

SKRIPSI

ARIE AYU MALAHAYATI

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETHER
DAN EKSTRAK METANOL LUMUT HATI
(*MARCHANTIA CF. PLANIOBA* STEPH.) TERHADAP
KULTUR SEL MIELOMA MENCIT DENGAN
METODE VIABILITAS SEL**



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

Lembar Pengesahan

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETHER
DAN EKSTRAK METANOL LUMUT HATI
(*MARCHANTIA CF. PLANIOBA* STEPH.) TERHADAP
KULTUR SEL MIELOMA MENCIT DENGAN
METODE VIABILITAS SEL**

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2004**

Oleh :

**ARIE AYU MALAHAYATI
050012302**

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

**Drs. Sukardiman, Apt., MS
NIP : 131801629**

**Dr. Bambang Prajogo, EW., Apt., MS
NIP: 131470933**

“... Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu; Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.”

AL-QUR'AN
Surat Al-Baqarah 216

*Kupersembahkan Skripsi Ini Sebagai
Hadiah Untuk Papa dan Mama Tercinta
serta Adekku Tersayang*
TERIMA KASIH ATAS KASIH SAYANG YANG BEGITU INDAH

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, nikmat, hidayah dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETER DAN EKSTRAK METANOL LUMUT HATI (*MARCHANTIA* CF. *PLANILOBA* STEPH.) TERHADAP KULTUR SEL MIELOMA MENCIT DENGAN METODE VIABILITAS SEL”, untuk memenuhi persyaratan guna mencapai gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Skripsi ini bisa diselesaikan oleh penulis atas bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, perkenankanlah penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
2. Drs. Sukardiman, Apt., MS selaku dosen pembimbing utama yang senantiasa membimbing dan memberikan semangat serta bantuan baik material maupun spiritual.
3. Dr. Bambang Prajogo EW., Apt., MS selaku pembimbing serta yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Drs. Achmad Fuad, Apt., MS, Drs. Abdul Rahman, Apt., MS dan Dra. Aty Widnyawaruyanti, Apt., Msi, selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan kritik dan saran kepada penulis.
5. Drh. Dharmawan, selaku Kepala Laboratorium Vaksin Mamalia Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya, atas ijin dan fasilitas yang diberikan dalam penelitian ini.
6. Drh. Nurul Qomariyah, Bu Sri, Bu Panca, Bu Is serta seluruh petugas di Laboratorium Zoonosis PUSVETMA, atas semua bantuan, bimbingan dan waktu yang diberikan sehingga penelitian ini dapat selesai.
7. Drs. Herra Studiawan, Apt., MSi dan Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi, atas bantuan dan saran yang diberikan.

8. Dra. Hj. Juniar Soerjono, Apt., MS, selaku dosen wali yang telah memberi dorongan kepada penulis dalam menjalankan proses perkuliahan.
9. Keluargaku tercinta : papa dan mama atas kasih sayang dan pengorbanannya, adekku Malahayani atas semangat dan dukungannya, serta kakek dan nenek atas doanya.
10. Teman-teman seperjuangan Lumutpepaya2000 : Putri, Fitriah, Rina, Fika, Umi, Nadya dan Rice, atas semangat dan kerjasamanya.
11. Karyawan dan karyawan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, khususnya laboran di Bagian Ilmu Bahan Alam yang telah banyak membantu penulis.
12. Teman-teman angkatan 2000, atas indahnya persahabatan dan kebersamaan.
13. Sahabat-sahabat Fillah : Miftah, Erny Nurul, Etik dan Emy, atas indahnya ukhuwah.
14. Teman-teman kost : Aini, Mimin, Reni, Mbak Yenny, Mbak Shinta, Prima, dan Rahel, atas semangat dan dukungannya.
15. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah banyak membantu dan memberikan dukungan kepada penulis.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumbangan bagi ilmu pengetahuan dan dapat berguna bagi penelitian selanjutnya. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari pembaca.

Surabaya, 18 Agustus 2004

Penulis

RINGKASAN

Kanker merupakan penyebab utama kematian di negara berkembang–satu dari lima populasi di Eropa dan Amerika utara diperkirakan mati karena kanker. Di negara maju, kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular. Usaha pengobatan kanker telah banyak dilakukan, tetapi belum memberikan hasil yang memuaskan sehingga banyak penderita kanker dalam stadium dini memilih pengobatan alternatif.

Penelitian di Jepang yang dilakukan oleh Asakawa terhadap lumut hati (*Marchantia polymorpha* L.) menunjukkan bahwa ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia polymorpha* L.) dengan senyawa bioaktif terbesar marchantin A, menunjukkan aktivitas antikanker terhadap KB *Cell*. Aktivitas antikanker tersebut ditunjukkan pula oleh jenis yang lain dari marga *Marchantia* seperti *Marchantia palaceae* Bertol var *diptera* (Mont) dan *Marchantia tosana* Steph. Berdasarkan persamaan marga dan jumlah populasi yang cukup besar serta mengacu pada penelitian tersebut, maka dilakukan penelitian terhadap jenis lain dari marga *Marchantia* yang tumbuh di Indonesia, yaitu lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.).

Lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut eter, kemudian dilanjutkan dengan pelarut metanol. Ekstrak cair yang didapat kemudian diuapkan hingga di dapat ekstrak kering. Dari ekstrak eter dan ekstrak metanol dibuat larutan uji dengan konsentrasi 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm dan 1 ppm. Sebagai kontrol positif digunakan larutan etoposida dengan konsentrasi 100 ppm, 10 ppm dan 1 ppm. Larutan uji, larutan kontrol negatif dan larutan kontrol positif ditambahkan ke dalam suspensi sel mieloma dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi selama 24 jam dilakukan penghitungan jumlah sel yang hidup dan yang mati menggunakan Hemositometer dengan pewarnaan tripan biru. Viabilitas sel dinyatakan sebagai presentase sel yang hidup terhadap jumlah sel total.

Data hasil percobaan diolah dengan metode statistik analisis varian satu arah dan analisis probit menggunakan program SPSS 10.0 for Windows. Hasil analisis diperoleh harga $p < 0,000$ yang lebih kecil daripada harga derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) baik untuk ekstrak eter maupun ekstrak metanol. Hal ini menunjukkan ada perbedaan bermakna minimal satu pasang hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit antar larutan uji dan untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda bermakna dilanjutkan dengan analisis LSD. Dari analisis probit didapatkan harga LC_{50} dari ekstrak eter lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) yaitu pada konsentrasi 163,21 ppm dan untuk ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) yaitu pada konsentrasi 358,95 ppm. Sedangkan untuk kontrol positif etoposida didapatkan harga LC_{50} pada konsentrasi 5,47 ppm.

ABSTRACT

Some research in Japan resulted that methanol extract of livewort (*Marchantia polymorpha* L.) showed anticancer activity against KB cell. Other species of genus *Marchantia*, which are *Marchantia palacea* Bertol var *diptera* (Mont) and *Marchantia tosana* Steph. also showed the same activity. Based on similarity of the genus, this research will determine anticancer activity of livewort (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.).

The ether extract and methanol extract of livewort (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) were tested for its anticancer activity using viability test method on cell culture of mice myeloma. The myeloma cell were incubated in RPMI media contained 10 % of Fetal Bovine Serum (FBS). The concentration of ether extract and methanol extract of livewort (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) were 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm and 1 ppm. Etoposide was used as possitive control in three different concentration (100 ppm, 10 ppm and 1 ppm) while RPMI 1640 was used as negative control. Their solution were added into myeloma cell culture in microwell plate and then incubated for 24 hours, at 37°C in CO₂ incubator. Determination of anticancer activity used trypan blue exclusion method, with parameter value was viability of myeloma cell.

Analysis of varian of the data showed that ether extract and methanol extract of livewort (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) have anticancer activity against cell culture of mice myeloma. Probit analysis of the data indicates the LC₅₀ of ether extract of (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) was 163,21 ppm and methanol extract of (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) was 358,95 ppm.

Thin layer chromatography was used to identify the phytochemical content of livewort (*Marchantia* cf. *Planiloba* Steph.). The thin layer chromatogram profile suggested that ether and methanol extract of livewort (*Marchantia* cf. *Planiloba* Steph.) contains terpenoid or steroid compounds.

Keywords : Ether extract and methanol extract of livewort (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.), cell culture of mice myeloma, anticancer, viability test.

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman	6
2.1.1 Klasifikasi Tanaman	6
2.1.2 Nama Daerah	6
2.1.3 Morfologi Tanaman	6
2.1.4 Penyebaran Tanaman	7
2.1.5 Kandungan Tanaman	8
2.1.6 Khasiat Tanaman	8
2.2 Tinjauan Tentang Tumor dan Kanker	8
2.3 Tinjauan Tentang Antikanker	9
2.4 Tinjauan Tentang Kultur Sel	12
2.5 Tinjauan Tentang Sel Mieloma	13
2.6 Tinjauan Tentang Metode Viabilitas Sel	14

	2.7 Tinjauan Tentang Etoposida	16
BAB III	KERANGKA KONSEPTUAL	18
BAB IV	METODE PENELITIAN	21
	4.1 Bahan Penelitian	21
	4.1.1 Bahan Tanaman	21
	4.1.2 Kultur Sel Mieloma	22
	4.1.3 Bahan Kimia Dan Bahan Lain	22
	4.2 Alat-Alat	22
	4.3 Rancangan Penelitian	23
	4.4 Tahapan Percobaan	26
	4.5 Prosedur Kerja	26
	4.5.1 Pembuatan ekstrak eter dan ekstrak metanol	26
	4.5.2 Pembuatan larutan uji	27
	4.5.3 Pembuatan larutan kontrol positif	29
	4.5.4 Pembuatan larutan kontrol negatif	30
	4.5.5 Preparasi kultur sel mieloma	31
	4.5.6 Menghitung sel dengan Hemositometer	31
	4.5.7 Percobaan uji aktivitas antikanker	32
	4.5.8 Identifikasi ekstrak	33
	4.6 Analisis Data	34
	4.6.1 Analisis Varian Satu Arah (Anava Satu Arah)	34
	4.6.2 Analisis Probit	34
BAB V	HASIL PENGAMATAN	35
	5.1 Hasil Ekstraksi	35
	5.2 Pembuatan Larutan Uji	35
	5.2.1 Pembuatan Larutan Ekstrak Eter Dan Ekstrak Metanol	
	5.2.2 Pembuatan Larutan Kontrol Positif	36
	5.2.3 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif	36
	5.3 Hasil Uji Viabilitas	36

5.4 Hasil Uji Aktivitas Antikanker	37
5.5 Hasil Analisis Data	41
5.5.1 Anava Satu Arah Hasil Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol Lumut Hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.)	41
5.5.2 Analisis Probit Hasil Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol Lumut Hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.)	43
5.5.3 Analisis Probit Hasil Uji Aktivitas Antikanker Etoposida	44
5.6 Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak	45
BAB VI PEMBAHASAN	49
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	55
7.1 Kesimpulan	55
7.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

Tabel IV.1	Kelompok perlakuan pada kultur sel mieloma dalam tiap percobaan	23
Tabel IV.2	Rancangan percobaan	24
Tabel V.1	Hasil pembuatan ekstrak kering lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.)	35
Tabel V.2	Hasil perhitungan presentase viabilitas kultur sel mieloma mencit sebelum perlakuan	36
Tabel V.3	Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.) dan diinkubasi selama 24 jam	37
Tabel V.4	Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.) dan diinkubasi selama 24 jam	38
Tabel V.5	Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan etoposida sebagai kontrol positif dan diinkubasi selama 24 jam	40
Tabel V.6	Anava satu arah hasil uji aktivitas antikanker ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.)	41
Tabel V.7	Hasil perhitungan aktivitas ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.) dengan analisis LSD	42
Tabel V.8	Anava satu arah hasil uji aktivitas antikanker ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.)	42
Tabel V.9	Hasil perhitungan aktivitas ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.) dengan analisis LSD	43
Tabel V.10	Hasil penentuan harga LC ₅₀ larutan uji ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.)	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1	Skema kerangka konseptual	20
Gambar 4.1	Lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.)	21
Gambar 4.2	Skema rancangan penelitian uji aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.)	25
Gambar 4.3	Skema pembuatan larutan uji	28
Gambar 4.4	Skema pembuatan larutan kontrol positif	30
Gambar 4.5	Alat Hemositometer	32
Gambar 5.1	Grafik hubungan antara konsentrasi larutan ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.) vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	38
Gambar 5.2	Grafik hubungan antara konsentrasi larutan ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.) vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	39
Gambar 5.3	Grafik hubungan antara konsentrasi larutan ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.) vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	39
Gambar 5.4	Grafik hubungan antara konsentrasi larutan etoposida vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	40
Gambar 5.5	Kurva probit log antara konsentrasi larutan ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.) vs rata-rata % mortalitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	44
Gambar 5.6	Kurva probit log antara konsentrasi larutan ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.) vs rata-rata % mortalitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	44

Gambar 5.7	Kurva probit log antara konsentrasi larutan etoposida vs rata-rata % mortalitas sel mieloma mencit setelah perlakuan	45
Gambar 5.8	Kromatografi lapis tipis ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.)	45
Gambar 5.9	Profil kandungan kimia ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.) pada panjang gelombang 254 nm dengan KLT-Densitometri	46
Gambar 5.10	Profil kandungan kimia ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.) pada panjang gelombang 254 nm dengan KLT-Densitometri	47
Gambar 5.11	Profil kandungan kimia ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.) pada panjang gelombang 521 nm dengan KLT-Densitometri	47
Gambar 5.12	Profil kandungan kimia ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia</i> cf. <i>planiloba</i> Steph.) pada panjang gelombang 521 nm dengan KLT-Densitometri	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran-1	Gambar mikroskopis sel mieloma	59
Lampiran-2	Komposisi Media RPMI	60
Lampiran-3	Anava satu arah hasil uji aktivitas antikanker ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.)	61
Lampiran-4	Analisis probit hasil uji aktivitas antikanker ekstrak eter lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.)	62
Lampiran-5	Anava satu arah hasil uji aktivitas antikanker ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.)	64
Lampiran-6	Analisis probit hasil uji aktivitas antikanker ekstrak metanol lumut hati (<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.)	65
Lampiran-7	Analisis probit hasil uji aktivitas antikanker etoposida	67
Lampiran-8	Surat keterangan determinasi	69

DAFTAR SINGKATAN

ANAVA	= Analisis Varian
DAPI	= <i>4'6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	= <i>Dulbecco's Modification of Eagles Medium</i>
DMSO	= Dimetil Sulfoksida
DNA	= <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
FBS	= <i>Fetal Bovine Serum</i>
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
LAFC	= <i>Laminar Air Flow Cabinet</i>
LC ₅₀	= <i>Lethal Concentration 50</i>
LSD	= <i>Least Significant Difference</i>
MPOC-21	= <i>Mineral oil plasmacytoma-21</i>
RNA	= <i>Ribose Nucleic Acid</i>
RPMI	= <i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SPSS	= <i>Statistic Program for Social Science</i>
UV	= <i>Ultra Violet</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan penyebab utama kematian di negara berkembang—satu dari lima populasi di Eropa dan Amerika utara diperkirakan mati karena kanker. Di negara maju, kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular (Rang, 1995; Nafrialdi, 1995).

Insidens kanker di Indonesia diperkirakan 100 per 100.000 penduduk per tahun atau sekitar 200.000 penduduk per tahun. Pada survey kesehatan rumah tangga yang diselenggarakan Badan Litbangkes, ditemukan bahwa 1,4 % dari seluruh kematian disebabkan oleh kanker. Angka ini meningkat menjadi 3,4 % pada tahun 1980 dan 4,3 % pada tahun 1986. Dewasa ini, WHO menyatakan bahwa sepertiga dari seluruh kejadian kanker dapat dicegah, sepertiga lagi dapat disembuhkan dan sepertiga sisanya dapat dibebaskan dari rasa nyeri jika diberikan pengobatan (Dalimartha, 2003).

Kanker adalah suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali. Sel-sel kanker akan terus membelah diri terlepas dari pengendalian pertumbuhan. Bila pertumbuhan ini tidak cepat dihentikan dan diobati maka sel kanker akan tumbuh menyusup ke jaringan lain sekitarnya (invasif) dan menyebar (metastatis) ke tempat yang lebih jauh melalui pembuluh darah atau pembuluh getah bening, selanjutnya akan tumbuh kanker baru di tempat lain dan akhirnya menyebabkan kematian penderita (Katzung, 1995; Dalimartha, 2003).

Kanker terjadi karena sel kehilangan responnya untuk mengontrol pertumbuhan dan melanjutkan pembelahan sehingga menghasilkan sel lebih banyak. Penyebab dari beberapa kanker dapat ditimbulkan oleh lingkungan (kimiaawi, radiasi dan infeksi) dan latar belakang genetik (Spector, 1989; Kee, 1994).

Ada tiga cara untuk menyembuhkan kanker, yaitu : pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Penggunaan masing-masing cara diatas tergantung pada tipe tumor dan tingkat perkembangannya (Rang, 1995).

Kemoterapi kanker merupakan masalah yang kompleks, karena sulit untuk menemukan obat antikanker yang selektif bekerja pada sel kanker tanpa mengganggu sel normal. Obat kemoterapi atau obat antikanker yang ideal seharusnya dapat selektif membunuh sel kanker saja tanpa mempengaruhi atau membahayakan jaringan normal sehingga tidak menyebabkan efek samping terhadap pemakainya (Rang, 1995; Katzung, 1995).

