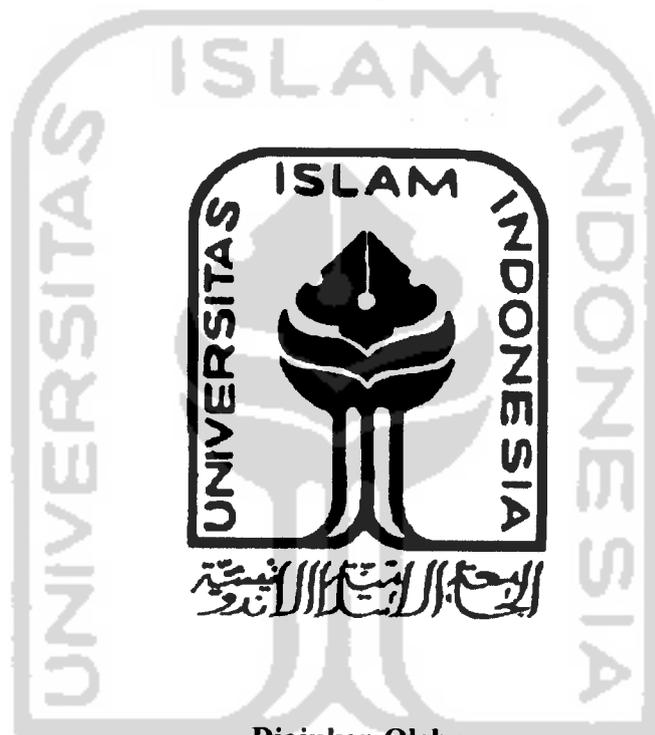


**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK KLOROFORM
BIJI RAMBUTAN (*Nephlium lappaceum*, L.) var. *aceh lebak bulus*
TEHADAP SEL MYELOMA**

Skripsi



Diajukan Oleh :

ENI SRIYANA

02 613 198

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA
JOGJAKARTA
AGUSTUS 2006**

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK KLOROFORM
BIJI RAMBUTAN (*Nephelium lappaceum*, L.) var. *aceh lebak bulus*
TERHADAP SEL MYELOMA**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm.)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Oleh :

ENI SRIYANA

02 613 198

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA
JOGJAKARTA
AGUSTUS 2006**

SKRIPSI

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK KLOROFORM
BIJI RAMBUTAN (*Nephelium lappaceum*, L.) var. *aceh lebak bulus*
TERHADAP SEL MYELOMA**



Yang diajukan oleh

ENI SRIYANA

02613198

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Dra. Suparmi, M.Si, Apt.

Rochmi Istikharah, S.Farm., Apt.

SKRIPSI

**AKTIVITAS SITOTOKSIK KLOROFORM
BIJI RAMBUTAN (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus*
TERHADAP SEL MYELOMA**

Oleh :

ENI SRIYANA

02613198

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 14 Agustus 2006

Ketua Penguji,



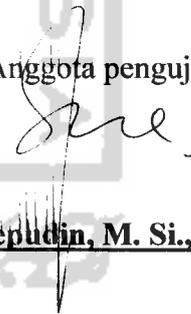
Dra. Suparmi, M.Si, Apt.

Anggota penguji,



Rochmi Istikharah S. Farth., Apt.

Anggota penguji,

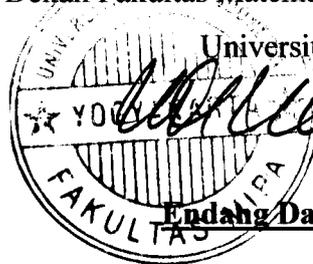


Saepudin, M. Si., Apt.

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Endang Darmawan, M. Si, Apt.

PERNYATAAN

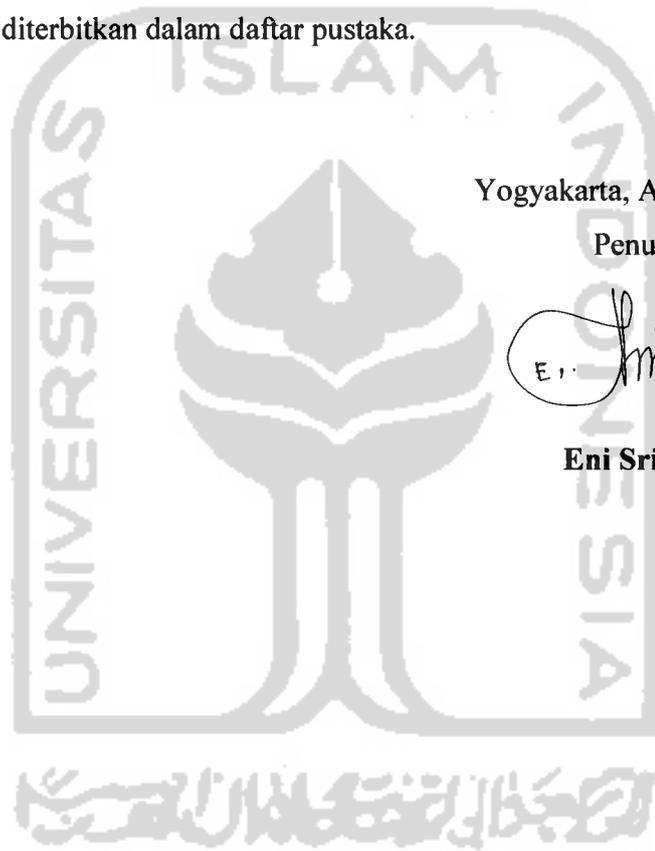
Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, Agustus 2006

Penulis,

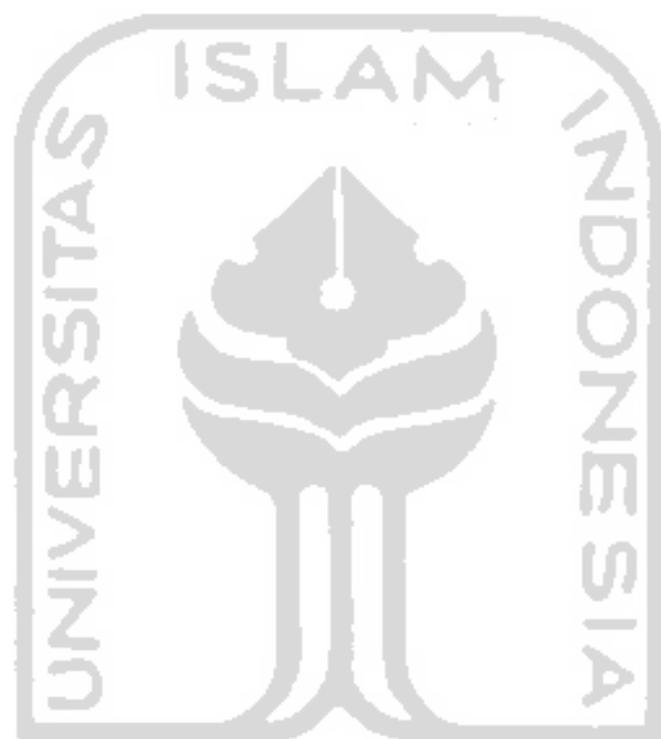


Eni Sriyana



"I
pe
as
d
Ten
ye
untt

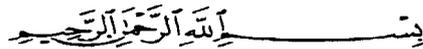
Wh
Nev



جامعة الإسلام في إندونيسيا



KATA PENGANTAR



Assalamualaikum Wr. Wb.

Puji dan syukur senantiasa kita panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul : “AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK KLOROFORM BIJI RAMBUTAN (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* TERHADAP SEL MYELOMA”.

Skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana Farmasi (S. Farm.) Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

Penyusunan skripsi oleh penulis ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dra. Suparmi, M. Si., Apt., Ibu Asih Triastuti, S. F., Apt, dan Ibu Rochmi Istikharah, S. Farm., Apt. selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan arahan sampai selesainya skripsi ini.
2. Bapak Saepudin, M. Si., Apt selaku dosen penguji atas saran, masukan, dan arahan yang bersifat membangun bagi kesempurnaan skripsi ini.
3. Bapak Endang Darmawan, M. Si., Apt. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam serta segenap Dosen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas ilmu yang telah diberikan dan segala kelancaran selama menempuh studi.
4. Semua pihak yang telah membantu baik material maupun spiritual dalam penulisan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu kritik dan saran dari pembaca dan semua pihak yang bersifat membangun sangat diharapkan demi kemajuan dan kesempurnaan penulisan di masa yang akan datang.

DAFTAR ISI

| | | |
|---------|--|----------|
| | B. KATA PENGANTAR..... | vii |
| III. ME | DAFTAR ISI..... | ix |
| A. | DAFTAR TABEL..... | xi |
| | DAFTAR GAMBAR..... | xii |
| | DAFTAR LAMPIRAN..... | xiii |
| B. | INTISARI..... | xv |
| | ABSTRACT..... | xvi |
| | BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| | A. Latar Belakang Masalah | 1 |
| | B. Rumusan Masalah | 3 |
| | C. Tujuan Penelitian | 3 |
| | D. Manfaat Penelitian | 3 |
| | BAB II. STUDI PUSTAKA | 4 |
| | A. Tinjauan Pustaka..... | 4 |
| | 1. Kanker | 4 |
| | 2. Siklus Sel..... | 6 |
| C. 3 | 3. Multiple Myeloma..... | 9 |
| D. 4 | 4. Sel Myeloma..... | 11 |
| IV. HAS | 5. Ekstraksi Tanaman..... | 12 |
| A. 1 | 6. Rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i> , L)..... | 13 |
| B. 1 | (a). Klasifikasi Ilmiah..... | 13 |
| | (b). Nama..... | 14 |
| | (c). Uraian Tumbuhan..... | 14 |
| C. 1 | (d). Khasiat..... | 15 |
| D. 1 | (e). Kandungan..... | 15 |
| V. KES | (f). Cara Pemakaian..... | 16 |
| A. 1 | 7. Kromatografi Gas..... | 16 |
| B. 3 | 8. Uji Sitotoksitas..... | 17 |

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK KLOROFORM BIJI RAMBUTAN
(*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* TEHADAP SEL MYELOMA**

INTISARI

Kanker adalah sebuah penyakit yang ditandai dengan proliferasi sel yang tidak terkontrol karena terjadi perubahan fisiologis dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antikanker biji rambutan pada sel Myeloma. Penelitian ini dilakukan dengan mengekstraksi biji rambutan dengan pelarut kloroform secara soxhletasi, kemudian kandungan asam lemak di dalam pelarut kloroform diidentifikasi dengan kromatografi gas. Pada uji aktivitas antikanker, sel Myeloma dipropagasi terlebih dahulu kemudian dilakukan pemanenan sel Myeloma, microplate dibagi menjadi 6 kelompok. Kelompok A berisikan ekstrak + sel, kelompok B berupa media RPMI + ekstrak, kelompok C berisikan sel + media RPMI, kelompok D berisi media RPMI, kelompok E berisi DMSO seri kadar + sel, kelompok F berisi DMSO seri kadar + media RPMI. Keenam kelompok tersebut diuji sitotoksitasnya dengan metode MTT. Keenam kelompok tersebut diuji sitotoksitasnya dengan metode MTT. Sel dengan kepadatan 3×10^4 sel/100 μ L didistribusikan kedalam sumuran dan diinkubasi bersama ekstrak kloroform biji rambutan dengan seri kadar 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 400 μ g/mL, 800 μ g/mL and 1600 μ g/mL selama 24 jam dan 48 jam. Pada akhir inkubasi, masing-masing sumuran ditambahkan 15 μ L MTT 2.5 μ g/mL dalam media RPMI. Kemudian dibaca serapannya dengan ELISA reader pada λ 550 nm, dan dihitung % kematian sel dan analisis konsentrasi letalnya (LC_{50}) dengan menggunakan analisa Probit. Efek penghambatan pertumbuhan sel Myeloma yang paling baik ditunjukkan oleh seri kadar 1600 μ g/mL. Diperoleh nilai LC_{50} pada inkubasi 48 jam adalah 1,579 mg/mL yang menunjukkan bahwa ekstrak koroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* tidak poten untuk membunuh sel Myeloma.


Key words : *Myelloma cell line*, *Nephelium lappaceum*, L. var. *aceh lebak bulus*, aktivitas sitotoksik, LC_{50}

**CITOTOXIC ACTIVITY OF RAMBUTAN SEEDS CHLOROFORM
EXTRACT (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* ON MYELOMA
CELLS**

ABSTRACT

Cancer is an abnormal proliferation of cell causing by fisiologic changing of the body. The purpose of this study was to know anticancer activity of rambutan seeds to Myeloma cell line. The method of this study was by extracting rambutan seeds with chloroform using soxhletation. Oleic acids that containing in chloroformic extract were identified by gas chromatography. Myeloma cells were cultured in RPMI 1640 medium. Chloroformic extract from rambutan seeds (*Nephelium lappaceum* L) var. *aceh lebak bulus* was devided into six groups. Group A contents extract + cell, group B RPMI media + extract, group C contents cell + RPMI media, group D contents RPMI media, group E contents DMSO concentration level + cell, group F contents DMSO concentration level + RPMI media. All of the groups were testing for its citotoxicity by MTT method. The density of cell line is 3×10^4 cell/100 μ L distributed into 96 microplate and incubated with chloroform extract of rambutan seeds in concentration level 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 400 μ g/mL, 800 μ g/mL, and 1600 μ g/mL for 24 hours and 48 hours. At the end of incubation, each of microplate is added by 15 μ L MTT 2.5 μ g/mL in RPMI media. The absorption was read by *ELISA reader* at λ 550 nm. The percentage of death cell and letal concentration (LC_{50}) were calculated by probit analyze. The best activity in inhibit the growth of HeLa cell have shown by 1600 μ g/mL concentration. LC_{50} of the incubation of 48 hour 1,579 mg/mL, from this result rambootan seeds chloroform extract (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* does not have potency to improve as anticancer drugs.

Key words : *Myelloma cell line*, *Nephelium lappaceum*, L var. *aceh lebak bulus*, cytotoxic activity, LC_{50}

BAB I

PENDAHULUAN



A. Latar Belakang Masalah

Kanker adalah sebuah penyakit yang ditandai dengan pembagian sel yang tidak teratur dan kemampuan sel-sel ini untuk menyerang jaringan biologi lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (*invasi*) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (*metastasis*). Pertumbuhan yang tidak teratur ini disebabkan oleh kerusakan DNA, mutasi di gen vital yang mengontrol pembagian sel, dan fungsi lainnya (Anonim, 2005^c).

Di AS dan beberapa negara berkembang lainnya, kanker sekarang ini bertanggung jawab untuk sekitar 25% dari seluruh kematian. Setiap tahunnya, sekitar 0,5% dari populasi terdiagnosa kanker (Anonim, 2005^c).

Kematian akibat penyakit kanker di Amerika Serikat mencapai 22%, berada di urutan kedua setelah penyakit kardiovaskular 37% (King, 2000). Kanker menempati peringkat keenam penyebab kematian di Indonesia setelah penyakit infeksi, kardiovaskular, kecelakaan lalu lintas, defisiensi nutrisi dan penyakit congenital. Diperkirakan ada 170-190 kasus baru pada setiap 100.000 penduduk tiap tahun (Tjindarbumi *and* Mangunkusumo, 2002).

Myeloma multiple adalah kanker yang terdapat pada sel-sel plasma sumsum tulang dan menginfiltrasi tulang yang menghasilkan lesi pada bagian dari tulang rangka (tulang pipih, belakang, tengkorak, panggul dan iga). Lesi akan menghancurkan jaringan tulang. Pada stadium akhir kanker akan menyerang organ hati, limpa, limpanodus, paru-paru, kelenjar adrenal, ginjal, kulit, dan saluran pencernaan. Myeloma saat ini sudah sangat meluas. Frekuensi penyakit ini rata-rata 5-6 kasus baru per 100.000 orang dalam setahun. Di Amerika Serikat 15.980 kasus baru terdiagnosa pada tahun 2005. Di masa mendatang diperkirakan 50.000 orang di Amerika Serikat menderita myeloma multipel (Lonial, 2005).

Pengobatan jangka panjang multiple myeloma terdiri dari kemoterapi untuk menekan pertumbuhan sel plasma dan mengurangi rasa sakit. Obat-obatan yang digunakan pada multiple myeloma memiliki efek yang sangat kuat. Karenanya sangat sulit untuk menekan efek samping terapi sehingga hanya sel kanker saja yang mati tanpa membunuh sel yang masih sehat. Pengobatan akan menimbulkan efek samping jika sel yang masih sehat ikut mati. Efek samping yang timbul dapat berupa *nausea*, *vomiting*, kebotakan, dan kehilangan nafsu makan. Untuk itu dibutuhkan pengobatan alternatif dari bahan alam yang harganya lebih terjangkau dan memiliki efek samping yang relatif lebih rendah (Anonim, 2005^g).

