

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL BUAH AMLA (*Phyllanthus emblica*
L.) TERHADAP SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
7,12-Dimethylbenz(a)antrasena (DMBA) SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

**Oleh :
Efa Lusiana
NIM. 19620083**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2023**

UJI SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL BUAH AMLA (*Phyllanthus emblica* L.) TERHADAP SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI 7,12-Dimethylbenz(a)antrasena (DMBA) SECARA IN VITRO

SKRIPSI

**Oleh:
Efa Lusiana
NIM. 19620083**

**Diajukan Kepada :
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyarat dalam
Memperoleh Gelar Sarjana (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

UJI SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL BUAH AMLA (*Phyllanthus emblica* L.) TERHADAP SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI 7,12-Dimethylbenz(a)antrasena (DMBA) SECARA IN VITRO

SKRIPSI

**Oleh:
EFA LUSIANA
NIM. 19620083**

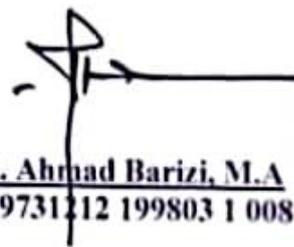
**Telah dipertahankan didepan Tim Penguji dan dinyatakan lulus
tanggal tanggal _____**

Pembimbing I



**Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001**

Pembimbing II



**Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 19731112 199803 1 008**



Mengetahui,

**Dr. Endang Handi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002**

UJI SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL BUAH AMLA (*Phyllanthus emblica* L.) TERHADAP SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI 7,12-Dimethylbenz(a)antrasena (DMBA) SECARA IN VITRO

SKRIPSI

Oleh:
EFA LUSIANA
NIM. 19620083

Telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu
persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: Agustus 2023

Ketua Penguji	:	Kholifah Holil, M.Si NIP. 19751106 200912 2 002	(.....)
Anggota Penguji I	:	Mujahidin Ahmad, M.Sc NIP. 19860512 201903 1 002	(.....)
Anggota Penguji II	:	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si NIP. 196731113 199402 2 001	(.....)
Anggota Penguji III	:	Dr. H. Ahmad Barizi, M.A NIP. 19731212 199803 1 008	(.....)



Mengesahkan,
Program Studi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim segala puji bagi kepada Allah *subhanahu wata'ala* yang telah memberikan rahmat, nikmat dan karunia yang berlimpah sehingga penulis dapat menyusun karya tulis ini yang berjudul **“Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol Buah Amla (*Phyllanthus emblica* L.) terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz(a)antrasena (DMBA) secara In Vitro”**. Tak lupa sholawat serta salam senantiasa dihaturkan kepada baginda Nabi besar Muhammad *shallallahu 'alaihi wa sallam*, sebab perjuangan Beliau ilmu pengetahuan dan indahnya islam ini sampai pada masa sekarang. Atas jasa, kebaikan, dan dukungan semua pihak, maka penulis mengucapkan terimakasih yang tak terkira teruntuk kepada :

1. Alm. Ayah, ibu tercinta, adik, dan keluarga tercinta penulis yang telah memberikan do'a restu dan kasih sayang yang tulus serta dukungan yang sangat berarti untuk penulis sampai detik ini
2. Ibu Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si selaku dosen pembimbing utama yang telah membimbing dan memberikan banyak arahan dan masukan selama penulisan karya ini
3. Ibu Lil Hanifah, M.Siselaku dosen dan pembimbing lapangan terutama ketika di laboratorium kultur sel hewan banyak mengajarkan ilmu-ilmu baru yang peneliti butuhkan selama proses penelitian dari awal sampai akhir lengkap dengan motivasi dan masukan serta saran yang sangat membantu
4. Ibu Kholifah Holil, M.Si, selaku penguji rasa pembimbing di bidang kultur jaringan hewan yang telah memberikan motivasi, masukan dan pencerahan selama proses penelitian
5. Bapak Dr. H. Ahmad Barizi, M.A selaku pembimbing agama yang telah sabar memberikan masukan dan bimbingan terkait ayat integrasi dan agama
6. Teman-teman biologi angkatan '19 yang telah banyak memberi pengalaman dan menjadi pembelajaran berharga selama di perkuliahan
7. Teman-teman syajaroh thoyyibah, khususnya Luluk Mukarromah S.P., Annisa Saragih, Dzakiyyatun Nisa' Fathiya, sebagai teman-teman dan adik-adik yang selalu mewarnai hari-hari di asrama selama masa studi dan berproses di asrama
8. Teman-teman organisasi LDK At-Tarbiyah, dan KAMMI Ulul Albab yang telah menjadi wadah untuk bertumbuh bersama dan sirkel yang selalu *support* dalam kebaikan sejak awal masuk UIN sampai akhirnya purna masa studi

Malang, 25 Juli 2023

Penulis

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Efa Lusiana

NIM : 19620083

Program Studi : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : "Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol Buah Amla (*Phyllanthus emblica* L.) terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz(a) antrasena (DMBA) secara In Vitro"

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 25 Juli 2023

Yang Membuat Pernyataan



PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

MOTTO

“

Kematangan dalam belajar diraih dengan proses yang tidak mudah, seperti halnya dalam penelitian ini, harus menjalankan proses yang cukup panjang, kesabaran yang luas, menuai banyak hikmah berharga, hingga pengorbanan yang tak sedikit, namun semoga proses itu membawa kita pada kedekatan pada-Nya dan keridhoan-Nya serta tercatat amal baik untuk kedua orang tua. Sebab kita bukan siapa-siapa tanpa orang tua kita.

Ingatlah “*Laa yukallifu nafsan illaa wus’aha*” bahwa Allah akan selalu memberikan ujian sesuai kapasitas yang kita miliki.

Ilmu yang terbaik adalah ilmu yang mengantarkan kita pada ketaqwaan

“

Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol Buah Amla (*Phyllanthus emblica* L.) terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz(a)antrasena (DMBA) secara In Vitro

Efa Lusiana, Retno Susilowati, Ahmad Barizi

Program Studi Sarjana Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Kanker masih menjadi epidemik global yang memiliki risiko tinggi terhadap kesehatan. Salah satu tanaman yang telah lama dimanfaatkan karena khasiatnya yaitu buah amla (*Phyllanthus emblica*). Penelitian farmakologi melaporkan buah amla memiliki aktivitas sebagai analgesik, antioksidan, antitusif, antiinflamasi, aktivitas mutagenik dan antikanker. Buah amla mengandung senyawa aktif diantaranya asam ellagic, asam galat, asam askorbat, fenolik, flavonoid, dan tanin yang diduga memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh sitotoksik ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(a)antrasena (DMBA) secara in vitro. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan 4 ulangan yaitu perlakuan kontrol (-), kontrol (+), P1 dengan konsentrasi buah amla (*Phyllanthus emblica*) 200 µg/ml, P2 400 µg/ml, P3 600 µg/ml, P4 800 µg/ml, dan P5 1000 µg/ml dengan masing-masing kelompok (P1-P5) diinduksi DMBA 0.1 µg/ml selama 2x24 jam. Data penelitian meliputi rata-rata viabilitas dan konfluenitas kemudian dilakukan lanjut menggunakan uji BNT 5%. Hasil menunjukkan ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) berpengaruh terhadap konfluenitas dan viabilitas sel yang ditunjukkan adanya penurunan rata-rata konfluenitas serta mampu menghambat viabilitas sel hepar tikus yang diinduksi DMBA. Nilai LC₅₀ yang diperoleh sebesar 161.11 µg/ml (LC₅₀ < 200 µg/ml) hal ini mengindikasikan senyawa dalam buah amla (*Phyllanthus emblica*) bersifat sitotoksik dan berpotensi sebagai senyawa antikanker.

Kata kunci : Sitotoksik, Sel Hepar, *Phyllanthus emblica*, DMBA, In Vitro

Cytotoxic Test of Amla Fruit Methanol Extract (*Phyllanthus Emblica L.*) Against Hepar Cell Rattus (*Rattus norvegicus*) which is induced by 7.12-Dimethylbenz(α)antrasena (DMBA) in Vitro Method

Efa Lusiana, Retno Susilowati, Ahmad Barizi

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim Malang State Islamic University

ABSTRACT

Cancer is still a global epidemic that has a high risk of health. One of the plants that has long been utilized because of its properties is the amla fruit (*Phyllanthus emblica*). Pharmacological research reports that Amla has activity as analgesics, antioxidants, antitussive, anti-inflammatory, mutagenic activity and anticancer. Amla fruit contains active compounds including ellagic acid, error acid, ascorbic acid, phenolic, flavonoids, and tannins that are thought to have a cytotoxic effect on cancer cells. The purpose of this study was to determine the effect of the cytotoxic extract of Amla (*Phyllanthus emblica*) on mouse liver cells (*Rattus norvegicus*) which was induced by 7.12-dimethylbenz (A) Antrasena (DMBA) in vitro. This study uses a complete randomized design (RAL) with 7 treatments and 4 replications namely control treatment (-), control (+), P1 with amla fruit concentration (*Phyllanthus emblica*) 200 $\mu\text{g/ml}$, P2 400 $\mu\text{g/ml}$, P3 600 $\mu\text{g/ml}$, P4 800 $\mu\text{g/ml}$, and P5 1000, $\mu\text{g/ml}$ with each group (P1-P5) induced by 0.1 $\mu\text{g/ml}$ for 2x24 hours. Research data includes the average viability and confluence and then carried out further using the 5%BNT test. The results show that the amla fruit extract (*Phyllanthus emblica*) affects the confluence and viability of cells that are indicated by a decrease in the average conflictity and is able to inhibit the viability of the liver cells that are induced by DMBA. The LC50 value obtained is 161.11 $\mu\text{g/ml}$ (LC50 <200 $\mu\text{g/ml}$) This indicates compounds in the amla fruit (*Phyllanthus emblica*) is cytotoxic and has the potential as an anticancer extract.

Keyboard : Cytotoxic, Liver cell, *Phyllanthus emblica*, DMBA, in vitro

ضد رات الخلية (AMLA (*Phyllanthus emblica* L.) النشاط السام للخلايا لمستخلص ميثانول فاكهة في المختبر (DMBA) (*antrasena* (α) الذي يسببه 7.12-ديميثيل بنز (*Rattus norvegicus*) الهيبار

Efa Lusiana, Retno Susilowati, Ahmad Barizi

برنامج دراسة علم الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا ، مولانا مالك إبراهيم مالانج الجامعة الإسلامية

ألبحث ملخص

لا يزال السرطان وباءًا عالميًا لديه خطر كبير من الصحة. واحدة من النباتات التي تم استخدامها منذ فترة طويلة بسبب لديها نشاط مثل المسكنات AMLA تقارير الأبحاث الدوائية أن (*Phyllanthus emblica*) Amla خصائصها هي فاكهة على AMLA ، مضادات الأكسدة ، مضاد للضادة ، مضاد للالتهابات ، النشاط الطفرة ومضاد للسرطان. تحتوي فاكهة مركبات نشطة بما في ذلك حمض الإلياجيك ، حمض الخطأ ، حمض الأسكوربيك ، الفينول ، الفلافونويد ، والعفص الذي يعتقد أن له تأثير سامة للخلايا على الخلايا السرطانية. كان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد تأثير المستخلص السام للخلايا الذي تم إحداثه بواسطة 7.12 (*Rattus norvegicus*) على خلايا كبد الماوس (*Phyllanthus emblica*) AMLA - مع 7 (RAL) في المختبر. تستخدم هذه الدراسة تصميمًا عشوائيًا كاملاً (*DMBA*) (*Antrasena*) (*dimethylbenz (A)*) (*Phyllanthus emblica*) AMLA مع تركيز فاكهة P1 ، (+) علاجات و 4 تكرارات هي علاج التحكم (-) ، التحكم ، P5 1000 ميكروغرام/مل ، و P4 800 ميكروغرام/مل ، P3 600 ميكروغرام/مل ، P2 400 ميكروغرام/مل ، 200 ساعة. تتضمن بيانات البحث متوسط $\times 24$ الناجم عن 0.1 ميكروغرام/مل لمدة 2 (P1-P5) ميكروغرام/مل مع كل مجموعة AMLA بنسبة 5٪. أظهرت النتائج أن مستخلص فاكهة BNT الجدوى والصراع ثم يتم تنفيذها بشكل أكبر باستخدام اختبار يؤثر على النقاء الخلايا التي يتم الإشارة إليها من خلال انخفاض في الصراع المتوسط وقادرة (*Phyllanthus emblica*) التي تم الحصول عليها هي 161.11 ميكروغرام/مل LC50 قيمة DMBA. على تثبيط صلاحية خلايا الكبد التي تسببها هو سامة للخلايا (*Phyllanthus emblica*) Amla وهذا يشير إلى مركبات في فاكهة (ميكروغرام/مل < 200 LC50) وله إمكانية كمركب مضاد للسرطان

لوحة المفاتيح: في المختبر, DMBA, سامة للخلايا الخلوية، خلايا الكبد، فيلانثوس إيمبليكا،

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT. yang telah memberikan kemudahan sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Metanol Buah Amla (*Phyllanthus emblica* L.) terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz(a) antrasena (DMBA) secara In Vitro” secara maksimal. Sholawat serta salam, tak lupa dihaturkan pada baginda tercinta yaitu Nabi Muhammad SAW. yang kita nantikan syafaatnya di akhirat kelak. Penulis mengucapkan terima kasih pada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini baik, diantaranya:

1. Prof. Dr. H. Muhammad Zainuddin, M.A, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M. Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si, selaku dosen pembimbing skripsi, yang telah memberikan saran dan nasehat selama masa perkuliahan dan selalu sabar dalam membimbing dan mengarahkan sehingga tugas akhir dapat terselesaikan.
5. Dr. H. Ahmad Barizi, M.A, selaku dosen pembimbing skripsi bidang agama, karena berkat bimbingan beliau penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Kholifah Holil, M.Si dan Fitriyah, M.Si sebagai dosen penguji atas segala masukan, ilmu dan saran dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Ruri Siti Resmisari, M.Si, M.P, selaku dosen wali yang banyak memberikan waktu luang, bimbingan dan masukan.
8. Bu Lil Hanifah, M.Si, selaku pembimbing lapangan yang mengajarkan banyak hal terutama metode dan eksekusi ketika di lab kultur jaringan hewan
9. Orang tua tersayang dan seluruh keluarga tercinta yang selalu memberikan dukungannya baik berupa doa, moral, dan materi, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar.
10. Seluruh pihak yang mungkin penulis tak dapat sebutkan satu persatu, sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Semoga kasih sayang Allah SWT tercurahkan kepada semuanya. Dalam penulisan skripsi ini tentulah masih terdapat kekurangan namun penulis berharap ada ilmu yang bisa didapat serta bermanfaat bagi pembaca dan penulis. *Aamiin Allahumma Aamiin.*

Malang, 25 Juli 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	v
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vi
MOTTO.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
ألبحث ملخص	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	vv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian.....	9
1.4 Hipotesis Penelitian	9
1.5 Manfaat Penelitian	9
1.6 Batasan Penelitian	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Buah Amla dan Fungsinya bagi Kesehatan dalam Islam	11
2.1.1 Tinjauan Umum	11
2.1.2 Morfologi dan Klasifikasi Buah Amla	15
2.1.3 Kandungan Buah Amla (<i>Phyllanthus emblica</i>)	17
2.2 Hepar	19
2.2.1 Anatomi dan Fisiologi Hepar	19
2.3 Uji Sitotoksik	23
2.4 Viabilitas dan Konfluenitas Sel	25
2.5 DMBA	26
2.6 MTT Assay dan Nilai LC ₅₀	27
BAB III METODE PENELITIAN	30
3.1 Rancangan Penelitian	30
3.2 Variabel Penelitian	30
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	30
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	31
3.5 Prosedur Penelitian	32
3.5.1 Preparasi Ruang dan Alat	32
3.5.2 Pembuatan Sampel Buah Amla (<i>Phyllanthus emblica</i>)	33
3.5.3 Metode Esktraksi Buah Amla	33
3.5.4 Pembuatan Media Kultur DMEM	34
3.5.5 Persiapan Kultur Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	34
3.5.6 Pembagian Kelompok	35
3.5.7 Perlakuan Induksi DMBA terhadap Sel Hepar Tikus (<i>Rattus</i>	

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Ringkasan ANOVA Pengaruh ekstrak metanol buah amla (<i>Phyllanthus emblica</i>) terhadap konfluenitas sel hepar tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diinduksi DMBA secara in vitro	50
Tabel 4.2 Uji BNT 5% Pengaruh Ekstrak Buah Amla (<i>Phyllanthus emblica</i>) terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus yang Diinduksi DMBA secara In Vitro	51
Tabel 4.3 Ringkasan ANOVA Pengaruh ekstrak metanol buah amla (<i>Phyllanthus emblica</i>) terhadap viabilitas sel hepar tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diinduksi DMBA secara in vitro	56
Tabel 4.4 Uji BNT 5% Pengaruh Ekstrak Buah Amla (<i>Phyllanthus emblica</i>) terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus yang Diinduksi DMBA secara In Vitro	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi <i>Phyllanthus emblica</i>	16
Gambar 2.2 Reaksi Pembentukan dan Penggabungan Radikal Fenoksil	19
Gambar 2.3 Morfologi Hepar	19
Gambar 2.4 Anatomi Hepar	21
Gambar 2.5 Aliran Vena Portal pada Hepar	22
Gambar 4.1 Hasil Konfluenitas Sel Hepar Tikus Hari ke-4	42
Gambar 4.2 Pertumbuhan Sel Hepar Tikus yang Diinduksi DMBA	46
Gambar 4.3 Pewarnaan <i>Trypan Blue</i> dan Analisis Viabilitas Sel Hepar Tikus Menggunakan Alat <i>Counstess</i>	53
Gambar 4.4 Uji Sitotoksik Ekstrak Buah Amla (<i>P.emblica</i>) terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) menggunakan analisis <i>ELISA reader</i>	63

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker masih menjadi epidemik global yang memiliki risiko tinggi terhadap kesehatan hal ini ditunjukkan oleh tingginya penderita kanker baik di Indonesia maupun di dunia. Terdapat sekitar empat belas juta kasus baru setiap tahunnya dengan kasus kematian sekitar delapan juta orang (Ferlay *et al.*, 2015). Kanker ialah penyakit yang disebabkan oleh perubahan patofisiologis dalam proses pembelahan sel sehingga terjadi kelainan yang signifikan dan penyebab kematian di seluruh dunia (Hanahan, 2022). Angka kasus akibat kanker lebih dari 19,3 juta kanker baru yang didiagnosis dan menyebabkan kematian sekitar 10 juta jiwa pada tahun 2020 (Ferlay, 2021) yang disebabkan berbagai faktor termasuk lingkungan, gaya hidup, industrialisasi dan makanan (Eala, *et al.*, 2022).

Global Cancer Observatory (GCO) tahun 2020 mencatat total kasus tertinggi penyebab kematian yaitu kanker paru-paru (1,79 juta kasus atau 18%), kanker hepar (830.000 kasus atau 8,3%), dan kanker payudara (680.000 kasus atau 6,9%) (Ferlay, 2021). Kanker hepar menjadi kasus terbanyak nomor 6 di dunia di tahun 2018 sebanyak 841.080 kasus baru, dan didominasi oleh laki-laki daripada perempuan yakni perbandingan sekitar 2-3:1 (WHO IARC, 2019). Negara berkembang seperti Indonesia memiliki peluang angka kematian lebih tinggi akibat kanker terutama kanker hepar dan kanker perut paling banyak menyebabkan kematian (Torre, 2015). Hal ini dapat dikarenakan perbedaan faktor seperti keberhasilan penanganan deteksi, ketersediaan pengobatan antara dibanding negara maju. Bahkan hasil analisis sebuah penelitian menunjukkan bahwa kejadian kanker

di Indonesia masih tinggi terutama di pulau Jawa (Dewi, 2017). Kanker umumnya ditandai dengan penyakit gangguan pada sistem pembelahan sel dengan ciri kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis pada organisme multiseluler (Haryoto, dkk., 2013). Penyakit kanker dapat diakibatkan karena faktor internal maupun eksternal maupun internal. Faktor internal bisa karena kerusakan replikasi atau keturunan, sedangkan eksternal seperti senyawa yang bersifat karsinogen, penyedap makanan, pengawet, asap rokok, radiasi alat elektronik ataupun infeksi virus (Khafiuddin, dkk., 2011).

Kanker hati menjadi salah satu kanker yang prevalensinya terus meningkat namun pengobatan saat ini masih terbatas (Gravitz, 2014). Seperti yang kita pahami, hepar ialah organ yang sangat vital dalam proses metabolisme dalam tubuh manusia terutama berfungsi untuk detoksifikasi. Kanker hepar menjadi salah satu penyakit kronis dengan gejala seperti inflamasi dan fibrosis hepar sehingga hal ini dapat mengakibatkan gangguan fisiologi dan struktur hepar akibatnya dapat mengganggu fungsi dan metabolismenya. Beberapa disebabkan karena hepatitis kronis dalam jangka panjang (Khanifah 2019). Sebagaimana fungsinya sebagai detoksifikasi, hepar memproduksi enzim lebih banyak yang berperan dalam proses metabolisme tubuh. Apabila hasil metabolisme bersifat toksik, enzim akan membentuk ikatan kovalen dengan asam nukleat dan dapat memicu terbentuknya karsinogenesis. Tingkat kepekaan terhadap senyawa karsinogen disebabkan karena terjadi reaksi oksidasi oleh enzim sitokrom P450 atau CYP yang mampu berikatan dengan retikulum endoplasma sel hepar, sehingga dapat memicu terbentuknya kanker (Kurlila, 2013).

Penyakit hepar seperti infeksi virus hepatitis B (HBV) dikaitkan dengan kerusakan hepar termasuk hepatitis kronis, sirosis hepar dan HCC (*Hepatocellular Carcinoma*) (Nugraha, *et al.*, 2018). Karsinoma hepatoseluler (KHS) dapat disebabkan karena fibrosis dan sirosis lanjut (Dhar, *et al.*, 2020). Karsinoma hepatoseluler (KHS) atau disebut juga kanker hepar adalah tumor yang berasal dari hepatosit dan secara klinis bersifat progresif. Karsinoma hepatoseluler merupakan tumor ganas yang berasal dari hepatosit. Kanker hepar biasanya disertai dengan kelainan hepar lainnya seperti penyakit hepar kronis Hepatitis B dan C, sirosis hepar, NAFLD (*non-alcohol fatty liver disease*) atau infeksi hepatitis virus (Villanueva, 2019).. Faktor risiko dapat meningkatnya penyakit ini disebabkan hal eksternal seperti pola hidup, geografi, jenis kelamin, umur, riwayat keluarga, serta tingkat keparahan kerusakan hepar (Villanueva, 2019).

Pembentukan dan pembelahan sel hepar dikontrol oleh gen-gen tertentu dalam sel. Kanker hepar berasal dari satu sel yang mengalami perubahan mekanisme kontrol dalam sel yang mengakibatkan pembelahan sel yang tidak terkontrol. Sel abnormal yang terinisiasi akan membentuk jutaan kopi yang dinamakan klon namun sudah tidak dapat melakukan fungsi normal sel hepar sehingga terus menerus berproliferasi karena kegagalan fungsi sistem dalam pembelahan sel. Proses pertumbuhan disebut mikroevolusioner yang mampu terbentuk selama berbulan-bulan hingga tahunan (Nisa *et al.*, 2014). Faktor eksternal (lingkungan) maupun internal telah diidentifikasi sebagai penyebab naiknya risiko perkembangan sel kanker. *American Cancer Society* (2008) menyatakan kanker tidak lepas karena faktor zat kimia, tembakau, dan faktor

mutasi, hormon, serta kondisi imun yang menginisiasi proses karsinogenesis. Karsinogen merupakan senyawa yang dapat memicu terjadinya kanker dengan cara mempengaruhi DNA atau protein yang mengatur siklus sel, seperti *protooncogene* atau tumor *supressorgene* (Sudiana, 2008). Karsinogenesis disebabkan karena peningkatan proliferasi sel yang mengalami mutasi genetik yang diawali mutasi DNA sehingga proliferasi sel dan regulasi siklus sel tidak terkendali. Akibatnya sel mengalami kerusakan genetik yang berpengaruh pada viabilitas sel normal, dan kemampuan proliferasi sel.

