau konsentrasi sel melebihi kapasitas medium; *plateau phase* yaitu fase pertumbuhan atau konsentrasi sel yang stabil karena proliferasi sel melambat menyebabkan siklus sel aktif turun sebesar 0-10% dan berhenti. Pada fase ini sel-sel paling rentan terhadap cedera; *decline phase* yaitu fase kematian sel dan reduksi viabilitas sel bukan karena pengurangan suplemen nutrisi tapi merupakan siklus seluler alami (EACC,2012).

2.5.2 Limbus dan Epitel Limbal

Permukaan mata dilapisi oleh dua lapisan sel yang berbeda, yaitu lapisan epitel kornea dan lapisan epitel konjungtiva yang menutupi permukaan sklera. Kedua lapisan epitel ini dipisahkan oleh zona transisional yang disebut daerah limbus, yang berbentuk sirkular sesuai lingkaran luar kornea. Epitel kornea diperbaharui setiap 3 - 10 hari oleh kumpulan *Limbal Mesenchymal Stem Cell*. Jika terjadi kerusakan *Limbal Mesenchymal Stem Cell* total, maka epitel limbal tidak terbentuk dan epitel kornea juga tidak terbaharui dengan optimal, sehingga fungsi epitel kornea lambat laun akan terganggu. Kerusakan *Limbal Mesenchymal*

Stem Cell akan memicu epitel konjungtiva tumbuh ke arah kornea (konjungtivalisasi). (Medical Advisory Secretariat, 2008; Smolin, *et al.*, 2004)

Konjungtiva merupakan membran mukoid yang melapisi seluruh permukaan dan bagian dalam palpebra, superior, dan inferior mata, kecuali daerah kornea. Konjungtiva dilapisi epitel skuamosa non keratinisasi, namun pertumbuhan epitel tidak bergantung pada ada tidaknya *Limbal Mesenchymal Stem Cell* (Medical Advisory Secretariat, 2008; Smolin, *et al.*, 2004).

Limbus dihuni oleh satu lapis sel basal limbal yang bergelombang. 7-10 lapis sel skuamosa bertingkat non-keratinisasi yang membentuk epitel limbal, melanosit dan sel langerhans yang sering tampak diantara sel epitel, serta jaringan penunjang longgar dengan jaringan vaskular sebagai sumber nutrisi bagi semua sel di atasnya. Sel apikal epitel limbal mempunyai mikropilika/mikrovili pada membran apikal. (Smolin, *et al.*, 2004).

2.5.3 Mesenchymal Stem Cell

Mesenchymal Stem Cell atau Sel Punca Mesenkim adalah sel yang tidak berdiferensiasi yang memiliki beberapa sifat seperti pembaharuan diri dan plastisitas. *Mesenchymal Stem Cell* dibagi menjadi 2 macam yaitu : *Mesenchymal Stem Cell* embrionik dan *Mesenchymal Stem Cell* dewasa. Berdasarkan plastisitas sel mesenkimal dapat dibagi menjadi beberapa jenis sel serta totipoten, pluripoten, multipoten, oligopoten, dan unipoten. *Mesenchymal Stem Cell* dapat digunakan untuk berkembang sebagai obat pembeding berdasarkan sifat dan fungsi *Mesenchymal Stem Cell*, dan untuk terapi perbaikan kerusakan sel, jaringan, dan organ cacat, yang akhirnya dapat menghambat mengarah kepada penyakit

degeneratif (Rantam, dkk., 2017). *Mesenchymal Stem Cell* adalah sel somatik yang dapat diisolasi dari berbagai jaringan dewasa, mempunyai kemampuan memperbaharui diri sampai jumlah yang cukup untuk penyembuhan luka atau menggantikan jaringan yang sakit. Karakteristik *in vitro Mesenchymal Stem Cell* yang terpenting adalah kemampuan proliferasi, berkembang, dan membelah diri dalam waktu yang tak terbatas dengan fenotipe embrionik (belum berdeferensiasi) (Rif'ati, 2012)

Karakteristik *Mesenchymal Stem Cell* antara lain : mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi. Sebagian besar sel dalam tubuh mempunyai bentuk dan fungsi yang tidak dapat diubah. Sebagai contoh, sel saraf sudah berkembang dengan sedemikian rupa sehingga mempunyai bentuk dan fungsi yang khusus dan tidak dapat diubah bentuk dan fungsinya menjadi sel lain. *Mesenchymal Stem Cell* merupakan sel yang berada pada stadium awal perkembangan sel, belum mempunyai bentuk dan fungsi yang khusus. *Mesenchymal Stem Cell* mampu berkembang (berdiferensiasi) menjadi sel yang lainnya. Dalam hal ini *Mesenchymal Stem Cell* mampu berkembang menjadi berbagai jenis sel matang, misalnya sel saraf, sel otot jantung, sel otot rangka, sel pankreas, dan sel-sel lain ; kemampuan untuk memperbaharui atau meregenerasi dirinya sendiri. Dalam hal ini *Mesenchymal Stem Cell* mempunyai kemampuan untuk dapat membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya melalui pembelahan sel (Hartono, 2017).

Skrining toksisitas obat-obatan dengan *Mesenchymal Stem Cell* terkait fungsi sel-sel ini yang memproduksi stroma yang menyediakan lingkungan untuk

memungkinkan sistem lain berfungsi dengan baik seperti chondrogenesis, osteogenesis, adipogenesis. Toksisitas terhadap sistem ini dapat menyebabkan kerusakan yang cukup besar dan ketidakmampuan jaringan berfungsi dengan baik, *Mesenchymal Stem Cell* primer, dalam banyak hal, mirip dengan sistem limfosit dan sistem hematopoietik (Reagan *et al.*, 2011).

Isolasi *Mesenchymal Stem Cell* dari sumsum tulang dapat dilakukan dengan prinsip *density gradient centrifugation* yang kemudian dikultur dalam petridish selama semalam. *Mesenchymal Stem Cell* akan melekat pada petridish sedangkan sel-sel yang tidak melekat pada dasar petridish dibuang dan mengganti medium kultur. Identifikasi *Mesenchymal Stem Cell* menurut *International Society of Chytoteraphy*, terdapat 3 syarat minimal populasi suatu sel agar dapat disebut sebagai *Mesenchymal Stem Cell* yaitu, (a) melekat pada dasar petridish plastik (*plastic-adherent*) dengan medium kultur standar, (b) mengekspresikan marker CD105, CD73, CD90 dan tidak mengekspresikan CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79 α atau CD19 dan HLA-DR, (c) Kriteria yang ketiga *Mesenchymal Stem Cell* paling tidak secara *in vitro* dapat berdiferensiasi menjadi osteoklas, adiposit dan kondroblas (Winarno, 2011).

2.6 Perhitungan.

Untuk mengetahui persentase jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* hidup dilakukan dengan memakai rumus (Yuliati, 2005):

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{(\text{OD Perlakuan} + \text{OD media}) \times 100 \%}{(\text{OD Sel} + \text{OD media})}$$

Keterangan :

% Sel hidup : presentasi jumlah kehidupan sel setelah uji.

OD Perlakuan : nilai OD (*optical density*) formazan setiap sampel setelah tes.

OD Media : nilai OD (*optical density*) formazan pada rata- rata setiap kontrol media.

Sel : nilai OD (*optical density*) formazan pada rata- rata setiap kontrol sel.

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB III MATERI DAN METODE PENELITIAN



3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain penelitian *The Post Test Only Control Group Design*. Perlakuan dengan pemberian ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi 0,5%, 0,25%, 0,125%, dan 0,0625% terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci.

3.2 Sampel dan Besar Sampel

3.2.1 Sampel

Sampel penelitian menggunakan *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci. *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci disediakan oleh Laboratorium Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell, *Tropical Disease Center* (TDC), Universitas Airlangga Surabaya.

Penentuan banyaknya sampel diperoleh dengan menggunakan rumus (Federer, 1963) :

$$(t-1) \times (n-1) \geq 15$$

$$(6-1) \times (n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

n = besar replikasi per kelompok

t = jumlah kelompok uji

Setelah dihitung menggunakan rumus federer, ditemukan besar sampel minimal adalah 4 sampel per kelompok uji. Dalam penelitian yang dilakukan digunakan 6 sampel per kelompok uji sehingga tidak perlu dilakukan penambahan sampel lagi, yang akan diulang pada 6 kelompok perlakuan antara lain, kelompok kontrol positif berisi kultur *Mesenchymal Stem Cell* dan media *eagle's*, kelompok kontrol negatif berisi media *eagle's* saja, dan kelompok perlakuan berisi kultur *Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang diberi ekstrak Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dengan konsentrasi 0,5%, 0,25%, 0,125%, dan 0,0625%.

3.2.2 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 6 perlakuan antara lain : kelompok kontrol sel berisi *Limbal Mesenchymal Stem Cell* dan media *eagle's*, kelompok kontrol media berisi media *eagle's* saja, dan kelompok perlakuan berisi *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci sebanyak 4 kelompok yaitu yang diberi ekstrak daun Kembang bulan 0,5%, ekstrak daun Kembang bulan 0,25%, ekstrak daun Kembang bulan 0,125%, dan ekstrak daun Kembang bulan 0,0625%.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak daun Kembang bulan (*T. diversifolia*) dengan konsentrasi 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci.

3.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dari penelitian ini adalah media, alat, bahan, suhu, inkubasi dan cara kerja yang dilakukan.

3.4 Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Uji Sitotoksitas

Uji evaluasi biologis dan tes skrining awal yang dilakukan untuk memperkirakan bahaya terhadap material biologis atau non biologis akibat suatu obat atau senyawa yang menggunakan sel-sel jaringan secara *in vitro*.