Rambutan (*Nephelium sp.*) merupakan tanaman buah hortikultural berupa pohon dengan famili Sapindaceae. Tanaman buah tropis ini dalam bahasa Inggrisnya disebut *Hairy Fruit* berasal dari Indonesia. Hingga saat ini telah menyebar luar di daerah yang beriklim tropis seperti Filipina dan negara-negara Amerika Latin dan ditemukan pula di daratan yang mempunyai iklim sub-tropis. Tanaman buah rambutan sengaja dibudidayakan untuk dimanfaatkan buahnya yang mempunyai gizi, zat tepung, sejenis gula yang mudah terlarut dalam air, zat protein dan asam amino, zat lemak, zat enzim-enzim yang esensial dan nonesensial, vitamin dan zat mineral makro, mikro yang menyehatkan keluarga, tetapi ada pula sementara masyarakat yang memanfaatkan sebagai pohon pelindung di pekarangan, sebagai tanaman hias (Anonim, 2002).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Dr. Menendez asam oleat yang berasal dari minyak zaitun dapat menekan resiko terkena kanker payudara (Anonim, 2005^d), berdasarkan hal tersebut maka dapat dijadikan alasan untuk melakukan penelitian uji aktivitas antikanker biji rambutan (*Nephelium lappaceum* L) yang kandungan terbesar asam lemaknya adalah asam oleat. Menurut penelitian klinis yang dilakukan oleh Dr. Msenendez asam oleat, senyawa kimia yang paling banyak terkandung di dalam minyak zaitun, dapat menekan pertumbuhan sel kanker payudara (Menendez *et al.*, 2005).

B. Rumusan Masalah

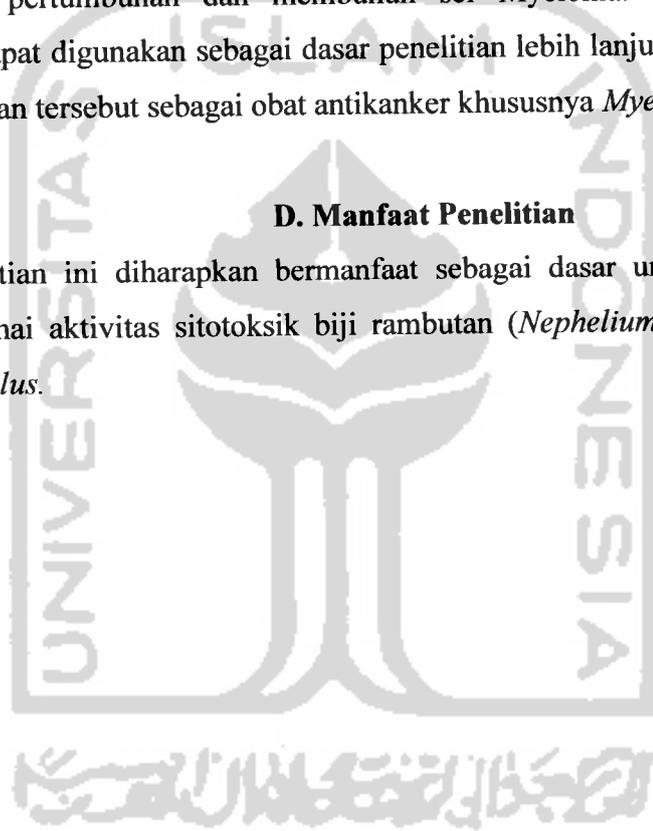
Apakah ekstrak kloroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L.) var. *aceh lebak bulus* mempunyai aktivitas dalam menghambat pertumbuhan dan membunuh sel Myeloma.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antikanker ekstrak kloroform dari biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* dalam menghambat pertumbuhan dan membunuh sel Myeloma. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut dalam menyelidiki khasiat tanaman tersebut sebagai obat antikanker khususnya *Myeloma Multipel*.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas sitotoksik biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus*.



BAB II STUDI PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Kanker

Kanker adalah sebuah penyakit yang ditandai dengan pembagian sel yang tidak teratur dan kemampuan sel-sel ini untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (*invasi*) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (*metastasis*). Pertumbuhan yang tidak teratur ini disebabkan oleh kerusakan DNA, mutasi di gen vital yang mengontrol pembagian sel, dan fungsi lainnya (Anonim, 2005^c).

Satu atau lebih dari mutasi ini, yang dapat merupakan turunan atau diperoleh, dapat menyebabkan ke pembagian sel yang tak terkontrol dan pembentukan tumor. Tumor menunjukkan massa jaringan yang tidak normal, tetapi dapat berupa ganas (*cancerous*) atau jinak (*noncancerous*). Hanya tumor ganas yang mampu menyerang jaringan lainnya atau *metastasizing* (Anonim, 2005^c).

Beberapa jenis kanker terutama pada orang dewasa sering disebabkan oleh faktor resiko yaitu sebagai berikut :

1. Faktor gaya hidup

Faktor gaya hidup dan lingkungan seperti merokok, diet lemak, paparan dari ultraviolet (radiasi sinar UV dari matahari), paparan bahan – bahan kimia (substansi penyebab kanker) di tempat kerja selama beberapa periode.

2. Faktor genetik

Sejarah keluarga, keturunan, dan genetik berperan penting dalam menyebabkan kanker pada orang dewasa dan anak – anak. Hal ini disebabkan karena beberapa gen diturunkan.

3. Faktor paparan virus

Contoh : *Human Papiloma Virus (HPV)*, *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*, dan *Herpes Virus*.

4. Faktor paparan lingkungan

Paparan lingkungan seperti pestisida dan pupuk (Anonim, 2005^a)

Kanker dapat menyebabkan banyak gejala yang berbeda, tergantung lokasinya dan karakter dari keganasan dan apakah ada metastasis. Sebuah diagnosis yang menentukan biasanya membutuhkan pemeriksaan mikroskopiktissue yang diperoleh dengan biopsy. Setelah didiagnosa, kanker biasanya dirawat dengan operasi, chemotherapy dan/atau radiasi (Anonim, 2005^c).

Kanker diklasifikasikan berdasarkan jaringan dimana sel kanker tumbuh dan berkembang atau berdasarkan lokasi dimana sel pertama kali tumbuh. Ada lima macam kanker yaitu :

1). Karsinoma

Karsinoma ialah kanker yang berada di jaringan epitel yang menutupi permukaan organ dan kelenjar. Sebagian karsinoma menyerang organ atau kelenjar yang berfungsi untuk sekresi misalnya payudara yang memproduksi susu. Tercatat karsinoma berjumlah 80 % dari keseluruhan kanker.

2). Sarkoma

Sarkoma ialah tumor *malignant* yang tumbuh pada jaringan ikat, tulang atau jaringan otot. Sarkoma yang paling sering terjadi yaitu pada tulang banyak menyerang pada anak-anak. Contoh sarkoma adalah osteosarkoma dan chondrosarkoma.

3). *Lymphoma*

Lymphoma merupakan kanker yang tumbuh di kelenjar pada sistem limfatik yang fungsinya memproduksi sel darah putih. *Lymphoma* juga dapat tumbuh di otak dan payudara. *Lymphoma* dibagi menjadi dua yaitu *Hodgin's lymphoma* dan *non-Hodgin's lymphoma*.

4). Leukemia

Leukemia, biasa disebut kanker darah, ialah kanker pada sumsum tulang belakang yang fungsinya menjaga agar sumsum tulang tetap memproduksi sel darah merah, sel darah putih dan platelets. Sel darah putih memerangi infeksi sedangkan sel darah merah mengedarkan oksigen ke seluruh tubuh. Platelet berperan dalam

pembekuan darah. Contoh leukemia ialah *myelogenous leukemia*, *chronic myelogenous leukemia*, *acute lymphocytic leukemia* dan *chronic lymphocytic leukemia*.

5). Myeloma

Myeloma berkembang di sel plasma pada sumsum tulang belakang. Pada beberapa kasus sel myeloma terkumpul pada satu tulang sebagai single tumor yang biasa disebut *plasmacytoma*. Sedangkan pada kasus yang lain sel myeloma berada pada lebih dari satu tulang, oleh karena itu sering disebut sebagai Myeloma multipel (Anonim, 2005^a).

2. Siklus sel

Siklus sel merupakan mekanisme yang kompleks dimana tubuh mengontrol pertumbuhan sel. Kanker ditandai dengan adanya multiplikasi sel yang tidak terkontrol karena protein pengatur siklus sel yang malfungsi akibat dari adanya mutasi genetik. Protein malfungsi yang paling umum terjadi ialah mutasi pada p53 yaitu suatu gen *suppressor* tumor, ditemukan pada sekitar dua pertiga penderita kanker (Anonim, 2005^b).

Eukaryotic cell tidak dapat membelah menjadi dua, dua menjadi empat, dan seterusnya. Tanpa terjadinya dua sel pengganti., yaitu :

1. Penggandaan *genome* (DNA) pada S phase (*synthesis phase*) dari siklus sel.
2. Pembelahan *genome* menjadi separuhnya selama mitosis (M phase).

Periode antara M dan S disebut G1: dan periode antara M dan S adalah G2.

Jadi, siklus sel terdiri dari:

1. G1= pertumbuhan dan persiapan kromosom untuk replikasi.
2. S = sintesis dari DNA(dan *sentrosome*).
3. G2 = persiapan untuk mitosis.
4. M = Mitosis (Anonim 2005^f).

Jalur sel melalui siklus sel dikontrol oleh protein di sitoplasma. Yang paling berperan pada sel hewan adalah :

1. Cyclins

- a). G1 cyclin (cyclin D)
- b). S-phase cyclin (cyclin E dan A)
- c). Mitotic cyclin (cyclin B dan A)

Mereka berperan pada perbaikan dan perusakan pada siklus sel.

2. Cyclin-dependent kinases (Cdks)

- a). G1 Cdk (Cdk4)
- b). S-phase Cdk (cdk2)
- c). M-phase Cdk(Cdk 1)

Mereka berperan untuk menjaga kestabilan sel, tetapi masing-masing harus mengikat *cyclin* yang cocok untuk diaktifkan. Mereka menambahkan gugus *phosphate* untuk substrat protein yang dikontrol pada siklus sel.

3. Anaphase-Promoting Complex (APC). APC juga disebut *cyclosome*, dan kompleks disebut sebagai APC/C (Anonim 2005^f).

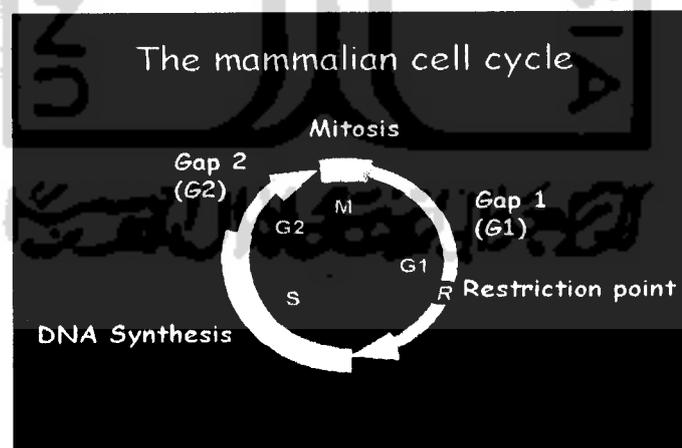
Tahapan siklus sel dimulai dengan meningkatnya jumlah ikatan G1-*cyclins* dengan Cdks yang akan memberikan perintah kepada kromosom untuk bereplikasi. Jumlah *S-phase promoting factor* (SPF) meningkat lalu masuk ke inti sel dan menyiapkan sel untuk menggandakan DNA dan kromosomnya. Ketika DNA bereplikasi, *cyclin E* hancur dan jumlah *mitotic cyclins* meningkat (pada fase G2). *M-phase promoting factor* (kompleks ikatan antara *mitotic cyclins* dan *M-phase Cdk*) melakukan inisiasi yaitu, memasang *mitotic spindle*, membongkar pembungkus inti dan mengondensasi kromosom. Peristiwa ini membawa sel pada proses metafase dari mitosis. Pada tahap ini *M-phase promoting factor* mengaktifkan *anaphase-promoting complex* (APC) yang akan memisahkan pasangan *chromatids* (metafase) dan memindahkannya ke kutub sel (anafase) sehingga melengkapkan proses metafase (Anonim, 2005^f).

Sel memiliki beberapa sistem yang dapat menghentikan siklus sel apabila terjadi hal yang salah. Sistem tersebut diantaranya adalah :

1. Pengawasan yang terjadi saat fase S. Sel dimonitor atas adanya Okazaki *fragments*. Sel tidak akan dapat melanjutkan siklus jika *fragments* tersebut belum hilang.
2. DNA *damage checkpoints*. DNA damage bekerja pada saat sebelum sel memasuki fase S (*G1 checkpoint*), selama fase S, dan setelah DNA bereplikasi (*G2 checkpoint*).
3. *Spindle checkpoints* yang mendeteksi adanya kegagalan pada saat proses metafase (*M checkpoint*). Jika kerusakan tidak dapat diperbaiki maka sel akan melakukan apoptosis.

Semua *checkpoints* dilakukan oleh kompleks protein. Jika terjadi mutasi gen maka akan dapat menimbulkan kanker. Jika *checkpoints* malfungsi maka sel akan terus-menerus membelah meskipun dapat merusak jaringan (Anonim, 2005^f).

Protein p53 menyebabkan kerusakan DNA dengan menghentikan perkembangan pada fase G1. Seluruh kopi dari p53 bermutasi karena hal ini sehingga p53 dikategorikan sebagai *tumor suppressor gene*. Protein p53 juga berperan dalam proses apoptosis dengan memaksa sel lain agar "bunuh diri" sehingga sel kanker dapat berkembang dengan cepat (Anonim 2005^f).



Gambar 1. Cell Cycle (Benards, 2005).

Siklus sel berlangsung dari fase G1 kemudian ke DNA *synthesis* selanjutnya ke G2 baru ke mitosis kembali lagi ke G1.

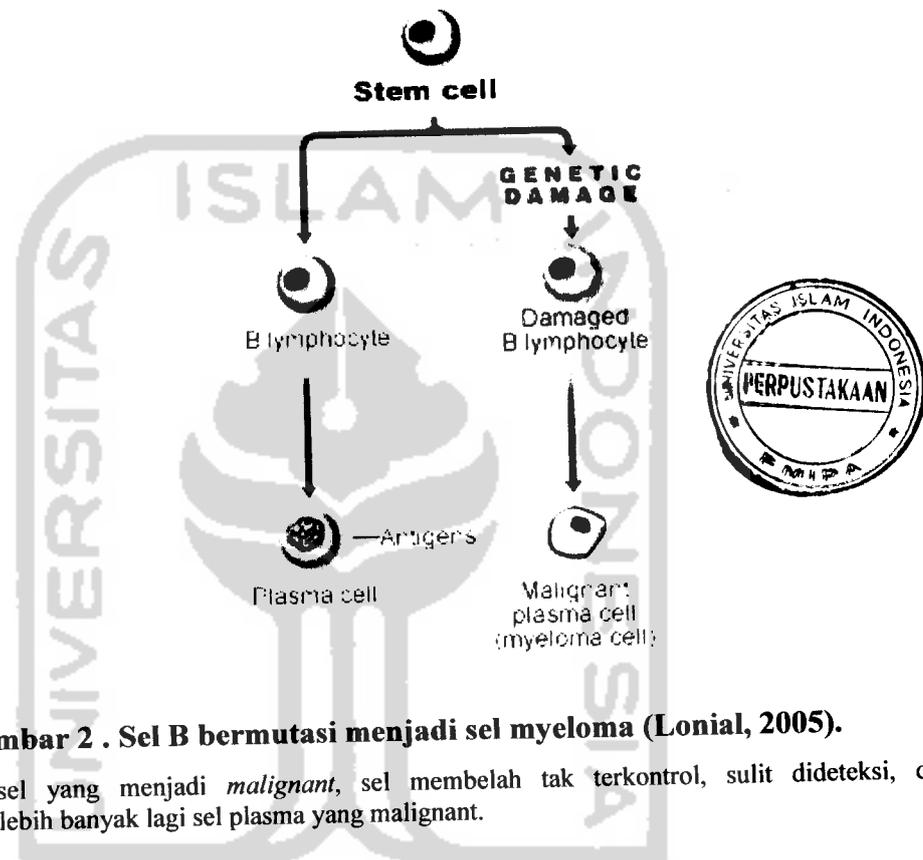
3. Myeloma multipel

Myeloma multipel adalah gangguan limfoproliferatif yang berhubungan dengan sel plasma. Myeloma multipel adalah gangguan neoplastik ganas yang berasal dari sumsum tulang dan terutama melibatkan tulang. Median umur penderita ini pada saat diagnosis dilakukan adalah 60 tahun. Myeloma multiple jarang ditemukan pada individu berumur di bawah 40 tahun. Sel-sel plasma merupakan bentuk sel limfosit B yang paling matang yang sudah diaktifkan dan bertanggung jawab atas sintesis immunoglobulin. Lima golongan utama immunoglobulin adalah IgA, IgD, IgE, IgG dan IgM (Anderson, 1994).

