



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMANFAATAN EKSTRAK CENTELLA ASIATICA DAN ACALYPHA
INDICA Linn DALAM MENINGKATKAN REKAYASA SEL PUNCA
MESENKIM ASAL DARAH TEPI UNTUK PENDEKATAN TERAPI SEL**

TESIS

**ROBI IRAWAN
0906505855**

**PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOMEDIS
SALEMBA
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMANFAATAN EKSTRAK CENTELLA ASIATICA DAN ACALYPHA
INDICA Linn DALAM MENINGKATKAN REKAYASA SEL PUNCA
MESENKIM ASAL DARAH TEPI UNTUK PENDEKATAN TERAPI SEL**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains

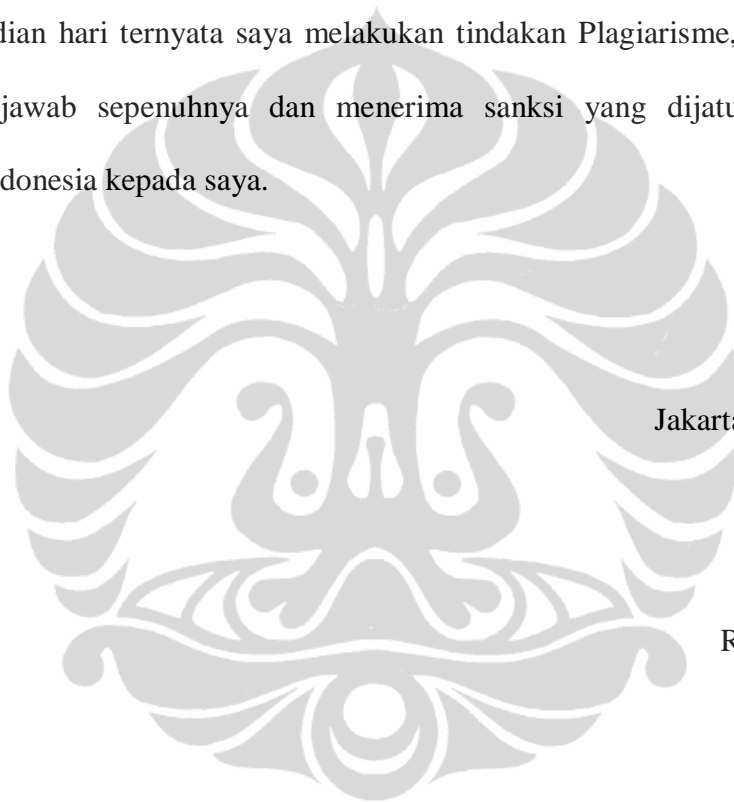
**ROBI IRAWAN
0906505855**

**PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOMEDIS
KEKHUSUSAN INSTRUMENTASI BIOMEDIS
dan PENCITRAAN
SALEMBA
JULI 2011**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan tindakan Plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.



Jakarta, Juli 2011

Robi Irawan

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Robi Irawan
NPM : 0906505855
Tanda Tangan :
Tanggal : 14 Juli 2011



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Robi Irawan
NPM : 0906505855
Program Studi : Teknologi Biomedis
Judul Tesis : Pemanfaatan Ekstrak *Centella Asiatica* Linn dan
Acalypha indica Linn dalam Meningkatkan
Rekayasa Sel Punca Mesenkim Asal
Darah Tepi untuk Pendekatan Terapi Sel

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Teknologi Biomedis Program Pascasarjana Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : dr. Nurhadi Ibrahim, Ph.D (.....)
Penguji : Prof. Dr. dr. Cholid Badri, Sp.Rad (.....)
Penguji : dr. Dangsina Moeloek, Sp.KO, Sp.KL(.....)

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 14 Juli 2011

Oleh
Ketua Program Studi Teknologi Biomedis
Program Pascasarjana Universitas Indonesia

Prof. Dr. dr. Cholid Badri, Sp.Rad

KATA PENGANTAR.

Segala puji dan syukur dihadapan Tuhan Yang Maha Esa, karena hanya dengan karunia-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan ini. Tesis ini dilaksanakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di program Magister Teknologi Biomedik dengan judul Pemanfaatan ekstrak *Centella asiatica* dan ekstrak *Acalypha indica* Linn dalam meningkatkan rekayasa sel punca mesenkim asal darah tepi untuk pendekatan terapi sel.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya atas segala bentuk bantuan dan dukungan, baik berupa materi, gagasan, semangat, bimbingan maupun koreksi tulisan, karena berkat bantuannya, tesis ini dapat terselesaikan. Ucapan terima kasih ini ditujukan untuk:

1. Seluruh Staff Pengajar Program Pascasarjana Program Studi Teknologi Biomedis yang telah memberikan ilmu dan waktunya bagi saya sehingga dapat menyelesaikan studi saya tepat waktu.
2. Kepada Staff Sekretariat Program Studi Teknologi Biomedis yang selalu membantu saya dalam segala hal yang berhubungan dengan administrasi selama studi dan penelitian.
3. dr. Nurhadi Ibrahim, PhD sebagai dosen pembimbing dalam tesis. Terima kasih atas semua saran, bimbingan dan dukungan alat, laboratorium, dan bahan penelitian yang diberikan selama penulis melakukan penelitian dan mengerjakan tesis.
4. Mbak YM Lauda Feroniasanti, M.Si sebagai Peneliti Ahli Madya II di Cell Culture Laboratory Kimia Farma, yang telah memberikan bantuan ide, saran, gagasan, dorongan semangat kepada penulis dalam menghadapi masalah yang ada.
5. Bapak Imam Hidayatulloh, S.Si sebagai staf Peneliti di Cell Culture Laboratory Kimia Farma, yang telah memberikan bantuan saran kepada penulis dalam menyelesaikan penelitian penulis.

6. Dr. Indra Kusuma sebagai rekan dalam penelitian di Cell Culture Laboratory Kimia Farma yang selalu memberikan saran dalam menyelesaikan penelitian penulis.
7. Yus Mita, ST, MM, calon Isteri tersayang yang selalu mengingatkan penulis untuk menyelesaikan tesis dan memberi dukungan moril, pengertian, doa serta semangat dalam keadaan sulit maupun senang.
8. Seluruh keluarga penulis, mama dan seluruh kakak yang tidak lelah memberikan dukungan semangat dan doa untuk penyelesaian studi penulis.
9. Seluruh staf pengajar di departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Atma Jaya, terima kasih atas dukungan dan pemberian semangatnya.
10. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan namanya satu persatu, semua guru yang telah mendidik sampai sekarang, serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis ini

Dengan kerendahan hati penulis menyadari bahwa tidak ada karya yang sempurna selain karya-Nya. Oleh karena itu kepada segenap pembaca karya ini, penulis menghaturkan penghargaan dan ucapan terima kasih.

Jakarta, 2011

Robi Irawan

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Robi Irawan
NPM : 0906505855
Program Studi : Teknologi Biomedis
Fakultas : Program Pascasarjana
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty- Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pemanfaatan Ekstrak Centella Asiatica Linn dan Acalypha indica Linn dalam Meningkatkan Rekayasa Sel Punca Mesenkim Asal Darah Tepi untuk Pendekatan Terapi Sel

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : Juli 2011
Yang Menyatakan

Robi Irawan

ABSTRAK

Nama : Robi Irawan
Program Studi : Teknologi Biomedis
Judul : Pemanfaatan Ekstrak *Centella Asiatica* Linn dan *Acalypha indica* Linn dalam Meningkatkan Rekayasa Sel Punca Mesenkim Asal Darah Tepi untuk Pendekatan Terapi Sel

Terapi sel merupakan salah satu pendekatan penyembuhan penyakit degenerasi yang memberikan harapan untuk dapat memperbaiki organ atau jaringan sehingga memberikan hasil yang memuaskan dalam hal regenerasi dan pengembalian fungsi normal suatu organ. Sel punca mesenkim ditemukan dalam darah manusia normal yang dapat dikultur. Sel punca mesenkim memiliki morfologi, cytoskeletal, cytoplasmik dan penanda permukaan (CD14⁻, CD31⁻, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, dan CD166⁺) yang sama seperti precursor mesenkim sumsum tulang. Darah tepi merupakan sumber yang menjanjikan untuk digunakan sebagai alternatif sumber sel punca mesenkim untuk tujuan terapi sel karena memiliki keuntungan yaitu tidak invasif, mudah, tidak perlu dilakukan biopsi dan tidak memerlukan keahlian dalam mendapatkannya. Namun ada kekurangan yang dimiliki oleh sel punca mesenkim yang berasal dari darah tepi yaitu jumlah populasi lebih sedikit dibandingkan dengan populasi yang dimiliki sel punca mesenkim yang berasal dari sumsum tulang.