Sampai sekarang belum dapat ditemukan obat antikanker yang memenuhi kriteria tersebut diatas, disamping itu dilaporkan adanya beberapa jenis kanker yang resisten terhadap obat-obat kemoterapi. Sehingga dewasa ini telah dilakukan usaha-usaha penelitian terhadap pencarian bahan obat antikanker yang lebih selektif yaitu melalui penapisan ataupun isolasi bahan obat dari tanaman, desain rasional senyawa obat baru ataupun penggunaan terapi gen (Katzung, 1995).

Penggunaan bahan alam sebagai obat bukanlah hal baru. Sejak ada manusia di permukaan bumi, maka sejak itu pula mereka sudah mengobati penyakit yang dideritanya dengan menggunakan bahan alam. Tanaman merupakan sumber obat yang berperan penting dalam kesehatan sekitar 80 % populasi di dunia (Sutrisno, 1983; Roja and Rao, 2000).

Sampai saat ini obat tradisional dianggap dan diharapkan berperan dalam usaha-usaha pencegahan dan pengobatan penyakit, termasuk penyakit kanker. Penderita kanker dalam stadium dini ada yang menghindari operasi dan memilih pengobatan alternatif. Banyak alasan yang diberikan penderita, seperti ketidakmampuan biaya, rasa takut dioperasi, melihat penderita kanker lain yang tetap menderita setelah diradiasi atau dikemoterapi, sehingga mereka lebih memilih pengobatan tradisional. Salah satunya adalah dengan tumbuhan obat yang bersifat antikanker. Mereka meminum ramuan dari akar, batang, daun, biji, bunga, buah bahkan tubuh binatang (Dalimartha, 2003).

Tumbuhan yang mempunyai khasiat sebagai antikanker selama ini masih didominasi oleh tumbuhan tingkat tinggi, misalnya sambiloto (*Andrographis paniculata*), pepaya (*Carica papaya*), tapak dara (*Vinca rosea*), cerme (*phyllantus acidus*) dan masih banyak yang lainnya (Dalimartha, 2003).

Tumbuhan tingkat rendah ternyata juga mempunyai khasiat sebagai antikanker. Salah satu tumbuhan tingkat rendah yang mempunyai khasiat sebagai

antikanker adalah tumbuhan lumut (*Bryophyta*). Pada mulanya tumbuhan lumut diabaikan karena mempunyai rasa dan aroma yang tidak enak sewaktu diremas. Setelah diadakan penelitian lebih lanjut, ternyata tumbuhan lumut mempunyai aktivitas biologi, misalnya : antialergi, antikanker, antibakteri, pembunuh serangga dan regulator pertumbuhan tanaman (Asakawa, 1981).

Salah satu kelas dari tumbuhan lumut yang diteliti oleh peneliti asal Jepang yaitu Asakawa adalah kelas Hepaticae (lumut hati). Menurut Asakawa, beberapa Hepaticae mempunyai aktivitas biologis seperti : antialergi, antikanker, antimikroba dan regulator pertumbuhan tanaman dan aktivitas ini disebabkan oleh terpenoid atau aromatis lipofilik yang terdapat dalam Hepaticae (Asakawa, 1984).

Penelitian yang dilakukan oleh Asakawa terhadap lumut hati (*Marchantia polymorpha* L.) menunjukkan bahwa ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia polymorpha* L.) dengan senyawa bioaktif terbesar marchantin A, menunjukkan aktivitas antikanker terhadap KB *cell*. Aktivitas antikanker tersebut ditunjukkan pula oleh jenis yang lain dari marga *Marchantia* seperti *Marchantia palaceae* Bertol var *diptera* (Mont) dan *Marchantia tosona* Steph. (Asakawa, 1984).

Penelitian selanjutnya yang dilakukan oleh Asakawa mendapatkan komponen aktif lainnya yaitu sesquiterpen dan sedikit monoterpen. Ada kurang lebih 7 jenis marchantin dan 30 jenis terpenoid yang sudah ditemukan oleh Asakawa dalam marga *Marchantia*. Sedangkan penelitian pendahuluan kandungan kimia yang dilakukan oleh Aty Widyawaruyanti terhadap marga lain dari suku Marchantiaceae yaitu lumut hati (*Weisnerella* cf. *denudata* (Mitten.) Steph.) didapatkan senyawa sterol dan senyawa sterol ini ternyata juga mempunyai aktivitas antikanker (Asakawa, Toyota, 1984; Widyawaruyanti, 1994; Awad, 2000).

Untuk mendapatkan kandungan terpenoid, metode yang dilakukan oleh Asakawa adalah dengan mengekstraksi komponen yang bersifat nonpolar dari lumut hati dengan pelarut organik nonpolar misalnya *n*-heksana, *n*-pentana atau dietil eter. Kemudian dilanjutkan dengan mengekstraksi komponen yang bersifat polar dari lumut hati dengan pelarut organik polar, misalnya metanol atau etil asetat (Glime, 1988).

Di Indonesia juga telah dilakukan penelitian terhadap lumut hati (*Marchantia geminata* Reinw., Bl., Nees) oleh Putra Hernawan dan menunjukkan aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit. Hal ini menunjukkan bahwa dari marga yang sama namun jenis yang berbeda mempunyai aktivitas yang sama (Asakawa, 1984, Hernawan, 2002).

Berdasarkan persamaan marga dan jumlah populasi yang cukup besar serta mengacu pada penelitian tersebut, maka akan dilakukan penelitian terhadap jenis lain dari marga *Marchantia* yang tumbuh di Indonesia, yaitu lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) Dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel didasarkan pada kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan-bahan yang bersifat toksik, kemudian dilakukan perhitungan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati setelah dilakukan pewarnaan dengan tripan biru memakai alat Hemositometer dengan menggunakan mikroskop cahaya.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel ?

1.3 Tujuan Penelitian

- (1) Melakukan uji aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.
- (2) Menentukan LC_{50} dari uji aktivitas antikanker dari ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.

1.4 Hipotesis Penelitian

Ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan bisa memberikan manfaat untuk masyarakat yaitu sebagai landasan untuk penelitian selanjutnya mengenai aktivitas lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dalam pengobatan penyakit kanker, sehingga dapat dimanfaatkan untuk pengembangan dan peningkatan daya guna tumbuhan lumut sebagai tanaman obat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Tanaman

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Divisi : Bryophyta
 Kelas : Hepaticae
 Bangsa : Marchantiales
 Suku : Marchantiaceae
 Marga : *Marchantia*
 Jenis : *Marchantia cf. planiloba* Steph.
 (Tjitrosoepomo, 1986)

2.1.2 Nama Daerah

Jawa : lumut ati
 Madura : lomot ateh
 Toraja : limulun
 (Tjitrosoepomo, 1986)

2.1.3 Morfologi Tanaman

Habitus : Tubuh tumbuhan lumut berupa thalus seperti lembaran-lembaran daun belum terdapat akar yang sesungguhnya melainkan hanya rizoid–rizoid berbentuk benang atau kadang-kadang memang menyerupai akar.

Thalus : Seperti pita, ± 0,5–1 cm lebarnya agak tebal berdaging bercabang-cabang menggarpu dan mempunyai satu rusuk tengah yang menonjol. Pada sisi bawah thalus terdapat selapis sel–sel yang menyerupai daun yang dinamakan sisik–sisik perut atau sisik–sisik ventral. Pada sisi bawah thalus terdapat rizoid–rizoid yang bersifat fototrop negatif dan dinding selnya mempunyai penebalan ke dalam yang bentuknya seperti sekat–sekat

yang tidak sempurna. Permukaan atas thalus mempunyai lapisan kutikula, oleh sebab itu hampir tidak mungkin dilalui oleh air. Jika di lihat dari atas thalus itu terlihat berpetak-petak. Di bawah tiap–tiap petak di dalam thalus terdapat suatu ruang udara, dan di tengah tiap petak terdapat suatu ruang udara, dan di tengah tiap petak terdapat suatu liang udara.

Liang udara : Liang udara menghubungkan ruang udara dengan dunia luar. Dinding lebih tinggi dari permukaan thalus untuk mencegah masuknya air. Dinding liang udara terdiri dari atas 4 cincin, masing–masing cincin terdiri atas 4 sel. Pada dasar ruang udara terdapat sel–sel yang mengandung kloroplas dan merupakan jaringan asimilasi.

Gametangium : Gametangium di dukung oleh suatu cabang thalus yang tumbuh tegak. Bagian bawah thalus ini tergulung, merupakan suatu tangkai. Didalam gulungan ini terdapat saluran dengan benang–benang rhizoid. Bagian tersebut mengadakan percabangan menggarpu hingga akhirnya membentuk suatu badan seperti bintang.

(Tjitrosoepomo, 1986)

2.1.4 Penyebaran Tanaman

Kebanyakan lumut hati hidup di tempat–tempat yang basah, oleh sebab itu tubuhnya mempunyai struktur yang higromorf. Bentuk lain jarang ditemukan, meskipun ada pula yang terdapat pada tempat–tempat yang kering, misalnya pada kulit–kulit pohon, di atas tanah atau batu cadas, sehingga tubuhnya perlu mempunyai struktur yang xeromorf. Dalam tubuh terdapat alat penyimpan air, atau dapat menjadi kering tanpa mengakibatkan kematiannya. Yang bersifat epifit ada yang dapat hidup pada daun pohon–pohon dalam rimba daerah tropika, dan karena hidupnya di atas daun itu lumut hati merupakan suatu bentuk ekologi yang khusus yang dinamakan epifit (Tjitrosoepomo, 1986).

2.1.5 Kandungan Tanaman

Kandungan dari lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.), belum diketahui, namun pada umumnya kandungan thalus dari marga *Marchantia* adalah senyawa turunan golongan bis bibenzil yaitu marchantin dan golongan terpenoid. Ada kurang lebih 7 jenis marchantin dan 30 jenis terpenoid yang sudah ditemukan oleh Asakawa dalam marga *Marchantia* (Asakawa, 1984).

Penelitian pendahuluan kandungan kimia yang dilakukan oleh Aty Widyawaruyanti terhadap marga lain dari suku Marchantiaceae yaitu *Weisnerella* cf. *denudata* (Mitten.) Steph. didapatkan senyawa sterol (Asakawa, Toyota, 1984; Widyawaruyanti, 1994). Selain itu, kandungan dari kelas Hepaticae adalah golongan ester, bibenzil, flavonoid, *miscellaneous aromatic* dan minyak atsiri. (Mues and Zinsmeister, 1988).

2.1.6 Khasiat Tanaman

Khasiat dari lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) belum diketahui, namun secara umum suku Marchantiaceae mempunyai aktivitas antimikroba, diuretik, antikanker, pembunuh serangga, regulator pertumbuhan tanaman dan obat alergi kulit (Asakawa, 1981).

2.2 Tinjauan Tentang Tumor Dan Kanker

Tumor adalah istilah umum untuk menunjukkan adanya pertumbuhan tidak normal dari masa atau jaringan yang tidak membahayakan kehidupan. Tumor terbentuk karena adanya mutasi pada biosintesis sel, yaitu kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi atau ada pengaturan kembali, adanya adisi dan integrasi bahan genetik virus ke dalam gen dan adanya perubahan ekspresi genetik. Tumor yang membahayakan (*malignant tumor*) disebut : kanker, sedang penyebab kanker disebut karsinogen (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Kanker terjadi karena sel kehilangan responnya untuk mengontrol pertumbuhan dan melanjutkan pembelahan sehingga menghasilkan sel lebih banyak. Penyebab dari beberapa kanker dapat ditimbulkan oleh lingkungan (kimiaawi, radiasi dan infeksi) dan latar belakang genetik (Spector, 1989; Kee, 1994).

Sifat umum kanker ialah sebagai berikut :

- (1) Pertumbuhan berlebihan umumnya berbentuk tumor.
- (2) Gangguan diferensiasi dari sel dan jaringan sehingga mirip jaringan.
- (3) Bersifat invasif, mampu tumbuh di jaringan sekitarnya.
- (4) Bersifat metastatik, menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru.
- (5) Memiliki hereditas bawaan yaitu turunan sel kanker juga dapat menimbulkan kanker.
- (6) Pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel.

(Nafrialdi, 1995)

Beberapa perbedaan morfologi sel kanker dari sel normal adalah :

- (1) Bentuk dan ukuran sel lebih besar.
- (2) Inti sel kelihatan membesar disebabkan jumlah sitoplasma berkurang.
- (3) Anak inti mengalami perubahan bentuk dan ukuran.
- (4) Mitokondria sangat berkurang jumlahnya.

(Anderson, 1991)

2.3 Tinjauan Tentang Antikanker

Obat antikanker adalah senyawa kemoterapetik yang digunakan untuk pengobatan tumor yang membahayakan kehidupan (kanker). Obat antikanker sering dinamakan pula sebagai obat sitotoksik, sitostatik, atau antineoplasma. Tujuan utama kemoterapi kanker adalah merusak secara selektif sel tumor yang berbahaya tanpa mengganggu sel normal. (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Antikanker diharapkan memiliki toksisitas selektif, artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel jaringan normal. Terapi hanya dapat dikatakan berhasil baik, bila dosis yang digunakan dapat mematikan sel tumor yang ganas dan tidak terlalu mengganggu sel normal yang berproliferasi (Nafrialdi, 1995).

Ada beberapa perbedaan mekanisme dari obat antikanker dalam mengganggu pertumbuhan dan pembelahan sel. Perbedaan mekanisme ini

berkaitan dengan biokimia molekuler dari sel. Proses kehidupan sel merupakan suatu siklus yang terdiri beberapa fase sebagai berikut :

(1) Fase G_1

Fase G_1 adalah fase istirahat, merupakan fase yang mendominasi siklus hidup dari sel. Fase ini terjadi setelah sel mengalami pembelahan (mitosis). Selama Fase G_1 tidak terjadi sintesa DNA, tetapi sintesa RNA dan protein tetap terjadi secara normal. Setelah fase G_1 sel kemudian menuju fase S. Kadang - kadang, setelah mengalami pembelahan (mitosis), sel bisa menuju ke tipe lain dari fase istirahat yaitu Fase G_0 dimana sel keluar dari siklus tetapi masih bisa untuk berproliferasi (berkembang biak).

(2) Fase S

Fase S adalah fase sintesa DNA yang terjadi setelah Fase G_1 dan didahului dengan peningkatan laju sintesa RNA. Hasilnya adalah replikasi DNA dan produksi kromatid.

(3) Fase G_2

Fase G_2 adalah fase istirahat lain yang terjadi segera setelah fase S. Sintesa DNA berhenti selama sintesa protein dan RNA berlanjut.

(4) Fase M (mitosis)

Selama fase mitosis, terjadi pengurangan laju sintesa protein dan RNA. Pada fase ini kromosom berkondensasi dan kromatid berpisah, sel terbelah menjadi dua, dan terjadi fase istirahat lagi (Grahame-smith, 1992).

Obat-obat antikanker dapat dibagi menjadi beberapa kategori, yaitu :

(1) Senyawa pengalkilasi

Senyawa pengalkilasi adalah senyawa reaktif yang dapat mengalkilasi DNA, RNA dan enzim-enzim tertentu. Senyawa pengalkilasi dapat membentuk senyawa kationik antara yang tidak stabil, diikuti pemecahan cincin membentuk ion karbonium reaktif. Ion ini bereaksi, melalui reaksi alkilasi, membentuk ikatan kovalen dengan gugus-gugus donor elektron, seperti gugus-gugus karboksilat, amin, fosfat, dan tiol, yang terdapat pada struktur asam amino, asam nukleat dan protein, yang sangat dibutuhkan untuk biosintesis sel. Reaksi ini membentuk hubungan melintang (*cross-linking*)

antara dua rangkaian DNA dan mencegah mitosis. Akibatnya proses pembentukan sel terganggu dan terjadi hambatan pertumbuhan sel kanker.

(2) Antimetabolit

Antimetabolit adalah senyawa yang dapat menghambat jalur metabolik yang penting untuk kehidupan dan reproduksi sel kanker, melalui penghambatan asam folat, purin, pirimidin dan asam amino, serta jalur nukleosida pirimidin, yang diperlukan dalam sintesis DNA. Hambatan replikasi DNA ini dapat secara langsung maupun tidak langsung sehingga menyebabkan sel tidak berkembang biak dan mengalami kematian.

(3) Antikanker produk alam

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

Antikanker produk alam dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu :

(1) Antibiotika antikanker

Beberapa antibiotik yang mula-mula dikembangkan sebagai senyawa antibakteri ternyata didapatkan mempunyai efek sitotoksik tinggi. Efek samping tersebut dievaluasi dan kemudian dikembangkan menjadi obat-obat antikanker. Salah satu contoh antibiotika antikanker adalah Mitomisin C yang didapat dari kultur *Streptomyces caespitosus* dan *S. verticillatus*. Mekanisme kerjanya sebagai antikanker adalah dengan *cross-linking complementary DNA-strands* sehingga menghambat sintesis DNA.

(2) Antikanker produk tanaman

Contoh tanaman yang mempunyai aktivitas antikanker adalah *Vinca rosea Linn*. Tanaman ini menghasilkan alkaloida vinblastin dan vinkristin yang mekanisme kerjanya mengikat tubuli dan menghambat pembentukan komponen mikrotubuli pada kumparan mitosis sehingga metafase berhenti.

(3) Antikanker produk rekayasa genetika

Mekanisme kerja antikanker dari produk rekayasa genetika belum diketahui dengan jelas.

(4) Hormon

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

- (1) Hormon androgen : testosteron propionat, testolakton, fluoksimesteron.
- (2) Hormon estrogen : dietilbesterol, klortiasin dan etinil estradiol
- (3) Hormon progestin : hidroksiprogesteron.
- (4) Glukokortikoid : prednison, kortison, dan deksametason.
- (5) Antiestrogen : tamoksifen sitrat.
- (6) Antiandrogen : flutamid.