Sel yang berfungsi sebagai sel imun, seperti sel darah, terbentuk di sumsum tulang belakang dari batang sel. Sebagian batang sel tumbuh menjadi sel darah putih yang disebut *lymphocyte*. Dua macam *lymphocyte* yang utama adalah sel B (*Lymphocyte B*) dan sel T (*lymphocyte T*). Plasma sel terbentuk dari sel B. Plasma sel yang normal terbentuk dari sel B di limfa nodus sebagai respon imun terhadap penyakit dan infeksi. Transformasi dari sel B normal menjadi *malignant* melewati multi proses yang rumit meliputi abnormalitas genetik. Akibat dari sel yang menjadi *malignant*, sel membelah tak terkontrol, sulit dideteksi, dan menghasilkan lebih banyak lagi sel plasma yang *malignant*. Sel myeloma ini ikut dalam peredaran darah dan terkumpul di sumsum tulang belakang dimana akan menyebabkan kerusakan pada jaringan (Lonial, 2005).

Sering dijumpai komplikasi seperti *pneumonia*, infeksi saluran kemih, dan bakteremia. Penyakit ini terutama disebabkan oleh berkurangnya atau tidak adanya immunoglobulin normal serta leucopenia sekunder karena penggantian sumsum atau kemoterapi. Peningkatan kadar globulin abnormal menyebabkan peningkatan viskositas serum disertai gangguan penglihatan, sakit kepala, mengantuk, mudah marah dan kebingungan. Pengembangan volume plasma dapat mengakibatkan payah jantung kongestif. Sel-sel darah merah berlapis protein yang saling melekat seperti tumbukan mata uang. Terjadi manifestasi pendarahan karena protein mengadakan interaksi dengan faktor-faktor pembekuan dan melapisi trombosit sehingga mengganggu fungsi trombosit. Salah satu dari globulin itu, krioglobulin,

mengendap pada suhu dingin, menyebabkan pucat, rasa sakit, dan timbulnya tukak pada ujung jari tangan dan kaki. Juga terdapat anemia normositik normokrom. Menunjukkan sediaan hapus darah perifer pada myeloma multiple yang menggambarkan keganasan sel plasma (Anderson, 1994).



Gambar 2 . Sel B bermutasi menjadi sel myeloma (Lonial, 2005).

Akibat dari sel yang menjadi *malignant*, sel membelah tak terkontrol, sulit dideteksi, dan menghasilkan lebih banyak lagi sel plasma yang *malignant*.

Nyeri tulang hebat yang mengakibatkan penderita cacat, terutama di daerah yang menanggung berat badan, terjadi secara sekunder akibat destruksi tulang dan fraktur fisiologis. Gerakan sederhana seperti membalikkan badan di tempat tidur, batuk, atau bersin dapat mengakibatkan fraktur lengan dan tulang iga. Fraktur kompresi mengakibatkan tinggi badan berkurang. Karena *destruksi* tulang ini, kalsium dimobilisasi, sehingga menyebabkan hiperkalsemia (kadar kalsium dalam darah meningkat). Gejala-gejala neurologis berkisar dari neuropati perifer sampai penekanan medulla spinalis. Yang terakhir ini merupakan keadaan darurat medik, dan

bila tidak dilakukan pengobatan segera dengan radioterapi dan/atau kemoterapi penderita akan menjadi lumpuh. Penderita ini mungkin menunjukkan gejala-gejala gagal ginjal, anoreksia, kebingungan dan koma. Jika gagal ginjal tidak diobati dapat terjadi kematian. Di samping karena hiperkalsemia, gagal ginjal juga dapat diatasi oleh protein mieloma (yang disebut protein Bence Jones) yang merusak tubuli ginjal. Kadar asam urat yang tinggi terjadi secara sekunder akibat peningkatan pergantian sel plasma juga dapat mengakibatkan gagal ginjal. Hal ini mungkin diakibatkan oleh penyakit primer atau mungkin sekunder akibat kemoterapi. Dehidrasi dapat mempercepat gagal ginjal yang sebenarnya (Anderson, 1994).

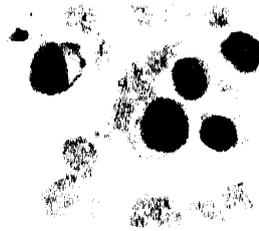
Diagnosis mieloma multiple berdasarkan pada pemeriksaan fisik, anamnesis, gambaran radiologis, hematologis dan kimia. Gambaran positif berupa peningkatan protein pada elektroforesis serum dan/atau urin dan tes imunoforesis serta lesi litik tulang punched out pada radiogram rangka. Pemeriksaan sumsum tulang biasanya menunjukkan plasmatisosis (jumlah plasmasit yang meningkat dalam darah) yang lebih dari 10% disertai sel-sel plasma imatur. Sel-sel ini berdiameter 15 sampai 40 m, basofilik, dan mengandung inti yang terletak eksentrik dan kromatin halus yang berkelompok (Anderson, 1994).

4. Sel myeloma

Myeloma cell line pertama kali diambil pada tahun 1967 oleh R.Laskov dan M.D. Scharff dari Merwin plasma sel tumor (MP-11) yang diisolasi dari mencit Balb/c. Sel tumor ini diadaptasikan ke dalam kultur secara terus menerus sampai 6 kali dan dipelihara dalam flask yang berisi media Dulbeccos-Eagle's dengan asam amino non esensial dan 20% serum kuda yang inaktif. *Myeloma cell line* ini menyerupai sel tumor induk, dapat memproduksi gamma globulin (igG2b), memiliki rantai dimer dan rantai bebas. Waktu pembelahan sel kira-kira 17 jam, seperti halnya sel tumor induk berisi virus tipe A. Sel menghasilkan 5-6 mikrogram igG2b per sel / menit (Anonim, 1983).

Media pertumbuhan sel myeloma adalah RPMI 1640 yang berisi 20 asam amino seperti asparagin, glutamine, histidin, metionin dan serin, 11 vitamin seperti

biotin, tiamin HCl, inositol, riboflavit dan vitamin B12, 6 garam anorganik seperti NaCl, KCl, NaHCO₃ dan MgSO₄, serta 3 komponen lain yaitu glukosa, glutation dan fenol merah (Anonim, 1983).



Gambar 3. Sel Myeloma (Anonim, 2003).

Sel Myeloma berbentuk bulat dengan inti sel terletak di tengah. Pada gambar terlihat sel myeloma yang terdapat di dalam sumsum tulang belakang.

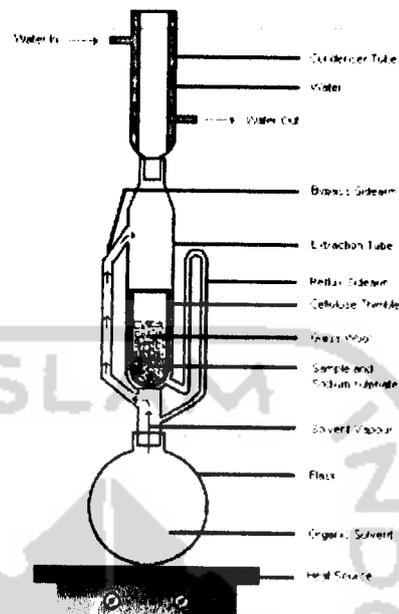
5. Ekstraksi tanaman

Cara Soxhletasi

Soxhlet merupakan alat ekstraksi dengan penyarian berkesinambungan. Alat ini merupakan penyempurnaan dari alat ekstraksi. Uap cairan penyari naik ke atas melalui pipa samping, kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Cairan turun ke labu melalui tabung yang berisi serbuk simplisia. Cairan penyari sambil turun melarutkan zat aktif serbuk simplisia. Karena adanya sifon maka setelah cairan mencapai permukaan sifon, seluruh cairan akan kembali ke labu. Cara ini lebih menguntungkan karena uap panas tidak melalui simplisia, tetapi melalui samping.

Keuntungan ekstraksi dengan soxhletasi adalah cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit dan secara langsung diperoleh hasil yang lebih pekat. Serbuk simplisia disari oleh cairan penyari murni, sehingga dapat menyari zat aktif lebih banyak. Penyarian dapat diteruskan sesuai dengan keperluan tanpa menambah volume cairan penyari. Sedangkan kerugian dari metode soxhletasi adalah larutan dipanaskan terus-menerus sehingga zat aktif yang tidak tahan pemanasan kurang cocok, hal ini dapat diperbaiki dengan menambahkan peralatan untuk mengurangi tekanan udara. Cairan penyari dididihkan terus-

menerus, sehingga cairan penyari yang baik harus murni atau campuran azeotrop (Anonim, 1986).



Gambar 4. Soxhlet ekstraktor (Wild dan de Koning, 1997).

Soxhlet ekstraktor terdiri atas 4 bagian yaitu : *condenser tube*, soxhlet, labu alas bulat dan sumber panas.

6. Rambutan (*Nephelium lappaceum*, L.)

(a). Klasifikasi ilmiah

Klasifikasi ilmiahnya adalah sebagai berikut:

| | |
|-----------------|-----------------------|
| <i>Kingdom</i> | : Plantae |
| <i>Division</i> | : Magnoliophyta |
| <i>Class</i> | : Magnoliopsida |
| <i>order</i> | : Sapindales |
| <i>family</i> | : Sapindaceae |
| <i>genus</i> | : <i>Nephelium</i> |
| <i>species</i> | : <i>N. lappaceum</i> |



Gambar 5 . Rambutan (Anonim, 2005e).

Buah bentuknya bulat lonjong, panjang 4-5 cm, dengan duri tempel yang bengkok, lemas sampai kaku. Kulit buahnya berwarna hijau, dan menjadi kuning atau merah kalau sudah masak.

(b). Nama

a. Nama daerah

Sumatera : rambutan, rambot, rambut, rambuteun, rambuta, jailan, folui, bairabit, puru biancak, p. biawak, hahujam, kakapas, likes, alu.

Jawa : rambutan, corogol, tundun, bunglon, buwa buluwan

Nusa tenggara : buluan, rambuta.

Kalimantan : rambutan, siban, banamon, beriti, sanggalaong, sagalong, beliti, maliti, kayokan, bengayau, puson.

Sulawesi : rambutan, rambuta, rambusa, barangkasa, bolangat, balatu, balatung, walatu, wayatu, wilatu, wulangas, lelamu, lelamun, toleang.

Maluku : rambutan, rambuta.

b. Nama asing

Shao tzu (c), rambutan (Tag), ramustan (spanyol)

c. Nama simplisia

Nephelii lappecei semen (biji rambutan), Nephelii lappecei pericarpium (kulit buah rambutan) (Dalimartha, 2004).

(c). Uraian Tumbuhan

Rambutan banyak ditanam sebagai pohon buah, kadang-kadang ditemukan tumbuh liar. Tumbuhan tropis ini memerlukan iklim lembab dengan curah hujan

tahunan paling sedikit 2.000 mm. Rambutan merupakan tanaman dataran rendah hingga ketinggian 300-600 dpl (Dalimartha, 2004).

Pohon dengan tinggi 15-25 m ini mempunyai banyak cabang. Daun majemuk menyirip letaknya berseling, dengan anak daun 2-4 pasang. Helai anak daun bulat lonjong, panjang 7,5-20 cm, lebar 3,5-8,5 cm, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, tangkai silindris, warnanya hijau, kerap kali mongering. Bunga tersusun pada tandan di ujung ranting, harum, kecil-kecil, warnanya hijau muda. Bunga jantan dan bunga betina tumbuh terpisah dalam satu pohon. Buah bentuknya bulat lonjong, panjang 4-5 cm, dengan duri tempel yang bengkok, lemas sampai kaku. Kulit buahnya berwarna hijau, dan menjadi kuning atau merah kalau sudah masak, dinding buah tebal, biji bentuk elips, terbungkus daging buah berwarna putih transparan yang dapat dimakan dan banyak mengandung air, rasanya bervariasi dari masam sampai manis, kulit biji tipis berkayu (Dalimartha, 2004).

Rambutan Aceh Lebak bulus pohonnya tinggi dan lebat buahnya dengan hasil rata-rata 160-170 ikat per pohon, kulit buah berwarna merah kuning, halus, rasanya segar manis-asam banyak air dan ngelotok daya simpan 4 hari setelah dipetik, buah ini tahan dalam pengangkutan (Anonim, 2002).

(d). Khasiat

Kulit batang berkhasiat untuk mengobati sariawan; daun untuk meredakan sakit kepala; kulit buah untuk mengobati disentri dan cacingan; biji buah untuk menurunkan kadar gula darah (hipoglikemik); dan buah untuk mengobati sakit perut, disentri dan cacingan (Anonim, 2002).

(e). Kandungan Kimia

Buah mengandung karbohidrat, protein, lemak, fosfor, besi, kalsium, dan vitamin C. Kulit buah mengandung tanin dan saponin. Kulit batang mengandung tanin, saponin, flavonoida, *peptic substances*, dan zat besi (Dalimartha, 2004).

Kandungan lemak pada bijinya meliputi: asam lemak pada yang terdiri dari : asam palmitat 2%; asam stearat 13,8%; asam arakhidonat 34,7%; asam oleat 45,3%; sam ercosenoic 4,2%;. Gliserida tersabunkan terdiri dari 1,4%. Kandungan minyak yang ada dapat dijadikan sabun dan permen jika terdapat dalam jumlah yang besar (Anonim, 1998).

7. Kromatografi gas

Kromatografi gas (GC) ialah tehnik analisis untuk memisahkan senyawa kimia berdasarkan perbedaan titik uapnya. Kromatografi dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Senyawa melewati kromatografi gas dalam bentuk gas, baik karena bentuknya gas maupun senyawa yang dipanaskan dan kemudian diuapkan. Partisi senyawa antara fase diam, berupa padat maupun larutan, dan fase gerak yang berupa gas. Perbedaan partisi senyawa dengan fase diam menyebabkan senyawadapat dipisahkan (Punrattanasin dan Spada, 1997).

Komponen utama kromatografi gas menurut Punrattanasin dan Spada adalah :

1. Gas pembawa

Gas pembawa yang biasa dipakai diantaranya ialah helium, higrogen, atau nitrogen. Gas pembawa berfungsi sebagai fase gerak yang akan membawa sampel melewati kolom.

2. Injektor

Injektor berbentuk silinder yang akan dimasuki sampel sebelum ke dalam kolom kromatografi gas. Suhu injektor diatur sehingga seluruh komponen sampel dapat diuapkan.

3. Kolom

Kolom merupakan komponen yang paling utama dari kromatografi gas. Kolom bertindak sebagai fase diam yang akan memisahkan komponen sampel. Komponen dari fase diam akan sangat mempengaruhi waktu yang dibutuhkan sampel melewati kolom.

4. Oven

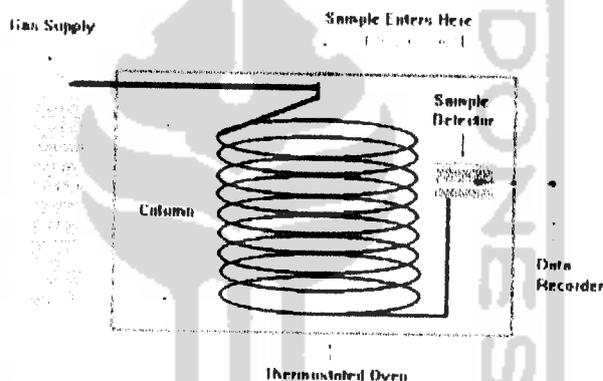
Kolom ditempatkan dalam sebuah oven yang suhunya diatur sedemikian rupa sehingga sesuai dengan yang diinginkan. Biasanya suhu oven GC sekitar 300 derajat celcius.