Perubahan sel normal menjadi kanker melalui 3 tahap yaitu inisiasi, promosi, dan progresi. Faktor inisiasi ini beragam, seperti bahan kimia, virus, radiasi, ataupun senyawa radikal bebas lainnya. Hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH) termasuk bahan kimia penyebab kanker yang merupakan polutan udara dihasilkan dari bahan bakar fosil, pembakaran biomassa dan terkandung di atmosfer telah banyak dilaporkan memiliki keterkaitan penyebab penyakit kanker (Hayakawa, 2022). Karsinogenisitas PAH berkaitan dengan kemampuannya mengikat DNA sehingga menyebabkan serangkaian efek penyebab tumor. Struktural atau modifikasi molekul PAH yang menyebabkan pengikatan silang DNA dan menyebabkan karsinogenesis (Ifegwu, *et al.*, 2015).

Senyawa karsinogen yang banyak digunakan sebagai model kanker atau penyebab karsinogenesis adalah DMBA (*7,12-Dimetilbenz(α)antrasena*). Senyawa ini mampu berperan sebagai inisiator ataupun promotor, membentuk proximate dan ultimate karsinogen yang paling poten membentuk DNA *adduct* dengan bantuan aktivasi enzim sitokrom P450 yang mampu memicu stress oksidatif (Wuyung,

2016). Senyawa DMBA atau *7,12-Dimethylbenz(α)antrasena* merupakan salah satu senyawa turunan dari polisiklik hidrokarbon aromatic (PAH) yang dikenal sebagai agen mutagenik, tertogenik, karsinogenik, sitotoksik dan immunosupresif (Budi & Widyarini, 2010).

Senyawa DMBA ini dapat dijadikan senyawa uji untuk perlakuan model kanker untuk upaya mencari kandidat obat yang efektif mengobati penyakit kanker. Berbagai upaya preventif untuk mencegah dan mengobati kanker yang sudah pernah dilakukan seperti terapi dengan hormon atau antibodi monoklonal, kemoterapi, pembedahan, radioterapi, (Dolinsky, 2002) bahkan obat yang mampu merangsang diferensiasi sel kanker ganas menjadi jinak, obat yang merubah respon imun sel kanker, hingga obat antikanker lainnya (Li *et al.* 2008). Namun pengobatan yang ada belum cukup berhasil dan cenderung menimbulkan efek samping toksik pada jaringan normal serta resistensi sel kanker (Tyagi *et al.*, 2004). Disamping itu setiap hari kondisi tubuh kita dipengaruhi oleh agen di lingkungan dan pola makan yang tentu dapat berpotensi mempengaruhi integritas genom, seperti xenobiotik, dan spesies oksigen reaktif dan agen radikal bebas lainnya yang bersifat karsinogenik. Dengan mengurangi paparan xenobiotik berbahaya, meningkatkan kapasitas kita untuk menyerap spesies oksigen reaktif dapat menjadi cara potensial untuk mencegah penyakit kanker. Upaya berkelanjutan dalam pengembangan obat terapi telah dilakukan. Obat sintetik, system nano berbasis produk alami, nanokonjugasi, nanopartikel polimer, nanopartikel padar, radiodiagnosis kanker, telah merevolusi system penghantaran obat serta pengembangan biosensor baru untuk diagnosis biomarker kanker, namun

penyembuhan total perlu kemajuan lebih lanjut melibatkan gaya hidup dan terapi tertentu (Chhikara, 2022). Karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengangkat salah satu tanaman herbal buah amla (*Phyllanthus emblica*) yang telah lama digunakan oleh terapi kesehatan dan memiliki berbagai potensi, salah satunya sebagai antikanker.

Penyembuhan dan pengobatan kanker maupun penyakit lainnya dapat berhasil tentu atas izin Allah yang tak lepas pula dari ikhtiar manusia. Manusia hanya memperoleh apa yang telah diusahakannya yakni mencari penyembuhan melalui ilmu pengetahuan dan obat-obat yang Allah karuniakan di bumi-Nya. Allah SWT menciptakan penyakit tentu diberikan pulan dengan obatnya sebagaimana bunyi hadits dari sahabat Jabir *radhiyallahu 'anhu* meriwayatkan dari Rasulullah *shallallahu 'alaihi wa sallam*, bahwa beliau bersabda :

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya : “Setiap penyakit ada obatnya, dan bila telah ditemukan dengan tepat obat suatu penyakit, niscaya akan sembuh dengan izin Allah Azza wa Jalla.”(H.R Muslim).

Hadist diatas diriwayatkan oleh Jabir *radhiyallahu 'anhu* tersebut menjelaskan bahwa Allah *Subhanahu wata'ala* Maha Adil dan Maha Pemurah. Dari berbagai macam penyakit yang ada di bumi, tentu Allah hadirkan pula penawarnya (obat) bagi mereka yang mau berfikir dengan keimanannya. Setiap penyakit yang Allah turunkan pasti Allah sediakan pula obatnya dibumi. Sebagai hamba-Nya yang beriman dan berakal kita perlu terus menggali ilmu pengetahuan baik itu lewat tumbuhan, dan segalanya yang Allah sediakan dibumi. Berbagai

penelitian mengenai potensi obat kanker herbal yang efektif telah lama digunakan sejak dahulu. Manfaat yang telah dirasakan oleh orang-orang terdahulu salah satu tanda kebenaran Al-Qur'an bahwa Allah telah menyediakan obat untuk setiap penyakit melalui hasil bumi seperti tumbuhan. Sebagaimana firman-Nya, Allah mengkaruniakan berbagai jenis tumbuhan untuk kebutuhan manusia di bumi, seperti pada surah Thaha [20]:53

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَوَسَّلَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَخَرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى

Artinya: “(Dialah Tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan dan meratakan jalan-jalan di atasnya bagimu serta menurunkan air (hujan) dari langit.” Kemudian, Kami menumbuhkan dengannya (air hujan itu) beraneka macam tumbuh-tumbuhan” (Q.S. Thaha[20]: 53)

Tanaman yang sudah cukup lama dimanfaatkan sebagai obat adalah tanaman Amla (*Phyllanthus emblica*) atau dikenal juga dengan buah malaka. Seraca hitoris, tanaman ini terkenal sejak dahulu dimanfaatkan sebagai pengobatan masyarakat lampau karena kandungan dan potensinya, seperti di India telah digunakan untuk mengobati berbagai penyakit yaitu kanker, anemia, diabetes, gangguan jantung dan hepar/liver (Khan, 2009). Penelitian terdahulu farmakologi tentang tanaman malaka ini diketahui memiliki aktivitas sebagai antikanker, antioksidan, aktivitas mutagenik, analgesik, antitusif, dan antiinflamasi (Dasaroju, *et al.* 2014). Selain itu berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan Sharma *et al.*, (2000) melalui uji *Ames test*, membuktikan bahwa *Phyllanthus emblica* yang sinonimnya dikenal dengan *Emblica officinalis* berpotensi mencegah mutagenesis *in vitro*. Selain itu dalam *review* artikel menurut Zhao *et al.*, (2015) berbagai

penelitian terdahulu mengatakan, dalam model karsinogenesis, pemberian *Emblica officinalis* secara terus menerus pada 100 mg/kg mengurangi kejadian tumor sebesar 60%. Studi independen juga menunjukkan polifenol atau fraksi berair pada tanaman buah Amla (*Emblica officinalis*) pada dosis 60-250 mg/kg mencegah karsinoma hepatoseluler yang diinduksi N-nitrosodiethylamine sebesar 80-100%.

Dari penelitian yang dipaparkan diatas menunjukkan bahwa buah Amla *Emblica officinalis* atau dikenal juga *Phyllanthus emblica* memiliki kapasitas untuk mencegah timbulnya beberapa kanker namun tidak semua jenis kanker, tergantung inisiatornya. Penelitian tentang pengaruh uji sitotoksik senyawa dari *Phyllanthus emblica* terhadap sel kanker yang disebabkan oleh senyawa karsinogen 7,12-Dimethylbenz(α)antrasena (DMBA) masih belum banyak ditemukan, maka berdasarkan pemaparan diatas penelitian ini bertujuan untuk mengetahui uji sitotoksik ekstrak buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap sel hepar tikus yang diinduksi DMBA secara in vitro.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh sitotoksik ekstrak metanol 99% buah amla (*Phyllanthus emblica* L.) terhadap konfluenitas dan viabilitas kultur sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara in vitro ?
2. Berapa nilai LC₅₀ pemberian ekstrak metanol 99% buah amla (*Phyllanthus emblica* L.) terhadap viabilitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara in vitro ?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui pengaruh sitotoksik ekstrak metanol 99% buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap konfluenitas dan viabilitas kultur sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara in vitro
2. Untuk mengetahui berapakah nilai LC₅₀ dari ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap viabilitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara in vitro

1.4 Hipotesis

1. Ekstrak metanol buah amla (*Phyllanthus emblica*) memiliki pengaruh sitotoksik terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara in vitro
2. Ekstrak metanol buah amla memiliki nilai LC₅₀ yang cukup toksik terhadap sel kanker hepar dan berpotensi menghambat pertumbuhan sel kanker.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Bagi masyarakat
Memberikan informasi kepada masyarakat tentang uji antikanker dan antisitotoksik pada penyakit kanker hepar serta sarana mencegah dan mengatasi penyakit kanker dengan memanfaatkan tanaman yang berpotensi sebagai antikanker
2. Bagi akademik
Sebagai publikasi karya ilmiah yang dapat menjadi rujukan atau referensi untuk penelitian selanjutnya khususnya manfaat dari buah Amla sebagai kandidat obat antikanker hepar.

1.6 Batasan Masalah

Ruang lingkup pembahasan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Sampel buah amla yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah Amla (*Phyllanthus emblica*) yang masih segar, setengah matang dan berwarna hijau.
2. Pembuatan ekstrak buah amla menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol 99%
3. Sel kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur primer organ hepar *baby* tikus berumur 2-3 hari yang diinduksi senyawa DMBA konsentrasi 10 µg/ml.
4. Media yang digunakan selama kultur sel hepar adalah DMEM dan suplemen serum FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10%
5. Uji sitotoksik metode *in vitro* dilakukan terhadap pengamatan viabilitas sel kanker dilakukan dengan cara menghitung absorbansi menggunakan metode MTT Assay yang terbaca melalui ELISA *reader*
6. Efek sitotoksik ekstrak buah Amla terhadap sel kanker hepar diperoleh dengan menghitung nilai LC₅₀ dengan membuat grafik log konsentrasi dan prosentase sel hidup melalui rumus grafik standar.
7. Data parameter viabilitas diperoleh melalui analisis menggunakan alat *Countess (Automatic Cell Counter)* dengan metode pewarnaan *trypan blue*
8. Data parameter konfluenitas didapatkan melalui hasil *capture* mikroskop *inverted* yang dianalisis menggunakan *software ImageJ* untuk memperoleh persentase konfluenitas

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Buah Amla dan Fungsinya bagi Kesehatan dalam Islam

2.1.1 Tinjauan Umum

Buah amla ialah salah satu tanaman yang sudah dikenal sejak lama karena khasiat dan manfaatnya. Tanaman ini termasuk dalam jenis tanaman dimanfaatkan berbagai komponennya termasuk ranting, akar, daun, bunga dan biji. Tanaman obat ini memiliki berbagai khasiat yang telah terbukti secara empiris baik baik secara turun-temurun di masyarakat maupun secara ilmiah. Tanaman ini tumbuh diberbagai belahan dunia area seperti hutan, padang rumput, dan daerah yang panas, atau dataran rendah (Cahyaningrum, 2022). Amla menjadi salah satu spesies keanekaragaman hayati yang ada di Indonesia dan memiliki banyak khasiat telah Allah karuniakan kepada hamba-Nya. Sebagaimana firman-Nya, kesehatan dan pengobatan yang berasal dari tumbuhan sangat memiliki hubungan erat, bagaimana tumbuhan menyediakan nutrisi dan kandungannya yang bermanfaat baik untuk mengatasi berbagai penyakit, Allah berfirman :

﴿أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi berapa banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu perlbagai macam-tumbuh-tumbuhan yang baik” (Q.S Asy-Syuaraa:7).

Menurut penelitian yang dilakukan Novitayanti (2021) tentang makna “زَوْجِ كَرِيمٍ” yang disebutkan dalam Al-Qur’an diambil dari kata dasar “زوج-يزوج” yang berarti menikahkan. Menurut ar-Ragib al—Asfahani, kata tersebut digunakan untuk dua hal yang berdampingan seperti jantan-betina, atau hal yang berpasangan. Selanjutnya al-Ragib menegaskan bahwa sesuatu yang berpasangan tersebut bisa karena kesamaan ataupun sesuatu yang berbeda (bertolak-belakang). Menurut tafsir al-Qurthubi, surah Asy-Syu’ara ayat 7, didalam terdapat kata “*zauj*” berarti warna dan lafal “*Karim*” artinya baik dan mulia maksudnya adalah tumbuhan yang subur dan memberikan manfaat. Jadi menurut berbagai mufassir *Zauj* artinya pasangan, yang dimaksud dari kata “pasangan” adalah perkawinan 2 jenis kelamin yang berbeda atau pertemuan antara alat kelamin jantan (benang sari) dan alat kelamin betina (putik). Sedangkan yang dimaksud dengan istilah “tumbuhan yang baik (*karīm*)” yaitu tumbuhan yang dapat tumbuh dengan subur menghasilkan buah yang lebat dan bermanfaat (Novitayanti 2021).

Dalam tafsir al-Misbah *zauj* diartikan sebagai pasangan karena tidak hanya manusia yang berpasangan namun juga tumbuh-tumbuhan. *Zauj* dapat pula ditafsirkan sebagai sesuatu yang bertolak belakang, yang berarti memiliki sesuatu yang berbeda atau berlawanan (Novitayanti 2021). Diantara berbagai penelitian yang pernah ada, dalam ilmu biologi sendiri sebagai contohnya khasiat kulit manggis dapat menurunkan diabetes, sedangkan daging buahnya mengandung kalori tinggi yang dapat menaikkan diabetes. Manfaat dan kandungan antara kulit dan buahnya saling berlawanan tetapi memiliki khasiat dan manfaat yang sesuai

karakternya. Dan dengan proses berpikir tentang alam yang Allah ciptakan manusia akan menemukan lebih banyak manfaat dari tumbuhan. Lebih dalam makna dari itu jika kita analisis dari pengetahuan dan sains, kata *zaujinkarim* dapat proses atau tahapan ciri makhluk hidup yaitu tumbuhan dan koteks ini, seperti yang kita ketahui tumbuhan mengalami pertumbuhan dari zigot sampai menjadi tumbuhan dewasa yang terdiri dari buah, akar, daun, biji, batang dan bunga dimana memiliki karakteristik masing-masing. Karakter yang kaya ini lahir akibat dari kromosom dan DNA yang terdapat terkandung dalam tumbuhan.

Kekayaan tumbuhan menurut syarat hidupnya dibedakan ke dalam dua macam yakni buah-buahan tropis dan subtropis. Buah-buahan tropis yaitu yang dapat tumbuh pada dataran tinggi pada suhu diatas 25°C, diantaranya buah durian, manga salak, rambutan manggis, duku, dan buah-buahan subtropis dapat tumbuh pada suhu rendah yakni dibawah suhu 20°C, seperti buah apel, arbey, pir, kiwi, persik, markisa, dan lainnya. Seperti yang kita pahami Indonesia kaya akan tumbuhan dan organisme yang memiliki kekayaan plasma nutfah, dari sinilah manfaat dan kandungan berbagai tanaman dapat ditelusuri melalui berbagai penelitian. Menurut tafsir Al-Azhar karya Prof. Prof. Dr. Hamka secara lebih mendalam buah-buahan tercipta karena “pertemuan yang mulia” atau “*zaujin karimin*” (Ja’far, 2009), lebih jelasnya lagi menurut Noviyanti (2021) tafsir-tafsir tentang makna *zaujin karim* fokus membahas tumbuh-tumbuhan bukan makna secara umum pasangan antara manusia. Hasil dari pemaknaan tentang *zaujinkarim* ini mendorong saintis mengkaji berbagai khasiat lain yang dimiliki tumbuhan yang ada di Indonesia, baik yang dikonsumsi langsung sebagai makanan, diolah untuk

kepentingan industri, obat-obatan, dan manfaat lainnya sesuai dengan kandungan dan manfaatnya.

Buah amla termasuk salah satu keanekaragaman Indonesia yang memiliki banyak khasiat dalam pengobatan. Asal mula kata “amla” (amalaka) terbentuk dari bahasa Sanskerta yang artinya “asam atau masam”. Beberapa referensi menyebutkan kata “amla” merujuk pada salah satu jenis tanaman yang digunakan untuk pengobatan masyarakat berperadaban Arya dan dikenal secara ilmiah bernama *Phyllanthus emblica* (Phyllanthaceae). Buah amla memiliki nama lain seperti “amalaka”, “amala”, “amalaki”, di Nusantara penyebutan buah ini berbeda-beda di berbagai daerah, terkhusus di Austronesia Barat-Tengah yang dikenal dengan nama daerahnya “mlaka”, “mloko”, “balakka”, dan “meloko” (Khoiriyah dkk., 2015). Hampir semua komponen buah amla, seperti daun, ranting, bunga, buah, dan biji dimanfaatkan untuk pengobatan. Di Indonesia, nama buah amla memiliki perbedaan nama diantaranya di Kemloko (Jawa), ceremai. Amla (Melayu), Balaka (Minangkabau), Malakah (Madura), Kalimoko (Bali) (Cahyaningrum, 2022).

Phyllanthus emblica memiliki persebaran alami yang luas, meliputi didaerah tropis dan subtropis, diantaranya Borneo, Pakistan, Bangladesh, Himalaya (termasuk Nepal), India, Cina, Kamboja, Laos, Myanmar, Sri Lanka, Semenanjung Malaya, Thailand, Jawa, Sumatera, Nusa Tenggara, Bali, Taiwan, dan Vietnam (Balakrishnan dan Chakrabarty, 2007; Chakrabarty dan Balakrishnan, 2018). Di beberapa wilayah diketahui jenis tanaman ini dibudidayakan, yaitu di Pulau India,

Puerto Rico, Kuba, Mauritius, Kepulauan Windward (Karibia), dan Trinidad-Tobago (Acevedo-Rodriguez dan Strong, 2007).

Buah Amla ini digolongkan dalam suku *Phyllantacheae* yang termasuk jeni buah-buahan asli Indonesia, yang tersebar di Pulau Sumatera, Nusa Tenggara Jawa, Kalimantan, Bali, dan Maluku. Dengan kata lain, *P. emblica* termasuk spesies alami Indonesia, di Pulau Bali buah Amla juga banyak ditemukan khususnya di daerah bernama Amlapura dimana penelitian menurut Keim, dkk., (2020) nama tersebut asal usulnya karena banyak ditemukan pohon “melaka” (*Phyllanthus emblica*). (Keim, dkk., 2020). Studi penelitian sebelumnya telah membuktikan buah amla (*P. emblica*) banyak memiliki uji biologis yang meliputi antioksidan, hipolipidemik, hipoglikemik, antimikroba, antitumor, dan antiinflamasi. Selain itu juga berpotensi mengurangi risiko atau keparahan kerusakan hepar dan mencegah displidemia pada berbagai penyakit kronis termasuk diabetes (Huang, *et al.*, 2017).

2.1.2 Morfologi dan Klasifikasi

Klasifikasi tumbuhan Amla diklasifikasikan sebagai berikut (Singh, *et al.*, 2011) :

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Kelas : Magnoliosida

Ordo : Malpighiales

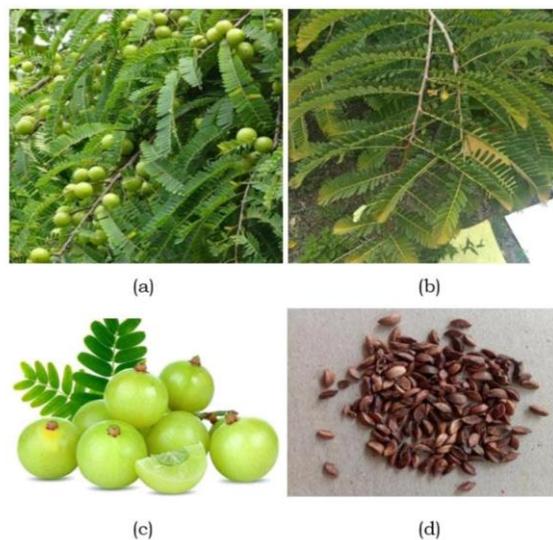
Famili : Phyllanthaceae

Bangsa : Phyllantheae

Genus *Phyllanthus*

Spesies : *Phyllanthus emblica* L.

Pohon Amla memiliki kemiripan dengan pohon cereme, tetapi tumbuh lebih tinggi mencapai 7-25 meter. Batang pohon ini mempunyai struktur percabangan monopodial, bulat, tegak, dan memiliki warna coklat agak kekuningan. Jenis daunnya tunggal, kecil, memanjang, mempunyai cabang menyirip dan ramping. Tangkai daun yang ramping diapit oleh sepasang daun kecil meruncing. Bunga jantan maupun betina berwarna kuning atau hijau dan dikelompokkan dalam kelompok kecil di ketiak daun. Buah amla berbentuk bulat, rasanya asam dan sedikit pahit. Akar tanaman Amla berciri akar tunggang berwarna putih keruh dan tumbuh lebat (Cahyaningrum, 2022).



Gambar 2.1 Morfologi *Phyllanthus emblica* (sumber: <https://ksdae.menlhk.go.id/> dalam Cahyaningrum, 2022). Keterangan : a) Pohon; b) Daun; c) Buah; d) Biji

Dalam penelitian Sangeetha, *et al.* (2010) daun tanaman Amla memiliki ciri warna kulit kayu abu-abu pudar hingga tua, memiliki cabang primer dan sekunder

yang terkulai sedang hingga tinggi dengan panjang daun rata-rata berukuran 1,8 cm, lebar daun sekitar 0,5 cm. Ukuran tinggi pohon Amla ada yang berukuran 200-1500 meter, memiliki cabang primer dan sekunder.

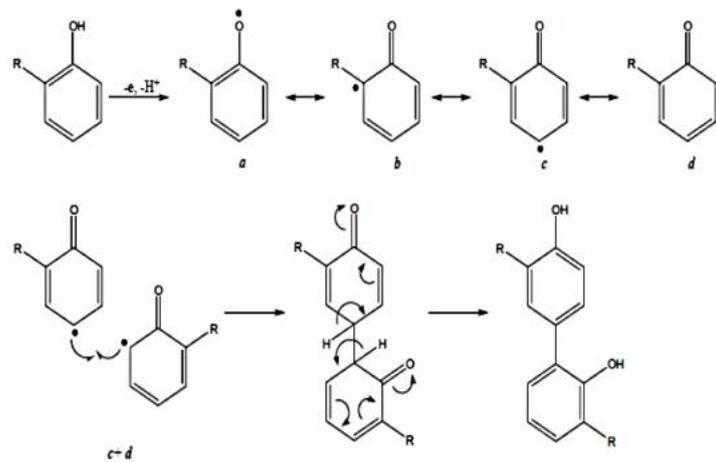
2.1.3 Kandungan Buah Amla (*Phyllanthus emblica*)

Berbagai penelitian menyebutkan buah Amla mampu mengatasi masalah kesehatan seperti memperbaiki pencernaan, menurunkan demam dan batuk, sembelit, meredakan asma, mengobati myopia, meningkatkan imunitas (Nala, 2001). Selain itu penelitian selama 25 tahun terakhir menyatakan buah Amla memiliki kandungan asam askorbat yang sangat tinggi mencapai 160 kali dibandingkan buah apel dan jeruk. Disamping itu, buah ini mengandung mineral, asam amino, tannin yang bersifat antikanker, antibakteri, dan antikarsinogenik. Kandungan buah amla ini diantaranya polifenol dan tanin. Polifenol berperan sebagai senyawa antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas diantaranya dengan cara menghambat kerja enzim kanker dan menonaktifkan bahan kimia yang dapat memicu pertumbuhan sel kanker (Cahyanigrum, 2022). Menurut Qureshi *et al.*, (2009) dan Yulistyarini *et al.*, (2000), buah Amla mengandung sumber vitamin C yang tinggi, terkandung dalam setiap 100 gramnya ditemukan sekitar 600-1300 mg vitamin C yang dikandung buah ini.