3.4.2 Ekstrak Daun Kembang Bulan

Ekstrak daun Kembang bulan adalah ekstrak yang didapatkan melalui proses ekstraksi dengan metode maserasi dari simplisia daun Kembang bulan dengan menggunakan pelarut etanol teknis 70% didapat konsentrasi 100% dan diencerkan menjadi konsentrasi 0,5%, 0,25%, 0,125%, dan 0,0625% menggunakan aquades steril.

3.4.3 *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci

Limbal Mesenchymal Stem Cell kelinci yang berasal dari limbus mata kelinci yang didapat dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell Universitas Airlangga.

3.4.4 Sel Hidup

Sel yang hidup merupakan *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang dapat menghasilkan konsentrasi hasil produk MTT yang diukur dengan spektrofotometer. Sel yang hidup adalah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang dapat mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu.

3.4.5 Sel Mati

Sel yang mati merupakan *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang tidak dapat menghasilkan konsentrasi hasil produk MTT yang diukur dengan spektrofotometer. Sel yang hidup adalah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang tidak dapat mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu.

3.4.6 MTT Assay

MTT assay yaitu uji colorimetrik standar untuk mengukur perubahan warna untuk mengukur pertumbuhan sel. MTT (3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), merupakan senyawa yang tereduksi menjadi ungu di dalam mitokondria sel hidup. Reduksi hanya terjadi bila terdapat enzim reduktase yang diproduksi oleh mitokondria aktif, sehingga perubahan tersebut secara langsung berkaitan dengan jumlah sel yang hidup.

3.4.7 Pengukuran MTT Assay

Pengukuran MTT Assay menggunakan alat *ELISA reader* yang menghasilkan data berupa angka *optical density* tersebut merupakan nilai dari

kepekatan warna pada kultur sel tersebut. Semakin pekat warna yang dihasilkan, maka semakin tinggi angka *optical density* dan semakin banyak sel yang hidup.

3.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan 31 Desember 2018 – 11 Februari 2019. Proses ekstraksi daun Kembang bulan dilakukan di PT. Herbacore, Wringinanom, Gresik. *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci didapatkan dari Laboraturium Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell, *Tropical Disease Center* (TDC), Universitas Airlangga Surabaya.

Proses pengamatan dan pengujian sampel dilakukan di Laboraturium Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell, *Tropical Disease Center* (TDC), Universitas Airlangga Surabaya.

3.6 Bahan dan Materi Penelitian

3.6.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: daun Kembang bulan kering diperoleh dari penjual tanaman obat di Malang (lampiran 2.1.b) yang kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi, etanol 70%, aerosol karboksil, aquades steryl, *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci diperoleh dari koleksi sel Pusat Penelitian dan pengembangan Stem Cell Universitas Airlangga (lampiran 2.1.a), *Phosphat Buffer Saline* (PBS) 10%, *Foetal Bovine Serum* (FBS), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 5 mg/ml, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) 50-100µl,

aquades steril, *Minimum Essential Medium Eagle -alpha modification* (alpha MEM) (lampiran 2.1.g), *Trypsine EDTA*.

3.6.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: 200 dan 100 μ L *Thermo scientific micropipette* (lampiran 2.2.1), Tabung reaksi kecil, rak tabung reaksi kecil, *microplate 96 well* (lampiran 2.2.c), *Nest conical tube 15 ml* (lampiran 2.2.g), *Yellow tip and blue tip*, *Promega GloMax Explorer ELISA reader* (lampiran 3.d), *Corning Plate Ø 10 cm dan Ø 5 cm*, *5ml syringe*, *Sartorius 0,02 μ l Syringe filter*, pipet volum, pipet elektrik, *Nikon TMS Infrared microscope Japan*, *Olympus CKX53 inverted microscope*, *Advantec TME-21 test tube mixer Japan*, *One Med Health Care Centrifuge model 0512-1*, *WINA Instrument type 3045 Laminar air flow* (lampiran 2.2.i), *ESCO Cell Culture CO₂ incubator* (lampiran 2.2.b), timbangan analitik, mesin ekstraktor (lampiran 2.2.a), rotary evaporator (lampiran 2.2.a), mesin oven (lampiran 2.2.e).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Penelitian

3.7.1.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kembang Bulan

Daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) yang didapat dicuci bersih kemudian dipotong menjadi beberapa bagian, dan dimasukkan kedalam oven pada suhu 50°C selama kurang lebih $\pm$ 24 jam. Setelah diperoleh daun Kembang bulan kering, lakukan penimbangan daun Kembang bulan seberat 2,5 kg, lakukan proses ekstraksi dengan etanol 70% sebanyak 25 liter, kemudian lakukan proses maserasi pada suhu tangki maksimal 60 °C selama 3 jam dan diperoleh ekstrak cair.

Lakukan proses press pada ampas hasil ekstraksi kemudian tampung pada troli penampung hasil ekstraksi. Lakukan proses evaporasi dengan suhu tangki maksimal 60°C, hingga cairan tersisa 4,5 L. Lakukan proses *mixing* dengan aerosol karboksil sebanyak 58 gram, dengan pengadukan manual selama 5 menit hingga terlihat homogen, proses selanjutnya ekstrak kental daun Kembang bulan yang telah melalui *mixing* dilakukan pengeringan pada oven dengan suhu 45°C hingga kering. Serbuk kering ekstrak daun Kembang bulan disimpan pada wadah tanpa udara dan disimpan pada suhu *freezer*, dan siap untuk diencerkan saat akan melakukan perlakuan terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell*.

3.7.1.2 Persiapan *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci

Mencairkan kultur sel limbal kelinci yang sebelumnya telah dibekukan kedalam *medium freezing* dan disimpan pada *deep freezer* dengan suhu -80°C. Kultur sel limbal kelinci yang telah dicairkan kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* yang sudah berisi media α MEM, kemudian di *centrifuge* 2400 rpm selama 5 menit, kemudian buang sisa media, lakukan sebanyak 2 kali proses mencuci dan *centrifuge* untuk menghilangkan sisa *Dymethyl Sulfoxide* (DMSO). Supernatan yang dihasilkan dibuang di dalam beker *glass* sebagai tempat pembuangan sehingga tersisa endapan sel di dasar. Endapan sel tersebut ditambahkan dengan 10 ml media *Minimum Essential Medium Eagle-alpha modification* (alpha MEM) yang kemudian dituangkan ke *petridish* yang telah berisi 10 ml media *alpha MEM* lalu di inkubasi di inkubator CO₂ pada suhu 37°C sampai membentuk sel *monolayer*. Sisa media kemudian dibuang dan dicuci dengan Phosphat Buffer Saline (PBS) 3-5 ml. Setelah sisa PBS dibuang sel di

petridish ditambahkan trypsin 1 ml untuk melepas sel dari dinding *petridish* dan sel-sel yang bergerombol, kemudian diinkubasi di inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 5 menit, kemudian amati dibawah mikroskop perbesaran 40-100 kali. Setelah nampak sel tidak saling bergerombol dan terlepas dari dinding *petridish* kemudian ditambah *stopper* dengan menambah serum FBS dengan perbandingan 1:1, kemudian lakukan resuspensi untuk memisahkan sebagian sel yang masih saling menempel. Masukkan sel yang telah diresuspensi ke dalam *conical tube* 15 ml. Kemudian di *centrifuge* 2400 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil *centrifuge* dibuang dan pellet (sel yang mengendap) ditambahkan *medium alpha MEM* 1 ml untuk dihitung jumlah sel pada sel counter dan sel siap dibagi rata dalam *microplate* 96 *well* sesuai jumlah sampel dan pengulangan, sehingga setiap sumur berisi sel dan media Eagle's dengan kepadatan 3-5 x 10 sel ml. Sel kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Sumuran yang berisi kultur *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci dan media dianggap kontrol sel dan sumuran berisi media saja di anggap kontrol media.

3.7.1.3 Tahap Perlakuan

Microplate yang berisi *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang telah di inkubasi diamati dibawah mikroskop cahaya apakah sel yang telah ditanam dalam setiap sumuran telah cukup banyak dan siap untuk dilakukan perlakuan. Sel yang telah siap, kemudian *media alpha MEM* dibuang, dan dimasukkan ekstrak daun Kembang bulan yang telah diencerkan dengan *media alpha MEM* dan sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan yaitu 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625%, setiap perlakuan mempunyai replikasi sebanyak 6 kali, 6 sampel untuk

kontrol sel dan kontrol media, tidak dilakukan penetasan. Semua kelompok perlakuan di inkubasi selama 24 jam dalam inkubator 37°C, kemudian pindahkan dari inkubator.

3.7.2 Tahap Pengamatan dan Pembacaan Hasil Perlakuan.

Setelah 24 jam, pereaksi garam Tetrazolim (MTT) 5mg/ml ditambahkan sebanyak 25 µl untuk setiap sumuran, kemudian diinkubasi selama kurang lebih 4 jam pada suhu 37°C. Kemudian amati ada tidaknya Kristal formazan dan tambahkan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) sebanyak 50-100 µl untuk melarutkan Kristal formazan kedalam setiap sumuran. *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup akan terwarnai dengan formazan menjadi biru, sedangkan yang mati tidak terbentuk warna biru. Formazan yang dibaca absorbsinya secara spektrofotometri dengan *ELISA reader* dengan panjang 595 nm, semakin pekat warna semakin tinggi nilai absorbsinya dan semakin banyak jumlah sel yang hidup.

3.7.3 Perhitungan.

Untuk mengetahui persentase jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* hidup dilakukan dengan memakai rumus (Yuliati, 2005):

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{(\text{OD Perlakuan} + \text{OD media}) \times 100 \%}{(\text{OD Sel} + \text{OD media})}$$

Keterangan :

% Sel hidup : presentasi jumlah kehidupan sel setelah uji.