5. Detektor

Setelah melewati kolom, sampel akan memasuki detektor. Senyawa dan detektor berinteraksi menghasilkan signal berupa jumlah senyawa uji yang ada di dalam sampel.

6. Data recorder system

Sistem *recorder* akan mencatat signal yang dihasilkan oleh detektor. Alat ini biasa disebut *chromatogram*.



Gambar 6 . Kromatografi gas (Wild dan de Koning, 1997).

Kromatografi gas terdiri dari beberapa bagian yaitu: gas *supply*, *injector*, kolom, *thermostated oven*, sampel *detector*, dan data *recorder* untuk menganalisis data.

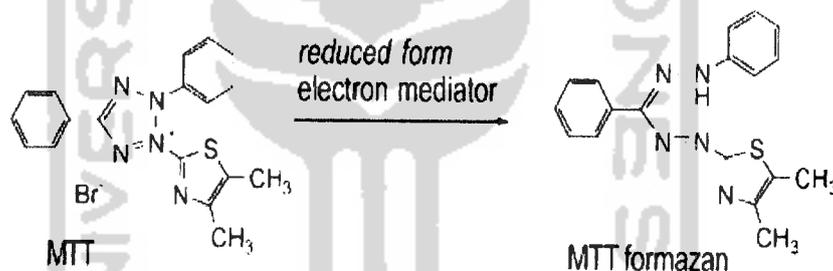
8. Uji Sitotoksitas Dengan Metode MTT

Sitotoksik adalah sifat toksis/beracun suatu senyawa terhadap sel hidup uji sitotoksitas merupakan suatu uji yang cepat, terstandarisasi, sensitif dan tidak terlalu mahal, dengan kepentingan untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis dalam jumlah yang signifikan. Sensitifitas yang tinggi dari uji ini karena adanya sel uji yang terisolasi dalam kultur dan tidak adanya mekanisme protektif tubuh yang mempengaruhi sel uji. Antibiotik

dapat ditambahkan pada medium untuk mikroba yang mungkin ada pada material uji dan sample kontrol (Wallin, 1998).

Pemilihan sel untuk uji sitotoksitas tergantung pada tujuan yang ingin dicapai. Tapi pada umumnya untuk penapisan senyawa uji selalu dipilih sel yang cepat tumbuh dan penanganannya mudah. Pada umumnya uji sitotoksitas secara in vitro ini dapat digunakan untuk kultur primer maupun subkultur yang merupakan turunan dari sel primer yang disebut sebagai *cell lines* (Freshney, 2000).

Garam tetraolium MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil tetrazolium bromida) ditambahkan pada media setelah diinkubasi 24 jam garam ini akan direduksi oleh system reduktase suksinat tetrazolium dalam rantai respirasi mitokondria aktif menjadi formazan. Formazan yang berwarna ungu ini tidak larut dalam air maka dilarutkan menggunakan HCl 0,04 N dalam isopropanol (sigma, 1999) atau dengan 10 % Sodium Dedosil Sulfat (SDS) dalam 0,01 N HCl (Tada, dkk, 1986). Reaksi reduksi MTT menjadi formazan tampak pada gambar :



Gambar 7. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Anonim, 2006)

MTT (3-(4,4-dimetiltiazol-2,5-difenil tetrazolium bromida) akan direduksi oleh sel hidup menjadi kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air.

9. *Lethal Concentration* (LC₅₀)

Respon apapun yang dipilih sebagai ukuran, hubungan antara respon pada system biologis dan jumlah zat toksik yang diberikan ditunjukkan sebagai hubungan dosis respon. Bila kematian merupakan responnya maka dosis yang menimbulkan kematian pada 50 % populasi pada spesies yang sama, dalam waktu yang spesifik dan kondisi percobaan yang sesuai diistilahkan sebagai median *Lethal Dose* atau LD₅₀.

pemberian obat bila dinyatakan sebagai konsentrasi maka diistilahkan sebagai median *Lethal Concentration* atau LC_{50} (Casscarett and Doull, 1975).

Bila frekuensi atau efek lain dihubungkan terhadap dosis dalam skala logaritmik, diperoleh suatu kurva berbentuk S. Akan tetapi, banyak bagian kurva dapat diluruskan dengan menggambarkan titik-titik tersebut berdasarkan nilai basis probit (Lu, Frank C., 1995). Hubungan dosis-respon dapat dibedakan dalam 2 tipe yaitu *Graded Response* dan *quantal Response*. Tipe yang pertama, *graded Response* yaitu respon bertingkat antara nol dan nilai maksimum dan 6 intensitas respon tergantung pada dosis. Tipe kedua, *quantal* respon yaitu suatu respon dimana efek bisa diamati hanya ada dua kemungkinan yaitu ada atau tidak adanya respon (*all or none*). Pada respon *quantal*, respon yang timbul terdistribusi secara normal (Casscarett and Doull, 1975).

10. Obat – obatan Antikanker

Berdasarkan mekanisme kerjanya Tjay dan Rahardja membagi obat antikanker dalam berbagai golongan sebagai berikut :

a) Zat-zat Alkilasi

Zat-zat alkilasi berkhasiat kuat terhadap sel-sel yang sedang membelah. Mekanismenya berdasarkan gugusan alkilnya yang sangat reaktif dan menyebabkan *cross-linking* (saling mengikat) antara rantai-rantai DNA di dalam inti sel. Dengan demikian, penggandaan DNA terganggu dan pembelahan sel dapat dirintangi. Contoh obatnya yaitu Klorambusil dan Siklofosfamid.

b) Antimetabolit

Obat-obatan antimetabolit mengganggu sintesa DNA, tetapi dengan jalan antagonisme saingan. Rumus kimia obat golongan ini sangat mirip dengan rumus beberapa metabolit tertentu yang penting bagi fisiologi sel, yakni asam folat, purin dan pirimidin. Obat menduduki tempat metabolit tersebut dalam sistem enzim tanpa mengambil alih fungsinya, sehingga sintesa DNA atau RNA gagal dan kebanyakan terhenti. Contoh obatnya 5-Fluorourasil (antagonis pirimidin) dan Merkarptopurin (antagonis purin).

c) Antimitotika

Zat-zat antimikotika menghindarkan pembelahan pada fase metafase sehingga merintangi terjadinya pembelahan inti. Zat antimitotika mencegah masuknya belahan kromosom ke dalam anak inti. Contoh obat golongan ini adalah Vinblastin dan Vinkristin.

d) Antibiotika

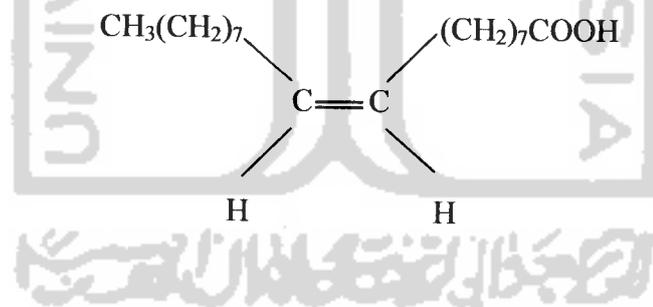
Beberapa antibiotik dapat mengikat DNA secara kompleks sehingga sintesanya terhenti. Contohnya Doksorubisin dan Bleomisin.

e) Hormon dan Antihormon

Sejumlah kanker yang bersifat *estrogen dependent* atau *adrogen dependent* ternyata dapat dihambat pertumbuhannya oleh hormon lawannya. Misalnya digunakan Tamoxifen (anti-estrogen) untuk pengobatan kanker payudara.

f) Antioksidan

Senyawa yang memiliki gugus C ikatan rangkap dapat bersifat antioksidan yaitu mengikat gugus C radikal bebas sehingga dapat menghindari kerusakan sel akibat radikal bebas. Asam oleat memiliki satu ikatan rangkap sehingga dapat dimasukkan ke dalam golongan antioksidan.



Gambar 8. Struktur asam oleat

Asam oleat memiliki satu ikatan rangkap sehingga dapat bersifat sebagai antioksidan

Asam oleat bekerja sebagai antioksidan dengan mekanisme menangkap radikal bebas. Asam oleat memiliki atom $C\alpha$ yang dapat melepaskan atom H radikal bebas sehingga atom $C\alpha$ pada asam oleat menjadi C radikal bebas yang dapat menangkap radikal – radikal bebas di dalam tubuh.

B. Keterangan Empiris

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Dr. Menendez asam oleat yang berasal dari minyak zaitun dapat menekan resiko terkena kanker payudara, berdasarkan hal tersebut maka dapat dijadikan alasan untuk melakukan penelitian uji sitotoksik biji rambutan (*Nephelium lappaceum, L*) var. *aceh lebah bulus* yang kandungan terbesar asam lemaknya adalah asam oleat dengan mekanisme sebagai antioksidan.



BAB III METODE PENELITIAN

A. Bahan dan alat

1. Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji antikanker ini adalah: biji rambutan (*Nephelium lappaceum, L*) var. *aceh lebak bulus* dari daerah Wedomartani, kloroform p.a, etanol 70% (E-merk), pelarut DMSO (*dimethyl sulfoxide*)(E-merk), media RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Sigma), kultur sel Myeloma (Laboratorium Hayati UGM), medium pertumbuhan yang mengandung 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco), pereaksi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil tetrazolium bromida) (Sigma), pereaksi penghenti MTT (Sodium Dedosil Sulfate).

2. Alat

Alat-alat yang digunakan untuk uji sitotoksisitas adalah *plate 96-well* (Nunc), *LAF (Laminar Air Flow) cabinet* (EACI), sentrifuse (LBS), inkubator 37°C dengan 5% CO₂ (memmert), *tissue culture flask* (Nunc), tabung conical steril (Nunclon) (Nunc), tabung effendorf (Eppendorf), hemositometer (Neubauer), mikroskop (Olympus), foto mikroskop elektron (Olympus), alat-alat gelas, ELISA *reader* (SLT/sltlabinstruments), *blue tip, yellow tip, vortex* (K-Gemmy Industrial Corp), Counter-Count (Niko), mikropipet (Labsystem).

B. Cara Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA Universitas Islam Indonesia untuk memastikan kebenaran tanaman yang diteliti berdasarkan buku Flora of Java (Backer & Bakhuizen, 1965). Tanaman yang digunakan adalah biji rambutan (*Nephelium lappaceum, L*) var. *aceh lebak bulus*.

2. Pengeringan dan penyerbukan simplisia kering biji rambutan

Biji rambutan hasil sortasi dikeringkan di lemari pengering pada suhu sekitar 40-50° C sampai berat konstan dan diserbuk menggunakan mesin penyerbuk, kemudian ditempatkan dalam plastik bersih.

3. Pembuatan ekstrak kloroform biji rambutan

Serbuk diekstraksi dengan kloroform menggunakan alat soxhlet. Untuk setiap 30 g serbuk digunakan 200 mL kloroform. Setelah cairan penyari jernih, proses ekstraksi dihentikan dan selanjutnya ekstrak kloroform diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dianalisis dengan GC.

4. Identifikasi kandungan asam lemak dengan Gas Chromatography

Ekstrak kloroform diidentifikasi dengan GC dengan menggunakan standar minyak zaitun. Waktu retensi yang diperoleh dibandingkan dengan Waktu retensi standar (Christie, 1993).

5. Pembuatan larutan uji

Ekstrak yang diperoleh dibuat larutan stok 3200 µg/mL sebanyak 4 ml. Masukkan dalam conical steril ditutup dengan aluminium foil. Selanjutnya dibuat seri kadar ekstrak dari larutan stok dalam media kultur RPMI 1640. Untuk mencampurkan ekstrak kloroform dengan media kultur diperlukan DMSO.

6. Uji sitotoksistas ekstrak kloroform biji Rambutan terhadap sel Myeloma

a. Propagasi sel Myeloma

Sel diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian segera dicairkan dalam penangas air pada suhu 37°C. Ampul disemprot dengan etanol 70% kemudian dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung steril yang berisi media RPMI 1640. suspensi sel disentrifugasi 1500 g selama 5 menit, supernatan yang diperoleh dibuang, diganti dengan media RPMI yang baru lalu disuspensi pelan-pelan.

Suspensi sel disentrifugasi lagi 1500 g selama 5 menit dan supernatan yang diperoleh dibuang. Sel ditambah dengan 1 mL medium pertumbuhan yang mengandung 10% PBS dan diresuspensikan hingga homogen. Kemudian sel ditumbuhkan dalam beberapa tabung biakan kecil, inkubasikan pada suhu 37°C dengan aliran CO₂ 5%. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian lebih lanjut (Anonim, 2001^a).

b. Panen sel Myeloma

Setelah jumlah sel cukup, medium diganti dengan medium RPMI 1640 sebanyak 5 mL dan sel dilepaskan dari dinding tabung. Sel dipindahkan ke dalam tabung steril dan ditambahkan medium RPMI sampai volume 10 mL dan disentrifugasi pada 1500 g selama 5 menit, sel dicuci dua kali menggunakan medium yang sama, sel dihitung jumlahnya dengan hemositometer. Pada suspensi sel ditambah sejumlah medium sehingga memperoleh konsentrasi sel 3×10^4 sel/100 μ L dan siap untuk penelitian lebih lanjut (Anonim, 2001^a).

c. Uji sitotoksitas dengan metode MTT

Sel dengan kepadatan 3×10^4 sel/100 μ L didistribusikan kedalam sumuran dan diinkubasikan bersama ekstrak kloroform biji rambutan dengan satu seri kadar selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, masing-masing sumuran ditambahkan 10 μ L MTT 2.5 μ g/mL dalam medium RPMI. Kemudian diinkubasikan minimum 9 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan pereaksi penghenti sebanyak 100 μ L dan diinkubasikan semalam pada suhu kamar (Anonim, 2001^b). Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm.

d. Analisis Data Uji sitotoksitas

Disini digunakan uji sitotoksitas dengan metode MTT, dimana absorbansi yang didapat dari ELISA *reader* mencerminkan jumlah sel yang hidup. Maka prosentase kematian sel karena sampel dapat dihitung dengan rumus :

Misal,

A = absorbansi sampel / ekstrak + sel

B = absorbansi sampel / ekstrak + media

C = absorbansi media + sel

D = absorbansi media

$$\%kematian = \frac{(C - D) - (A - B)}{(C - D)} \times 100\%$$

Kemudian dihitung juga harga LC₅₀ (Lethal Concentration 50) dengan metode Probit untuk mengetahui potensi ketoksikan.