(Siswandono dan Soekardjo, 2000)

2.4 Tinjauan Tentang Kultur Sel

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari dispersi sel yang diambil dari jaringan asli, dari kultur primer, atau dari *cell line* dengan menggunakan metode enzimatik, mekanik, atau kimia untuk menghasilkan suspensi sel yang kemudian ditanam ke dalam media yang sesuai (Freshney, 1987).

Kultur sel primer adalah kultur sel yang diperoleh secara langsung dengan mengisolasi jaringan segar tertentu sampai dilakukan subkultur. Kultur sel primer biasanya heterogen, tetapi lebih mencerminkan jenis sel dan menyatakan sifat-sifat spesifik jaringan asalnya. Sedangkan *cell line* adalah hasil pembiakan secara berulang-ulang ataupun hasil transformasi dari kultur sel primer. Pada *cell line* sel-selnya lebih homogen tetapi dapat kehilangan sifat-sifat khusus sel dan sifat diferensiasi (Wilson, 1998; Freshney, 1987).

Media yang sering digunakan untuk kultur sel mamalia adalah RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) dan *Dulbecco's Modification of Eagles Medium* (DMEM). Untuk mendukung pertumbuhan sel dalam kultur, maka perlu ditambahkan serum, yaitu *Fetal Bovine Serum* (FBS). Untuk menghindari kontaminasi dari bakteri dan jamur, maka perlu juga ditambahkan antibiotik ke dalam media. Antibiotik yang sering digunakan adalah Penicillin, Streptomycin,

dan Amphotericin B. Sedangkan untuk mengantisipasi bakteri yang resisten terhadap Penicillin dan Streptomycin biasanya digunakan Gentamycin (Bangun, 1990).

Prinsip dasar pembiakan kultur sel secara *in vitro* yaitu dengan cara memindahkan atau mengambil sel yang akan diteliti pada jaringan asal. Kemudian sel ditempatkan dalam wadah kultur yang memiliki permukaan pertumbuhan dan nutrisi yang cukup sebagai media kultur 37°C, lingkungan gas (5% CO₂/95% O₂) dan pH 7,4-7,7. Media yang digunakan merupakan campuran kompleks dari karbohidrat, asam amino, garam-garam, vitamin, hormon, dan faktor pertumbuhan. Keadaan garam dalam media adalah isotonik untuk menjaga ketidakseimbangan osmotik. Bikarbonat sering ditambahkan sebagai sistem dapar bersama lingkungan CO₂ sehingga kultur dapat dipelihara pada pH optimal untuk pertumbuhan. *Phenol red* biasa ditambahkan dalam media sebagai indikator pH yang disebabkan kontaminasi bakteri. Vitamin dan hormon terdapat dalam jumlah relatif rendah yang digunakan sebagai faktor dalam mendukung pertumbuhan sel (Dendy, 1976).

Pada penelitian ini digunakan sistem kultur sel sebagai metode alternatif menggantikan hewan coba, hal ini disebabkan oleh beberapa hal :

- (1) Studi tentang sel pada binatang tidak praktis karena kesulitan dalam mengidentifikasi sel, mengendalikan kebiasaan binatang, dan membedakan efek intrinsik sel dengan efek yang berasal dari interaksi antara banyak tipe sel yang ada dalam organisme.
- (2) Pada kultur sel, lingkungan kultur sel dapat dikendalikan.
- (3) Tipe dari sel target dapat ditentukan.
- (4) Perubahan sel selama perlakuan dengan bahan karsinogen dapat diuji.
- (5) Hasil karsinogen dapat dideterminasi.

Digunakan kultur *cell line* karena kemudahan dalam inisiasi sel dan sel bisa dikembangkan dalam waktu yang tidak terbatas (Darnell, 1990).

2.5 Tinjauan Tentang Sel Mieloma

Sel mieloma adalah salah satu jenis sel tumor hasil transformasi sel-sel pembentuk antibodi yang akhirnya menjadi malignan. Pemunculan sel mieloma

pada hewan coba mencit, dapat dilakukan dengan pemberian senyawa karsinogen golongan hidrokarbon aromatis seperti minyak mineral melalui rute intraperitoneal secara berturut-turut selama tiga hari dengan harapan akan muncul tumor atau kanker satu tahun kemudian (Indrawati, 1999).

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

2.6 Tinjauan Tentang Metode Viabilitas Sel

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

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

Kerusakan atau kematian sel diikuti adanya perubahan integritas membran dan ini dapat diketahui dengan menggunakan pewarnaan. Sel yang mati bersifat permeable terhadap zat warna tertentu sehingga dapat menyerap warna, sedangkan sel yang hidup bersifat impermeabel dan tidak dapat menyerap warna. Viabilitas sel dinyatakan sebagai presentase sel yang hidup atau yang tidak

terwarnai. Zat warna yang dapat digunakan antara lain nigrosin, tripan biru dan eritrosin (Freshney, 1987; Suntoro, 1983).

Untuk penghitungan jumlah sel dapat digunakan metode atau alat antara lain (Freshney, 1987; Jaime, 1999) :

(1) *Cell Counting*

Metode *Cell Counting* ada 3 macam :

- (1) Metode Hemositometer
- (2) Metode *Electronic Particle Counting*
- (3) Metode *Coulter Cell Counter*

Dalam penelitian ini digunakan metode *Cell Counting* dengan metode Hemositometer karena cara ini lebih mudah dilaksanakan dan tidak membutuhkan banyak biaya dibandingkan dengan metode *Cell Counting* yang lain (*Electronic Particle Counting* dan *Coulter Cell Counter*)

(2) *Cell Weight*

Ada 2 macam cara yang digunakan untuk menghitung jumlah sel dengan metode penentuan berat sel (*cell weight*), yaitu berat basah (*wet weight*) dan berat kering (*dry weight*). Cara berat basah tidak digunakan jika melibatkan sejumlah sel dengan ukuran yang besar karena adanya cairan intraseluler bisa menyebabkan kesalahan penghitungan. Sedangkan berat kering jarang digunakan karena mempunyai kelemahan baik untuk *unfixed cell* maupun *fixed cell*. Untuk *unfixed cell*, garam yang ada dalam media bisa mempengaruhi berat sel dan untuk *fixed cell* akan kehilangan berat molekul intraseluler dan lemak yang juga akan mempengaruhi berat sel.

(3) *DNA Content*

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

(1) Menentukan *DNA Content* dari sel dengan metode Hoechst 33258.

Sel dihomogenkan pada dapar pH 7,4 dan dipusingkan. Endapan sel dicampur dengan Hoechst 33258 dan emisi fluorosensinya diukur. Emisi fluorosensi timbul karena interaksi antara warna dan Hoechst 33258

dengan DNA pada pH 7,4. Metode ini membandingkan DNA *double helix* yang masih utuh.

(2) Menentukan DNA *Content* dari sel dengan metode DAPI.

Sel lisis dicampur dengan DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) pada kondisi gelap dan fluoresensinya di ukur pada panjang gelombang UV panjang dengan fluorometer.

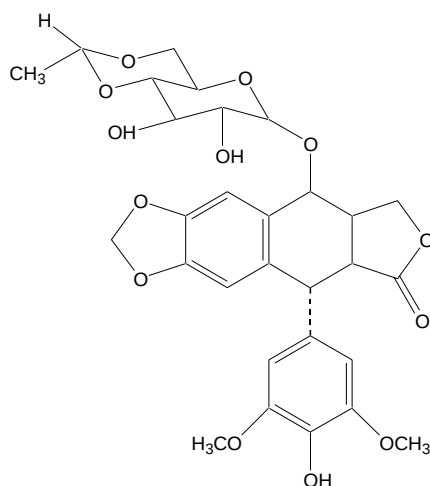
2.7 Tinjauan Tentang Etoposida

Etoposida merupakan antikanker semisintetik turunan dari tanaman *Podophyllum peltatum*. Etoposida digunakan untuk pengobatan karsinoma paru, kanker testis, koriokarsinoma, leukemia mielogenous akut dan limfoma (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Sampai sekarang mekanisme kerja etoposida sebagai antikanker belum diketahui dengan pasti. Tetapi diduga dapat menghambat enzim topoisomerase II. Hambatan ini terjadi pada 2 fase siklus hidup sel kanker, yaitu fase G_1 dan fase S. Pada fase G_1 hambatan terjadi antara pembelahan akhir dan pembentukan DNA replikasi, sedangkan pada fase S hambatan terjadi pada saat replikasi DNA. Interaksi tersebut menyebabkan fragmentasi/kerusakan DNA (Synder, 1997).

Dengan dihambatnya aktivitas enzim topoisomerase II oleh etoposida maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama, akibatnya terjadi fragmentasi/kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses dalam sel khususnya proses replikasi DNA, serta diakhiri dengan kematian sel kanker (Anonim, <http://www.tevauoncology.com>, 2004).

Dosis tinggi 10 $\mu\text{g/ml}$ atau lebih menyebabkan lisis dari sel yang mengalami mitosis, sedangkan dosis rendah 0,03-10 $\mu\text{g/ml}$ menghambat sel yang memasuki profase. Bentuk sediaannya adalah injeksi intravena dalam pelarut organik yang bebas dari pengawet. Biasanya penggunaannya ditambahkan ke dalam infus dekstrosa 5 % (Anonim, <http://medsafe.govt.nz>, 2004).



Gambar 2.1 Struktur Etoposida
(Siswandono dan Soekardjo, 2000)

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Penyakit kanker merupakan penyebab kematian terbesar kedua setelah penyakit kardiovaskular. Ada tiga cara untuk menyembuhkan kanker, yaitu : pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi (Nafrialdi, 1995; Rang, 1995).

Tujuan utama kemoterapi kanker adalah merusak secara selektif sel tumor yang berbahaya tanpa mengganggu sel normal. Tujuan ini sering mengalami kegagalan dan sampai sekarang masih sedikit sekali obat antikanker yang bekerja secara selektif untuk pengobatan jenis kanker tertentu (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

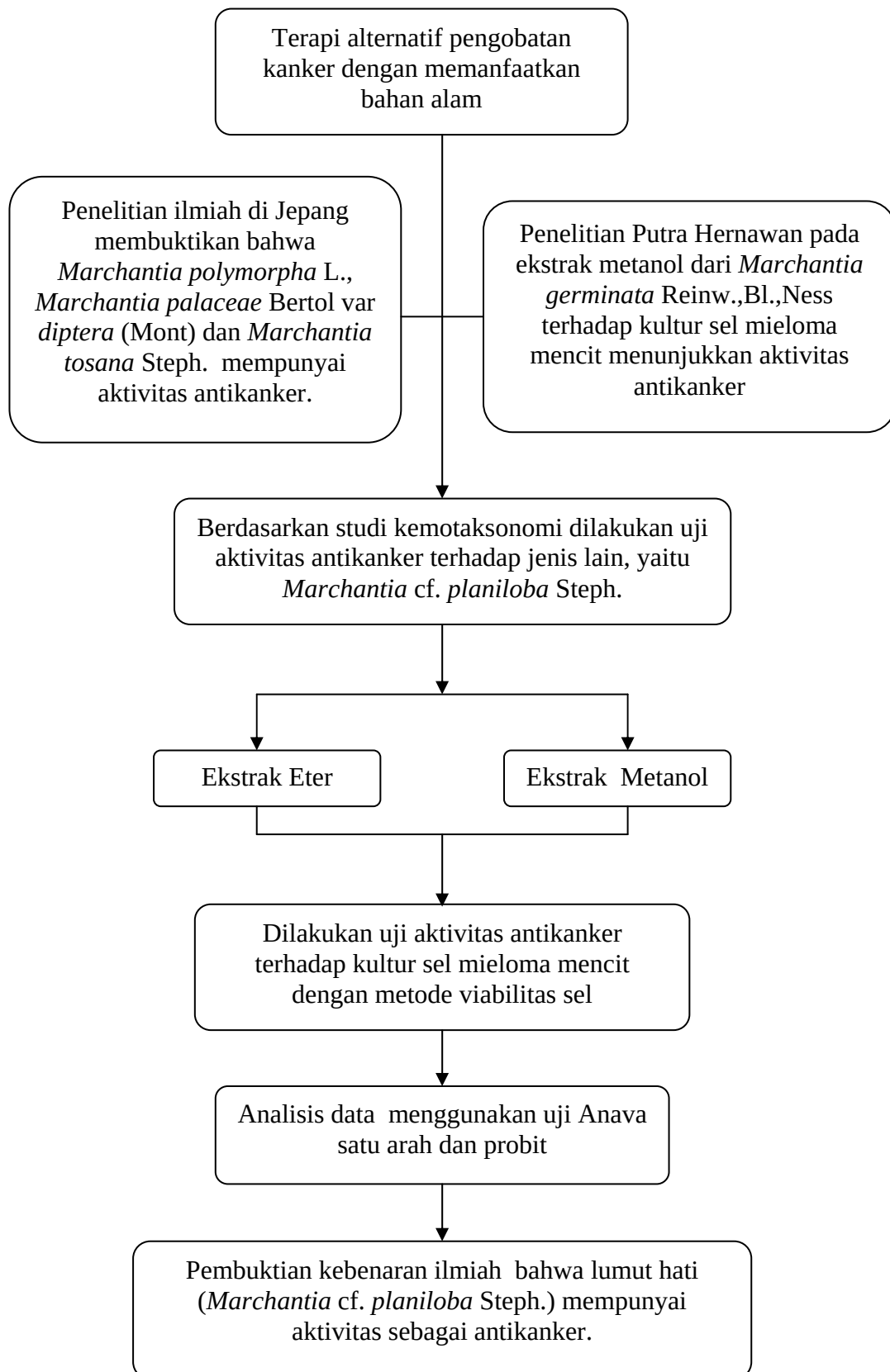
Penderita kanker dalam stadium dini ada yang menghindari operasi dan memilih pengobatan alternatif yaitu dengan tumbuhan obat yang bersifat antikanker. Salah satu tumbuhan yang mempunyai khasiat sebagai antikanker adalah tumbuhan lumut (*Bryophyta*), sedangkan tumbuhan lumut yang memiliki senyawa bioaktif sebagai antikanker salah satunya adalah lumut hati (*Marchantia polymorpha* L.) (Dalimartha, 2003; Asakawa, 1984).

Dalam penelitian yang dilakukan di Jepang, ekstrak metanol dari lumut hati (*Marchantia polymorpha* L.) dengan senyawa bioaktif terbesar marchantin A, menunjukkan aktivitas antikanker terhadap KB *cell*. Aktivitas antikanker tersebut ditunjukkan pula oleh jenis yang lain dari marga *Marchantia* seperti *Marchantia palaceae* Bertol var *diptera* (Mont) dan *Marchantia tosana* Steph. Begitu juga dengan penelitian yang dilakukan di Indonesia yaitu oleh Putra Hernawan terhadap *Marchantia geminata* Reinw., Bl., Nees juga menunjukkan aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit. Hal ini menunjukkan bahwa dari marga yang sama namun jenis yang berbeda mempunyai aktivitas yang sama (Asakawa, 1984, Hernawan, 2002).

Berdasarkan persamaan marga dan jumlah populasi yang cukup besar serta mengacu pada penelitian tersebut, maka akan dilakukan penelitian terhadap jenis lain dari marga *Marchantia* yang tumbuh di Indonesia, yaitu lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) Dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia* cf.

planiloba Steph.) pada kultur sel mieloma mencit dengan metode viabilitas sel didasarkan pada kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan–bahan yang bersifat toksik.

Data hasil percobaan dianalisis menggunakan uji Anava satu arah dengan taraf kepercayaan 95 % untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) terhadap viabilitas sel mieloma mencit. Selain itu, data hasil percobaan dianalisis dengan probit untuk mengetahui LC_{50} dari ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.).



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Tanaman

Bahan yang akan digunakan adalah lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) yang dikumpulkan dari daerah pegunungan Bromo, Probolinggo. Determinasi tanaman diperoleh dari *Herbarium Bogoriense*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, Bogor. Bagian lumut yang akan diteliti terlebih dahulu di cuci dengan air sampai bersih, kemudian dikeringkan. Pengeringan lumut tidak dilakukan dibawah sinar matahari langsung, melainkan dibiarkan kering di udara terbuka atau di angin-anginkan. Setelah cukup kering bahan tersebut diserbuk hingga menjadi serbuk yang halus.



Gambar 4.1 Lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

4.1.2 Kultur Sel Mieloma

Untuk kultur sel mieloma digunakan sel mieloma mencit P₃UI yang diperoleh dari Laboratorium Vaksin Pusat Veterinaria Farma Surabaya.