OD Perlakuan : nilai OD (*optical density*) formazan setiap sampel setelah tes.

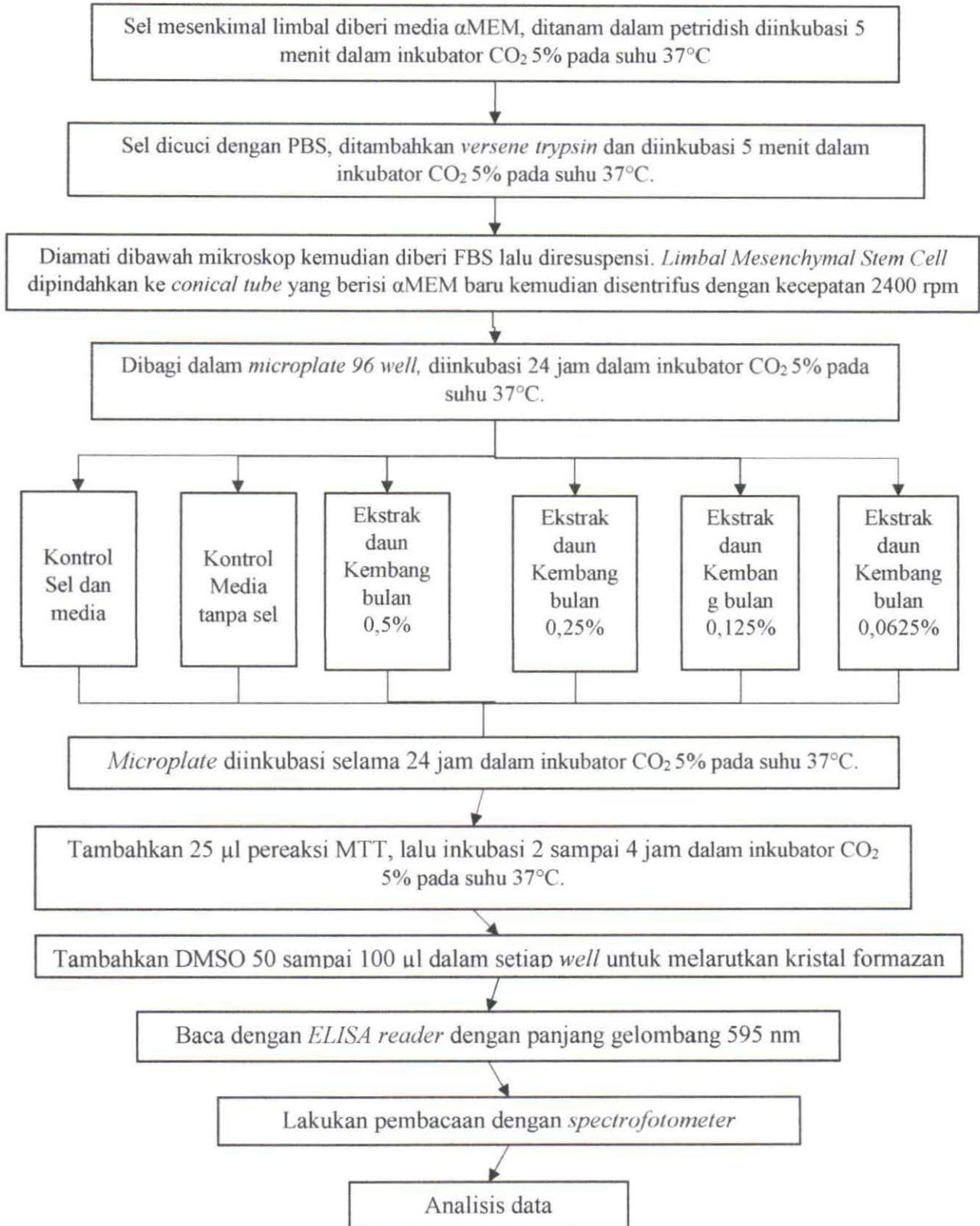
OD Media : nilai OD (*optical density*) formazan pada rata- rata setiap kontrol media .

Sel : nilai OD (*optical density*) formazan pada rata- rata setiap kontrol sel.

3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh diuji statistik menggunakan *One-way analysis of variance* (ANOVA). Apabila terdapat perbedaan yang nyata, untuk mengetahui perlakuan terbaik maka dilakukan uji jarak berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*) (Kusriningrum, 2012). Hubungan regresi antara konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan dan presentase jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* yang masih hidup dianalisis menggunakan analisis probit sehingga diperoleh nilai *Lethal Concentration* (LC₅₀). Analisis statistik dilakukan menggunakan bantuan perangkat lunak program komputer *Statistical Program and Service Solution* (SPSS) versi 21 *for windows*.

3.9 Diagram Alir Penelitian



BAB IV

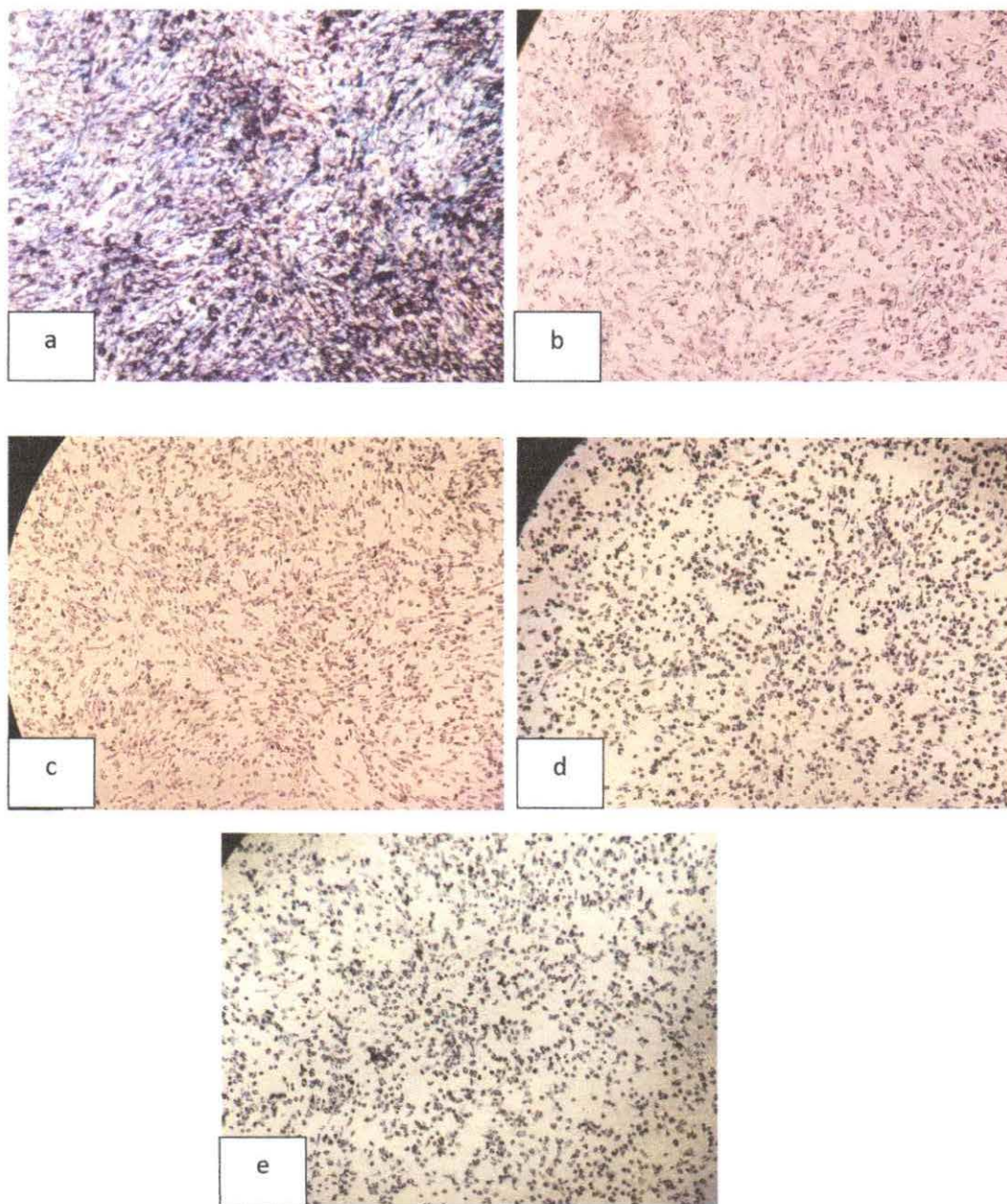
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA



BAB IV HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian uji toksisitas ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) menggunakan metode MTT Assay dengan pembacaan melalui *ELISA reader*. Hasil pembacaan uji MTT dengan menggunakan *ELISA reader* pada penelitian ini adalah berupa optikal densitas yang merupakan tingkat absorbansi melalui perubahan warna yang dihasilkan oleh aktivitas mitokondria menjadi biru/ungu formazan, semakin pekat warna yang dihasilkan semakin tinggi nilai absorbansinya.