Tanaman amla (*Phyllanthus emblica*) juga dilaporkan mengandung banyak senyawa obat seperti vitamin C, flavonoid, emblicol, emblicanin A/B, dan digunakan oleh orang china untuk obat terapeutiknya seperti heptaprotektif, antimikroba yang telah dikonfirmasi dalam penelitian medis modern (Variya *et al.*,

2016). Penelitian yang pernah dilakukan Winaryo, (2003), flavonoid mampu berperan sebagai antioksidan maupun antihistamin, dapat menghambat fosfodiesterase, monoamine oksidase aldoreduktase, protein kinase, DNA polymerase, lipoksigenase (Paul *et al.*, 2022). Di Asia buah Amla telah banyak digunakan untuk pengobatan hepar karena kandungannya kaya akan polifenol yang relevan dengan pengobatan seperti asam galat, asam ellagie, geranin, asam chebulagic, corilagin, dan phyllanthin (Huang *et al.*, 2022). Kandungan senyawa antioksidan pada tanaman ini diantaranya senyawa fenolik, tanin dan flavonoid, asam galat (senyawa utama), dan vitamin C merupakan senyawa esensial yang berpotensi sebagai antioksidan kuat. Mekanisme senyawa fenolik dalam memerangi radikal bebas yaitu melalui kemampuan gugus fenolnya untuk mengikat suatu radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen melalui transfer elektron kemudian berubah menjadi radikal fenoksil (Janeiro and Brett 2004). Derivat fenol termasuk donor hidrogen yang baik karena mampu menghambat reaksi yang disebabkan oleh radikal bebas, sehingga disebut sebagai senyawa inhibitor radikal (Kate, 2014).

Dari hal tersebut derivat dari fenol merupakan donor hidrogen yang baik yang dapat menghambat reaksi yang terjadi akibat senyawa radikal bebas. Senyawa fenol ini juga berfungsi sebagai inhibitor radikal (Kate, 2014)

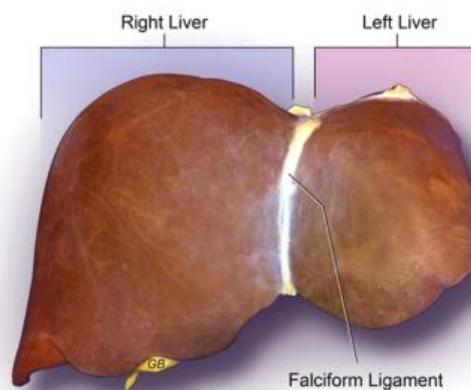


Gambar 2.2 Reaksi Pembentukan dan Penggabungan Radikal Fenoksil (Kate, 2014)

Kandungan tanin dalam dari buah Amla berpotensi sebagai antibakteri dan vitamin C-nya sebagai antioksidan dan buah amla ini (*Phyllanthus emblica*) telah terbukti menjadi salah satu tanaman antikanker (Yadav et al., 2017). Metabolit sekunder yang terkandung didalamnya seperti alkaloid dan senyawa fenolik (tanin) (Bandyopadhyay et al., 2011).

2.2 Hepar

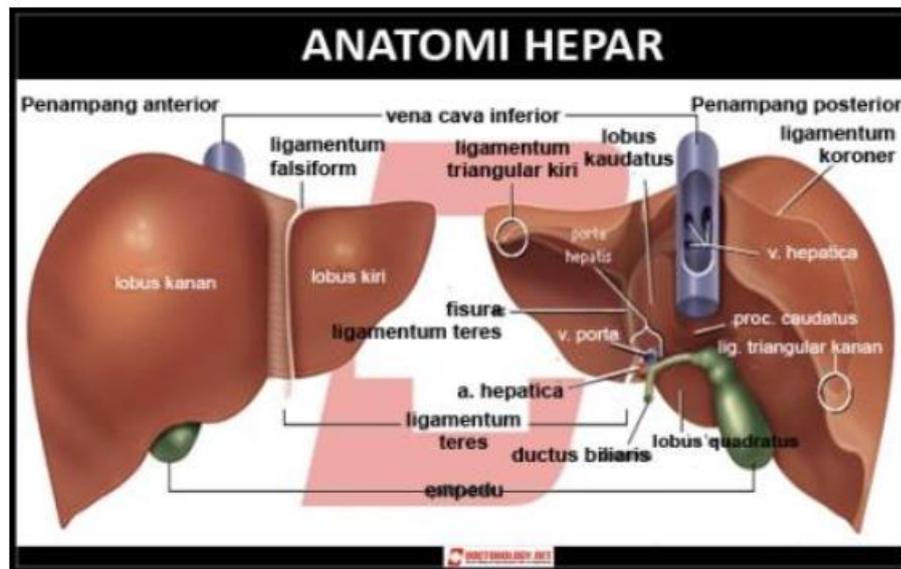
2.2.1 Anatomi dan Morfologi Hepar



Gambar 2.3 Morfologi Hepar (Sibulesky L., 2013).

Hepar terdiri dari 2 lobus yaitu lobus kanan dan kiri, bagian permukaan berbentuk sedikit cembung dan posisinya dibawah diafragma. Pada permukaan bawah terdapat lekukan dan tidak rata, fura transversus, permukaan ini dilintasi oleh pembuluh darah yang keluar-masuk hepar. (Azmi, 2016). Struktur hepar ada yang bernama muralium (dinding). Parenkim hepar menyentuh saluran portal dan kapsul eksternal yang dibatasi oleh selaput membran. Sinusoid dilapisi oleh satu jenis sel yaitu fagosit potensial. Arteri hepatis sendiri memiliki saluran masuk menuju sinusoid parportal, menengah dan sentrolobular (Elias, 1955). Belahan kanan dan kiri pada permukaan bawah dipisahkan oleh fura longitudinal. Hepar terbagi menjadi 4 belahan yang terdiri dari lobules berbentuk polyhedral (segibanyak). Pada tiap-tiap lobules berbentuk kubus dan percabangan pembuluh darah yang diikat oleh jaringan hepar (Azmi, 2016).

Merefleksi hikmah dari surah an-Najm ayat 11 mengenai hepar atau hepar, merupakan kelenjar terbesar didalam tubuh yang berperan penting dalam sistem metabolisme dan menetralkan racun yang berasal dari berbagai substansi yang masuk kedalam tubuh. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Yong Song Guan dan Qing He dalam *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, hepar berfungsi sebagai pembersih racun (detoksifikasi), penghancur sel darah merah yang sudah menua, pengolah dan penyeimbang protein dan hormon, serta menyimpan glikogen sebagai sumber energi (Qur'an Kemenag, 2019).

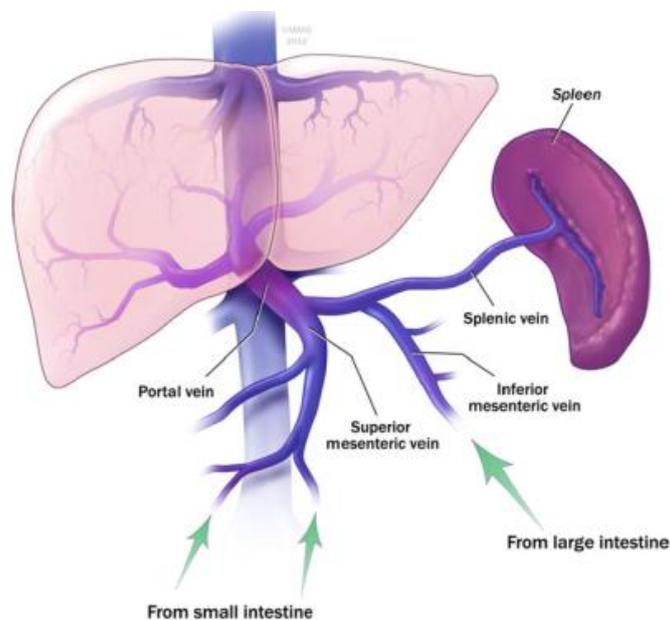


Gambar 2.4 Anatomi Hepar (Azmi, 2016).

Hepar terbagi dalam dua belahan utama, lobus kiri dan lobus kanan. Permukaan atas berbentuk lebih cembung dan terletak dibawah diafragma. Permukaan bawah sedikit tidak rata dan memperlihatkan lekukan, fisura transversus. Permukaan hepar dilintasi oleh berbagai pembuluh darah yang masuk maupun keluar hepar untuk mensuplai oksigen dan nutrisi. Fisura longitudinal ini memisahkan belahan kanan dan kiri di permukaan bawah. Hepar terbagi menjadi empat belahan yaitu belahan kanan, kiri, kaudata dan kuadrata. Setiap belahan atau lobus terdiri atas lobules yang berbentuk polyhedral (segibanyak) dimana setiap lobulus terdiri atas sel hepar berbentuk kubus, dan cabang-cabang pembuluh darah diikat bersamaan dengan jaringan hepar (Azmi, 2016).

Warna hepar normal adalah coklat dan permukaan luarnya halus (Hepar Normal). Hepar memiliki berat sekitar 2% dari berat badan orang dewasa, dengan berat sekitar 1400 gram pada laki-laki dan 1800 gram pada wanita. Hepar ini berfungsi menerima suplai darah dari 2 sumber yaitu 80% dialirkan oleh vena

portal, yang mengalirkan limpa dan usus, sedangkan 20% sisanya, darah teroksigenasi, dialirkan oleh arteri hepatic. Vena portal dibentuk oleh penyatuan limpa dan vena mesentrika superior dengan vena mesentrika inferior mengalir ke vena limpa. Arteri hepatic umum adalah cabang dari arteri seliaka diikuti dengan arteri limpa lambung bagian kiri, terkadang arteri hepatic memiliki pembuluh tambahan atau pengganti yang mensuplai hepar. Arteri hepatic kanan aksesori atau pengganti adalah cabang dari arteri mesentrika superior proksimal, sedangkan arteri hepatic kiri aksesori atau pengganti adalah cabang dari arteri lambung kiri. Secara eksternal hepar dibagi oleh ligament falciform, menjadi lobus kanan (lebih besar) dan lobus kiri yang lebih kecil. Ligamentum falciform melekatkan hepar ke dinding anterior abdomen.



Gambar 2.5 Aliran Vena Portal pada Hepar

Berdasarkan klasifikasi Couinaud, hepar terbagi menjadi segmen fungsional independen. Setiap segmen memiliki pedikel portalnya sendiri yang terdiri dari cabang arteri hepatic, cabang portal, dan saluran empedu dengan cabang vena hepatic terpisah yang membentuk aliran keluar (Sibulesky L., 2013). Hepar memiliki 2 jenis persediaan yaitu melalui arteri hepatica dan melalui vena porta. Hepar terdiri dari bermacam-macam sel diantaranya meliputi hepatosit sekitar 60% sel hepar, sedangkan sisanya terdiri dari sel epithelia sel non-parenkimal, endothelium, sel kupfer dan sel stella menyerupai bintang. Hepatosit dipisahkan sinusoid tersusun melingkari vena hepatica dan duktus hepaticus (Azmi, 2016)..

2.3 Uji Sitotoksik

Uji atau tes sitotoksik adalah salah satu metode bioassay *in vitro* pertama yang digunakan untuk memprediksi toksisitas zat ke berbagai jaringan pengujian. Pengujian sitotoksik *in vitro* menyediakan sarana penting untuk penilaian dan penyaringan keamanan dan untuk menentukan kualifikasi senyawa. Pilihan menggunakan teknologi uji sitotoksik tertentu bergantung pada tujuan penelitian. Terdapat empat kelas pengujian utama yang digunakan untuk mengetahui respons sel yang dikultur setelah perlakuan menggunakan racun atau toksin potensial. Metode ini dapat digunakan untuk mengukur viabilitas, integritas membran sel, proliferasi sel, dan uji metabolisme sel (Tolosa L., *et al.*, 2015).

Uji sitotoksik juga digunakan untuk mengetahui adanya antineoplastik suatu senyawa biasanya secara *in vitro*. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel menjadi salah satu cara dalam penelitian *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat yang memiliki efek sitotoksik. Metode ini merupakan uji kuantitatif dengan cara

menentukan angka kematian sel. Parameter yang digunakan untuk uji sitotoksik yaitu LC_{50} . Nilai LC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi pada konsentrasi berapa akan mampu menghambat proliferasi sel hidup mencapai 50% (Cho *et al.*, 1998). Nilai LC_{50} dapat menunjukkan potensi sitotoksitas suatu senyawa. Semakin besar harga LC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Hartoyo, dkk., 2013). Selanjutnya, bagian akhir dari proses uji sitotoksik ini dapat memberikan konsentrasi yang maksimum namun masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Terakhir dari rangkaian uji sitotoksitas ini dmampu memberikan informasi berapa konsentrasi maksimum suatu ekstrak namun sel masih mampu bertahan hidup (*viable*). Hasil sitotoksitas suatu senyawa tertentu akan berpengaruh pada gangguan dan struktur atau sifat yang dapat berpengaruh bagi kelangsungungan hidup sel, proliferasi atau fungsi sel bahkan jaringan dan organ. Evaluasi keamanan senyawa, seperti obat-obatan kosmetik, bahan tambahan makanan, pestisida dan bahan kimia industri meningkat dari tahun- ke tahun. Hal ini tentu dapat berpengaruh pada kerusakan tubuh akibat oksidasi radikal bebas, hingga dapat pula menyebabkan stress dan faktor pertumbuhan gangguan pada siklus metabolisme. Oleh karena itu kebutuhan akan uji sitotoksitas yang andal, sensitif, kuantitatif, mudah ditangani, dan cepat, mengarah pada pengembangan beberapa pengujian yang diadaptasi untuk *throughput* tinggi dalam mikrotiter yang secara rutin digunakan untuk mendeteksi efek sitotoksik sejumlah senyawa dalam sistem seluler (Tolosa L., *et al.*, 2015).

Eksperimen sitotoksitas umumnya dirancang untuk menentukan nilai IC_{10} dan LC_{50} (yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian sel 10 atau 50%)

serta konsentrasi non-toksik maksimal suatu senyawa (yaitu konsentrasi tertinggi yang kompatibel dengan kelangsungan hidup sel). Oleh karena itu, pengujian sitotoksitas *in vitro* memberikan sarana penting untuk penilaian keamanan serta untuk kualifikasi senyawa. Pilihan metode pengujian yang tepat tidak bergantung pada jumlah dan jenis sel yang digunakan tetapi juga pada hasil yang diharapkan. Misalnya pengujian viabilitas berdasarkan pengukuran uji reduktase metabolik yang terus digunakan dan memiliki kelebihan sebagai bahan pokok industri yang hemat biaya.

2.4 Viabilitas dan Proliferasi Sel

Viabilitas sel dapat dinilai dari perubahan morfologis dan perubahan permeabilitas membran atau keadaan fisiologis. Kerusakan sel oleh xenobiotic biasanya menghasilkan perubahan integritas membran sel awal yang menyebabkan perubahan permeabilitas. Pewarna vital seperti trypan blue, propidium iodide, hydroethidine, dan fluorescein dipancarkan dari bagian sel yang normal/sehat. Namun, apabila permeabilitas sel terganggu senyawa tersebut akan melintasi membran dan mewarnai komponen interaseluler.

Menurut penelitian yang dilakukan Tolosa L. *et al.*, (2015), yang dianalisis dari berbagai hasil penelitian sebelumnya, untuk mengukur viabilitas sel dapat menggunakan parameter eksperimental diantaranya Trypan blue, Hydroethidine, Fluorescein diacetat, Propidium iodide, Sulfohodamine assay, dan lainnya. Sedangkan parameter penelitian proliferasi sel dapat menggunakan H-Thymidine,

Sulfohidamine assay, Lowry assay, Clonogenic assay, Metabolic activity (MTT, XTT, dsb), 5-bromo-2'-deoxyuridine, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine, dan lainnya.

2.5 DMBA

Senyawa DMBA atau *7,12-Dimethylbenz(α)antrasena* termasuk salah satu senyawa turunan dari polisiklik hidrokarbon aromatic (PAH) merupakan polutan organik yang dilepaskan ke lingkungan dan bersifat karsinogenik (Attar, 2004). DMBA ini dikenal sebagai sitotoksik, karsinogenik, dan mutagenik, sebagai analog dari PAH dan dapat menyebabkan kanker (Ewa, *et al.*, 2017). Hidrokarbon aromatic polisiklik (PAH) adalah sekelompok senyawa organik dengan 2 atau lebih cincin aromatic yang menyatu. Senyawa PAH ini bersifat karsinogenik, mutagenik, dan sitotoksik dan telah banyak terbukti menyebabkan peningkatan risiko kanker (Ewa, *et al.*, 2017). Senyawa DMBA dapat dijadikan senyawa uji untuk perlakuan model kanker untuk upaya mencari kandidat obat yang efektif mengobati penyakit kanker. *7,12 Dimethylbenz(α)antrasena* (DMBA) adalah PAH yang ditemukan pada konsentrasi tinggi fraksi tar asap rokok, knalpon, dan dilaporkan banyak menginduksi imunitoksisitas dan telah banyak digunakan sebagai model eksperimental karsinogen untuk kanker kulit, payudara, mulut, paru-paru dan lainnya (Kwon, *et al.*, 2018). PAH bersifat lipofotik, berikatan dengan membrane lipid dan diangkut oleh lipoprotein dalam darah, masuk ke saluran pernafasan saluran pencernaan, dan mengalami 2 fase metabolisme. Fase pertama 3 jalur utama aktivasi PAH dibedakan menjadi 2 yaitu pertama pembentukan dihidrodiol epoksida, dikatalisis oleh enzim sitokrom P450 dan epoksida hidrolase (jalur

CYP), kedua pembentukan kation radikal PAH dalam proses oksidasi metabolic oleh aktivitas sitokrom P450 peroksidase dan ketiga orto-kuinon melalui oksidasi katekol oleh dihidrodiol dehidrogenase, kelompok aldo-keto reduktase (jalur AKR) (Gungerich 2008, Shimde 2006, dalam Ewa *et al.*, (2017). Siklus redoks kuinon dapat pembentukan ROS yang menyebabkan karsinogenesis melalui kerusakan oksidatif DNA (Moorthy, dkk., 2015).

DMBA karsinogenik mutagenic, polisiklik aromatic hidrokarbon (PAH) yang kuat menjadi kontributor utama akibat stress oksidatif, yang dapat menyebabkan radikal bebas seperti superoksida, radikal hidroksil (OH), dan non radikal seperti hidrogen peroksida (H₂O₂), singlet oksigen (O₂) dan nitrogen reaktif seperti peroksi nitrat (ONOO) dan nitrogen oksida (NO) yang beracun yang dihasilkan oleh oksida nitrat. Sehingga mampu menyebabkan stress oksidatif dan kerusakan sel dan mampu menggerakkan peroksida lipid yang diinduksi oleh peroksin nitrat dalam jaringan kanker. Stress oksidatif dapat deaminasi oleh metabolit DMBA oleh enzim mitokondria monoamine oksidase serta autooksidase disertai dengan pembentukan hidrogen peroksida. Disamping itu radikal hidroksil mampu menginisiasi peroksidasi lipid mengoksidasi rantai asam amino dalam protein yang dapat menyebabkan pemutusan untai ganda DNA sehingga terjadi genotoksik (Periyasamy, *et al.*, 2015).

2.6 MTT Assay dan Nilai LC₅₀

Uji sitotoksik yakni dapat menentukan nilai LC₅₀ (Lethal concentration) dimana nilai ini akan menunjukkan angka konsentrasi untuk menghambat sel hidup mencapai 50%.

Biasanya suatu senyawa yang diujikan kepada sel hidup dapat dikatakan toksik atau tidak tergantung berapa persen sel yang mati akibat terpapar oleh senyawa uji. Semakin tinggi nilai kematian (*Letahl Concentration*) atau LC_{50} maka dianggap senyawa uji memiliki tingkat toksisitas yang tinggi (Meiyanto, dkk., 1999). Senyawa atau ekstrak dinilai toksik atau berpotensi sebagai antikanker apabila $LC_{50} < 1000$ ppm (Lisdawati, 2002). Efek sitotoksik terhadap sel kanker dapat di analisis melalui MTT assay. Dalam menentukan LC_{50} dapat dilihat dari absorbansi yang terbaca oleh ELISA reader. Jika konsentrasi tersebut mampu mematikan sebesar 50% atau lebih sel hidup berdasarkan kristal formazan hasilnya adalah senyawa tersebut bersifat toksik. Sel hidup akan diketahui melalui kristal formazan akan tampak berwarna ungu. Intensitas warna ungu menunjukkan sel hidup sedangkan sel mati akan menunjukkan warna kuning dalam Suzery dan Cahyono (2014).

Menurut Lisdawati (2002), suatu ekstrak dianggap toksik terhadap sel kanker jika mempunyai nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm. Tussanti (2014) menyatakan sitotoksitas dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu sitotoksik potensial jika sitotoksitas potensial dapat digunakan sebagai antikanker sedangkan sitotoksitas moderat dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Efek sitotoksik menggunakan sel kanker dapat dievaluasi dengan metode MTT Assay. Uji MTT Assay ini untuk mengetahui potensi antikanker suatu ekstrak/senyawa yang dinyatakan dengan LC_{50} yang merupakan potensi konsentrasi larutan uji yang dapat mematikan 50% populasi sel. Untuk menentukan LC_{50} , hambatan pertumbuhan sel, sel yang hidup dan mati yakni dengan dasar pembentukan kristal formazan yang berwarna ungu. Menurut Udea, *et al.*, (2002) hambatan pertumbuhan sel terdeteksi dengan adanya absorbansi sel yang ditunjukkan dalam bentuk warna. Intensitas warna ungu proporsional dengan

jumlah sel yang hidup (membentuk formazan). Sedangkan sel yang mati akan memberikan warna kuning dalam Suzery dan Cahyono (2014). Uji MTT dianggap sebagai contoh pertama dari garam tetrazolium yang digunakan dalam pengujian berbasis reduktase viabilitas dalam *multi-well* pada sampel sel mamalia dan hal ini adalah diantara tes sitotoksitas yang mudah untuk dilakukan. Ketika menggunakan MTT, formazan yang akan terbentuk tidak larut dalam air, melainkan mengendap ke dalam sel dan harus diekstraksi dengan pelarut organik. Uji MTT dinilai mudah diaplikasikan menurut berbagai literatur. Selain itu dianggap sebagai *gold-standard* dalam pengujian.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental atau *True Experimental Design* dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 7 kelompok dan 4 ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

- a. Variabel bebas yang dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak metanol buah Amla (*Phyllanthus emblica*) untuk menguji efek uji sitotoksik terhadap kanker hepar tikus dengan berbagai konsentrasi yaitu 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml, dan 1000 µg/ml.
- b. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu tingkat konfluenitas, viabilitas kultur sel hepar, dan nilai LC₅₀
- c. Variabel terkontrol yaitu *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA dengan konsentrasi 0.1 µg/ml.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian kultur sel *in vitro* ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Hewan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Februari sampai Juli 2023.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: wadah maserasi, enlemeyer 100 ml., cawan petri, tabung endorf 2 ml, corong, bola hisap, *beaker glass*, *vacum rotary* evaporator, *Elisa Reader*, labu ukur 100ml, pipet tetes 2ml, corong, spatula, tabung reaksi 250ml, aluminium foil, kertas label, kertas saring, blender, gunting *Laminar Air Flow* (LAF) (LABTECH), neraca analitik, Mikroskop *Inverted* (Nikon TI-u), mikropipet, sentrifus, *Automatic Cell Counter* (Invitrogen Thermo Fisher), pipet ukur 25ml, *plate well* 98, Inkubator CO₂, timbangan analitik, *Tissue Culture Disk* (TCD), *blue tip* Lokal, *yellow tip* Lokal, tabung duran 100 ml, tabung sentrifus 15 ml, filter 0,2 µm, spuit 20 cc, dan beaker glass 100 ml.