4.1.3 Bahan Kimia dan Bahan Lain

- (1) Metanol
- (2) Eter (dietil eter)
- (3) Larutan tripan biru
- (4) *Media Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI)
- (5) *Fetal bovine serum* (FBS)
- (6) Dimetil sulfoksida (DMSO)
- (7) Aquadest steril
- (8) Larutan *saline* (NaCl 0,9%)
- (9) Larutan injeksi Etoposid “Ebewe” 100 mg/5 ml (Ferron pharmaceutical)
- (10) *n*-Heksana
- (11) Etil asetat
- (12) Penisilin G (Sigma)
- (13) Streptomisin Sulfat (Meiji)
- (14) Kanamisin (Meiji)
- (15) NaHCO₃
- (16) HEPES

4.2 Alat-Alat

- (1) Bejana tertutup dan pengaduk
- (2) Lempeng KLT dengan fase diam Silica Gel 60 F₂₅₄
- (3) Botol kultur
- (4) Hemositometer (Nebaur)
- (5) *Rotavapour*
- (6) Mikroskop cahaya
- (7) Mikropipet (*Socorex*)
- (8) Tip mikropipet

- (9) Pipet tetes
- (10) Pipet volume
- (11) Penyaring *Buchner*
- (12) Vial
- (13) *Microwell plate* (isi 24 well)
- (14) Inkubator CO₂
- (15) *Microtube*
- (16) Cawan porselen
- (17) Autoklaf
- (18) Oven
- (19) *Laminar Air Flow Cabinet*
- (20) Labu ukur
- (21) Tabung sentrifus
- (22) *Cell counter*

4.3 Rancangan Penelitian

Dalam tiap percobaan, kultur sel mieloma terdapat dua perlakuan, yaitu :

Tabel IV.1 Kelompok perlakuan pada kultur sel mieloma dalam tiap percobaan

Kelompok I	Bahan Uji (Ekstrak Eter Dan Ekstrak Metanol)
Kelompok II	Kontrol Positif (Etoposida)
Kelompok III	Kontrol negatif (media RPMI mengandung DMSO)

Pada kelompok I, sel mendapatkan larutan bahan uji, masing-masing dengan kadar 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Pada kelompok II, sebagai kontrol positif digunakan etoposida untuk membuktikan bahwa bahan-bahan yang diberikan dan proses perlakuan pada kultur sel tidak menghambat kerja senyawa antikanker.

Pada kelompok III, sebagai kontrol negatif digunakan media RPMI yang sudah ditambahkan DMSO untuk memastikan bahwa apabila terdapat efek antikanker, maka efek ini tidak disebabkan oleh medianya dan proses perlakuan.

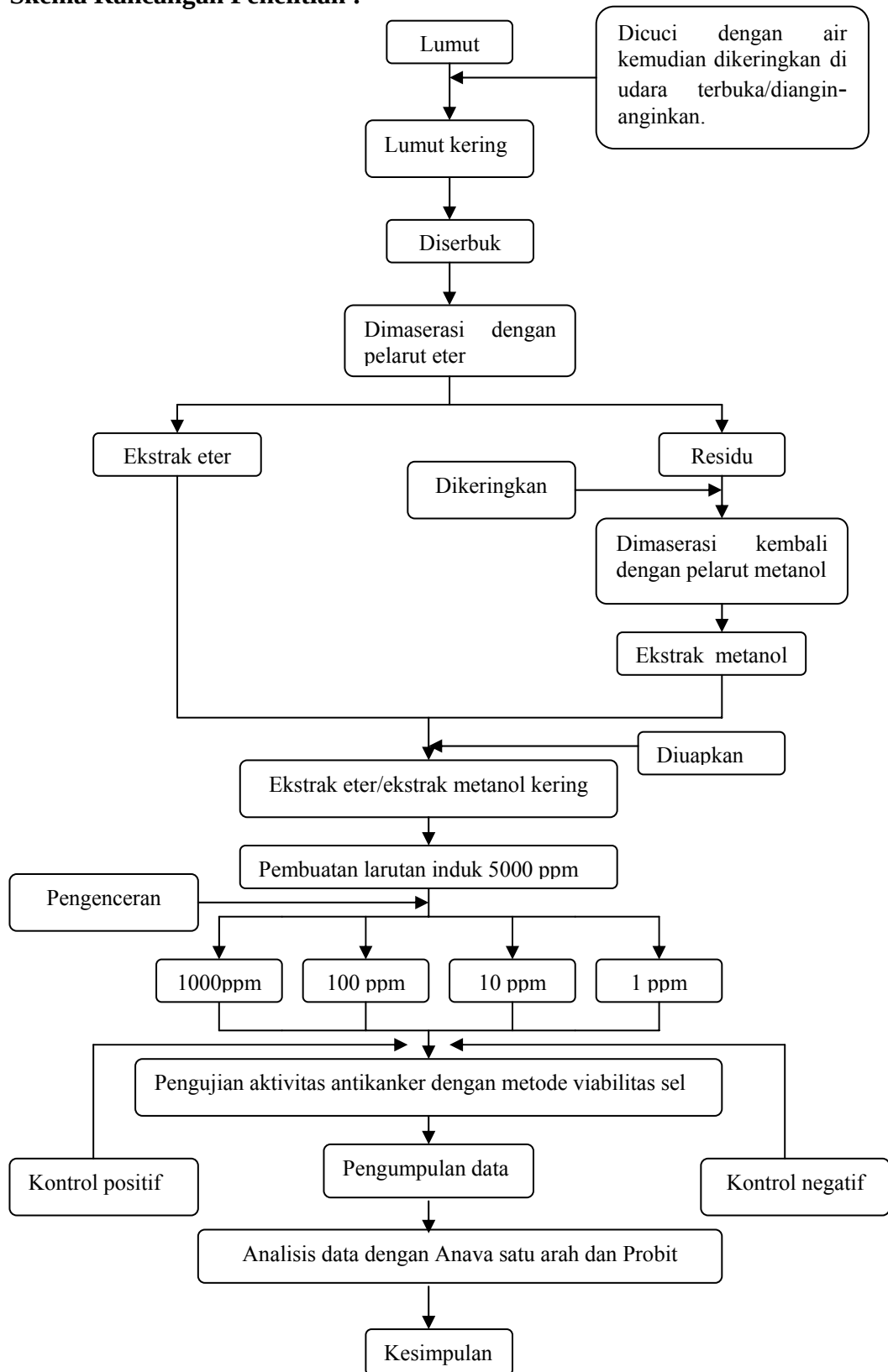
Masing-masing kadar pada kelompok I diwakili oleh tiga lubang pada *microwell plate*. Demikian juga kelompok II dan kelompok III, masing-masing

juga diwakili oleh tiga lubang pada *microwell plate*. Jadi, jumlah lubang pada *microwell plate* yang digunakan dalam tiap percobaan adalah 24.

Percobaan tiap bahan uji dapat digambarkan sebagai berikut :

Tabel IV.2 Rancangan percobaan

24 lubang <i>Microwell</i> <i>plate</i>	Kelompok I	Bahan uji 1000 ppm Bahan uji 100 ppm Bahan uji 10 ppm Bahan uji 1 ppm
	Kelompok II	Etoposida 100 ppm Etoposida 10 ppm Etoposida 1 ppm
	Kelompok III	Kontrol negatif

Skema Rancangan Penelitian :

Gambar 4.2 Skema rancangan penelitian uji aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

4.4 Tahapan percobaan

- (1) Pembuatan ekstrak eter dan ekstrak metanol bahan uji.
- (2) Pembuatan larutan uji.
- (3) Pembuatan larutan kontrol positif.
- (4) Pembuatan larutan kontrol negatif.
- (5) Preparasi kultur sel mieloma.
- (6) Menghitung sel dengan Hemositometer.
- (7) Percobaan uji aktivitas antikanker.
- (8) Identifikasi kandungan kimia ekstrak.

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Pembuatan Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol

Serbuk tanaman dimasukkan ke dalam bejana, ditambahkan eter hingga terendam seluruhnya, kemudian di tutup dan dibiarkan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam sambil sesering mungkin di aduk. Kemudian disaring dengan penyaring *Buchner* dan filtrat yang diperoleh ditampung. Ampas di maserasi lagi beberapa kali beberapa kali dengan pelarut yang baru dengan orientasi kandungan terpenoid dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase gerak (eluen) *n*-heksana : etil asetat (4 : 1) dan penampak noda anisaldehyd asam sulfat yang menghasilkan warna merah ungu. Maserasi dihentikan apabila setelah dilakukan orientasi tidak menunjukkan warna merah ungu pada plat KLT dengan pemberian penampak noda. Maserat yang diperoleh diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh massa ekstrak kental. Kemudian pelarut dalam ekstrak kental diuapkan dalam lemari asam sampai diperoleh ekstrak eter kering.

Residu dikeringkan untuk kemudian dilanjutkan proses maserasi dengan mengganti pelarut dari eter ke metanol lalu maserasi dilakukan dengan cara yang sama seperti pada pelarut eter. Maserasi dihentikan apabila setelah dilakukan orientasi kandungan terpenoid dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase gerak (eluen) *n*-heksana : etil asetat (1 : 4) dan penampak noda anisaldehyd asam sulfat tidak menunjukkan warna merah ungu pada plat KLT. Hal yang sama dilakukan pada pelarut metanol sehingga didapatkan ekstrak metanol kering.

4.5.2 Pembuatan Larutan Uji

(1) Pembuatan larutan induk 5000 ppm

Konsentrasi larutan induk ekstrak eter atau ekstrak metanol yang akan dibuat adalah 5000 ppm, oleh karena itu dilakukan prosedur sebagai berikut : ekstrak eter atau ekstrak metanol kering ditimbang 50,0 mg (0,0500 gram) kemudian dilarutkan dengan bantuan 1,0 ml DMSO sampai larut kemudian ditambah dengan media RPMI sampai tepat 10,0 ml dan dikocok sampai homogen. Larutan yang diperoleh kemudian dimasukkan tabung tertutup steril. Konsentrasi larutan uji yang diperoleh : $50,0 \text{ mg}/10 \text{ ml} = 5000 \text{ ppm}$.

(2) Pembuatan larutan baku kerja

Dari larutan induk (5000 ppm) dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan media RPMI 0,9 ml, didapatkan konsentrasi 500 ppm. Kemudian dari konsentrasi 500 ppm dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi berikutnya dan ditambah dengan media RPMI 0,9 ml, didapatkan konsentrasi 50 ppm. Selanjutnya dari konsentrasi 50 ppm dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi berikutnya dan ditambah dengan media RPMI 0,9 ml, didapatkan konsentrasi 5 ppm.

Perhitungan konsentrasi larutan baku kerja adalah sebagai berikut :

$$(1) (0,1 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 5000 \text{ ppm} = 500 \text{ ppm}$$

$$(2) (0,1 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 500 \text{ ppm} = 50 \text{ ppm}$$

$$(3) (0,1 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 50 \text{ ppm} = 5 \text{ ppm}$$

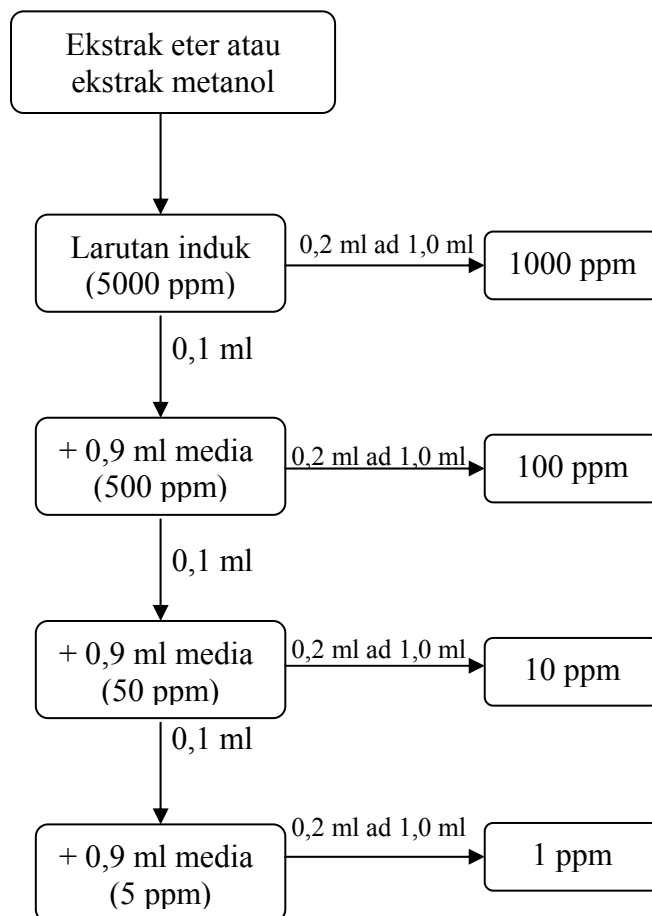
(3) Pembuatan larutan uji

Dari larutan induk 5000 ppm dan larutan baku kerja masing-masing dipipet 0,2 ml dan diletakkan dalam *microwell plate* yang akan ditambahkan media RPMI berisi sel mieloma yang telah disiapkan untuk uji aktivitas antikanker sampai 1,0 ml kemudian dihomogenkan, sehingga didapatkan larutan uji dengan konsentrasi 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm.

Perhitungan konsentrasi larutan uji adalah sebagai berikut :

- (1) $(0,2 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 5000 \text{ ppm} = 1000 \text{ ppm}$
- (2) $(0,2 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 500 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$
- (3) $(0,2 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 50 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$
- (4) $(0,2 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 5 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}$

Skema Pembuatan Larutan Uji :



Gambar 4.3 Skema pembuatan larutan uji

4.5.3 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

(1) Pembuatan larutan induk etoposida 5000 ppm

Dipipet dari sediaan larutan injeksi etoposida 100 mg/5 ml sebanyak 2,5 ml, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml dan ditambah DMSO 1,0 ml. Lalu ditambahkan media RPMI sampai garis tanda dan dikocok sampai homogen. Konsentrasi larutan yang diperoleh adalah : $50,0 \text{ mg}/10,0 \text{ ml} = 5000 \text{ ppm}$

(2) Pembuatan larutan baku kerja etoposida

Dari larutan induk etoposida (5000 ppm) dipipet 0,1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah dengan media RPMI 0,9 ml, didapatkan konsentrasi 500 ppm. Kemudian dari konsentrasi 500 ppm dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi berikutnya dan ditambah dengan media RPMI 0,9 ml, didapatkan konsentrasi 50 ppm. Selanjutnya dari konsentrasi 50 ppm dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi berikutnya dan ditambah dengan media RPMI 0,9 ml, didapatkan konsentrasi 5 ppm.

Perhitungan konsentrasi larutan baku kerja adalah sebagai berikut :

$$(1) (0,1 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 5000 \text{ ppm} = 500 \text{ ppm}$$

$$(2) (0,1 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 500 \text{ ppm} = 50 \text{ ppm}$$

$$(3) (0,1 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 50 \text{ ppm} = 5 \text{ ppm}$$

(4) Pembuatan larutan kontrol positif etoposida

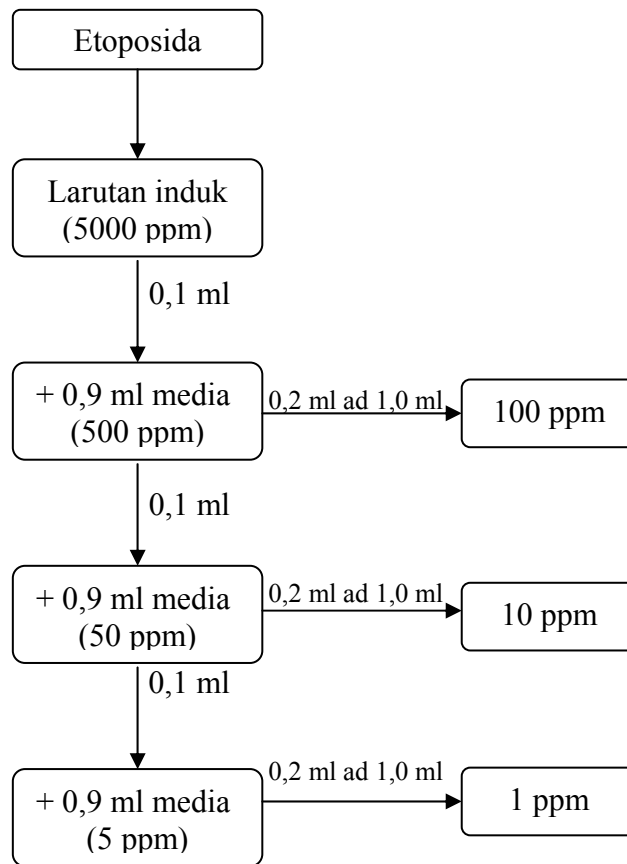
Dari larutan baku kerja masing-masing dipipet 0,2 ml dan diletakkan dalam *microwell plate* yang akan ditambahkan media RPMI berisi sel mieloma yang telah disiapkan untuk uji aktivitas antikanker sampai 1,0 ml kemudian dihomogenkan, sehingga didapatkan larutan uji dengan konsentrasi 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm.

Perhitungan konsentrasi larutan uji adalah sebagai berikut :

$$(1) (0,2 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 500 \text{ ppm} = 100 \text{ ppm}$$

$$(2) (0,2 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 50 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$$

$$(3) (0,2 \text{ ml}/1,0 \text{ ml}) \times 5 \text{ ppm} = 1 \text{ ppm}$$

Skema Pembuatan Larutan Kontrol Positif :

Gambar 4.4 Skema pembuatan larutan kontrol positif

4.5.4 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

- (1) Dipipet 1,0 ml DMSO, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml dan ditambah media RPMI sampai tepat 10,0 ml, dikocok sampai homogen.
- (2) Dari larutan DMSO dalam labu ukur 10,0 ml dipipet 0,2 ml dan dimasukkan ke dalam *microwell plate*.
- (3) Ditambahkan media RPMI berisi sel mieloma yang telah disiapkan untuk uji aktivitas antikanker ke dalam *microwell plate* tersebut sampai 1,0 ml. Konsentrasi larutan uji = 0 ppm.