Hasil yang didapat menunjukkan semakin tinggi konsentrasi semakin banyak *Limbal Mesenchymal Stem Cell* mati, yang ditunjukkan dengan semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin banyak *Limbal Mesenchymal Stem Cell* yang tidak dapat mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan yang berwarna biru-ungu, sehingga di bawah mikroskop hanya nampak warna kemerahan yang merupakan warna dari medium yang menggunakan *phenol red* (gambar 4.1. (b),(c),(d)), Hasil sangat berbeda ditunjukkan pada kontrol sel dimana *Limbal Mesenchymal Stem Cell* tidak diberi ekstrak daun Kembang bulan menunjukkan pembentukan kristal formazan berwarna biru-ungu sangat pekat (gambar 4.1. (a)). Semakin rendah konsentrasi menunjukkan semakin banyak *Limbal Mesenchymal Stem Cell* yang mampu mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan yang berwarna biru-ungu, meskipun kepekatan warna biru-ungu dari kristal formazan tidak sepekat kepekatan warna biru-ungu pada kontrol sel (gambar 4.1. (e)).



Gambar 4.1. *Limbal Mesenchymal Stem Cell* dengan mikroskop cahaya: 40-100x
(a) kontrol sel
(b) konsentrasi ekstrak 0,5%,
(c) konsentrasi ekstrak 0,25%
(d) konsentrasi ekstrak 0,125%, dan
(e) konsentrasi ekstrak 0,0625%.

Nilai optikal densitas menggambarkan jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* yang hidup sehingga semakin besar nilai optikal densitas menunjukkan semakin besar juga jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* yang hidup atau berploriferasi. Perhitungan jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* yang hidup menggunakan rumus presentase sel hidup. Berdasarkan hasil pengamatan dan pembacaan nilai absorbansi uji toksisitas ekstrak daun Kembang bulan terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* melalui *ELISA reader* yang terbagi atas kelompok perlakuan dengan konsentrasi 0,5%, 0,25%, 0,125%, dan 0,0625% didapatkan hasil sebagai berikut :



Gambar 4.2 Grafik Persentase Sel Hidup berdasarkan Konsentrasi *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci

Pada gambar 4.2 menunjukkan persentase kehidupan *Limbal Mesenchymal Stem Cell* setelah diberi perlakuan ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi yang berbeda, pada konsentrasi 0,5% persentase sel hidup sebesar 14%, pada konsentrasi 0,25% persentase sel hidup sebesar 29%, pada konsentrasi

0,125% persentase sel hidup sebesar 33%, dan pada konsentrasi 0,0625% persentase sel hidup sebesar 50%.

Data berupa OD (*optical density*) yang diperoleh agar diketahui kenormalan data dan ada tidaknya perbedaan bermakna pada seluruh kelompok hasil penelitian, maka data pada seluruh kelompok perlakuan dianalisis menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov, berlanjut dengan uji ANOVA dengan $p < 0,05$ dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* dan untuk menentukan LC_{50} , data di analisis probit menggunakan program *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 21.

Statistik uji normalitas Kolmogorov Smirnov digunakan untuk menguji kenormalan data. Data pada lampiran 1.1, menunjukkan pada uji Kolmogorov Smirnov didapatkan hasil seluruh kelompok penelitian mempunyai nilai lebih besar yaitu 0,126 ($\text{Sig} > 0,05$) yang berarti data dari seluruh kelompok penelitian berdistribusi normal.

Uji homogenitas varians Levene perlu dilakukan untuk mengetahui varians data yang digunakan sama atau tidak. Hasil seperti yang terlihat tabel tes homogenitas dalam lampiran 1.2 menunjukkan nilai sig. sebesar 0,195 ($\text{Sig} > 0,05$). Maka dapat disimpulkan varians yang terdapat pada penelitian tersebut adalah homogen.

Hasil yang sudah diuji dalam uji sebelumnya menyatakan bahwa data tersebut berdistribusi normal dan homogen. Maka dapat dikatakan data yang didapat, memenuhi syarat uji ANOVA. Uji ANOVA digunakan untuk menguji perbedaan rata-rata hitung jika kelompok sampel yang diuji lebih dari atau dua

kelompok yang berasal dari populasi yang berbeda yang dapat dilihat di lampiran 1.3. Berdasarkan lampiran 1.3 didapatkan sig value sebesar 0,000, dimana nilai $\text{sig} < 0,05$. Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa hasil perlakuan yang dilakukan memberikan perbedaan yang signifikan karena $\text{sig} < 0,05$.

Tabel 4.1 Rerata dan Simpang Baku Persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* hidup setelah diberi ekstrak daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) selama 24 jam.

Kelompok	Rerata (Sel Hidup) $\pm$ SD
Kontrol Media	1,78 ^e $\pm$ 0,05
Kontrol Sel	3,81 ^a $\pm$ 0,07
Konsentrasi 0,5%	2,19 ^d $\pm$ 0,04
Konsentrasi 0,25%	2,56 ^d $\pm$ 0,06
Konsentrasi 0,125%	2,62 ^c $\pm$ 0,09
Konsentrasi 0,0625%	2,99 ^b $\pm$ 0,13

Berdasarkan tabel 4.1 didapatkan hasil gambaran perbedaan tiap kelompok perlakuan penelitian. Uji Duncan adalah uji lanjutan untuk mengetahui nilai tengah mana saja yang sama dan nilai tengah mana saja yang tidak sama ketika pengujian kehomogenan beberapa nilai tengah memberikan hasil menolak hipotesis nol dan menerima hipotesis alternatif, jika $\text{sig} < \alpha$ ($=0,05$). Berdasarkan tabel 4.1 untuk data standar deviasi terlihat bahwa terdapat beberapa perlakuan yang tidak berbeda nyata antara perlakuan, perlakuan tersebut adalah konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan 0,5% dan konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan 0,25%. Serta antara konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan 0,125%, konsentrasi

ekstrak daun Kembang bulan 0,0625%, kontrol media dan kontrol sel berbeda nyata dengan kelompok lainnya. Nilai yang tertulis pada kolom merupakan nilai rata rata, sehingga perlakuan dengan rata rata tertinggi adalah konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan 0,0625% kemudian konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan 0,125%, sedangkan yang terendah adalah kontrol media. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan perlakuan yang memberikan hasil toksisitas tertinggi adalah konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan 0,5%. Hal ini juga menunjukkan bahwa semua kelompok konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan memiliki efek yang sama yaitu menurunkan jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* Kelinci yang hidup.

Pengaruh yang timbul terhadap viabilitas *Limbal Mesenchymal Stem Cell* berupa perubahan permeabilitas membran sel .Efek toksisitas dari Kembang bulan dapat menyebabkan terjadinya perubahan permeabilitas membran sel sehingga membran selnya tidak dapat mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan yang berwarna biru-ungu. Terdapat beberapa mekanisme biokimia yang diduga mempengaruhi kematian sel,hal ini dapat menjelaskan terjadinya kematian sel sehubungan dengan toksisitas suatu bahan. Mekanisme biokimia tersebut antara lain adalah penipisan kadar Adenosin Triphospate (ATP) dan defek pada membran sel. Enzim dehidrogenase adalah salah satu ezim yang berperan dalam pembentukan ATP, yaitu suatu energi yang sangat dibutuhkan oleh sel untuk berbagai aktifitas fungsional sel. Jika enzim dehidrogenase tidak aktif akibat efek sitotoksik maka ATP berkurang, aktivitas sel terganggu sehingga dapat mengakibatkan kematian sel.

Analisis probit kemudian dilanjutkan untuk mengetahui *Lethal Concentration* (LC_{50}) terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci selama 24 jam. Konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan yang dapat membunuh 50% (LC_{50}) terhadap jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup adalah 0,059% yang terdapat pada lampiran 1.6.

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V PEMBAHASAN

Kembang bulan (*T. diversifolia*) merupakan tanaman semak dengan tinggi 1,2-3 meter. Daun tanaman ini berbentuk menjari yang berjumlah ganjil 3-5 buah dan berukuran 5-17 x 3,5-12 cm. Bunga dari Kembang bulan berwarna kuning, kuntum bunga berukuran 3-6 cm x 5-18 mm. Setiap batang memiliki beberapa kuntum bunga di atasnya. Bunga dari Kembang bulan menghasilkan biji-biji yang dapat disebarkan oleh angin, air dan hewan (Orwa, *et al.*, 2009). Benih atau biji tanaman Kembang bulan (*achenes*) berukuran 5-8 mm dan pada bagian atas benih terdapat bentuk yang melingkar (*pappus*). Kembang bulan menghasilkan benih sepanjang tahun yang kemudian pada musim hujan benih-benih tersebut akan tersebar ke beberapa tempat lain (Kandungu, 2013).

Tanaman Kembang bulan juga telah banyak dikenal oleh masyarakat Indonesia dengan sebutan “daun insulin” (Amanatie, dkk., 2015). Tanaman daun Kembang bulan berkhasiat sebagai obat diabetes, malaria dan penyakit infeksi lainnya (Zirconia, dkk., 2015). Daun Kembang bulan mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain : tanin; alkaloid; steroid; terpenoid; dan fenol (Omoboyowa, 2015) serta mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol pada bagian daun, kulit batang dan akar tumbuhan daun Kembang bulan (Desriyanti, dkk., 2017). Ekstrak daun Kembang bulan yang mengandung flavonoid merupakan senyawa aktif bahan alam yang telah diteliti memiliki aktivitas antihiperglikemik sebagai obat diabetes (Sasmita, dkk., 2017).

Tanaman Kembang bulan (*T. diversifolia*) memiliki kegunaan dalam menyembuhkan konstipasi, sakit perut, penyakit hepar, anti malaria, anti inflamasi, analgesik, antibiotik, antimikroba dan lain-lain (Kandungu, *et al.*, 2013). Tanaman Kembang bulan sering digunakan untuk pengobatan tradisional sebagai terapi diabetes dan penyakit infeksi (Duarte, *et al.*, 2012).