Mengamati pengaruh pemberian ekstrak *Centella asiatica* (pegagan) dan *Acalypha indica* (air akar kucing) terhadap peningkatan efisiensi rekayasa sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi dalam pendekatan terapi sel.

Studi eksperimental *in vitro* pada kultur primer dan kultur *post pasasi* pada sel punca mesenkim asal darah tepi. Kelompok perlakuan terdiri atas beberapa kelompok yaitu satu kelompok control, 3 kelompok ekstrak air *Acalypha indica* (10mg/mL, 15mg/mL, 20mg/mL) dan 3 kelompok ekstrak air *Centella asiatica* (10µg/mL, 15µg/mL, 20µg/mL) selama 17 hari untuk kultur primer dan 48 jam pada kultur *post pasasi*. Setelah diberi perlakuan, nilai viabilitas relatif sel dan tingkat proliferasi sel diukur dengan metode MTT.

Viabilitas relatif sel dan tingkat proliferasi sel pada kultur primer dan kultur *post pasasi* sel punca mesenkim dengan pemberian ekstrak *Centella asiatica* memiliki tingkat proliferasi lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kontrol dan pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn ($p < 0,05$).

Pemberian ekstrak *Centella asiatica* lebih bermanfaat dalam meningkatkan proliferasi sel dan viabilitas relatif sel dibandingkan ekstrak *Acalypha indica* pada kultur *post pasasi* PBMC yang diperlukan untuk mendapatkan sel punca mesenkim yang akan dijadikan terapi sel

Kata kunci: terapi sel, sel punca mesenkim, proliferasi sel, *Centella asiatica*, *Acalypha indica*

ABSTRACT

Name : Robi Irawan
Study Program : Biomeical Engineering
Title : Utilization of Centella asiatica extract of Acalypha indica Linn and Linn in Improving Engineering Origin mesenchyme stem cells Blood Bank for Cell Therapy Approach

Cell therapy is one of healing degeneration diseases approaching which provides the hoping of organ or tissue repairing to provide satisfactory results in terms of regeneration and rehabilitation organ function. Mesenchymal stem cell found in the human peripheral blood. This stem cell have morphology, cytoskeletal, cytoplasmik and surface markers (CD14-, CD31-, CD34-, CD44 +, CD45-, CD73 +, CD90 +, CD105 + and CD166 +) which are the same with Bone marrow derived mesenchymal stem cell. Peripheral blood is a promising source that can be used as an alternative source of /Mesenchymal stem cells for cell therapy because it has the advantage that are not invasive, easy to cultur, not necessary for biopsy treatment and requires no expertise to be collected. The disadvantages of Mesenchymal stem cells derived peripheral blood are less population compared to bone marrow derived mesenchymal stem cells.

This research purpose to observe the effect of Centella asiatica and Acalypha indica extract in Mesenchymal stem cells derived peripheral blood cultured to approach cell therapy.

Experimental studies in vitro in primary culture and subculture of Mesenchymal stem cells derived peripheral blood. The treatment groups consisted of several groups: one control group, three groups of Acalypha indica water extract (10mg/mL, 15mg/mL, 20mg/mL) and three groups of Centella asiatica water extract (10µg/mL, 15µg/mL, 20µg/mL) for 17 days primary culture and 48 hours subculture. Further treatment, the relative cell viability and cell proliferation rate are measured by MTT method.

Relative cell viability and cell proliferation rate of primary culture cells and the Mesenchymal stem cells subculture from Centella asiatica extract have a significant higher proliferation than the control group and Acalypha indica Linn extract ($p < 0.05$).

Centella asiatica extract is more useful for increasing cell proliferation rate and relative cell viability compared to Acalypha indica extracts in PBMC culture to obtain mesenchymal stem cells that will be used for cell

Keywords: cell therapy, mesenchymal stem cells, cell proliferation, Centella asiatica, Acalypha indica.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4. Hipotesis Penelitian	6
1.5. Manfaat Penelitian	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Kultur Sel	7
2.1.1 Prinsip Kerja Kultur Sel	7
2.1.2 Sel Punca dewasa dan Sel Punca Embrionik	8
2.2 Sel Punca Mesenkim sebagai salah satu Jenis sel Punca Dewasa	9
2.2.1 Isolasi dan Kultur Sel Punca Mesenkim	9
2.2.2 Sumber Sel Punca Mesenkim	11
2.2.3 Karakteristik Sel Punca Mesenkim asal Darah Tepi	13
2.2.4 Potensi Klinik Sel Punca Mesenkim asal Darah Tepi	15
2.2.4.1 Terapi Neurorestoratif	16
2.2.4.2 Mekanisme Efek Neurorestoratif dari Sel Punca Mesenkim	16
2.3 Tanaman Herbal yang meningkatkan Proliferasi Sel	17
2.3.1 Akar Kucing (<i>Acalypha indica</i>)	18
2.3.2 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	20
2.4 Pemeriksaan Viabilitas dan Proliferasi Sel dengan Metode 3-[4,5-Dimetythiazol-2-YL]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT)	24
2.5 Kerangka Teori	25
2.6 Kerangka Konsep	25

3. METODE PENELITIAN	26
3.1. Rancangan Penelitian	26
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	27
3.3. Alat dan Bahan Penelitian	27
3.3.1 Alat Penelitian	27
3.3.2 Bahan Penelitian	28
3.4. Populasi Penelitian	29
3.4.1 Subjek Penelitian	29
3.4.2 Sample Penelitian	29
3.4.3 Besar Sampel	29
3.5. Parameter dan Variabel Penelitian	30
3.6. Definisi Operasional	30
3.7. Cara Kerja	31
3.8. Analisis data	36
3.9. Alur Penelitian	37
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1. Pengaruh pemberian ekstrak <i>Acalypha indica</i> Linn dan ekstrak <i>Centella asiatica</i> selama 17 hari pada Kultur Primer PBMC terhadap Persentase Viabilitas Relatif Sel	39
4.2. Pengaruh pemberian ekstrak <i>Acalypha indica</i> Linn dan ekstrak <i>Centella asiatica</i> selama 48 jam pada Subkultur PBMC terhadap Persentase Viabilitas Relatif Sel	42
4.3. Pengaruh pemberian ekstrak <i>Acalypha indica</i> Linn dan ekstrak <i>Centella asiatica</i> selama 17 hari pada Kultur Primer PBMC terhadap Tingkat Proliferasi Sel	44
4.4. Pengaruh pemberian ekstrak <i>Acalypha indica</i> Linn dan ekstrak <i>Centella asiatica</i> selama 48 Jam pada Subkultur PBMC terhadap Tingkat Proliferasi Sel	47
5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	52
DAFTAR REFERENSI	54
LAMPIRAN	58

