

**EFEK SITOTOKSIK EKSTRAK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma domestica*  
*Val*) TERHADAP VIABILITAS SEL HELA**

*Study In Vitro*

**Karya Tulis Ilmiah**  
untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



diajukan oleh :

**Absharina Marini Sabila**  
**01.207.5435**

kepada

**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG**  
**SEMARANG**

**2011**

**KARYA TULIS ILMIAH**  
**EFEK SITOTOKSIK EKSTRAK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma domestica*  
*Val*) TERHADAP VIABILITAS SEL HELA**  
*Study In Vitro*

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

**Absharina Marini Sabila**

**01.207.5435**

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
pada tanggal 01 Maret 2011  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Susunan Tim Penguji**

Pembimbing I



dr. Erna Mirani, M.Si.Med

Anggota Tim Penguji



Drs. H. Israhanto, M.Si.

Pembimbing II



dr. Hj. Chpdidjah, M. Kes.

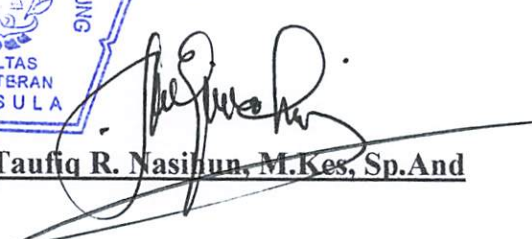


dr. Hj. Qathrunnada Djam'an, M.Si.Med

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*

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpah rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah ini.

Karya tulis ilmiah ini yang berjudul **“EFEK SITOTOKSIK EKSTRAK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma domestica* Val) TERHADAP VIABILITAS SEL HELA *Study In Vitro*”** disusun untuk memenuhi persyaratan dalam mencapai gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Selesainya penyusunan karya tulis ilmiah ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. dr. Taufiq R. Nasihun, M. Kes, Sp. And, selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang telah mengizinkan karya tulis ilmiah ini.
2. dr. Erna Mirani M. Si. Med dan dr. Chodidjah M. Kes, selaku pembimbing yang telah membimbing dan menempa dengan segenap ilmu, waktu dan tenaga dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini.
3. Drs. H. Israhanto, M. Si. dan dr. Hj. Qathrunnada Djam'an, M. Si. Med selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya dalam menguji karya tulis ilmiah ini.

4. dr. Hadi Sarosa, M. Kes selaku koordinator kegiatan ilmiah dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini.
5. Kedua orang tuaku tercinta dan keluarga besarku yang selalu mendoakanku, memberi dukungan, perhatian, dan nasehatnya.
6. Kepada Mba Dina, Mba Ami, Bu Eva, dan Pak Kamami yang selalu membantu selama jalannya penelitian.
7. Kepada teman-temanku satu bimbingan Ocit, Dina, Tina, Risa, Duita, Aziz, Noven, Alfi, atas semua dukungan dan semangat yang diberikan.
8. Kepada anak-anak kontrakan HI yang selalu mengobarkan semangat.
9. Kepada dosen dan teman-teman sejawat laboratorium fisiologi, semua teman REINFORCER, dan semua teman yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu terima kasih atas dukungan dan doanya.
10. Petugas di Laboratorium Kimia Universitas Negeri Semarang, terima kasih atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian.

Semoga amal baik yang diberikan mendapatkan imbalan dari Allah SWT. Akhirnya dengan segala kekurangan yang ada, Penulis berharap KTI ini dapat memberikan sumbangan ilmu pengetahuan.

*Wassalamu'alikum Wr. Wb*

Semarang, 14 Maret 2011

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
PRAKATA .....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR SINGKATAN .....	viii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
INTISARI .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1. Tujuan Umum .....	3
1.3.2. Tujuan Khusus .....	3
1.4. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1. Sel HeLa .....	5
2.2. Kanker Serviks .....	6
2.3. Kunyit ( <i>Curcuma domestica Val.</i> ) .....	7
2.3.1. Klasifikasi .....	7

2.3.1	Morfologi Rimpang Kunyit .....	8
2.3.2	Kandungan Kunyit .....	9
2.3.3	Efek Farmakologis .....	10
2.2.	Sitotoksik .....	12
2.3.	Efek Kunyit ( <i>Curcuma domestica Val.</i> ) Terhadap Sel HeLa	14
2.4.	Kerangka Teori .....	18
2.5.	Kerangka Konsep .....	19
2.6.	Hipotesis .....	19
<b>BAB III</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	<b>20</b>
3.1.	Jenis dan Rancangan Penelitian .....	20
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional .....	20
3.2.1	Variabel .....	20
3.2.2	Definisi Operasional .....	20
3.3.	Populasi dan Sampel .....	21
3.3.1	Populasi .....	21
3.3.2	Sampel .....	21
3.3.3	Kriteria Inklusi .....	21
3.3.4	Kriteria Eksklusi .....	22
3.4.	Alat dan Bahan Penelitian .....	22
3.4.1	Alat Penelitian .....	22
3.4.2	Bahan Penelitian .....	22
3.5.	Cara Penelitian .....	23
3.5.1	Cara Pembuatan Ekstrak Rimpang Kunyit .....	23

3.5.2 Cara Memperoleh Sel HeLa .....	24
3.5.3 Kultur dan Subkultur Sel HeLa .....	24
3.5.4 Cara Perlakuan (Uji Sitotoksitas) .....	25
3.6. Tempat dan Waktu .....	26
3.7. Kerangka Kerja .....	27
3.8. Analisa Hasil .....	28
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>29</b>
4.1. Hasil Penelitian .....	29
4.2. Pembahasan .....	33
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>34</b>
5.1. Kesimpulan .....	37
5.2. Saran .....	38
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>41</b>



## DAFTAR SINGKATAN



AIDS	: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ATCC	: <i>American Type Cell Culture</i>
ATM	: <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
CIN	: <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	: <i>sulfoxide Dimetil</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
FADD	: <i>Fas associated death domain</i>
FBS	: <i>Foetalbovin serum</i>
HELA	: <i>Henrietta Lacks</i>
HPV	: <i>Human Papiloma Virus</i>
IARC	: <i>International Agency for Research on Cancer</i>
LAF	: <i>laminar air flow</i>
LC50	: <i>Lethal Concentration 50</i>
LDH	: <i>laktat dehydrogenase</i>
PARP	: <i>Poly (ADP-ribosa) polimerase</i>
PBS-EDTA	: <i>Fosfat Buffered Saline - ethylenediaminetetraacetic asam</i>
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institut</i>
TNFR	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kandungan kimia dalam rimpang kunyit per 100 gram bahan yang dapat dimakan .....	9
Tabel 2.2. Efek farmakologis zat aktif yang terkandung dalam rimpang kunyit	11
Tabel 4.1. Rerata persentase kematian sel HeLa .....	30
Tabel 4.2. Signifikansi dari <i>independent T test</i> dan <i>mann whithney</i> .....	31



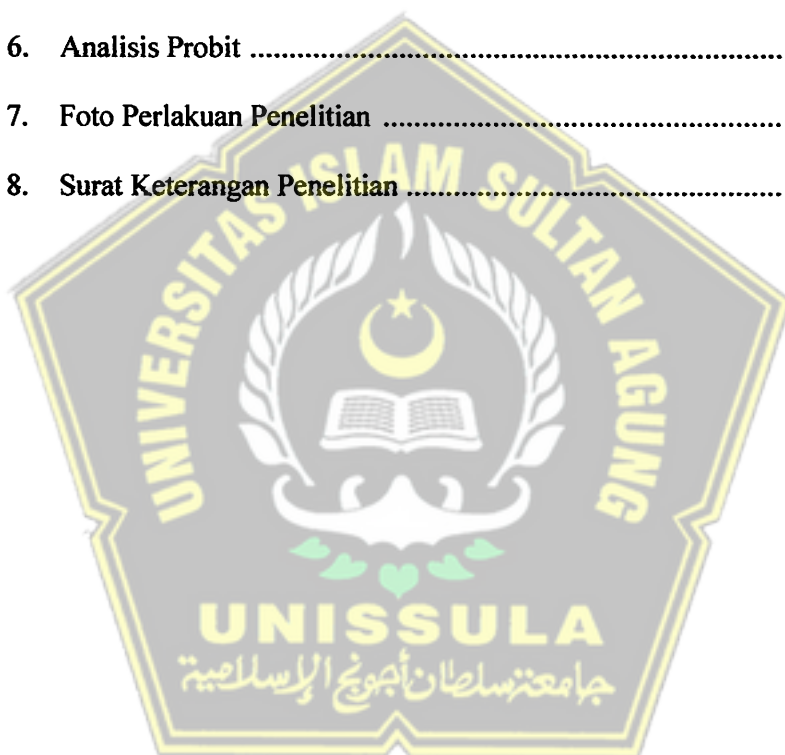
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	<i>Curcuma domestica Val</i> .....	41
Gambar 2.	Sel HeLa .....	70
Gambar 3.	Inkubator .....	70
Gambar 4.	ĻAF̄ .....	71
Gambar 5.	<i>Neubauer Improved</i> .....	71



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Morfologi rimpang kunyit .....	41
Lampiran 2. Cara menghitung viabilitas sel HeLa .....	42
Lampiran 3. Tes Normalitas dan Homogenitas .....	43
Lampiran 4. Tes <i>Kruskal-Wallis</i> .....	44
Lampiran 5. Tes <i>T-Independent</i> dan <i>Mann-Whitney</i> .....	45
Lampiran 6. Analisis Probit .....	68
Lampiran 7. Foto Perlakuan Penelitian .....	70
Lampiran 8. Surat Keterangan Penelitian .....	72



## INTISARI

Kanker serviks adalah kanker pembunuh ketiga pada wanita dengan 529.000 kasus baru di dunia pada tahun 2008. Pengobatan untuk kanker serviks (sitostatika) merusak sel-sel jaringan tubuh terutama yang berproliferasi tinggi. Kunyit diketahui mengandung komponen anti kanker, yaitu kurkumin. Penelitian ini bertujuan untuk mencari efek sitotoksik ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan berbagai konsentrasi terhadap viabilitas sel HeLa (sel kanker serviks yang dikulturkan) secara in vitro.