Perhitungan LC₅₀

- Regresi linear 1: $x = \%kematian$

$$y = probit$$

$$\text{Persamaan garis : } y = bx + a \dots\dots\dots(1)$$

Probit untuk 50% kematian ($x = 50$)

$$x = 50 \rightarrow y = b(50) + a$$

$$y = c$$

- Regresi Linear 2 : $x = \log dosis$

$$y = probit$$

$$\text{Persamaan garis : } y = bx + a \dots\dots\dots(2)$$

Substitusi (1) ke (2) :

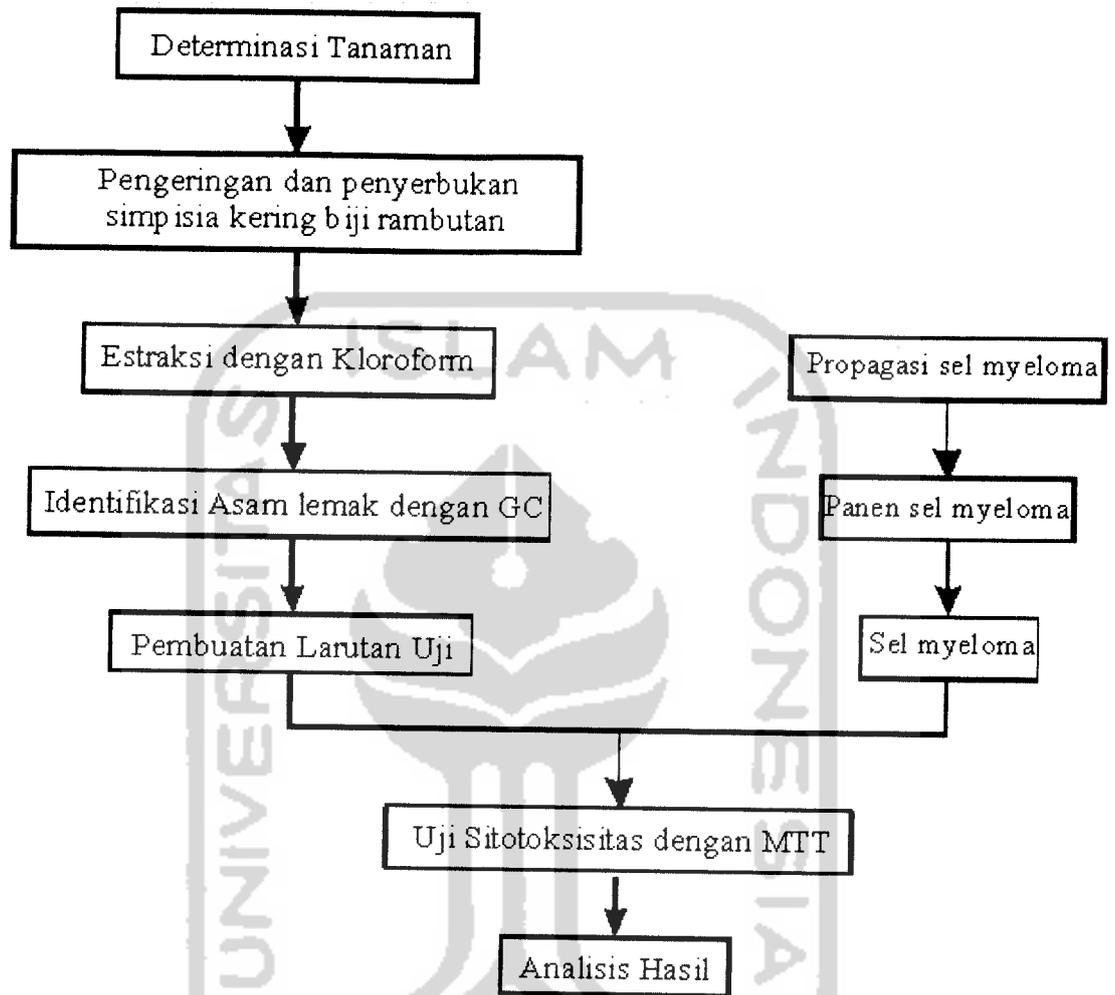
$$y = c \rightarrow y = bx + a$$

$$x = d$$

$$\text{anti log } x = \text{LC50} \quad \mu\text{g/mL}$$

$$\text{anti log } d = \text{LC50} \quad \mu\text{g/mL}$$

C. Skema cara kerja



Gambar 9. Skema cara kerja

D. Analisis Hasil

Persentase kematian sel karena sampel dapat dihitung dengan rumus :

Misal,

A = Absorbansi sampel (ekstrak) + sel

B = Absorbansi sampel (ekstrak) + media

C = Absorbansi media + sel

D = Absorbansi media

$$\%kematian = \frac{(C - D) - (A - B)}{(C - D)} \times 100\%$$

Kemudian LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) dianalisis dengan metode Probit untuk mengetahui potensi ketoksikan.

- Regresi linear 1: $x = \%kematian$

$$y = probit$$

$$\text{Persamaan garis : } y = bx + a \dots\dots\dots(1)$$

Probit untuk 50% kematian ($x = 50$)

$$x = 50 \rightarrow y = b(50) + a$$

$$y = c$$

- Regresi Linear 2 : $x = \log dosis$

$$y = probit$$

$$\text{Persamaan garis : } y = bx + a \dots\dots\dots(2)$$

Substitusi (1) ke (2) :

$$y = c \rightarrow y = bx + a$$

$$x = d$$

$$anti \log x = LC50 \quad \mu\text{g/mL}$$

$$anti \log d = LC50 \quad \mu\text{g/mL}$$

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN



A. Determinasi Tanaman

Pada tahap awal penelitian dilakukan determinasi tanaman. Determinasi tanaman ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII yang berdasarkan buku Flora of Java, adapun hasil dari determinasi adalah sebagai berikut:

1 b - 2 b - 3 b - 4 b - 6 b - 7 b - 10 b - 11 b - 12 b - 13 b - 14 a - 15 b (Golongan 9)

Golongan 9 - 197 b - 208 b - 219b - 220 a - 221 b - 222 a (69. Sapindaceae)

69. Sapindaceae - 1 b - 5 a (*Nephelium*) - 1 b (*Nephellium lappaceum*, L)

Varietas : *aceh lebak bulus*

Dari determinasi yang dilakukan, membuktikan bahwa tanaman yang akan digunakan untuk penelitian adalah biji Rambutan (*Nephellium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus*. Determinasi tanaman merupakan tahap awal penelitian untuk menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan utama serta mencegah kontaminasi tanaman lain yang tidak dikehendaki.

B. Pembuatan Ekstrak Kloroform

1. Pengumpulan dan Penyiapan Bahan Utama

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji Rambutan (*Nephellium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* yang dikumpulkan di daerah Wedomartani, Sleman. Pengumpulan bahan utama ini berasal dari satu daerah tertentu saja. Apabila dikumpulkan dari beberapa daerah yang memiliki perbedaan kondisi lingkungan, iklim, dan keadaan tanah dapat mempengaruhi kandungan kimia di dalam tanaman. Akibatnya antara biji Rambutan yang satu dengan yang lain akan memiliki variasi kandungan kimia yang terlalu besar.

2. Pembuatan Serbuk

Biji Rambutan yang telah dikumpulkan dipisahkan dari daging buahnya. Untuk menghilangkan kotoran dan sisa-sisa daging buah dilakukan pencucian sehingga diperoleh biji Rambutan yang bersih dan terbebas dari daging buah. Untuk mempermudah proses pengeringan dilakukan pemotongan atau perajangan biji Rambutan .

Hasil rajangan biji rambutan dikeringkan di lemari pengering pada suhu sekitar 40-50°C. Pengeringan dilakukan di lemari pengering untuk menghindari pemanasan yang terlalu tinggi yang dapat merusak kandungan dalam biji. Tujuannya adalah menghilangkan air di dalam tanaman untuk mencegah terjadinya pencampuran, reaksi enzimatik, kerja bakteri dan perubahan kimia. Pengeringan dihentikan setelah mencapai berat biji kering yang konstan. Hal tersebut membuktikan bahwa tidak ada lagi zat cair dalam tanaman sehingga proses pengeringannya dihentikan. Pada penelitian ini pengeringan dihentikan dan diperoleh berat serbuk konstan sebesar 485 gram.

Selanjutnya biji diserbuk menggunakan mesin penyerbuk. Serbuk simplisia tidak boleh terlalu halus, karena dapat memberikan kesulitan pada proses penyarian. Selanjutnya serbuk diayak menggunakan ayakan. Untuk memperoleh ukuran serbuk yang seragam.

3. Pembuatan Ekstrak

Untuk pembuatan ekstrak biji rambutan penyarian yang digunakan adalah kloroform karena sifatnya yang non-polar yang bertujuan agar dapat menarik asam lemak yang bersifat non-polar pula. Penggunaan kloroform juga dikarenakan sifatnya yang lebih selektif terhadap asam lemak. Apabila menggunakan pelarut yang lain kurang selektif sehingga zat yang tertarik akan lebih banyak.

Serbuk biji rambutan yang diperoleh selanjutnya diekstraksi dengan kloroform menggunakan alat Soxhlet. Tujuan penggunaan alat Soxhlet ini adalah agar diperoleh zat dalam jumlah yang lebih banyak karena proses dari Soxhletasi yang

terjadi secara berkesinambungan dan jumlah penyari yang dibutuhkan tidak terlalu banyak.

Proses ekstraksi ini dihentikan apabila cairan penyari sudah jernih. Selanjutnya ekstrak kloroform diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan senyawa dari pelarutnya sehingga pelarutnya masih bisa dipakai. Keuntungan menggunakan *rotary evaporator* adalah zatnya tidak rusak dan bisa terpisah dari pelarutnya, serta dapat menghindari bahaya karena apabila menggunakan penangas air untuk memisahkan pelarutnya dikhawatirkan uap dari pelarut yang digunakan akan terhirup. Sedangkan kerugian dari penggunaan *rotary evaporator* adalah biayanya mahal dan sulit ditentukan kapan diberhentikan.

Agar pelarut yang digunakan benar-benar hilang setelah dirotary evaporator maka dilakukan pemanasan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak yang benar-benar kental, yaitu sampai diperoleh ekstrak yang masih bisa dituang. Adapun ekstrak kental kloroform yang diperoleh adalah 9 ml.

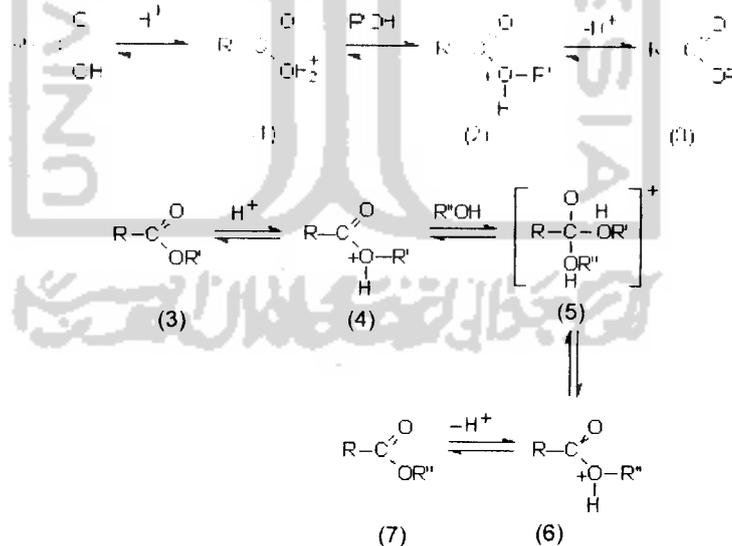
C. Pemeriksaan Kandungan Kimia

Untuk mengetahui ada tidaknya kandungan asam oleat dari biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus*, ekstrak kloroform diidentifikasi dengan kromatografi gas. Karena diduga kandungan ekstrak kloroform rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* sebagian besar terdiri dari asam lemak terutama asam oleat dan diduga memiliki aktifitas antikanker. Alasan penggunaan kromatografi gas dikarenakan sifat asam oleat yang non-polar dan memiliki titik didih yang tinggi sehingga dapat dipisahkan dengan baik oleh GC.

Fase diam atau kolom yang digunakan adalah Chrompack CP-Sil 5 CB sepanjang 50 meter, karena dapat diaplikasikan secara luas dengan *range* temperature yang luas juga. Sedangkan fase gerak yang digunakan adalah gas Nitrogen. Detektor yang digunakan adalah FID (*Flame Ionization Detector*), merupakan detektor yang cocok untuk semua senyawa yang mengandung atom C dimana pemisahannya berdasarkan jumlah atom C, yaitu semakin banyak atom C maka waktu retensinya

akan semakin besar. Kelebihan FID adalah respon yang bersifat universal tetapi kurang selektif.

Pemeriksaan kandungan kimia melalui analisis kualitatif ini dilakukan terhadap derivat asam lemak yang non-reaktif yang berupa metil ester, karena sifat dari metil ester yang lebih mudah menguap (*volatile*) dibandingkan dengan asam lemaknya sendiri. Untuk memperoleh derivat berupa metil ester dilakukan preparasi sampel yaitu sampel direaksikan dengan BF_3 (Boron Trifluorida), metanol, yang direfluks pada suhu $60^\circ\text{-}70^\circ\text{C}$ selama 1 jam. Perubahan asam lemak menjadi metil ester ini terjadi melalui reaksi transesterifikasi yaitu dengan mengganti gugus gliserol pada asam oleat dengan gugus alkohol pada metanol dalam suasana asam. Larutan BF_3 digunakan untuk memberikan suasana asam agar reaksi tersebut dapat berlangsung. Transesterifikasi merupakan pertukaran bagian alkohol dari suatu ester dapat dicapai dalam larutan asam atau basa oleh suatu reaksi reversible antara ester dan alkohol (Fessenden & Fessenden, 1992). Setelah larutan yang diperoleh dingin baru kemudian diekstrak dengan n-heksana yang berfungsi untuk menarik metil ester yang telah terbentuk, kemudian larutan diinjeksikan ke dalam kromatografi. Adapun reaksi transesterifikasi yang terjadi sebagai berikut :



Gambar 10. Reaksi Transesterifikasi (Christie, 1993)

Pada gambar terjadi perubahan bentuk asam lemak menjadi bentuk derivatnya yaitu metil ester

Standar yang digunakan untuk analisis kromatografi gas ini adalah asam oleat yang murni. Standar berfungsi untuk membandingkan waktu retensi antara ekstrak dengan asam oleat itu sendiri. Dari data yang diperoleh dapat dilihat bahwa salah satu senyawa kimia yang terkandung memiliki waktu retensi yang mirip dengan waktu retensi asam oleat murni standar yaitu 27, 853 sedangkan waktu retensi senyawa kimia ekstrak adalah 27, 175. Dari profil kromatogram tersebut juga diperoleh nilai AUC metil oleat sebesar 35, 538 %. Jadi dapat disimpulkan bahwa dalam ekstrak kloroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* terdapat asam oleat.

D. Uji Sitotoksitas Ekstrak Kloroform Biji Rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* Terhadap Sel Myeloma

1. Panen sel Myeloma

Apabila jumlah sel telah mencukupi, media diganti dengan media RPMI 1640 sebanyak 5 mL dan sel dilepaskan dari dinding tabung. Sel dipindahkan ke dalam tabung steril dan ditambahkan media RPMI 1640 sampai volume 10 mL dan disentrifugasi pada 1500 g selama 5 menit untuk memisahkan sel dari medianya. Selanjutnya sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama untuk menghilangkan sisa-sisa metabolisme pada medium yang lama, sel dihitung jumlahnya dengan hemositometer. Pada suspensi sel ditambah sejumlah media sehingga memperoleh konsentrasi sel 3×10^4 sel/100 μ L dan siap untuk penelitian lebih lanjut.

2. Uji sitotoksitas dengan metode MTT

Uji sitotoksitas terhadap sel Myeloma ini dilakukan untuk mengetahui potensi ketoksikan ekstrak dari tanaman. Dimana uji sitotoksitas dilakukan secara kualitatif dan secara kuantitatif. Kualitatif yaitu dengan pengamatan secara visual dengan melihat kerusakan sel seperti bentuk sel yang berubah atau mengerut, juga dilihat lisisnya dinding sel sebagai sel yang mati. Sedangkan kuantitatif dengan cara menghitung harga LC_{50} .

Uji sitotoksitas dilakukan dengan cara menginkubasi sel Myeloma dalam microplate yang terdiri dari 96 sumuran bersama suatu seri kadar ekstrak kloroform

biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* dalam media kultur RPMI selama 24 dan 48 jam pada suhu 37⁰ C dengan aliran udara CO₂ 5 %. Jumlah sel yang digunakan adalah 3x10⁴ sel/100 µL media, karena jumlah sel yang digunakan tidak boleh terlalu pekat karena akan menyulitkan pada saat perhitungan. Ekstrak kloroform terlebih dahulu dilarutkan dalam DMSO 100% kemudian ekstrak dibuat berbagai seri kadar 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1600 µg/mL. Seri kadar ekstrak dimasukkan ke dalam sumuran dan dibuat 3x replikasi untuk masing-masing seri kadar. Isi dari sumuran dibuat dalam 6 kelompok yaitu Kelompok A berisikan ekstrak + sel, kelompok B berupa media RPMI + ekstrak, kelompok C berisikan sel + media RPMI, kelompok D berisi media RPMI, kelompok E berisi DMSO seri kadar + sel, kelompok F berisi DMSO seri kadar + media RPMI. Keenam kelompok tersebut diuji sitotoksitasnya dengan metode MTT.

Metode MTT selama ini dinilai sebagai metode yang cukup baik, praktis, dan akurat. Garam tetrazolium MTT akan direduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium dalam rantai respirasi mitokondria aktif menjadi formazan yang berwarna ungu. Untuk mengukur warna ungu yang timbul dari reaksi dengan MTT digunakan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Dimana warna yang terjadi menggambarkan jumlah sel yang bertahan hidup sehingga semakin besar absorbansi maka jumlah sel yang hidup semakin banyak karena reaksi terjadi pada sel mitokondria yang hidup saja.