Bahan yang digunakan sebagai obat perlu diperhatikan sifat toksiknya. Bahan yang berkontak dengan organ dalam harus bersifat tidak toksik, tidak mengiritasi, dan harus mempunyai sifat biokompatibilitas atau bahan yang diproduksi tidak boleh mempunyai efek yang merugikan terhadap lingkungan biologis, baik lokal maupun sistemik, untuk itu diperlukan penelitian untuk menguji toksisitas suatu bahan (Meizarini, 2005).

Senyawa toksis dalam ekstrak daun Kembang bulan yang diduga bertanggung jawab menimbulkan efek toksis adalah *sesquiterpene lactones* dan turunan asam klorogenik yang menyebabkan kerusakan pada hati dan ginjal menurut penelitian (Passoni, *et al.*, 2013), juga menyebutkan ekstrak dengan konsentrasi turunan asam klorogenik yang lebih tinggi pada tikus dengan pemberian selama 90 hari menyebabkan cedera hati sedangkan ekstrak kaya *sesquiterpene lactones* menyebabkan kerusakan ginjal, disebutkan pula dosis aman pemberian ekstrak daun Kembang bulan yaitu $\leq 100\text{mg/kg}$.

Penelitian ini didasarkan pada dua senyawa yang memunculkan berbagai aktivitas biologis dari daun Kembang bulan yaitu, senyawa *sesquiterpene lactone* dan senyawa *chlorogenic acid*. Pemberian polar ekstrak daun Kembang bulan yang kaya akan *chlorogenic acid* tanpa senyawa *sesquiterpene lactone* dan

pemberian ekstrak kaya *sesquiterpene lactone* pada tikus menunjukkan *Sesquiterpene lactones* mengarahkan toksisitas pada glomerulus dan tubulus distal ginjal dan sedikit mengarahkan toksisitas pada timus dan limpa, sedangkan *chlorogenic acid* mengarahkan toksisitas pada sel hati yang menyebabkan stenosis hati pada dosis yang lebih tinggi, namun beberapa penelitian menyebutkan *chlorogenic acid* dalam dosis yang tepat berperan sebagai *hepatoprotective*, dengan kata lain *Sesquiterpene lactone* lebih memegang peran penyebab toksisitas bila dikonsumsi.

Mekanisme toksisitas daun Kembang bulan terkait dengan mekanisme *sesquiterpene lactone* yang meliputi mekanisme alkilasi dan non-alkilasi. Mekanisme toksisitas alkilasi *sesquiterpene lactone* diketahui menginduksi akumulasi ROS dan mekanisme non-alkilasi *sesquiterpene lactone* diketahui menghambat kelas enzim pengangkut CA^{2+} (pompa serca) yang menyebabkan kadar kalsium sitosol meningkat yang mengarah pada kerusakan DNA oksidatif (Amorim, *et al.*, 2013).

Uji sitotoksitas yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode MTT Assay. MTT Assay merupakan salah satu metode yang digunakan dalam penelitian ini yang memiliki dasar uji yang berupa jumlah pembentukan kristal formazan memiliki korelasi positif dengan jumlah sel dan aktivitasnya, dan nilai absorbansi kolori metrinnya menunjukkan jumlah sel yang masih hidup serta aktivitas metaboliknya (Li, Zhou, Xu, 2015). Parameter yang umum digunakan untuk uji sitotoksitas yaitu nilai LC_{50} . Nilai LC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan

potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai LC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik, semakin besar harga LC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Djajanegara, dkk., 2009).

Hasil pengamatan pada uji sitotoksitas ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi 0,5%, 0,25%, 0,125%, dan 0,0625% yang dikontakkan langsung dengan *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang kemudian diinkubasi 24 jam, menunjukkan presentase sel hidup yang berbeda pada setiap perlakuannya. Persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* yang hidup pada perlakuan ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi 0,0625% sebesar 50%. Sedangkan ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi 0,5%, 0,25%, dan 0,125% nilainya kurang dari 50%.

Hasil penelitian yang di dapat dari pemberian konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci dengan menggunakan MTT Assay pada konsentrasi 0,0625% menunjukkan jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup sebesar 50%, pada konsentrasi 0,125% menunjukkan jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup sebesar 33%, pada konsentrasi 0,25% menunjukkan jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup sebesar 29%, dan pada konsentrasi 0,5% menunjukkan jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup sebesar 14%. Hasil pengamatan yang didapat menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan, maka semakin rendah jumlah persentase *Limbal Mesenchymal Stem Cell*

kelinci yang hidup, yang berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan, maka semakin tinggi pula efek toksik terhadap *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci, sehingga pada konsentrasi terendah 0,0625% menghasilkan viabilitas sel tertinggi, sedangkan ekstrak daun Kembang bulan dengan konsentrasi 0,5% menghasilkan viabilitas sel terendah.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN



6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

- a. Semakin besar konsentrasi ekstrak yang diberikan, maka semakin rendah jumlah *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci yang hidup.
- b. Konsentrasi ekstrak daun Kembang bulan yang dibutuhkan untuk membunuh 50% *Limbal Mesenchymal Stem Cell* kelinci (LC_{50}) dalam rentang waktu 24 jam adalah 0,059%.

6.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas masing-masing senyawa kimia aktif yang terkandung di dalam ekstrak daun Kembang bulan.

DAFTAR PUSTAKA



DAFTAR PUSTAKA

- Achieng, J.O, G. Ouma, G. Odhiambo, and F.Muyekho. 2010. Effect of *Tithoniadiversifolia* (Hemsley) and Inorganic Fertilizers on Maize Yield on Alfisols and Ultisols of Western Kenya. Agriculture and Biology J. of America. 1 (5) :740-745
- Alien.2001.*Tithoniadiversifolia*.https://www.sanparks.org/docs/parks_kruger/conservation/scientific/ff/alien_biota/awareness/no7-tithonia.pdf.
- Amanatie, Sulistyowati E. 2015. Structure Elucidation of the Leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. Jurnal Sains and Matematika, 23(4), 101-106.
- Ambrosio S.R,Y. Oki, V.C.Heleno, J.S. Chaves, P.G.Nascimento, J.E.Lichston, M.G. Constantino, E.M Varanda and F.B. Da Costa . 2008. Constituents of Glandular Trichomes of *Tithoniadiversifolia*: Relationships to Herbivory and Antifeedant Activity. Phytochemistry. 69:2052-2060.
- Amorim, M. H. R., Gil da Costa, R. M., Lopes, C., & Bastos, M. M. 2013. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. Critical reviews in toxicology, 43(7), 559-579.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnology annual review, 11, 127-152.
- BPOM RI. 2004. ketentuan pokok pengelompokan dan penandaan obat bahan alam Indonesia.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2005. Standarisasi Ekstrak Tanaman Obat Indonesia. InfoPOM. 6(4)
- Capasso 2003. Phytotherapy: A quick Reference to Herbal Medicine. New York. Springer-Verlag. Pag3.
- Chukwuka, K.S and O.M. Ojo. 2014. Extraction and Characterization of Essential Oils From *Tithoniadiversifolia*. AmericanJ. Essential Oils and Natural Products. 1(4): 1-5
- Dairo, T.A. 2016. Proximate composition, amino acid profile and some anti-nutrients of *Tithonia diversifolia* cut at two different times. African Journal of Agricultural. 11(38): 3659-3663
- Desriyanti, E. Lia , dan Yuliawati. 2017. Uji Total Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) (Hemsley) A.Gray).Riset Informasi Kesehatan, Vol. 6 No. 1.

- Dewoto, H.R. 2007. Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 57(7): 205-211.
- Djajanegara, I., & Wahyudi, P. 2009. Pemakaian sel HeLa dalam uji sitotoksitas fraksi kloroform dan etanol ekstrak daun *Annona squamosa*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7(1), 7-11.
- Dona, R., N. Sulistyani dan Nurani, L. H. 2016. Uji sitotoksitas dan antiproliferasi ekstrak etanol daun leunca (*Solanum*, *Pharmaciana*. 6(2): 181-190).
- Duarte, M. D. R., & Empinotti, C. B. 2012. Leaf and stem microscopic identification of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1), 109-116.
- EACC. 2012. *Fundamental Technique in Cell Culture Laboratory Handbook*. 2nd Ed. Sigma Life Science. 23.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., & Kleiner, J. 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and chemical toxicology*, 40(2-3), 193-236.
- Elufioye, T., Alatise, O., Fakoya, F., Agbedahunsi, J., & Houghton, P. 2009. Toxicity studies of *Tithonia diversifolia* A. Gray (Asteraceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 122: 410-415.
- Freshney, R.I. 2000. *Culture of Animal Cell: a manual of basic technique*. 4th Edition. New York: Willey Liss Inc. 89, 243.
- Hartono, B. 2017. Sel Punca: Karakteristik, Potensi dan Aplikasinya. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 22(60).
- Hermanto, F., Febriani, Y., Aisyah, L., Saputra, T., Hakim, A., Ningsih., Herlina, T., Julaha, E., Zainuddin, A., Supratman, U. 2014. Uji Aktivitas Anti Malaria Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek (*Kalanchoe blossfeldiana* poelln) Pada *Plasmodium Falciparum* 3D7. *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, Vol. 2(2): 54-58
- Kandungu, J., P. Anjarwalla, L. Mwaura, D.A. Ofori, R. Jamnadass, P.C. Severson and P. Smith. 2013. *Pesticidal Plant Leaflet Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray*. Kew Royal Botanic Gardens, World Agroforestry Centre.
- Kuroda, M., Yokosuka, A., Kobayashi, R., Jitsuno, M., Kando, H., Nosaka, K., & Mimaki, Y. 2007. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(8), 1240-1244.