Penelitian eksperimental dengan *post test only control group design* ini menggunakan sel HeLa yang dibagi menjadi 3 kategori. Kategori pertama sebagai kontrol positif, kedua sebagai kontrol negatif, dan ketiga sebagai perlakuan (sel HeLa diberi ekstrak dengan berbagai konsentrasi). Konsentrasi ekstrak rimpang kunyit yang dipakai yaitu 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, dan 1.000 µg/ml. Jumlah sel HeLa yang hidup dan mati dinilai dengan metode *direct counting* pewarnaan *trypan blue*. Data konsentrasi ekstrak dicari LC50-nya dengan menggunakan analisis regresi probit.

Konsentrasi ekstrak rimpang kunyit yang memberikan efek sitotoksik terbesar adalah pada 250 µg/ml yakni mampu mematikan 74,72 % sel HeLa sedangkan yang terendah pada 25 µg/ml yakni mematikan 44,72 % sel HeLa. Pada penelitian ini LC50 didapatkan hasil 0,657 µg/ml.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa.

Kata kunci: kanker serviks, viabilitas, sel HeLa, sitotoksik, ekstrak rimpang kunyit, kurkumin, LC50.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kanker serviks atau kanker serviks merupakan masalah kesehatan di seluruh dunia. Kanker serviks adalah kanker pembunuh ketiga pada wanita, dengan 529.000 kasus baru di dunia pada tahun 2008 (IARC, 2010). Pengobatan untuk kanker serviks (sitostatika) merusak sel-sel berbagai jaringan tubuh. Jaringan yang paling banyak mengalami kerusakan tentu saja adalah organ-organ yang mempunyai daya proliferasi tinggi, seperti sumsum tulang, mukosa saluran cerna, dan folikel rambut (Reksodiputro, 2006). Karena itu, perlu usaha pencarian agen antikanker dari bahan alami yang mudah didapatkan dan murah dengan efek samping minimum. Keanekaragaman hayati di Indonesia sangat berpotensi dalam penemuan senyawa baru yang berkhasiat sebagai antikanker, salah satunya adalah tanaman kunyit. Dalam hal ini, yang berfungsi sebagai antikankernya adalah zat yang bernama kurkumin (Karunagaran dkk, 2005). Pemakaian kunyit sebagai komposisi dari obat telah dipakai sekitar sebelum abad 20 sebagai agen anti-inflamasi. Kini, selain sebagai anti-inflamasi, kunyit (khususnya kurkumin) juga ditemukan sebagai anti mutagenik dan molekul anti-kanker (Singh, S. and Ashok Khar, 2006). Kurkumin mampu untuk menginduksi apoptosis sehingga tentunya mampu untuk menurunkan viabilitas sel HeLa (sel kanker serviks yang dikulturkan).

Kurkumin bekerja sebagai anti-oxidant dan mampu menginduksi apoptosis (Singh, S. and Ashok Khar, 2006). Kurkumin menghambat proliferasi dan pertumbuhan sel melalui induksi fase S dan fase G2/M dari *cell cycle arrest* kemudian terjadi apoptosis dalam sel tumor. Pada dosis rendah kurkumin menginduksi fase G2/M *cell cycle arrest*. Pada dosis tinggi kurkumin meningkatkan G2/M *cell cycle arrest*. Mekanisme molekulernya diperkirakan bahwa kurkumin meningkatkan ekspresi p53 dalam yang tergantung waktu, diikuti oleh induksi dari ekspresi p21. *Cell cycle arrest* diinduksi oleh kurkumin mungkin dengan mengaktifkan p53 (Susilowati, 2009). Sel HeLa atau HeLa *Cell Line* merupakan sel tumor yang diambil dan dijadikan sampel guna penelitian medis. Sel HeLa tersebut merupakan *immortal cell* (sel abadi) karena mampu bertahan hidup, membelah dan memperbanyak diri dalam jumlah tak terbatas dalam media kultur (anonim, 2010a). 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 serviks (Goodwin dan DiMaio dalam Rosita dkk, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Jaiswal *et al* melaporkan bahwa kurkumin menyebabkan berhentinya fase G2/M dan apoptosis tidak tergantung p53- and p21- pada HCT-116 *cell lines* (*Human colon cancer cell lines*) dengan metode *PARP-1 cleavage* dan (*TUNEL*) *assay* dosis 20  $\mu$ M. Hal itu mengakibatkan penurunan dari viabilitas HCT-116 *cell lines* (Jaiswal, A. S. *et al.*, 2002). Selain itu juga terdapat penelitian mengenai efek anti tumor kurkumin pada kanker serviks Sel Hela secara invitro yang dilakukan oleh Jing *et al*, penghambatan

pertumbuhan dari sel HeLa diamati dengan menggunakan 5-50  $\mu\text{mol/L}$  kurkumin yang diujikan pada sel HeLa tersebut dengan metode MTT. Hasil dari penelitiannya, kurkumin dalam dosis tertentu, mampu menghambat proliferasi sel HeLa (Jing et al, 2007).

Sampai saat ini belum ada penelitian mengenai pengaruh total ekstrak rimpang kunyit pada kanker serviks. Oleh karena itu, tujuan utama penelitian ini adalah untuk mempelajari efek sitotoksik ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dengan berbagai konsentrasi terhadap viabilitas sel HeLa secara in vitro.

## 1.2. Rumusan Masalah

Apakah ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) mempunyai efek sitotoksik terhadap viabilitas sel HeLa ?

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui efek sitotoksik ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) terhadap viabilitas sel HeLa.

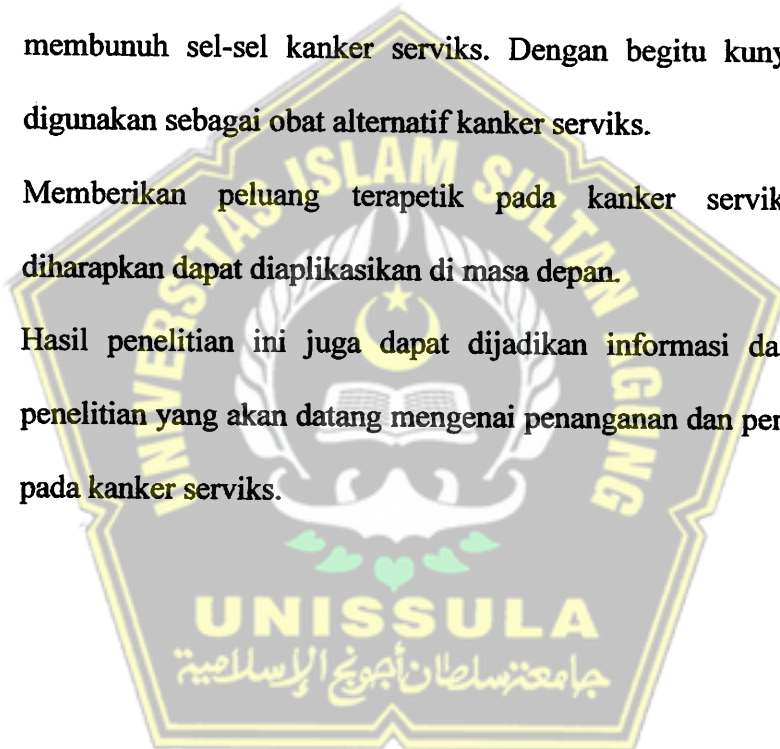
### 1.3.2. Tujuan Khusus

- 1.3.2.1. Untuk mengetahui viabilitas sel HeLa pada Kelompok Kontrol.
- 1.3.2.2. Untuk mengetahui viabilitas sel HeLa setelah pemberian konsentrasi ekstrak rimpang kunyit 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , dan 1.000  $\mu\text{g/ml}$ .

- 1.3.2.3. Untuk mengetahui pada rentang konsentrasi berapakah LC50 ekstrak rimpang kunyit terhadap viabilitas sel HeLa.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

- 1.4.1. Memberikan informasi mengenai kanker serviks.
- 1.4.2. Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai keefektifan rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) dalam membunuh sel-sel kanker serviks. Dengan begitu kunyit dapat digunakan sebagai obat alternatif kanker serviks.
- 1.4.3. Memberikan peluang terapeutik pada kanker serviks yang diharapkan dapat diaplikasikan di masa depan.
- 1.4.4. Hasil penelitian ini juga dapat dijadikan informasi dasar bagi penelitian yang akan datang mengenai penanganan dan pengobatan pada kanker serviks.





## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. SEL HELA

Sel HeLa atau HeLa Cell Line merupakan sel tumor yang diambil dan dijadikan sampel guna penelitian medis oleh dr. George Otto Gey yang berasal dari tumor ganas serviks seorang wanita Virginia bernama Henrietta Lacks. Sel HeLa tersebut merupakan immortal cell (sel abadi) karena mampu bertahan hidup, membelah dan memperbanyak diri dalam jumlah tak terbatas dalam media kultur. Sel HeLa sekarang telah tersebar ke seluruh dunia. Pada tahun 1954, sel HeLa digunakan oleh Jonas Salk untuk mengembangkan vaksin polio. Sel HeLa terus digunakan untuk penelitian kanker, AIDS, ketahanan manusia terhadap gravitasi 0, dan lain-lain (anonim, 2010a).

Sel ini secara morfologi merupakan sel epitelial yang sudah dimasuki oleh *Human Papiloma Virus* (HPV) tipe 18. 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. dalam Rosita dkk, 2009).