4.5.5 Preparasi Kultur Sel Mieloma

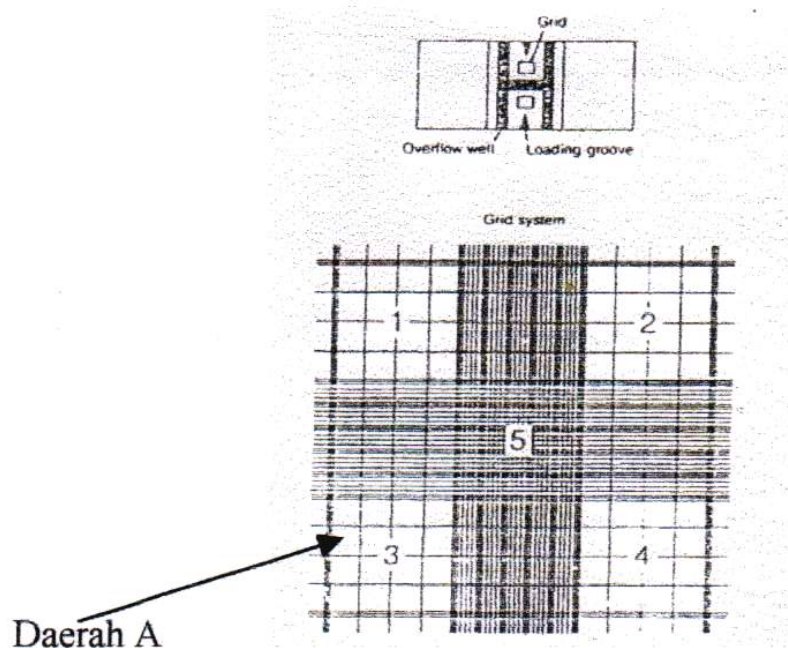
Cara kerja :

- (1) Disiapkan sel mieloma dalam media RPMI.
- (2) Sel mieloma tersebut dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi.
- (3) Media berisi sel mieloma disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.
- (4) Supernatan dipisahkan dari endapan sel (dikerjakan di ruang LAFC).
- (5) Sel di tanam dalam media yang sudah disiapkan dengan FBS 10 % pada botol kultur (dikerjakan di ruang LAFC).
- (6) Kultur diinkubasi dalam inkubator 95 % O₂ dan 5 % CO₂ pada suhu 37°C selama 24 jam (hasil pembiakan sel mieloma ini yang nanti akan digunakan untuk uji aktivitas antikanker)
- (7) Kultur tersebut dikeluarkan dari inkubator, kemudian dihomogenkan.
- (8) Dihitung kepadatan sel mieloma yang terdapat pada kultur tersebut dengan menggunakan Hemositometer sejumlah 10^5 - 2×10^6 sel /ml.

4.5.6 Menghitung Sel dengan Hemositometer

Dihitung jumlah sel kanker yang terdapat dalam daerah 1, 2, 3, 4. Tiap daerah mempunyai 16 daerah A. Luas daerah A = 0,0625 mm², kedalaman 0,1 mm. Volume dari 16 A = $16 \times 0,0625 \times 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$.

Sel-sel yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kanan dan bawah tidak dihitung, sedangkan yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kiri dan atas di hitung atau sebaliknya. Pada saat pengisian suspensi sel ke dalam alat Hemositometer harus tepat penuh, tidak boleh berlebihan. Apabila berlebihan, bersihkan dan ulangi lagi.



Gambar 4.5 Alat Hemositometer

4.5.7 Percobaan Uji Aktivitas Antikanker

Cara kerja :

- (1) Dari larutan induk 5000 ppm dan larutan baku kerja 500 ppm, 50 ppm, 5 ppm dipipet masing-masing 0,2 ml, kemudian dimasukkan ke dalam *microwell plate*.
- (2) Pada *microwell plate* tersebut ditambahkan 0,8 ml media yang berisi sel mieloma sejumlah 10^5 - 2×10^6 sel /ml.
- (3) Sel mieloma dalam *microwell plate* tersebut diinkubasi dalam inkubator 95 % O₂ dan 5 % CO₂ pada suhu 37°C selama 24 jam.
- (4) Setelah diinkubasi, diambil *microwell plate* dari dalam inkubator.
- (5) Sel di dalam *microwell plate* dikerok dan dipindahkan ke dalam *microtube* lalu dihomogenkan.
- (6) Diambil 50 µl sel dalam *microtube* lalu dimasukkan ke dalam *microtube* baru dan ditambahkan 50 µl larutan tripan biru 0,4 % dalam larutan *saline*. Kemudian dihomogenkan.

- (7) Dipipet larutan dalam *microtube* tersebut dengan mikropipet dan diletakkan di Hemositometer. Mikropipet diletakkan di bawah gelas penutup kemudian mikropipet ditekan dan larutan dalam pipet dimasukkan pelan–pelan ke bawah gelas penutup.
- (8) Letakkan kamar hitung di bawah mikroskop dan lakukan penghitungan terhadap sel hidup (tidak berwarna/jernih) dan sel mati (berwarna biru) dengan perbesaran 100 kali.
- (9) Viabilitas sel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{jumlah sel hidup}}{\text{jumlah sel hidup} + \text{jumlah sel mati}} \times 100\%$$
- (10) Dilakukan analisis data yang diperoleh dengan Anava satu arah dan probit.

4.5.8 Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak

Identifikasi kandungan kimia dilakukan terhadap ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dengan menggunakan cara KLT-Densitometri. Ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dilakukan analisis KLT dengan menggunakan :

Fase diam : Silica Gel 60 F₂₅₄

Fase gerak : *n*-heksana : Etil asetat (4 : 1)

Penampak noda :

(1) Sinar Ultra Violet (UV)

(2) Anisaldehyd-asam sulfat

Dari perlakuan tersebut dilakukan analisis dengan menggunakan Densitometri dan didapatkan profil kandungan kimia ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada dua panjang gelombang (sebelum dan sesudah disemprot dengan anisaldehyd-asam sulfat pekat).

4.6 Analisis Data

4.6.1 Analisis Varian Satu Arah (Anava Satu Arah)

Data hasil percobaan dianalisis dengan program SPSS 10.0 *for Windows* menggunakan uji Anava satu arah dengan taraf kepercayaan 95 % untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba*) terhadap viabilitas sel mieloma mencit. Aktivitas antikanker ditunjukkan dengan adanya perbedaan bermakna antara % viabilitas kontrol negatif dengan % viabilitas larutan uji.

Hipotesis statistik yang diajukan ialah :

H_0 = tidak ada perbedaan bermakna hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit antar larutan uji.

H_a = ada perbedaan bermakna minimal satu pasang hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit antar larutan uji.

Untuk menilai hipotesis statistik, terlebih dahulu dihitung harga p hitung yang akan dibandingkan dengan harga tingkat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$). Bila harga p hitung $<$ harga $\alpha = 0,05$ maka H_0 ditolak dan H_a diterima yang berarti ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit antar larutan uji. Sedangkan bila harga p hitung $>$ harga $\alpha = 0,05$ maka H_a ditolak dan H_0 diterima yang berarti tidak ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit antar larutan uji. Kemudian untuk mengetahui kelompok larutan uji mana saja yang berbeda maka dilakukan uji LSD.

4.6.2 Analisis Probit

Analisis probit dilakukan untuk mengetahui sejauh mana potensi lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) sebagai antikanker, yaitu dilihat dengan harga LC_{50} -nya. Harga LC_{50} menunjukkan konsentrasi larutan uji yang bisa menghambat 50 % pertumbuhan sel mieloma.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Ekstraksi

Lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dicuci, kemudian dikeringkan, setelah itu diserbuk. Serbuk kering ditimbang 500 mg, kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut eter dan dilanjutkan dengan pelarut metanol. Hasil ekstraksi kemudian diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh massa ekstrak kental. Kemudian pelarut dalam ekstrak kental diuapkan dalam lemari asam sampai diperoleh ekstrak kering. Hasil ekstraksi dari masing-masing pelarut, volume pelarut yang diperlukan dan berat ekstrak kering yang diperoleh dari maserasi lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) tertera pada tabel V.1.

Tabel V.1 Hasil pembuatan ekstrak kering lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

Nama bahan	Volume pelarut (liter)	Berat ekstrak kering yang diperoleh (gram)
Ekstrak eter	8,4	3,8950
Ekstrak metanol	5,3	2,2872

5.2 Pembuatan Larutan Uji

5.2.1 Pembuatan Larutan Ekstrak Eter Dan Ekstrak Metanol

Ekstrak yang diperoleh dari masing-masing pelarut ditimbang 50,0 mg (0,0500 gram) kemudian dilarutkan dalam 1,0 ml DMSO. Larutan tersebut kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur dan ditambah media RPMI ad 10,0 ml. Konsentrasi larutan induk yang diperoleh adalah 5000 ppm. Dari larutan ini kemudian dibuat empat macam larutan uji dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm.

5.2.2 Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Larutan injeksi etoposida dengan kadar 100 mg/5ml, dipipet 2,5 ml kemudian ditambah 1,0 ml DMSO dan media RPMI sampai 10,0 ml. Konsentrasi larutan induk yang didapatkan adalah 5000 ppm. Dari larutan ini kemudian dibuat 3 macam larutan uji dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm dan 100 ppm.

5.2.3 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Dipipet 1,0 ml DMSO, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml dan ditambah media RPMI sampai tepat 10,0 ml. Konsentrasi larutan uji = 0 ppm.

5.3 Hasil Uji Viabilitas

Sebelum dilakukan uji aktivitas antikanker, terlebih dahulu dilakukan uji viabilitas terhadap kultur sel mieloma yang akan digunakan dalam percobaan. Kultur sel mieloma mencit bisa digunakan untuk uji aktivitas antikanker jika presentase viabilitasnya memenuhi persyaratan, yaitu $> 80 \%$. Untuk memudahkan dalam pengamatan, maka jumlah sel sebelum perlakuan sebaiknya dalam rentang 10^5 - 2×10^6 sel/ml. Data viabilitas dan jumlah sel mieloma yang akan digunakan untuk uji aktivitas antikanker tertera dalam tabel V.2.

Tabel V.2 Hasil perhitungan presentase viabilitas kultur sel mieloma mencit sebelum perlakuan

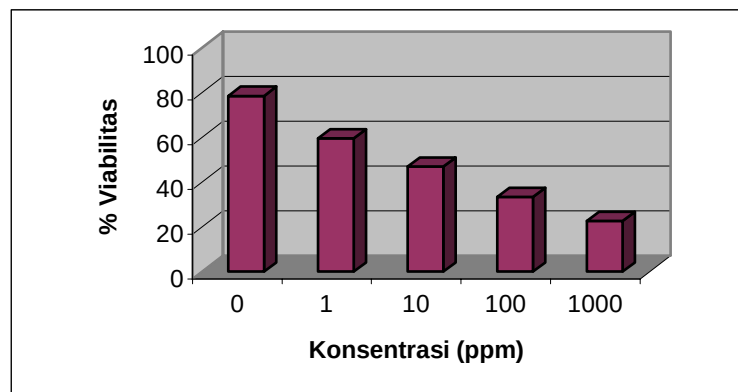
Ekstrak	Replikasi	Jumlah Sel ($\times 10^4$ / ml)			Viabilitas Sel (%)
		Hidup	Mati	Total	
Eter	1	65	9,5	74,5	87,25
	2	57,5	7,5	65	88,46
	3	55	6	61	90,16
Metanol	1	90	2	92	97,83
	2	87	2,5	89,5	97,21
	3	93	3,5	96,5	96,37

5.4 Hasil Uji Aktivitas Antikanker

Setelah dilakukan percobaan dengan menambahkan larutan uji kemudian diinkubasi selama 24 jam, maka dilakukan perhitungan persen viabilitas kultur sel mieloma mencit. Hasil perhitungan presentase viabilitas sel tertera pada tabel berikut :

Tabel V.3 Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dan diinkubasi selama 24 jam

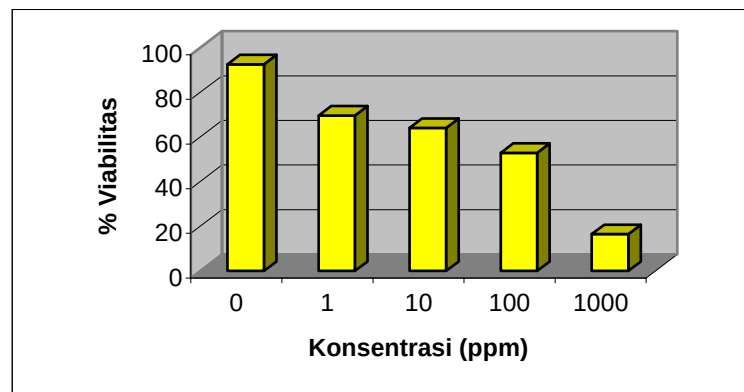
Nama Bahan	Kadar (ppm)	Replikasi	Jumlah Sel ($\times 10^4$)			% viabilitas	Rata-rata % viabilitas
			Hidup	Mati	Total		
Kontrol Negatif	0	1	35	8,5	43,5	80,46	78,62
		2	34	10	44	77,27	
		3	37,5	10,5	48	78,13	
Larutan uji Ekstrak eter	1	1	33	22,5	55,5	59,46	59,72
		2	30	21	51	58,82	
		3	28	18	46	60,87	
	10	1	30	27	57	52,63	47,08
		2	25	29	54	46,30	
		3	22	30	52	42,31	
	100	1	13	26	39	33,33	33,42
		2	13,5	27,5	41	32,93	
		3	17	33	50	34,00	
	1000	1	13,5	39	52,5	25,71	22,69
		2	13	54	67	19,40	
		3	15,5	52	67,5	22,96	



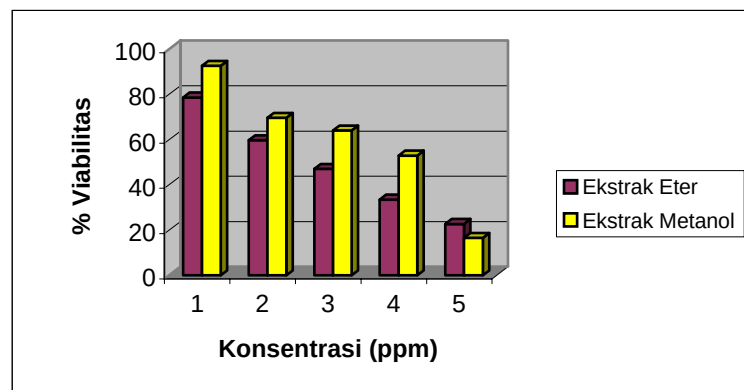
Gambar 5.1 Grafik hubungan antara konsentrasi larutan ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan

Tabel V.4 Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dan diinkubasi selama 24 jam

Nama Bahan	Kadar (ppm)	Replikasi	Jumlah Sel ($\times 10^4$)			% viabilitas	Rata-rata % viabilitas
			Hidup	Mati	Total		
Kontrol Negatif	0	1	64	4	68	94,12	92,57
		2	47	3	50	94,00	
		3	64,5	7,5	72	89,58	
Larutan uji ekstrak metanol	1	1	67	29,5	96,5	69,43	69,61
		2	67,5	28	95,5	70,68	
		3	50,5	23	73,5	68,71	
	10	1	57,5	33,5	91	63,19	64,05
		2	52	31,5	83,5	62,28	
		3	40	20	60	66,67	
	100	1	31,5	31	62,5	50,40	52,89
		2	39	31,5	70,5	55,32	
		3	31,5	28	59,5	52,94	
	1000	1	11	52	63	17,46	16,45
		2	8,5	45	53,5	15,89	
		3	8	42	50	16,00	



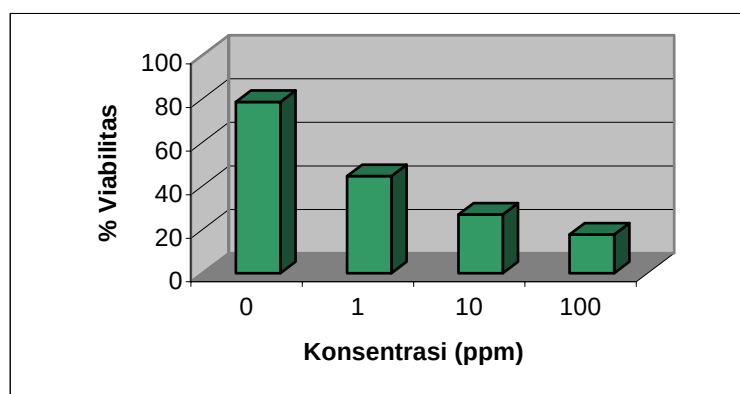
Gambar 5.2 Grafik hubungan antara konsentrasi larutan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan



Gambar 5.3 Grafik hubungan antara konsentrasi larutan ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) vs rata-rata % viabilitas sel mieloma mencit setelah perlakuan

Tabel V.5 Hasil uji viabilitas sel mieloma mencit setelah penambahan etoposida sebagai kontrol positif dan diinkubasi selama 24 jam

Nama Bahan	Kadar (ppm)	Replikasi	Jumlah Sel ($\times 10^4$)			% viabilitas	Rata-rata % viabilitas
			Hidup	Mati	Total		
Kontrol Negatif	0	1	35	8,5	43,5	80,46	78,62
		2	34	10	44	77,27	
		3	37,5	10,5	48	78,13	
Larutan Etoposida	1	1	24	28,5	52,5	45,71	44,51
		2	21	29	50	42,00	
		3	22	26	48	45,83	
	10	1	15	43,5	58,5	25,64	26,96
		2	14	37	51	27,45	
		3	15	39	54	27,78	
	100	1	10	42	52	19,23	17,79
		2	11	52	63	17,46	
		3	9	45	54	16,67	



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

5.5 Hasil Analisis Data

5.5.1 Anava Satu Arah Hasil Uji Aktivitas Antikanker ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol Lumut Hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

Data hasil penelitian dianalisis dengan program SPSS 10.0 *for Windows* menggunakan uji Anava satu arah. Hasil pengolahan data tertera pada tabel berikut :

5.5.1.1 Ekstrak Eter Lumut Hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

Tabel V.6 Anava satu arah hasil uji aktivitas antikanker ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

Sumber Variasi	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat rata-rata	F hitung	Harga p
Antar kelompok	5785,252	4	1446,313	175,493	,000
Dalam kelompok	82,414	10	8,241		
Total	5867,666	14			

($\alpha = 0,05$)

Hasil analisis diperoleh harga p 0,000 yang artinya lebih kecil daripada harga derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$). Dengan demikian H_0 ditolak, H_a diterima dan dapat ditarik kesimpulan bahwa ada perbedaan bermakna minimal satu pasang hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit antar larutan uji.