3.4.2 Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini diantaranya adalah sebagai berikut: simplisia buah Amla (*Phyllanthus emblica*), metanol 99%, medium kultur DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), trypsin, penisilin, streptomisin, PBS (*Phosphate Buffer Saline*), serum FBS (*Fetal Bovine Serum*), senyawa DMBA (*7,12-Dimethylbenz(α)antrasena*), 50 mg MTT assay 5 mg/ml, NaHCO₃, DI steril, streptomycin, hepes, akuades, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10 % dalam 0,1 N HCl, HCl 0,1 M, tissue makan, aluminium foil, *trypan blue*.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1. Preparasi Ruang dan Alat

Prosedur penelitian diawali dengan preparasi ruang dan alat, dengan cara memastikan ruang dan alat steril serta memastikan semuanya siap pakai. Proses sterilisasi dengan membersihkan ruangan dan bisa menggunakan alkohol agar terbebas dari segala bentuk kontaminan. Kemudian dilakukan penyinaran UV selama 1x24 jam, kemudian dilakukan uji sterilisasi untuk memastikan ruangan aman dari kontaminan dengan menggunakan NA (*Natrium Agar*) dan PDA (*Potato Detrose Agar*) untuk mengetahui ada tidaknya bakteri dan jamur dengan cara masing-masing media dibuat 6 cawan petri dan diletakkan di berbagai sudut ruangan dan dibiarkan terbuka 15 menit, lalu ditutup kembali, diinkubasi selama 1 x24 jam dan diamati dengan mikroskop.

Sterilisasi alat dilakukan agar terhindar dari kontaminasi ketika melakukan kultur. 'alat-alat yang akan digunakan direndam dengan tipol 1x 24 jam lalu dibilas dan dikeringkan dalam oven bersuhu 50-60°C. Sterilisasi terbagi menjadi 2 macam yaitu sterilisasi kering dan basah, sterilisasi kering dikenakan pada ala-alat yang berbahan kaca dan dioven selama 3 jam pada suhu 121°C, sedangkan sterilisasi basah ini dilakukn untuk alat-alat plastik dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C rentang waktu 15 menit tekanan 1.5 atm, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, dan terakhir alat-alat tadi dimasukkan ke dalam LAF dengan memanfaatkan sinar UV selama 2 jam sebelum alat-alat tersebut digunakan.

3.5.2. Pembuatan Sampel Buah Amla (*Phyllanthus emblica*)

Penyiapan sampel buah Amla dilawali dengan mengumpulkan buah Amla sebanyak 1 kg, kemudian dicuci menggunakan air mengalir lalu dilakukan perajangan dan pengeringan dalam oven selama kurang lebih selama 3 x 24 pada suhu 55°C. Hasil perajangan yang telah kering lalu dilakukan penyerbukan/penghalusan menggunakan blender sampai menjadi serbuk yang halus secara merata. Kemudian buah amla diayak menggunakan ayakan, hingga hingga didapatkan serbuk buah amla yang akan digunakan sebagai bahan baku ekstraksi. Setelah itu ditimbang berat kering dari buah amla yang sudah diayak.

3.5.3 Metode Ekstraksi buah Amla (*Phyllanthus emblica*)

Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) dalam bentuk serbuk sebanyak 200 kg direndam dengan 1 liter metanol selama 24 jam. Hasil residu dari maserasi pertama lalu dimaserasi kembali dengan metanol sebanyak setengah dari volume pertama yaitu 500 liter selama 24 jam. Residu dari maserasi kedua diambil lalu dimaserasi kembali dengan metanol sebanyak 2,5 liter selama 24 jam, setelah proses maserat dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan, tahap selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dan corong. Hasil maserat yang didapat kemudian dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 60-70°C kemudian didiamkan sampai pelarut menguap dan dihasilkan maserat berbentuk pasta yang cukup pekat dan siap digunakan.

3.5.4 Pembuatan Media Kultur DMEM

Medium kultur DMEM merupakan media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco) yang berbentuk cair. Kemudian dimodifikasi dengan penambahan antibiotik dan *fungizone*. Ditimbang NaHCO₃ sebanyak 0.37 gram, 0.006 gram penicillin dan streptomycin 0.001 gram. Selanjutnya, dituang DMEM cair hingga volume mencapai 100 ml ke dalam erlenmeyer. Kemudian dicampur bahan antibiotik dan *fungizone* yang telah ditimbang ke dalam erlenmeyer dan dihomogenkan. Selanjutnya media stok DMEM cair disimpan dalam suhu 4° C untuk siap digunakan.

3.5.5 Persiapan Kultur Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan adalah tikus remaja yang kemudian dilakukan dislokasi lalu dicacah organ heparnya. Organ hepar tikus lalu dicuci dengan 2 ml PBS, dan 1 ml penicillin streptomycin 3 kali. Kemudian hepar dipindah ke cawan petri dan dicacah pada 500 µl tripsin hingga benar-benar halus. Tahap selanjutnya dihomogenasi dengan spuit lalu dimasukkan ke tabung sentrifus, sisa homogenasi ditambahkan 500 µl PBS (1:1) kemudian diinkubasi didalam inkubator selama 20 menit.

Tabung yang berisi pellet diambil dari inkubator dan disentrifuse kembali 2500 rpm selama 5 menit lalu dibuang supernatannya dan pellet yang dihasilkan ditambah dengan 3 ml media DMEM 10%, 0.01 mg penicillin 3 tetes *fungizone*, streptomycin lalu disentrifuse lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Dibuang kembali supernatan dan ditambahkan 3 ml DMEM 10 FBS, 3 tetes

fungizone pada pellet, lalu disentrifuse kembali setelah dilakukan 3x prosedur diatas, supernatan lalu dibuang dan pelet disisakan sebanyak 1 ml, lalu dipipeting / homgenasi. Hasil dari pellet diambil 50 µl dan dimasukkan kedalam *Multiwell* isi 24 yang telah terisi oleh DMEM, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, antibiotik dan *fungizone*, setelah itu sel dikultur pada suhu 37°C, 5% CO². Setelah sel mencapai konfluen, kemudian diberi perlakuan induksi DMBA konsentrasi 10 µg/ml lalu diinkubasi kurang lebih selama 48 jam setelah itu diberi perlakuan ekstrak buah Amla (*Phyllanthus emblica*) sesuai kelompok konsentrasi. Jumlah sel yang diisolasi sebanyak 7000 sel pada setiap *well*. Menurut Freshney (2000) jumlah sel yang ditanam dalam *multiwell* 24 adalah berkisar sekitar 2x10³ sel/ ml sampai dengan 2 x 10⁵ sel/ml. Jumlah sel tersebut setara dengan 2 x 10³ sampai dengan 2 x 10⁵ sel/ml.

3.5.6. Pembagian Kelompok

Dalam penelitian ini perlakuan masing-masing kelompok dibagi menjadi 7 kelompok yaitu sebagai berikut :

1. Kontrol (-) : Sel hepar + DMEM + FBS 10%
2. Kontrol (+) : Sel hepar + DMEM + FBS 10% + DMBA 10 µg/ml
3. Kelompok P1 : Sel hepar + DMEM + FBS 10% + DMBA 0.1 µg/ml + 200 µg/ml ekstrak metanol buah amla
4. Kelompok P2 : Sel hepar + DMEM + FBS 10% + DMBA 0.1 µg/ml + 400 µg/ml ekstrak metanol buah amla
5. Kelompok P3 : Sel hepar + DMEM + FBS 10% + DMBA 0.1 µg/ml + 600 µg/ml ekstrak metanol buah amla
6. Kelompok P4 : Sel hepar + DMEM + FBS 10% + DMBA 0.1 µg/ml + 800 µg/ml ekstrak metanol buah amla

7. Kelompok P5 : Sel hepar + DMEM + FBS 10% + DMBA 0.1 µg/ml + 1000 µg/ml ekstrak metanol buah amla

3.5.7 Perlakuan Induksi DMBA (7,12-Dimetilbenz(a)Antrasena) Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara in Vitro

Sel hepar tikus yang telah dikultur kemudian diinduksi DMBA pada medium kultur dengan konsentrasi 10 µg/ml sebanyak 100 µl dan dibiarkan selama 48 jam. Setelah sel mengalami konfluen minimal 50% sel kemudian dicuci dengan DMEM, sebanyak 1 ml non serum, 3 tetes penicillin streptomycin sebanyak 0.01 mg kemudian media DMEM ditambahkan FBS 10% sebanyak 300 µl dan diberi perlakuan ekstrak buah Amla (*Phyllanthus emblica*) sesuai kelompok dosis konsentrasi (perlakuan P1, P2, P3, P4, dan P5) sebanyak 100 µg/ml. Kelompok perlakuan K(-) tidak diinduksi DMBA sedangkan K(+) diinduksi DMBA 0.1 µg/ml tanpa perlakuan ekstrak buah Amla (*Phyllanthus emblica*) dan seluruh kelompok diamati setelah 1x24 jam, hari ke-2, dan hari ke-4.

3.5.8 Pemberian Konsentrasi Ekstrak Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) secara in Vitro

Penelitian pengaruh ekstrak methanol buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar senyawa DMBA dalam kondisi in vitro yakni menggunakan 5 konsentrasi ekstrak buah amla dengan dosis yang berbeda-beda yakni terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan dosis ekstrak masing-masing kelompok yaitu P1 = 200 µg/ml, P2= 400 µg/ml , P3 = 600 µg/ml, P4 = 800 µg/ml, dan P5 = 1000 µg/ml. Semua konsentrasi diberikan pada hari ke-2 setelah isolasi sel atau 2x 24 jam setelah dilakukan *washing*. Sebanyak

100 µl pada masing-masing TCD (*Tissue Culture Disk*) ekstrak buah amla setiap kelompok kecuali K(-) dan K(+) tanpa pemberian ekstrak.

3.5.9 Pengamatan dan Perhitungan Sel Hepar

3.5.10 Pengamatan Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*)

Sel yang telah dikultur setelah mengalami konfluen diamati menggunakan mikroskop *inverted* yang tersedia di Laboratorium Kultur Jaringan. Hal ini untuk mengetahui pengaruh berbagai perlakuan yang berbeda terhadap parameter konfluenitas sel. Konfluenitas sel didasarkan pada tingkat perkembangan dan kepadatan sel yang ditunjukkan oleh banyaknya sel yang menempel memenuhi *Multiwell*. Jika sel mencapai konfluen 60-80%, lalu dilakukan pasase dengan cara membuang media lalu dilakukan *washing* yaitu dengan mengganti media DMEM 1 ml non serum, 3 tetes *fungizone*, dan 1 tetes penicillin streptomycin, kemudian diberi tripsin EDTA 0.25% sebanyak 200 µl. Setelah itu diinkubasi suhu 37°C dengan 5% CO₂ selama 2 x 24 jam. Medium kultur kemudian diganti dan ditambahkan FBS 10% dan diberi perlakuan ekstrak buah amla sesuai kadar dosis masing-masing kelompok. Indikator untuk pengamatan konfluen sel adalah 100% apabila sel sudah menutupi semua wadah sumuran dalam *Multiwell* 75% apabila menutupi sepertiga, 25% apabila sel menutupi seperempat tiap sumuran dan 0% apabila belum menutupi tiap sumuran dalam *Multiwell* (Tregono, 2009).

3.7.2 Uji Viabilitas Sel Hepar Tikus

Uji viabilitas sel dilakukan dengan metode perhitungan langsung menggunakan *Countes cell*. Sel hasil kultur disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit kemudian dibuang supernatan dan pelet dicuci dengan PBS 2 ml kemudian dipipeting, prosedur ini diulangi 2 kali. Pelet kemudian ditambahkan tripsin 500 µl pada sel hepar tikus dengan perbandingan 1 : 1. Setelah itu dimasukkan pada *tissue culture dish* dan diinkubasi selama 15 menit kemudian ditambahkan PBS 1 ml untuk menghilangkan tripsin, dan disentrifus kembali 2500 rpm selama 5 menit. Langkah berikutnya supernatan dibuang, kemudian ditambah PBS sampai volume tabung mencapai 2 ml, dan disentrifus kembali. Pelet disisakan 1 ml lalu dipipeting dan diamati dibawah mikroskop dengan *tripan blue* 0.4%, hal ini untuk memudahkan identifikasi oleh mikroskop. Langkah-langkah pengamatan viabilitas sel disesuaikan dengan cara kerja *Countess™ II FL automated cell counter User Guide* (2019). *Trypan blue* sebanyak 10 µl 0,4% ditambahkan pada 10 µl suspensi sel, kemudian dicampurkan dengan suspensi sel. Setelah itu diambil sebanyak 10 µl dimasukkan kedalam slide *chamber*, kemudian didiamkan 30 detik lalu dimasukkan pada *port slide instrument*. Instrumen akan secara otomatis membaca hasil dengan mengatur fokus dan intensitas cahaya, sehingga di akhir akan menunjukkan konsentrasi sel dan persentase sel hidup dan sel mati. Viabilitas sel adalah persentase perbandingan jumlah sel yang hidup (*viable*), ditunjukkan dengan kontur hijau dan sel yang mati (*non viable*), ditunjukkan dengan kontur merah (Kalanjati, 2006).

3.5.12 Uji Sitotoksisitas Sel Kanker Hepar Tikus dengan Metode MTT Assay

Sel hasil kultur diambil dari inkubator dan dilakukan pemanenan. Jumlah sel dihitung dan diencerkan dengan membuat media kultur sesuai kebutuhan, lalu dimasukkan kembali ke dalam sumuran sebanyak 100 μ l, dan diamati dibawah mikroskop *inverted* untuk mengamati distribusinya, setelah itu diinkubasi kembali sekitar 12 jam agar sel merata pulih kembali setelah pemanenan. Kultur sel kemudian dipanen dengan tripsin EDTA dan didistribusikan ke dalam *Multiwell* berisi sumuran dengan jumlah sel tiap sumuran 2×10^3 sel dalam 100 μ l kemudian diinkubasi selama 4 jam agar sel beradaptasi dan menempel pada sumuran. Setelah itu, media dalam *multiwell* dibuang dan dicuci dengan PBS 100 μ l lalu ditambahkan 100 μ l media yang mengandung larutan uji dengan kadar tertentu dan diinkubasi selama 24 jam (Hanifah, 2021).

Sebagai kontrol, digunakan sel kanker hepar dan kontrol media, setelah diinkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dan dicuci lagi dengan 100 μ l PBS, kemudian ditambahkan 100 μ l media kultur yang mengandung MTT 0.5 mg/ml kemudian diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37°C, kelembapan 98%, kadar CO₂ 5%. Sel ditanam di media kultur terdiri dari penisilin-strptomycin sebagai fungizone dan antibiotik untuk mencegah dari kontaminasi bakteri, FBS mengandung hormon yang dapat memacu pertumbuhan sel hepar, serta transportasi protein, mineral & lemak, *fungizone* sebagai anti jamur untuk mencegah dari pertumbuhan jamur yang ikut tumbuh dalam media. DMSO digunakan sebagai pelarut sedangkan medium DMEM sebagai sumber nutrisi yang dibutuhkan sel hidup untuk pertumbuhan yaitu asam amino, vitamin, garam-organik, serta glukosa

sehingga sel hepar dapat tumbuh dengan baik. Reagen MTT disiapkan untuk perlakuan 0,5 mg/ml. Pengamatan menggunakan ELISA *reader* menggunakan panjang gelombang *visible* 595-600 nm. Hasil analisis ELISA *reader* kemudian dikonversi kedalam persentase sel hidup. Standar toksisitas suatu ekstrak dinyatakan sangat toksik ketika $LC_{50} < 200 \mu\text{l/ml}$ (Hanifah, 2021).

3.5.13 Analisis Data

Analisis untuk hasil konfluenitas menggunakan *software ImageJ* kemudian didapatkan nilai persen area (konfluenitas), sedangkan untuk analisis hasil persentase viabilitas yang didapat menggunakan alat *Countess (Automatic Councer Cell)* kemudian nilai persentase tersebut diolah dengan SPSS untuk uji homogenitas, normalitas, uji ANOVA dan uji lajut BNT 5%. Persentase kehidupan sel dihitung dari hasil absorbansi metode MTT *Assay* yang terhitung otomatis melalui ELISA *reader* dengan rumus sebagai berikut :

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

Hasil Persentase sel hidup lalu dikonversi dan mengacu pada kurva standar dengan persamaan $Y=Bx+A$, dimana Y adalah probit persen kematian sel sebanyak 50% dan X ialah log kadar konsentrasi ekstrak. Menurut Meyer *et al.*, (1982) senyawa ekstrak memiliki efek toksik apabila nilai $LC_{50} < 100 \text{ ppm}$, sedangkan untuk senyawa murni apabila nilai $LC_{50} < 200 \text{ ppm}$ semakin potensial sebagai antikanker.

BAB IV

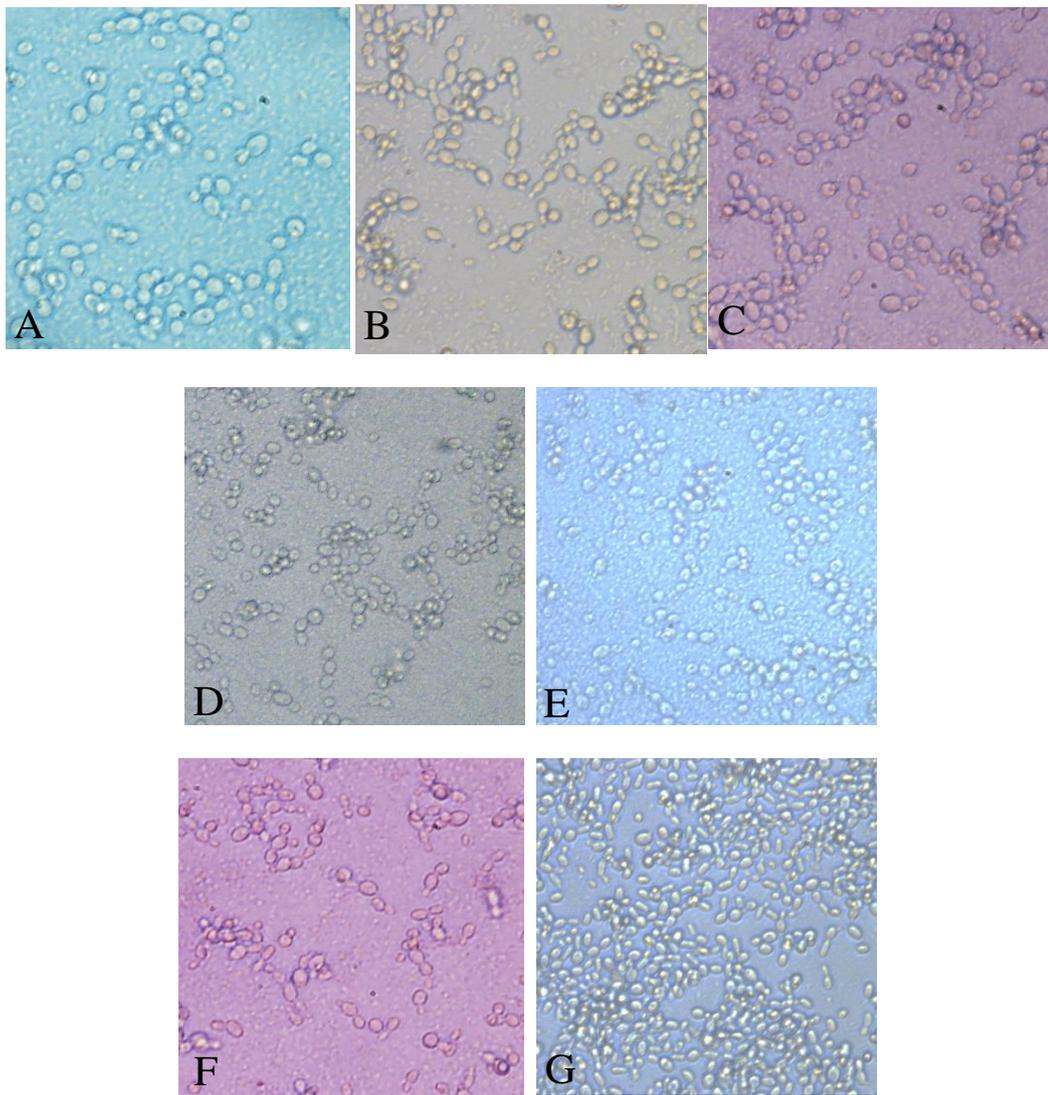
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz(a)antrasena (DMBA) secara *In Vitro*

Konfluenitas merupakan tumbuh meratanya sel hingga menutupi cawan kultur sebagai tempat melekatnya sel. Menurut Sadiyah (2019) apabila sel telah mencapai konfluen, maka sel dalam media kultur telah memakan substrat dan sel saling berhubungan antara satu dengan yang lain. Konfluenitas menjadi salah satu parameter yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan dan proliferasi sel. Penelitian ini menggunakan kultur sel primer yaitu sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang masih berumur 2-3 hari. Sel hepar tikus diisolasi selama 2 x 24 jam dalam media DMEM dan penambahan serum FBS 10% sebagai nutrisi sel kemudian diberi perlakuan DMBA 0.1 µg/ml pada masing-masing perlakuan (P1-P5) kecuali kontrol negatif (normal). Metode ini sejalan dengan beberapa penelitian yang pernah dilakukan oleh Kurlila (2013) dan Hanifah (2021).

Isolasi sel secara *in vitro* ini membutuhkan sterilitas yang tinggi untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi. Sebelum sel diisolasi, penambahan antibiotik dan *fungizone* pada media DMEM yaitu penicillin dan streptomisin sangat penting digunakan untuk melindungi sel dari bakteri, jamur atau kontaminan lain. Selain itu sterilisasi ruang, alat dan bahan akan sangat membantu dalam menghindari kontaminan yakni dengan cara sterilisasi kering dengan suhu oven 121° C. Konfluenitas sel sebanding dengan tingkat proliferasi sel hepar, semakin tinggi proliferasi sel maka akan semakin tinggi konfluenitasnya ditunjukkan oleh *area fraction* yang terdeteksi oleh software *ImageJ*. Sel hepar tikus yang diinduksi

DMBA diamati setelah 2 x 24 jam menunjukkan nilai rata-rata konfluenitas masing-masing perlakuan setelah hari ke-4 (gambar 4.1). Hasil penelitian tiap gambar mewakili rata-rata tiap perlakuan dengan tingkat proliferasi sel yang tidak jauh berbeda. Proliferasi sel dapat dipengaruhi faktor genetik, dan lingkungan serta nutrisi yang mendukung pembelahan sel selama waktu isolasi. Hasil penelitian konfluenitas sel hepar tikus yang dipapar DMBA dapat diamati pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Hasil Konfluenitas Sel Hepar Tikus yang Diinduksi DMBA setelah hari ke-4, perbesaran 400 kali, menggunakan mikroskop *inverted* ; (A) P1 (200 $\mu\text{g/ml}$); (B) P2 (400 $\mu\text{g/ml}$); (C) (600 $\mu\text{g/ml}$); (D) P4 ((800 $\mu\text{g/ml}$); (E) P5 ((1000 $\mu\text{g/ml}$); (F) K(+); (G) K-

Proses pengamatan dilakukan dengan perbesaran kuat 400x menggunakan mikroskop *inverted*. Perbesaran kuat dengan fokus yang tinggi akan menghasilkan gambar yang jelas dan mudah untuk dianalisis secara kuantitatif. Tahapan awal sebelum hasil gambar di-*capture*, isolasi sel harus dipastikan bahwa tidak mengalami kontaminasi. Kontaminasi rawan terjadi pada penelitian *in vitro* karena media yang digunakan mengandung nutrisi yang juga dibutuhkan mikroorganisme lain. Kultur sel dikatakan tidak terkontaminasi ketika media bersih, jernih dan terlihat bening, sel tampak jelas dan tidak ada mikroorganisme lain seperti jamur, bakteri dan lainnya pada media kultur.

