

PENGARUH EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*)

TERHADAP SEL HELA

Penelitian Invitro pada Sel Hela Kanker Serviks

Karya Tulis Ilmiah

Untuk memenuhi sebagian persyaratan

mencapai gelar sarjana kedokteran



diajukan oleh

Siti Masithoh

01.207.5566

kepada

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2011

KARYA TULIS ILMIAH
PENGARUH EKSTRAK DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*)
TERHADAP SEL HELA

Penelitian Invitro pada Sel Hela Kanker Serviks

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

Siti Masithoh

01.207.5566

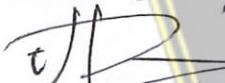
Telah dipertahankan didepan Dewan Penguji

Pada tanggal 2 Maret 2011

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

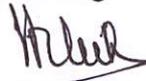
Pembimbing I

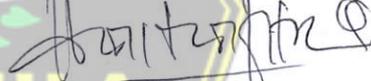

dr. Erna Mirani, M.Si.Med

Anggota Tim Penguji


Drs. H. Israhanto I., M.Si.

Pembimbing II


Ir. Titiek Sumarawati, M. Kes


dr. Minidian Fasitasari, M.Sc.

Semarang,...Maret 2011

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. H. Taufiq R. Nasihun, M.Kes, Sp.And.

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas semua anugerah dan rahmat-Nya sehingga Karya Tulis Ilmiah dengan judul "*Pengaruh Ekstrak Daun Mimba (Azadirachta indica) Terhadap Sel Hela (Penelitian Invitro pada Sel Hela Kanker Serviks)*" ini dapat terselesaikan.

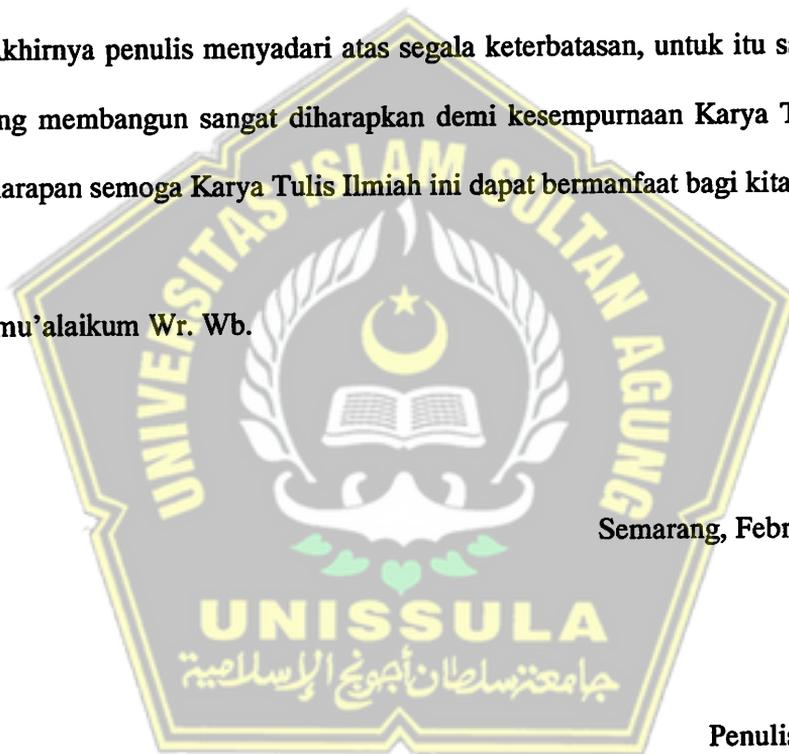
Karya Tulis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

1. Dr. dr. H. Taufiq R. Nasihun, M.Kes, Sp.And., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. Erna Mirani, M.Si.Med. dan Ir. Titiék Sumarawati, M.Kes., selaku dosen pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran membimbing, mengarahkan dan meluangkan waktu hingga terselesaikannya Karya Tulis Ilmiah ini.
3. Drs. H. Israhnanto I., M.Si. dan dr. Minidian Fasitasari, M.Sc., selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan saran untuk perbaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
4. Bapak (Alm.) dan Ibu serta Adik – adikku tercinta yang senantiasa memberikan kasih sayang, motivasi, dukungan, dan doa yang tiada henti.

5. Kepala Laboratorium Biologi dan Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
6. Analis dan Asisten Laboratorium Biologi dan Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
7. Sahabat-sahabat terbaikku : Aisyah, Asty, Okky, Ilham, Ida, Ika, Kallida, Musfiroh, Lena dan teman-teman Reinforcer atas dukungan, doa, dan semangat serta kekompakan kalian.

Akhirnya penulis menyadari atas segala keterbatasan, untuk itu saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan Karya Tulis ini, dengan harapan semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.



Semarang, Februari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PRAKATA.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR SINGKATAN.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GRAFIK.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
INTISARI.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kanker Serviks	6
2.2.1 Definisi.....	6
2.2.2 Etiologi dan Faktor Resiko	6

2.2	Sel Hela	9
2.3	Mimba.....	11
2.3.1	Morfologi.....	11
2.3.2	Taksonomi.....	12
2.3.3	Nama Daerah.....	12
2.3.4	Kandungan Mimba	12
2.3.5	Pemanfaatan Mimba	13
2.4	Uji Sitotoksik.....	14
2.5	Doxorubisin.....	15
2.6	Efek Sitotoksik Ekstrak Daun Mimba (<i>Azadirachta indica</i>) terhadap Sel Hela	15
2.7	Kerangka Teori	19
2.8	Kerangka Konsep	20
2.9	Hipotesis	20
BAB III METODE PENELITIAN		
3.1	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	21
3.2	Variabel dan Definisi Operasional.....	21
3.2.1.	Variabel.....	21
3.2.2.	Definisi Operasional.....	21
3.2.3.1.	Ekstrak Daun Mimba.....	21
3.2.3.2.	Efek Sitotoksis.....	21
3.2	Populasi dan Sampel.....	22
3.3.1.	Populasi.....	22

3.3.2. Sampel.....	22
3.3.3. Kriteria Inklusi	22
3.3.4. Kriteria Eksklusi	22
3.3 Alat dan Bahan Penelitian.....	23
3.4 Cara Penelitian.....	24
3.5.1. Cara Memperoleh Sel Hela.....	24
3.5.2. Kultur Sel Hela.....	25
3.5.3. Cara Membuat Ekstrak.....	26
3.5.4. Cara Membuat Larutan Uji.....	26
3.5.5. Uji Sitotoksik.....	27
3.5 Tempat dan Waktu.....	28
3.6 Analisis Hasil.....	28
3.7 Kerangka Kerja Penelitian	29
3.8 Jadwal Kegiatan.....	30
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
4.1. Hasil Penelitian.....	31
4.2. Pembahasan.....	34
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	38
5.2. Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR SINGKATAN

1. AIDS : Acquired Immunodeficiency Syndrome
2. ATCC : American Type Culture Collection
3. ATP : Adenosin Tri Phospate
4. DMEM : Dubelco's Modified Eagle's Medium
5. DMSO : Dimethyl Sulfoxide
6. DNA : Deoxyribonucleic Acid
7. FBS : Fetal Bovin Serum
8. HPV : Human Papiloma Virus
9. HIV : Human Deficiency Virus
10. IgA : Immunoglobulin A
11. IgG : Immunoglobulin G
12. IL : Interleukin
13. LAF : Laminar Air Flow
14. LC : Letal Concentration
15. MCF7 : Macrophage Chemotactic Factor 7
16. NK : Natural Killer
17. Rb : Rubidium
18. RPMI : Roswell Park Memorial Institute

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Senyawa yang terkandung dalam mimba (*Azadirachta indica*).. 13

Tabel 4.1. Tabel rerata efek sitotoksik ekstrak daun mimba terhadap sel 31

HeLa.....



DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1. Gambar rerata efek sitotoksik ekstrak daun mimba terhadap sel HeLa.....	33
Gambar 4.3. Gambar Analisa Probit Letal Konsentrasi.....	66



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kelompok Konsentrasi Ekstrak.....	42
Lampiran 2. Hasil Analisis Data dengan SPSS 19.0 For Windows.....	42
Lampiran 2.1. Hasil Tes Normalitas.....	42
Lampiran 2.2. Hasil Tes Homogenitas.....	42
Lampiran 2.3. Hasil Uji Kruskal Wallis.....	43
Lampiran 2.4. Hasil Uji Beda (Mann Whithney).....	44
Lampiran 2.5. Tabel Hasil Uji Mann Whitney.....	58
Lampiran 3. Tabel rerata efek sitotoksik ekstrak daun mimba (<i>Azadirachta indica</i>) terhadap sel hela pada berbagai konsentrasi ekstrak.....	58
Lampiran 4. Hasil Analisis Data dengan SPSS 19.0 For Windows (Letal Concentration 50).....	60
Lampiran 5. Gambar-gambar Penelitian	63
Gambar 5.1. Inkubator.....	61
Gambar 5.2. Sentrifuge.....	61
Gambar 5.3. Sel Hela yang telah di subkulturkan (dalam flask) dimasukkan kembali dalam inkubator	61
Gambar 5.4. Sel Hela dalam mikroskop inverted (Belum Konfluen).....	61
Gambar 5.4. Sel Hela dilihat dalam mikroskop inverted (Konfluen)....	62
Gambar 5.5. Plating dengan konsentrasi dosis ekstrak.....	62
Gambar 5.6. Plate inkubator.....	62

Intisari

Sel Hela merupakan sel kanker serviks yang dapat bermetastasis dengan cepat. Daun mimba merupakan tanaman multifungsi yang dapat digunakan sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel HeLa (sel kanker serviks) khususnya pada LC 50.

Penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* ini menggunakan $1,08 \times 10^6$ sel HeLa, dibagi dalam 10 kelompok yang dimasukkan kedalam sumuran dengan pemberian konsentrasi ekstrak daun mimba 1 $\mu\text{l/ml}$, 2,5 $\mu\text{l/ml}$, 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 500 $\mu\text{l/ml}$ dan 1000 $\mu\text{l/ml}$, menggunakan kontrol doksorubisin dan sel. Pengaruh efek sitotoksik berupa kematian sel diamati dengan metode *direct counting* dengan pewarnaan tryphan blue.

Hasil rerata efek sitotoksik tertinggi terdapat pada kelompok 1000 $\mu\text{l/ml}$ (87,50 %), sedangkan rerata terendah terletak pada kelompok 1 $\mu\text{l/ml}$ (39,17 %). Hasil uji *kruskal walis* didapatkan perbedaan bermakna dengan $p = 0,008$. Hasil analisis *Mann Whitney* menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna diantara tiap konsentrasi ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) maupun pada kelompok kontrol ($p > 0,05$). Analisis efek sitotoksik menggunakan probit pada LC 50 terletak pada konsentrasi 8.23027 $\mu\text{l/ml}$.

Dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) mempunyai pengaruh terhadap sel hela dengan dosis minimum 8.23 $\mu\text{l/ml}$.

Kata kunci: Kanker Serviks, Sel Hela, Daun Mimba, Efek Sitotoksik

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Kanker leher rahim (kanker serviks) merupakan kanker terbanyak kedua yang diderita oleh seluruh wanita di dunia yang merupakan penyebab utama terjadinya kematian, khususnya di negara yang sedang berkembang. Sampai saat ini, kira-kira terdapat 500.000 kasus kanker serviks setiap tahunnya. Kanker ini paling banyak diderita oleh wanita di Indonesia dan angka kematian akibat kanker tersebut di Indonesia pun cukup tinggi (Hawari, 1998). Prevalensi kanker serviks di Provinsi Jawa Tengah dari tahun ke tahun semakin meningkat, dari 0,02% pada tahun 2006, menjadi 0,03% pada tahun 2007, dan pada tahun 2008 masih tetap 0,03%. Pada tahun 2007, prevalensi tertinggi adalah di Kota Semarang sebesar 0,22% (Depkes, 2009). Sel kanker serviks yang telah diisolasi dikenal sebagai sel hela. Sel ini berawal dari sel serviks normal yang cepat tumbuh dan akhirnya mengalami hiperplasi. Hal ini diakibatkan karena infeksi Human Papilloma Virus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel normal. *Viral* tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses deregulasi siklus pertumbuhan sel inang yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin dan DiMaio, 2000). Pengobatan konvensional yang umum dilakukan pada penyakit kanker antaranya dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi (Apantaku 2002). Namun, terapi kanker secara pembedahan tidak dapat dilakukan

khususnya pada sel kanker yang telah menyebar (metastasis), sementara pengobatan kemoterapi dan radiasi dapat menimbulkan efek samping meskipun pengobatan kemoterapi mampu mengeluarkan keseluruhan tumor. Karena itu, usaha pencarian agen kemoterapi dari bahan alami yang menasarkan target aksinya pada agen pengatur pertumbuhan atau proliferasi sel dengan efek samping minimum sangat diperlukan dalam pengobatan penyakit kanker. Usaha untuk mengobati penyakit kanker dengan obat tradisional semakin banyak dilakukan karena alasan biaya yang lebih murah, lebih mudah didapat, efek samping yang relatif kecil, dan dapat diramu sendiri (Kintoko et al, 2008).

Ekstrak tumbuhan telah lama digunakan dalam pengobatan penyakit kanker (Newman et al. 2000). Uji antiproliferasi/sitotoksitas menyediakan data permulaan yang penting untuk membantu dalam pemilihan ekstrak-ekstrak tumbuhan yang berpotensi sebagai agen antineoplastik (Kintoko et al, 2008). Penelitian untuk mendapatkan obat anti kanker antara lain dilakukan dengan menggali senyawa-senyawa alam yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Hal tersebut dikarenakan kecenderungan masyarakat untuk kembali ke alam (*back to nature*) semakin tinggi dengan lebih memilih menggunakan obat-obatan tradisional (Mangan, 2003). Keanekaragaman hayati Indonesia sangat berpotensi dalam penemuan senyawa baru yang berkhasiat sebagai antikanker. Salah satunya tanaman yang digunakan adalah family *Meliaceae*. Mimba (*Azadirachta indica*) merupakan tanaman multi fungsi, karenanya tanaman ini juga dikenal sebagai *Wonderful tree* yang kaya dengan kandungan kimia, yang sudah diketahui antara lain *Azadirachtin*, *minyak gliserida*, *asam (asetiloksifuranil, dekahidrotetrametil,*

oksosiklopentanatolfuran, Asetat, keton (heksahidro), hidroksitetrametil, fenantenon (nimbol)) yang terletak di dalam biji dan daunnya. Karena kandungan itulah mimba sering digunakan untuk mengobati *anti diabetic, anti diare, anti piretik* (penurun panas) dan *anti bilious*, dan pada saat ini banyak penelitian yang menunjukkan bahwa tanaman mimba dapat digunakan sebagai obat antikanker (Hatmanani, 2010).

Penelitian sebelumnya pada September 2002 menunjukkan bahwa ekstrak daun Mimba (*Azadirachta indica*) LC 50 diketahui efektif sebagai obat anti kanker terhadap beberapa jenis lini sel kanker manusia, bahkan mampu menghambat perkembangan HIV yang menjadi penyebab penyakit AIDS. Dalam penelitian tersebut dikatakan bahwa daun mimba mengandung *azadiractin* (C₃₅H₄₄ dan O₁₆) serta komponen lain yang diklaim sebagai racun yang efektif terhadap sel kanker tersebut. Namun penelitian tersebut hanya membahas seputar pada kanker A498 (*kidney*), EVSA-T (*breast*), H226 (*lung*), IGROV (*ovarian*), M19 (*melanoma*), MCF7 (*breast*), dan WiDR (*colon*) dan penelitian tentang sel hela (kanker servik) belum pernah dilakukan, padahal mengingat prevalensi yang ada, kejadian kanker serviks tidaklah sedikit (Wahyuningsih, 2002).

Uji klinik sebelumnya untuk menentukan efek daun mimba juga pernah dilakukan terhadap penderita scabies (penyakit kulit). Sebanyak 814 penderita diberi campuran antara mimba dan kunyit *Curcuma longa* menunjukkan kesembuhan 97%. Dan tidak ada efek racun dalam pengamatan. Oleh karena alasan itulah, perlu diteliti lebih lanjut efek sitotoksik ekstrak daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel HeLa (Sel kanker servik).

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Adakah pengaruh ekstrak daun Mimba (*Azadirachta indica*) pada sel HeLa (Sel kanker servik) secara in vitro.

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel HeLa (Sel kanker servik).

1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Untuk mengetahui adanya perbedaan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dalam dosis konsentrasi 1 $\mu\text{l/ml}$, 2,5 $\mu\text{l/ml}$, 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 500 $\mu\text{l/ml}$ dan 1000 $\mu\text{l/ml}$ terhadap sel hela.

1.3.2.2. Untuk mengetahui adanya efek sitotoksik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dalam dosis konsentrasi 1 $\mu\text{l/ml}$, 2,5 $\mu\text{l/ml}$, 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 500 $\mu\text{l/ml}$ dan 1000 $\mu\text{l/ml}$ terhadap sel hela.

1.3.2.3. Menentukan nilai LC50 ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*)

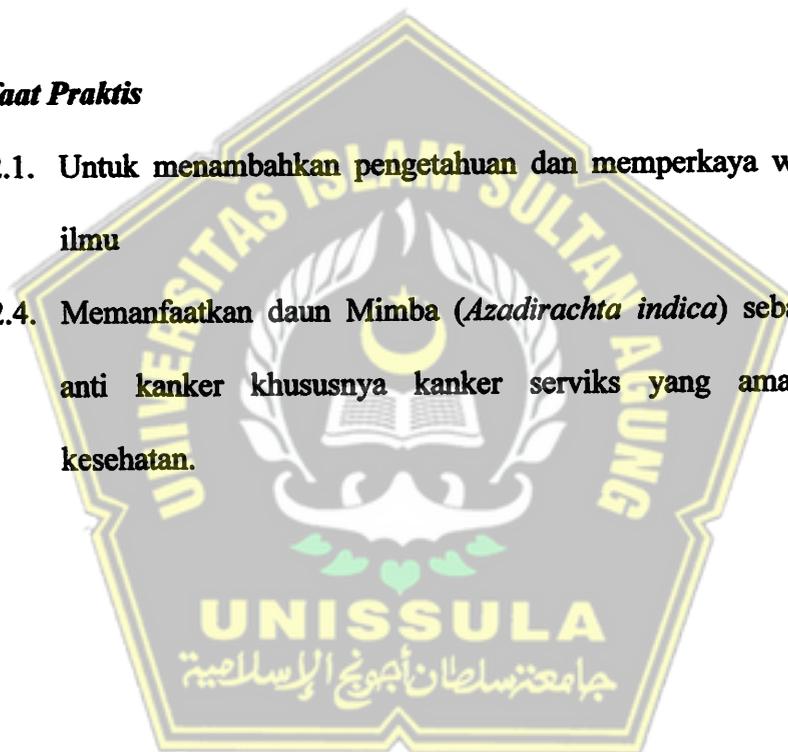
1.4. MANFAAT

1.4.1. *Manfaat Teoritis*

- 1.4.1.1. Memberi masukan dan informasi ilmiah tentang zat-zat yang terkandung dalam daun Mimba (*Azadirachta indica*) dan efek sitotoksik yang timbul.
- 1.4.1.2. Sebagai bahan rujukan untuk penelitian lebih lanjut

1.4.2. *Manfaat Praktis*

- 1.4.2.1. Untuk menambahkan pengetahuan dan memperkaya wawasan ilmu
- 1.3.2.4. Memanfaatkan daun Mimba (*Azadirachta indica*) sebagai zat anti kanker khususnya kanker serviks yang aman bagi kesehatan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker Serviks

2.2.1. Definisi

Kanker leher rahim (kanker Serviks) adalah tumor ganas yang tumbuh di daerah leher rahim (serviks), yaitu suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang merupakan pintu masuk ke arah rahim yang terletak antara rahim (uterus) dan liang senggama (vagina). Kanker leher rahim terjadi jika sel-sel yang ada di daerah tersebut membelah secara tak terkendali dan menjadi abnormal. Jika sel-sel tersebut terus membelah, maka akan terbentuk suatu massa jaringan yang disebut tumor. Tumor dapat bersifat jinak atau ganas. Jika tumor tersebut menjadi ganas, maka keadaanya disebut sebagai kanker leher rahim (Wahyuningasih, 2002).

2.2.2. Etiologi dan Faktor Risiko

Penyebab dari terjadinya kelainan pada sel-sel leher rahim tersebut tidak diketahui secara pasti, tetapi terdapat beberapa faktor risiko yang dapat berpengaruh terhadap terjadinya kanker serviks tersebut, yaitu :

2.2.2.1. Ras

Pada ras Afrika-Amerika kejadian kanker leher rahim meningkat sebanyak 2 kali dari Amerika Hispanik. Sedangkan untuk ras Asia-amerika memiliki angka kejadian yang sama dengan warga Amerika. Hal ini berkaitan dengan faktor sosioekonomi.