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Penanda Permukaan dari Sel Punca Mesenkim	11
Tabel 3.1	Parameter, Variabel Terikat dan Variabel Bebas	30
Tabel 4.1	Rerata Persentase viabilitas relative sel pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari	40
Tabel 4.2	Transformasi Log10 data rerata persentase viabilitas relatif sel pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari	40
Tabel 4.3	Hasil Uji Kemaknaan Rerata persentase viabilitas relatif sel antar kelompok pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari	41
Tabel 4.4	Rerata persentase viabilitas relatif sel pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam	43
Tabel 4.5	Hasil uji kemaknaan rerata persentase viabilitas relative sel antar kelompok pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam	44
Tabel 4.6	Rerata absorbansi pemeriksaan MTT untuk Tingkat Proliferasi Sel pada kultur primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari	45
Tabel 4.7	Hasil uji kemaknaan rerata absorbansi pemeriksaan MTT antar kelompok pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari	46
Tabel 4.8	Rerata absorbansi pemeriksaan MTT untuk Tingkat Proliferasi sel pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam	47
Tabel 4.9	Hasil uji kemaknaan rerata absorbansi pemeriksaan MTT antar kelompok pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Sumber Sel Punca Mesenkim	13
Gambar 2.2	Ekspansi Kultur BMSC dan PMSC	15
Gambar 2.3	<i>Acalypha indica</i> Linn	19
Gambar 2.4	<i>Centella asiatica</i> Linn	21
Gambar 2.5	Diagram Kerangka Teori	25
Gambar 2.6	Diagram Kerangka Konsep	25
Gambar 3.1	Diagram Alur Penelitian	37
Gambar 4.1	Morfologi Kultur PBMC	38
Gambar 4.2	Rerata persentase viabilitas relative sel pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari	39
Gambar 4.3	Rerata persentase viabilitas relative sel pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam	42
Gambar 4.4	Rerata absorbansi pemeriksaan MTT pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari	45
Gambar 4.5	Rerata absorbansi pemeriksaan MTT pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam.....	48

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Terapi sel merupakan salah satu pendekatan penyembuhan penyakit degenerasi yang memberikan harapan untuk dapat memperbaiki organ atau jaringan sehingga memberikan hasil yang memuaskan dalam hal regenerasi dan pengembalian fungsi normal suatu organ (William. 2003). Secara umum, terapi sel terbagi atas 2 kelompok yaitu terapi auto-sel dan terapi allo-sel (William.2003). Pada terapi auto-sel sumber selnya berasal dari individu yang sama yang mengalami proses kultur untuk ekspansi secara *ex vivo* sebelum ditransplantasi ke lesi. Dengan terjadinya stimulasi immunologi dari sel yang ditanamkan menghasilkan efek regenerasi sedangkan terapi allo-sel menggabungkan metode terapi obat immunosuppresif seperti *cyclosporine*, *FK506* dan *rapamycin* dengan sel yang berasal dari individu yang lain (William.2003). Tujuan penggunaan obat immunosuppresif adalah untuk mencegah terjadinya destruksi sel yang ditransplantasikan. Sumber sel untuk terapi sel ini dapat berasal dari sel punca embrionik dan sel punca dewasa. Salah satu yang termasuk dalam sel punca dewasa adalah sel punca mesenkim.

Sel punca mesenkim merupakan sel punca yang memiliki kemampuan multipotensial karena selain dapat berdeferensiasi menjadi sel dalam jalur mesenkim juga dapat berdeferensiasi diluar jalur dengan teknik trandeferensiasi (Par.2007; Kim.2006; Baksh.2004; Halim.2010; Sarugaser.2009; Rosenbaum.2008; Deans.2000; Kuroda.2010; Liu.2011). Sel punca mesenkim lebih banyak digunakan dalam penelitian karena kapasitas yang besar untuk memperbanyak diri, dapat diterima tanpa memicu sistem imun, dan mudah diekspansi secara *in vitro* dan *in vivo*. Sel punca mesenkim didapatkan dari sumsum tulang, otot, tulang pipih, dermis, jaringan adipose, periosteum, pericyte, membrane synovial dan darah tepi (Par.2007; Rosenbaum.2008; Kuroda.2010; Tuan.2003; Kern.2006). Populasi sel punca mesenkim diperkirakan hanya 0.001% sampai 0.01% dari seluruh sel yang ada dalam sumsum tulang (Habib. 2007). Sel

punca mesenkim akan mengalami penurunan populasi seiring dengan bertambahnya usia. Sumsum tulang merupakan sumber sel punca mesenkim yang sudah banyak diteliti namun memiliki kerugian karena cara isolasinya yang bersifat sangat invasif, hal ini sama dengan sel punca yang berasal dari tulang pipih sehingga membuat terbatasnya penggunaan sel punca mesenkim sumber ini untuk tujuan terapi sel. Sel punca yang berasal dari otot, dermis dan jaringan adipose juga memiliki kerugian karena isolasinya harus melakukan proses biopsy yang dilakukan oleh klinisi yang ahli sehingga membuat kurang menjadi kandidat sebagai sumber terapi sel.

Sel punca mesenkim ditemukan dalam darah manusia normal yang dapat dikultur yang memiliki morfologi, cytoskeletal, cytoplasmik dan penanda permukaan (CD14⁻, CD31⁻, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, dan CD166⁺) yang sama seperti precursor mesenkim sumsum tulang (Yu. 2009; Lee.2004; Moore.2005; Cesselli.2009). Sel ini memiliki kemampuan untuk berdeferensiasi menjadi sel fibroblast, osteoblast dan adiposit (Seo.2009; Porat.2006; Harris.2008). Darah tepi merupakan sumber yang menjanjikan untuk digunakan sebagai alternatif sumber sel punca mesenkim untuk tujuan terapi sel karena memiliki keuntungan yaitu tidak invasif, mudah, tidak perlu dilakukan biopsi dan tidak memerlukan keahlian dalam mendapatkannya. Namun ada kekurangan yang dimiliki oleh sel punca mesenkim yang berasal dari darah tepi yaitu jumlah populasi lebih sedikit dibandingkan dengan populasi yang dimiliki sel punca mesenkim yang berasal dari sumsum tulang (Habib.2007; Yu.2009; Lee.2004; Moore.2005), disamping itu kemampuan proliferasi sel punca mesenkim asal darah tepi lebih rendah bila dibandingkan dengan sel punca mesenkim asal sumsum tulang sehingga memerlukan waktu lebih lama bagi sel untuk berkonfluen dalam media kultur (Kim.2006). Oleh sebab itu diperlukan suatu pemicu proliferasi sel agar proses ekspansi sel punca mesenkim asal darah tepi dapat mencukupi jumlah sel minimum untuk aplikasi terapi sel dan mempercepat waktu yang diperlukan untuk kultur sel secara *in vitro*. Punturee dkk (2006) menerangkan bahwa terdapat beberapa tanaman herbal yang memiliki efek meningkatkan proliferasi sel mononuklear darah tepi manusia secara *in vitro*. Adapun tanaman yang dimaksudkan adalah *Murdanian loriformis*, *Cymbopogon*

citratus, *Momornica charantia*, *Allium sativum*, *Carthamus tinctorius*, *Eclipta alba*, *Cyperus rotundus* dan *Centella asiatica*. Dilain pihak, Marwah dkk (2006) menerangkan bahwa tanaman herbal *Allophylus rubifolius* dan *Acalypha indica* memiliki efek antioksidan dan dapat meningkatkan penyembuhan luka terbuka.

Tanaman pegagan atau *Centella asiatica* merupakan tanaman yang banyak tumbuh di tanah yang agak lembab dan cukup mendapatkan sinar matahari seperti di padang rumput, pinggir selokan, sawah dan lain sebagainya. Tanaman ini dikenal di Indonesia dengan panggilan pegagan atau daun kaki kuda atau antanan atau ganggagan. Masyarakat secara tradisional memakainya untuk pengobatan. Tanaman ini bisa dikonsumsi dalam bentuk segar, diramu, dimasak, atau dijus. Tanaman ini sejak beberapa ribu tahun yang lalu sudah digunakan oleh masyarakat India, Pakistan, Malaysia, dan sebagian Eropa Timur sebagai obat menambah ketahanan tubuh, membersihkan darah, dan memperlancar urine.