- Kusriningrum, P.S. 2012. Perancangan percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 15-19
- Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. 2015. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*, 3(5), 617-620.
- Li, Y., Huang, W., Huang, S., Du, J., & Huang, C. 2012. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay. *Biochemical and biophysical research communications*, 422(1), 85-90.
- Medical Advisory Secretariat. Limbal stem cell transplantation: an evidence-based analysis. Ontario Health Technology Assessment Series 2008;8(7):1-58
- Meerlo, V.J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture* (pp. 237-245). Humana Press.
- Meizarini, A., Munadzir, E., & Rachmadi, P. 2005. Sitotoksitas bahan restorasi cyanoacrylate dengan variasi perbandingan powder dan liquid menggunakan MTT assay. *Jurnal Penelitian Medika Eksakta*, 6(1), 16-25.
- Mendoza, M.E., R. Sanchez., A. Reyez., L.C. Antonio and L.M. Jimenez. 2011. Bioassay-Guided Isolation of an Anti-Ulcer Compound, Tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: Role of Nitric Oxide, Prostaglandins and Sulfhydryls. *Molecules*, 16 : 665-674
- Muaja, A.D., Harry S. J. K. Max R. 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Seyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal : MIPA UNSRAT*.
- Mukhrani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *J. Kesehatan*. 7(2): 21-26
- Nuria, M. C., & Faizatun, A. (2009). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha Curcas* L) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro*, 5(2).
- Oloruntola, D. A., Dada, E. O., Osho, I. B., & Ogundolie, O. O. 2017. Effects of Hydro-ethanolic Leaf Extract of *Tithonia diversifolia* on Parasitaemia Level, Serum Metabolites and Histopathology of Organs in Swiss Albino Mice Infected with *Plasmodium berghei* NK65. *Asian Journal of Medicine and Health*. 6(2):5-10.
- Oludare, A. O., Oyedeji, S., Ajao, A., & Aregbesola, O. (2016). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil extracted from *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) flower. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 1(4), 169-176.

- Omoboyowa. 2015. Anti – Typhoid aid Ghepatic Response In Salmonella Typhi Infected Rats Treated With Etanol Leaf Extract of *Thithonia diversifolia* Pelagia Research Library 5(8):34-36
- Orwa C., Mutua A., Kindt R. Jamnadas R., Anthony S. 2009. Agroforestry database: a tree reference and selection guide version 4.0 world agroforestry centre, Kenya.
- Oyewole, I O., Ibadapo, C A., Moronkola, D O., Aduola A.O, Adeoye, G.O, Anyasor G.N and Obansa J.A. 2008. Anti-maralial and Repellent Activities of *Tithoniadiversifolia* Leaf Exstract. J.of Med. Plants Resarch 2 (8) : 171-175
- Passoni, F. D., Oliveira, R. B., Chagas-Paula, D. A., Gobbo-Neto, L., & Da Costa, F. B. 2013. Repeated-dose toxicological studies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray and identification of the toxic compounds. Journal of ethnopharmacology, 147(2), 389-394.
- Phan, M. A., Wang, J., Tang, J., Lee, Y. Z., & Ng, K. 2013. Evaluation of a-glucosidase inhibition potential of some flavonoids from Epidemium Brevicornum. Elvesier. 53:495-496.
- Raina, L. 2011. Ensiklopedi tumbuhan berhasiat obat. Jakarta: Salemba Medika : 13 – 19.
- Rantam, F. A., Utomo, D. N., & Suroto, H. (2017, July). Comparative Study: The Role of Stem Cell In Damaged Cell. In 1st International Conference in One Health (ICOH 2017). Atlantis Press.
- Reagan, W. J., Irizarry-Rovira, A., Poitout-Belissent, F., Bolliger, A. P., Ramaiah, S. K., Travlos, G., & Bone Marrow Working Group of ASVCP/STP. 2011. Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. Toxicologic pathology, 39(2), 435-448.
- Rifati, L. 2012. Induksi In-Vitro Sel Punca Mesenkim Dari Tali Pesar Manusia Menjadi *Limbal Mesenchymal Stem Cell*:Puslitbang Biomedis dan Teknologi Kesehatan Dasar Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.PS1 44.Jakarta
- Roggen, E.L. 2011. *In vitro In vitro* toxicity testing in the twenty-first century. fronties in pharmacology. 1(3): 1-3
- Sasmita, F. W., Susetyarini, E., Husamah, & Pantiwati, Y. 2017. Efek Ekstrak Daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*) yang Diinduksi Alloxan. Biosfera. 34(1):222-31.
- Siregarr, F., & Hadijono, B. S. 2000. Uji Toksisitas Dengan Essei MTT. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, 7, 28-32.

- Smolin and Thoft's. The cornea: scientific foundations and clinical practice. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins:Philadelphia. 2005.
- Taofik M., E. Yuianti., A Barizi dan E.K Hayati. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Air Daun Paitan (*Tithoniadiversifolia*) Sebagai Bahan Insektisida Botani Untuk Pengendalian Hama Tungau Eriophyidae. *Alchemi* 2(1):104-157
- Tjitrosoepomo, G. 2004. Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta). Yogyakarta :GadjahMada University Press
- Tolosa, L., Donato, M. T., & Gómez-Lechón, M. J. 2015. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (pp. 333-348). Humana Press, New York, NY.
- Wahyuni, M., Saleh, C., & Kartika, R. 2015. Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) Dan Uji Aktivitas Antibakteri Daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 12(2).
- Wardhana, AH dan N. Diana. 2014. Aktivitas Biolarvasidal Ekstrak Metanol Daun Kipair (*Tithoniadiversifolia*) Terhadap Larva Lalat *Chrysomiabezziana*. *JITV*. 19(1): 43-51
- Wayuni M, Saleh C, Kartika R, Bahar A. Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) Dan Uji Aktivitas Antibakteri Daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *J Kim Mulawarman* .2015; 12:79-82
- Winarno, W. 2011. Isolasi, Produksi Dan Penyimpanan Sel Punca (Stem Cell) Dari Sumsum Tulang (Bone Marrow) Mencit Sebagai Sumber Mesenchymal Stem Cell.
- Yuliati, A. 2005. Viabilitas sel fibroblas BHK-21 pada permukaan resin akrilik rapid heat cured (Viability of fibroblast BHK-21 cells to the surface of rapid heat cured acrylic resins). *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 38(2), 68-72.
- Zhang, M., Aguilera, D., Das, C., Vasquez, H., Zage, P., Gopalakrishnan, V., & Wolff, J. 2007. Measuring cytotoxicity: a new perspective on LC50. *Anticancer research*, 27(1A), 35-38.
- Zirconia, A., Kurniasih, N., & Amalia, V. 2015. Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dengan Metode Pereaksi Geser. *al-Kimiya*, 2(1), 9-17.

LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji Statistik Kelompok Perlakuan

1.1. One Sample Kolmogorov Smirnov Test

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			Sel
N			36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean		2.6617
	Std. Deviation		.65054
Most Extreme Differences	Absolute		.131
	Positive		.131
	Negative		-.115
Test Statistic			.131
Asymp. Sig. (2-tailed)			.126

- a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

1.2. Test of Homogeneity of Variances (Levene Test)

Test of Homogeneity of Variances			
Sel			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.582	5	30	.195

1.3. ANOVA

ANOVA					
Sel					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.631	5	2.926	483.573	.000
Within Groups	.182	30	.006		
Total	14.812	35			



1.4. Descriptives

Descriptives								
Sel								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Media	6	1.7800	.04648	.01897	1.7312	1.8288	1.72	1.81
Kontrol Sel	6	3.8100	.07321	.02989	3.7332	3.8868	3.72	3.93
MTT 0,5%	6	2.1933	.04131	.01687	2.1500	2.2367	2.14	2.22
MTT 0,25%	6	2.5633	.05820	.02376	2.5023	2.6244	2.50	2.63
MTT 0,125%	6	2.6267	.08914	.03639	2.5331	2.7202	2.50	2.75
MTT 0,0625%	6	2.9967	.12549	.05123	2.8650	3.1284	2.87	3.19
Total	36	2.6617	.65054	.10842	2.4416	2.8818	1.72	3.93

1.5. Post Hoc Test Homogenous Subsets

Sel						
Duncan ^a						
Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Kontrol Media	6	1.7800				
Kontrol Sel	6		2.1933			
0,5%	6			2.5633		
0,25%	6			2.6267		
0,125%	6				2.9967	
0,0625%	6					3.8100
Sig.		1.000	1.000	.169	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