2.2.2.2. HPV (*Human Papilloma Virus*)

HPV adalah suatu virus yang dapat menyebabkan terjadinya kutil pada daerah genital (kondiloma akuminata), yang ditularkan melalui hubungan seksual. HPV sering diduga sebagai penyebab terjadinya perubahan yang abnormal dari sel-sel leher rahim.

2.2.2.3. Merokok

Merokok merupakan penyebab penting terjadinya kanker leher rahim jenis karsinoma sel skuamosa. Faktor risiko meningkat 2 kali dengan risiko tertinggi didapatkan pada orang yang merokok dalam jangka waktu lama dengan intensitas yang tinggi (jumlah yang banyak).

Tembakau yang terkandung dalam rokok dapat menurunkan sistem kekebalan tubuh dan mempengaruhi kemampuan tubuh untuk melawan infeksi HPV pada serviks.

2.2.2.4. Hubungan seksual pertama dilakukan pada usia dini

Hubungan seksual pertama kali sebelum usia 16 tahun berkaitan dengan peningkatan risiko kanker leher rahim 2 kali dibandingkan wanita yang melakukan hubungan seksual setelah usia 20 tahun.

2.2.2.5. Berganti-ganti pasangan seksual

Kanker leher rahim juga berkaitan dengan jumlah partner seksual. Semakin banyak partner seksual maka semakin meningkat risiko kanker leher rahim. Peningkatan paritas (jumlah kehamilan) juga merupakan faktor risiko kanker leher rahim.

2.2.2.6. Gangguan sistem kekebalan tubuh

Pada wanita imunokompromise (penurunan kekebalan tubuh) seperti transplantasi ginjal dan HIV, dapat mengakselerasi (mempercepat) pertumbuhan sel kanker dari noninvasif menjadi invasif (tidak ganas menjadi ganas).

2.2.2.7. Pemakaian pil KB

Penggunaan kontrasepsi pil dalam jangka waktu lama (5 tahun atau lebih) meningkatkan risiko kanker leher rahim sebanyak 2 kali. Penggunaan metode kontrasepsi barrier (penghalang), terutama yang menggunakan kombinasi mekanik dan hormon memperlihatkan penurunan angka kejadian kanker leher rahim yang diperkirakan karena penurunan paparan terhadap agen penyebab infeksi.

2.2.2.8. Infeksi herpes genitalis atau infeksi klamidia menahun

Penelitian epidemiologi memperlihatkan bahwa infeksi HPV terdeteksi menggunakan penelitian molekular pada 99,7% wanita dengan karsinoma sel skuamosa karena infeksi HPV adalah penyebab mutasi neoplasma (perubahan sel normal menjadi sel ganas). Terdapat 138 strain HPV yang sudah diidentifikasi, 30 diantaranya dapat ditularkan melalui hubungan seksual. Dari sekian tipe HPV yang menyerang anogenital (dubur dan alat kelamin), ada 4 tipe HPV yang biasa menyebabkan masalah di manusia seperti 2 subtipe HPV dengan risiko tinggi keganasan yaitu tipe 16 dan 18 yang ditemukan pada 70% kanker leher rahim serta HPV tipe 6 dan 11, yang menyebabkan 90% kasus genital warts (kutil kelamin).

(Wahyuningsih, 2002).

2.2. Sel HeLa

Sel ini pertama kali dikenalkan oleh George Gey di Universitas John Hopkins (1951). Sel ini diisolasi dari sel kanker leher rahim seorang pasien, namun klasifikasi dari sel ini masih diperdebatkan. HeLa bersifat immortal yang tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi dasar bagi sel untuk tetap hidup masih ada. Strain-strain baru dari sel HeLa telah dikembangkan dalam berbagai macam kultur sel, tapi semua sel HeLa berasal dari keturunan yang sama. Sel HeLa telah mengalami transformasi akibat infeksi human papillomavirus 18 (HPV 18) dan berbeda dengan sel leher rahim yang normal.

Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV ini diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat immortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang immortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses deregulasi siklus pertumbuhan sel inang yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin dan DiMaio, 2000).

Protein E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur daur sel. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai *ubiquitin*. Protein E6 juga menstimulasi aktivitas *enzim telomerase*. Sedangkan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan

ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk *cell cycle progression* (DeFilippis et al, 2003).

Sebagian besar sel kanker leher rahim, termasuk sel HeLa, mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk *wild type*. Jadi, gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal ini juga terdapat dalam sel kanker leher rahim. Namun, aktivitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin dan DiMaio, 2000).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Andrea et al, 2009).

Studi menggunakan hewan dan pengamatan pada manusia disimpulkan bahwa insiden timbulnya efek sitotoksik sel hela dipengaruhi oleh banyak factor baik endogen atau eksogen. Beberapa faktor tersebut adalah spesies atau strain, umur, gizi, lingkungan dan jalur pemberian. Perbedaan kepekaan antar spesies atau strain terhadap efek sitotoksik suatu zat dipengaruhi oleh absorpsi, metabolisme dan ekskresi terhadap zat tersebut. Umur secara signifikan berpengaruh pada sitotoksisitas dari beberapa zat, hal ini disebabkan adanya kapasitas metabolisme dan ekskresi terhadap zat tersebut. Status gizi atau makan

mempengaruhi kofaktor dan mekanisme biotransformasi yang penting berkaitan dengan ADME dan sitotoksik. Faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi sitotoksik suatu zat antara lain temperature, kelembaban dan sinar matahari (Priyanto, 2007).

2.3. Mimba (*Azadirachta indica*)

2.3.1. Morfologi

Tanaman *Azadirachta indica* merupakan pohon yang tinggi batangnya dapat mencapai 20 m. Kulit tebal, batang agak kasar, daun menyirip genap, dan berbentuk lonjong dengan tepi bergerigi dan runcing, sedangkan buahnya merupakan buah batu dengan panjang 1 cm. Buah mimba dihasilkan dalam satu sampai dua kali setahun, berbentuk oval, bila masak daging buahnya berwarna kuning, biji ditutupi kulit keras berwarna coklat dan didalamnya melekat kulit buah berwarna putih. Batangnya agak bengkok dan pendek, oleh karena itu kayunya tidak terdapat dalam ukuran besar (Rostiwati, 2007).

Daun mimba tersusun spiralis, mengumpul di ujung rantai, merupakan daun majemuk menyirip genap. Anak daun berjumlah genap diujung tangkai, dengan jumlah helaian 8-16. tepi daun bergerigi, bergigi, beringgit, helaian daun tipis seperti kulit dan mudah layu. Bangun anak daun memanjang sampai setengah lancet, pangkal anak daun runcing, ujung anak daun runcing dan setengah meruncing, gundul atau sedikit berambut. Panjang anak daun 3-10,5 cm (Ambarwati, 2007).

2.3.2. Taksonomi

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak kelas	: Dialypetaleae
Bangsa	: Rurales
Suku	: Meliaceae
Marga	: Azadirachta
Jenis	: <i>Azadirachta indica</i> (Tjitrosoepomo, 2002)

2.3.3. Nama Daerah

Jawa	: Imba, Mimba
Madura	: Membha, Mempheuh
Bali	: Intaran, Mimba
Inggris/Belanda	: Margosier, Margosatree, Neem tree (Rostiwati, 2007)

2.3.4. Kandungan Mimba (*Azadirachta indica*)

Daun *Azadirachta indica* mengandung senyawa-senyawa diantaranya adalah *azadirachtin*, β -sitosterol, *hyperoside*, *nimbolide*, *quercetin*, *quercitrin*, *rutin*, *azadirachtin*, dan *nimbine*. Beberapa diantaranya diungkapkan memiliki aktivitas antikanker (Agrawal, 2004). Sedangkan dari sumber lain, Daun *Azadirachta indica* mengandung *azadirachtin*, *nimbin*, *nimbine*, *6-desacetylbimbine*, *nimbolide* dan *quercetin* (Biswas, 2002).

Pada penelitian Agrawal (2002), menunjukkan beberapa senyawa yang terkandung dalam tanaman mimba diantaranya tertera dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Senyawa yang terkandung dalam mimba (*Azadiracta indica*)

Sumber	Kandungan mimba	Aktivitas biologi
Minyak dan Biji	Nimbidin	Anti Inflamasi Anti Arthritis Anti Piretik Anti Ulkus Gastrik Spermisida Anti jamur Anti Bakteri Diuretic
	Na- Nimbidine	Anti Inflamasi
	Nimbine	Spermisida
	Nimbolite	Anti Bakteri Anti Malaria
	Gedhunine	Anti Malaria Anti Jamur
	Azadirachtine Mahmodine	Anti Malaria Anti bakteri
Batang	Gallic acid, Epichatekin, dan Katekin	Anti Inflamsi dan imunomodulatory
	Margolon, Margolonone dan iso-margolonone	Anti Bakteri
Batang dan Daun	Cyclic trisulphide dan cyclic tetrasulphide	Anti jamur
	Polisacharida	Anti Inflamasi dan anti tumor
	Limonoids NB-II Peptidoglican	Anti oksidan Immunomodulatory

2.3.5. Pemanfaatan Mimba (*Azadirachta indica*)

Tanaman *Azadirachta indica* mempunyai beberapa kegunaan. Di India tanaman ini disebut "*The Village Pharmacy*", dimana *Azadirachta indica* Juss, digunakan untuk penyembuhan penyakit kulit, antiinflamasi, demam, antibakteri, antidiabetes, penyakit kardiovaskular, dan insektisida. Daun *Azadirachta indica*

Juss juga di gunakan sebagai repelan, obat penyakit kulit, hipertensi, diabetes, *anthelmintika*, ulkus peptik, dan antifungi. Selain itu bersifat antibakteri dan antiviral (HNM, 2010).

Seduhan kulit batangnya digunakan sebagai obat malaria. Penggunaan kulit batangnya yang pahit dianjurkan sebagai *tonikum*. Kulit batang yang ditoreh pada waktu tertentu setiap tahun menghasilkan cairan dalam jumlah besar. Cairan ini diminum sebagai obat penyakit lambung di India. Daunnya yang sangat pahit, di Madura digunakan sebagai makanan ternak. Rebusannya diminum sebagai obat pembangkit selera makan dan obat malaria (Anne, 2007).