Sampai saat ini kandungan bahan aktif yang bermanfaat dari tanaman ini baru beberapa saja yang sudah teridentifikasi diantaranya *Triterpenoid acids*, *Fatty oil*, *Glycoside*, *Flavonoids* dan lain sebagainya. Mohandas dkk (2006) telah membuktikan bahwa ramuan pegagan dapat meningkatkan pembentukan jaringan dendritik *amydala* dan *hippocampus* sehingga meningkatkan daya ingat dan proses belajar pada tikus percobaan. Menurut Lu dkk (2004), zat asiaticosid, salah satu jenis *Triterpenoid acids*, yang dikandung oleh ekstrak *Centella asiatica* dapat digunakan untuk meningkatkan proliferasi sel fibroblast dan matriks ekstraselular pada proses penyembuhan luka dengan menggunakan kadar asiaticosid sebesar 30 µg/ml. Pada penelitian Omar dkk (2011), penggunaan ekstrak *Centella asiatica* tanpa mengambil salah satu zat kandungannya untuk melihat efek antioksidan, neuroprotektif dan cytotoksik terhadap neuroblastoma, sel SH-SY5Y didapatkan kadar 1-50 µg/ml memberikan efek antioksidan dan neuroprotiktif sedangkan pada kadar ≥ 100 µg/ml akan memberikan efek cytotoksik terhadap sel SH-SY5Y.

Tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn merupakan tanaman perdu yang banyak tumbuh di pinggir jalan atau ladang yang tidak terawat dan dapat dijumpai di setiap daerah di Indonesia dengan nama yang berbeda-beda, antara lain kucing-kucingan, bungan anting-anting, atau rumput bolong-bolong.

Tanaman ini sudah digunakan sebagai pengobatan alternatif untuk menghilangkan gejala sisa pasien *post stroke* (penadakwah.nd). Bahan aktif dari tanaman ini masih belum semua diidentifikasi dengan baik. Beberapa bahan aktif yang sudah diketahui antara lain *Kaempferol glycosides, mauritianin, clitorin, nicotiflorin and biorobin, acalyphin, flavonoid dan lain – lain* (Nahrstedt.2006; Globinmed.nd).

Purwaningsih dkk (2008) telah membuktikan bahwa pemberian ekstrak akar kucing secara *eks vivo* maupun *in vivo* pada dosis 15-20 mg/ml memberikan efek neuroprotektor dan neuroterapi. Yolanda dkk (2010) meneliti efek ekstrak akar kucing terhadap neurogenesis pada kultur jaringan hippocampus dengan mengukur viabilitas sel dan tingkat proliferasi sel dengan menggunakan kadar ekstrak *Acalypah indica* 10 – 20 mg/ml.

Pengaruh ekstrak tanaman pegagan dan akar kucing untuk meningkatkan proliferasi sel dan viabilitas relatif sel pada kultur sel punca mesenkim secara *in vitro* masih belum banyak data yang ada. Oleh sebab diperlukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak pegagan dan akar kucing yang diberikan secara terpisah terhadap tingkat proliferasi dan viabilitas relatif sel punca mesenkim asal darah tepi sebagai sumber potensial terapi sel. Pada penelitian kali ini, penulis memilih dosis ekstrak *Acalypha indica Linn* 10 – 20 mg/ml untuk mengetahui efek ekstrak *Acalypha indica Linn* terhadap tingkat proliferasi sel dan viabilitas relatif sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi. Hal ini berdasarkan penelitian sebelumnya dimana sekarang penulis akan menguji ulang dosis yang pernah digunakan. Untuk dosis ekstrak *Centella asiatica Linn* , penulis menggunakan kadar 10 – 20 µg/ml asiaticoside yang dikandung ekstrak *Centella asiatica* dimana diketahui pada penelitian sebelumnya pada dosis rendah yaitu antara 1 – 50 µg/ml dapat memberikan efek antioksidan dan neuroprotektif serta pada dosis 30 µg/ml dapat meningkatkan proliferasi sel fibroblast. Penelitian ini merupakan awal dari penelitian penulis untuk menghasilkan sel saraf dari sel punca mesenkim asal darah tepi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh ekstrak pegagan pada dosis 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$ dan 20 $\mu\text{g/ml}$ terhadap viabilitas relatif sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi?
2. Bagaimana pengaruh ekstrak pegagan pada dosis 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$ dan 20 $\mu\text{g/ml}$ terhadap tingkat proliferasi sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi?
3. Bagaimana pengaruh ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/ml , 15 mg/ml dan 20 mg/ml terhadap viabilitas relatif sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi?
4. Bagaimana pengaruh ekstrak air akar kucing pada dosis 10 mg/ml , 15 mg/ml dan 20 mg/ml terhadap proliferasi sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengamati pengaruh pemberian ekstrak pegagan dan air akar kucing terhadap peningkatan efisiensi rekayasa sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi dalam pendekatan terapi sel.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) Membandingkan dan menganalisa pengaruh ekstrak pegagan (*Centella asiatica* Linn) terhadap tingkat viabilitas relatif sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi.
- 2) Membandingkan dan menganalisa pengaruh ekstrak air akar kucing (*Acalypha indica* Linn) terhadap tingkat viabilitas relatif sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi.
- 3) Membandingkan dan menganalisa pengaruh ekstrak pegagan (*Centella asiatica* Linn) terhadap tingkat proliferasi sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi.

- 4) Membandingkan dan menganalisa pengaruh ekstrak air akar kucing (*Acalypha indica* Linn) terhadap tingkat proliferasi sel pada kultur sel punca mesenkim asal darah tepi.

1.4 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak *Centella asiatica* Linn dapat meningkatkan viabilitas relatif sel punca mesenkim.
2. Ekstrak air *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan viabilitas relatif sel punca mesenkim.
3. Ekstrak *Centella asiatica* Linn dapat meningkatkan tingkat proliferasi sel punca mesenkim.
4. Ekstrak air *Acalypha indica* Linn dapat meningkatkan tingkat proliferasi sel punca mesenkim.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*Centella asiatica* Linn) dan akar kucing (*Acalypha indica* Linn) terhadap tingkat proliferasi dan viabilitas sel.
2. Memberikan data tambahan untuk penelitian selanjutnya pada tingkat molekuler yang berhubungan dengan pengaruh pemberian ekstrak pegagan dan akar kucing terhadap rekayasa sel atau jaringan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kultur Sel

2.1.1. Prinsip kerja kultur sel

Kultur sel adalah suatu teknik memelihara dan menumbuhkan satu sel hidup atau satu unit fungsional sel diluar tubuh suatu organism. Hal ini memberikan perkembangan dan revolusi terhadap pengetahuan terutama biologi sel, yang diperlukan tidak hanya dalam dunia penelitian namun dalam dunia ekonomi, farmasi, makanan dan industri bioteknologi (Martin.1994; Committee on the Biological and Biomedical Application of Stem cell research.2003; Freshney.2006). Prinsip kerja dari kultur sel secara umum adalah menjaga sel akan tetap hidup dan berfungsi secara alami dengan cara menyediakan lingkungan yang mendekati lingkungan alaminya. Untuk itu diperlukan beberapa hal yang mendukung prinsip kultur sel diatas seperti sterilitas, media pertumbuhan yang sesuai dengan sel yang ditanam, dan kontaminasi (Martin.1994; Committee on the Biological and Biomedical Application of Stem cell research.2003).

Sterilitas merupakan hal yang sangat penting sekali dalam prinsip kerja kultur sel. Semua alat, bahan dan ruangan yang berhubungan dengan kultur sel harus dalam keadaan steril dan bebas dari segala mikroorganisme lain. Hal ini dapat dilakukan dengan melakukan sterilitas semua alat, bahan dan ruangan dengan alat sterilitas seperti *autoclave*, pemanasan, penyinaran sinar UV dan melakukan kerja dalam *cabinet* steril disertai dengan baju perlindungan diri steril (Martin.1994).

Secara umum media tumbuh berbentuk cair dan mengandung nutrient, elektrolit, enzim pertumbuhan yang diperlukan oleh sel yang akan ditanam. Sifat dari media tumbuh merupakan cairan isoosmotik atau isotonik yang memiliki nilai osmolaritas sekitar 300mOsm/kgH₂O dan nilai tonisitas sekitar 150 mM. Nilai pH memegang peranan dalam viabilitas sel yang ditanam, secara umum sel dapat hidup pada pH sekitar 7,4 (Martin.1994; Freshney.2006).