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 serviks. Namun, aktivitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin dan DiMaio dalam Rosita dkk, 2009).

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 (Freshney dalam Anggrianti, 2008).

## 2.2. KANKER SERVIKS

Insidensi kelainan prakanker (*cervical intraepithelial neoplasia = CIN*) memuncak pada usia sekitar 30 tahun, sedangkan untuk karsinoma invasif adalah sekitar 45 tahun. Jelas bahwa lesi prakanker memerlukan waktu bertahun-tahun untuk berkembang menjadi karsinoma yang nyata (Kumar et al, 2007).

Kanker serviks adalah kanker pembunuh ketiga pada wanita, dengan 529 000 kasus baru di dunia pada tahun 2008. Rasio insiden adalah 52%, dan kanker serviks bertanggung jawab untuk 275 000 kematian pada tahun 2008, sekitar 88% dari yang terjadi di negara berkembang: 53 000 di Afrika, 31 700 di Amerika Latin dan Karibia, dan 159 800 di Asia (IARC, 2010).

Penatalaksanaan untuk kanker serviks bersifat multidisiplin, mulai dari pendekatan diagnostik yang melibatkan banyak keahlian, kemudian pengobatan kanker yang multimodalitas dengan operasi, radiasi, dan kemoterapi, ataupun kombinasi dari ketiga hal tersebut (Reksodiputro, 2006). Namun sitostatika juga memiliki efek yang merugikan yaitu merusak sel-sel berbagai jaringan tubuh. Jaringan yang paling banyak mengalami kerusakan tentu saja adalah organ-organ yang mempunyai daya proliferasi tinggi, seperti sumsum tulang, mukosa saluran cerna, dan folikel rambut. Efek samping tersebut antara lain gejala gastrointestinal (mual, muntah, diare, dan mukositis), supresi sumsum tulang, kerontokan rambut, kerusakan otot jantung, sterilitas, fibrosis paru, kerusakan ginjal, kerusakan hati, sklerosis kulit, reaksi anafilaksis, gangguan saraf, gangguan hormonal, dan perubahan genetik yang dapat mengakibatkan terjadinya kanker baru (Reksodiputro, 2006).

### 2.3. KUNYIT (*Curcuma domestica Val.*)

#### 2.3.1. Klasifikasi

Klasifikasi tanaman ini sebagai berikut :

- Kingdom : Plantae (tumbuh-tumbuhan)
- Divisio : Spermatophyta (tumbuhan berbiji)
- Subdivisio : Angiospermae (berbiji tertutup)
- Kelas : Monocotyledoneae (biji berkeping satu)
- Ordo : Zingiberales
- Famili : Zingiberaceae

Genus : *Curcuma*

Species : *Curcuma domestica Valet*

(Wahyuni dkk, 2004).

### 2.3.2. Morfologi Rimpang Kunyit

Rimpang kunyit bercabang-cabang membentuk rumpun. Rimpang atau disebut juga akar rimpang berbentuk bulat panjang dan membentuk cabang rimpang berupa batang yang berada di dalam tanah (Lampiran 1). Rimpang kunyit terdiri dari rimpang induk atau umbi kunyit (Jawa: *empu* atau ibu kunyit) dan tunas atau cabang rimpang. Rimpang utama ini biasanya ditumbuhi tunas yang tumbuh ke arah samping, mendatar, atau melengkung. Tunas berbuku-buku pendek, lurus, atau melengkung. Jumlah tunas umumnya banyak. Tinggi anakan mencapai 10,85 cm (Winarto dan Tim Lentera, 2003).

Rimpang kunyit tumbuh dari umbi utama yang berbentuk bulat panjang, pendek, tebal, lurus, dan melengkung. Warna kulit rimpang jingga kecokelatan atau berwarna terang agak kuning sampai kuning kehitaman. Warna daging rimpangnya jingga kekuningan dilengkapi dengan bau khas yang rasanya agak pahit dan pedas (Winarto dan Tim Lentera, 2003).

Rimpang cabang tanaman kunyit akan berkembang secara terus-menerus membentuk cabang-cabang baru dan batang semu, sehingga berbentuk sebuah rumpun. Lebar rumpun mencapai 24,10 cm. Panjang rimpang bisa mencapai 22,5 cm. Tebal rimpang yang tua 4,06 cm dan

rimpang muda 1,61 cm. Rimpang kunyit yang sudah besar dan tua merupakan bagian yang dominan sebagai obat (Winartodan Tim Lentera, 2003).

### 2.3.3. Kandungan Kunyit

Komponen kimia yang terdapat dalam rimpang kunyit diantaranya minyak asiri, pati, zat pahit, resin, selulosa, dan beberapa mineral. Kandungan minyak asiri kunyit sekitar 3-5 %. Sementara itu, komponen utama pati berkisar 40-50% dari berat kering rimpang (Winarto dan Tim Lentera, 2003).

Komponen zat warna atau pigmen pada kunyit yang utama adalah kurkumin, yakni sebanyak 2,5-6 %. Di samping itu kunyit juga mengandung zat warna lain, seperti monodesmetoksikurkumin dan bidesmetoksikurkumin. Setiap rimpang segar kunyit mengandung ketiga senyawa ini sebesar 0,8 %. Pigmen kurkumin inilah yang memberi warna kuning oranye pada rimpang. Selain itu, kurkumin juga memberi sumbangan terhadap karakter kepedasan yang lembut pada rempah (Winarto dan Tim Lentera, 2003).

Kandungan kimiawi dalam rimpang kunyit selengkapnya dapat dilihat di Tabel 2.1 berikut ini.

Tabel 2.1. Kandungan kimia dalam rimpang kunyit per 100 gram bahan yang dapat dimakan

No	Nama Komponen	Komposisi
1	Air	11,4 g
2	Kalori	1480 kal
3	Karbohidrat	64,9 g

4	Protein	7,8 g
5	Lemak	9,9 g
6	Serat	6,7 g
7	Abu	6,0 g
8	Kalsium	0,182 g
9	Fosfor	0,268 g
10	Besi	41 g
11	Vitamin B	5 mg
12	Vitamin C	26 mg
13	Minyak asiri	3%
14	Kurkumin	3%

(Winarto dan Tim Lentera, 2003)

#### 2.3.4. Efek Farmakologis

Kunyit memiliki bau khas aromatik, rasa agak pahit tetapi menyejukkan, dan sedikit pedas. Kunyit juga tidak beracun. Kunyit memiliki efek farmakologis melancarkan darah dan vital energi (energi hidup yang dinyatakan berdasarkan pandangan bahwa makhluk hidup memiliki energi yang berbeda dan tidak tunduk pada hukum termodinamika biasa), menghilangkan sumbatan peluruh haid (emmenagogue), antiradang (anti-inflamasi), mempermudah persalinan, peluruh kentut (carminative), antibakteri, memperlancar pengeluaran empedu (kolagogum), dan pelembap (astringent). Kandungan zat aktif yang terdapat pada rimpang ini juga dapat meningkatkan aktivitas seksual. Tabel 2.2 berikut ini menjelaskan zat aktif rimpang kunyit dan efek farmakologisnya (Winarto dan Tim Lentera, 2003).

Tabel 2.2. Efek farmakologis zat aktif yang terkandung dalam rimpang kunyit

No	Nama Zat Aktif	Efek Farmakologis
1	Caffeic acid	Merangsang semangat, penyegar, mengurangi rasa lelah, antiradang, antikejang, dan antioksidan.
2	L-a dan L-b curcuma	Penyegar
3	Guanicol	Menurunkan kepekaan saraf peraba dan menekan batuk.
4	Protochatechuic acid	Merangsang daya tahan tubuh.
5	Ukanon A, B, C, dan D	Merangsang daya tahan, stamina, dan kekebalan tubuh.
6	Zingiberene	Feromon (zat pengharum obat atau makanan).

(Winarto dan Tim Lentera, 2003)

Aktivitas biologis kunyit adalah sebagai anti-inflamasi, hypocholestremic, choleric, antimikroba, antirheumatic, antibakteri, antiviral, sitotoksik, spasmolytic, sensitif, antidiabetes dan antihepatoberasuc (Govindarajan et al dalam Sasikumar, 2001). Kunyit juga dihubungkan dengan antikanker (Kuttan et al dalam Sasikumar, 2001).

Beberapa kandungan kimia dari rimpang kunyit yang telah diketahui yaitu minyak atsiri, kurkuminoid (kurkumin, desmetoksikurkumin, dan bidesmetoksikurkumin), resin, oleoresin, damar, gom, lemak, protein, kalsium, fosfor, dan besi. (Hernani & Rahardjo, 2005).

## 2.4. SITOTOKSIK

Sitotoksik adalah senyawa atau proses yang dapat meracuni sel, menimbulkan reaksi *cell-killing* (anonim, 2002). Dua mekanisme sitotoksik yaitu: pertama, mekanisme apoptosis, di mana sel efektor memicu kaskade *autolytic* di sel target dan fragmen genom DNA sebelum sel lisis. Kedua, mekanisme litik, di mana molekul litik, terutama perforin, disekresikan oleh sel efektor ke ruang interseluler dan polimerisasi untuk membentuk pori-pori di membran sel target, yang mengarah ke sel lisis (anonim, 2010b).

Uji sitotoksik adalah uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada suatu sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kualitatif dengan cara menetapkan kematian sel. Akhir-akhir ini uji sitotoksik digunakan secara luas menggantikan uji toksisitas secara *in vivo* yang menggunakan hewan. Metode *in vitro* memberikan beberapa keuntungan, antara lain dapat digunakan sebagai langkah awal dalam pengembangan suatu obat, merupakan metode yang cepat, hanya memerlukan sedikit senyawa yang digunakan dalam pengujian, secara drastis dapat mengurangi penggunaan hewan laboratorium dan untuk beberapa tujuan penggunaan kultur sel primer dari bermacam-macam organ target dapat memberikan informasi tentang potensi efeknya pada sel target manusia secara langsung (Doyle dan Griffiths dalam Anggrianti, 2008).