Secara morfologi seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.1 bentuk sel hepar pada monolayer berbentuk poligonal nampak jelas sitoplasma dan membran selnya. Sel diamati pada hari ke-4 setelah dilakukan *washing* yakni untuk membersihkan media dari sisa metabolisme sel sehingga akan memperjelas hasil pengamatan. Pada perlakuan P1, P2, P3, P4, P5, dan K(+) dapat dikatakan hampir sama tingkat konfluenitas selnya baik secara gambar pengamatan dan sesuai dengan analisis kuantitatif menggunakan *ImageJ*. Namun berbeda dengan kontrol (-) yakni perlakuan normal tanpa DMBA dan tanpa ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) cenderung lebih tinggi konfluenitasnya daripada perlakuan lain. Hal ini menunjukkan sel normal tumbuh dan berkembang mengalami konfluenitas yang lebih tinggi dari perlakuan lainnya. Perlakuan kontrol positif cenderung lebih rendah konfluenitasnya dilihat dari hasil pengamatan mikroskop. Secara hasil, diduga DMBA dapat mengurangi kemampuan proliferasi sel lebih rendah karena senyawa ini bersifat toksik terhadap sel hepar. Senyawa DMBA yang diinduksikan bertindak sebagai karsinogen yang mempengaruhi tingkat konfluenitas sel hepar

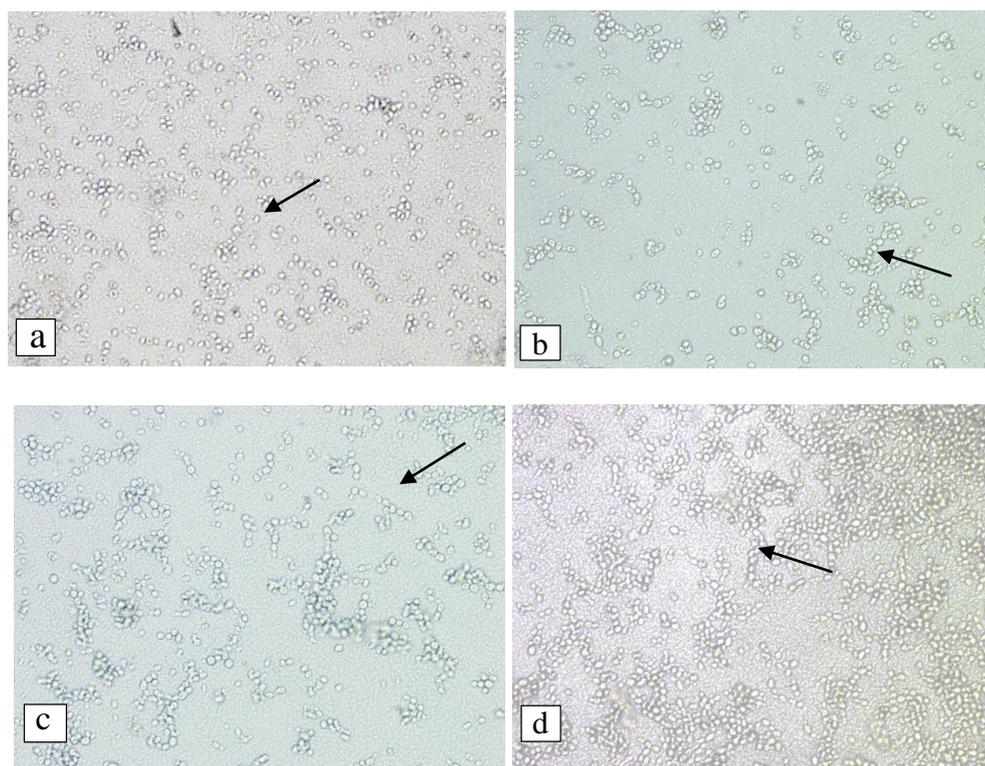
kontrol positif menjadi lebih rendah dari perlakuan kontrol negatif. Menurut Hanifah (2021) penyebab senyawa DMBA tidak mampu memicu sel kanker dari tingkat proliferasinya karena diduga metabolit reaktif DMBA pada perlakuan kontrol positif terjadi proses detoksifikasi oleh enzim dan tidak adanya *diol epoxide* yang lolos detoksifikasi maka hal ini DMBA tidak berkaitan dengan adenin DNA. Sehingga dari penelitian ini diduga DMBA memicu kerusakan membran sel yang mampu menghambat kemampuan sel untuk bertumbuh, akibatnya konfluenitas sel menjadi rendah. Senyawa DMBA banyak digunakan untuk uji hewan coba untuk penelitian terkait organ dalam salah satunya organ hati (hepar). DMBA termasuk senyawa kimia PAH (polisiklik aromatik karbon) pemicu kanker dan menyebabkan karsinogenik, karena kemampuannya mengikat DNA sehingga mengakibatkan efek timbulnya sel abnormal (tumor/kanker) (Ifegwu *et al.*, 2015) dan penelitian *in vivo* terkait DMBA ini jauh lebih berhasil menyebabkan organ target mengalami kanker atau kerusakan organ secara signifikan

Penelitian *in vitro* telah lama diketahui demikian pula mengenai sel hepar juga pernah dilakukan oleh Iype (1971) pernah menyebutkan bentuk sel hepar monolayer adalah poligonal, granular dan mengandung sejumlah mitokondria. Dimana laju respirasi endogen sel cukup tinggi mensintesis glukosa dari asam laktat. Meskipun nilai konfluenitas kontrol positif tidak jauh berbeda dengan rata-rata konfluenitas perlakuan yang lain, namun secara morfologi pada perlakuan K(+) berbeda daripada perlakuan lainnya meskipun dugaan awal perlakuan DMBA yang memiliki konfluenitas lebih tinggi tetapi hasil menunjukkan sebaliknya. Pemberian senyawa DMBA dalam penelitian *in vivo* telah banyak membuktikan bahwa mampu merusak DNA sel dan pemicu kanker, Sel-sel yang diisolasi dapat

mengacu pada berbagai jenis sel yang ada di hepar, seperti perbedaan bentuk terjadinya sel binukleat dan poliploid menunjukkan dugaan adanya perenkim dan kolagen meski secara biokimia perlu ditelusuri lebih lanjut. Berbeda dengan sel secara *in vivo* yang dikendalikan oleh pengaruh hormonal, *in vitro* hanya mengandalkan asupan nutrisi dari luar sel (eksternal). Sehingga ketika terjadi perbedaan morfologi maupun fisiologinya akan cukup mempengaruhi proliferasi dan metabolisme sel, hal inilah belum banyak dibuktikan pada penelitian *in vitro*.

Pemberian induksi DMBA terbukti cukup mempengaruhi proliferasi sel hepar setelah 2 x 24 jam yang kemudian diberi ekstrak pada hari ke-3 dan ke-4. Hal ini menunjukkan bahwa efek karsinogen senyawa DMBA mampu mempengaruhi kondisi pertumbuhan sel berbeda dari sel normal (kontrol negatif), meskipun secara teori sel normal akan berproliferasi lebih cepat jika diinduksi senyawa karsinogen. Menurut Kwon *et al.*, (2018) DMBA secara nyata mampu meningkatkan proliferasi sel kanker dan invasi melalui promosi faktor penginduksi epitel mesenkimal dan β -catenin. Mekanisme molekuler DMBA bertindak sebagai ligan untuk reseptor hidrokarbon dan mengaktifkan pensinyalan untuk berikatan dengan xenobiotik. Hidrokarbon yang teraktivasi oleh DMBA menginduksi ekspresi enzim sitokrom P450 (CYPs) seperti CYP1A1, CYP1A2, dan CYP1B1 sehingga akan memetabolisme DMBA untuk menjadi radikal bebas seperti hydrogen peroksida, superoksida, dan nitrogen oksida yang dapat menghasilkan adisi DNA mutagenik melalui pengikatan kovalen pada gugus asam amino eksosiklik purin atau induksi oksidatif yang selanjutnya akan menginduksi karsinogenesis (Shou *et al.*, 1996; Nebert, *et al.*, 2004; Wakui *et al.*, 2006). DNA mutagenik tidak terjadi pada perlakuan kontrol positif dimana sel telah diinduksi DMBA, namun indikator lain

bahwa sel hepar mengalami kanker dilihat dari analisis fase pembelahan sel, ataupun morfologi sel. Hal ini masi perlu ditelusuri lebih lanjut namun pada umumnya sel yang ditanam dalam media cenderung sensitive terhadap senyawa yang bersifat toksik, termasuk DMBA sebagai agen karsinogen. Pertumbuhan sel hepar dari hari ke-0, hingga hari ke-4 menunjukkan pertumbuhan yang dapat dilihat pada gambar 4.2. Gambar tersebut mewakili rata-rata setiap kelompok perlakuan dengan pertumbuhan sel hepar yang berbeda diamati menggunakan mikroskop *inverted* perbesaran 200 kali. Hal ini menjadi data awal untuk mengetahui apakah sel hepar mampu tumbuh dengan baik dari hari ke hari, yang kemudian dapat dilanjutkan dengan perlakuan sesuai konsentrasi ekstrak.



Gambar 4.2 Pertumbuhan Sel hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA dengan perbesaran 200 kali menggunakan mikroskop *inverted* (a) Hari-ke-0; (b) Hari ke-1; (c) Hari ke-2; (d) Hari ke-4

Dalam penelitian ini, hasil *capture* menggunakan mikroskop *inverted* menunjukkan konfluenitas kultur sel hepar tikus yang kemudian dianalisis menggunakan *software ImageJ* lalu didapatkan nilai luas penutupan (area) yang mewakili konfluenitas. Konfluenitas sel ditandai dengan proliferasi sel yang semakin banyak dan melekatnya sel pada substrat. Berdasarkan hasil pengamatan gambar 4.2. pertumbuhan sel hepar pada hari ke-0 dan hari ke-1 sel masih berbentuk *single cell*, sel belum melekat pada substrat setelah penanaman sel. Fase pertumbuhan sel dalam tahapan *lag phase* (fase adaptasi) hal ini terlihat ketika sel masih belum turun ke permukaan cawan dan masih terlihat melayang-layang pada cairan media. Sel dalam hal ini masih mencari tempat melekatnya, beradaptasi dengan lingkungannya, sehingga perlu merekonstruksi lingkungan mikro yang menyerupai kondisi sel hepar seperti *in vivo*. Sel hepar mulai turun ke permukaan, melekat dan berkembang pada hari ke-3 dan ke-4, fase ini sel berada pada *attachment site* atau saling melekat antar sel satu dengan yang lain. Hal ini ditunjukkan dengan adanya sel yang menempel tersusun memanjang atau membentuk agregat. Secara morfologi, sel hepar berbentuk bulat Proliferasi sel yang terus menerus akan memicu sel mengalami konfluen dan ekspansi setelah menemukan substrat yang cocok untuk berkembang. Tahap ini disebut tahap *log phase* (fase eksponensial). Dalam tahap ini ekspansi dan pembelahan sel terus terjadi sehingga perlahan menutupi cawan kultur. Menurut Budiono (2002) konfluen sel adalah permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah terpakai dan sel saling berhubungan dengan sekitarnya. Kultur sel primer rata-rata membelah secara cepat selama 48 jam dan akan konfluen dalam 72 jam setelah diinkubasi sehingga dalam

hal ini konfluenitas sel dianalisis setelah hari ke-4 setelah sel hepar diberi perlakuan ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*).

Setelah sel berumur 2 x 24 jam sel hepar yang dikultur dilakukan *washing* yakni mengganti medium kultur dan pemberian nutrisi yang cukup. Hal ini untuk mencegah sel dari sisa metabolit yang dapat menyebabkan kontaminasi dan kematian sel. Inkubasi selama 2 x 24 untuk mengetahui apakah ada pengaruh DMBA terhadap kultur sel hepar tikus. Menurut Sidhu *et al.*, (2004) lingkungan matriks ekstraseluler, adanya hormon glukokortikoid dalam medium yang dibutuhkan sel hepatosit untuk merespon bahan kimia pada tingkat ekspresi gen dan protein. Sehingga dalam metode *in vitro* ini diperlukan nutrisi yang cukup untuk mendukung pertumbuhan sel hepar. Salah satu media yang digunakan yaitu DMEM dan serum sebagai nutrisi bagi sel. Menurut Williams *et al.*, (1977) dalam Tuschl (2006) serum dapat meningkatkan kemampuan pelekatan permukaan hepatosit. Sel hepar berbentuk poligonal dan pelekatan sel-sel yang luas, dan lebih merata. Sitoplasma sel dan membran sel juga terlihat jelas seperti pada gambar 4.1 (c) menunjukkan bahwa pemberian serum cukup membantu dalam metabolisme dan pertumbuhan sel. Dalam penelitian Tuschl (2006) dinyatakan bahwa kultur monolayer selama 24 jam mengalami pelekatan dan peningkatan jumlah.

Analisis morfologi sel primer menurut Ladke *et al.*, (2023) perubahan morfologi sel dapat diamati pada skala waktu hari ke-1, hari ke-8, hari ke-15, dan hari ke-21. Jenis morfologi sel primer pada umumnya bermacam-macam diantaranya sel epitel, sel polygonal, sel stroma berupa sel gelendong atau sel bintang. Sel primer pada hari ke-1, 2, 3 masih belum terlihat perubahannya namun

berbentuk bulat, sedangkan hari ke-5, dan 6 akan pertama kali berbentuk gelendong untuk sel stroma dan berbentuk poligonal untuk sel epitel (Ladke *et al.*, (2023). Selain itu, adanya perubahan lingkungan tumbuh yang awalnya *in vivo* menjadi *in vitro* menyebabkan sel harus beradaptasi, sehingga proliferasi sel lebih lambat (Smadja *et al.* 2007). Hal ini yang dapat mempengaruhi proliferasi sel dimana lingkungan dan nutrisi yang cukup akan membantu sel terus berkembang. Penelitian sel hepar *baby* tikus dibatasi hingga hari ke-4 sehingga sel masih belum membentuk gelendong, namun sel sudah membentuk agregat yang ditandai dengan melekatnya sel dengan sel lainnya.

Berdasarkan hasil analisis penelitian, rata-rata konfluenitas paling tinggi adalah pada perlakuan Kontrol (-) dengan rata-rata konfluenitasnya adalah sebesar 37.79, hal ini mengindikasikan bahwa DMBA tidak mempengaruhi sel untuk berproliferasi lebih cepat sebagai salah satu indikasi sel telah mengalami kanker. Sebagai senyawa karsinogen DMBA seharusnya dapat memacu proliferasi sel hepar tikus namun diduga mengalami kerusakan DNA ataupun membran sel sehingga sel mengalami kemampuan proliferasi yang rendah, meskipun perlu ditinjau kembali berapa konsentrasi DMBA yang dibutuhkan untuk tujuan memicu proliferasi sel secara *in vitro*. Hansen (1994) mengatakan pelekatan sel pada permukaan substrat yaitu pada fase *attachment site* yakni dipengaruhi karena interaksi molekuler dan adhesi sel hal ini melibatkan bentuk interaksi antar sel, sel dengan ekstraseluler matrix (ECM) ataupun dengan faktor pertumbuhan sel lainnya. Pertumbuhan sel berkaitan erat dengan molekul ekstraseluler berasal dari mediator terlarut dan matriks. Hal ini juga tidak dapat dipungkiri faktor pertumbuhan sel mempengaruhi tingkat konfluenitas sel hepar selama inkubasi.

Nilai ringkasan ANOVA sebesar 3.296 yakni F hitung lebih besar dari nilai F tabel 5% ($\alpha=0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh nyata ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap sel hepar yang diinduksi DMBA dalam kondisi in vitro. Data tersebut diuji homogenitasnya dengan uji homogenitas *levene*. Setelah diuji data berdistribusi normal dan homogen ($\alpha > 0.05$). Pengaruh ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap konfluenitas kultur primer sel hepar *baby* tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12- dimetilbenz(α)antrassen dilihat dari perbedaan perlakuan antar kelompok dengan analisis *One Way* ANOVA taraf signifikan 5%. Pengaruh ekstrak metanol buah amla diketahui melalui nilai ringkasan *One Way* ANOVA dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Ringkasan ANOVA Pengaruh ekstrak metanol buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara in vitro.

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftabel 5%
Perlakuan	6	2698.127	449.6878	3.296717**	2.572712
Galat	21	2864.499	136.4047		
Total	27	5562.626			

Berdasarkan tabel 4.1 Ringkasan *One Way* ANOVA diketahui bahwa nilai F hitung $>$ F tabel pada level nyata (α) = 5% (dengan tanda**). Hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh nyata ekstrak buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA, dengan kata lain bahwa H_1 diterima pada level nyata (α) = 5% sementara H_0 ditolak. Nilai koefisien konfluenitas yang didapatkan sebesar 6% menunjukkan bahwa tingkat keragaman kurang dari 10%, hal ini menunjukkan bahwa nilai koefisien keragaman yang semakin kecil berarti bahwa derajat kejituan/keandalan (*accuracy/precision*) akan semakin tinggi sehingga validitas. Untuk mengetahui

ada tidaknya perbedaan pada tiap perlakuan serta dosis yang efektif dari setiap perlakuan, maka dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Berdasarkan hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% yang sudah dikonfirmasi dengan nilai rata-rata konfluenitas sel, maka didapatkan notasi BNT seperti yang terdapat pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil Uji BNT 5% Pengaruh Ekstrak Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara In Vitro

Perlakuan	Rata-rata \pm SD	Notasi BNT 5%
P3	22.74 \pm 1.82	a
K(+)	24.27 \pm 3.17	a
P2	25.76 \pm 1.81	a
P5	27.47 \pm 4.03	a
P1	27.98 \pm 3.50	a
P4	29.15 \pm 3.33	a
K(-)	37.79 \pm 5.83	b

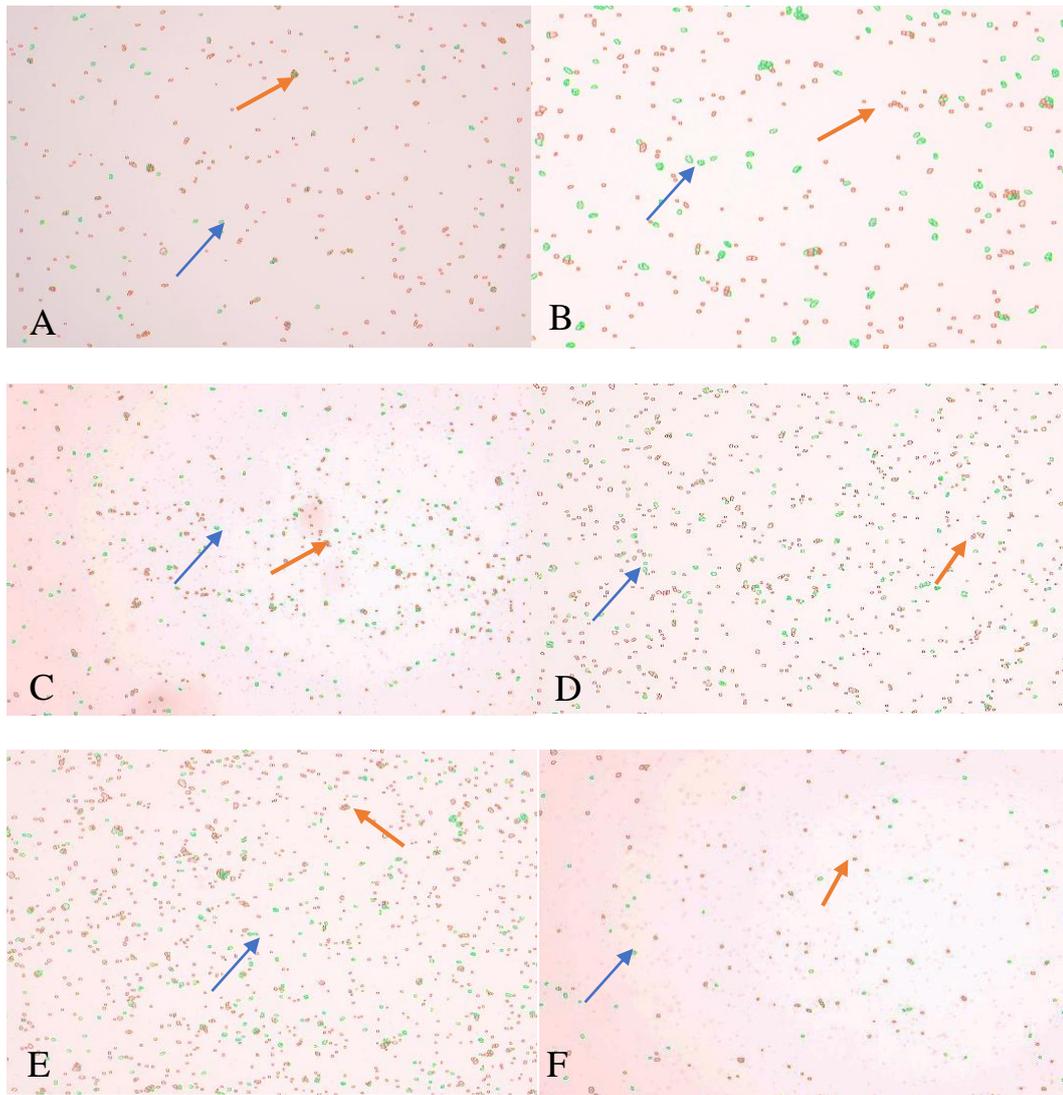
Berdasarkan hasil uji lanjut menggunakan BNT 5%, perlakuan P3, P2, P5, dan Kontrol (-) tidak berbeda signifikan yang ditunjukkan oleh notasi 'a' hasil uji lanjut BNT 5% . P1 dan P4 tidak berbeda signifikan dengan semua perlakuan, dan Kontrol (-) berbeda signifikan dengan semua perlakuan. Rata-rata nilai konfluenitas tertinggi antara perlakuan P1-P5 terdapat pada P4 dengan dosis ekstrak 800 μ g/ml diinduksi setelah pemberian DMBA 2 x 24 jam. Konfluenitas diamati pada dari ke-1 setelah isolasi sel hepar menunjukkan bahwa konfluenitas tertinggi yaitu perlakuan kontrol positif. Menurut Kim, *et al.*, (2003) dan Arora, *et al.*, (2003) buah amla memiliki kandungan yang kaya akan quercetin, asam galat, tanin, flavonoid, pectin, dan vitamin C juga berbagai senyawa polifenol. Berbagai komponen fitokimia termasuk terpenoid, alkaloid, flavonoid, dan tanin telah diteliti sejak lama

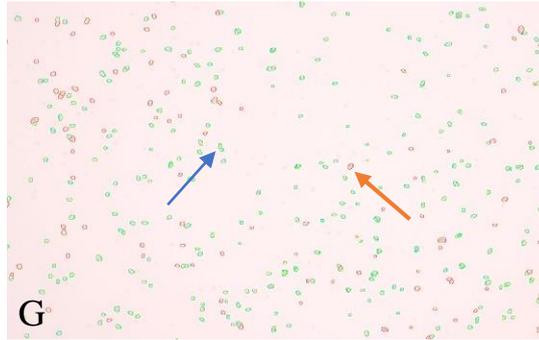
dan terbukti secara biologis. Fitokimia tanaman amla (*P. emblica*) termasuk tanin terhidrolisis (Emblicanin A, Emblicanin B) (Ghosal, *et al.*, 1996), alkaloid (Phyllantidin, phyllantine) (Khanna *et al.*, 1975), asam galat, asam ellagic, asam chebilinic, quercetin, asam chebulagic, corilagin, isostrictinin (Zany, 2003). Sarwat, *et al.*, (2008) juga menyatakan *P. emblica* memiliki potensi dalam memperbaiki respon yang diinduksi karsinogen pada tikus. Kandungan vitamin C buah amla berperan sebagai antioksidan yang berkali-kali lipat lebih baik daripada lemon atau jeruk (Kulkarni & Ghurghure, 2018).

4.2 Pengaruh Ekstrak Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) Terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

Viabilitas sel merupakan kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang, semakin banyaknya jumlah sel hidup dibandingkan dengan sel mati dapat menunjukkan kemampuan pertumbuhan dan perkembangan sel yang tinggi (Takeuchi, 2014). Metode pengamatan viabilitas mengadopsi metode yang sudah pernah dilakukan oleh penelitian sebelumnya, yakni yang paling umum yaitu metode pewarnaan *trypan blue*. Isolasi sel pada hari ke-4 kemudian dibuang medianya, dan dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) kemudian dilakukan *trypsinization* (penambahan tripsin) agar sel terpisah satu sama lain atau membentuk *single cell*. Larutan PBS akan menghilangkan serum yang terkandung di dalam medium. Serum harus dihilangkan karena *trypan blue* dengan serum. Setelah sel dicuci dengan PBS, ditambahkan tripsin untuk melepas sel dari permukaan *well* dan lebih mudah melakukan perhitungan karena sel akan terpisah-pisah. Tripsin memiliki aktivitas proteolitik yang dapat menyebabkan kerusakan protein pada membran sel. Inkubasi suspensi tripsinisasi dilakukan selama 3-5

menit. Waktu inkubasi yang terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan membran sel akibat degradasi membran protein oleh tripsin (Hsiang dkk , 2010). Hasil pengamatan menggunakan *Countess* dapat dilihat secara kuantitatif, tidak spesifik seperti mikroskop, seperti pada gambar 4.3.