Untuk mengetahui kelompok larutan uji mana saja yang berbeda, maka dilakukan uji LSD. Hasil yang diperoleh dengan uji LSD dapat dilihat pada tabel V.7 adalah sebagai berikut :

Tabel V.7 Hasil perhitungan aktivitas ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dengan analisis LSD

Konsentrasi (ppm)	0	1	10	100	1000
0	0	18,9033*	31,5400*	45,2000*	55,9300*
1		0	12,63,67*	26,2967*	37,0267*
10			0	13,6600*	24,3900*
100				0	10,7300*
1000					0

* Ada perbedaan bermakna

5.5.1.2 Ekstrak Metanol Lumut Hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

Tabel V.8 Anava satu arah hasil uji aktivitas antikanker ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

Sumber Variasi	Jumlah kuadrat	Df	Kuadrat rata-rata	F hitung	Harga p
Antar kelompok	9337,514	4	2334,379	587,187	,000
Dalam kelompok	39,755	10	3,976		
Total	9377,269	14			

Hasil analisis diperoleh harga p 0,000 yang artinya lebih kecil daripada harga derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$). Dengan demikian H_0 ditolak, H_a diterima dan dapat ditarik kesimpulan bahwa ada perbedaan bermakna minimal satu pasang hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit antar larutan uji.

Untuk mengetahui kelompok larutan uji mana saja yang berbeda, maka dilakukan uji LSD. Hasil yang diperoleh dengan uji LSD dapat dilihat pada tabel V.9 adalah sebagai berikut :

Tabel V.9 Hasil perhitungan aktivitas ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dengan analisis LSD

Konsentrasi (ppm)	0	1	10	100	1000
0	0	22,9600*	28,5200*	39,6800*	76,1167*
1		0	5,5600*	16,7200*	53,1567*
10			0	11,1600*	47,5967*
100				0	36,4367*
1000					0

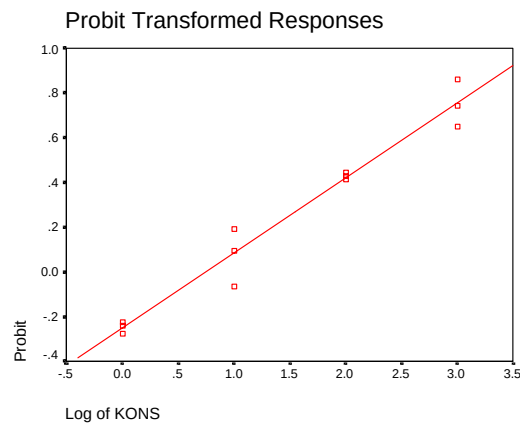
* Ada perbedaan bermakna

5.5.2 Analisis Probit Hasil Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol Lumut Hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

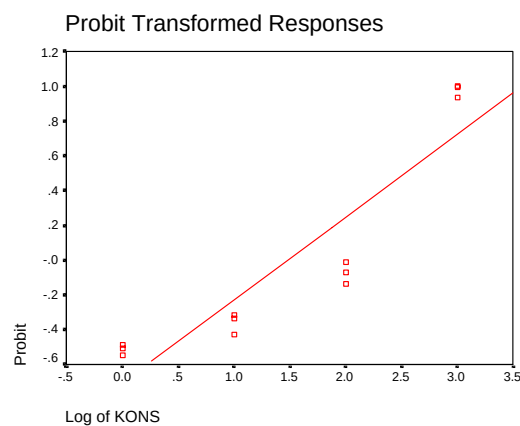
Untuk menentukan harga LC_{50} dari ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.), data hasil penelitian diolah dengan analisis probit menggunakan program SPSS 10.0 for Windows dengan derajat kepercayaan 95 %. Harga LC_{50} ekstrak eter dan ekstrak metanol dapat dilihat pada tabel V.10.

Tabel V.10 Hasil penentuan harga LC_{50} larutan uji ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

Nama bahan	Harga LC_{50} (ppm)
Ekstrak eter	163,21
Ekstrak metanol	358,95



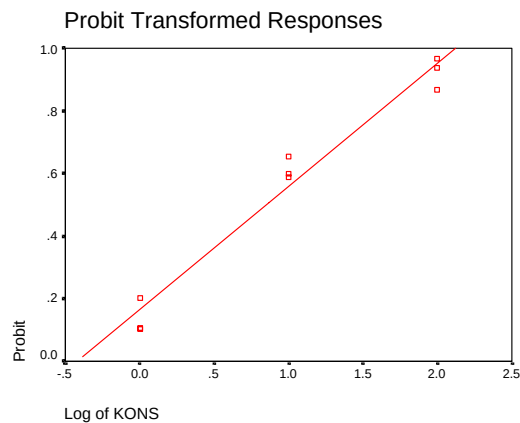
Gambar 5.5 Kurva probit log antara konsentrasi larutan ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) vs rata-rata % mortalitas sel mieloma mencit setelah perlakuan



Gambar 5.6 Kurva probit log antara konsentrasi larutan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) vs rata-rata % mortalitas sel mieloma mencit setelah perlakuan

5.5.3 Analisis Probit Etoposida

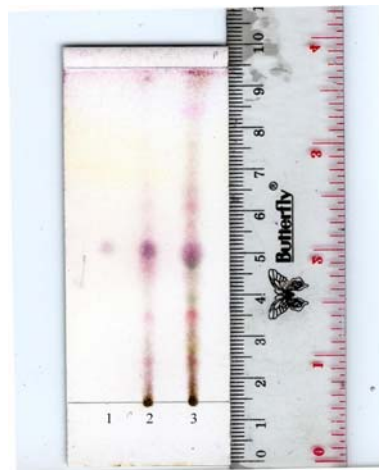
Untuk menentukan harga LC_{50} dari etoposida sebagai kontrol positif, data hasil penelitian diolah dengan analisis probit menggunakan program SPSS 10.0 for Windows dengan derajat kepercayaan 95 %. Harga LC_{50} etoposida yang didapatkan adalah 5,47 ppm.



Gambar 5.7 Kurva probit log antara konsentrasi larutan etoposida vs rata-rata % mortalitas sel mieloma mencit setelah perlakuan

5.6 Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak

Hasil KLT dari ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dapat dilihat pada gambar berikut :



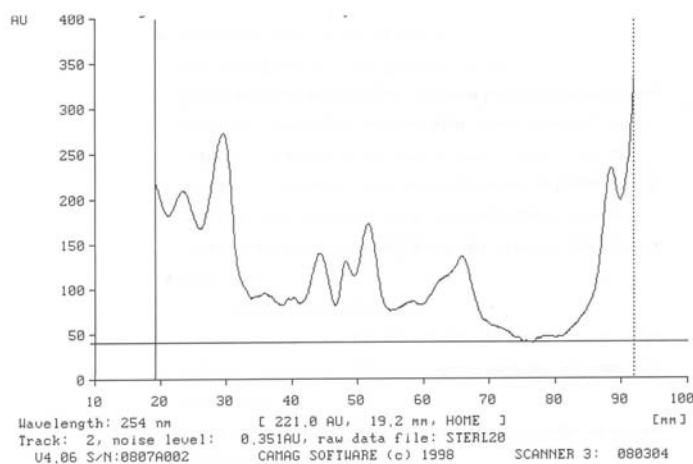
Gambar 5.8 Kromatografi lapis tipis ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.)

Fase diam	: Silica Gel 60 F ₂₅₄
Fase Gerak	: <i>n</i> -Heksana : Etil Asetat (4:1)
Penampak noda	: Anisaldehyd-Asam Sulfat

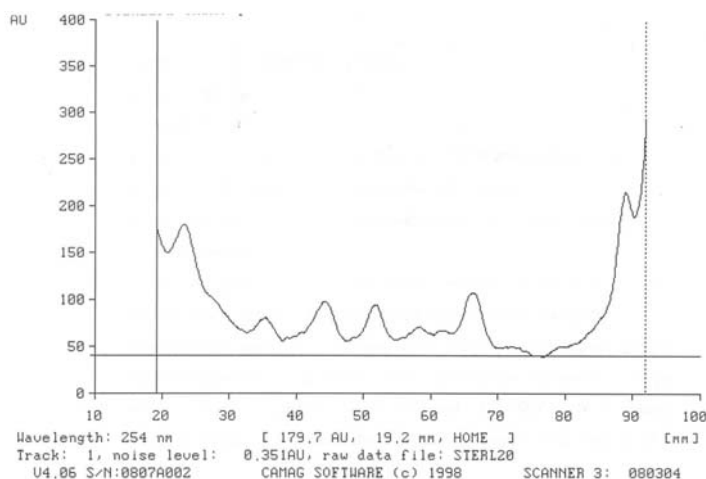
Keterangan gambar :

- 1 = Standar Sterol, isolat dari lumut hati (*Marchantia geminata* Reinw., Bl., Nees)
- 2 = Ekstrak Metanol
- 3 = Ekstrak Eter

Pada pengamatan KLT dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat terlihat kedua ekstrak eter dan metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) memberikan noda dan warna yang hampir sama dengan standar, yaitu warna merah ungu. Diduga noda tersebut adalah senyawa golongan terpenoid atau steroid, karena pada umumnya senyawa golongan terpenoid atau steroid akan berwarna merah ungu pada penyemprotan dengan anisaldehyd-asam sulfat pekat dan diikuti oleh pemanasan. Profil kandungan kimia ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada panjang gelombang 254 nm dan 521 nm dapat dilihat pada gambar berikut :

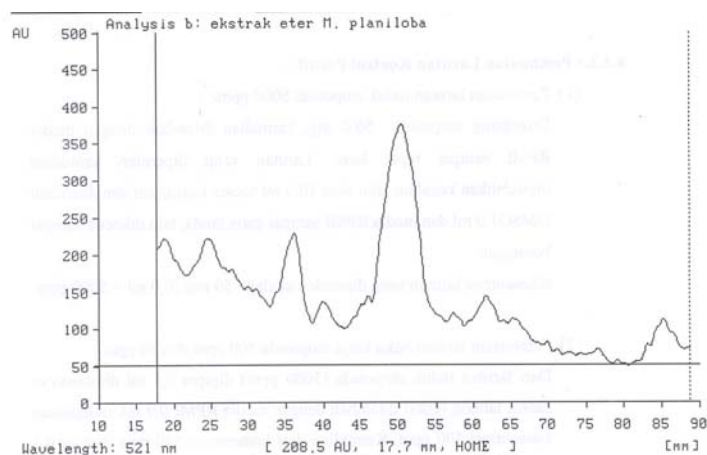


Gambar 5.9 Profil kandungan kimia ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada panjang gelombang 254 nm dengan KLT-Densitometri



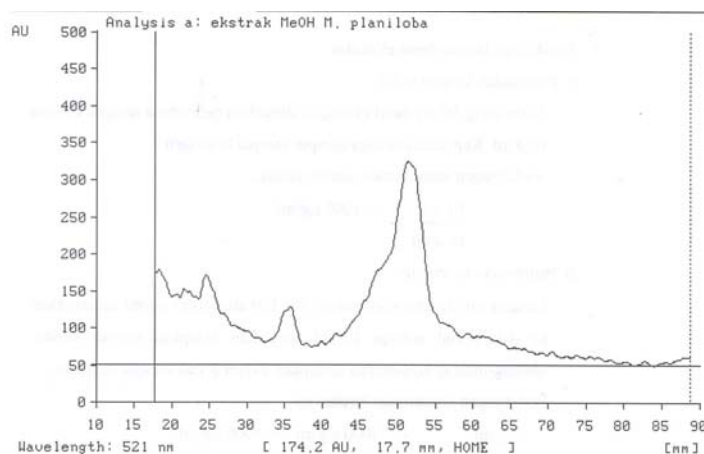
Gambar 5.10 Profil kandungan kimia ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada panjang gelombang 254 nm dengan KLT-Densitometri

Dari hasil analisis Densitometri ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada panjang gelombang 254 nm diperoleh profil kandungan kimia dengan 4 puncak yang dominan, yaitu pada jarak migrasi 30 mm, 45 mm, 52 mm dan 66 mm. Sedangkan untuk ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) diperoleh profil kandungan kimia dengan 3 puncak yang dominan, yaitu pada jarak migrasi 44 mm, 53 mm dan 68 mm.



Gambar 5.11 Profil kandungan kimia ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada panjang gelombang 521 nm dengan KLT-Densitometri

Fase diam : Silica Gel 60 F₂₅₄
 Fase Gerak : *n*-Heksana : Etil Asetat (4:1)
 Penampak noda : Anisaldehyd-Asam Sulfat



Gambar 5.12 Profil kandungan kimia ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada panjang gelombang 521 nm dengan KLT-Densitometri

Fase diam : Silica Gel 60 F₂₅₄
 Fase Gerak : *n*-Heksana : Etil Asetat (4:1)
 Penampak noda : Anisaldehyd-Asam Sulfat

Dari hasil analisis Densitometri ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada panjang gelombang 521 nm setelah disemprot dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat, kemudian dipanaskan, diperoleh profil kandungan kimia dengan 2 puncak yang dominan, yaitu pada jarak migrasi 36 mm dan 51 mm. Sedangkan untuk ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) diperoleh profil kandungan kimia dengan 2 puncak yang dominan, yaitu pada jarak migrasi 36 mm dan 54 mm.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian di Jepang yang dilakukan oleh Asakawa terhadap lumut hati (*Marchantia polymorpha* L, *Marchantia palaceae* Bertol var *diptera* (Mont) dan *Marchantia tosana* Steph.) menunjukkan aktivitas antikanker terhadap KB *cell*. Berdasarkan pendekatan marga dan jumlah populasi yang cukup besar serta mengacu pada penelitian di atas maka dilakukan penelitian uji aktivitas antikanker terhadap jenis lain dari marga *Marchantia* yang tumbuh di Indonesia, yaitu lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.)

Dalam penelitian ini aktivitas antikanker ditentukan dengan metode viabilitas sel yaitu salah satu metode uji aktivitas antikanker yang berdasarkan pada kemampuan bertahan hidup suatu sel terhadap pemaparan senyawa toksik. Kemudian dilakukan perhitungan jumlah sel yang hidup dan sel yang mati setelah dilakukan pewarnaan dengan tripan biru 0,4 % dalam *saline* memakai alat hemositometer dibawah mikroskop. Sel yang mati ditunjukkan dengan masuknya zat warna tripan biru ke dalam membran sel, sedangkan sel yang dapat bertahan hidup tetap memperlihatkan warna dan bentuk seperti semula. Hal ini disebabkan karena kerusakan atau kematian sel diikuti adanya perubahan integritas membran dan ini menyebabkan membran pada sel mati bersifat permeabel, sehingga dapat menyerap zat warna. Sedangkan sel yang hidup masih bersifat impermeabel sehingga tidak dapat menyerap zat warna.

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) Kedua ekstrak tersebut diperoleh dengan mengekstraksi 500 gram serbuk kering lumut hati (*Marchantia* cf. *planiloba* Steph.) secara maserasi dengan pelarut eter sebanyak 9 kali, saat diketahui tidak lagi menunjukkan noda pada KLT dengan fase gerak heksana-etil asetat (4 : 1) dan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat pekat. Kemudian maserasi dilanjutkan dengan pelarut metanol sebanyak 3 kali saat diketahui tidak lagi menunjukkan noda pada KLT dengan fase gerak heksana-etil asetat (1 : 4) dan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat pekat . Ekstrak eter yang didapatkan sebanyak 3,8950 gram dan ekstrak metanol sebanyak 2,2872 gram.

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana dan hemat yang berprinsip pada keseimbangan konsentrasi antara larutan dan residu padat (komponen aktif yang belum terlarut). Proses ekstraksi dengan cara maserasi dilakukan dengan menggunakan 2 macam pelarut yaitu eter dan metanol yang memiliki polaritas yang berbeda. Dengan proses maserasi, diharapkan kontak antara pelarut dengan bahan aktif yang terkandung dalam lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) bisa optimal dengan bantuan pengadukan.

Penggunaan pelarut dengan polaritas yang berbeda dimaksudkan agar zat-zat kandungan yang terdapat dalam lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dapat tersari dalam pelarut yang sesuai dengan kepolarannya, sehingga terjadi pemisahan kandungan kimia. Kandungan kimia yang bersifat nonpolar dapat tersari dalam pelarut eter dan kandungan kimia yang bersifat polar akan tersari dalam metanol.

Ekstrak eter dan ekstrak metanol yang didapatkan kemudian diuapkan dengan alat *rotavapour* sampai ekstrak menjadi kental, kemudian ekstrak kental tersebut dipindahkan ke dalam cawan porselen dan dibiarkan kering di dalam lemari asam sampai didapat ekstrak kering. Sebelum dibuat larutan uji, terlebih dahulu dilakukan uji sterilitas terhadap ekstrak eter dan ekstrak metanol dengan menggunakan media thioglikolat cair. Apabila dalam waktu 7 hari media thioglikolat cair tidak menjadi keruh, maka ekstrak tersebut steril dan pada pembuatan larutan uji tidak perlu dilakukan sterilisasi filtrasi menggunakan membran filter.