Ada 3 parameter dasar untuk pengukuran sitotoksik. Parameter yang pertama adalah mengukur dari aktivitas metabolik seluler. Indikasi awal dari kerusakan selular adalah reduksi dalam aktivitas metabolik. Tes ini mengukur tingkat metabolisme ATP seluler atau aktivitas mitokondria (melalui metabolisme MTS). Parameter yang kedua yaitu mengukur integritas membran. Membran sel membentuk *barrier* fungsional di sekitar sel, dan lalu lintas masuk dan keluar dari sel sangat diatur oleh transporter, reseptor dan jalur sekresi. Ketika sel-sel rusak, mereka menjadi “bocor” dan ini menjadi dasar untuk tes jenis kedua. Membran integritas ditentukan dengan mengukur dehydrogenase laktat (LDH) dalam medium ekstraselular. Enzim ini biasanya terdapat di dalam sitosol, dan tidak dapat diukur secara ekstrasel kecuali kerusakan sel telah terjadi. Uji yang lain mengukur penyerapan pewarna fluorescent (ethidium DI) yang biasanya dikeluarkan dari sel-sel yang *intact*. Telah ditunjukkan bahwa perubahan dalam aktivitas metabolik adalah indikator yang lebih baik pada cedera sel awal, dan bahwa efek terhadap integritas membran adalah indikasi cedera yang lebih serius, mengarah ke kematian sel. Jenis uji yang ketiga adalah mengukur langsung jumlah sel, karena sel-sel mati biasanya lepas dari *culture plate*, dan hanyut dalam medium. Jumlah sel dapat diukur dengan menghitung sel langsung, atau dengan pengukuran total protein sel atau DNA, yang mana sebanding dengan jumlah sel (anonim, 2010c).

## 2.5. Efek KUNYIT (*Curcuma domestica Val.*) terhadap sel Hela

Kurkumin merupakan turunan diferuloilmetana dari tumbuhan *Curcuma longa* dan mempunyai aktifitas antitumor. Kurkumin dapat menjadi calon obat kanker dengan cara menekan inisiasi, promosi dan metastasis terhadap beberapa tipe tumor. Kurkumin telah dipercaya aman secara farmakologi karena di alam terdapat substansi yang digunakan dalam diet dan obat tradisional oriental untuk berbagai penyakit di Asia tenggara dan India. *Efficacy* (daya sembuh) anti tumor dan toksisitasnya minimal (Susilowati, 2009).

Kurkumin menghambat proliferasi dan pertumbuhan sel melalui induksi fase S dan fase G2/M dari *cell cycle arrest* kemudian terjadi apoptosis dalam sel tumor. Pada dosis rendah kurkumin menginduksi fase G2/M *cell cycle arrest*. Pada dosis tinggi kurkumin meningkatkan G2/M *cell cycle arrest*. Mekanisme molekulernya diperkirakan bahwa kurkumin meningkatkan ekspresi p53 dalam yang tergantung waktu, diikuti oleh induksi dari ekspresi p21. *Cell cycle arrest* diinduksi oleh kurkumin mungkin dengan mengaktifkan p53 (Susilowati, 2009).

Sel pada fase G2 mempunyai mekanisme penghentian siklus sel jika terdeteksi DNA nukleus mengalami kerusakan. Mekanisme ini berfungsi untuk menjaga integritas genom, salah satu pengaturnya adalah gen penekan tumor p53 yang dikenal sebagai *guardian of the genome*. Gen ini mentranskripsi protein p53 yang merespon terhadap kerusakan DNA. Respon tersebut diawali dengan fosforilasi protein p53 dan mdm2 yang dimediasi

*ataxia telangiectasia mutated* (ATM) dan *related ATR serine/threonine kinase*. Fosforilasi ini menyebabkan p53 terlepas dari ikatan mdm2 yang selanjutnya meningkatkan level protein p53. Protein p53 akan meningkatkan ekspresi *CDK inhibitor* (CKI) khususnya p21CIP1 untuk menghentikan siklus sel, sehingga sel mempunyai kesempatan untuk memperbaiki DNA sebelum kembali memasuki siklus sel. Selain itu, protein p53 juga dapat meningkatkan protein proapoptosis dari keluarga Bcl-2 seperti Bax, Noxa, dan Puma, untuk mengaktifkan jalur apoptosis. (Fenton dan Longo, 2008; Moscow dan Cowan, 2007). *Multi-domain* protein keluarga Bcl-2 berperan penting sebagai regulator apoptosis yang dapat dikelompokkan ke dalam para anggota antiapoptotic yang terdiri Bcl-2, Bcl-XL dan MCL-1 serta para anggota proapoptotic seperti Bax dan Bak (Karunagaran, D. *et al*, 2005).

Pada *Ehrlich's Ascites Carcinoma Cells*, kurkumin menginduksi apoptosis dengan cara meningkatkan regulasi protein Bax. Jumlah Bcl-2, sebuah protein anti apoptosis, bagaimanapun, tetap tidak berubah dan karena apoptosis / kelangsungan hidup sangat tergantung pada rasio tingkat seluler protein antiapoptotic dan proapoptotic, sedikit peningkatan dalam jumlah protein proapoptotic seperti Bax akan mengakibatkan kematian sel (Singh, S. and Ashok Khar, 2006).

Apoptosis yaitu fenomena kematian sel secara terprogram . Apoptosis diperlukan dalam sejumlah proses perkembangan untuk menghilangkan sel-sel tertentu pada daerah dimana tipe-tipe sel yang lebih terdiferensiasi atau berbeda akan berkembang. Apoptosis melibatkan pemampatan sel,

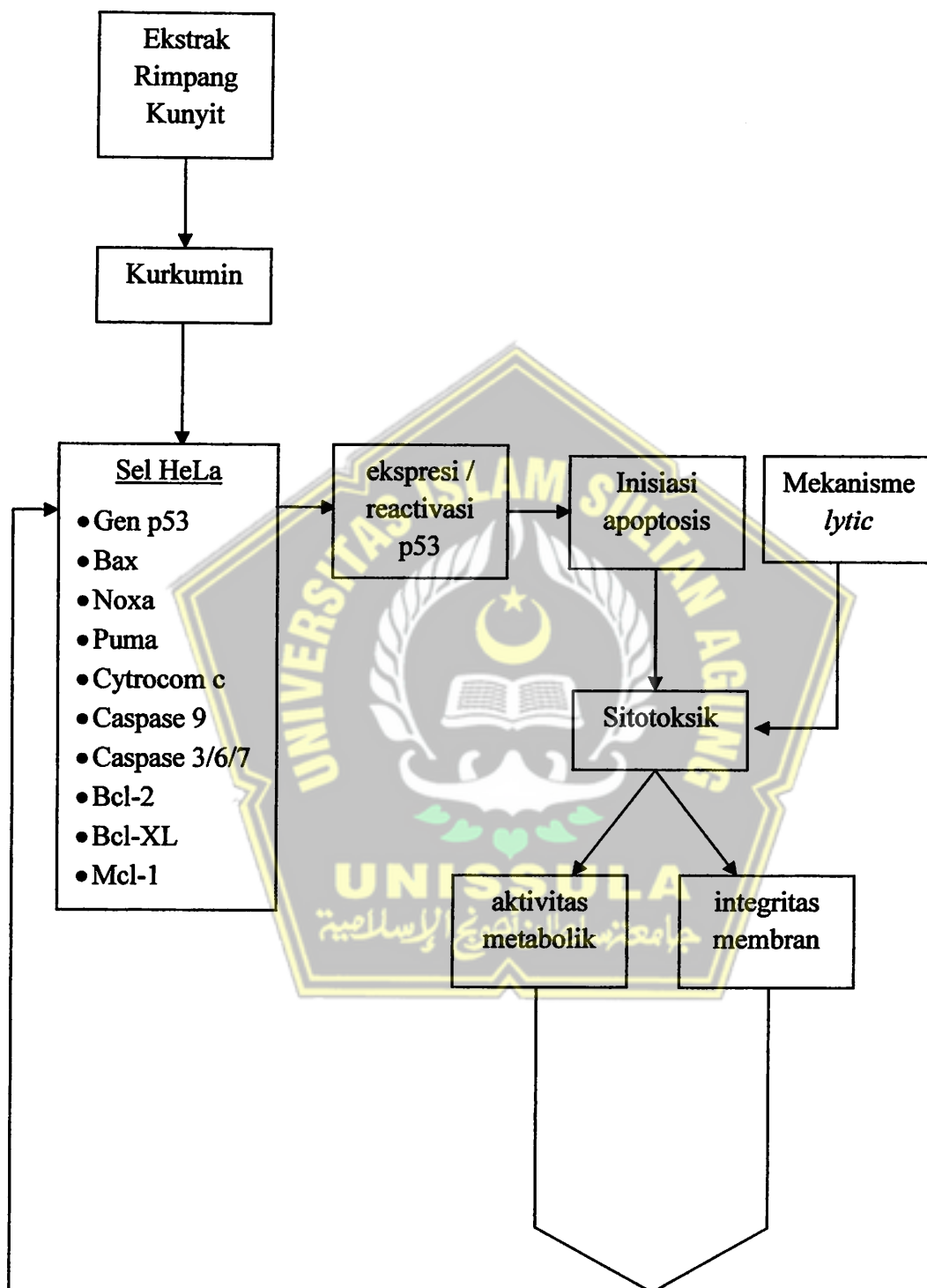
kondensasi kromatin, fragmentasi DNA, dan pengembangan membran. Sel-sel yang mati pada akhirnya hancur dan ditelan oleh sel-sel yang mengelilinginya (Elrod and Stansfield, 2007) .