Gambar 4.3 Pewarnaan *Trypan blue* dan Analisis Viabilitas sel Hepar Tikus Menggunakan Alat *Countess (Automated Cell Counter)*. A) P1 sel hidup 25%; B) sel hidup 37%; C) P3 sel hidup 36%; D) P4 sel hidup 27%; E) P5 sel hidup 30%; F) K(+) sel hidup 43%, G) K(-) sel hidup 70% (Keterangan: panah biru menunjukkan sel hidup dan panah merah menunjukkan sel mati).

Sel yang telah diwarnai dengan *trypan blue* sesuai dengan prosedur menurut Louis dan Siegel (2011), sebanyak 10 μ l suspensi dimasukkan kedalam *Countess chamber slide* untuk diamati menggunakan *Countess (Automated Cell Counter)*. Analisis viabilitas sel hepar dilakukan setelah sel berumur 4 hari setelah isolasi. Rata-rata konsentrasi yang dihitung yakni sebanyak 5.2×10^6 /ml total konsentrasi yang dihitung menggunakan *Countess (Automated Cell Counter)*. Prinsip kerja alat ini yakni menggunakan algoritma analisis gambar dengan mesin canggih untuk memberikan jumlah sel yang akurat dan pengukuran viabilitas dalam kurang dari 30 detik. Kelebihan alat ini diantaranya memiliki pencahayaan otomatis, fokus, menangkap, menghitung, dan menyimpan hasil analisisnya. Dalam jumlah Brightfield ini, 0,4% noda biru trypan digunakan untuk membedakan viabilitas, dengan sel-sel hidup yang tersisa dan sel-sel mati pewarnaan gelap. Kontur merah (lingkaran) menunjukkan sel yang dihitung mati, sedangkan kontur hijau menunjukkan sel dihitung sebagai hidup (Thermofisher, 2023). Data yang diperoleh berupa nilai persentase sel yang masih hidup serta konsentrasinya yang

tersimpan dalam *flashdisk*. Persentase viabilitas kemudian dilakukan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov yang kemudian diuji normalitas dengan SPSS.

Konsep pewarnaan *trypan blue* adalah salah satu pewarnaan yang paling umum digunakan. Prinsip pewarnaan *trypan blue* digunakan untuk menggunakan jumlah sel yang *viable* yang ada dalam sebuah suspensi. Hal ini didasarkan pada prinsip bahwa sel hidup memiliki membran sel yang tidak mengandung pewarna tertentu seperti *trypan blue*, *eosin*, atau propidium, sedangkan sel mati tidak. Suspensi sel dicampur dengan pewarna lalu diamati secara visual untuk menentukan apakah sel menyerap atau tidak menyerap pewarna. Sel yang hidup (*viable*) akan memiliki sitoplasma yang jelas sedangkan sel yang mati akan terwarnai oleh *trypan blue* sehingga berwarna gelap. Sel mati memiliki membran plasma yang pecah akan terwarnai oleh *trypan blue* dan dikategorikan sebagai nekrotik yang mati (Kerschbaum, *et al.*, 2021). Konsep pewarnaan *trypan blue* sudah sejak lama digunakan namun yang baru-baru ini dan belum banyak digunakan adalah perhitungan sel otomatis menggunakan alat canggih bernama *Countess (Automated cell counter)*. Alat ini mengadopsi pencahayaan menyerupai mikroskop namun pada dasarnya tidak dapat digunakan untuk mengamati struktur sel lebih detail seperti mikroskop. *Countess (automatic counter cell)* secara otomatis menghitung sel yang terwarnai maupun yang tidak terwarnai.

Berdasarkan tabel ringkasan ANOVA didapatkan nilai F hitung $>$ F tabel, yaitu dapat dilihat pada tabel 4.3, F hitung sebesar 2.71 lebih besar dari pada F tabel 5% yaitu sebesar 2.57 menunjukkan ada pengaruh nyata ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap viabilitas sel hepar yang diinduksi DMBA. Jika Fhitung $>$ Ftabel ($\alpha=5\%$) berarti perlakuan memberikan pengaruh yang nyata

terhadap respon yang diamati, artinya H_1 diterima pada level nyata (α) 5 %. Untuk mengetahui lebih spesifik perbedaan rata-rata antar kelompok maka dilakukan uji lanjut BNT 5% (tabel 4.4). Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) digunakan untuk perbandingan yang direncanakan, perlakuan yang dibandingkan tidak terlalu banyak biasanya maksimum 5 perlakuan dan nilai F hitung harus lebih besar dari F tabel (Harsojuwono, dkk., 2011:15-16).

Tabel 4.3 Ringkasan ANOVA Pengaruh Ekstrak Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus yang Diinduksi DMBA secara In Vitro

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftabel 5%
Perlakuan	6	6214.448	1035.741	2.715406	2.572712
Galat	21	8010.062	381.4315		
Total	27	14224.51			

Nilai Koefisien Keragaman (KK) pada pengaruh ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) yaitu sebesar 8% menunjukkan nilai KK yang cukup tinggi validitasnya, maka untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dilakukan uji lanjut BNT 5%. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) ini dikatakan memiliki ketelitian sedang dan digunakan ketika data homogen pada rentang 5-10%. Hasil nilai KK dibawah 10% untuk penelitian in vitro dianggap masih dalam rentang yang normal dan menunjukkan nilai varian antar kelompok memiliki tingkat akurasi yang tinggi. Hasil uji BNT 5% dapat dilihat pada tabel 4.4

Tabel 4.4 Ringkasan Uji BNT 5% Pengaruh Ekstrak Bua Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara In Vitro

Perlakuan	Rata-rata \pm SD	Notasi BNT 5%
P2 (400 μ g/ml)	13.18 \pm 3.92	a
P4 (800 μ g/ml)	15.51 \pm 4.54	a
P1 (200 μ g/ml)	26.56 \pm 2.62	b
P3 (600 μ g/ml)	36.97 \pm 3.41	c
P5 (1000 μ g/ml)	39.33 \pm 1.86	cd
K (+) (0 μ g/ml)	45.57 \pm 3.05	d
K (-) (0 μ g/ml)	53.72 \pm 2.01	e

Hasil analisis viabilitas sel hepar menggunakan *countess cell* kemudian dicari nilai rata-rata setiap perlakuan, hasil perhitungan rata-rata viabilitas dan uji lanjut BNT 5% sel hepar setelah hari ke-4 penanaman dapat diamati pada tabel 4.4. Berdasarkan hasil perhitungan *Countess* nilai rata-rata viabilitas yang paling tinggi yaitu pada perlakuan kontrol (-) dengan rata-rata viabilitas sebesar 53.77%, sedangkan angka viabilitas sel paling rendah yakni pada perlakuan P2 sebesar 13.19%. Viabilitas sel pada hari ke-4 setelah pemberian ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) memiliki rata-rata dibawah 50%. Hal ini mengindikasikan pada setiap perlakuan memiliki peredaan yang signifikan dan notasi BNT 5% yang berbeda tiap kelompok, membuktikan adanya pengaruh ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap sel hepar tikus yang diinduksi DMBA.

Berdasarkan hasil uji lanjut BNT 5% perlakuan P2 dan P4 tidak berbeda nyata, namun berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. P3 dan P5 tidak berbeda nyata namun berbeda nyata dengan perlakuan P1, P4, P3 dan K(+) tidak berbeda nyata, dan perlakuan K(-) berbeda nyata dengan semua perlakuan. Hal ini

mengindikasikan ekstrak buah amla berpengaruh terhadap kemampuan viabilitas sel. Dari tabel 4.4 berbeda signifikan antar kelompok menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata ($\alpha > 0.05$) pada perbedaan konsentrasi ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*), hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan yang diberi ekstrak cenderung berbeda dengan perlakuan yang tidak diberi ekstrak yaitu K(+) dan K(-) (sel normal). Kontrol (-) menjadi acuan sel hepar yang normal karena kontrol (-) tidak diberi perlakuan senyawa DMBA dan ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) menunjukkan tingginya viabilitas sel dariada perlakuan lainnya. Tujuan dari pemberian ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) yaitu agar dapat membandingkan kadar konsentrasi berapa yang mampu menekan angka viabilitas sel kanker hepar. Kontrol negatif (-) berbeda signifikan dengan perlakuan yang lain hal ini menunjukkan bahwa ekstrak buah amla (*P. emblica*) memiliki pengaruh terhadap kemampuan viabilitas dan proliferasi sel hepar yang ditunjukkan pada tabel hasil rata-rata viabilitas. Ekstrak diduga bersifat toksik terhadap sel, dilihat perbandingannya yang berbeda nyata dengan perlakuan sel normal (kontrol negatif).

Untuk mengevaluasi keberhasilan kultur dapat menggunakan viabilitas sel sebagai parameternya. Viabilitas sel dapat diuji menggunakan pewarnaan yang didasarkan pada membran sel. Sel yang hidup tidak mampu mengikat zat warna karena membran sel yang utuh tidak dapat ditembus oleh zat warna sehingga sel tidak akan terwarnai. Sedangkan pada membran sel yang mati atau rusak mampu mengikat zat warna sehingga sel akan terwarnai. Pewarna yang dapat digunakan dalam uji viabilitas sel yakni nigrosin, eritrosin dan *trypan blue* (Trenggono, 2009). Pada penelitian ini menggunakan pewarna *trypan blue*, dimana dapat dilihat pada

gambar 4.4 sel hidup ditandai dengan kontur hijau sedangkan sel mati ditandai dengan kontur merah. Sitoplasma yang jernih menandakan bahwa sel tersebut hidup sedangkan sitoplasma gelap menandakan sel mati hal ini menurut pendapat Strober (2015). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian DMBA akan masuk ke dalam tubuh secara sistemik dan akan mengganggu metabolisme hepar sehingga menjadi senyawa karsinogen dan menyebabkan stres oksidatif akibatnya memberikan perubahan pada struktural hepar secara mikroskopik (Rahman, 2023). Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan menurut Elvi, S. (2015) dalam penelitian Rahman (2018) bahwa sifat negatif radikal bebas dapat menyebabkan stres oksidatif yaitu keadaan ketidakseimbangan antara radikal bebas.

Menurut Bolt (2001) uji viabilitas sel pada umumnya dilakukan dengan perhitungan sel menggunakan hemositometer dan zat warna *trypan blue*. Pewarna *trypan blue* akan menunjukkan perbedaan antara sel yang hidup dan mati dengan cara sel yang hidup akan terlihat bening (tidak berwarna) karena struktur membran sel tersebut utuh sehingga zat warna tidak dapat berikatan dengan sel. Sedangkan pada sel yang mati terlihat berwarna biru karena zat warna berikatan dengan protein dalam plasma pada membran sel yang rusak. Penggunaan Konsentrasi yang efektif untuk uji viabilitas sel menggunakan *trypan blue* adalah sebesar 0.5% karena tidak dapat merubah integritas membran sel dan dapat memperlambat kematian sel (apoptosis).

Salah satu indikasi sel abnormal (kanker) adalah kemampuan proliferasinya yang tinggi. Proliferasi sel-sel kanker ini dipengaruhi oleh perubahan ekspresi protein (Hanahan & Wienberg, 2005) yang berhubungan erat pula dengan kemampuan sel hidup (*viable*). Namun berbeda dengan teori, penelitian in vitro ini

viabilitas tertinggi dialami oleh sel normal (kontrol negatif) sedangkan sel abnormal (kontrol positif) yang diinduksi DMBA memiliki nilai viabilitas yang rendah. Pada konsentrasi 400 µg/ml (P2) memiliki nilai rata-rata terkecil diantara perlakuan yang lain, hal ini mengindikasikan bahwa terdapat pengaruh sitotoksik terhadap sel hepar yang diinduksi senyawa DMBA. Sel yang mati menunjukkan pengaruh sitotoksik ekstrak terhadap sel hepar yang diinduksi senyawa DMBA disebabkan ekstrak buah amla diduga mengandung senyawa utamanya yaitu *ellagic* dan asam galat yang merupakan kandungan utama dari buah ini. Sel memiliki mekanisme interinsik penghancuran diri yang disebut kematian terprogram (apoptosis). Terdapat 2 jalur pensinyalan apoptosis yaitu ekstrinsik yang dimediasi oleh reseptor kematian sel yang berada pada membran sel/permukaan dan jalur instrinsik yang dimediasi oleh mitrokondria (Igney & Kammer, 2002). Viabilitas sel normal yang tinggi dapat dipengaruhi oleh faktor nutrisi sel yang tersedia melalui media pertumbuhan, sedangkan sel kanker (kontrol positif) yang memiliki viabilitas rendah dapat mungkin disebabkan oleh apoptosis yang dimediasi oleh reseptor kematian karena kemampuan DNA sel yang abnormal akibat paparan senyawa karsinogen DMBA. Hal ini perlu ditelusuri lebih lanjut apakah konsentrasi DMBA yang digunakan untuk memicu proliferasi sel sesuai dengan hipotesis penelitian. Viabilitas sel yang rendah juga dapat pula disebabkan oleh toksisitas senyawa DMBA pada kontrol positif, maupun ekstrak buah amla pada semua perlakuan karena kandungan senyawa aktif pada buah ini.

Ketika mekanisme intrinsik dan pensinyalan apoptosis terganggu atau mengalami kerusakan, maka sel akan terus membelah dan kehilangan kendalinya serta kemampuan proliferasi dan apoptosisnya menjadi abnormal. Dalam hal ini

apoptosis merupakan kemampuan alami sel yang sudah tersistem dari awal diciptakan. Secara fisiologis, system yang Allah atur dalam tubuh manusia menjadi penjelasan atas kebesaran-Nya, bahwa kehidupan dan kematian sel termasuk hal yang telah diatur dan keseimbangan yang dirasakan manfaatnya untuk kesehatan. Jika apaoptosis berlebihan makan individu akan mengalami fungsi yang tidak normal, sebaliknya apabila sel ber proliferasi berlebihan akan mengakibatkan kanker atau tumor. Allah berfirman dalam kalam-Nya yang dijelaskan dalam surah Al-Mulk ayat 3 yang berbunyi :

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا مَا تَرَى فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِنْ تَفْوُتٍ فَارْجِعِ الْبَصَرَ هَلْ تَرَى مِنْ فُطُورٍ

“(Dia juga) yang menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. Kamu tidak akan melihat pada ciptaan Tuhan Yang Maha Pengasih ketidakseimbangan sedikit pun. Maka, lihatlah sekali lagi! Adakah kamu melihat suatu cela?”

Dalam hal yang paling sederhana yaitu sel, hingga hal yang besar tatanan yang kompleks yaitu semesta, Allah menunjukkan kebesaran-Nya. Menurut Abdulah (2006) Allah maksud dari kalimat مَا تَرَى فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِنْ تَفْوُتٍ adalah semua ciptaan Allah sesuai dan seimbang, tidak ada pertentangan, benturan, ketidakcocokan, kekurangan dan kerusakan. Sehingga mendukung satu sama lain, berjalan seimbang dan tidak ada cela/cacat dalam penciptaannya. Begitupun system dalam tubuh makhluk hidup, manusia, tumbuhan, hewan dan organisme, setiap sel memiliki kemampuan dan karakter sendiri untuk tumbuh dan berkembang, sehingga dalam hal ini diartikan dengan homeostatis kehidupan. Dalam hal ini penelitian in vitro dapat dinilai memiliki kelebihan dapat mempelajari sel-sel epitel dewasa normal, kariologi, dan pola pertumbuhan sel untuk studi tentang karsinogenesis in

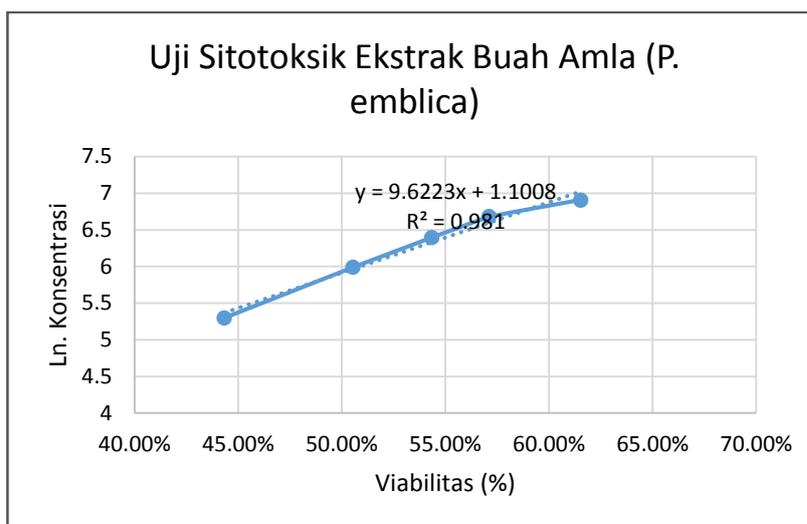
vitro yang dapat mendorong pengetahuan tentang karakter sel secara spesifik dan lebih luasnya manfaat dalam bidang kesehatan

4.3 Pengaruh Ekstrak Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) Terhadap Nilai LC₅₀ Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

Uji sitotoksik bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik senyawa yang memiliki potensi dapat menghambat pertumbuhan sel uji. Parameter yang digunakan adalah *Lethal Concentration* 50% (LC₅₀). Uji sitotoksitas dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak metanol buah amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap sel kanker hepar secara *in vitro*. Metode uji yang digunakan adalah metode MTT (*microculture tetrazolium technique*). Pereaksi MTT yang digunakan merupakan garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu dan tidak larut dalam air yang dapat dibaca yang mengacu pada prosedur menurut *Cancer Chemoprevention Research Cancer*, Fakultas Farmasi UGM (2012).

Pengujian menggunakan MTT *assay* mempunyai prinsip kerja yakni berdasarkan reaksi reduksi garam tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetra-zolium bromide) oleh *sistym reductase*. Suksinat tetrazolium dengan mitokondria sel-sel hidup akan membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Selanjutnya diberikan larutan *stopper Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) untuk menghentikan reaksi MTT *Assay*. Larutan SDS ini bekerja dengan tujuan untuk melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein sehingga reaksi antara MTT dengan mitokondria dapat dihentikan (Bhuyan, 2009). Sel hepar sebanyak

dengan kerapatan 1×10^6 didistribusikan kedalam sumuran pada 96 *plate well*, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam didalam inkubator CO₂ 5%, suhu 37° C. Analisis dari MTT Assay yaitu melalui intensitas ungu yang terbentuk yang terbaca otomatis menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 490-595 nm. Data absorbansi kemudian dikonversi kedalam persen sel hidup.



Gambar 4.4 Uji Sitotoksik Ekstrak Buah Amla (*P.emblica*) terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) metode MTT Assay menggunakan analisis ELISA *reader*

Berdasarkan grafik hubungan antara Ln. konsentrasi buah amla dengan persentase sel hidup melalui nilai absorbansi ELISA reader bertujuan mendapatkan persamaan linier yang digunakan untuk mencari LC₅₀. Sitotoksik suatu ekstrak berdasarkan nilai LC₅₀ digolongkan menjadi 3 yaitu sitotoksitas potensial (LC₅₀ < 200 µg/ml), sitotoksitas sedang (LC₅₀ < 1000 µg/ml) dan rendah (LC₅₀ > 1000 µg/ml) (Prayong, 2008). Hasil pengujian ekstrak buah amla (*P. emblica*) diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 161.11 µg/ml, hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak metanol buah amla cukup potensial sebagai antikanker yang dilihat dari nilai LC₅₀ kurang dari 200 µg/ml. Kemampuan penghambatan proliferasi sel kanker dapat berkaitan

dengan mekanisme *cell cycle arrest* yakni adanya kerusakan DNA atau RNA yang dapat memicu aktivitas gen untuk berproliferasi.

Mekanisme toksisitas suatu senyawa, dapat dilihat dari perubahan ekspresi gen yang disebabkan pengobatan sel secara *in vitro*. Terdapat empat indikasi ekstrak buah amla (*P. emblica*) memiliki potensi sebagai antikanker atau kemopreventif yakni *Phyllanthus emblica* memiliki aktivitas penangkap radikal bebas yang kuat sehingga dapat mencegah spesies oksigen reaktif menginduksi kerusakan DNA dan onkogenesis (Harza *et al.*, 2010 dan Majeed, *et al.*, 2009). Kemungkinan kedua yaitu ekstrak ini memungkinkan untuk menurunkan kadar enzim sitokrom pada sel hepar seperti sitokrom Cyp 450, mengubah xenobiotic menjadi zat yang berpotensi karsinogenik dalam upaya membersihkannya dari tubuh. Ketiga, ekstrak *P. emblica* memiliki aktivitas antiinflamasi yang mencegah kanker terkait inflamasi, dan keempat ekstrak ini terbukti memiliki sifat represif antitumor yang kuat terhadap sejumlah jenis kanker baik *in vivo* dan *in vitro* (Zhao *et al.*, 2015).

Ekstrak buah amla mengandung asam *ellagic* dan asam galat yang mana telah diidentifikasi sebagai senyawa utama yang terkandung dalam ekstrak buah amla. Menurut penelitian Lu *et al.*, (2016) ekstrak buah amla secara signifikan dapat menurunkan akumulasi lemak dan ROS dengan mengubah ekspresi gen terkait lipogenesis dan menstimulasi pensinyalan AMP-protein kinase dalam HepG2. Ekstrak ini juga menghambat fibrosis hepar pada sel HSC-T6 dan menginduksi apoptosis mitokondria. *Phyllanthus emblica* terbukti menghambat steatosis seluler dan fibrosis hati secara *in vitro*, mengurangi lipogenesis hepatosit dan sel fibrotik.

Penelitian yang sama juga memaparkan bahwa ekstrak buah amla (*P. emblica*) konsentrasi 200 µg/mL secara signifikan mengurangi kadar ROS intraseluler dalam sel HepG2 yang rusak akibat stress oksidan yang ditimbulkan oleh senyawa asam lemak bebas atau FFA (*Free Fatty Acid*).

Penelitian menurut Ngamkitidechakul, et al., (2010) memaparkan bahwa *Phyllanthus emblica* mengandung polifenol yang menginduksi apoptosis pada sel kanker manusia. Ekstrak *P. emblica* juga mengandung tanin dan asam galat. Studi menunjukkan tindakan kemopreventif. *P. emblica* memiliki kemampuan untuk menghambat karsinogenesis yang terbukti secara signifikan menghambat proliferasi enam sel kanker manusia secara in vitro. Beberapa sampel penelitian yang telah dilakukan diantaranya pada konsentrasi 50-100 µg/ml mampu menghambat pertumbuhan *cell line* A549 (kanker paru-paru) dan sel HeLa (kanker serviks). Pada dosis 130-180 µg/ml pada pertumbuhan sel MDA-MBA-231 (adenokarsinoma payudara), SKOV3 (adenokarsinoma ovarium), dan SW620 (adenokarsinoma kolorektal). Namun uniknya *P. emblica* memiliki efek sitotoksik rendah pada sel normal MRC5 (sel fibroblast paru-paru normal). Dengan kata lain, *P. emblica* memiliki efek antiproliferatif dan sitotoksik yang selektif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Efek antioksidan buah *Phyllanthus emblica* dalam memicu peningkatan kadar antioksidan seluler sebab adanya glutathione, glutathione peroksidase, glutathione reduktase dan glutathione S-transferase. Dalam hal ini efek kemopreventif dari *P. emblica* dapat dikaitkan dengan aktivitas antioksidannya saja namun juga melalui induksi enzim detoksifikasi atau antioksidan seluler (Ngamkitidechakul, 2010). Antioksidan yang dikandung buah

amla menjadi pertahanan primer terhadap ROS (spesies oksigen reaktif) yang dihasilkan oleh senyawa atau spesies beracun.

Ekstrak *Phyllanthus emblica* kaya akan polifenol dan mineral sederhana menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap kanker serviks dan ovarium. *P. emblica* juga dapat mencegah karsinogenesis hepar yang mana telah diuji dalam penelitian *in vitro* menggunakan *cell line* hepar manusia HepG2, menunjukkan bukti sitotoksik ekstrak ini. Dapat dikatakan ekstrak *P. emblica* memiliki efek sitotoksik yang kuat terhadap sebagian besar *cell line*, namun mekanisme resistensi primer ada. Sel-sel yang resisten terbukti menjadi alat berguna dalam menentukan mekanisme resistensi dimana ekstrak ini melakukan efek sitotoksiknya (Zhao, 2015). Dalam berbagai penelitian efek antioksidan *P. emblica* dikarenakan kaya akan polifenol dan senyawa turunan tanin yang dapat dihidrolisis, termasuk asam ellagic, asam galat, dan asa chebulagic. Senyawa-senyawa tersebut telah terbukti banyak mencegah mutagenesis dan peroksida lipid dalam merespon karsinogen dan spesies oksigen reaktif. Sehingga kombinasi dari senyawa-senyawa tersebut bekerja sinergis memungkinkan ekstrak buah amla untuk menyerap radikal bebas dengan sangat efisien dan memberikan efek antikanker. Karsinogen alkilasi menghasilkan mutasi DNA melalui oksidasi karbon atau reaksi konjugasi dengan asam nukleat (Dipple, *et al.*, 1995).