1.6. Probit Analysis

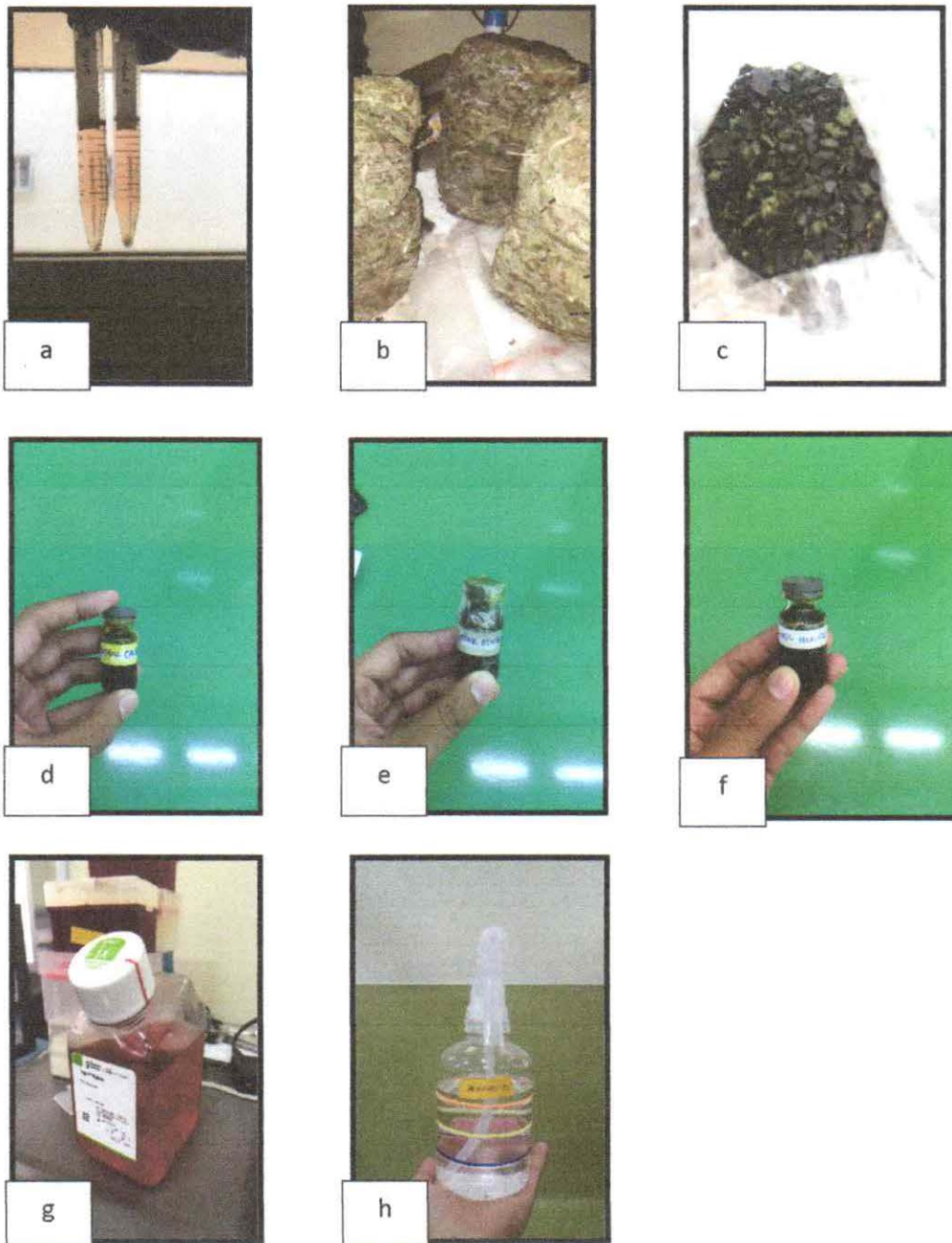
Confidence Limits							
	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	,010	8,495	2,817	91,583	,929	,450	1,962
	,020	4,746	1,835	36,424	,676	,264	1,561
	,030	3,280	1,396	20,310	,516	,145	1,308
	,040	2,484	1,136	13,096	,395	,056	1,117
	,050	1,982	,961	9,170	,297	-,017	,962
	,060	1,635	,832	6,774	,213	-,080	,831
	,070	1,381	,733	5,196	,140	-,135	,716
	,080	1,188	,655	4,100	,075	-,184	,613
	,090	1,035	,590	3,307	,015	-,229	,519
	,100	,912	,536	2,714	-,040	-,271	,434
	,150	,540	,358	1,206	-,267	-,446	,081
	,200	,356	,256	,643	-,448	-,592	-,192
	,250	,249	,187	,384	-,603	-,728	-,416
	,300	,181	,136	,251	-,742	-,867	-,600
	,350	,135	,096	,179	-,871	-1,018	-,748
	,400	,101	,066	,135	-,994	-1,181	-,869
	,450	,077	,045	,106	-1,112	-1,351	-,974
	,500	,059	,030	,085	-1,229	-1,525	-1,070
	,550	,045	,020	,069	-1,345	-1,703	-1,163
	,600	,034	,013	,056	-1,464	-1,886	-1,255
	,650	,026	,008	,045	-1,586	-2,077	-1,348
	,700	,019	,005	,036	-1,715	-2,279	-1,445
	,750	,014	,003	,028	-1,854	-2,498	-1,550
	,800	,010	,002	,022	-2,009	-2,742	-1,665
	,850	,006	,001	,016	-2,190	-3,027	-1,799
	,900	,004	,000	,011	-2,417	-3,387	-1,966
	,910	,003	,000	,010	-2,472	-3,474	-2,007
	,920	,003	,000	,009	-2,532	-3,569	-2,051
	,930	,003	,000	,008	-2,598	-3,673	-2,099

,940	,002	,000	,007	-2,671	-3,789	-2,153
,950	,002	,000	,006	-2,754	-3,921	-2,214
,960	,001	,000	,005	-2,853	-4,077	-2,286
,970	,001	,000	,004	-2,973	-4,269	-2,375
,980	,001	,000	,003	-3,134	-4,523	-2,492
,990	,000	,000	,002	-3,387	-4,925	-2,677

a. Logarithm base = 10.

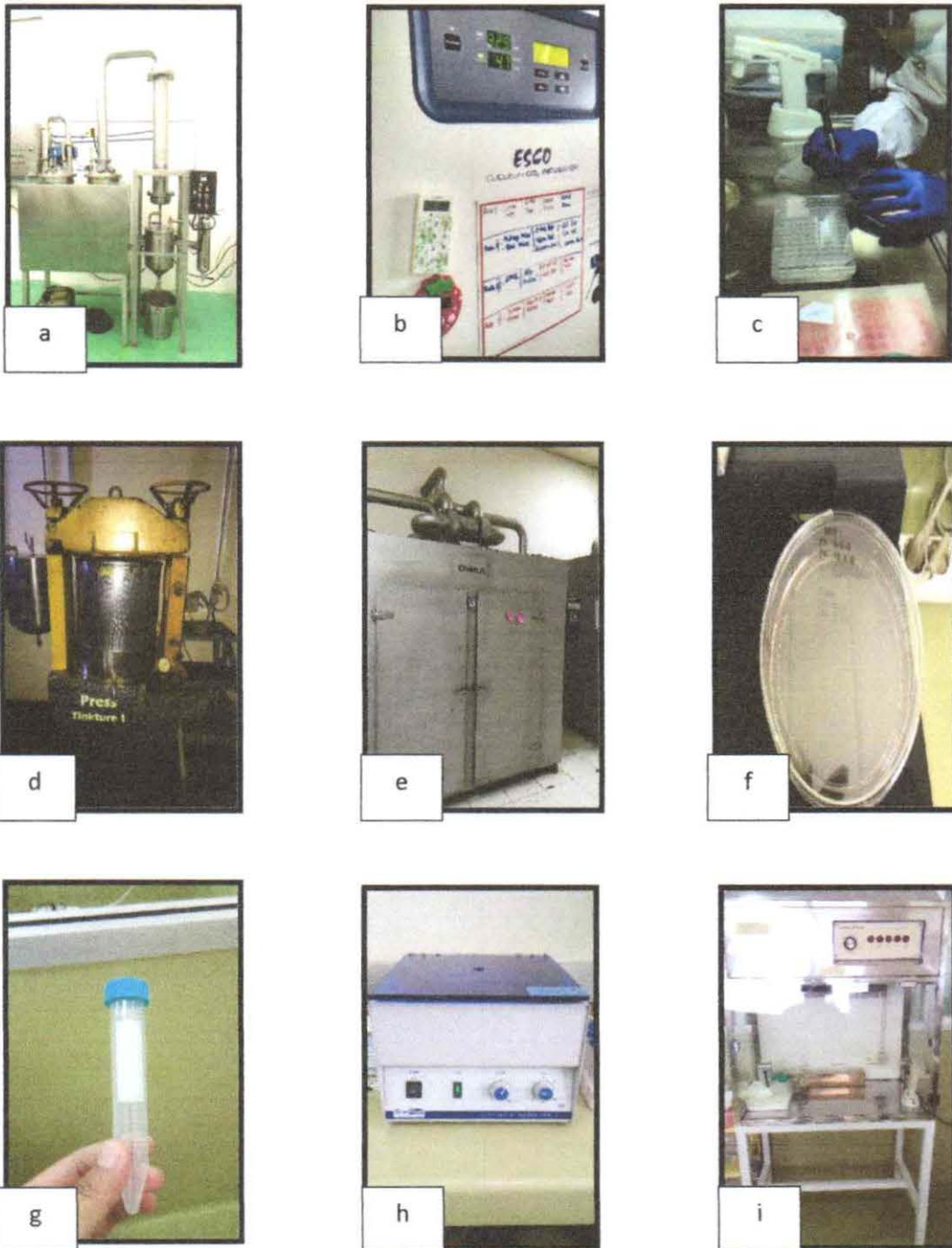
Lampiran 2. Dokumentasi Bahan (Gambar 1) dan Alat Penelitian (Gambar 2)

Gambar 1



Gambar 1 : Bahan Penelitian (a) *Limbal Mesenchymal Stem Cell Kelinci* (b) Daun Kembang bulan Kering (c) Hasil Ekstraksi Maserasi Daun Kembang bulan (d) Ekstrak Cair Daun Kembang Bulan (e) Ekstrak Kental Daun Kembang Bulan (f) Hasil Mixing Ekstrak Daun Kembang Bulan (g) media α MEM untuk menutrisi sel kultur (h) alkohol 70%.