Dua jalur sinyal apoptosis telah ditemukan pada sel mamalia. Salah satu jalur sering disebut jalur ekstrinsik atau *death receptor pathway* melibatkan sitosol domain anggota TNFR (nekrosis tumor faktor reseptor) keluarga seperti CD 95/Fas dan TRAIL-R1 (TNF-terkait apoptosis induksi ligand-R1) atau TRAIL-R2, yang merekrut procaspase 8. Ligasi reseptor ini menyebabkan oligomerisasi, perekrutan adaptor sitosol FADD (*Fas associated death domain*) dan aktivasi proteolitik dari procaspase 8, yang kemudian menginduksi aktivasi efektor caspase seperti caspase 3, 6 dan 7. Pada jalur intrinsik atau mitokondria, sitokrom c dilepaskan dari mitokondria ke sitosol sehingga berinteraksi dengan protease apoptosis mengaktifkan faktor-1 (Apaf-1) dan aktivasi caspase 9. caspase 9 kemudian mengaktifkan caspase efektor yang menengahi tahap eksekusi menunjukkan ciri karakteristik dari apoptosis, banyak yang mencerminkan pembelahan proteolitik dari berbagai protein intraselular memastikan eliminasi sel. Selain sitokrom c, pelepasan mitokondria kedua yang berasal dari penggerak caspase (Smac) dari mitokondria juga memastikan aktivasi caspase lanjutan. Internucleosomal degradasi, fitur biokimia karakteristik apoptosis, hasil dari pembelahan ICAD (inhibitor caspase diaktifkan DNase atau fragmentasi DNA factor 45/DFF45), yang melepaskan sebuah endonuklease bernama CAD (caspase Dnase diaktifkan) (Karunagaran, D. *et al*, 2005).

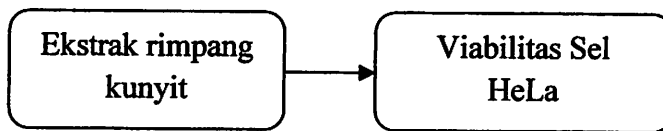
Tentu saja, kegagalan sel untuk mengalami apoptosis fisiologik dapat menyebabkan perkembangan aberan, proliferasi tumor yang tidak terkontrol, atau penyakit autoimun (Kumar et al, 2007).



## 2.6. Kerangka Teori



## 2.7. Kerangka Konsep



## 2.8. Hipotesis

Terdapat efek sitotoksik dari ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val.*) terhadap viabilitas sel HeLa.



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenis Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*.

#### **3.2. Variabel dan Definisi Operasional**

##### **3.2.1. Variabel**

###### **3.2.1.1. Variabel Bebas**

Ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val.*).

###### **3.2.1.2. Variabel Tergantung**

Viabilitas Sel HeLa.

##### **3.2.2. Definisi operasional**

###### **3.2.2.1. Ekstrak Rimpang Kunyit**

Ekstrak rimpang kunyit padat atau serbuk. Dalam penelitian ini ekstrak tersebut dipakai dalam berbagai konsentrasi yaitu 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, dan 1.000 µg/ml. Konsentrasi tersebut didapatkan dari pencampuran ekstrak rimpang kunyit dengan media kultur. Ekstrak rimpang kunyit yang dimasukkan sumuran yaitu masing-masing 100 µl.

Skala: ordinal.



### 3.2.2.2. Viabilitas sel HeLa

Viabilitas adalah kelangsungan hidup. Sel yang viabel berarti memiliki integritas membran yang masih baik sehingga tidak terwarnai dengan pewarnaan. Sel yang non-viabel memiliki integritas membran yang menurun sehingga akan menyerap warna dari pewarnaan yang dilakukan. Dalam hal ini, pewarnaan yang dipakai adalah *trypan blue*. Penghitungan viabilitas: % viabel = (jumlah sel viabel/jumlah total sel) x 100.

Skala: rasio.

## 3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

### 3.3.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah sel HeLa yang telah dikultur di Laboratorium Biologi FK Unissula.

### 3.3.2. Sampel

Sampel diambil dengan *simple random sampling* yaitu sel HeLa yang telah dikultur selama  $\pm 48$  jam, dengan morfologi yang utuh, dapat berkembang dan tidak rusak. Kepadatan sel HeLa tiap sumuran yaitu  $3 \times 10^4$ /ml.

### 3.3.3. Kriteria Inklusi

Sel HeLa yang hidup dalam proses pengulturan dan pencucian untuk digunakan sebagai bahan uji sitotoksik.

### 3.3.4. Kriteria Eksklusi

Sel HeLa yang terbilas dalam proses pencucian saat proses pengulturan dan pemanenan sebelum proses pengujian sitotoksik.

## 3.4. Alat dan Bahan Penelitian

### 3.4.1. Alat Penelitian

- a. Alat untuk kultur Sel HeLa
- b. Alat untuk pengolahan atau pembuatan ekstrak
- c. Alat untuk uji sitotoksik

### 3.4.2. Bahan Penelitian

- a. Ekstrak rimpang kunyit
  - Rimpang kunyit 1 kg
  - Etanol 95%
- b. Bahan untuk kultur sel HeLa
  - 1) sel HeLa
  - 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) *Trypan blue*
- c. Bahan kimia untuk uji sitotostik

Bahan kimia yang digunakan adalah doksorubisin 100 $\mu$ g/ml sebagai kontrol positif.

Doksorubisin (adriamisin) merupakan obat anti kanker golongan antibiotik antrasiklin yang diisolasi dari *streptomyces peucetius var. caesius*. Doksorubisin bekerja dengan berinteraksi dengan DNA, sehingga fungsi DNA sebagai *template* dan pertukaran *sister chromatid* terganggu dan untai DNA terputus. Regresi sel kanker terjadi setelah pemberian obat ini dalam kombinasi dengan berbagai sitostatik lain pada leukemia limfositik dan mielositik akut, tumor Wilms, neuroblastoma, sarkoma osteogenik dan sarkoma jaringan lunak; karsinoma mama, brokogenik, sel transisional kandung kemih, ovarium, endometrium, serviks, prostat dan testis; limfoma Hodgkin dan limfoma non-Hodgkin; karsinoma skuamosa leher dan kepala dan hepatoma. Dosis dewasa adalah 60-76 mg/m<sup>2</sup> diberikan sebagai suntikan tunggal setiap 3 minggu sampai dosis total tidak melebihi 550 mg/m<sup>2</sup>. Sedangkan dosis 20 mg/m<sup>2</sup> setiap minggu biasanya digunakan untuk dosis anak (Nafriadi dan Sulistia, 2008).

### 3.5. Cara Penelitian

#### 3.5.1. Cara pembuatan ekstrak rimpang kunyit

Kunyit dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil. Kunyit tersebut ditimbang sebanyak 1 kg lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 1 jam. Selanjutnya dimasukkan ke dalam pelarut etanol dan diekstraksi dengan menggunakan alat ekstraksi soxlet ± 40 floating. Pemanas dihidupkan dan pendingin balik diaktifkan. Waktu nol dari ekstraksi ditentukan pada saat etanol mencapai titik

didihnya dan diakhiri pada waktu yang telah ditentukan. Hasil ekstraksi didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtratnya didistilasi sedangkan residunya dibuang. Filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu distilasi untuk memisahkan ekstrak dari pelarut. Pemanas dihidupkan dan diperoleh hasilnya berupa pelarut dan residu. Residu dikeringkan di dalam oven dengan suhu 120 °C untuk menghilangkan sisa etanol yang masih terdapat dalam ekstrak. Setelah itu dilakukan penimbangan sampai diperoleh berat konstan. Pembuatan pengenceran dilakukan dengan rumus:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan:

M = konsentrasi

V = volume

### 3.5.2. Cara memperoleh Sel HeLa

Sel HeLa di dapat dari hasil pengkulturan sel kanker serviks yang berada di Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran UNISSULA.

### 3.5.3. Kultur dan Subkultur 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.

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 37<sup>0</sup>C dengan 5% CO<sub>2</sub>.

Pengsubkulturan dilakukan apabila sel telah mencapai konfluen 80%. Medium lama di dalam flask kultur dibuang dan sel dibasuh dengan PBS-EDTA sebanyak 3 kali. Ditambahkan media kultur ke dalam flask kultur dan displit selama ± 30 menit. Setelah itu dibagikan menjadi beberapa flask kultur baru. Sel dieram kembali di dalam inkubator pada suhu 37<sup>0</sup>C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Semua kerja pengkulturan dan pengsubkulturan sel dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow* (LAF) kelas II.

#### **3.5.4. Cara perlakuan (Uji Sitotoksitas)**

Sel yang sudah tumbuh memenuhi flask (setelah konfluen 80%) diganti medianya lalu dilepas dari dinding flask dengan cara displit selama ± 30 menit sampai sel terlepas semua. Suspensi sel tersebut dimasukkan dalam tabung conical lalu disentrifus 1500 g selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet disuspensikan lagi dengan media pencuci 5 ml. Kemudian, suspensi disentrifus 1500 g selama 10 menit. Pencucian tersebut dilakukan dua kali.