Senyawa turunan tanin yang mana dikatakan memiliki potensi antikanker terhadap sel kanker hepar dan hepatokarsinoma xenografis. Penelitian Model tumogenesis kelompok yang diberi perlakuan DMBA dan ekstrak *P. emblica* mengalami penurunan signifikan lebih dari 50% sel tumor kulit tikus yang dimodel tumogenesis melalui DMBA sebagai inisiator dan promotor. *Phyllanthus emblica*

adalah satu diantara banyak ciptaan Allah di bumi yang memiliki banyak manfaat dan khasiat. Berbagai terdahulu sudah banyak membuktikan potensi yang dimiliki oleh tanaman ini, diantara sebagai antikanker, antiinflamasi, antikarsinogenik, antioksidan, antibakteri (Cahyaningrum, 2022) meningkatkan imunitas, meredakan asma, mengobati pencernaan, menurunkan demam, dan sebagainya (Nala, 2001). Berbagai kandungan yang berpotensi mengatasi berbagai penyakit menunjukkan kebesaran Allah dalam menyediakan kebutuhan manusia di bumi, sebagaimana firman Allah, bahwa langit dan bumi ditundukkan untuk manusia demi kepentingan hidup manusia, yang tercantum dalam firman-Nya :

وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمٰوٰتِ وَمَا فِي الْاَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ اِنَّ فِيْ ذٰلِكَ لَاٰيٰتٍ لِّقَوْمٍ يَّتَفَكَّرُوْنَ

“Dia telah menundukkan (pula) utukmu apa yang ada di langit dan apa yang ada di bumi semuanya (sebagai rahmat) dari-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berpikir” (Q.S Al Jasiyah [45]: 13)

Allah menjelaskan bahwa Dialah yang menundukkan semua makhluk ciptaan-Nya yang ada di langit dan di bumi agar manusia dapat menggunakan dan memanfaatkannya untuk kepentingan manusia dalam melaksanakan tugas sebagai khalifah Allah di bumi. Hal ini berarti bahwa manusia wajib berusaha mencari manfaat dan kegunaan ciptaan Allah bagi mereka. Kunci dari semuanya adalah kemauan berusaha dan keinginan mengetahui sebagian pengetahuan Allah. Ciptaan Allah yang ada di bumi di samping sebagai rahmat dan karunia-Nya kepada manusia juga mengandung tanda-tanda kekuasaan dan keagungan-Nya, yang menunjukkan bahwa penciptanya adalah Zat Yang Maha Esa.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan uraian analisis dan pembahasan dalam penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian ekstrak buah Amla (*Phyllanthus emblica*) berpengaruh signifikan ($\alpha > 0.05\%$) terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yaitu mampu menghambat konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus yang diinduksi DMBA secara in vitro
2. Nilai LC_{50} ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker dengan nilai LC_{50} sebesar $161.11 \mu\text{g/ml}$ sehingga disimpulkan memiliki efek sitotoksik terhadap sel hepar tikus yang diinduksi DMBA secara in vitro. Nilai $LC_{50} < 200 \mu\text{g/ml}$ mengindikasikan berpotensi sebagai senyawa antikanker.

5.2 Saran

Penelitian ini tidak melalui tahap pasase I dan II, sehingga sel masih belum konfluen secara sempurna. Penelitian selanjutnya sebaiknya melalui tahap pasase I dan II untuk mengetahui pertumbuhan sel hepar normal (tanpa DMBA) dan dipastikan mencapai konfluen 90%. Selain itu pengaruh DMBA terhadap sel hepar normal belum dapat dipastikan apakah sel telah mengalami karsinogenik sehingga untuk penelitian selanjutnya perlu diidentifikasi baik secara morfologi, bentuk sel, maupun fase pembelahan. Untuk mengetahui uji lanjut mengenai sel kanker dapat diidentifikasi menggunakan kromatografi. Perlu dilakukan pula uji kandungan ekstrak buah amla (*Phyllanthus emblica*) untuk dapat memperoleh informasi lebih spesifik senyawa-senyawa yang menghambat karsinogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

- A. Sabarwal, K. Kumar, R.P. Singh. 2018. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 63, 103–114.
- Al-Qur'anul Karim dan Terjemahannya versi Kemenag RI: <https://quran.kemenag.go.id/> (Diakses pada 25 Januari 2022)
- Al-Attar AM. 2004. *The influence of dietary grape seed oil on DMBA-induced liver enzymes disturbance in the frog, Rana ridibunda.* *Pakistan J Nutr* 3 (5): 304-309
- American Cancer Society. 2008. National Home Office: American Cancer Society, Inc., 250 Williams Street, NW, Atlanta, GA 30303-1002, (404) 320- 3333
- A. Dipple. 1995. "DNA adducts of chemical carcinogens," *Carcinogenesis*, vol. 16, no. 3, pp. 437–441, Aji, Amri, Leni Maulinda, and Sayed Amin. 2015. "Isolasi Nikotin Dari Puntung Rokok Sebagai Insektisida." *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*4(1):100–120
- Arora S, Kaur K, Kaur S. 2003. Indian medicinal plants as a reservoir of protective phytochemicals. *Teratog Carcinog Mutagen.* 295-300.
- Aventi, A. 2016. Penelitian Pengukuran Kadar Air Buah. In *Prosiding Seminar Nasional Cendekiawan.*
- Azmi, F. 2016. Anatomi Dan Histologi Hepar. *Jurnal Kedokteran*, 1(2), 147-154.
- Bhuyan, A. K., 2009. On The Mechanism of SDS-induced Protein Denaturation. *Biopolymer.* 93(2): 186-199
- Bandyopadhyay, S. K., Chatterjee, A., Chattopadhyay, S. 2011. Biphasic effect of phyllanthus emblica L. extract on NSAID-induced ulcer: An antioxidative trail weaved with immunomodulatory effect. *Evidence based Complement. Altern. Med.* Vol. 2011. Pp. 1-13.
- Budi R.T., Widyarini S., 2010. The Impact of Mammary Carcinogenesis Induced by 7,12 Dimethylbenz(a) anthracene on Histopathological Features of The Gastric in Sprague Dawley Rat, *Jurnal Veteriner*, Vol. 11 No. 1: 17-23
- Cahyaningrum, Putu. 2022. *Monograf Buah Amla (Phyllanthus emblica L.): Khasiat Antioksidan dalam Sediaan Dekokta dan Loloh Ayurveda.* Cv. Media Sains Indonesia: Bandung
- CCRC, 2009, Protokol in Vitro, Cancer Chemoprevention Research Center, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- CCRC, 2010. Standard Operating Procedure, Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

- CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center). Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT. <http://www.ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/03.010.-Sitotoksik.pdf.2012>. [Diakses 01 Juni 2023]
- Cancer Chemoprevention Research Center. 2013. Cancer Chemoprevention Research Center, , 8. Terdapat di: <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/03.010.02-uji-sitotoksik-MTT.pdf> [Diakses pada 28 Januari 2023]
- Chhikara, B. S., & Parang, K. 2023. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451-451.
- Dasaroju, S., and Gottimukkala, K.M. 2014. "Current Trend in the Research of *Emblica officinalis* (Amla): A Pharmacological Perspective." *International Journal Pharmaceutical Sciences* 24(3): 150-159
- Dewi, M. 2017. Sebaran kanker di Indonesia, riset kesehatan dasar 2007. *Indonesian Journal of Cancer*, 11(1), 1-8.
- Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T., & Brenner, D. A. 2020. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 245(2), 96-108.
- Eala, M. A. B., Robredo, J. P. G., Dee, E. C., Lin, V., & Lagmay, A. M. F. A. 2022. Climate crisis and cancer: perspectives from the hardest hit. *The Lancet Oncology*, 23(3), e92.
- Ewa, B., & Danuta, M. Š. 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of applied genetics*, 58, 321-330.
- Feola, S., Chiaro, J., Martins, B., Russo, S., Fusciello, M., Ylösmäki, E., ... & Cerullo, V. 2022. A novel immunopeptidomic-based pipeline for the generation of personalized oncolytic cancer vaccines. *Elife*, 11, e71156.
- Elias, H. (1955). Liver morphology. *Biological reviews*, 30(3), 263-310.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149(4), 778-789.
- Ghosal S, Tripathi VK, Chauhan S. Active constituent of *Emblica officinalis*: part 1st the chemistry and antioxidant effects of two new hydrolysable tannins, emblicanin A and B. *Indian J Chem.*1996; 35b: 941–948
- Gravitz, L. 2014. Liver cancer. *Nature*, 516 (7529), S1-S1.
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
- Handayani, Nur. 2022. Kanker dan Serba-serbi Kanker (Hari Kanker Sedunia, 2022). <https://rsprespira.jogjaprov.go.id/> (Diakses 27 September 2022).

- Hanifah, L. 2021. *Aktivitas antikanker ekstrak daun kesambi (Scheichera oleosa) terhadap sel hepar tikus (Rattus norvegicus) yang diinduksi (7, 12-Dimethylbenz (α) antrasena)(DMBA) secara in vitro* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Hansen, LK., DJ. Mooney, JP. Vacanti, DE. Ingber. 1994. Integrin Binding and Cell Spreading on Extracellular Matrix Act at Different Points in the Cell Cycle to Promote Hepatocyte Growth. *Molecular Biology of the Cell*. Vol5: 967-975
- Harsojuwono, B. A., Arnata, I. W., & Puspawati, G. A. K. D. 2011. Rancangan percobaan. *Teori, Aplikasi SPSS dan Excel*. Malang: Lintas Kata Publishing.
- Haryoto, M., Indrayudha, P., Azizah, T., Suhendi, A., Haryoto, M., & Peni Indrayudha, T. A. A. 2013. Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol tumbuhan sala (*Cynometra ramiflora* Linn) terhadap sel HeLa, T47D dan WiDR. *Jurnal Penelitian Saintek*, 18(2), 21-28. S
- Hayakawa, K. 2022. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Handbook of Air Quality and Climate Change* (pp. 1-17). Singapore: Springer Singapore.
- Huang, C. Z., Tung, Y. T., Hsia, S. M., Wu, C. H., & Yen, G. C. 2017. The hepatoprotective effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in SD rats. *Food & function*, 8(2), 842-850.
- Hussain, S. Z., Naseer, B., Qadri, T., Fatima, T., & Bhat, T. A. 2021. Anola (*Emblca officinalis*): Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. In *Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas: Nutritional and Health Benefits* (pp. 193-206). Cham: Springer International Publishing.
- Ifegwu, O. C., & Anyakora, C. 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons: part I Exposure. *Advances in clinical chemistry*, 72, 277-304.
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277-288.
- J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015
- Kaur, K., & Thakur, S. 2020. Documentation of floristic diversity & traditional knowledge: A case study of Block Bhunga, district Hoshiarpur, Punjab (India). *The Journal of Indian Botanical Society*, 99(3and4), 96-114.
- Keim, A. P., Adi, T. R., Nikmatullah, M., Arifa, N., Akbar, F., & Sujarwo, W. 2020. Etnobiologi Kota Amlapura, Karangasem, Bali: Amla, Amlapura dan *Phyllanthus emblica* L.(Phyllanthaceae). *Journal of Tropical Ethnobiology*, 3(1), 69-80.

- Kerschbaum, H. H., Tasa, B. A., Schürz, M., Oberascher, K., & Bresgen, N. 2021. Trypan blue—Adapting a dye used for labelling dead cells to visualize pinocytosis in viable cells. *Cell. Physiol. Biochem*, 55, 171-184.
- Kementerian Kesehatan RI. 2013. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). Jakarta: Badan Litbang Kemenkes RI.
- Kementrian Agama RI. 2019. *Qur'an Asy-Syifaa'*. Syamil Qur'an. Sygma : Bandung
- Kementerian Kesehatan RI. 2015. Situasi Penyakit Kanker. Jakarta : Pusat Data dan Informasi
- Kementerian Kesehatan RI. 2018. Situasi Penyakit Kanker. Jakarta : Pusat Data dan Informasi
- Kerr, M. 2004. Liver Cancer Fastest Growing Cancer in US. Diakses pada tanggal 17 Pktober 2016. <http://www.nlm.nih.gov>
- Khan, K.H., 2009. “Roles of *Embllica officinalis* in Medicine- A Review”. *Botany Research Intenational*. 2(4): 218-228
- Khanifah, 2019. Makalah CA. Hepar. Poltekkes Kemenkes Pontianak
- Khoiriyah, U., Pasaribu, N., Hannum, S. 2015. Distribusi *Phyllanthus emblica* L. di Sumatera Utara bagian Selatan. *Biosfera* 32(2): 98-102.
- Kim HJ, Yokozawat, Kimhy, Tohda C, Rao TP, JunejaLR. Influence of Amla (*Embllica Officinalis* Gaertnl) on hypercholesterolemia and lipid peroxidation in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2005; 51:413-418
- Kim, J. Y., An, J. M., Chung, W. Y., Park, K. K., Hwang, J. K., Kim, D. S., ... & Seo, J. T. 2013. Xanthorrhizol induces apoptosis through ROS-mediated MAPK activation in human oral squamous cell carcinoma cells and inhibits DMBA-induced oral carcinogenesis in hamsters. *Phytotherapy Research*, 27(4), 493-498.
- Kurlila, Anis. 2018. Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* Linn.) Terhadap Pertumbuhan Kultur Primer Sel Hepar Baby Hamster Yang Dipapar 7.12-Dimetilbenz(α)Antrasen. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Kurlila, A. 2013. *Pengaruh ekstrak pegagan (Centella asiatica linn.) terhadap pertumbuhan kultur primer sel hepar baby hamster yang dipapar 7.12-dimetilbenz (α) antrasen* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Kurnijasanti, R., Hamid., Sahrial, I., & Rahmawati, K. 2008. Efek Sitotoksik invitro dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa Terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma. *Jurnal Penelitian Med Eksakta*, 7(1): 48–54
- Kwon, Y. J., Ye, D. J., Baik, H. S., & Chun, Y. J. 2018. 7, 12-Dimethylbenz [α] anthracene increases cell proliferation and invasion through induction of Wnt/ β -catenin signaling and EMT process. *Environmental toxicology*, 33(7), 729-742.

- Ladke, V. S., Kumbhar, G. M., Joshi, K., Kheur, S., Bhonde, R., & Raut, C. 2023. Isolation, Culture and Morphological Assessment of Primary Cell Lines from Human Primary Oral Squamous Cell Carcinoma Using Explant Technique. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 24(1), 257.
- Li, N., Z. Shi, Y. Tang, J. Chen dan X. Li. 2008. Recent Progress On The Total Synthesis Of Acetogenins From Annonaceae. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 4(48): 4–12.
- Lu, C. C., Yang, S. H., Hsia, S. M., Wu, C. H., & Yen, G. C. 2016. Inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* L. on hepatic steatosis and liver fibrosis in vitro. *journal of functional foods*, 20, 20-30.
- Masrida, W. O., Kristina, S. A., & Wiedyaningsih, C. (2019). Estimasi Premature Mortality Cost Penyakit Kanker Akibat Rokok di Indonesia. *Majalah Farmaseutik*, 17(2), 182-186.
- Miller, C. L., & Eaves, C. J. (1997). Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13648-13653.
- M. Quraish Shihab, *Tafsir Al Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qu'ran*, Vol. 11, , (Jakarta: Lentera Hati, 2002), 539.
- Moorthy B, Chu C, Carlin DJ 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci* 145(1):5–15
- National Center for Biotechnology Information 2023. PubChem Compound Summary for CID 6001, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene. Retrieved January 26, 2023 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7_12-Dimethylbenz_a_anthracene.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem*. 2004;279(23):23847– 23850.
- Ngamkitidechakul, C., Jaijoy, K., Hansakul, P., Soonthornchareonnon, N., & Sireeratawong, S. 2010. Antitumour effects of *Phyllanthus emblica* L.: induction of cancer cell apoptosis and inhibition of in vivo tumour promotion and in vitro invasion of human cancer cells. *Phytotherapy research*, 24(9), 1405-1413.
- Nisa, F., I. Pratomo, P. A. Nugroho dan A. Hermawan. 2014. Kanker Hepar (Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Farmasi UGM).
- Noviyanti, I. (2021). *Makna Pasangan Mulia: Analisis Terhadap Lafal Zauj Karīm Dalam Surah Al-Syu'arā' ayat 7. Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Nugraha, A., Khotimah, K., & Rietjens, I. M. 2018. Risk assessment of aflatoxin B1 exposure from maize and peanut consumption in Indonesia using the

margin of exposure and liver cancer risk estimation approaches. *Food and chemical toxicology*, 113, 134-144.khn

- Noviyanti, I. 2021. *Makna Pasangan Mulia: Analisis Terhadap Lafal Zauj Karīm Dalam Surah Al-Syu'arā' ayat 7* (Bachelor's thesis).
- Prayong J, Barusrux S, and Weerapreeyakul N. 2008. Cytotoxic Activity Screening of some Indigenous Thai plants. *Fitoterapia* 79(7): 598-601
- Periyasamy, K., Baskaran, K., Ilakkia, A., Vanitha, K., Selvaraj, S., & Sakthisekaran, D. 2015. Antitumor efficacy of tangeretin by targeting the oxidative stress mediated on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced proliferative breast cancer in Sprague–Dawley rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 75, 263-272.
- Rini, K. P. M. 2013. *Pengaruh ekstrak etanol daun sirsak (Annona muricata liin) terhadap pertumbuhan sel hepar baby hamster yang diinduksi DMBA (7, 12-dimetilbenz (a) antracene) secara in vitro* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Rodhi, H., & Rudina, A. 2019. *Biologi Sel dan Genetika*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI
- Schliess F, Gorg B, Fischer R, et al. Ammonia induces MK-801- € sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *Faseb J*. 2002;16(7):739–741
- Sharma, N., Trikha, P., Athar, M., & Raisuddin, S. .2000. In vitro inhibition of carcinogen-induced mutagenicity by *Cassia occidentalis* and *Emblia officinalis*. *Drug and Chemical Toxicology*, 23(3), 477-484.
- Shimada, T., & Fujii-Kuriyama, Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and1B1. *Cancer science*, 95(1), 1-6.
- Subijanto, A. A., & Diding, H. P. 2008. Pengaruh Ekstrak Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus* [L.] Skeels) terhadap Kadar IgE pada Tikus Model Alergi. *Jurnal Kedokteran YARSI*, 16(1), 013-017.
- Singh Ekta, Sharma Sheel, Pareek Ashutosh, Dwivedi Jaya, Yadav Sachdev, Sharma Swapnil. 2011. “Phytochemistry, traditional uses and cancer chemopreventive activity of Amla (*Phyllanthus emblica*): The Sustainer”. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (01):176-183
- Sibulesky, L. 2013. Normal liver anatomy. *Clinical liver disease*, 2(Suppl 1), S1. Diakses dari [ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov) (pada tanggal 23 Januari 2022)
- Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. 2007. Endothelial progenitor cells: Characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol* 23: 223– 239.
- <https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-instruments/automated-cell-counters/models/countess-3.html> (Diakses pada 22 Juli 2023)

- Sarwat Sultana, Salahuddin Ahmed and Tamanna Jahangir., *Embllica officinalis* and hepatocarcinogenesis: A chemopreventive study in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2008; 118: 1–6.
- Shou M, Korzekwa KR, Krausz KW, et al. Specificity of cDNAexpressed human and rodent cytochrome P450s in the oxidative metabolism of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Mol Carcinog.* 1996;17(4):241–249.
- Tolosa, L., Donato, M. T., & Gómez-Lechón, M. J. 2015. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. In *Protocols in in vitro hepatocyte research* (pp. 333-348). Humana Press, New York, NY.
- Variya, B. C., Bakrania, A. K., and Patel, S. S. 2016. *Embllica officinalis* (Amla): a review for its phytochemistry, ethnomedicinal uses and medicinal potentials with respect to molecular mechanisms. *Pharmacol. Res.* 111, 180–200. doi:10.1016/j.phrs.2016.06.
- Wakui S, Yokoo K, Takahashi H, et al. Prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure modulates induction of rat hepatic CYP 1A1, 1B1, and AhR by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 210(3):200–211.
- Sibuea, C. V., Pawitan, J. A., & Antarianto, R. (2022). Pengaruh Penggantian Medium terhadap Viabilitas Hepatosit Kultur 3D Organoid Hati. *Nommensen Journal of Medicine*, 7(2), 39-42.
- Villanueva, A. (2019). Hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 380(15). Editor D. L. Longo. New York: Massachusetts Medical Society.
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 111(1), A3-B.
- Sudiana, I Ketut. 2008. Patobiologi Molekuler Kanker. Jakarta: Salemba Medika
- Susanti, E. (2016). *Gambaran Histopatologi Hati Tikus Putih (Rattus Norvegicus) yang diberi Insektisida Golongan Piretroid (sipermetrin)* (Doctoral dissertation).
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Trenggono, Bambang S. 2009. Metode Dasar Kultur Jaringan Hewan. Jakarta: Universitas Trisakti.
- Tuschl, G., & Mueller, S. O. 2006. Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes—cell morphology and differential gene expression. *Toxicology*, 218(2-3), 205-215.
- Wuyung, P. E. 2016. Induksi DMBA dalam Karsinogenesis Kelenjar Payudara. *Pratista Patologi*, 5(1), 44-51.
- Yadav, S. S., Singh, M. K., Singha, P. K., Kumar, V. 2017. Traditional Knowledge to clinical trials: A riveew on therapeutic actions of Emlica officinalis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* Vol. 93(2017). Pp. 1292-1302.