2.4. Uji Sitotoksik

Sitotoksik terdiri dari 2 kata yaitu; Sito yang artinya sel dan Toksik yang berarti racun. Jadi sitotoksik itu sendiri berarti racun yang dapat membunuh atau meracuni sel tersebut. Pada percobaan ini khususnya pada sel hela. Sitotoksik dari tiap sel itu berbeda. Hal itu terjadi berdasarkan sifat dari sel itu sendiri dan kemampuan *apoptosis* dari masing-masing sel. Begitu juga dengan uji sitotoksik dari sel itu, mempunyai prinsip yang berbeda.

Apoptosis merupakan kegagalan dari sistem pertahanan tubuh manusia untuk mengenali dan mengeliminasi sel kanker pada leher rahim merupakan penyebab dari makin berkembangnya penyakit ini (Manal et al, 2009).

Uji aktivitas antiproliferasi dilakukan pada kultur sel kanker HeLa, menggunakan metode uji metilen biru atau triplen blue yang telah dilaporkan oleh Lin & Hwang (1993) dan menggunakan media RPMI-1640. Dengan kontrol

positif digunakan doxorubisin sesuai dosis dan kontrol negatif menggunakan media RPM I-1640 murni. Kemudian diinkubasi 24 jam dan 48 jam. Suhu 37⁰ C, CO₂ 5% (Kintoko et al, 2008).

2.5. Doxorubisin

Mekanisme kerja dari obat – obat anti kanker adalah menghancurkan sel – sel kanker tersebut saat sedang berkembang maupun saat sedang istirahat pada fase G₀. Doxorubisin merupakan obat anti kanker yang telah di percaya efektif dalam penghancuran sel yang sedang berkembang melalui siklus sel (Howland et al., 2006).

2.6. Efek sitotoksis ekstrak daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel

Hela

Mimba, terutama dalam biji dan daunnya mengandung beberapa komponen dari produksi metabolit sekunder yang diduga sangat bermanfaat, baik dalam bidang pertanian (pestisida dan pupuk), maupun farmasi (kosmetik dan obat-obatan). Beberapa diantaranya adalah *azadirachtin*, *salanin*, *meliantriol*, *nimbin* dan *nimbidin*, *Azadirachtin* sendiri terdiri dari sekitar 17 komponen dan komponen yang mana yang paling bertanggung jawab sebagai pestisida atau obat, belum jelas diketahui (Vaidekin et al, 2007). Mimba tidak membunuh hama secara cepat, namun mengganggu hama pada proses makan, pertumbuhan, reproduksi dan lainnya. Sama halnya dengan khasiatnya sebagai obat, Mimba

tidak membunuh kanker atau zat-zat patogen, melainkan mengganggu pertumbuhan dari sel atau zat patogen tersebut.

Selain hal tersebut di atas yang terpenting ternyata daun mimba mengandung polisakarida dan liminoids yang dapat mengobati tumor dan kanker dan efektif untuk melawan leukemia limfositik. Pada beberapa buku dan penelitian juga menggunakan ekstrak daun ini untuk mencegah proses adhesi dari sel kanker ke sel tubuh lain sehingga kanker itu tidak dapat menyebar dan memudahkan untuk rusak (Agrawal, 2004).

Polisakarida adalah senyawa karbohidrat kompleks. Bila dihidrolisis, polisakarida akan menghasilkan lebih dari 6 gugus monosakarida. Contohnya yaitu: Glikogen, Amilum, Selulosa dan Dextrin. Polisakarida terdiri atas dua jenis yaitu *homopolisakarida* (mengandung hanya satu jenis unit monomer) dan *heteropolisakarida* (mengandung dua atau lebih jenis unit monosakarida yang berbeda). Polisakarida biasanya tidak berasa, tidak larut dalam air, dan memiliki berat molekul yang tinggi. Contoh homopolisakarida adalah *pati* yang hanya mengandung unit-unit D-glukosa, sedangkan *asam hialuronat* pada jaringan pengikat mengandung residu dari dua jenis unit gula secara berganti-ganti merupakan contoh dari heteropolisakarida (Trisha, 2004).

Beberapa polisakarida berfungsi sebagai bentuk penyimpanan bagi monosakarida dan yang lainnya berfungsi sebagai unsur struktural di dalam dinding sel dan jaringan pengikat. Glikogen dan pati merupakan polisakarida simpanan yang terdapat pada tumbuhan dan manusia sedangkan selulosa merupakan polisakarida struktural yang berfungsi sebagai tulang semu bagi

tumbuhan. Pati dan glikogen dihidrolisa di dalam saluran pencernaan oleh *amilase*, sedangkan selulosa tidak dapat dicerna. Namun, selulosa mempunyai peran penting bagi manusia karena merupakan sumber serat dalam makanan manusia. Selulosa atau polisakarida struktur adalah polisakarida yang banyak terdapat dalam tumbuhan, terutama pada bagian dinding sel. Selulosa berfungsi untuk menjaga struktur sel tersebut (Ambarwati 2007). Kandungan polisakarida yang ada di dalam mimba tersebut memungkinkan sel yang terkena kanker atau tumor tersebut dapat menjaga struktur sel tersebut, agar sel sekitar yang belum terkena tidak mudah ikut terkena. Polisakarida juga merupakan sumber bahan makanan bagi sel, sehingga sel tersebut mendapat peningkatan ketahanan tubuh.

Liminoid sebagai antioksidan yang dapat menahan mutasi genetik yang dapat menyebabkan kanker. Beberapa peneliti percaya bahwa daun mimba dapat menjadi suplemen untuk mencegah kanker hati, karena daun ini dapat melindungi hati dan mempunyai efek anti kanker pada saat bersamaan (Biswas dkk, 2002). Ini sangat penting, karena hati adalah organ tubuh utama untuk menyaring racun. Molekul ini mengalami suatu reaksi berantai yang menimbulkan jutaan radikal bebas baru yang merusak protein, sel, jaringan, dan organ tubuh. Ia menyebabkan penuaan, perubahan degeneratif, radang, dan penyakit, yang membuat lama hidup lebih singkat. Sederhananya, cara radikal bebas merusak sel tubuh sama dengan proses oksigen membuat kertas putih berubah warna menjadi kuning atau mentega menjadi tengik.

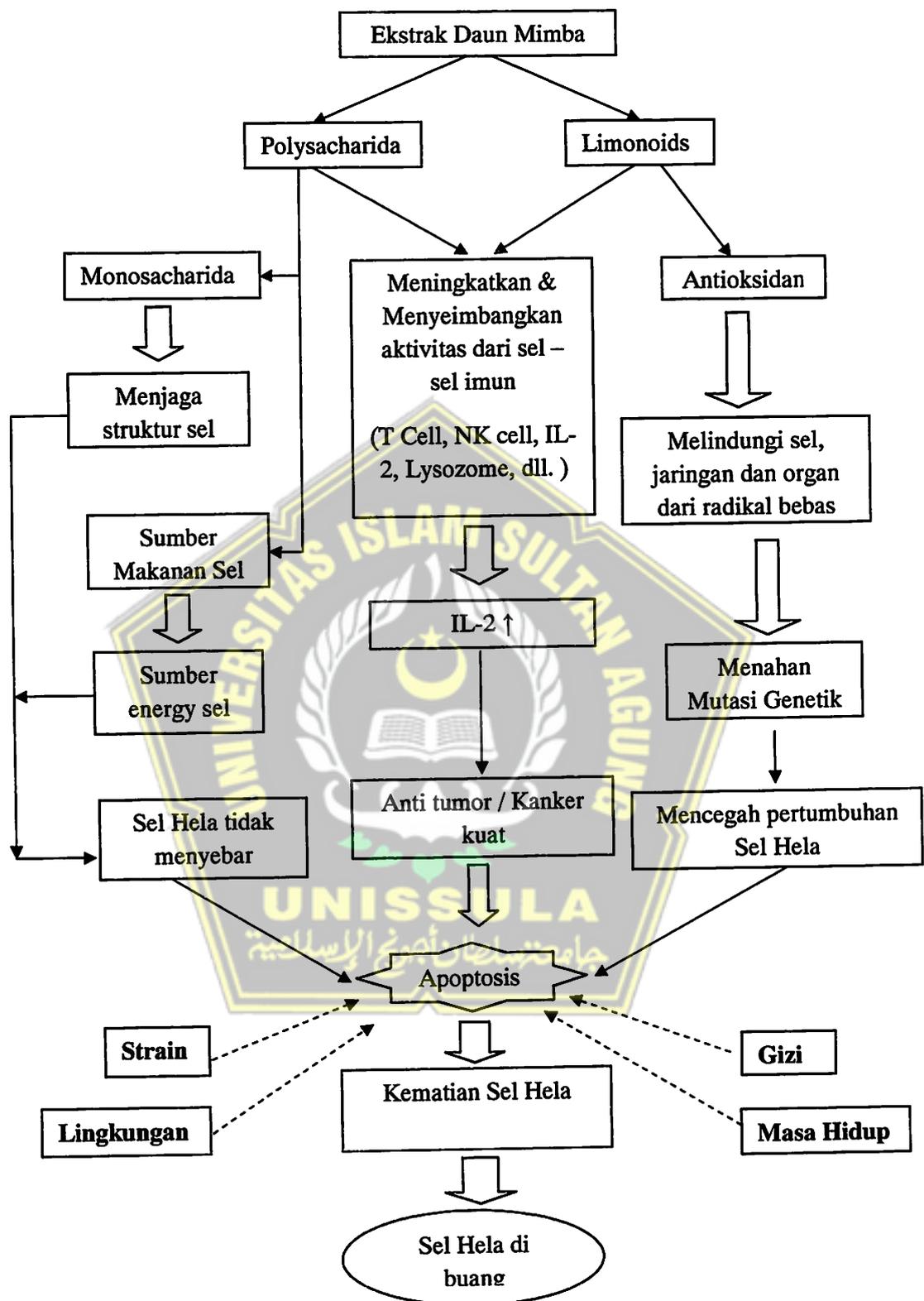
Antioksidan ialah senyawa penetral radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul tak stabil yang terus-menerus menyerang tubuh dari luar

(karena sinar matahari, polusi, asap rokok) dan dari dalam (disebabkan oleh metabolisme dan kehidupan normal). Antioksidan mencegah kerusakan tubuh dengan melindungi protein, sel, jaringan, dan organ sasaran radikal bebas. Antioksidan sudah terbukti secara ilmiah menghambat penuaan, penyakit jantung, berbagai kanker, dan kebutaan, serta memperkuat sistem imun (Trisha, 2004).