Media yang digunakan pada uji sitotoksitas ini adalah media RPMI yang sifatnya polar sedangkan senyawa uji yang digunakan berupa ekstrak kloroform yang bersifat non-polar, akibatnya ekstrak tidak dapat bercampur dengan media yang digunakan. Oleh karena itu ekstrak kloroform harus dilarutkan terlebih dahulu agar bisa bercampur dengan media yang digunakan dan baru kemudian dibuat seri konsentrasi. Sebagai pelarutnya dipilih DMSO 100 % karena zat ini dapat campur dengan air dan merupakan pelarut yang baik untuk ion anorganik maupun untuk senyawa organik (Fessenden & Fessenden, 1992). Selain itu ekstrak kloroform yang sifatnya non polar sukar larut dalam air namun dapat larut dalam DMSO. Sehingga

pada penelitian ini diperlukan kontrol pelarut yang berupa sel yang diikubasi bersama DMSO dengan konsentrasi yang sama dengan yang digunakan sebagai pelarut senyawa uji. Kontrol pelarut diperlukan untuk mengetahui pengaruh DMSO terhadap pertumbuhan sel myeloma. Kematian sel karena DMSO harus lebih kecil daripada kematian karena senyawa uji sehingga dapat diabaikan. Untuk melihat pengaruh DMSO dilakukan pengamatan secara mikroskopi dan dibandingkan jumlah sel yang mati pada pemberian DMSO dan jumlah sel yang mati pada pemberian ekstrak. Perbandingan antara sel myeloma pada pemberian DMSO dan sel myeloma pada pemberian ekstrak tampak pada gambar 10.



Gambar 11. Sel Myeloma pada perbesaran 100 x dengan pemberian DMSO (a) dan Sel Myeloma dengan pemberian ekstrak kloroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus*.

Terlihat sel myeloma yang diberi DMSO dengan kadar 1600 $\mu\text{g/mL}$ masih banyak sel yang hidup dan sedikit sekali sel yang mati (a) dan sel myeloma yang diberi ekstrak kloroform biji rambutan dengan kadar yang sama 1600 $\mu\text{g/mL}$ (b).

Pada gambar memperlihatkan pertumbuhan sel myeloma pada pemberian DMSO dan ekstrak kloroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus*. Terlihat sel yang hidup berupa sel yang bulat, berinti dan dikelilingi dinding sel yang jernih sedangkan sel yang tidak lagi bulat dan berwarna hitam adalah sel myeloma yang mati. Dari gambar tersebut dapat dilihat pada perlakuan DMSO sel myeloma (Gambar 10) masih banyak sel yang hidup, berarti DMSO yang digunakan sebagai pelarut senyawa uji tidak terlalu mempengaruhi pertumbuhan sel

myeloma bila dibandingkan dengan pertumbuhan sel myeloma pada perlakuan ekstrak.

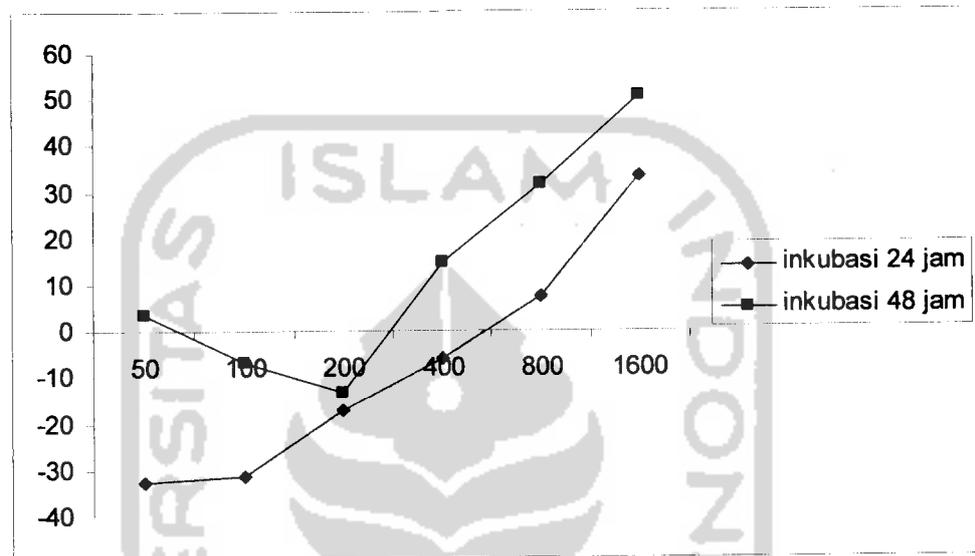
Sebelum dibaca absorbansinya reaksi MTT dihentikan dengan pereaksi penghenti SDS (*Sodium Dodesil Sulfat*) 100% dalam HCl 0,01 N sebanyak 10 μ L kemudian diinkubasi semalam pada suhu kamar. Garam formazan yang berwarna ungu ini akan larut dalam reagen stoper yang mengandung *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 1% dalam HCL 0,01N. Hasil yang diperoleh dari penghitungan dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Pengaruh variasi kadar ekstrak kloroform biji rambutan terhadap % kematian sel pada inkubasi 24 jam dan 48 jam

| Kadar (μ g/mL) | % kematian sel | |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| | Inkubasi 24 jam | Inkubasi 48 jam |
| 50 | -32,789 | 3,501 |
| 100 | -31,482 | -6,681 |
| 200 | -17,103 | -13,140 |
| 400 | -5,991 | 14,774 |
| 800 | 7,625 | 31,403 |
| 1600 | 33,33 | 50,628 |

Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa kadar ekstrak tertinggi yang mampu mematikan sel myeloma sebesar 33,33 % populasi adalah pada kadar 1600 μ g/mL dengan waktu inkubasi 24 jam sedangkan pada waktu inkubasi 48 jam kadar ekstrak tertinggi yang mampu mematikan sel myeloma sebesar 50,628 % populasi adalah 1600 μ g/mL. Pada data banyak didapatkan hasil % kematian sel myeloma yang bernilai negatif yang menunjukkan bahwa ekstrak kloroform tidak dapat menimbulkan kematian sel. Persentase kematian sel meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi yang diuji. Pada inkubasi selama 48 jam nilai % kematian sel lebih tinggi bila dibandingkan % kematian sel myeloma pada inkubasi selama 24 jam. Uji ini dilakukan tiap 24 jam sekali dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh

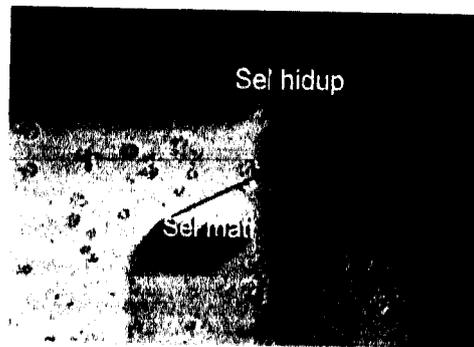
senyawa uji terhadap penghambatan pertumbuhan sel. Sehingga dari data yang diperoleh dapat dilihat bahwa ekstrak kloroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* dapat menghambat pertumbuhan sel Myeloma karena pada inkubasi 48 jam % kematian sel lebih tinggi. Kadar ekstrak vs % kematian sel dapat dilihat pada grafik di bawah ini :



Gambar 12. Grafik kadar ekstrak vs kematian sel pada inkubasi 24 dan 48 jam.

Dari grafik dapat dilihat bahwa semakin besar kadar ekstrak maka nilai % kematian sel semakin besar dan semakin lama waktu inkubasi maka nilai % kematian sel myeloma semakin meningkat.

Potensi ketoksikan ekstrak juga dapat dilihat secara mikroskopik dengan membandingkan morfologi sel Myeloma pada kontrol dan sel yang diberi perlakuan ekstrak. Pada gambar dapat dilihat bahwa sel myeloma yang normal berbentuk bulat, berinti dan dikelilingi dinding sel yang jernih sedangkan sel Myeloma yang mati berwarna hitam dan mengkerut. Hal ini ditunjukkan pada gambar 12.



Gambar 13. Sel Myeloma secara mikroskopik dengan perbesaran 100 x

Sel Myeloma hidup berbentuk bulat, berinti dan dikelilingi dinding sel yang jernih sedangkan sel Myeloma yang mati berwarna hitam dan mengkerut.

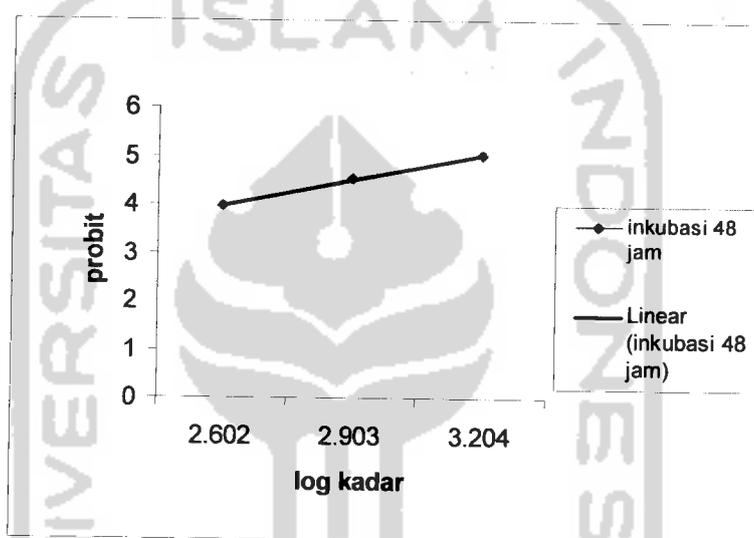
Untuk menghitung jumlah sel yang hidup dapat juga dilakukan dengan metode *direct counting*. *Direct counting* merupakan metode yang dilakukan dengan cara menghitung secara langsung jumlah sel hidup di bawah mikroskop dengan bantuan *hemocytometer*. Metode ini cukup sederhana namun memiliki beberapa kekurangan yaitu subyektifitas yang tinggi dan waktu perhitungan yang lama.

Data yang didapatkan dari ELISA reader digunakan untuk menghitung nilai LC_{50} dengan menggunakan metode probit. LC_{50} merupakan parameter ketoksikan yang menunjukkan kemampuan ekstrak untuk membunuh sel kanker. Metode probit dihitung dengan cara memasukkan nilai % kematian sel ke dalam tabel probit, hanya saja nilai % kematian sel yang bernilai negatif tidak dapat dihitung menggunakan metode ini. Harga probit dicari untuk tiap persentase kematian sel dari tabel untuk inkubasi 24 jam dan tabel II untuk inkubasi 48 jam. Berikut ini tabel potensi ketoksikan ekstrak pada inkubasi 24 jam dan 48 jam:

Tabel II. Potensi ketoksikan pada inkubasi 24 jam

| Kadar ($\mu\text{g/mL}$) | Log kadar | % kematian sel | | Angka probit | |
|----------------------------|-----------|----------------|---------|--------------|--------|
| | | 24 jam | 48 jam | 24 jam | 48 jam |
| 50 | 1,6989 | -32,789 | 3,501 | - | |
| 100 | 2 | -31,482 | -6,681 | - | - |
| 200 | 2,301 | -17,103 | -13,140 | - | - |
| 400 | 2,602 | -5,991 | 14,774 | - | 3,9508 |
| 800 | 2,903 | 7,625 | 31,403 | 3,5704 | 4,512 |
| 1600 | 3,204 | 33,33 | 50,628 | 4,5667 | 5,0126 |

Data yang diperoleh pada inkubasi 24 jam nilai % kematian yang positif kurang dari 3 sehingga tidak dapat dilakukan perhitungan LC_{50} . Data % kematian sel yang dapat dihitung hanya inkubasi 48 jam saja. Pengamatan dilakukan tiap 24 jam sekali dan tidak hanya pada saat sel konfluen (cukup) dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh senyawa uji terhadap penghambatan pertumbuhan sel tiap hari. Senyawa uji dikatakan dapat menghambat pertumbuhan sel apabila nilai % kematian sel lebih besar terjadi pada inkubasi 48 jam bila dibandingkan dengan inkubasi 24 jam. Berikut ini grafik antara % kematian dan angka probit pada inkubasi 48 jam yang disertai grafik linear untuk membandingkan penyimpangan data yang terjadi :



Gambar 14. Grafik antara log kadar vs probit pada inkubasi 48 jam

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa log kadar berbanding lurus dengan angka probit. Semakin besar log kadar maka angka probit akan semakin besar.

Dari grafik dapat dilihat bahwa tidak terjadi penyimpangan data yang signifikan karena tidak ada titik yang terlalu melebar dari grafik linear. Data % kematian sel yang dapat dihitung hanya waktu inkubasi 48 jam pada seri kadar 400 $\mu\text{g/mL}$, 800 $\mu\text{g/mL}$ dan 1600 $\mu\text{g/mL}$ dan diperoleh nilai LC_{50} 1,579 mg/mL . Nilai LC_{50} ini menunjukkan bahwa ekstrak kloroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* tidak poten untuk membunuh sel Myeloma sebab untuk membunuh 50 % populasi sel Myeloma dibutuhkan kadar ekstrak sebesar 1,579 mg/mL . Hal ini mungkin disebabkan ekstrak kloroform biji rambutan

var. *aceh lebak bulus* belum merupakan fraksi yang murni sehingga zat aktif yang diduga dapat bersifat sitotoksik kemungkinan jumlahnya lebih sedikit bila dibandingkan dengan senyawa lain dalam ekstrak. Penyebab lain adalah struktur asam oleat yang hanya memiliki satu ikatan rangkap yang dapat menangkap radikal bebas namun kurang poten sebagai agen sitotoksik.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Ekstrak kloroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L) var. *aceh lebak bulus* memiliki nilai LC_{50} sebesar 1,579 mg /mL yang menunjukkan bahwa ekstrak kloroform tersebut tidak bersifat sitotoksik terhadap sel Myeloma.

B. SARAN

1. Tingginya angka kematian akibat kanker diperlukan adanya penelitian lebih lanjut tentang obat antikanker baru yang lebih efektif dan efisien.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang keefektifan asam oleat sebagai obat antikanker mengingat asam oleat efektif dalam menghambat kanker payudara pada penelitian secara *invivo*.
3. Perlu dicari cara yang efektif untuk memisahkan asam oleat dari ekstrak kloroform biji rambutan (*Nephelium lappaceum*, L).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1983, *American Type Culture Collection of Strain II*, Fourth Ed., Liss, Inc, New York, 61,107, 145.
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 17.
- Anderson, S., 1994, *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*, EGC, Jakarta, 258, 259.
- Anonim, 1998, *Rambutan (Nephelium lappaceum)*, available at <http://www.civil.soton.ac.uk/icuc/rambutan.htm?id=t1003> (diakses tanggal 12 Agustus 2005)
- Anonim, 2001^a, *Myeloma Cell Line Preparation*, available at <http://www.rit.edu/~gtfsbi/hytc/myeloma.htm> (diakses tanggal 10 Desember 2005)
- Anonim, 2001^b, *MTT Cell Proliferation Assay Instruction*, available at <http://www.atcc.org/pdf/30-1010k> (diakses tanggal 10 Desember 2005)
- Anonim, 2002, *Teknologi Tepat Guna*, available at <http://www.iptek.net.id>, (diakses 15 Desember 2005)
- Anonim, 2003, *Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Uncertain Significance (MGUS)*, available at www.hmms.org.uk/myeloma.html (diakses tanggal 27 juli 2006)
- Anonim, 2005^a, *Cancer Overview*, available at http://www.rush.edu/rume/page_p07300.html. (diakses 14 Desember 2005)
- Anonim, 2005^b, *Cell Cycle In Cancer*, available at http://www.cyclacel.com/cyclacel_science/apoptosis.htm (diakses 10 Desember 2005)
- Anonim, 2005^c, *Kanker*, available at <http://id.wikipedia.org/wiki/kanker> (diakses 24 Desember 2005)

- Anonim, 2005^d, *Olive Oil May Protect Against Breast Cancer*, available at <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=41386> (diakses 10 November 2005)
- Anonim, 2005^e, *Rambutan Nutrition in Puerto Rico*, available at <http://www Rambutan.com/Nutrition.html>(diakses 23 Desember 2005)
- Anonim, 2005^f, *The Cell Cycle*, available at <http://www.cancerquest.com> (diakses 14 Desember2005)
- Anonim, 2005^g, *Cancer*, available at <http://www.medicinenet.com> (diakses 20 Desember 2005)
- Anonim, 2006, *Produce Name : MTT*, available at <http://www.dojindo.com/products.html>(diakses 7 Juli 2006)
- Backer, C.A., and Bakhuizen Van Den Brink, R.C., 1965, *Flora of Java*, N.V.P. Noordhroff-Gronigen-The Nedherlands, Leyden
- Benards, R., 2005, *Cell cycle regulation and cancer*, available at http://streaming.cineca.it//sestri/courses/cancgen/img/Bernards/images005_b.gif(diakses 9 Desember 2005)
- Cassarett, L., J., and Doull, J., 1975, *Toxicology, The Basic Science of Poison*, Macmillan Publishing, Co. Inc., New York, 19-21, 112-113.
- Christie, W., W., 1993, *Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids For Chromatographic Analysis*, available at <http://www.lipidlibrary.co.uk/masspec.html> (diakses 27 februari 2006)
- Dalimarta, S., 2004, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Penerbit Trubus Agriwidya, Jakarta, 19.
- Lu, F. C., 1995, *Toksikologi Dasar : Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Risiko*, Universitas Indonesia, Jakarta, 89.
- Freshney, R. I., 2000, *Animal Cell Culture, a Practical Approach*, 2nd edition, IRL press, Washington DC, , 3-214.