Pelet hasil pencucian disuspensikan dalam media penumbuh sampai diperoleh kepadatan sel  $3 \times 10^4$ /ml (jumlah sel dihitung dengan

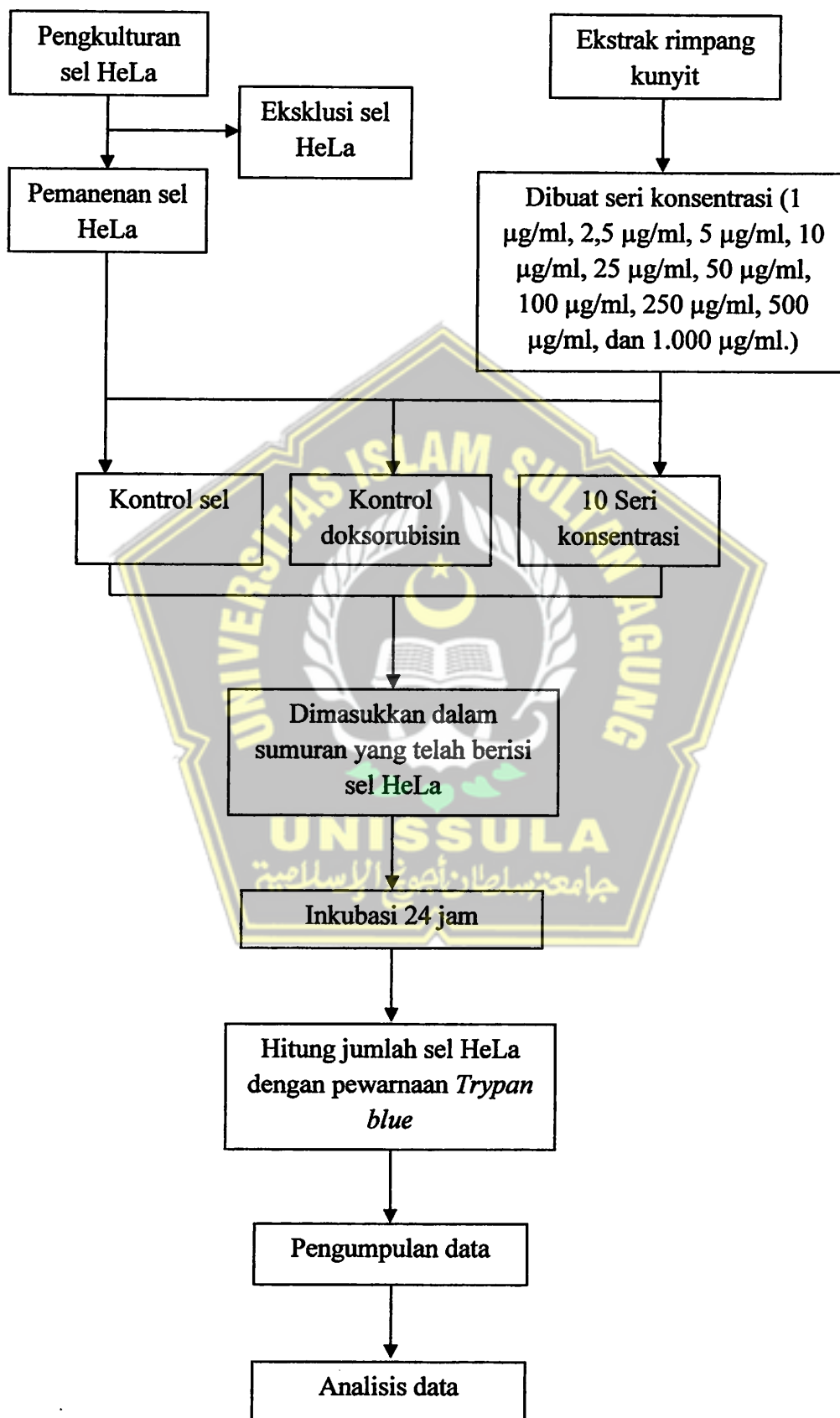
*Nebauer Hemocytometer* dengan pewarna *trypan blue*). Tiap 100  $\mu$ l suspensi sel tersebut dimasukkan dalam tiap sumuran *Tissue culture cluster 96*, kemudian diinkubasi 24 jam, suhu 37<sup>0</sup>C dalam aliran CO<sub>2</sub> 5%. Setelah itu ditambahkan 100  $\mu$ l ekstrak yang akan diuji sitotoksik dengan konsentrasi bertingkat (dalam 50  $\mu$ l media kultur). Kocok perlahan dengan pipet (dihomogenkan), lalu diinkubasi lagi selama 24 jam, 37<sup>0</sup>C dalam aliran CO<sub>2</sub> 5%.

Pada akhir inkubasi, sel diamati di bawah mikroskop untuk melihat perbedaan antara sel yang diberi perlakuan dengan zat sitotoksik dengan sel kontrol menggunakan pewarnaan *Trypan blue*. Caranya yaitu suspensi sel dicampur dengan *trypan blue* dengan menggunakan pipet. Setelah itu, transfer ke hemocytometer dan dilihat dengan menggunakan mikroskop (lampiran 2). Sel yang hidup tidak akan berwarna sedangkan sel yang mati berwarna biru. Hal ini karena sel mati tidak memiliki integritas membran sehingga akan menyerap warna dari *trypan blue*. Penghitungan harus dilakukan kurang dari 5 menit setelah pemberian *trypan blue* karena lebih dari itu sel yang hidup pun akan mulai menyerap warna (Anonim, 2010d).

### **3.6. Tempat dan waktu**

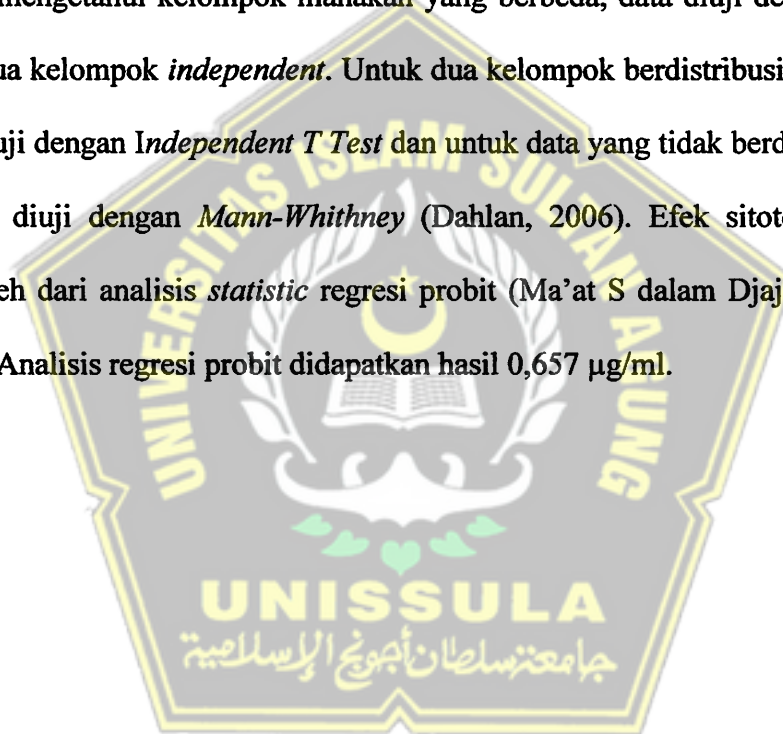
Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi FK Unissula selama 3 hari di Bulan Februari.

### 3.7. Kerangka Kerja



### 3.8. Analisa Hasil

Data viabilitas *post test* tiap kelompok diuji normalitas dan homogenitasnya. Dari uji normalitas dan homogenitas terdapat data yang berdistribusi tidak normal dan tidak homogen. Untuk mengetahui adanya perbedaan efek sitotoksik pada tiap-tiap kelompok, data diuji dengan *Kruskal Wallis*. Hasil signifikansi *Kruskal Wallis* didapatkan  $p < 0,05$ . Untuk mengetahui kelompok manakah yang berbeda, data diuji dengan uji beda dua kelompok *independent*. Untuk dua kelompok berdistribusi normal, data diuji dengan *Independent T Test* dan untuk data yang tidak berdistribusi normal diuji dengan *Mann-Whithney* (Dahlan, 2006). Efek sitotoksitas diperoleh dari analisis *statistic* regresi probit (Ma'at S dalam Djajanegara, 2010). Analisis regresi probit didapatkan hasil  $0,657 \mu\text{g/ml}$ .





## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) terhadap viabilitas sel HeLa. Rimpang kunyit yang digunakan berasal dari Pasar Tlogosari Semarang pada Januari 2011. Rimpang kunyit diambil dari satu daerah karena kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda tergantung dari bagian tanaman yang digunakan, umur tanaman, waktu panen dan lingkungan tempat tumbuh sehingga diharapkan bila diambil pada satu daerah dengan waktu panen yang sama maka kadar zat aktif yang terkandung pada rimpang kunyit relatif sama.

Sampel diambil dengan *simple random sampling* yaitu sel HeLa yang telah dikultur selama 6 hari, dengan morfologi yang utuh, dapat berkembang dan tidak rusak. Setelah dipanen, sel HeLa dimasukkan ke 36 sumuran pada *plate cluster 96*. Kepadatan sel HeLa tiap sumuran yaitu  $3 \times 10^4$ /ml. Penelitian ini dibagi menjadi 3 kategori, kategori I adalah kontrol sel HeLa, kategori II adalah kontrol positif yaitu sel HeLa yang diberikan doksorubisin konsentrasi 100 µg/ml, dan kategori III adalah sel HeLa yang diberi ekstrak rimpang kunyit dengan konsentrasi 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, dan 1.000 µg/ml. Kelompok-kelompok ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Untuk melarutkan sampel digunakan DMSO karena DMSO adalah pelarut yang baik untuk ion

anorganik maupun senyawa organik (Fessenden dalam Anggrianti, 2008). Selain itu, DMSO relatif tidak toksik terhadap sel, tidak mengganggu pertumbuhan sel, tidak mudah menguap dan biasa digunakan dalam uji kultur. Pada akhir perlakuan masing-masing kelompok dihitung jumlah sel HeLa yang hidup dan mati dengan pewarnaan *trypan blue* pada hemocytometer. Rerata sel HeLa yang mati dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Rerata persentase kematian sel HeLa

Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ )	Persentase Dosis (%)	Rerata Persentase Kematian (%)
1	0.10	49,12
2.5	0.25	55,79
5	0.50	60,75
10	1.00	72,45
25	2.50	44,72
50	5.00	52,78
100	10.00	71,96
250	25.00	74,72
500	50.00	72,23
1000	100.00	72,20
Doksorubisin Sel	100.00 -	90.67 2.17

Dari hasil pemeriksaan efek sitotoksik sel hela tiap sumuran lalu data diuji normalitas (*Shapiro Wilk*) dan homogenitasnya (*Levene test*). Hasil uji normalitas diperoleh bahwa ada dua nilai  $p < 0,05$  yaitu kelompok konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  (0,042) dan 250  $\mu\text{g/ml}$  (0,042) sehingga dapat disimpulkan bahwa sebaran data tidak normal (lampiran 3). Hasil uji homogenitas diperoleh nilai 0,001 berarti  $p < 0,05$  sehingga varians data tidak homogen (lampiran 3). Dengan demikian uji statistik yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis*.