Gambar 2



Gambar 2 : Alat Penelitian (a) Ekstraksi Tank dan Evaporasi Tank (b) CO₂ Incubator (c) *Microplate 96 well* (d) *Press Tincture* (e) Oven (f) *Cawan Petridish* (g) *15 ml Conical Tube* (h) *Alat Centrifuge* (i) *Laminar Air Flow*.



j



k

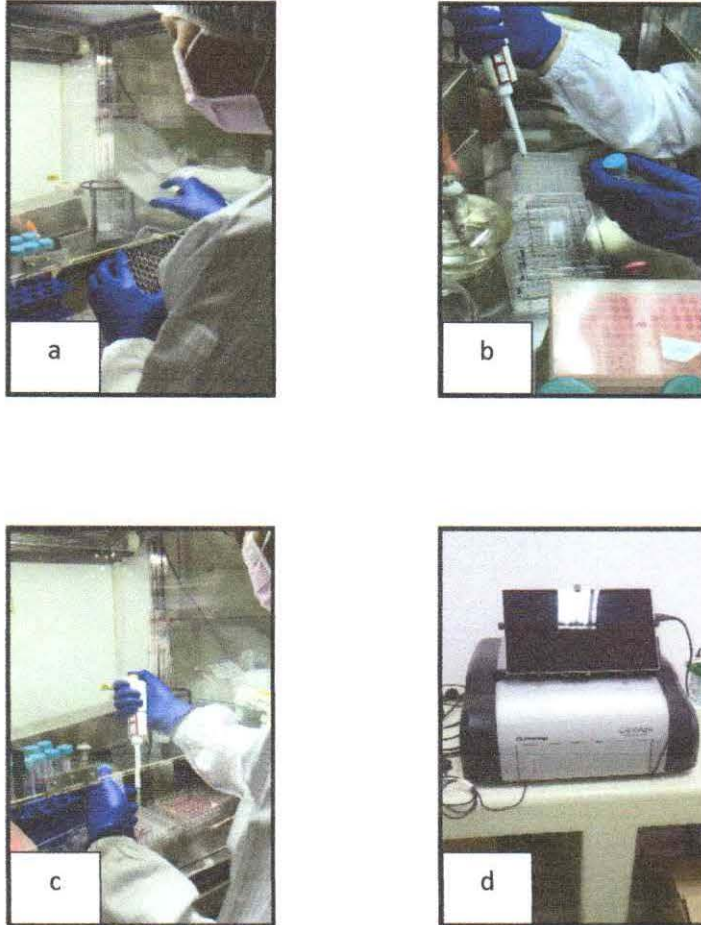


l

Gambar 2 : Alat Penelitian (j) *Tube Mixer* (k) Mikroskop (l) *Micropipette*

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian

Tahap perlakuan penelitian dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 3 : Dokumentasi Penelitian (a) Setelah sampel diinkubasi selama 24 jam, dibuang dan dicuci dengan PBS 3-5 kali (b) Pemberian pereaksi MTT dalam PBS ke dalam setiap microplate diinkubasi selama 4 jam (c) Pemberian DMSO pada setiap microplate (d) Pengukuran nilai absorbansi menggunakan *ELISA reader*

Lampiran 4. Hasil *Optical Density*



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN STEM CELL

Gedung Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga, Kampus C, Mulyorejo-Surabaya, 60115

Telp. 031-5950930. website: www.indonesian-stemcell.com dan Email: stemcell.ind@gmail.com

MTT Ekstrak Daun Kembang Bulan - Sel MSC Limbal Kelinci

No	K.Med	K.sel	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%
1	0,095	0,447	0,147	0,187	0,195	0,249
2	0,096	0,441	0,143	0,211	0,209	0,267
3	0,094	0,473	0,145	0,191	0,216	0,317
4	0,098	0,428	0,148	0,204	0,226	0,249
5	0,093	0,436	0,144	0,197	0,190	0,265
6	0,096	0,422	0,150	0,213	0,214	0,294
Jumlah	0,383	1,789	0,583	0,793	0,846	1,082
Mean	0,128	0,596	0,194	0,264	0,282	0,361
Jumlah % sel hidup			14,243	29,176	32,945	49,726

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{OD perlakuan} - \text{OD media}}{\text{OD kontrol sel} - \text{OD media}} \times 100\%$$

Surabaya, 26 November 2018

Mengetahui,

Ketua Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell



Dr. Purwati, dr. SpPD., K-PTI, FINASIM

Lampiran 5. Tabel Persentase Arcsin

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.0	0	0.57	0.81	0.99	1.15	1.28	1.40	1.52	1.62	1.72
0.1	1.81	1.90	1.99	2.07	2.14	2.22	2.29	2.36	2.43	2.50
0.2	2.56	2.63	2.69	2.75	2.81	2.87	2.92	2.98	3.03	3.09
0.3	3.14	3.19	3.24	3.29	3.34	3.39	3.44	3.49	3.53	3.58
0.4	3.63	3.67	3.72	3.76	3.80	3.85	3.89	3.93	3.97	4.01
0.5	4.05+	4.09	4.13	4.17	4.21	4.25+	4.29	4.33	4.37	4.40
0.6	4.44	4.46	4.52	4.55+	4.59	4.62	4.66	4.69	4.73	4.76
0.7	4.80	4.83	4.87	4.90	4.93	4.97	5.00	5.03	5.07	5.10
0.8	5.13	5.16	5.20	5.23	5.26	5.29	5.32	5.35+	5.38	5.41
0.9	5.44	5.47	5.50	5.53	5.56	5.59	5.62	5.65+	5.68	5.71
1	5.74	6.02	6.29	6.55	6.80	7.04	7.27	7.49	7.71	7.92
2	8.13	8.33	8.53	8.72	8.91	9.10	9.28	9.46	9.63	9.81
3	9.98	10.14	10.31	10.47	10.63	10.78	10.94	11.09	11.24	11.39
4	11.54	11.68	11.83	11.97	12.11	12.25	12.39	12.52	12.66	12.79
5	12.92	13.05+	13.18	13.31	13.44	13.56	13.69	13.81	13.94	14.06
6	14.18	14.30	14.42	14.54	14.65+	14.77	14.89	15.00	15.12	15.23
7	15.34	15.45+	15.56	15.68	15.79	15.89	16.00	16.11	16.22	16.32
8	16.43	16.54	16.64	16.74	16.85	16.95+	17.05+	17.16	17.26	17.36
9	17.46	17.56	17.66	17.76	17.85+	17.95+	18.05	18.15	18.24	18.34
10	18.44	18.53	18.63	18.72	18.81	18.91	19.00	19.09	19.19	19.28
11	19.37	19.46	19.55+	19.64	19.73	19.82	19.91	20.00	20.09	20.18
12	20.27	20.36	20.44	20.53	20.62	20.70	20.79	20.88	20.96	21.05
13	21.13	21.22	21.30	21.39	21.47	21.56	21.64	21.72	21.81	21.89
14	21.97	22.06	22.14	22.22	22.30	22.38	22.46	22.55	22.63	22.71
15	22.79	22.87	22.95	23.03	23.11	23.19	23.26	23.34	23.42	23.50
16	23.58	23.66	23.73	23.81	23.89	23.97	24.04	24.12	24.20	24.27
17	24.35+	24.43	24.50	24.58	24.65+	24.73	24.80	24.88	24.95+	25.03
18	25.10	25.18	25.25+	25.33	25.40	25.48	25.55	25.62	25.70	25.77
19	25.84	25.92	25.99	26.06	26.13	26.21	26.28	26.35	26.42	26.49
20	26.56	26.64	26.71	26.78	26.85+	26.92	26.99	27.06	27.13	27.20
21	27.28	27.35	27.42	27.49	27.56	27.63	27.69	27.76	27.83	27.90
22	27.97	28.04	28.11	28.18	28.25	28.32	28.38	28.45+	28.52	28.59
23	28.66	28.73	28.79	28.86	28.93	29.00	29.06	29.13	29.20	29.27
24	29.33	29.40	29.47	29.53	29.60	29.67	29.73	29.80	29.87	29.93
25	30.00	30.07	30.13	30.20	30.26	30.33	30.40	30.46	30.53	30.59
26	30.66	30.72	30.79	30.85+	30.92	30.98	31.05	31.11	31.18	31.24
27	31.31	31.37	31.44	31.50	31.56	31.63	31.69	31.76	31.82	31.88
28	31.95	32.01	32.08	32.14	32.20	32.27	32.33	32.39	32.45	32.52
29	32.58	32.65	32.71	32.77	32.83	32.90	32.96	33.02	33.09	33.15
30	33.21	33.27	33.34	33.40	33.46	33.52	33.58	33.65	33.71	33.77
31	33.83	33.89	33.96	34.02	34.08	34.14	34.20	34.27	34.33	34.39
32	34.45	34.51	34.57	34.63	34.70	34.76	34.82	34.88	34.94	35.00
33	35.06	35.12	35.18	35.24	35.30	35.37	35.43	35.49	35.55	35.61
34	35.67	35.73	35.79	35.85	35.91	35.97	36.03	36.09	36.15+	36.21
35	36.27	36.33	36.39	36.45+	36.51	36.57	36.63	36.69	36.75+	36.81
36	36.87	36.93	36.99	37.05	37.11	37.17	37.23	37.29	37.35	37.41
37	37.47	37.52	37.58	37.64	37.70	37.76	37.82	37.88	37.94	38.00
38	38.06	38.12	38.17	38.23	38.29	38.35+	38.41	38.47	38.53	38.59
39	38.65	38.70	38.76	38.82	38.88	38.94	39.00	39.06	39.11	39.17
40	39.23	39.29	39.35	39.41	39.47	39.52	39.58	39.64	39.70	39.76
41	39.82	39.87	39.93	39.99	40.05	40.11	40.16	40.22	40.28	40.34
42	40.40	40.46	40.51	40.57	40.63	40.69	40.74	40.80	40.86	40.92
43	40.98	41.03	41.09	41.15	41.21	41.27	41.32	41.38	41.44	41.50
44	41.55+	41.61	41.67	41.73	41.78	41.84	41.90	41.96	42.02	42.07