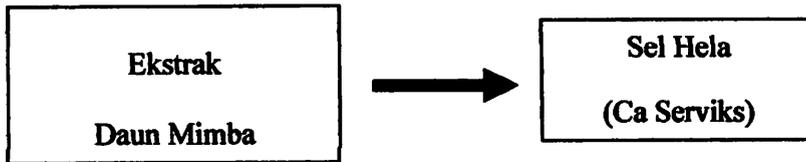
Polisakarida dan liminoid memiliki peranan penting untuk meningkatkan imun atau kekebalan tubuh kita. Sistem imun adalah angkatan bersenjata di dalam tubuh kita. Beberapa penelitian telah mengungkapkan kemampuan mimba untuk mengatur imunitas dengan memimpin dan mengontrol banyak dari fungsi pertahanan tubuh yang penting. Karena efektifitasnya sebagai anti bakteri, antiviral, antifungal dan sebagainya. Polisakarida dari mimba meningkatkan dan menyeimbangkan aktivitas dari semua kelas sel-sel imun, termasuk *T-cells*, *cytotoxic T-cells*, *NK cells*, *lysozyme*, *tumor necrosis factor-alpha*, *IgG* dan *iga* dan *interleukin-2(IL-2)* (Biswas dkk, 2002).

Interleukin-2 adalah *cytokine* (protein sel) penting yang menghasilkan anti-tumor yang kuat yang bereaksi terhadap berbagai jenis kanker. Polisakarida dari mimba telah menunjukkan hasil dalam meningkatkan produksi IL-2. Di Amerika, IL-2 telah dipelajari sebagai faktor yang meningkatkan imunitas sejak 1983, dan telah digunakan untuk beberapa kanker dan untuk infeksi HIV (Andrea et al, 2009). Karena kandungan-kandungan tersebut yang memungkinkan mimba memiliki kemampuan menyebabkan kematian sel-sel tumor dengan cara menghasilkan apoptosis, suatu proses dimana sel-sel kanker meluruh dan dibuang.

2.6. Kerangka Teori

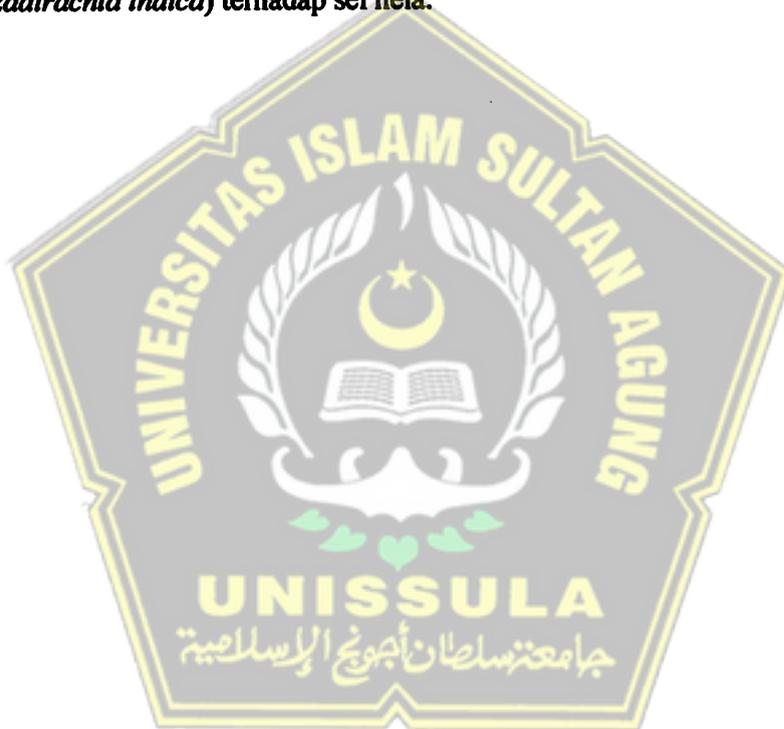


2.7. Kerangka Konsep



2.8. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah terdapat pengaruh ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel hela.



BAB III

METODE PENELITIAN

3. 1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

3. 2. Variabel dan Definisi Operasional

➤ *Variabel*

3. 2. 1. 1. Variabel bebas

Ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*)

3. 2. 1. 2. Variabel tergantung

Efek sitotoksik sel hela (sel kanker serviks)

➤ *Definisi Operasional*

3.2.2.1. Ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*)

Adalah larutan kental yang diperoleh dari pengambilan ekstraksi daun mimba dengan menggunakan pelarut etanol 90% diberikan dengan dosis konsentrasi 1 $\mu\text{l/ml}$, 2,5 $\mu\text{l/ml}$, 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 500 $\mu\text{l/ml}$ dan 1000 $\mu\text{l/ml}$.

Satuan : $\mu\text{l/ml}$

Skala : Ordinal

3.2.2.2. Efek Sitotoksik

Adalah efek yang ditimbulkan pada sel hela setelah pemberian ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dan diuji *in vitro* dengan

menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan menghitung kematian sel secara langsung menggunakan *haemocytometer*.

Satuan : juta / mm³

Skala : Rasio

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah sel hela yang telah dikultur di Laboratorium Biologi FK UNISSULA.

3.3.2. Sampel penelitian

Sampel diambil secara acak yaitu sel hela yang telah dikultur selama ± 24 jam, dengan morfologi yang utuh, dapat berkembang dan tidak rusak dengan kriteria inklusi dan eksklusi yang ada.

3.3.3. Kriteria Inklusi

Sel hela yang dipakai dalam penelitian ini adalah

- ✓ Sel HeLa yang hidup dalam proses pengkulturan dan pencucian untuk digunakan sebagai bahan uji sitotoksik.
- ✓ Sel hela yang mengalami proses pengkulturan dan pencucian yang sama.
- ✓ Sel hela yang diinkubasi pada tempat, suhu dan kondisi yang sama

3.3.4. Kriteria Eksklusi

Sel hela yang tidak digunakan dalam penelitian adalah sel HeLa yang terbilas dalam proses pencucian saat proses pengulturan dan proses pengujian sitotoksik.

3. 4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

- a. Alat untuk kultur Sel hela
 - Flask media
 - Inkubator
 - Labu erlenmeyer
- b. Alat untuk pengolahan atau pembuatan ekstrak
 - Timbangan
 - Tempat pengeringan daun mimba
 - Labu dan tabung destilator
- c. Alat untuk uji sitotoksik
 - *Micro Wheel*
 - Inkubator
 - Pipet

3.4.2. Bahan

- a. Daun Mimba (*Azadirachta indica*)

Daun mimba yang tumbuh di daerah Semarang. Daun ini telah diidentifikasi dan determinasi di Laboratorium Biokimia FK UNISSULA Semarang. Daun yang dipilih adalah daun yang masih segar, tidak

berlubang ataupun sobek, dan warnanya tidak rapuh. Dengan karakteristik sebagai berikut :

- 1) Bentuk : Bentuk bundar telur memanjang tidak setangkup.
- 2) Ukuran : Panjang helaian daun 5 cm, lebar 3 cm sampai 4 cm.
- 3) Warna : Coklat Kehijauan
- 4) Bau : Lemah

b. Bahan untuk kultur sel hela

- 1) sel Hela (sel kanker rahim)
- 2) Media RPMI-1640 (1-glutamin), Foetalbovin serum (FBS), Fungison 0,5%, Penisilin streptomisin 2% (Gibco) atau DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- 3) Larutan tripsin
- 4) Tryplan blue

c. Bahan kimia untuk uji sitotostik

Bahan kimia yang digunakan adalah bahan yang diperoleh dari Laboratorium Biologi FK UNISSULA yang meliputi ;

- 1) Doksorubisin 10 mg/5ml → Kontrol Positif

3. 5. Cara Penelitian

3.5.1. Cara memperoleh Sel Hela

Sel hela didapat dari hasil pengkulturan sel kanker leher rahim yang berada di Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran UNISSULA.

3.5.2. Kultur Sel HeLa

Kultur sel HeLa (kanker serviks) diperoleh dari *American Type Cell Culture* (ATCC), kultur sel disimpan pada *freezing medium* dalam kriovial yang mengandung campuran FBS dan DMSO dengan perbandingan 9:1.

Pengkulturan dan pengsubkulturan sel

Titisan-titisan sel kanker HeLa dikultur dalam medium pertumbuhan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) yang mengandung 5% serum anak sapi (*Fetal Bovine Serum*), 1% penisilin-streptomisin, 1% fungizon dan 0,1% miramisin. Diinkubasi dalam inkubator suhu 37⁰C dengan 5% CO₂.

Pengsubkulturan dilakukan apabila sel telah mencapai konfluen 90%. Medium lama di dalam flask kultur dibuang dan sel dibasuh dengan PBS-EDTA sebanyak 3 kali. Ditambahkan larutan tripsin 0,025% (0,1 ml/cm²) ke dalam flask kultur dan diinkubasi selama 5 menit dalam inkubator pada suhu 37⁰C dengan 5% CO₂. Sel pada dasar permukaan medium yang tanggal ditambah medium pertumbuhan baru dan dibagikan menjadi beberapa flask kultur baru. Sel dieram kembali di dalam inkubator pada suhu 37⁰C dengan 5% CO₂. Semua kerja pengkulturan dan pengsubkulturan sel dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow* (LAF) kelas II.

Sel HeLa ditumbuhkan dalam kultur flask Media RPMI-1640 dengan 10% FBS. Setelah konfluen 60-70% media diganti dan satu hari berikutnya dipanen, dikulturkan dalam tube steril, dan disentrifugasi 1200 rpm/5menit. Supernatan dibuang, pelet diresuspensi dengan media penumbuh 2 ml, dihitung kerapatan sel mencapai $1,08 \times 10^6$ sel/ 100 ml (Goodwin, 2000).

3.5.3. Cara membuat Ekstrak

Metode ekstraksi dipilih berdasarkan faktor seperti sifat bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna dari obat. Sifat bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi (Ansel, 1989).

Prosesnya dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan agung Semarang.

Daun mimba yang telah dipilih terlebih dahulu dikeringkan dibawah sinar matahari sampai kering kemudian mengambil 100 gram daun mimba kering dengan menggunakan timbangan analitis. Masukkan 1000 ml ethanol ke dalam labu destilasi dan jalankan pendingin dan kompor listrik. Percobaan akan selesai setelah terjadi flooding 16 kali (ekstraksi dilakukan kurang lebih selama 4 jam). Hasil ekstrak kemudian dipekatkan (dievaporator) sampai mencapai volume 120 ml ekstrak daun mimba dengan konsentrasi 100%.