Hasil uji *Kruskal-Wallis* diperoleh signifikansi adalah 0,022 (lampiran 4), oleh karena signifikansi  $p < 0,05$ , maka dapat disimpulkan paling tidak terdapat

2 kelompok yang berbeda secara signifikan. Untuk mengetahui kelompok manakah yang berbeda, data diuji dengan uji beda dua kelompok *independent*. Untuk dua kelompok berdistribusi normal, data diuji dengan *independent T test* dan untuk data yang tidak berdistribusi normal diuji dengan *mann-whithney* (lampiran 5). Nilai signifikansi dari *independent T test* dan *mann-whithney* dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Signifikansi dari *independent T test* dan *mann-whithney*

No	Kelompok	p (Sig.)
1	1 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	0,120
2	2,5 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	<b>0,008</b>
3	5 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	<b>0,001</b>
4	10 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	0,051
5	25 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	<b>0,000</b>
6	50 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	0,117
7	100 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	0,050*
8	250 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	0,275
9	500 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	<b>0,011</b>
10	1000 $\mu$ l/ml $\times$ Doxorubicin	<b>0,011</b>
11	1 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	<b>0,049</b>
12	2,5 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	<b>0,019</b>
13	5 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	<b>0,000</b>
14	10 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	<b>0,000</b>
15	25 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	<b>0,007</b>
16	50 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	<b>0,037</b>
17	100 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	0,050*
18	250 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	0,050*
19	500 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	<b>0,000</b>
20	1000 $\mu$ l/ml $\times$ Kontrol Sel	<b>0,000</b>
21	Doksorubicin $\times$ Kontrol Sel	<b>0,001</b>
22	1 $\mu$ l/ml $\times$ 2,5 $\mu$ l/ml	0,572
23	1 $\mu$ l/ml $\times$ 5 $\mu$ l/ml	0,837
24	1 $\mu$ l/ml $\times$ 10 $\mu$ l/ml	0,404
25	1 $\mu$ l/ml $\times$ 25 $\mu$ l/ml	0,215
26	1 $\mu$ l/ml $\times$ 50 $\mu$ l/ml	0,897
27	1 $\mu$ l/ml $\times$ 100 $\mu$ l/ml	0,827
28	1 $\mu$ l/ml $\times$ 250 $\mu$ l/ml	0,275
29	1 $\mu$ l/ml $\times$ 500 $\mu$ l/ml	0,655
30	1 $\mu$ l/ml $\times$ 1000 $\mu$ l/ml	0,690
31	2,5 $\mu$ l/ml $\times$ 5 $\mu$ l/ml	0,436
32	2,5 $\mu$ l/ml $\times$ 10 $\mu$ l/ml	<b>0,046</b>

Lanjutan Tabel 4.2.

No	Kelompok		p (Sig.)
33	2,5 µl/ml	<< 25 µl/ml	0,224
34	2,5 µl/ml	<< 50 µl/ml	0,432
35	2,5 µl/ml	<< 100 µl/ml	0,127
36	2,5 µl/ml	<< 250 µl/ml	0,275
37	2,5 µl/ml	<< 500 µl/ml	0,098
38	2,5 µl/ml	<< 1000 µl/ml	0,113
39	5 µl/ml	<< 10 µl/ml	<b>0,019</b>
40	5 µl/ml	<< 25 µl/ml	<b>0,007</b>
41	5 µl/ml	<< 50 µl/ml	0,695
42	5 µl/ml	<< 100 µl/ml	0,513
43	5 µl/ml	<< 250 µl/ml	0,827
44	5 µl/ml	<< 500 µl/ml	0,052
45	5 µl/ml	<< 1000 µl/ml	0,077
46	10 µl/ml	<< 25 µl/ml	<b>0,003</b>
47	10 µl/ml	<< 50 µl/ml	0,448
48	10 µl/ml	<< 100 µl/ml	0,275
49	10 µl/ml	<< 250 µl/ml	0,513
50	10 µl/ml	<< 500 µl/ml	0,284
51	10 µl/ml	<< 1000 µl/ml	0,255
52	25 µl/ml	<< 50 µl/ml	0,139
53	25 µl/ml	<< 100 µl/ml	0,050*
54	25 µl/ml	<< 250 µl/ml	0,050*
55	25 µl/ml	<< 500 µl/ml	<b>0,004</b>
56	25 µl/ml	<< 1000 µl/ml	<b>0,005</b>
57	50 µl/ml	<< 100 µl/ml	0,827
58	50 µl/ml	<< 250 µl/ml	0,275
59	50 µl/ml	<< 500 µl/ml	0,752
60	50 µl/ml	<< 1000 µl/ml	0,793
61	100 µl/ml	<< 250 µl/ml	0,827
62	100 µl/ml	<< 500 µl/ml	0,827
63	100 µl/ml	<< 1000 µl/ml	0,827
64	250 µl/ml	<< 500 µl/ml	0,513
65	250 µl/ml	<< 1000 µl/ml	0,513
66	500 µl/ml	<< 1000 µl/ml	0,891

Angka yang dicetak tebal menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada  $p < 0,05$

\* terdapat perbedaan signifikan secara marginal pada  $p = 0,05$

Efek sitotoksitas (menghitung nilai LC50) diperoleh dari analisis *statistic* regresi probit (Ma'at S dalam Djajanegara, 2010). Analisis regresi probit didapatkan hasil 0,657 µg/ml (lampiran 6).

## 4.2. Pembahasan

Pada tabel 4.1 menggambarkan rerata persentase kematian sel HeLa berdasarkan pemberian konsentrasi ekstrak rimpang kunyit. Konsentrasi ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) yang memberikan efek sitotoksik terbesar pada sel HeLa adalah pada 250  $\mu\text{g/ml}$  yakni mampu mematikan 74,72 % sel HeLa sedangkan konsentrasi ekstrak rimpang kunyit yang memiliki efek sitotoksik terendah yaitu pada 25  $\mu\text{g/ml}$  yakni mematikan 44,72 % sel HeLa. Bila dibandingkan dengan prosentase sel HeLa yang mati pada kelompok kontrol sel (2,17 %), maka ekstrak rimpang kunyit terbukti memiliki efek sitotoksik pada sel HeLa.

Pada penelitian ini hasil dari uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai  $p=0,022$  ( $p < 0,05$ ), hal ini menunjukkan paling tidak terdapat 2 kelompok yang berbeda secara signifikan. Untuk mengetahui kelompok manakah yang berbeda, data diuji dengan uji beda dua kelompok *independent*. Untuk dua kelompok berdistribusi normal, data diuji dengan *independent T test* dan untuk data yang tidak berdistribusi normal diuji dengan *mann whitney*.

Berdasarkan hasil uji *independent* tersebut, kelompok-kelompok yang berbeda secara bermakna yaitu ekstrak konsentrasi 2,5  $\mu\text{l/ml}$ , 5  $\mu\text{l/ml}$ , 25  $\mu\text{l/ml}$ , 500  $\mu\text{l/ml}$ , 1000  $\mu\text{l/ml}$ , kelompok kontrol sel dengan doxorubicin yaitu dengan nilai  $p$  berturut-turut (0,008), (0,001), (0,000), (0,011), (0,011), (0,001), kemudian kelompok ekstrak 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  $\mu\text{l/ml}$ , 500  $\mu\text{l/ml}$ , 1000  $\mu\text{l/ml}$  dengan kelompok kontrol sel yaitu dengan nilai  $p$  berturut-turut (0,049), (0,019), (0,000), (0,000),

(0,007), (0,037) (0,000), (0,000), lalu antar kelompok perlakuan yaitu 2,5  $\mu\text{l/ml}$  dengan 10  $\mu\text{l/ml}$  (0,046), 5  $\mu\text{l/ml}$  dengan 10  $\mu\text{l/ml}$  (0,019), 5  $\mu\text{l/ml}$  dengan 25  $\mu\text{l/ml}$  (0,007), 10  $\mu\text{l/ml}$  dengan 25  $\mu\text{l/ml}$  (0,003), 25  $\mu\text{l/ml}$  dengan 500  $\mu\text{l/ml}$  (0,004), dan 25  $\mu\text{l/ml}$  dengan 1000  $\mu\text{l/ml}$  (0,005). Nilai  $p=0,050$  mengandung arti bahwa terdapat perbedaan signifikan secara marginal, yaitu didapati pada kelompok ekstrak konsentrasi 100  $\mu\text{l/ml}$  dengan doxorubicin, 100  $\mu\text{l/ml}$  dengan kontrol sel, 250  $\mu\text{l/ml}$  dengan kontrol sel, 25  $\mu\text{l/ml}$  dengan 100  $\mu\text{l/ml}$ , dan 25  $\mu\text{l/ml}$  dengan 250  $\mu\text{l/ml}$ .