Ekstrak eter dan ekstrak metanol kering yang didapat dilakukan pengenceran sampai didapat konsentrasi 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm dan 1 ppm. Dalam proses melarutkan ekstrak perlu di tambahkan DMSO untuk membantu melarutkan. DMSO yang ditambahkan tidak boleh mencapai kadar lebih dari 10 %. Hal ini dikarenakan DMSO tidak memberikan pengaruh sitotoksik pada kadar tidak lebih dari 10 % (Swanson, 1990). Selain larutan uji, dibuat juga kelompok kontrol yaitu kontrol negatif yang hanya berisi media dan kontrol positif yang mengandung etoposida dengan konsentrasi 100 ppm, 10 ppm dan 1 ppm. Kontrol positif dibuat hanya sampai konsentrasi 100 ppm karena etoposida adalah senyawa murni sehingga diperkirakan mempunyai harga LC_{50} yang lebih kecil

dari pada ekstrak. Kedua kontrol tersebut juga ditambahkan DMSO dengan kadar yang sama dengan larutan uji, yaitu konsentrasi akhir maksimum 10 %. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan variasi hasil akibat adanya perbedaan perlakuan antara larutan uji dengan larutan kontrol.

Tujuan dari dibuatnya kontrol negatif adalah untuk memastikan bahwa apabila terdapat efek antikanker, maka efek ini tidak disebabkan oleh medianya atau proses perlakuan. Sedangkan untuk kontrol positif bertujuan untuk membuktikan bahwa bahan-bahan yang diberikan dan proses perlakuan pada kultur sel tidak menghambat kerja senyawa antikanker.

Jenis sel mieloma mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah P₃UI yang diperoleh dari Laboratorium Vaksin Mamalia Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Sel mieloma dari penyimpanan di *thawing* kemudian dibiakkan dalam media RPMI yang mengandung FBS 10%. Sel tersebut disimpan dalam botol kultur dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ (5% CO₂, 95% O₂) pada suhu 37°C. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C, karena suhu tersebut merupakan suhu yang optimal untuk pertumbuhan sel mieloma. Lingkungan sel mengandung 5% CO₂ karena CO₂ diperlukan sebagai dapar (bersama-sama dengan bikarbonat yang terdapat dalam media).

Media yang digunakan adalah media RPMI 1640, media ini umum digunakan untuk kultur sel mieloma mencit karena terdapat komponen yang lebih lengkap untuk pertumbuhan sel dan untuk menggantikan *the natural media* seperti ekstrak embrio, protein hidrolisate dan *lymph*. Pada pembuatan media ini juga ditambahkan antibiotik Penisilin G, Streptomisin dan Kanamisin untuk menghindari kontaminasi jamur atau bakteri yang mungkin tumbuh selama penyimpanan atau selama proses perlakuan. Bikarbonat sering ditambahkan sebagai sistem dapar bersama lingkungan CO₂ sehingga kultur dapat dipelihara pada pH optimal untuk pertumbuhan (Freshney, 1987; Dendy, 1976).

Media RPMI 1640 mengandung komponen-komponen yang penting dan diperlukan untuk pertumbuhan kultur sel, seperti asam amino, vitamin dan garam-garam mineral. Selain itu juga diperlukan serum untuk memenuhi kebutuhan hormon dan faktor-faktor pertumbuhan. Serum yang digunakan dalam penelitian

ini adalah *Fetal Bovine Serum* (FBS). Kadar FBS yang ditambahkan ke dalam media adalah sebanyak 10 %.

Proses perlakuan sel mieloma harus dilakukan secara aseptis agar tidak terjadi kontaminasi oleh jamur atau bakteri. Semua bahan yang ditambahkan misalnya : larutan uji, media RPMI, FBS dan HEPES harus dilakukan uji sterilitas dengan media thioglikolat cair. Media RPMI yang dibuat harus dijaga pH-nya dalam rentang 7,2-7,4. Biasanya dalam proses penyimpanan, media RPMI berubah menjadi basa sehingga perlu ditambahkan HEPES untuk menormalkan pH.

Hasil penelitian menunjukkan harga persen viabilitas rata-rata dari ekstrak eter dari konsentrasi 1 ppm sampai 1000 ppm berturut turut adalah 59,72 %; 47,08 %; 33,42 %; dan 22,69 %. Sedangkan untuk ekstrak metanol harga persen viabilitas rata-ratanya dari konsentrasi 1 ppm sampai 1000 ppm berturut-turut adalah 69,61 %; 64,05 %; 52,89 % dan 16,45 %. Untuk kontrol positif, harga persen viabilitas rata-ratanya dari konsentrasi 1 ppm, 10 ppm dan 100 ppm adalah 44,51 %; 26,96 % dan 17,79 %. Hasil uji aktivitas antikanker ini menunjukkan bahwa viabilitas kultur sel mieloma mencit menurun dengan meningkatnya konsentrasi larutan uji.

Data hasil penelitian diolah dengan anava satu arah menggunakan program SPSS 10.0 *for Windows* untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) terhadap viabilitas kultur sel mieloma mencit. Hasil analisis diperoleh harga $p < 0,000$ yang artinya lebih kecil daripada harga derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) yang menunjukkan ada perbedaan bermakna minimal satu pasang hambatan pertumbuhan sel mieloma mencit antar larutan uji.

Untuk mengetahui kelompok larutan uji mana saja yang berbeda maka dilakukan uji LSD dan didapatkan hasil bahwa ada perbedaan bermakna antara kontrol negatif dengan larutan uji (ekstrak eter maupun ekstrak metanol) pada konsentrasi 1, ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit karena mampu menurunkan jumlah sel kanker yang hidup secara bermakna dibandingkan

dengan kontrol negatif. Pada larutan uji (ekstrak eter maupun ekstrak metanol) juga terdapat perbedaan bermakna pada kelompok larutan uji yaitu antara kadar 1 ppm dengan kadar 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm; antara kadar 10 ppm dengan kadar 100 ppm dan 1000 ppm; serta kadar 100 ppm dengan kadar 1000 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa viabilitas kultur sel mieloma mencit menurun secara bermakna dengan meningkatnya konsentrasi larutan uji.

Untuk mengetahui sejauh mana potensi antikanker yang dimiliki, maka dilakukan analisis probit menggunakan program SPSS 10.0 *for Windows* sehingga diketahui harga LC_{50} dari larutan uji yaitu konsentrasi larutan uji yang menghambat 50 % pertumbuhan sel mieloma. Dari analisis tersebut diperoleh harga LC_{50} dari ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) yaitu pada konsentrasi 163,21 ppm dan untuk ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) yaitu pada konsentrasi 358,95 ppm. Sedangkan untuk kontrol positif etoposida didapatkan harga LC_{50} pada konsentrasi 5,47 ppm. Dari harga LC_{50} ekstrak eter dan ekstrak metanol dapat diketahui bahwa ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) memiliki potensi antikanker lebih besar terhadap kultur sel mieloma mencit tipe P₃UI dibandingkan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.).

Untuk mengetahui profil kandungan kimia dari ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.), maka dilakukan identifikasi terhadap kedua ekstrak dengan menggunakan metode KLT-Densitometri. Dari hasil KLT didapatkan noda dan warna yang hampir sama dengan standar, yaitu warna merah ungu. Diduga noda tersebut adalah senyawa golongan terpenoid atau steroid, karena pada umumnya senyawa golongan terpenoid atau steroid akan berwarna merah ungu pada penyemprotan dengan anisaldehyd-asam sulfat pekat dan diikuti oleh pemanasan.

Dari hasil analisis Densitometri didapatkan profil kandungan kimia ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) pada panjang gelombang 254 nm dan 521 nm, yaitu panjang gelombang dimana ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) mempunyai serapan terbesar. Dari gambar profil bisa diketahui bahwa kandungan kimia dalam ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) berbeda dengan

kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) karena mempunyai profil yang berbeda.

Dalam penelitian ini beberapa hal yang perlu diperhatikan adalah : semua proses yang dilakukan dalam uji aktivitas ini harus dilakukan secara aseptis dan alat-alat yang digunakan harus dalam keadaan steril. Hal ini untuk menghindari kontaminasi dari jamur atau bakteri yang bisa menyebabkan sel menjadi mati dan data yang dihasilkan menjadi bias. Pada proses pembagian sel mieloma mencit ke dalam *microwell plate* harus dilakukan dengan homogen agar jumlah sel dalam tiap lubang *microwell plate* hampir sama. Proses pengamatan dan penghitungan sel dengan menggunakan larutan tripan biru dibawah mikroskop harus dilakukan dengan teliti dan secepat mungkin agar kematian sel bukan dipengaruhi oleh faktor lingkungan melainkan karena penambahan larutan uji.

Dari hasil beberapa penelitian menyatakan bahwa aktivitas antikanker suatu tanaman akan berbeda pada kultur sel yang berbeda pula (Moritani, 1996). Oleh karena itu disarankan pada penelitian lebih lanjut agar dilakukan uji aktivitas antikanker terhadap ekstrak yang mempunyai aktivitas antikanker lebih besar yaitu ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dengan jenis sel kanker yang berbeda seperti sel limfoma, sarkoma, karsinoma atau dengan metode lain. Selain itu, juga perlu dilakukan isolasi dan identifikasi kandungan ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) yang mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel lain dan secara *in vivo* sehingga didapatkan senyawa aktif yang mempunyai aktivitas antikanker lebih poten.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah : bahwa ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel mieloma mencit tipe P₃UI dengan metode viabilitas sel. Harga LC₅₀ untuk ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) adalah 163,21 ppm dan untuk ekstrak metanol lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) adalah 358,95 ppm.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka disarankan untuk :

- (1) Dilakukan uji aktivitas antikanker ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) dengan jenis sel kanker yang berbeda atau dengan metode lain.
- (2) Dilakukan isolasi dan identifikasi kandungan ekstrak eter lumut hati (*Marchantia cf. planiloba* Steph.) yang mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel lain dan secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

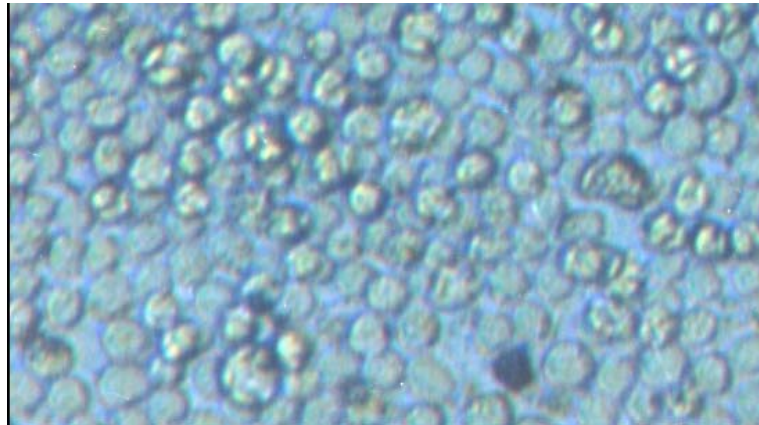
- Anderson, J. E., C.M. and J.L. Mc Laughlin, 1991. **Blind Comparison of simple Bench-top Bioassay and Human Tumor Cytotoxicities Antitumors Prescreens**, Phytochemical analysis, 2nd edition, p. 107-111.
- Anonim, 2004. **Etoposide**, didapat dari :
<http://www.tevauoncology.com/products/index.cfm?FuseAction=ShowFags&pid=8>, diakses tanggal 28 Januari 2004.
- Anonim, 2004. **Etoposide**, didapat dari :
<http://www.medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/e/Etoposideinj/PU.htm> ,
 diakses tanggal 24 Januari 2004.
- Anonim, 1991. **Methods In Plant Biochemistry**, Vol 6, Assays For Bioactivity, editor : K. Hostettmann, Academic Press, London, p. 73-76, 84.
- Asakawa, Y., 1981. **Biologically Active Substances Obtained from Bryophytes**, Journ. Hattori Bot. Lab. No.50, p. 123-142.
- Asakawa, Y., Toyota, M., Bischler, H., Campbell, O., and Hattori, S., 1984. **Comparative Study of Chemical Constituents of Marchantia Spesies**, Journ. Hattori Bot. Lab. No.57, p. 383-389.
- Asakawa, Y., 1984. **Some Biologically Active Substance Isolated from Hepaticae : Terpenoids and Lipophilic Aromatic Compounds**, Journ. Hattori Bot. Lab. No.56, p. 215-219.
- Awad, A.B.; Fink, C.S., 2000. **Phytosterol as Anticancer Dietary Components : Evidence and Action**,
<http://www.nutrition.org/cgi/content/full/130/9/2127>, diakses tanggal 16 Mei 2004.
- Bangun, A., 1990. **Antibodi Monoklonal**, Karya Aksara, Jakarta, hal. 16-48.
- Dalimartha, S., 2003. **Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker**, Seri Agrisehat, Penebar Swadaya, Jakarta, hal. v.
- Darnell, James., Lodish, Harvey. Baltimore, David., 1990. **Molecular Cell Biology**, 2nd edition, W.H Freeman and Company, Newyork, p. 960.
- Donatus, I. A., 1978. **Toksikologi Dasar**, Edisi ketiga, UGM, Yogyakarta.
- Dendy, P.P., 1976. **Human Tumours in Short Term Culture Technique and Clinical Aplication**, Academic Press, London, p. 4-8, 20-24, 150-155.

- Freshney, I.R., 1987. **Culture of Animal Cell : A Manual Basic of Technique**, 2nd edition, Alan R. Liss inc., New York, p. 227-292.
- Glime, J. M., 1988. **Methods in Bryology : Separation and Isolation of Terpenoids from Liveworts and Their Analysis by Thin Layer and Gas Chromatography**, Hattori Bot. Lab., Nichinan, p. 157-163.
- Grahame-smith, D.G., and Aronson, J.K., 1992. **Oxford Textbook of Clinical Pharmacology and Drug Therapy**, 2nd edition, Oxford Univdersity Press, New York, p. 505-510.
- Hernawan, P., 2002. **Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Metanol Lumut Hati (Marchantia geminata Reinw., Bl., Nees) Terhadap Kultur Sel Mieloma Mencit Dengan Metode Viabilitas Sel**, Bagian Ilmu Bahan Alam, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Indrawati, R., Lazuardi, M., Ratna, S.M., 1999. **Pengkajian Hambat Pertumbuhan Sel Kanker Mieloma secara In Vitro antara Maserasi Benalu Duku dan Maserasi Benalu Teh dibandingkan dengan Metotreksat**, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 8-9.
- Jaime, A.R. and Marcella Haun, 1999. **Cytotoxicity of trans-Dehydrocrotinin from Croton cajucara on V 79 Cells and Rat Hepatocytes**, in : *Planta Medica*, vol 65, p. 522.
- Katzung, B.G., 1995. **Basic and Clinical Pharmacology**, 7th edition, Prentice Hall International, p. 881.
- Kee, Joyce, L., and Hayes, Erellyn, R., 1994. **Farmakologi-Pendekatan Proses Keperawatan**, Alih Bahasa : dr. Peter Anugerah, Editor : Yasmin Asih, SKP, p. 389.
- Moritani, S., Nomura, M., Takeda, Y., Miyamoto, K., 1996. **Cytotoxic Components of Bardanae Fructus (Goboshi) I** : *Biological Pharmaceutical Bulletin*, vol 19, p. 1515-1519.
- Mues, R. and Zinsmeister H.D., 1988. **The Chemotaxonomy of Phenolic Compounds in Bryophytes, Biologically Active Substances Obtained from Bryophytes**, *Journ. Hattori Bot. Lab.* No.64, p. 109-141.
- Nafrialdi, Ganiswara, 1995, **Farmakologi dan Terapi**, edisi 4, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal. 686–701.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 1995. **Pharmacology**, 3rd edition, Churchill Livingstone, Newyork and Tokyo, p. 696–713.

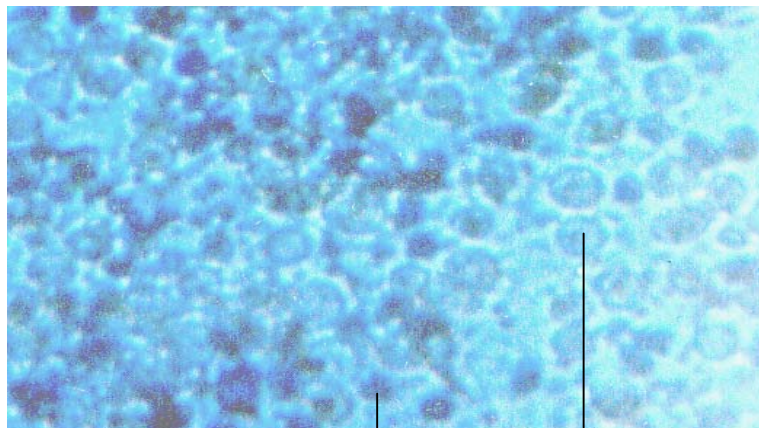
- Roja, G. and Rao, P.S., 2000, **Journal of Herbs, Spices and Medical Plant : Anticancer Compounds from Tissue Cultures of Medical Plants**, vol 7 (2), The Haworth Press. Inc., Newyork, p. 71–72.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal**, edisi kedua, Airlangga University Press, Surabaya, hal. 163–183.
- Spector, W.G., 1989. **An Introduction to General Pathology**, 3rd edition, Churchill Livingstone, Newyork, p. 278.
- Sutrisno, B., 1983. **Tanaman Obat Keluarga**, Jakarta : Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Departemen Kesehatan RI.
- Synder, L.A., 1997. **Pharmacology of Podophyllotoxin and related Compounds**, <http://biotech.icmb.utexas.edu/botany/potox.html>, 28 Januari 2004.
- Tjitrosoepomo, G., 1986. **Taksonomi Tumbuhan (Taksonomi Khusus)**, Bhratara Karya Aksara, Jakarta, hal. 168–176.
- Widyawaruyanti, A., 1994. **Studi Pendahuluan Kandungan Kimia dari Lumut Hati (Hepaticaceae)**, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, hal. 1-26.
- Wilson, A.P., 1988. **Cytotoxicity and Viability Assay Animal Cell Culture**, A Practical Approach, Washington, IRL Press, p. 183-215.