Masalah kontaminasi memegang peranan penting dalam keberhasilan kultur sel. Organism yang sering mengkontaminasi kultur sel adalah bakteri, fungi, mycoplasma dan virus (Martin.1994).

Untuk mendapatkan sel yang akan dikultur diperlukan suatu proses yang dinamakan isolasi sel. Isolasi dapat dilakukan secara diseksi, enzymatik, mekanik dan pemurnian dengan perbedaan gradient densitas menggunakan sentrifus. Hasil sel yang diisolasi bila ditanam langsung disebut dengan kultur primer sedangkan hasil penanaman kembali dari kultur primer disebut dengan *cell strains/subculture* (Martin.1994; Freshney.2006).

2.1.2. Sel punca dewasa dan sel punca embrionik

Kata sel punca pertama kali populer didunia kedokteran sejak tahun 1950-an sejak ditemukannya sel penyusun sumsum tulang yang memiliki potensi membentuk seluruh jenis sel darah manusia. Sel ini disebut dengan sel punca haemopoietik (Halim.2010; Habib.2007; Committee on the Biological and Biomedical Application of Stem cell research.2003; Solter.2005). Sel punca dapat diartikan sebagai sel yang menjadi awal mula pertumbuhan sel lain yang menyusun keseluruhan tubuh organism. Karakteristik dari sel punca adalah belum berdeferensiasi, mampu memperbanyak diri sendiri, dan dapat berdeferensiasi menjadi lebih dari satu jenis sel. Berdasarkan tingkat maturasi tubuh manusia sel punca terbagi atas 2 jenis yaitu sel punca embrionik dan sel punca dewasa (Halim.2010; Committee on the Biological and Biomedical Application of Stem cell research.2003; Solter.2005).

Sel punca embrionik adalah sel punca yang didapat dari perkembangan individu yang masih dalam tahap embrio dengan mengambil massa sel dalam yang terdapat dalam blastosis pada usia embrio 3 – 5 hari. Sel punca embrionik bersifat pluripoten yang memiliki daya proliferasi tinggi, telomere yang panjang dan aktifitas enzyme telomerase yang tinggi (halim.2010; Solter.2005). Hal ini menyebabkan sel punca embrionik memiliki kecenderungan menjadi sel kanker.

Penggunaan sel punca embrionik saat ini masih bersifat kontroversi karena terbentur dengan masalah etik (Halim.2010).

Sel punca dewasa adalah sel punca yang ditemukan diantara sel yang telah mengalami deferensiasi dalam suatu jaringan yang telah matur. Banyak para peneliti menduga keberadaan sel punca dewasa adalah untuk menjaga homeostasis jaringan dimana sel punca berada. Sel punca dewasa bersifat multipoten, kemampuan proliferasi dan deferensiasi yang lebih rendah dibandingkan sel punca embrionik (Halim.2010; Committee on the Biological and Biomedical Application of Stem cell research.2003; Solter.2005). Kekurangan dari sel punca dewasa adalah konsentrasi yang jauh lebih rendah dibandingkan sel – sel yang telah berdeferensiasi pada jaringan dan lokasi tempat sel punca dewasa berada dalam jaringan tertentu sehingga klasifikasi sel punca dewasa dilakukan berdasarkan organ atau golongan sel yang akan menjadi alur deferensiasi, contohnya sel punca hematopoetik, sel punca jaringan saraf, sel punca jaringan kulit, sel punca mesenkim dan sel punca jantung (Halim.2010). Sel punca dewasa memiliki kemampuan ber-tansdeferensiasi menjadi sel dan jaringan tertentu seperti sel punca mesenkim yang dapat berdeferensiasi menjadi sel saraf (Lindvall.2005) dan sel punca hematopoetik yang berdeferensiasi menjadi sel jantung (Halim.2010).

2.2. Sel Punca Mesenkim sebagai salah satu jenis sel punca dewasa

2.2.1. Isolasi dan kultur sel punca mesenkim

Sel punca mesenkim merupakan sel menjanjikan sebagai dasar terapi sel karena memiliki beberapa keuntungan yaitu mudah diisolasi dari pasien/individu, memiliki kemampuan ekspansi yang relatif lebih cepat secara *in vitro* biarpun memiliki kemampuan ekspansi yang tinggi sel ini bersifat nontumorigenik (Pountos.2007; Hwang.nd; Manochantr.2010). Pada awalnya sel ini dikenal dengan sebutan sel punca non-haematopoeti. Sel punca non-haematopoetik pertama kali diperkenalkan oleh Julius Cohneim yang menemukan adanya sekelompok sel yang memiliki

morfologi seperti fibroblast disamping sel inflamasi pada proses penyembuhan luka dan pada tahun yang berbeda Alexander Friendenstein yang pertama kali mengisolasi sel punca mesenkim yang berasal dari sumsum tulang (Dean.2000).

Menurut Westwood dkk (nd), isolasi sel punca mesenkim didapatkan dengan cara memanfaatkan kemampuan sel punca untuk melekat pada plastik kultur jaringan atau dengan menggunakan penanda permukaan sel seperti SH2, SH3, SH4, Stro-1, CD105 dan lain sebagainya (lihat tabel 1). Sel punca mesenkim memerlukan medium yang mengandung konsentrasi tinggi *fetal calf serum* untuk meningkatkan proliferasi pada beberapa kali pasasi (Halim.2010; Sutiropoulou.2006). Kemampuan proliferasi dan diferensiasi sel punca mesenkim dipengaruhi oleh beberapa kompleks komunikasi sel yang menghasilkan faktor pertumbuhan spesifik seperti *Wnt signaling* dan *Notch signaling* (Westwood.nd).

Wnt signaling adalah faktor yang mengatur pertumbuhan sel dan *cell fate* pada sejumlah tipe sel. Pengaturan proses ini dimulai dengan ikatan ligand dengan reseptor transmembran. Kadar rendah dari *Wnt* akan meningkatkan proliferasi sel punca mesenkim sedangkan kadar tinggi *Wnt* menyebabkan terjadinya penghambatan pertumbuhan karena pada kadar tinggi *Wnt*, sel punca mesenkim akan mengsekresikan *Dkk-1* yang menghambat jalur *Wnt signaling* (Westwood.nd).

Notch signaling merupakan jalur penting dalam proses perkembangan sel (Westwood.nd). Menurut Westwood dkk (nd), prinsip dari *Notch signaling* memediasi pertemuan sel antar sel yang menyebabkan ber-ikatnya *Notch ligand* (*Delta-like-1, 3, 4* dan *Jagged-1, 2*) dengan *Notch reseptor* (*Notch 1 – 4*). Proses ikatan ligand – reseptor menghasilkan pembelahan proteolitik *Notch reseptor* yang melepaskan *Notch intracellular domain (NICD)* ke dalam nucleus yang mengakibatkan perubahan aktifitas transkripsi dan *repressor* menjadi *activator*.

Tabel 2.1. Penanda permukaan dari sel punca mesenkim. dikutip dari Westwood, The Biology of Human Mesenchymal stem cells

Marker type	Marker name	
	Expressed	Not expressed
Specific antigens	SH2, SH3, SH4, Stro-1, ACTA1	CD133
Haematopoietic markers		CD4, CD14, CD34, CD45 (PTPRC), c-kit/SCFR (CD117)
Cytokines and growth factors	IL-1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14, and 15 LIF, SCF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF	
Cytokine and growth factor receptors	IL-1R, IL3R, IL4R, IL6R, IL7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNFR1, TNFR2, TGFBR1, TGFBR2, bFGFR, PDGFR, EGFR	IL-2R (CD25)
Adhesion molecules	Integrins α 1 (CD49a), α 2 (CD49b), α 3 (CD49c), α x (CD49e), β 1 (CD29), β 3 (CD61), β 4 (CD104)	α 4 (CD49d), α L (CD11a), C β 2 (CD18)
Extracellular matrix molecules and receptors	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (CD106), ALCAM-1 (CD166), LFA3 (CD58), L-selectin (CD62L), endoglin (CD105), hyaluronate (CD44) CK18, CK19	ICAM-3 (CD50), E-selectin (CD62E), P-selectin (CD62P), PECAM-1 (CD31), vWF, Cadherin 5
Others	CD9, CD13, Thy-1 (CD90), HLA-ABC (MHC I) (low)	HLA-DR (MHC II)