LC50 merupakan konsentrasi ekstrak rimpang kunyit yang mampu mematikan sel HeLa sebesar 50% populasi. Bila nilai  $LC50 \leq 30 \mu\text{g/ml}$ , zat tersebut bersifat sitotoksik atau berpotensi sebagai antikanker (Hudgson EP dalam Djajanegara, 2010). Analisis LC50 dilakukan dengan analisis probit (Ma'at S dalam Djajanegara, 2010). Pada penelitian ini nilai LC50 didapatkan hasil 0,657  $\mu\text{g/ml}$  (lampiran 5), karena LC50 didapatkan hasil 0,657 ( $\leq 30 \mu\text{g/ml}$ ) maka ekstrak rimpang kunyit berpotensi sebagai antikanker.

Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Jing *et al* (2007) dan Jaiswal *et al* (2002). Pada penelitian Jing *et al* dinyatakan bahwa kurkumin dalam dosis tertentu, mampu menghambat proliferasi sel HeLa. Penghambatan pertumbuhan dari sel HeLa diamati dengan menggunakan 5-50  $\mu\text{mol/L}$  kurkumin yang diujikan pada sel HeLa tersebut dengan metode MTT (Jing *et al*, 2007). Penelitian yang dilakukan oleh Jaiswal *et al* melaporkan bahwa kurkumin menyebabkan berhentinya fase G2/M dan apoptosis HCT-116 *cell lines* (Human colon cancer cell lines) dengan metode PARP-1 cleavage dan

(TUNEL) assay dosis 20  $\mu$ M. Hal itu mengakibatkan penurunan dari viabilitas HCT-116 cell lines (Jaiswal, A. S. et al., 2002). Kunyit mengandung kurkumin yaitu zat aktif yang mempunyai aktifitas antitumor. Kurkumin menghambat proliferasi dan pertumbuhan sel melalui induksi fase S dan fase G2/M dari cell cycle arrest kemudian terjadi apoptosis dalam sel tumor. Mekanisme molekulernya diperkirakan bahwa kurkumin meningkatkan ekspresi p53 dalam yang tergantung waktu, diikuti oleh induksi dari ekspresi p21. Cell cycle arrest diinduksi oleh kurkumin mungkin dengan mengaktifkan p53 (Susilowati, 2009). Sel pada fase G2 mempunyai mekanisme penghentian siklus sel jika terdeteksi DNA nukleus mengalami kerusakan. Mekanisme ini berfungsi untuk menjaga integritas genom, salah satu pengaturnya adalah gen penekan tumor p53 yang dikenal sebagai guardian of the genome. Gen ini mentranskripsi protein p53 yang merespon terhadap kerusakan DNA. Protein p53 juga dapat meningkatkan protein proapoptosis dari keluarga Bcl-2 seperti Bax, Noxa, dan Puma, untuk mengaktifkan jalur apoptosis. (Fenton dan Longo, 2008; Moscow dan Cowan, 2007). Multi-domain protein keluarga Bcl-2 berperan penting sebagai regulator apoptosis yang dapat dikelompokkan ke dalam para anggota antiapoptotic yang terdiri Bcl-2, Bcl-XL dan MCL-1 serta para anggota proapoptotic seperti Bax dan Bak (Karunakaran, D. et al, 2005).

Dalam penelitian ini, terdapat beberapa keterbatasan yakni : bahan yang dipakai yaitu ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) bukan merupakan senyawa tunggal sehingga masih terdiri dari berbagai senyawa

yang efeknya terhadap sel HeLa belum diketahui. Selain itu penelitian ini hanya terbatas pada melihat viabilitas sel HeLa, tidak sampai pada jalur apoptosisnya atau jalur mekanisme apoptosisnya.





## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan data penelitian tentang efek sitotoksik ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) terhadap viabilitas sel HeLa selama bulan Februari 2011, dapat ditarik kesimpulan bahwa :

- 5.1.1 Ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa.
- 5.1.2 Viabilitas sel HeLa pada kelompok kontrol (kontrol negatif) sebesar 97,83 % sedangkan pada sel HeLa kelompok doksorubisin (kontrol positif) sebesar 9,33 %.
- 5.1.3 Viabilitas sel HeLa pada kelompok konsentrasi ekstrak rimpang kunyit adalah sebagai berikut: 1 µg/ml (50,88%) , 2,5 µg/ml (44,21%), 5 µg/ml (39,25%), 10 µg/ml (27,55%), 25 µg/ml (55,28%), 50 µg/ml (47,22%), 100 µg/ml (28,04%), 250 µg/ml (25,28%), 500 µg/ml (27,77%), dan 1.000 µg/ml (27,80%).
- 5.1.4 Ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai LC50 = 0,657 µg/ml.

## 5.2. Saran

- 5.2.1 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang zat aktif dalam rimpang kunyit (*Curcuma domestica Val*) yang paling sitotoksik terhadap sel HeLa untuk mendapatkan hasil yang lebih spesifik dalam penelitian.
- 5.2.2 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat apoptosis dari sel HeLa atau melihat jalur apoptosisnya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anggrianti, P., 2008, *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (Piper cubeba L.) Terhadap Sel HeLa*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, halaman 22, 23.
- Anonim, 2002, *Definition of Cytotoxic*, *MedicineNet*, [www.medterms.com](http://www.medterms.com), diunduh tanggal 20 oktober 2010.
- Anonim, 2010a, *Henrietta Lacks dan Sel HeLa*, [www.dakdem.com](http://www.dakdem.com), dikutip pada 19-08-2010.
- Anonim, 2010b, *Cytotoxicity Assay Methods, Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation Manual*, diunduh tanggal 20 Oktober 2010.
- Anonim, 2010c, *Cytotoxicity, Drug Discovery*, [www.noabbidiscoveries.com](http://www.noabbidiscoveries.com), diunduh tanggal 20 Oktober 2010.
- Anonim, 2010d, *Hemocytometer Counting & Cell Viability, Immunocytometry Solutions*, [www.immunocytometry.com](http://www.immunocytometry.com), diunduh tanggal 20 Oktober 2010.
- Dahlan, M. S., 2006, *Statistika Untuk Kedokteran Dan Kesehatan: Uji Hipotesis Dengan Menggunakan SPSS*, PT ARKANS, Jakarta.
- Djajanegara, Ira dan Priyo Wahyudi, 2010, Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Herba Ceplukan (*Physalis angulata* Linn.) terhadap Sel T47D secara *In Vitro*, dalam Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, Vol. 8, No. 1, ISSN 1693-1831, Jakarta Pusat, h: 41,46.
- Elrod, S., and Stansfield, W., 2007, *Schaum's Outlines Genetika Edisi keempat*, 311, Erlangga, Jakarta.
- Fenton, R.G., Longo, D.L., 2008, Cancer Cell Biology and Angiogenesis, in: Fauci, A.S., Kasper D.L., Longo, D.L., Braunwald, E., Hauser, S.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J., Harrison's Principles of Internal Medicine, volume 1, 17<sup>th</sup> edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., 498-513.
- Hernani dan Mono Rahardjo, 2005, *Tanaman Berkhasiat Antioksidan (Berbagai Jenis Tanaman Penangkal Racun)*, Penerbar Swadaya, Jakarta, Hal 56.
- IARC, 2010, Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, [www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr) diunduh pada 1 Oktober 2010.
- Jaiswal, A. S., Benjamin P. M., Nirupama G. and Satya N., 2002,  $\beta$ -Catenin-mediated transactivation and cell  $\pm$  cell adhesion pathways are important

in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells, *Oncogene*, Hal. 8414.

- Jing, Z., Zhao Y., Zhang Y. and Chen W., 2007, Anti-Tumor Effect of Curcumin on Human Cervical Carcinoma HeLa Cells *In Vitro* and *In Vivo*, *Chinese Journal of Cancer Research* 19(1):32-36.
- Karunakaran, D., R. Rashmi and T.R. Santhosh Kumar, 2005, *Current Cancer Drug Target Vol. 5, No. 2*, Bentham Science Publishers Ltd., India, hal. 117, 119, 122.
- Kumar, V., Ramzi S. C. And Stanley L. R., 2007, *Buku Ajar Patologi Robbins*, Edisi 7, Volume 2, EGC, Jakarta, halaman 29, 767.
- Moscow, J.A., Cowan, K.H., 2007, *Biology of Cancer*, in: Goldman, L., Ausiello, D., Cecil Medicine, 23<sup>rd</sup> edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 1345-1348.
- Nafriadi dan Sulistia, G., 2008, Anti kanker, dalam: *Farmakologi dan Terapi*, Edisi Kelima, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, h: 737, 751
- Reksodiputro, A. H., 2006, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Jilid II, Edisi IV, Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal 864, 865.
- Rosita, A. T., Titi R. W., Esti W. dan Adam H., 2009, *Sel HeLa*, CCRC-Farmasi UGM, dikutip pada 19-08-2010.
- Sasikumar, B., 2001, *Turmeric, Handbook of Herbs and Spices*, Indian Institute of Spices Research, Kerala, halaman 308.
- Singh, S. and Ashok Khar, 2006, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, Vol. 6, No. 3, Bentham Science Publishers Ltd., India, Hal. 259, 260.
- Susilowati, Sri, 2009, *Kurkumin Memacu G2/Arrest*, CCRC-Farmasi UGM, dikutip pada 19-08-2010.
- Tim Modul, 2010, *Buku Praktikum Modul 26 Elektif Obat Tradisional*, Third edition, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, hal. 47-48.
- Wahyuni, A. Hardjono dan Paskalina H. Y., 2004, *Ekstrasi Kurkumin dari Kunyit*, Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses 2004 ISSN : 1411 – 4216, hal. F-17-2, F-17-3.
- Winarto, W. P. dan Tim Lentera, 2003, *Khasiat & Manfaat Kunyit*, Agromedia Pustaka, Jakarta, halaman 6, 7, 10-12.