- Yamaguchi, M. 2013. Suppressive role of regucalcin in liver cell proliferation: Involvement in carcinogenesis. *Cell proliferation*, 46(3), 243-253.
- Yanti, M. N., Rahmawati, I., & Herdwiani, W. 2021. Uji Aktivitas Sitotoksik Herba Kelakai (*Stenochlaena palustris* (Burm. F.) Bedd.) terhadap Sel Kanker Hati HEPG2. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 8(2), 255-266.
- World Health Organization. 2015. Cancer. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>), diakses 5 Februari 2023
- Zhang, K., Zhang, L., Liu, W., Ma, X., Cen, J., Sun, Z., ... & Hui, L. 2018. In vitro expansion of primary human hepatocytes with efficient liver repopulation capacity. *Cell stem cell*, 23(6), 806-819.
- Zhao, T., Sun, Q., Marques, M., & Witcher, M. 2015. Anticancer properties of *Phyllanthus emblica* (Indian gooseberry). *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
- Zulmiani, V. 2021. *Makanan Berkhasiat Obat Dalam Al-Qur'an Dan Korelasinya Dalam Pencegahan Covid-19*. Tesis. UIN Raden Intan Lampung)

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Penelitian

A. Konfluenitas Sel Hepar Hari ke-4

Konfluenitas Sel Hepar H+4 hari					
Slice	Count	Area	Average	%Area	
P1 1 M 40x-1.tif	8029	268695	33.466	21.866	
P1 2 M 40x-1.tif	8231	313752	38.118	25.533	
P1 3 M 40x-1.tif	4407	230490	52.301	18.757	
P1 4 M 40x-1.tif	901	403475	447.808	32.835	
Rata-rata					24.74775
P2 1 (M 40x)-1.tif	9297	276414	29.732	22.495	
P2 2 (M 40x)-1.tif	8772	344693	39.295	28.051	
P2 3 M 40x-1.tif	9962	366842	36.824	29.854	
P2 4 M 40x-1.tif	7724	278767	36.091	22.686	
Rata-rata					25.7715
P3 1 (M 40x)-1.tif	4159	267893	64.413	21.801	
P3 2 (M 40x)-1.tif	5890	300785	51.067	24.478	
P3 3 (M 40x)-1.tif	7131	314067	44.042	25.559	
P3 4 (M 40x)-1.tif	5316	235534	44.307	19.168	
Rata-rata					22.7515
P4 1 (M 40x)-1.tif	3997	296319	74.135	24.115	
P4 2 (M 40x)-1.tif	9886	363873	36.807	29.612	
P4 3 (M 40x)-1.tif	16171	383303	23.703	31.193	
P4 4 (M 40x)-1.tif	15042	389681	25.906	31.712	
Rata-rata					29.158
P5 1 (M 40x)-1.tif	11780	293096	24.881	23.852	
P5 2 (M 40x)-1.tif	6174	318307	51.556	25.904	
P5 3 (M 40x)-1.tif	8168	393356	48.158	32.011	
P5 4 (M 40x)-1.tif	10038	345784	34.447	28.14	
Rata-rata					27.47675
K- 1 (M 40x)-1.tif	12107	309329	25.55	25.17326	
K- 2 (M 40x)-1.tif	6142	304511	49.578	24.78117	
K- 3 (M 40x)-1.tif	6592	330778	50.179	26.91878	
K- 4 (M 40x)-1.tif	10645	248347	23.33	20.21053	
Rata-rata					24.27094
K+1 (M 40x)-1.tif	1876	441541	235.363	35.9327	
K+2 (M 40x)-1.tif	3185	465891	146.277	37.914	
K+3 (M 40x)-1.tif	1285	480949	374.279	39.14	
K+4 (M 40x)-1.tif	1489	469477	315.297	38.206	
Rata-rata					37.79817

A. Viabilitas Sel Hepar Hari ke-4

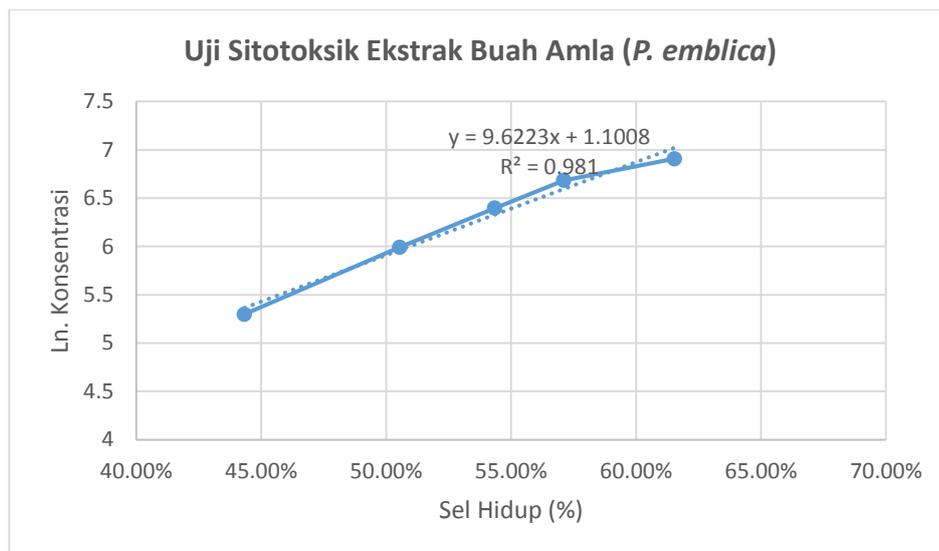
Viabilitas After Esktrak H+4 hari						
Perlakuan	Total Concentration	Total cells counted	Live cells counted	Dead cells counted	Viabilitas (%)	
P1	U1	1.87E+06	319	91	228	28.526646
	U2	2.47E+06	422	117	305	27.725118
	U3	2.43E+06	414	100	314	24.154589
	U4	2.36E+06	402	104	298	25.870647
	Rata-rata	2.28E+06				26.56925
P2	U1	1.96E+06	334	50	284	14.97006
	U2	3.14E+06	536	60	476	11.19403
	U4	3.48E+06	593	53	540	8.937605
	U5	2.46E+06	419	74	345	17.661098
	Rata-rata	2.76E+06				13.19069825
P3	U1	8.10E+06	1381	466	915	33.743664
	U2	9.07E+06	1546	567	979	36.675291
	U3	7.86E+06	1341	531	810	39.597315
	U5	1.28E+06	219	83	136	37.899543
	Rata-rata	6.58E+06				36.97895325
P4	U1	6.22E+06	1060	194	866	18.301887
	U2	5.55E+06	947	90	857	9.503696
	U3	5.52E+06	941	185	756	19.659936
	U5	5.91E+06	1007	147	860	14.597815
	Rata-rata	5.80E+06				15.5158335
P5	U1	3.51E+06	598	229	369	38.294314
	U2	3.11E+06	530	257	273	48.490566
	U3	3.62E+06	618	233	385	37.702265
	U5	3.36E+06	573	201	372	35.078534
	Rata-rata	3.40E+06				39.89141975
K(+)	U1	1.98E+07	3370	1568	1802	46.52819
	U5	5.91E+06	1007	455	552	45.183714
	U6	1.54E+07	2623	1092	1531	41.631719
	U4	1.09E+07	1852	888	964	47.948164
	Rata-rata	1.30E+07				45.32294675
K(-)	U1	3.05E+06	520	273	247	52.5
	U2	8.20E+06	1398	790	608	56.509299
	U3	5.95E+06	1015	547	468	53.891626
	U4	5.09E+06	868	453	415	52.18894
	Rata-rata	5.57E+06				53.77246625

A. Nilai Absorbansi menggunakan ELISA reader

Konsent.	Pengulangan				Rata-rata	Abs. Sampel	% Sel Hidup
	1	2	3	4			
1000	1.222	1.285	1.235	1.229	1.243	0.870	57.11%
800	1.363	1.361	1.303	1.344	1.343	0.970	61.54%
600	1.222	1.146	1.210	1.182	1.190	0.817	54.35%
400	1.008	1.053	1.037	1.074	1.043	0.670	44.33%
200	1.158	1.015	1.149	1.187	1.127	0.754	50.55%
0 (kontrol)	1.010	1.157	1.156	0.953	1.069	0.696	46.41%

B. Uji Sitotoksik (Grafik Nilai LC₅₀)

y	a	b	y = ax+b
50	9.622	1.1	ax = y-b x = (y-b)/a
X=	5.082104		
X=	Ln. LC ₅₀		
LC₅₀	161.1126		



Lampiran 2. Hasil Analisis Data Penelitian

2.1. Uji Normalitas

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Viabilitas	P1	.223	4	.	.956	4	.752
	P2	.196	4	.	.970	4	.842
	P3	.201	4	.	.978	4	.891
	P4	.230	4	.	.932	4	.605
	P5	.357	4	.	.831	4	.170
	K(-)	.229	4	.	.948	4	.701
	K(+)	.241	4	.	.881	4	.342
	Konfluenitas	P1	.263	4	.	.908	4
P2		.295	4	.	.840	4	.196
P3		.227	4	.	.951	4	.722
P4		.302	4	.	.828	4	.164
P5		.175	4	.	.976	4	.881
K(-)		.321	4	.	.890	4	.381
K(+)		.284	4	.	.929	4	.591

a. Lilliefors Significance Correction

2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Konfluenitas	Based on Mean	2.048	6	21	.104
	Based on Median	1.503	6	21	.226
	Based on Median and with adjusted df	1.503	6	14.182	.247
	Based on trimmed mean	1.976	6	21	.115
Viabilitas	Based on Mean	1.519	6	21	.221
	Based on Median	.630	6	21	.705
	Based on Median and with adjusted df	.630	6	7.392	.705
	Based on trimmed mean	1.368	6	21	.273

2.3 Hasil Analisa ANOVA One Way

A. Analisis SPSS

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Konfluenitas	Between Groups	576.104	6	96.017	8.048	.000
	Within Groups	250.549	21	11.931		
	Total	826.652	27			
Viabilitas	Between Groups	5544.499	6	924.083	70.574	.000
	Within Groups	274.971	21	13.094		
	Total	5819.471	27			

b. Ringkasan ANOVA (Excel)

1. Tabel Perhitungan ANOVA Pengaruh Ekstrak Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap konfluenitas sel hepar yang diinduksi DMBA secara in vitro

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftabel 5%
Perlakuan	6	2698.127	449.6878	3.296717**	2.572712
Galat	21	2864.499	136.4047		
Total	27	5562.626			

**Fhitung > Ftabel 5% : ada pengaruh nyata

2. Tabel Ringkasan Uji *One Way* ANOVA Pengaruh Ekstrak Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap viabilitas sel hepar yang diinduksi DMBA secara in vitro

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftabel 5%
Perlakuan	6	6214.448	1035.741	2.715406	2.572712
Galat	21	8010.062	381.4315		
Total	27	14224.51			

2.4 Uji Lanjut Tukey

Konfluenitas

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P3	4	22.7450	
K(-)	4	24.2709	
P2	4	25.7675	
P5	4	27.4750	
P1	4	27.9800	
P4	4	29.1550	
K(+)	4		37.7982
Sig.		.168	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Viabilitas

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
P2	4	13.1907				
P4	4	15.5158				
P1	4		26.5693			
P3	4			36.9790		
P5	4			39.8914	39.8914	
K(-)	4				45.3229	
K(+)	4					53.7725
Sig.		.967	1.000	.909	.376	1.000

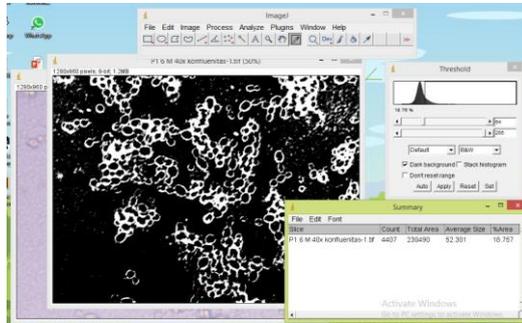
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

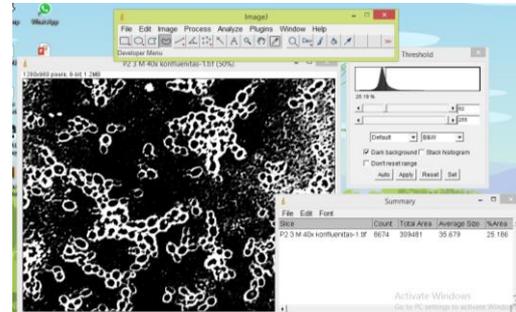
Lampiran 3. Gambar Hasil Penelitian dan Analisisnya

a. Analisis Konfluenitas Sel Menggunakan Software *ImageJ*

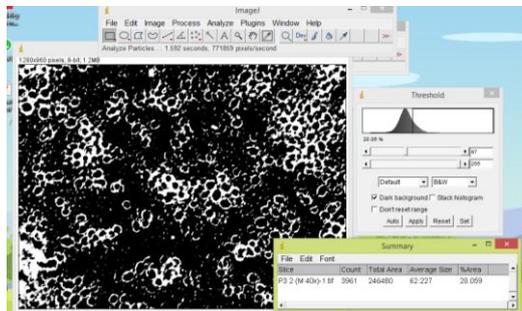
P1



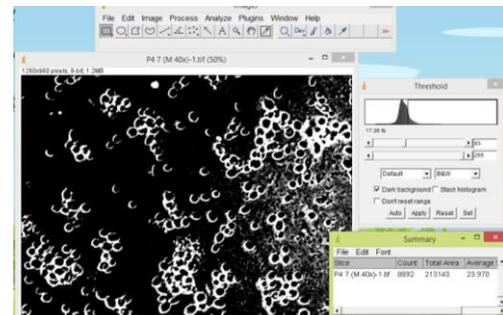
P2



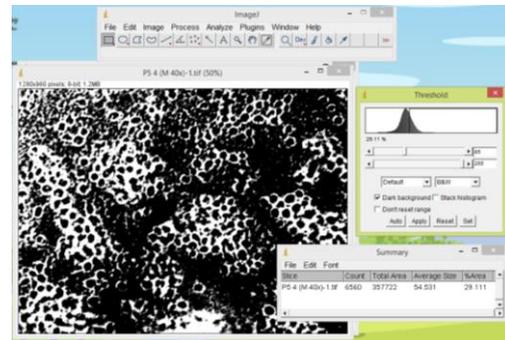
P3



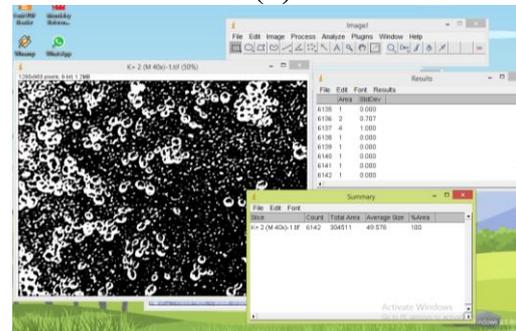
P4



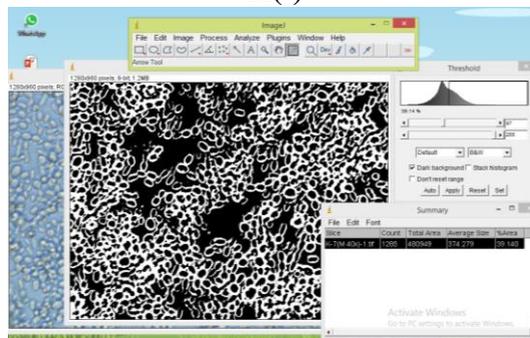
P5



K(+)

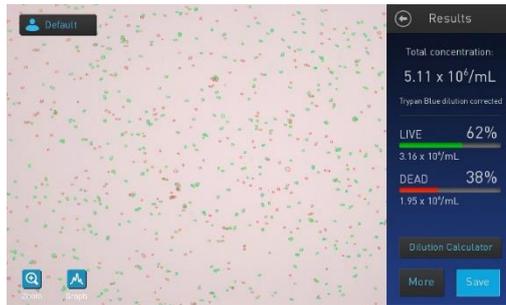


K(-)

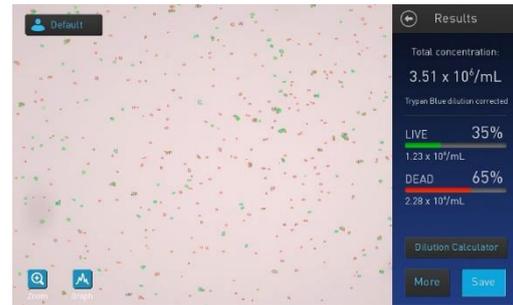


b. Viabilitas Sel

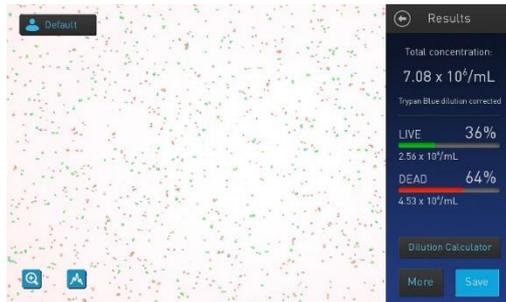
P1



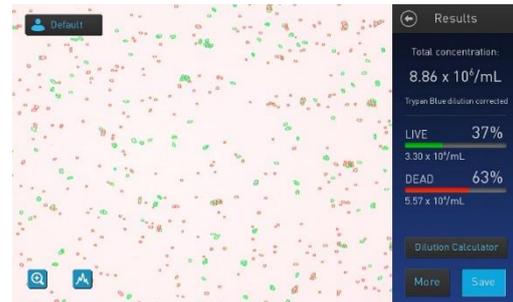
P2



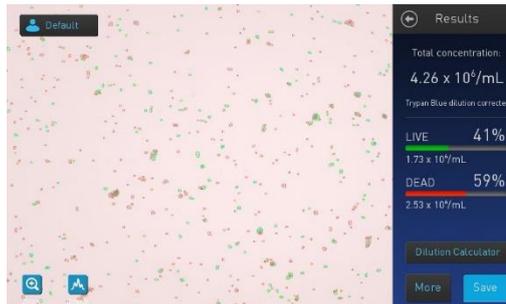
P3



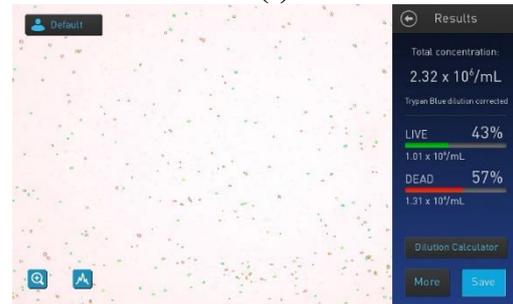
P4



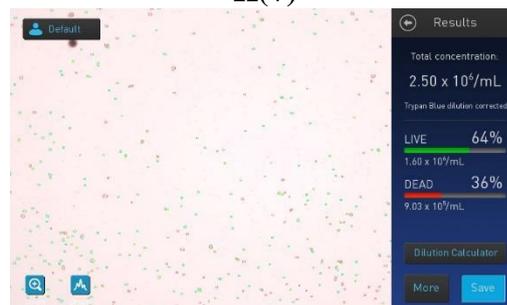
P5



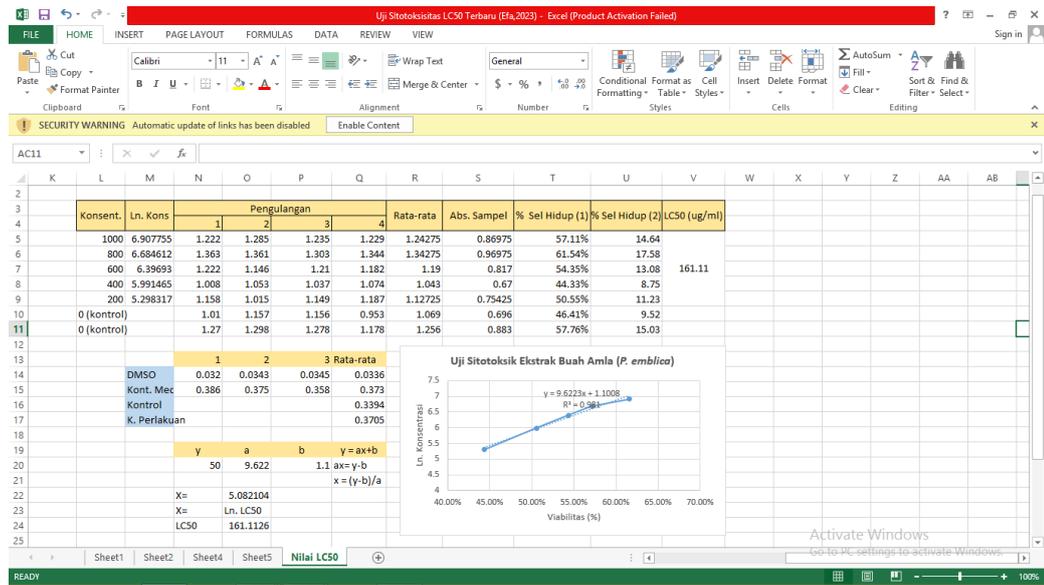
K(-)



K(+)



c. Menghitung Nilai LC50



LAMPIRAN 4. Dokumentasi Penelitian**Penanaman sel ke dalam *Multiwell*****Hasil Sentrifuse Sel Hepar Tikus****Penambahan cairan MTT Assay kedalam *multiwell*****Pipeting dan pencacahan sel hepar tikus****Pengamatan konfluenitas sel dengan Mikroskop *inverted*****Pembuatan media stok DMEM**



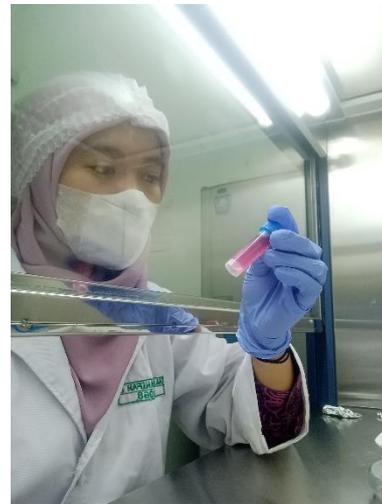
Sterilisasi alat dan bahan dengan UV



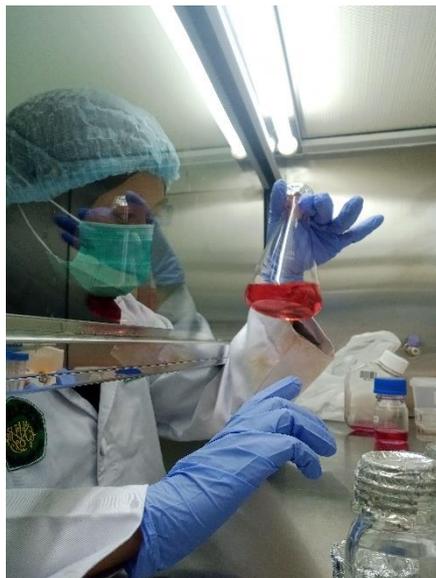
Isolasi Sel Hepar ke dalam TCD



Perhitungan viabilitas sel dengan Countess (automated cell counter)



Sel dimasukkan ke tube untuk diinkubasi (sebelum proses uji MTT Assay)



Penambahan antibiotik dan *fungizone* kedalam media DMEM



Analisis absorbansi MTT Assay dengan ELISA reader



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG

Jalan Gajayana Nomor 50, Telepon (0341)551354, Fax. (0341) 572533
Website: <http://www.uin-malang.ac.id> Email: info@uin-malang.ac.id

JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

IDENTITAS MAHASISWA

NIM : 19620083
Nama : Efa Lusiana
Fakultas : Sains dan Teknologi
Program Studi : Biologi
Dosen Pembimbing : Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
Judul Laporan : Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi DMBA secara In Vitro

IDENTITAS BIMBINGAN

No.	Tanggal	Nama Pembimbing	Deskripsi Konsultasi	Tahun Akademik	Status
1.	22 Agustus 2022	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Konsul Judul Skripsi	Ganjil 2022/2023	Sudah Dikoreksi
2.	05 Oktober 2022	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	ACC Judul Skripsi	Ganjil 2022/2023	Sudah Dikoreksi
3.	22 November 2022	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB I	Ganjil 2022/2023	Sudah Dikoreksi
4.	23 Januari 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan Lanjutan BAB I	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
5.	25 Januari 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan Lanjutan BAB I	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
6.	30 Januari 2023	Dr. H. Ahmad Barizi, M.A	Bimbingan Ayat Integrasi BAB I & II	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
7.	01 Februari 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan Lanjutan BAB I	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
8.	03 Februari 2023	Dr. H. Ahmad Barizi, M.A	Bimbingan Revisi Integrasi BAB I & II	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
9.	03 Februari 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Konsultasi BAB II	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
10.	07 Februari 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB III	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
11.	09 Februari 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB III	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG

Jalan Gajayana Nomor 50, Telepon (0341)551354, Fax. (0341) 572533
Website: <http://www.uin-malang.ac.id> Email: info@uin-malang.ac.id

12	14 Februari 2023	Dr. H. Ahmad Barizi, M.A	ACC BAB I-III	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
13	14 Februari 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	ACC BAB I-III	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
14	14 Maret 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan revisi sempro	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
15.	17 Maret 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan revisi sempro	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
17.	21 Mei 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
19.	26 Mei 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
20.	30 Juni 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
21.	3 Juli 2023	Dr. H. Ahmad Barizi, M.A	Bimbingan Integrasi BAB IV	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
22.	5 Juli 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
23.	26 Juli 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
24.	27 Juli 2023	Dr. H. Ahmad Barizi, M.A	ACC Ayat Integrasi BAB IV	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
25.	26 Juli 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
26.	28 Juli 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV & V	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
27.	31 Juli 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV & V	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
28.	02 Agustus 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	Bimbingan BAB IV & V	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi
29.	03 Agustus 2023	Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	ACC BAB IV dan V	Genap 2023/2024	Sudah Dikoreksi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG

Jalan Gajayana Nomor 50, Telepon (0341)551354, Fax. (0341) 572533
Website: <http://www.uin-malang.ac.id> Email: info@uin-malang.ac.id

Malang, Agustus 2023

Dosen Pembimbing I

Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001

Dosen Pembimbing II

Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 19731212 199803 1 008

Kelompok Program Studi Biologi

Dr. Erika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI

Jl. Gajayana No 50 Malang 65144 Telp / Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Efa Lusiana
NIM : 19620083
Judul : Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol Buah Amla (*Phyllanthus emblica*) terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi DMBA secara In Vitro

No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc	25%	
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si		
4	Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc		
5	Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc		

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi

Sandi Savitri, M.P
19741018 200312 2 002