2.2.2. Sumber sel punca mesenkim

Sel punca mesenkim dewasa dapat berdeferensiasi menjadi *chondrocyte*, *adipocyte*, *osteoblast*, *hepatocyte*, sel stromal, sel myoblast, sel mesangial, sel endothelial dan neuron (Tuan.2003; Pountos.2007; Westwood.nd; Bang.2005). Sel punca mesenkim tersebar pada berbagai jaringan tubuh organism dewasa yang mempunyai kemampuan untuk beregenerasi menjadi sel spesifik. Sumber sel punca mesenkim didapatkan dari jaringan lemak, periosteum, membrane synovial, otot, dermis, *pericyte*, sumsum tulang dan tulang trabekular. Saat ini sumber sel punca mesenkim yang paling banyak digunakan adalah sumsum tulang karena memiliki kandungan sel punca mesenkim lebih banyak dibandingkan

dengan sumber yang lain (Parr.2007; Hwang.nd). Kekurangan dari sumber sumsum tulang adalah prosedur isolasi bersifat invasif, menimbulkan rasa sakit yang sangat pada donor saat isolasi dan jumlah serta potensi deferensiasinya mengalami penurunan sejalan dengan usia donor. Sel punca mesenkim asal darah tali pusat diperoleh dengan metode yang tidak invasif dan tidak mengganggu ibu dan janin. Sel punca mesenkim asal jaringan lemak dapat diperoleh dengan metode invasif dan memerlukan teknik biopsy khusus (Kern.2006).

Oleh karena itu diperlukan alternatif sumber lain yaitu darah tali pusat dan darah tepi. Sangnyon Kim dkk (2006) mengatakan bahwa sel punca mesenkim asal darah tepi dapat berdeferensiasi menjadi sel saraf dalam *Neural progenitor basal medium* yang disuplemen dengan 2mM *L-glutamin*, 10 ng/mL *epidermal growth factor (EGF)*, 10ng/mL *basic fibroblast growth factor (bFGF)*, 100 U/mL *penicillin*, 0.1 mg/mL *streptomycin* yang ditanam dalam cawan 100 mm *non-treated* dan diinkubasi 3 hari dengan penambahan *EGF* dan *bFGF* setiap hari. Langkah selanjutnya koleksi neurosphere yang terbentuk dengan setrifuganya dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit dan di *resuspended* dalam *NPBM* yang disuplemen 2mM *L-glutamin*, 100 U/mL *penicillin* dan 0.1 mg/mL *streptomycin* pada cawan plastik dan diinkubasi selama 1 minggu.

Cesselli dkk (2009) dalam artikelnya mengatakan bahwa darah tepi mengandung sejumlah populasi *multipotent progenitor cells (MPC)* yang memiliki potensi klinik untuk mengobati beberapa penyakit dari beberapa organ. Populasi *MPC* dari darah tepi terdiri atas fibrosit dan sel punca mesenkim. Kedua populasi sel ini dapat berdeferensiasi menjadi sel neurogenik, sel myogenik, sel osteogenik, sel endothelial dan sel hepatosit dalam media yang sesuai. Hal ini membuat darah tepi merupakan salah satu alternatif sumber untuk mendapatkan sel punca mesenkim dalam memenuhi kebutuhan terapi sel.

Sources of multipotential adult mesenchymal stem cells			
Source tissue	Multilineage differentiation potential	Representative references	
Bone marrow	Adipocyte	[26,143]	
	Astrocyte, neuron	[12,137]	
	Cardiomyocyte	[14,15, 131–133]	
	Chondrocyte	[26,46,76,79]	
	Hepatocyte	[8,7,144]	
	Mesangial cell	[13]	
	Muscle	[10,35]	
	Neuron	[11,12]	
	Osteoblast	[26,33,43,145–147]	
	Stromal cell	[148]	
	Various embryonic tissue lineages	[139]	
	Muscle	Adipocyte, myotubes, osteocyte	[138]
		Endothelial cell, neuron	[20,149]
Chondrocyte		[112]	
Osteocyte		[20]	
Trabecular bone	Adipocyte, chondrocyte, osteoblast	[27–29]	
Dermis	Adipocyte, chondrocyte, muscle, osteoblast	[21]	
Adipose tissue	Chondrocyte, muscle, osteoblast	[16]	
	Stromal cell	[150]	
Periosteum	Chondrocyte, osteoblast	[17,18]	
Pericyte	Chondrocyte	[22]	
	Osteoblast	[23,24]	
Blood	Adipocyte, fibroblast, osteoblast, osteoclast	[25]	
Synovial membrane	Adipocyte, chondrocyte, muscle, osteoblast	[18]	

Gambar 2.1. Sumber sel punca mesenchymal, dikutip dari Porat.2006.

2.2.3. Karakteristik sel punca mesenkim asal darah tepi

Sel punca mesenkim merupakan sel multipoten karena dapat berdeferensiasi menjadi berbagai sel yang menjadi garis keturunannya. Bruder dkk mengatakan bahwa karakter sel punca mesenkim asal sumsum tulang memiliki *growth kinetic* yang lama dan memiliki potensial berdeferensiasi menjadi sel osteogenic dengan rata-rata 38 ± 4 *population* doubling (Deans.2000; Ho.2006).

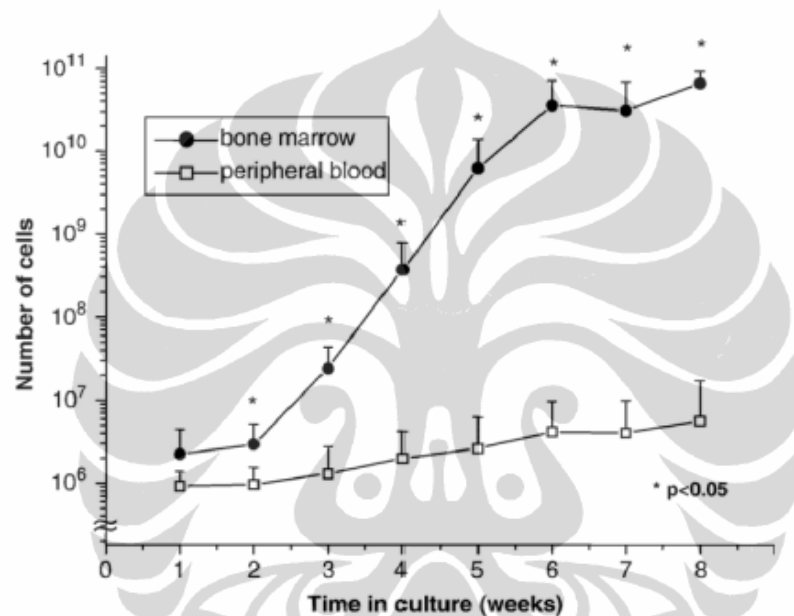
Sel punca mesenkim merupakan populasi kecil dari sel mononuclear sumsum tulang. Sesuai dengan deskripsi *Freidenstein* (1976), sel ini akan berkembang dan tumbuh pada media kultur seperti *flattened fibroblastlike cells* dan diduga dapat berdeferensiasi menjadi tulang, tulang rawan, sel myosit jantung, sel glia dan sel saraf dalam lingkungan *in vitro* and *in vivo* (Tuan.2003; Porat.2006; Manochantr.2010; Barzilay.2006).

Sel punca mesenkim manusia dapat ditemukan dalam darah manusia normal yang dapat berproliferasi dalam media kultur yang sesuai dan memiliki *surface marker* seperti CD14⁻, CD31⁻, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, dan CD166⁺ (Kim.2006; Tuan.2003; Lee.2004; Moore.2005; Cesselli.2009; Ho.2006; Gendebien.2005). Sel ini memiliki kemampuan berdeferensiasi menjadi fibroblast, osteoblast dan adiposit. Sel CD34 *fibroblast-like* pada darah tepi memperlihatkan karakteristik sel punca mesenkim yang berbeda dengan sel punca hemapoetik. Dikarena darah tepi mudah pengambilannya, tidak invasif, tidak menimbulkan rasa nyeri yang sangat saat isolasi, dapat berkembang sendiri, multipoten dan bersifat klonogenik maka sel punca mesenkim yang diisolasi dari darah merupakan kandidat bagus untuk terapi sel.