3.5.4. Cara Pembuatan larutan uji

Ekstrak daun mimba dibuat konsentrasi 1 $\mu\text{l/ml}$, 2,5 $\mu\text{l/ml}$, 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 500 $\mu\text{l/ml}$ dan 1000 $\mu\text{l/ml}$. Dari 1 mg/ml, lebih dahulu difilter dengan mikrofilter 0,2 mm. Pembuatan ekstrak mimba dengan berbagai konsentrasi, menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut :

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

Keterangan :

- M1 : Konsentrasi awal
- M2 : Konsentrasi akhir
- V1 : Volume larutan sebelum diencerkan
- V2 : Volume larutan setelah di encerkan

3.5.5. Uji Sitotoksik

Uji aktivitas antiproliferasi dilakukan pada kultur sel kanker HeLa, menggunakan metode uji metilen biru atau triplen blue yang telah dilaporkan oleh Lin & Hwang (1993).

Sel Hela diinjeksikan 100 μ l sel tiap sumuran, kemudian diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak daun mimba dosis konsentrasi 1 μ l/ml, 2,5 μ l/ml, 5 μ l/ml, 10 μ l/ml, 25 μ l/ml, 50 μ l/ml, 100 μ l/ml, 250 μ l/ml, 500 μ l/ml dan 1000 μ l/ml. Sebagai kontrol positif digunakan doksorubisin dengan dosis 0,5 mg/ml, dalam 3 wheel. Kontrol lainnya menggunakan kontrol sel dan kontrol media RPM I-1640 murni. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C, CO₂ 5%.

Analisis sitotoksik diambil dengan cara pengamatan yang dilakukan setelah sel Hela diberi perlakuan dan diinkubasi 24 jam, dengan menghitung jumlah sel hidup (viabilitas) yang dapat dibedakan dari sel mati dengan penambahan indikator metilen blue atau tripan blue.

Sel yang hidup ditandai dengan warna sumur yang tetap berwarna ungu, sedangkan sel yang mati warna berubah menjadi putih kekuningan. Untuk memastikan jumlah sel yang mati pada tiap wheel, kita ambil larutan dalam

wheel kita teteskan pada *haemocytometer* kemudian diamati di bawah mikroskop untuk melihat perbedaan antara sel yang diberi perlakuan dengan zat sitotoksik dengan sel kontrol menggunakan pewarnaan Tryphan Blue.

Kontrol negatif (-) sebagai total jumlah sel hidup 100% dan persentase kematian sel (%) yang menggambarkan tingkat sitotoksitas adalah 100% - viabilitas (%) dari tiap konsentrasi dosis uji. Nilai LC50 ditentukan dari grafik persen sel hidup vs log konsentrasi sampel uji (Lieberman et al. 2001).

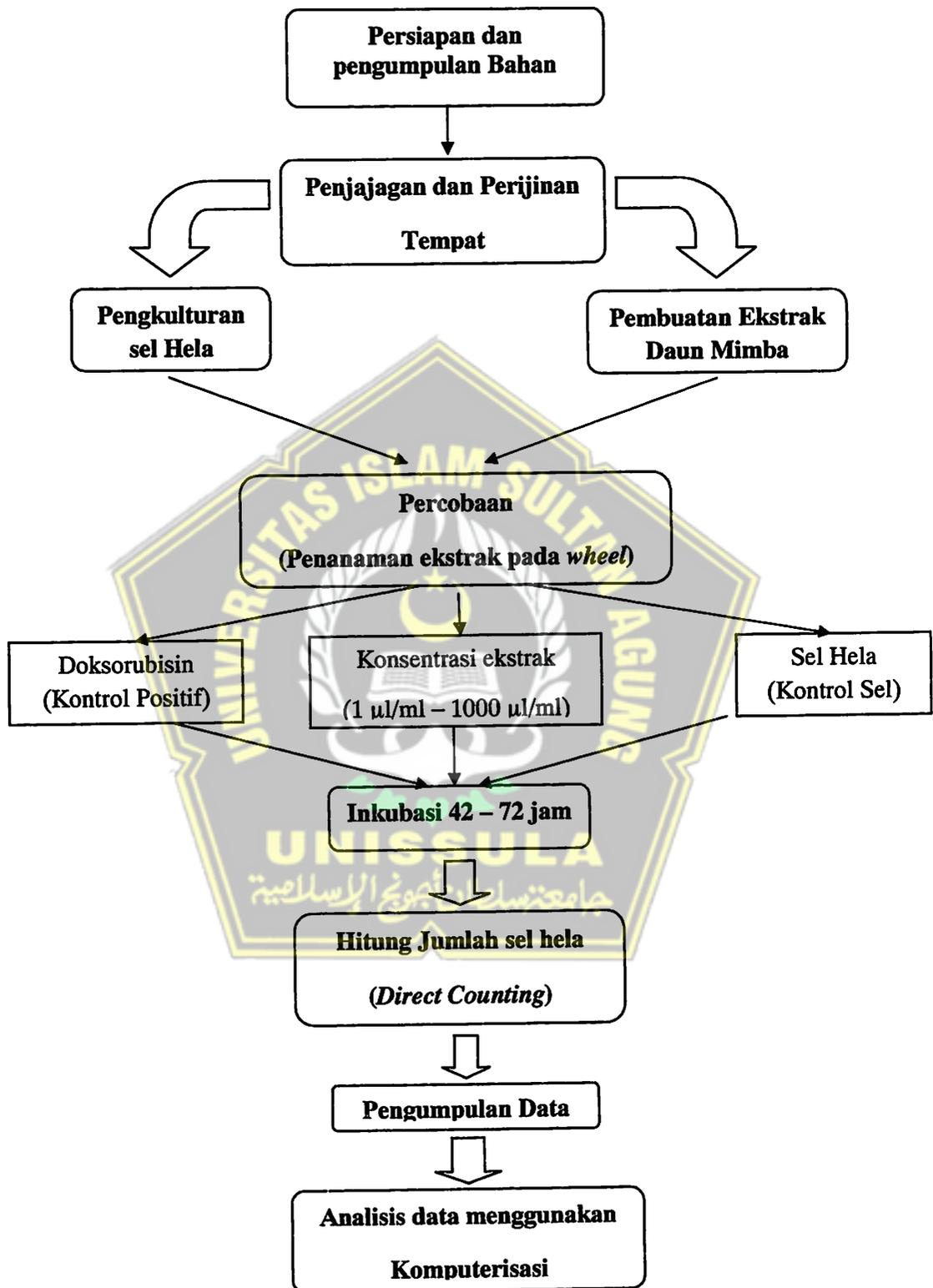
3. 6. Tempat dan Waktu

- Tempat : Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang
- Waktu : Januari 2011 - Februari 2011

3. 7. Analisa Hasil

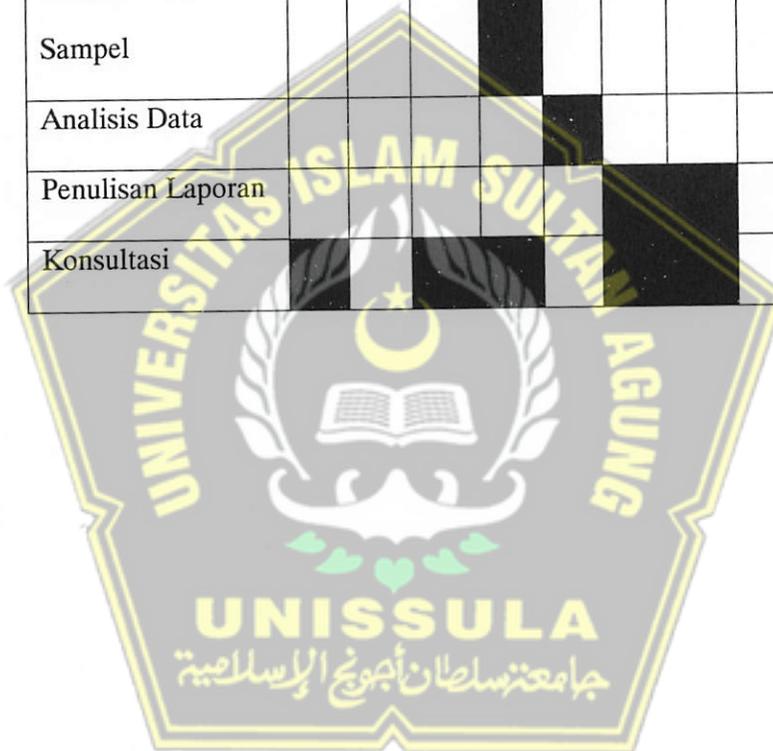
Data kematian sel hela yang diperoleh diolah menggunakan program SPSS. Data tersebut di uji normalitas dan homogenitas dengan *Shapiro-Wilk test* dan *Levene test*, karena data tidak normal dan tidak homogen dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis Test* untuk mengetahui perbedaan antar dua kelompok sampel atau lebih yang dilanjutkan dengan uji parametric *Mann-Whitney test* untuk menguji perbedaan antara kelompok satu dengan kelompok lain. Efek sitotoksitas diperoleh dari total jumlah sel hidup 100% dan persentase kematian sel (%) dari tiap konsentrasi dosis uji. Analisis statistik menggunakan regresi probit.

3. 8. Kerangka Kerja



3. 9. Jadwal Kegiatan

Minggu	Bulan I				Bulan II			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Perencanaan								
Pengumpulan Sampel								
Pengelolaan Sampel								
Analisis Data								
Penulisan Laporan								
Konsultasi								