- Fessenden., R. J., Fessenden, J. S., 1982, *Kimia Organik*, diterjemahkan oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, Penerbit Erlangga, Jakarta, 129.
- King, R. J. B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd ed., Pearson Education Limited, London
- Lonial, S., 2005, *Intro To Myeloma*, available at <http://www.multiplemyeloma.org> (diakses 14 Desember 2005)
- Menendez, J. A., Vellon L., Colomer R., Lupu R., 2005, *Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (HerceptinTM) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification*, available at <http://www.intl-announc.oxfordjournals.org/cgi/content/full/16/3/359> (diakses tanggal 10 November 2005)
- Punrattanasin, W., and Spada, C., 1997, *Gas Chromatography*, <http://ewr.cee.vt.edu/environmental/teach/smprimer/gc/gc.html> (diakses 24 Desember 2005)
- Sigma, 1999, *Biochemicals and Reagents for Life Science Research*, Sigma-Aldrich Co., Singapore, 723,1873
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K., 1986, An Improved Colorimetric Assay for Interleukin-2, *J. Immunological methods*, 93, 156-157
- Tjay, T. H., dan Rahardja, K., 2002, *Obat-Obat Penting: Khasiat, Penggunaan Dan Efek-Efek Sampingnya*, Penerbit Gramedia Jakarta, 206-219.
- Tjindarbumi, D., dan Mangunkusumo, R., 2002, *Cancer in Indonesia, Present and Future*, Jpn, Clin. Oncol
- Wallin, R. F., 1998, *A Practical Guide to ISO 10993-5*, available at <http://www.devicelink.com/mddi/archive/98/04/013.html> (diakses tanggal 23 Juli 2006)
- Wild G. dan de Konning J., 1997, *Contaminant Analysis Technique*, available at <http://www.csp.trentu.ca/csjpgd/>(diakses 9 Desember 2005)

Lampiran 1. Surat keterangan identifikasi rambutan

**UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JURUSAN FARMASI FMIPA UII
BAGIAN BIOLOGI FARMASI**

Alamat : Jl.Kaliurang Km 14,4 Yogyakarta
Telpon : (0274) 895920 Ext. 3033

SURAT KETERANGAN
Nomor:54/ UII/Jur Far/ det/II/2006

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi FMIPA UII menerangkan bahwa:

Nama : Eni Sriyana
NIM : 02613198
Pada Tanggal : 2 Februari 2006

Telah mendeterminasi 1 (satu) species tanaman dengan bimbingan Dra. Iyok Budiarti, di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII.

Tanaman tersebut: *Nephelium lappaceum*,L (rambutan)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan semestinya.

Yogyakarta, 3 Februari 2006
Bagian Biologi Farmasi
Kepala



Asih Triastuti, S.F., Apt
NIP. 3.469/MP

Lampiran 2. Data identifikasi asam oleat murni dengan kromatografi gas

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\LEMAK\DIAN3000.D

Sample Name: Ester biji Rambu

Dian 1 Ester Biji Rambutan Spiking Met.Oleat;160-4-40-2
50;5ul;Chrompack CP-Sil 5 CB 50 meter; FID; Split 70; f
80 HP 5890 Series II

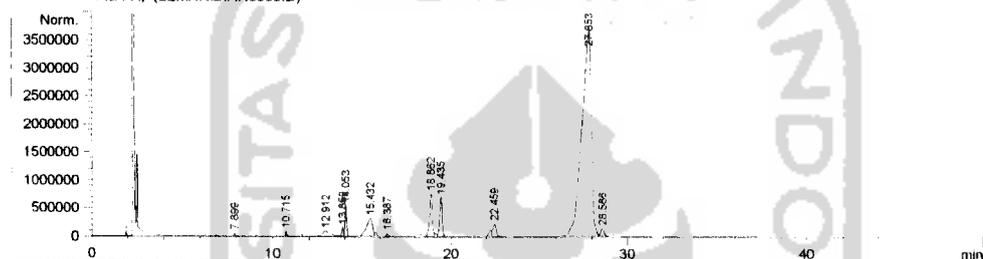
```

=====
Injection Date   : 3/14/06 3:34:11 PM
Sample Name     : Ester biji Rambu
Acq. Operator  : Maryati
Vial           : 1
Inj Volume    : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OLEAT.M
Last changed   : 3/14/06 3:46:06 PM by Maryati
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\OLEAT.M
Last changed   : 3/15/06 12:47:37 PM by Maryati
                (modified after loading)
  
```

Method for cooling GC HP5890

FID1 A, (LEMAK\DIAN3000.D)



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: FID1 A,

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area counts*s | Height [counts] | Area |
|--------|---------------|------|-------------|---------------|-----------------|----------|
| 1 | 7.899 | VP | 0.0497 | 1.54701e5 | 4.78541e4 | 0.08853 |
| 2 | 10.715 | BB | 0.0704 | 3.70366e5 | 8.24987e4 | 0.21194 |
| 3 | 12.912 | BV | 0.4257 | 2.68437e6 | 8.95647e4 | 1.53611 |
| 4 | 13.859 | VV | 0.1027 | 1.01494e6 | 1.50463e5 | 0.58079 |
| 5 | 14.053 | VB | 0.0992 | 3.40771e6 | 5.28618e5 | 1.95004 |
| 6 | 15.432 | BV | 0.3378 | 7.24342e6 | 3.10873e5 | 4.14499 |
| 7 | 16.387 | PB | 0.1230 | 4.00133e5 | 5.13107e4 | 0.22897 |
| 8 | 18.862 | VV | 0.1640 | 8.26859e6 | 7.65653e5 | 4.73164 |
| 9 | 19.435 | VB | 0.1577 | 6.98342e6 | 6.92370e5 | 3.99621 |
| 10 | 22.459 | VB | 0.2024 | 2.94165e6 | 2.19394e5 | 1.68333 |
| 11 | 27.853 | BV | 0.4866 | 1.39362e8 | 3.69049e6 | 79.74898 |
| 12 | 28.586 | VV | 0.2201 | 1.91959e6 | 1.34860e5 | 1.09847 |

Totals : 1.74751e8 6.76395e6

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Lampiran 3. Data identifikasi kandungan kimia ekstrak kloroform biji rambutan (Nephelium Lappaceum, L) var. Aceh Lebak Bulus dengan kromatografi gas