Sel punca mesenkim memiliki umur yang terbatas hal ini dibuktikan bahwa jumlah sel punca mesenkim akan menurun diiringi oleh usia pasien dan tergantung tempat isolasi dan status penyakit sistemik. Dalam artikel Fehrer (2005), sel punca mesenkim manusia memiliki kemampuan proliferasi sekitar 40-50 populasi (Stenderup dkk, 2003). Penuaan sel punca mesenkim secara *in vitro* berjalan seiring dengan kehilangan kemampuan multipoten dari sel clonal. Begitu juga dengan sel punca mesenkim yang berasal dari donor dengan peningkatan usia ditemukan mengalami penurunan jumlah *rapidly self-renewing cells (RS cells)* dan jumlah *colony-forming units* mengalami penurunan (Fehrer.2005). Peningkatan jumlah morfologi sel punca mesenkim yang besar dan adanya ekspresi *senescence-associated (SA) β -galactosidase* mengindikasikan adanya proses penuaan dan penurunan kemampuan proliferasi dan deferensiasi dari sel punca mesenkim. Penuaan sel punca mesenkim juga berhubungan dengan perubahan panjang telomere pada sel (Fehrer.2005). Sel yang berasal dari donor yang berumur akan mengalami erosi telomere 17 bp per tahun. Jika mencapai nilai erosi telomere 10 bp maka sel akan berhenti membelah (Fehrer.2005).

Zhen dkk (2009) dalam penelitiannya mengungkapkan bahwa jumlah populasi sel punca mesenkim akan meningkat diiringi oleh adanya

keadaan patologik seperti diantaranya kerusakan otot rangka yang kronik, luka bakar, kanker payudara, melanoma dan kanker kolon. Hal ini disebabkan karena pada keadaan patologi terjadi peningkatan beberapa growth factor dan sitokin seperti VEGF, bFGF, HGF, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, PDGF dan lain sebagainya.



Gambar 2.2. Ekspansi kultur *BMSC* (garis hitam) dan *PMSC* (garis kotak-kotak). Jumlah sel punca mesenkim dihitung setiap minggu. *Error bars* menggambarkan bahwa SD dari rerata * $p < 0.05$ ($n=16$) dikutip dari artikel Kim.2006.

2.2.4. Potensial klinik sel punca mesenkim

Kemampuan deferensiasi dan transdeferensiasi sel punca mesenkim menyebabkan jenis sel ini menjanjikan sebagai kandidat untuk aplikasi klinis dalam hal ini terapi sel. Pengaruh transplantasi sel punca mesenkim adalah untuk memfasilitasi penyembuhan dan regenerasi jaringan. Hal ini disebabkan bahwa sel punca mesenkim mengeluarkan beberapa faktor seperti *Growth factor*, *cytokine*, dan molekul adhesi yang mengubah lingkungan sekitar jaringan untuk memicu terjadinya perbaikan jaringan dan sel yang rusak. Salah satu aplikasi klinik dari sel punca

mesenkim adalah terapi neurorestoratif penyakit stroke (Gendebein.2005; Barzilay.2006; Deng.2006; Chen.2006; Zhang.2009).

2.2.4.1. Terapi neurorestoratif

Kemampuan regenerasi dari sel punca mesenkim sudah dibuktikan untuk regenerasi sel myocardial, otot tungkai dan iskemia otak⁴⁵. Pemberian sel punca mesenkim melalui intracerebral, intravena dan intra arteri dimulai 24 jam setelah stroke memberikan hasil yang memuaskan. Begitu juga dengan pemberian sel punca mesenkim 7 hari sampai 1 bulan setelah stroke meningkatkan terjadinya *brain plasticity* dan perbaikan fungsional otak (Bang.2005; Barzilay.2006; Deng.2006; Chen.2006).

2.2.4.2. Mekanisme efek neurorestoratif dari sel punca mesenkim

Sel punca mesenkim merupakan salah satu sel punca yang multipotensial dan dapat berdeferensiasi menjadi berbagai jenis jaringan yang berasal dari mesenkim seperti *chondrocyte*, *osteoblast*, *adipocyte*, *fibroblast*, sel stroma sumsum tulang dan neuron. Untuk berdeferensiasi menjadi sel saraf, sel punca mesenkim dapat berdeferensiasi menjadi astrocyte, neuron dan sel endothelial otak. Saat terapi sel punca diberikan 24 jam setelah stroke terjadi hasil yang cukup signifikan dapat dilihat pada 7 hari setelah pemberian. Tidak semua sel punca mesenkim berubah menjadi sel saraf namun lebih berfungsi sebagai pemicu sekresi beberapa *growth factor* seperti *VEGF*, *bFGF* dan *BDNF* (Zhang.2009). *Growth factor* ini yang nantinya akan mensupport dan meningkatkan terjadinya proses angiogenesis, neurogenesis dan *synaptic plasticity*. *MSC* bertindak sebagai biokimia dan katalisator sel parenkim otak untuk menghasilkan berbagai macam sitokin dan faktor tropik untuk menambah terjadinya angiogenesis di area sekitar lesi iskemia yang mana sel punca mesenkim dapat mencapainya.

Neurogenesis yang terjadi di *SVZ* dan *synaptogenesis* dapat ditingkatkan pada terapi *MSC*. *MSC* dapat menginduksi growth faktor lain yang timbul saat terjadi cedera otak seperti *bone morphogenetic protein*

(*BMP2* dan *BMP4*) atau *connexin* yang berkerja pada astrocytes. *MSC* secara signifikan dapat menurunkan pembentukan jaringan parut pada sel glia dan menyebabkan terjadi proses remodel sel glial-axonal (Zhang.2009).

Untuk memenuhi kebutuhan terapi, sel punca mesenkim dapat diekspansi secara *ex vivo* dan dapat ditransplantasikan secara baik dan aman. Sel punca mesenkim tidak menimbulkan reaksi imunorejeksi dan alergi bila digunakan.

2.3. Tanaman herbal yang meningkatkan proliferasi sel

Banyak tanaman herbal yang sudah diketahui memiliki efek dalam dunia klinik untuk menyembuhkan berbagai penyakit seperti infeksi, gangguan imunologi dan kanker. Punturee dkk (2005) dalam penelitiannya membandingkan beberapa tanaman herbal yang memiliki efek immunomodulasi seperti *Murdannia loriformis*, *Cymbopogon citratus*, *Momornica charantia*, *Centella asiatica*, *Alliumsativum*, *Carthamus tinctorius*, *Eclipta alba*, *Cyperus rotundus*, *lotus pollen* (*Dee-Buo*) dan *Ke-Sorn-Bou* yang dapat meningkatkan proliferasi sel PBMC. Hasil yang didapatkan adalah hanya tanaman herbal *Centella asiatica* yang memiliki efek immunostimulasi terhadap proliferasi sel PBMC sedangkan ekstrak *Ke-sorn-Bou*, *Dee-Bou*, *Cyperus rotundus* dan *Eclipta alba* memiliki efek immunosupresif.

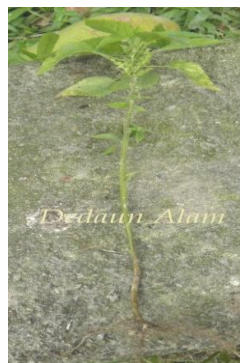
Selain tanaman herbal diatas dikenal juga tanaman herbal *Acalypha indica* Linn atau akar kucing yang memiliki pengaruh antioksidasi kuat. Balakrishnan dkk (2009) membandingkan efek antioksidan yang dimiliki *Acalypha indica* Linn dengan asam askorbat. Pada penelitian ini peneliti menggunakan kadar 100-1000 µg/ml ekstrak ethanol *Acalypha indica*. Hasil yang didapat menerangkan bahwa antioksidan yang dimiliki oleh *Acalypha indica* Linn lebih tinggi secara signifikan dengan yang dimiliki asam askorbat. Hal ini diduga dengan adanya kandungan *flavanoid* dan *phenolic* yang dimiliki oleh *Acalypha indica* Linn. Dengan adanya penelitian sebelumnya tentang pengaruh tanaman herbal terhadap kelangsungan sel, membuka peluang dari tanaman herbal untuk digunakan sebagai suatu suplemen dalam kultur sel untuk meningkatkan efisiensi ekspansi sel.