LAMPIRAN-1**Gambar Mikroskopis Sel Mieloma**

Gambar sel mieloma mencit sebelum pewarnaan dengan tripan biru



Gambar sel mieloma mencit setelah pewarnaan dengan tripan biru



Sel mati

Sel hidup

LAMPIRAN-2**Komposisi Media RPMI 1640 (mg/L)****(1) Asam amino, antara lain :**

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

(2) Vitamin, antara lain :

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

(3) Garam-garam anorganik, antara lain :

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

(4) Komponen lain, antara lain :

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

LAMPIRAN-3

ANAVA SATU ARAH HASIL UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETER LUMUT HATI (*MARCHANTIA CF. PLANILOBA STEPH.*)

Descriptives

VIA									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
.00	3	78.6200	1.65048	.95291	74.5200	82.7200	77.27	80.46	
1.00	3	59.7167	1.04882	.60554	57.1112	62.3221	58.82	60.87	
10.00	3	47.0800	5.20403	3.00455	34.1525	60.0075	42.31	52.63	
100.00	3	33.4200	.54065	.31214	32.0770	34.7630	32.93	34.00	
1000.00	3	22.6900	3.16365	1.82654	14.8311	30.5489	19.40	25.71	
Total	15	48.3053	20.47240	5.28595	36.9681	59.6426	19.40	80.46	
Model				.74123	46.6538	49.9569			479.35722
Fixed Effects				2.87079					
Random Effects				9.81941	21.0423	75.5684			

Test of Homogeneity of Variances

VIA			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.620	4	10	.099

ANOVA

VIA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5785.252	4	1446.313	175.493	.000
Within Groups	82.414	10	8.241		
Total	5867.666	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VIA

LSD

(I) KONS	(J) KONS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	1.00	18.9033*	2.34399	.000	13.6806	24.1261
	10.00	31.5400*	2.34399	.000	26.3173	36.7627
	100.00	45.2000*	2.34399	.000	39.9773	50.4227
	1000.00	55.9300*	2.34399	.000	50.7073	61.1527
1.00	.00	-18.9033*	2.34399	.000	-24.1261	-13.6806
	10.00	12.6367*	2.34399	.000	7.4139	17.8594
	100.00	26.2967*	2.34399	.000	21.0739	31.5194
	1000.00	37.0267*	2.34399	.000	31.8039	42.2494
10.00	.00	-31.5400*	2.34399	.000	-36.7627	-26.3173
	1.00	-12.6367*	2.34399	.000	-17.8594	-7.4139
	100.00	13.6600*	2.34399	.000	8.4373	18.8827
	1000.00	24.3900*	2.34399	.000	19.1673	29.6127
100.00	.00	-45.2000*	2.34399	.000	-50.4227	-39.9773
	1.00	-26.2967*	2.34399	.000	-31.5194	-21.0739
	10.00	-13.6600*	2.34399	.000	-18.8827	-8.4373
	1000.00	10.7300*	2.34399	.001	5.5073	15.9527
1000.00	.00	-55.9300*	2.34399	.000	-61.1527	-50.7073
	1.00	-37.0267*	2.34399	.000	-42.2494	-31.8039
	10.00	-24.3900*	2.34399	.000	-29.6127	-19.1673
	100.00	-10.7300*	2.34399	.001	-15.9527	-5.5073

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

LAMPIRAN-4**ANALISIS PROBIT HASIL UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK
ETER LUMUT HATI (*MARCHANTIA CF. PLANILOBA STEPH.*)****P R O B I T A N A L Y S I S****DATA Information**

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

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 6 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	-.00097	.00009	-10.64815

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.15819	.03744	4.22550

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 119.640 DF = 13 P = .000

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

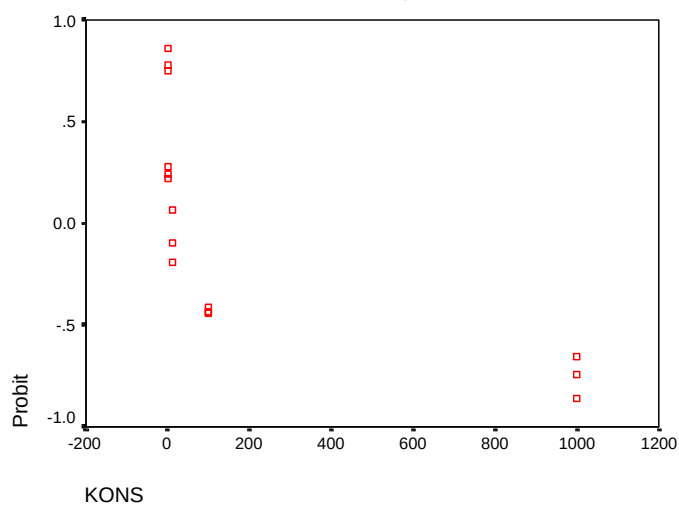
Observed and Expected Frequencies

KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	100.0	80.5	56.285	24.175	.56285
.00	100.0	77.3	56.285	20.985	.56285
.00	100.0	78.1	56.285	21.845	.56285
1.00	100.0	59.5	56.247	3.213	.56247
1.00	100.0	58.8	56.247	2.573	.56247
1.00	100.0	60.9	56.247	4.623	.56247
10.00	100.0	52.6	55.903	-3.273	.55903
10.00	100.0	46.3	55.903	-9.603	.55903
10.00	100.0	42.3	55.903	-13.593	.55903
100.00	100.0	33.3	52.443	-19.113	.52443
100.00	100.0	32.9	52.443	-19.513	.52443
100.00	100.0	34.0	52.443	-18.443	.52443
1000.00	100.0	25.7	20.865	4.845	.20865
1000.00	100.0	19.4	20.865	-1.465	.20865
1000.00	100.0	23.0	20.865	2.095	.20865

Confidence Limits for Effective KONS

Prob	KONS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	2563.24276	1642.07053	6378.50846
.02	2282.00893	1465.69630	5649.38918
.03	2103.57507	1353.44889	5187.12998
.04	1969.34623	1268.77634	4839.62359
.05	1860.16143	1199.71773	4557.13796
.06	1767.22801	1140.78104	4316.85531
.07	1685.74359	1088.96451	4106.31499
.08	1612.78400	1042.43888	3917.93137
.09	1546.43018	1000.00224	3746.72744
.10	1485.35137	960.81993	3589.25325
.15	1232.46881	796.95969	2938.90305
.20	1031.48576	663.79458	2424.95952
.25	859.06020	545.77128	1987.82123
.30	704.21672	434.30568	1600.73456
.35	560.73116	322.18891	1250.86835
.40	424.57739	200.15201	934.52858
.45	292.84705	53.09199	657.45410
.50	163.20524	-139.36384	432.49992
.55	33.56343	-386.48625	262.21232
.60	-98.16691	-677.72512	129.31670
.65	-234.32068	-1001.52637	14.74127
.70	-377.80624	-1355.33561	-93.43246
.75	-532.64972	-1744.65099	-202.66935
.80	-705.07528	-2183.14654	-319.33540
.85	-906.05833	-2697.97604	-451.61454
.90	-1158.94089	-3348.94566	-614.85535
.91	-1220.01970	-3506.52307	-653.93444
.92	-1286.37352	-3677.82524	-696.27284
.93	-1359.33311	-3866.30290	-742.70444
.94	-1440.81753	-4076.93392	-794.43026
.95	-1533.75095	-4317.30493	-853.27860
.96	-1642.93576	-4599.87788	-922.24988
.97	-1777.16459	-4947.47250	-1006.83420
.98	-1955.59845	-5409.82451	-1118.98880
.99	-2236.83228	-6139.05082	-1295.25601

Probit Transformed Responses



LAMPIRAN-5

ANAVA SATU ARAH HASIL UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK METANOL LUMUT HATI (MARCHANTIA CF. PLANILOBA STEPH.)

Descriptives

VIA

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.00	3	92.5667	2.5872	1.4937	86.1396	98.9937	89.58	94.12
1.00	3	69.6067	.9968	.5755	67.1304	72.0829	68.71	70.68
10.00	3	64.0467	2.3170	1.3377	58.2909	69.8024	62.28	66.67
100.00	3	52.8867	2.4604	1.4205	46.7746	58.9987	50.40	55.32
1000.00	3	16.4500	.8764	.5060	14.2729	18.6271	15.89	17.46
Total	15	59.1113	25.8806	6.6823	44.7791	73.4435	15.89	94.12

Test of Homogeneity of Variances

VIA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.516	4	10	.270

ANOVA

VIA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9337.514	4	2334.379	587.187	.000
Within Groups	39.755	10	3.976		
Total	9377.269	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VIA

LSD

(I) KONS	(J) KONS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.00	1.00	22.9600*	1.6280	.000	19.3326	26.5874
	10.00	28.5200*	1.6280	.000	24.8926	32.1474
	100.00	39.6800*	1.6280	.000	36.0526	43.3074
	1000.00	76.1167*	1.6280	.000	72.4893	79.7441
1.00	.00	-22.9600*	1.6280	.000	-26.5874	-19.3326
	10.00	5.5600*	1.6280	.007	1.9326	9.1874
	100.00	16.7200*	1.6280	.000	13.0926	20.3474
	1000.00	53.1567*	1.6280	.000	49.5293	56.7841
10.00	.00	-28.5200*	1.6280	.000	-32.1474	-24.8926
	1.00	-5.5600*	1.6280	.007	-9.1874	-1.9326
	100.00	11.1600*	1.6280	.000	7.5326	14.7874
	1000.00	47.5967*	1.6280	.000	43.9693	51.2241
100.00	.00	-39.6800*	1.6280	.000	-43.3074	-36.0526
	1.00	-16.7200*	1.6280	.000	-20.3474	-13.0926
	10.00	-11.1600*	1.6280	.000	-14.7874	-7.5326
	1000.00	36.4367*	1.6280	.000	32.8093	40.0641
1000.00	.00	-76.1167*	1.6280	.000	-79.7441	-72.4893
	1.00	-53.1567*	1.6280	.000	-56.7841	-49.5293
	10.00	-47.5967*	1.6280	.000	-51.2241	-43.9693
	100.00	-36.4367*	1.6280	.000	-40.0641	-32.8093

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

LAMPIRAN-6**ANALISIS PROBIT HASIL UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK
METANOL LUMUT HATI (*MARCHANTIA CF. PLANILOBA STEPH.*)****P R O B I T A N A L Y S I S****DATA Information**

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

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 9 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	-.00160	.00010	-16.38348

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
.57556	.03939	14.61151

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 97.955 DF = 13 P =
 .000

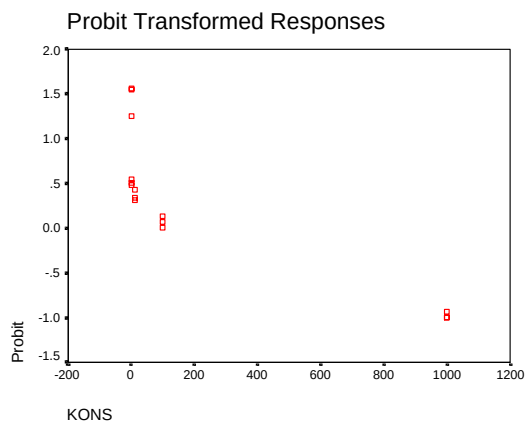
Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Observed and Expected Frequencies

KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	100.0	94.1	71.755	22.365	.71755
.00	100.0	94.0	71.755	22.245	.71755
.00	100.0	89.6	71.755	17.825	.71755
1.00	100.0	69.4	71.700	-2.270	.71700
1.00	100.0	70.7	71.700	-1.020	.71700
1.00	100.0	68.7	71.700	-2.990	.71700
10.00	100.0	63.2	71.210	-8.020	.71210
10.00	100.0	62.3	71.210	-8.930	.71210
10.00	100.0	66.7	71.210	-4.540	.71210
100.00	100.0	50.4	66.101	-15.701	.66101
100.00	100.0	55.3	66.101	-10.781	.66101
100.00	100.0	52.9	66.101	-13.161	.66101
1000.00	100.0	17.5	15.200	2.260	.15200
1000.00	100.0	15.9	15.200	.690	.15200
1000.00	100.0	16.0	15.200	.800	.15200

Confidence Limits for Effective KONS

Prob	KONS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	1809.78650	1363.85380	2745.69331
.02	1639.77934	1237.42178	2480.84707
.03	1531.91524	1157.00285	2313.01250
.04	1450.77329	1096.37595	2186.88795
.05	1384.77056	1046.96132	2084.39469
.06	1328.59188	1004.81993	1997.23860
.07	1279.33416	967.79939	1920.89055
.08	1235.22975	934.58848	1852.59341
.09	1195.11856	904.32622	1790.53815
.10	1158.19614	876.41520	1733.47075
.15	1005.32745	760.16297	1497.88961
.20	883.83226	666.67367	1311.75290
.25	779.60021	585.30054	1153.23181
.30	685.99660	510.87152	1012.22840
.35	599.25891	440.23479	883.23488
.40	516.95332	371.05368	762.98641
.45	437.32172	301.23581	649.52897
.50	358.95264	228.58459	541.81064
.55	280.58356	150.58486	439.44082
.60	200.95196	64.39634	342.35402
.65	118.64637	-32.87202	250.19280
.70	31.90868	-143.89717	161.58770
.75	-61.69493	-271.55277	73.81089
.80	-165.92698	-420.36780	-17.26830
.85	-287.42217	-599.40708	-117.85504
.90	-440.29086	-829.64313	-239.45237
.91	-477.21328	-885.78866	-268.28525
.92	-517.32447	-946.95834	-299.43309
.93	-561.42888	-1014.40020	-333.49928
.94	-610.68660	-1089.91640	-371.35168
.95	-666.86528	-1176.25560	-414.30995
.96	-732.86801	-1277.93534	-464.53811
.97	-814.00996	-1403.23148	-525.99341
.98	-921.87406	-1570.18793	-607.29047
.99	-1091.88122	-1834.01293	-734.74372



LAMPIRAN-7**ANALISIS PROBIT HASIL UJI AKTIVITAS ANTIKANKER ETOPOSIDA****P R O B I T A N A L Y S I S****DATA Information**

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

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Parameter estimates converged after 6 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	-.01058	.00099	-10.67851

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
.05786	.04356	1.32843

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 145.252 DF = 10 P =
 .000

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

Observed and Expected Frequencies

KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	100.0	80.5	52.307	28.153	.52307
.00	100.0	77.3	52.307	24.963	.52307
.00	100.0	78.1	52.307	25.823	.52307
1.00	100.0	45.7	51.886	-6.176	.51886
1.00	100.0	42.0	51.886	-9.886	.51886
1.00	100.0	45.8	51.886	-6.056	.51886
10.00	100.0	25.6	48.088	-22.448	.48088
10.00	100.0	27.5	48.088	-20.638	.48088
10.00	100.0	27.8	48.088	-20.308	.48088
100.00	100.0	19.2	15.861	3.369	.15861
100.00	100.0	17.5	15.861	1.599	.15861
100.00	100.0	16.7	15.861	.809	.15861

Confidence Limits for Effective KONS

Prob	KONS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	225.34009	132.45293	1017.76063
.02	199.57580	117.69509	892.34733
.03	183.22918	108.26530	812.84304
.04	170.93226	101.12549	753.08120
.05	160.92966	95.28065	704.50672
.06	152.41588	90.27347	663.19450
.07	144.95095	85.85371	627.00121
.08	138.26701	81.86861	594.62216
.09	132.18822	78.21756	565.20149
.10	126.59270	74.83043	538.14603
.15	103.42571	60.43036	426.50567
.20	85.01332	48.25823	338.50486
.25	69.21714	36.76626	264.05736
.30	55.03167	24.69927	198.94807
.35	41.88673	10.20447	141.92753
.40	29.41346	-10.27021	94.54115
.45	17.34542	-41.61022	60.22479
.50	5.46873	-84.41751	38.41667
.55	-6.40797	-134.50208	23.88584
.60	-18.47600	-188.95201	12.67941
.65	-30.94927	-247.04317	2.90950
.70	-44.09422	-309.29716	-6.35184
.75	-58.27968	-377.14145	-15.68384
.80	-74.07587	-453.16173	-25.60302
.85	-92.48826	-542.14907	-36.78862
.90	-115.65524	-654.45988	-50.51825
.91	-121.25077	-681.62551	-53.79520
.92	-127.32955	-711.15062	-57.34182
.93	-134.01350	-743.62926	-61.22733
.94	-141.47842	-779.91826	-65.55138
.95	-149.99221	-821.32338	-70.46565
.96	-159.99480	-869.98935	-76.21901
.97	-172.29173	-929.84330	-83.26670
.98	-188.63834	-1009.44414	-92.59995
.99	-214.40264	-1134.96832	-107.24690