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\LEMAK\DIAN1001.D

Sample Name: Ester biji Rambu

Dian 1 Ester Biji Rambutan;160-4-40-250;5ul;Chrompack C
P-Sil 5 CB 50 meter; FID; Split 70; f80 HP 5890 Series

```

=====
Injection Date : 3/14/06 2:20:43 PM
Sample Name    : Ester biji Rambu
Acq. Operator  : Maryati
Vial           : 1

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\OLEAT.M
Last changed   : 3/14/06 2:18:08 PM by Maryati
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\OLEAT.M
Last changed   : 3/14/06 3:46:06 PM by Maryati
                (modified after loading)
Method for cooling GC HP5890
                FID1 A, (LEMAKDIAN1001.D)
=====
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area counts*s | Height [counts] | Area |
|----------|---------------|------|-------------|---------------|-----------------|----------|
| 1 | 7.899 | VB | 0.0497 | 9.47339e4 | 2.93521e4 | 0.45245 |
| 2 | 9.373 | BB | 0.2096 | 5.28796e6 | 3.39778e5 | 25.25512 |
| 3 | 10.713 | BB | 0.1889 | 5.87122e5 | 4.05645e4 | 2.80408 |
| 4 | 18.812 | BB | 0.1763 | 1.89099e5 | 1.57234e4 | 0.90313 |
| 5 | 19.395 | BB | 0.1559 | 1.09754e6 | 1.10491e5 | 5.24183 |
| 6 | 23.943 | BB | 0.3641 | 1.17867e6 | 5.05344e4 | 5.62930 |
| 7 | 26.411 | BV | 0.4408 | 4.26007e6 | 1.42492e5 | 20.34592 |
| 8 | 27.175 | VB | 0.2481 | 7.44107e6 | 4.51816e5 | 35.53827 |
| 9 | 28.371 | BP | 0.2362 | 8.01912e5 | 5.19258e4 | 3.82990 |
| Totals : | | | | 2.09382e7 | 1.23268e6 | |

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Lampiran 4. Data ELISA reader pada inkubasi 24 jam

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| A | 0,000 | 0,028 | 0,024 | 0,039 | 0,033 | 0,011 | 0,032 | 0,029 | 0,032 | 0,032 | 0,021 | 0,032 | A |
| B | 0,710 | 0,714 | 0,719 | 0,700 | 0,512 | 0,502 | 0,393 | 0,660 | 0,733 | 0,502 | 0,519 | 0,594 | B |
| C | 0,786 | 0,797 | 0,784 | 0,750 | 0,490 | 0,492 | 0,739 | 0,741 | 0,783 | 0,504 | 0,545 | 0,551 | C |
| D | 0,894 | 0,735 | 0,862 | 0,657 | 0,492 | 0,492 | 0,751 | 0,801 | 0,757 | 0,536 | 0,502 | 0,587 | D |
| E | 0,531 | 0,857 | 0,845 | 0,813 | 0,416 | 0,491 | 0,800 | 0,832 | 0,887 | 0,509 | 0,510 | 0,533 | E |
| F | 0,935 | 0,904 | 0,853 | 0,280 | 0,485 | 0,488 | 0,914 | 0,861 | 0,871 | 0,477 | 0,517 | 0,536 | F |
| G | 0,921 | 0,911 | 0,892 | 0,700 | 0,505 | 0,466 | 0,867 | 0,922 | 0,895 | 0,500 | 0,524 | 0,556 | G |
| H | 0,034 | 0,827 | 0,822 | 0,810 | 0,834 | 0,812 | 0,520 | 0,533 | 0,514 | 0,493 | 0,516 | 0,034 | H |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |

Keterangan :

B1, C1, D1, E1, F1, G1 : variasi kadar DMSO +Sel Myeloma

**B2-4, C2-4, D2-4, E2-4, F2-4,G2-4 : Media RPMI + Ekstrak Kloroform biji *N. lappaceum*,
L + sel Myeloma (perlakuan)**

**B5-6, C5-6, D5-6, E5-6, F5-6, G5-6 : Media RPMI + Ekstrak Kloroform biji *N. lappaceum*,
L + DMSO (kontrol)**

H2-H7 : Media RPMI + Sel Myeloma (kontrol media)

H8-H11 : Media RPMI + DMSO (kontrol DMSO)

A12, B12, C12, D12, E12, F12, G12 : variasi kadar DMSO

Lampiran 5. Data ELISA reader pada inkubasi 48 jam

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| A | 0.075 | 0.076 | 0.077 | 0.088 | 0.034 | 0.036 | 0.034 | 0.032 | 0.036 | 0.035 | 0.035 | 0.034 | A |
| B | 0.482 | 0.552 | 0.525 | 0.532 | 0.322 | 0.329 | 0.561 | 0.510 | 0.532 | 0.322 | 0.304 | 0.363 | B |
| C | 0.725 | 0.713 | 0.658 | 0.674 | 0.317 | 0.321 | 0.533 | 0.534 | 0.394 | 0.307 | 0.318 | 0.340 | C |
| D | 0.833 | 0.836 | 0.819 | 0.820 | 0.334 | 0.311 | 0.751 | 0.594 | 0.722 | 0.324 | 0.328 | 0.332 | D |
| E | 0.871 | 0.844 | 0.840 | 0.845 | 0.315 | 0.322 | 0.803 | 0.814 | 0.534 | 0.302 | 0.316 | 0.328 | E |
| F | 0.920 | 0.891 | 0.853 | 0.870 | 0.310 | 0.315 | 0.786 | 0.786 | 0.822 | 0.318 | 0.315 | 0.329 | F |
| G | 0.917 | 0.948 | 0.897 | 0.907 | 0.321 | 0.322 | 0.788 | 0.679 | 0.788 | 0.322 | 0.316 | 0.325 | G |
| H | 0.033 | 0.605 | 0.788 | 0.739 | 0.752 | 0.752 | 0.325 | 0.324 | 0.322 | 0.301 | 0.328 | 0.604 | H |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |

Keterangan :

B1, C1, D1, E1, F1, G1 : variasi kadar DMSO +Sel Myeloma

**B7-9, C7-9, D7-9, E7-9, F7-9, G7-9 : Media RPMI + Ekstrak Kloroform biji *N. lappaceum*,
L + sel Myeloma (perlakuan)**

**B10-11, C10-11, D10-11, E10-11, F10-11, G10-11: Media RPMI + Ekstrak Kloroform biji
N. lappaceum, L + DMSO (kontrol)**

H2-H7 : Media RPMI + Sel Myeloma (kontrol media)

H8-H11 : Media RPMI + DMSO (kontrol DMSO)

A12, B12, C12, D12, E12, F12, G12 : variasi kadar DMSO

Lampiran 6. Data Hasil % kematian sel pada inkubasi 24 jam

| Kadar ($\mu\text{g/mL}$) | % kematian sel | | | |
|----------------------------|----------------|-------------|-------------|---------------------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | X \pm SD |
| 50 | -34,967 | -32,026 | -31,373 | -32,789 \pm 1,915 |
| 100 | -35,621 | -31,373 | -27,778 | -31,591 \pm 3,926 |
| 200 | -24,837 | -17,647 | -8,824 | -17,103 \pm 8,020 |
| 400 | 20,915 | -20,261 | -18,627 | -5,991 \pm 23,316 |
| 800 | 3,268 | 4,248 | 15,359 | 7,625 \pm 6,716 |
| 1600 | 32,353 | 30,719 | 36,928 | 33,333 \pm 3,218 |

Keterangan :

X = rata-rata % kematian sel
SD = simpangan deviasi

$$\%kematian = \frac{(C - D) - (A - B)}{(C - D)} \times 100\%$$

A = absorbansi sampel / ekstrak + sel

B = absorbansi sampel / ekstrak + media

C = absorbansi media + sel

D = absorbansi media

Lampiran 7. Data Hasil % kematian sel pada inkubasi 48 jam

| Kadar ($\mu\text{g/mL}$) | % kematian sel | | | |
|----------------------------|----------------|-------------|-------------|---------------------|
| | Replikasi I | Replikasi 2 | Replikasi 3 | X \pm SD |
| 50 | -5,112 | 19,376 | -5,112 | 3,051 \pm 14,138 |
| 100 | -3,118 | -4,454 | -12,472 | -6,681 \pm 5,059 |
| 200 | -10,022 | -12,472 | -16,927 | -13,140 \pm 3,501 |
| 400 | 4,677 | 29,399 | 10,245 | 14,774 \pm 12,968 |
| 800 | 28,285 | 28,508 | 37,416 | 31,403 \pm 5,209 |
| 1600 | 43,287 | 54,343 | 54,343 | 50,628 \pm 6,383 |

Keterangan :

X = rata-rata % kematian sel
SD = simpangan deviasi

$$\%kematian = \frac{(C - D) - (A - B)}{(C - D)} \times 100\%$$

A = absorbansi sampel / ekstrak + sel

B = absorbansi sampel / ekstrak + media

C = absorbansi media + sel

D = absorbansi media

Lampiran 8. Hasil perhitungan LC₅₀

a. LC₅₀ pada inkubasi 48 jam

Regresi linear 1: $x = \%kematian$

$y = probit$

| x | y | |
|--------|--------|--------------|
| 14,774 | 3,9508 | $a = 3,539$ |
| 31,4 | 4,512 | $b = 0.0295$ |
| 50,63 | 5,0126 | $r = 0,997$ |

Persamaan garis : $y = bx + a$

$$y = 0,0295x + 3,539 \dots\dots\dots(1)$$

Probit untuk 50% kematian ($x = 50$)

$$x = 50 \rightarrow y = 0,0295(50) + 3,539$$

$$y = 5,014$$

Regresi Linear 2 : $x = \log dosis$

$y = probit$

| x | y | |
|-------|--------|--------------|
| 2.602 | 3,9508 | $a = -0,628$ |
| 2.903 | 4,512 | $b = 1,764$ |
| 3.204 | 5,0126 | $r = 0,999$ |

Persamaan garis : $y = bx + a$

$$y = 1,764x - 0,628 \dots\dots\dots(2)$$

Substitusi (1) ke (2) $5,014 = 1,764x - 0,628$

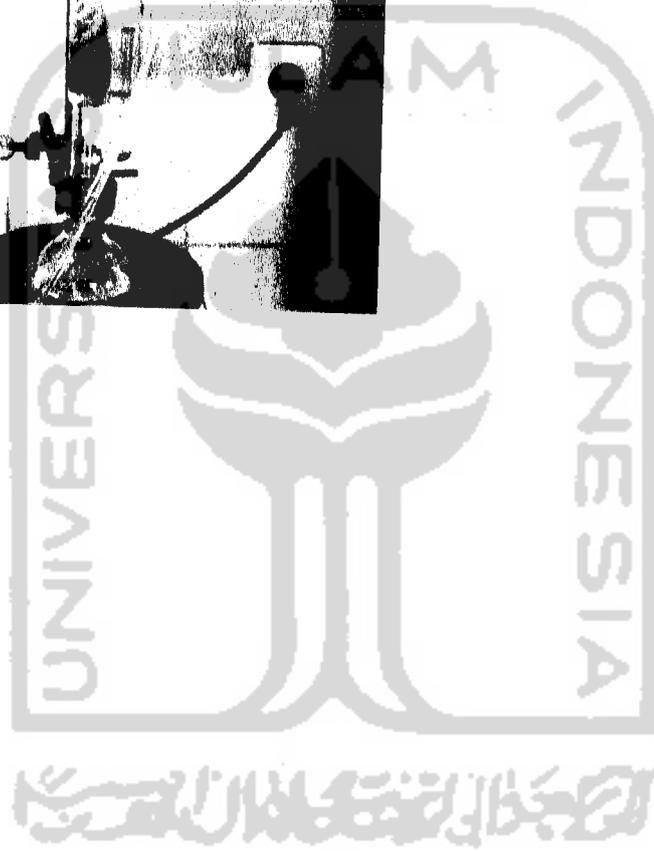
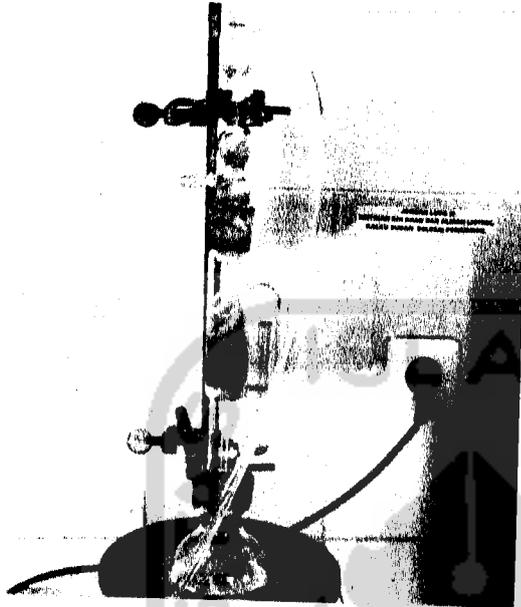
$$x = 3,198$$

$$anti \log x = 1570,111 \mu\text{g/mL}$$

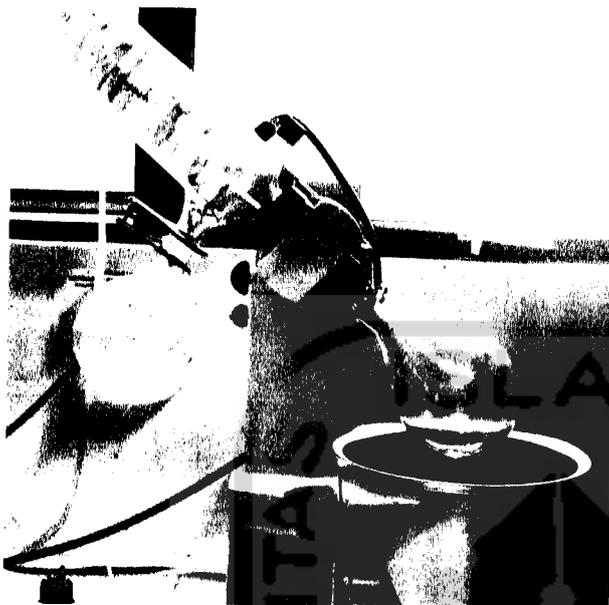
Lampiran 9. Foto Mesin Penyerbuk



Lampiran 10. Foto Alat Soxhlet



Lampiran 11. Foto Rotary Evaporator

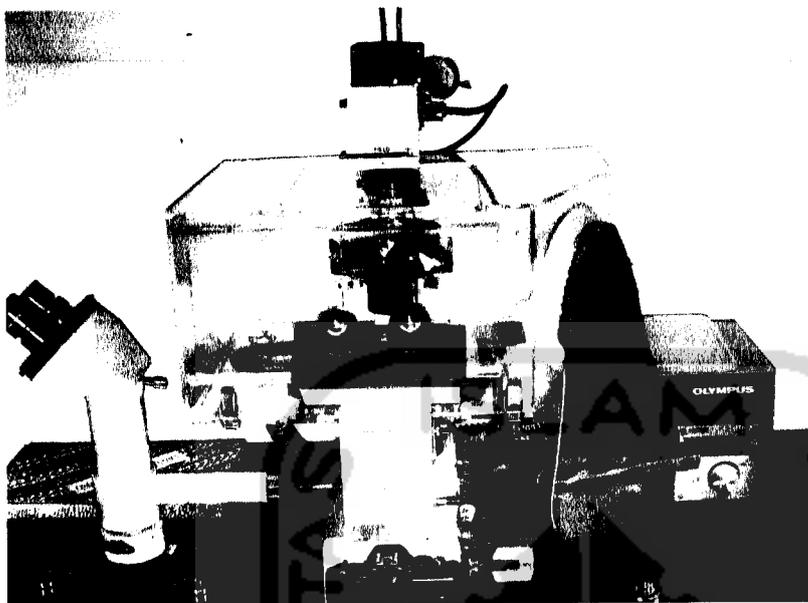


Lampiran 12. Foto ELISA Reader

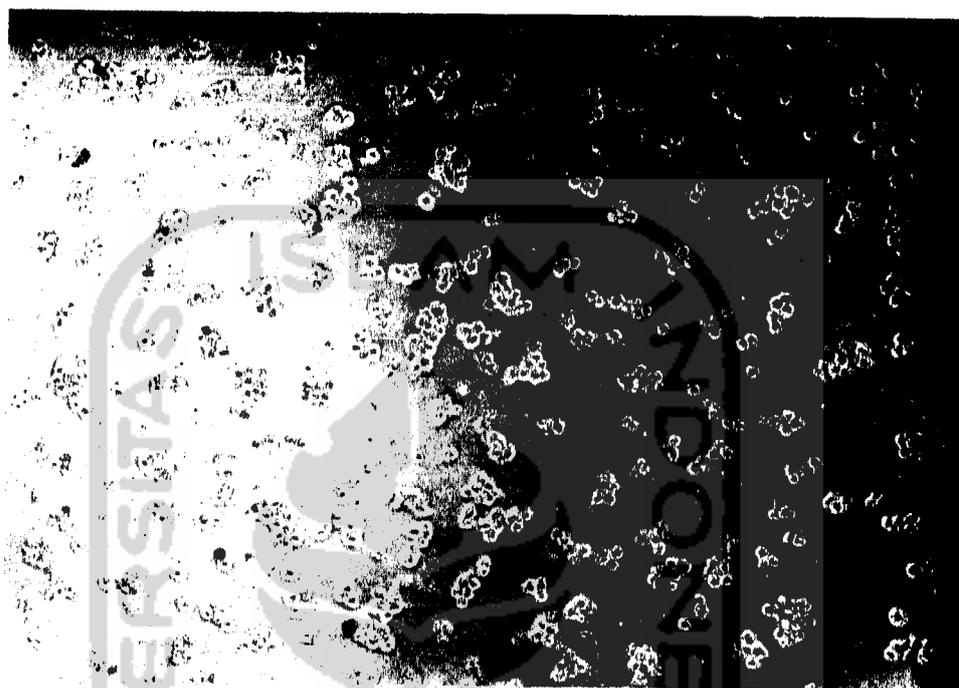


Lampiran 13. Foto LAF Cabinet

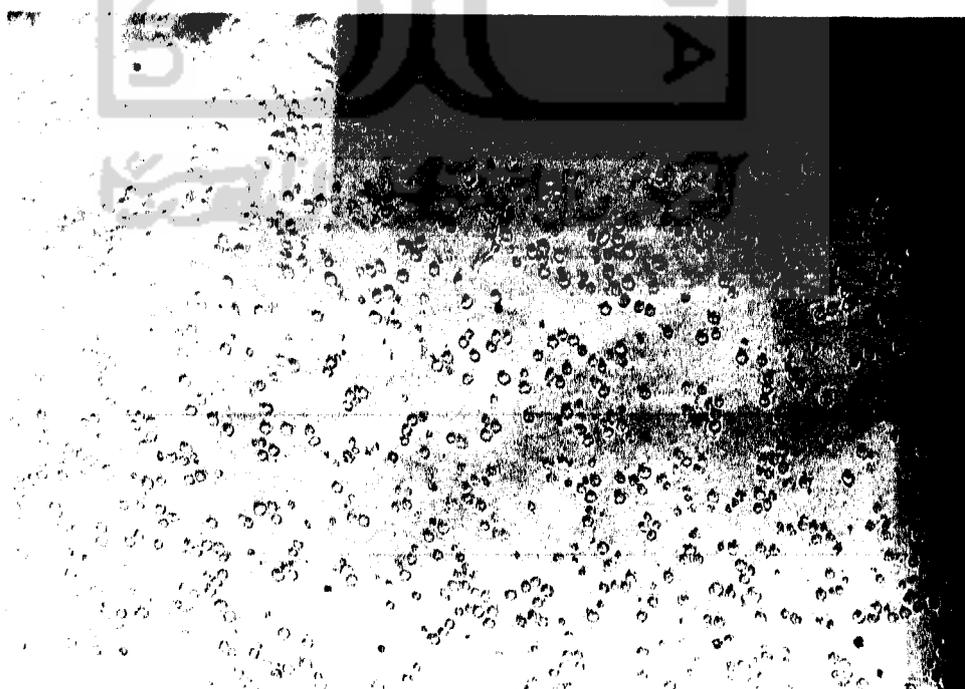


Lampiran 14. Foto Mikroskop Elektron

Lampiran 15. Foto sel Myeloma pada kadar ekstrak 400 $\mu\text{g/mL}$ (a) dan 800 $\mu\text{g/mL}$ (b) pada inkubasi 24 jam



(a)



(b)

Lampiran 16. Foto sel Myeloma pada kadar ekstrak 1600 $\mu\text{g/mL}$ pada inkubasi 24 jam.



Lampiran 17. Foto sel Myeloma+DMSO (1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (a) dan sel+RPMI (b) inkubasi 24 jam



(a)

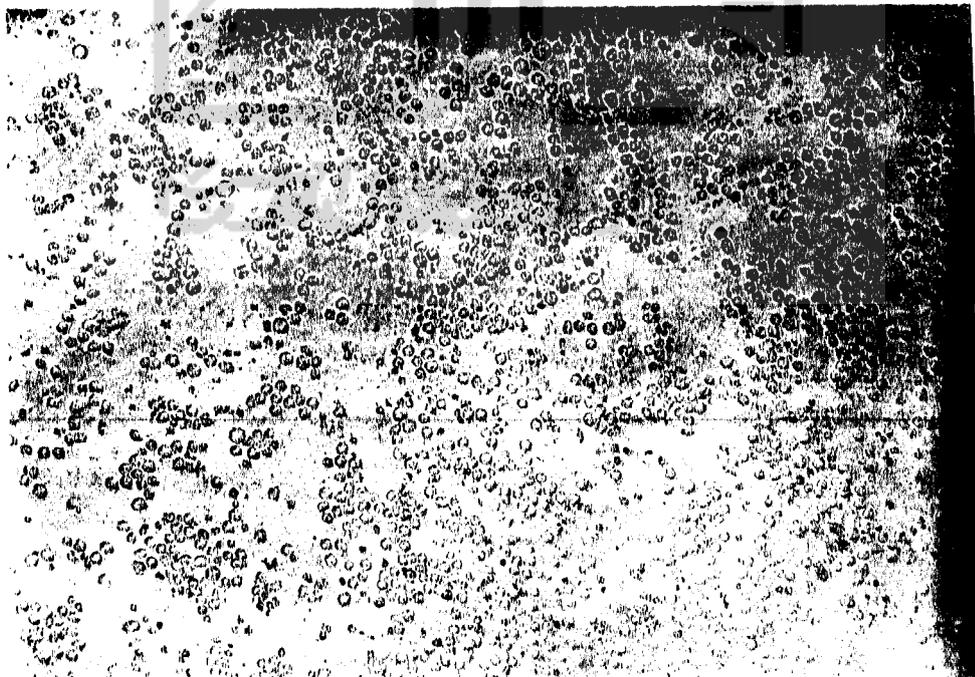


(b)

Lampiran 18. Foto sel Myeloma pada kadar ekstrak 800 $\mu\text{g/mL}$ dan 1600 $\mu\text{g/mL}$ inkubasi 48 jam



(a)



(b)

Lampiran 19. Foto sel Myeloma+RPMI inkubasi 48 jam



Lampiran 20. Tabel Probit

| % | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| - | - | 2.67 | 2.94 | 3.12 | 3.24 | 3.36 | 3.44 | 3.52 | 3.60 | 3.66 |
| 10 | 3.72 | 3.77 | 3.82 | 3.87 | 3.92 | 3.96 | 4.00 | 4.04 | 4.08 | 4.12 |
| 20 | 4.16 | 4.19 | 4.22 | 4.26 | 4.29 | 4.32 | 4.36 | 4.38 | 4.42 | 4.44 |
| 30 | 4.48 | 4.50 | 4.53 | 4.56 | 4.58 | 4.62 | 4.64 | 4.66 | 4.70 | 4.72 |
| 40 | 4.74 | 4.77 | 4.80 | 4.82 | 4.84 | 4.87 | 4.90 | 4.92 | 4.95 | 4.98 |
| 50 | 5.00 | 5.02 | 5.02 | 5.08 | 5.10 | 5.12 | 5.15 | 5.18 | 5.20 | 5.22 |
| 60 | 5.025 | 5.28 | 5.30 | 5.33 | 5.36 | 5.38 | 5.41 | 5.44 | 5.46 | 5.50 |
| 70 | 5.52 | 5.55 | 5.58 | 5.61 | 5.64 | 5.67 | 5.70 | 5.74 | 5.77 | 5.80 |
| 80 | 5.84 | 5.88 | 5.92 | 5.95 | 5.99 | 6.04 | 6.08 | 6.12 | 6.18 | 6.22 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 |
| 90 | 6.28 | 6.28 | 6.29 | 6.29 | 6.30 | 6.31 | 6.31 | 6.32 | 6.32 | 6.34 |
| 91 | 6.34 | 6.34 | 6.35 | 6.36 | 6.36 | 6.37 | 6.38 | 6.38 | 6.39 | 6.40 |
| 92 | 6.40 | 6.41 | 6.41 | 6.42 | 6.43 | 6.44 | 6.44 | 6.45 | 6.46 | 6.46 |
| 93 | 6.48 | 6.48 | 6.49 | 6.49 | 6.50 | 6.51 | 6.52 | 6.53 | 6.53 | 6.54 |
| 94 | 6.56 | 6.56 | 6.57 | 6.58 | 6.58 | 6.60 | 6.60 | 6.62 | 6.62 | 6.64 |
| 95 | 6.64 | 6.66 | 6.66 | 6.68 | 6.68 | 6.70 | 6.70 | 6.72 | 6.72 | 6.74 |
| 96 | 6.75 | 6.76 | 6.77 | 6.78 | 6.80 | 6.81 | 6.82 | 6.84 | 6.85 | 6.86 |
| 97 | 6.88 | 6.90 | 6.91 | 6.92 | 6.94 | 6.96 | 6.98 | 6.99 | 7.01 | 7.03 |
| 98 | 7.05 | 7.08 | 7.10 | 7.12 | 7.14 | 7.17 | 7.20 | 7.22 | 7.26 | 7.29 |
| 99 | 7.32 | 7.36 | 7.40 | 7.46 | 7.51 | 7.58 | 7.65 | 7.74 | 7.88 | 8.09 |