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

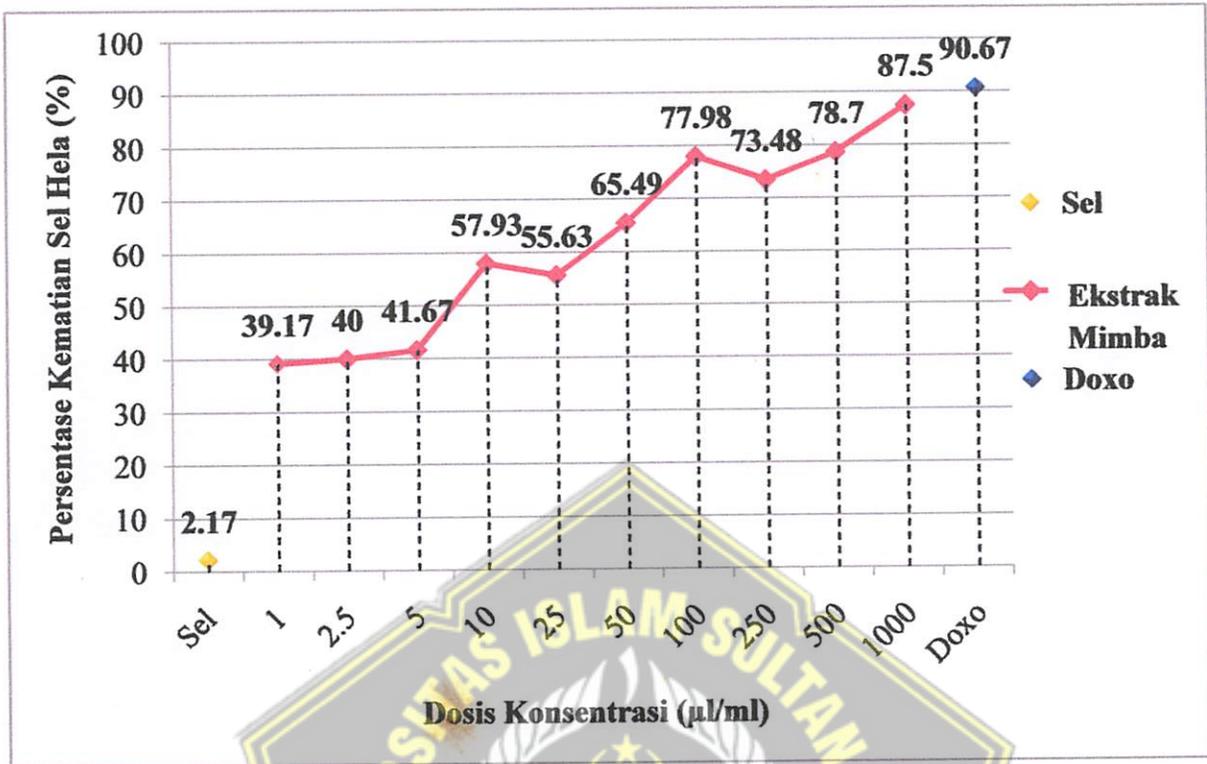
4.1. Hasil Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan kepadatan sampel $1,08 \times 10^6$ sel HeLa yang telah disubkulturkan. Sampel dibagi menjadi 12 kelompok uji yang masing-masing diisi dengan 100 μl kultur sel HeLa dengan kepadatan 3×10^4 sel tiap sumuran, selanjutnya tiap sumuran diberi ekstrak daun mimba konsentrasi 1 $\mu\text{l/ml}$, 2,5 $\mu\text{l/ml}$, 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 500 $\mu\text{l/ml}$ dan 1000 $\mu\text{l/ml}$, kontrol doksorubisin dan sel. Keduabelas kelompok uji tersebut dilakukan pengulangan masing-masing sebanyak tiga kali.

Setelah dilakukan penelitian dan perhitungan dengan menggunakan *haemocytometer* didapatkan hasil rerata persentase efek sitotoksik ekstrak daun mimba terhadap sel hela seperti tertera pada table 4.1. dan grafik 4.1.

Tabel 4.1. Tabel rerata efek sitotoksik ekstrak daun mimba terhadap sel HeLa

Kelompok	Dosis ($\mu\text{l/ml}$)	Persentase Dosis (%)	Persentase Rerata Kematian (%)
1	1	0.1	39.17
2	2.5	0.25	40
3	5	0.5	41.67
4	10	1	57.93
5	25	2.5	55.63
6	50	5	65.49
7	100	10	77.98
8	250	25	73.48
9	500	50	78.7
10	1000	100	87.5
11	Doxo (Kontrol Positif)		90.67
12	Kontrol Sel		2.17



Gambar 4.1. Gambar rerata efek sitotoksik ekstrak daun mimba terhadap sel HeLa

Berdasarkan data pada tabel 4.1 dan gambar 4.1, dapat diketahui rerata efek sitotoksik tertinggi pada kelompok kontrol positif doxorubisin (90,67 %), diikuti kelompok 1000 µl/ml (87,50 %), kemudian kelompok 500 µl/ml (78,70 %), kelompok 100 µl/ml (77,98 %) dan kelompok 250 µl/ml (73,48 %), selanjutnya diikuti dengan kelompok 50 µl/ml (62,83 %), kelompok 10 µl/ml (65,49 %), kelompok 25 µl/ml (55,63 %), kelompok 5 µl/ml (41,67 %), kelompok 2,5 µl/ml (40,00 %) dan kelompok 1 µl/ml (39,17 %). Kelompok sitotoksik terendah terletak pada kelompok kontrol sel, yaitu 2,17 %. (Lihat lampiran 3)

Dari hasil pemeriksaan efek sitotoksik sel HeLa tiap sumuran lalu kemudian data diuji normalitasnya (*Shapiro Wilk*) dan uji homogenitas (*Levene test*). Hasil uji normalitas diperoleh bahwa ada satu nilai $p < 0,05$ yaitu kelompok

konsentrasi 1 $\mu\text{l/ml}$ (0,477), kelompok konsentrasi 2,5 $\mu\text{l/ml}$ (0,144), kelompok konsentrasi 5 $\mu\text{l/ml}$ (0,945), kelompok konsentrasi 10 $\mu\text{l/ml}$ (0,768), kelompok konsentrasi 25 $\mu\text{l/ml}$ (0,519), kelompok konsentrasi 50 $\mu\text{l/ml}$ (0,565), kelompok konsentrasi 100 $\mu\text{l/ml}$ (0,027), kelompok konsentrasi 250 $\mu\text{l/ml}$ (0,230), kelompok konsentrasi 500 $\mu\text{l/ml}$ (0,340), dan kelompok konsentrasi 1000 $\mu\text{l/ml}$ (0,323), sehingga dapat disimpulkan bahwa sebaran data tidak normal, sedangkan hasil uji homogenitas diperoleh nilai 0,001, $p < 0,05$ sehingga varians data tidak homogen. Dengan demikian uji statistik yang digunakan adalah *uji kruskal walis*. Hasil uji *kruskal walis* diperoleh signifikansi adalah 0,008. Oleh karena signifikansi $p < 0,05$, maka disimpulkan bahwa terdapat perbedaan angka kematian sel yang bermakna pada tiap perlakuan dengan zat yang sama. (Lihat lampiran 2) Untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan secara bermakna, maka dilakukan uji analisis lanjut dengan menggunakan uji *Mann Whitney* antara kelompok (Dahlan, 2006).

Nilai signifikansi yang diperoleh dari hasil uji *Mann Whitney* antar kelompok perlakuan dan kelompok kontrol doksorubisin adalah $p > 0,05$ yang berkisar antara 0,050 sampai dengan 0,827 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna diantara tiap konsentrasi ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dan kelompok kontrol doksorubisin. (lihat lampiran 2.4 dan 2.5)

Nilai LC 50 menggunakan analisis regresi probit didapatkan hasil 8.23027 yaitu pada konsentrasi 8.23027 $\mu\text{l/ml}$, sedangkan untuk nilai LC 90 didapatkan hasil 2442.41633 yaitu pada konsentrasi 2442 $\mu\text{l/ml}$. Untuk nilai letal konsentrasi tiap kelompok konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 4.

4.1 Pembahasan

Hasil uji statistik baik dengan *Kruskal Wallis* maupun dengan *Mann Whitney U Test* menunjukkan adanya perbedaan angka kematian sel yang bermakna pada tiap kelompok perlakuan dengan zat yang sama. Hal itu disebabkan selama proses inkubasi adanya senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) khususnya polisakarida dan limonoid telah menghambat aktivitas proliferasi dari sel HeLa sesuai dengan kadar konsentrasi tiap kelompok.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat efek sitotoksik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap pertumbuhan sel HeLa. Hal ini mendukung teori bahwa senyawa-senyawa kimia yang berasal dari alam atau tumbuhan khususnya polisakarida dan limonoid memiliki daya untuk meningkatkan dan menyeimbangkan aktivitas dari semua kelas sel-sel imun sehingga pertahanan tubuh terhadap kanker meningkat dan akhirnya dapat mempercepat *apoptosis* (Agrawal, 2004).

Kegagalan dari sistem pertahanan tubuh manusia untuk mengenali dan mengeliminasi sel kanker pada leher rahim merupakan penyebab dari makin berkembangnya penyakit ini. *Apoptosis* merupakan suatu proses dimana sel-sel kanker meluruh dan dibuang. Sehingga dengan adanya senyawa tersebut akan menghambat proliferasi dari sel tersebut dan selanjutnya akan menyebabkan kematian sel (Biswas et al, 2002).

Kematian sel hela ditandai dengan berubahnya sel menjadi warna biru setelah diwarnai dengan pewarnaan triplan blue. Hal tersebut dapat terjadi karena

sel yang mati memiliki membrane yang rusak sehingga dapat menyerap warna biru dari tryplan blue tersebut. Pemberian senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak mimba (*Azadirachta indica*) merupakan salah satu faktor penyebab rusaknya membrane sel HeLa yang nantinya akan diikuti dengan matinya sel tersebut (Lieberman et al, 2001).

Menurut Iradjajanegara dan Priyo Wahyudi (2010), kecenderungan semakin tinggi konsentrasi ekstrak ceplukan (*Physalis angulata*) semakin banyak kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak tersebut sehingga semakin tinggi pula efek sitotoksik terhadap sel tersebut, tetapi dalam penelitian didapatkan bahwa tiap perbedaan konsentrasi tidak begitu mempengaruhi kadar sitotoksiknya. Hal ini bisa dikarenakan adanya pengenceran dosis yang tidak sesuai. Masa hidup atau umur dari sel juga menentukan adanya pengaruh sitotoksik. Walaupun kadar konsentrasinya rendah, sel hela yang sudah waktunya apoptosis juga akan lebih mudah mati. Menurut Priyanto (2007), penyebab perbedaan kadar sitotoksik disebabkan karena adanya faktor *biochemical uncoupling* yaitu zat - zat yang terkandung didalam ekstrak akan mempengaruhi sintesis molekul ATP tanpa mempengaruhi *transfor electron (normal)* dapat menyebabkan *liberasi energy* sehingga menghasilkan panas. *Biochemical uncoupling* menyebabkan konsumsi oksigen meningkat dan hipertermia. Peningkatan dosis konsentrasi, juga akan meningkatkan jumlah zat yang terkandung didalamnya, efek *biochemical uncoupling* pun juga semakin banyak sehingga efek toksiknya juga akan semakin besar.

Berdasarkan hasil analisis efek sitotoksik dengan metode *direct counting haemocytometer* yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa kelompok doksorubicin memiliki efek sitotoksik tertinggi diikuti dengan kelompok konsentrasi ekstrak, hal tersebut dikarenakan doksorubicin sudah mempunyai komponen senyawa yang utuh untuk membunuh sel hela, sedangkan kelompok ekstrak masih mempunyai beberapa senyawa lain yang kemungkinan menghambat efek sitotoksik selain polisakarida dan limonoid.

Setiap konsentrasi ekstrak tidak memiliki perbedaan yang bermakna terhadap jumlah sel HeLa yang mati, baik pada konsentrasi 1 $\mu\text{l/ml}$, 2,5 $\mu\text{l/ml}$, 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 500 $\mu\text{l/ml}$ dan 1000 $\mu\text{l/ml}$. Hal itu dikarenakan pada konsentrasi berapapun ekstrak tersebut sudah berefek sitotoksik terhadap sel HeLa, sehingga ekstrak tersebut dapat digunakan dengan berbagai macam dosis, namun paling optimal menggunakan kelompok konsentrasi 1000 $\mu\text{l/ml}$.

Kelompok konsentrasi 1000 $\mu\text{l/ml}$ (100%) dan kelompok kontrol positif doksorubicin masih didapatkan sel HeLa yang masih hidup padahal pada kelompok tersebut sudah memiliki konsentrasi yang pekat, ini menunjukkan bahwa sel HeLa merupakan sel yang kuat yang dapat mempertahankan hidup walau tanpa adanya media kultur selama 24 -72 jam. Kemudian, pada kelompok sel masih didapatkan sel HeLa yang mati. Hal ini juga dapat menunjukkan bahwa sel tersebut akan terhambat kerjanya bila tidak dalam media kultur yang sesuai atau tidak ada media kultur.

Analisis LC 50 didapatkan pada dosis kelompok konsentrasi yaitu pada konsentrasi 8.23027 $\mu\text{l/ml}$. Ini menunjukkan bahwa dengan dosis konsentrasi tersebut sel HeLa sudah dapat dimatikan. Bila diberikan dosis kurang dari 8.23027 $\mu\text{l/ml}$ maka sel HeLa akan menjadi resisten terhadap pengobatan (Vincent, 2007). Dosis optimum penggunaan dilihat dari nilai LC 90, yaitu 2442.41633 atau pada konsentrasi 2442 $\mu\text{l/ml}$.

Analisis probit pada LC 1- LC 6 menunjukkan bahwa dengan pemberian dosis konsentrasi ekstrak kurang dari 0,01 $\mu\text{l/ml}$ sel hela dapat mati, hal ini dapat disebabkan karena adanya faktor spesies atau *strain*, umur, gizi, lingkungan, dan jalur pemberian. Dalam penelitian ini yang membuat kematian sel adalah umur dan gizi dari sel HeLa karena pada faktor lainnya, misalnya spesies, lingkungan dan jalur pemberian dilakukan perlakuan yang sama pada plate yang sama dan satu tempat inkubator. Selain faktor tersebut, terbentuknya ikatan kovalen juga merupakan faktor kematian sel HeLa. Karena dengan terbentuknya ikatan tersebut terbentuk zat elektrofilik reaktif yang akan mempengaruhi senyawa pada ekstrak daun mimba (*Azadiracta indica*) karena itulah perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan pemisahan senyawa limonoid dan polisakarida terlebih dahulu (Priyanto, 2007).

Efek samping dan penggunaan dosis ekstrak daun mimba (*Azadiracta indica*) di masyarakat belum dapat diketahui, karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek sitotoksik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel hela secara in vivo yang di ujikan dengan hewan uji.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

5.1.1 Terdapat perbedaan pengaruh ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel hela pada konsentrasi 1 $\mu\text{l/ml}$, 2,5 $\mu\text{l/ml}$, 5 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 50 $\mu\text{l/ml}$, 100 $\mu\text{l/ml}$, 250 $\mu\text{l/ml}$, 500 $\mu\text{l/ml}$ dan 1000 $\mu\text{l/ml}$.

5.1.2 Terdapat efek sitotoksik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel hela. Efek sitotoksik tertinggi terdapat pada kelompok 1000 $\mu\text{l/ml}$ (87,50%), kemudian kelompok 500 $\mu\text{l/ml}$ (78,70%), kelompok 100 $\mu\text{l/ml}$ (77,98%) dan kelompok 250 $\mu\text{l/ml}$ (73,48%), selanjutnya diikuti dengan kelompok 50 $\mu\text{l/ml}$ (62,83%), kelompok 10 $\mu\text{l/ml}$ (65,49%), kelompok 25 $\mu\text{l/ml}$ (55,63%), kelompok 5 $\mu\text{l/ml}$ (41,67%), kelompok 2,5 $\mu\text{l/ml}$ (40,00%) dan kelompok 1 $\mu\text{l/ml}$ (39,17%).

5.1.3 LC 50 di temukan pada konsentrasi 8.23027 $\mu\text{l/ml}$ yaitu dengan nilai regresi probit 8.23027.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

5.2.1 Pemisahan senyawa polisakarida dan limonoid pada ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dengan senyawa lain.

5.2.2 Mengadakan pelatihan terlebih dahulu terhadap peneliti.

5.2.3 Efek sitotoksik ekstrak tumbuhan lain yang lebih efektif menghambat pertumbuhan sel hela.

5.2.4 Efek sitotoksik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel hela secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, D. P. 2004. Medicinal properties of Neem: New Findings. *Current Science : USA*. VOL. 82, NO. 11, 10 JUNE 2002 : 1336-1345.
- Ambarwati. 2007. Efektivitas Zat Antibakteri Biji Mimba (*Azadirachta indica*) untuk Menghambat Pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Staphylococcus aureus*. Universitas Muhammadiyah Surakarta : Surakarta.
- Andrea, Titi Wijayanti, dan Adam Hermawan. 2009. Sel Hela. <http://www.dakdem.com/artikel-bebas/20-biografi/30-henrietta-lacks-dan-sel-hela>. Dikutip tanggal 16 Desember 2009.
- Anne, John. 2007. Membuat Neem Jaring Pengaman Anda. *America Chronicle : USA*.
- Ansel, H.C., 1989. Pengantar Bentuk sediaan Farmasi. Edisi 4. UI Press. Jakarta. Halaman 96,147.
- Apantaku, L.M. 2002. Breast-conseving surgery for breast cancer. *Am. Fam. Physician* 66(12): 2271-2278.
- Biswas, Kausik, Ishita Chattopadhyay, Ranajit K.Banerjee and Uday Bandyopadhyay. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Department of Physiology, Indian Institute of Chemical Biology :Kolkata, India.
- Dahlan, M. Sopiudin. 2006. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan (edisi 4). Salemba Medika : Jakarta.
- Dasgupta, Trisha. 2004. Chemopreventive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems , *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 92 Issue 1 Pages 23-36. Cancer Biology and Applied Molecular Biology Laboratories, School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University : New Delhi, India
- DeFillippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L., DiMaio, D. 2003. Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in Hela Cervical Carcinoma Cells, *Journal of Virology*, Vol.77, no.2, 1551-1563.

- Departemen Kesehatan RI. 2009. Profil Kesehatan Profinsi Jawa Tengah Tahun 2009. Depkes RI: Jakarta.
- Goodwin, E.C., DiMaio, D. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in Hela cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Biochemistry Journal*, Vol.97, no.23.
- Hatmanani, Sen. 2010. Herbal. Erlangga : Jakarta.
- Hawari, Al .L. Plaa. 1998. *Memahami kanser*. Universiti Putra Malaysia : Serdang.
- Health Natural Medicine (HNM). 2010. The Neem tree, village pharmacy. Canada.
- Howland Jonathan ,W. Mangione Thomas, Kuhlthau Karen, Bell Nicole, Heeren Timothy, Lee Marianne, and Levine Sol. 2006. ADDICTION (Work-site variation in managerial drinking). Wiley Online Library. Volume 91. Page 1007-1017.
- Iradjajanegara dan Wahyudi, Priyo. 2010. Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Herba Ceplukan (*Physalis angulata*) terhadap Sel T47D secara Invitro. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia Edisi April 2010*, Vol.8, no.1, hal 41-47.
- Kintoko, Azimahtol Hawariah and Lope Pihie. 2008. Efek Antiproliferasi Ekstrak Kloroform Dari *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Pada Titisan Sel Kanker Manusia Rev. *Universiti Kebangsaan Malaysia: Serdang*.
- K. Vaidekin, S. Jayakumar, R. Rajendran and G. Thilagavathi. 2007. Investigation on the effect of RF air plasma and neem leaf extract treatment on the surface modification and antimicrobial activity of cotton fabric. PSG College of Arts and Science : Coimbatore, India.
- Lehninger. 1987. *Dasar-dasar biokimia jilid 1* [Principles of Biochemistry]. Erlangga : Jakarta. (Original work published: Worth Publisher).
- Lieberman. 2001. Sel Hela. <http://www.dakdem.com/artikel-bebas/20-biografi/30-henrietta-lacks-dan-sel-hela>. Dikutip tanggal 16 Desember 2009.
- Lin KP, Huang SC. 1993. An elastic mapping algorithm for tomographic images, proceeding of annual conferences of biomedical engineering, Oct hal 40-41. *IEEE Trans* : san diego.

- Manal, Shiddiq Ibrahim, Fauziah Othman, and Parichehr Hanachi. 2009. In vivo Anti-tumor Affects of *Azadirachta indica* in Rat Liver Cancer, *Research Journal of Biological Sciences* 4 (1) : 48-53, Medwell Journal.
- Mangan, 2003. Manfaat Obat Tradisional, dalam : Wahyuningsih, Mae S. H. 2002. Efek sitotoksik in vitro dari ekstrak daun mimba(*azadirachta indica* A. juss) terhadap beberapa jenis lini sel kanker manusia.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. 2000. The influence of natural products on drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*17(3): 215-234.
- Priyanto. 2007. TOKSISITAS (Obat, Zat Kimia, dan Terapi Antidotum). LESKONFI : Jakarta Barat.
- Rostiwati, Tati. 2007. Mimba (*Azadirachta indica*). BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KEHUTANAN, DEPARTEMEN KEHUTANAN: Bogor.
- Suhara. 2009. Dasar – Dasar Biokomia. Prima Press : Bandung.
- Tjitrosoepomo, G. 2002. Taksonomi tumbuhan obat-obatan. Universitas Gadjah Mada : Jogjakarta.
- Wahyuningsih, Mae S. H. 2002. Efek sitotoksik in vitro dari ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap beberapa jenis lini sel kanker manusia
- Vincent, Kim. 2007. Probit Analysis. [http:// userwww. sfsu. edu/ ~efc/ classes/ biol710/ probit/ Probit Analysis.pdf](http://userwww.sfsu.edu/~efc/classes/biol710/probit/Probit%20Analysis.pdf). Dikutip 12 Februari 2011.