2.3.1. Akar Kucing (*Acalypha indica* Linn)

Tanaman akar kucing atau *Acalypha indica* Linn merupakan tanaman perdu yang banyak tumbuh di pinggir jalan atau ladang yang tidak terawat dan dapat dijumpai di setiap daerah di Indonesia dengan nama yang berbeda-beda, antara lain kucing-kucingan, bungan anting – anting, atau rumput bolong – bolong. Tanaman akar kucing ini merupakan tanaman yang tumbuh menjulang dengan tinggi dapat mencapai 30 – 100 cm, daun berbentuk oval dan bergerigi pada tepinya dengan ukuran daun sekitar 3 – 5 cm dan bungan seperti anting – anting dengan warna hijau (Penadakhwah.nd; Globinmed.nd; Walter.nd).

Secara taksonomi Tanaman ini digolongkan sebagai (Globinmed.nd; google.nd):

Kingdom : Plantae
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh).
 Super Divisi : Spermatophyta (menghasilkan biji)
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
 Subkelas : Rosidae
 Ordo : Euphorbiales
 Famili : Euphorbiaceae
 Genus : *Acalypha*
 Species: *Acalypha indica* Linn.



Gambar 2.3. *Acalypha indica* Linn dikutip dari artikel Walter.nd.

Pada penelitian phytochemical, tanaman akar kucing mengandung beberapa zat aktif diantaranya *flavonoid*, *acalyphamide*, *aurantiamide*, *succinimide*, *calypholacetate*, *2-methyl anthraquinone*, asam *tri-*o*-methylelagic*, *β -sitosterol* dan *β -D-glucosida*, *cyanogenetic glycoside*, 2 alkaloid yaitu *acalyphin* dan *triacetonamid*, juga zat aktif lain seperti *n-octasanol*, *β -sitosterol acetate*, *kaempferol*, *quebrachitol*, *tannin*, *resin*, asam *hydrosianic* dan lemak esensial (Nahrstedt.2006; globinmed.nd; Walter.nd; Google.nd; Solomon.2005). Kucing yang sedang sakit sangat menyukai tanaman ini karena itu dinamakan dengan akar kucing. Setelah memakan tanam ini beberapa saat kucing akan memuntahkannya dan kucing tersebut terlihat lebih sehat. Pada manusia, akar kucing secara tradisional menggunakan akar kucing sebagai laxative, antihelmetik, anti mual dan expectorant (Walter.nd; Solomon.2005). Tanaman ini juga berguna untuk menyembuhkan bronchitis kronis, asma, scabies, rematik, luka bakar dan sakit kepala hebat.

Berdasarkan penelitian Purnawaningsih dkk (2008; 2010) yang melakukan pemberian ekstrak air *acalypha indica* Linn untuk mengetahui efek neuroproteksi dan neuroterapi yang dilakukan secara *ex vivo* pada otot katak yang diberikan pelumpuh otot. Peneliti dapat membuktikan efek neuroproteksi dan neuroterapi pada ekstrak akar kucing pada dosis 15 – 20 mg namun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kontrol. Begitu juga dengan Yolanda dkk (2010) yang melakukan penelitian untuk mengetahui efek neurogenesis yang dimiliki oleh akar kucing dengan menggunakan sel hipokampus tikus yang mengalami hipoksia secara *in vitro*. Hasilnya ekstrak air akar kucing dapat meningkatkan viabilitas sel dan proliferasi sel pada dosis 10 – 20 mg/ml.

2.3.2. Pegagan (*Centella asiatica* Linn)

Centella asiatica atau pegagan merupakan tumbuhan liar yang tumbuh diperkebunan, ladang, pematang sawah ataupun ladang yang

lembab dan agak berair yang berada disekitar 700 meter dari permukaan laut (Jamil.2007; Mohandas.2005). Tanaman ini berasal dari daerah asia tropik dan tersebar di asia tenggara termasuk Indonesia, india, china, jepang dan Australia. Tanaman ini memiliki berbagai nama yang sesuai dengan area tumbuhnya seperti diindonesia dikenal dengan nama pegagan, di india dikenal dengan nama brahmi, di amerika dikenal dengan nama *Indian Pennywort* dan lain sebagainya (Jamil.2007; Mohandas.2005; Singh. 2010).

Pegagan merupakan tanaman yang tumbuh menjalar dan berbunga sepanjang tahun. Daunnya seperti bentuk ginjal yang bergerigi pada tepinya dengan panjang 2 – 6 cm dan lebar 1.5 – 5 cm dan timbul sekitar 1 – 3 buah pada satu tangkai, tangkainya ramping, dengan bunga bergerombol kecil yang berwarna ungu atau merah jambu. Tinggi tanaman ini sekitar 15 cm. Berdasarkan sistem taksonomi, pegagan digolongkan sebagai (Jamil.2007; Singh.2010; Indonesian-herbal blogspot.2008):

Kingdom	: plantae
Divisi	: spermatophyta
Kelas	: Dicotyledone
Ordo	: Umbillales
Famili	: Umbiliferae (Apiaceae)
Genus	: Centella
Species	: Centella asiatica dan Hydrocotyle asiatica



Gambar 2.4. *Centella asiatica*, (A) Daun, (B) Batang dan (C) Bunga, dikutip dari artikel Singh (2010).

Simplicia tanaman pegagan mengandung beberapa senyawa kimia seperti (Jamil.2007; Singh.2010; Indonesia-herbal blogspot.2008; Alternative Medicine review.2007):

- *Triterpenoid* seperti *asiaticoside*, *centelloside*, *madecossoside*, *thankuniside*, asam isothakunic, *centellose*, asam Asiatic, asam centellic, asam madecassic, *brahmoside*, *brahminoside* dan *brahmicacid*. Senyawa kimia ini berfungsi sebagai penyembuhan, antibacterial, fungicidal dan mengaktivasi proliferasi sel. Hal ini dibuktikan oleh *Marquart et al* yang meneliti bahwa pemberian triterpenoid dari *Centella asiatica* dapat menimbulkan proliferasi sel fibroblast dan pembentukan kolagen pada luka.
- Flavanoid seperti *Flavanoids*, *3-glucosylquercetin*, *3-glucosylkaemferol* dan *7-glucosylkaemferol*. Senyawa ini berfungsi sebagai antiinflamasi, antibacteri, antiviral, antialergic, *cytotoxic* antitumour, penyembuhan penyakit neurodegeneratif, dan vasodilatasi pembuluh darah. *Flavonoid* juga dapat menghambat proses peroksidasi lemak, *platelet aggregation*, kerusakan kapiler dan dapat mengaktifkan enzim *cylo - oxigenase* dan *lypoxigenase* sehingga senyawa ini memiliki efek antioksidan dan penangkap radikal bebas. Senyawa ini juga menghambat enzim *hydrolases*, *hyalouronidase*, *alkaline phosphatase*, *arylsulphatase*, *cAMP phosphodiesterase*, *lipase*, *α-glucosidase*, dan *kinase*.
- Asam lemak seperti asam palmitic, *stearic*, *lignoceric*, *oleic*, *linoleic* dan *linolenic*.
- Alkaloid seperti *hydrocotylin*

Berdasarkan penelitian Mohandas dkk (2005 & 2006) yang memberikan ekstrak air *Centella asiatica* dengan dosis 140 mg – 420 mg/kgbb kepada tikus untuk mengetahui efek neurogenesis dan perpanjangan dendritic sel CA3 hipokampalis. Hasil yang didapatkan adalah ekstrak air/simplicia *Centella asiatica* dapat meningkatkan

pertumbuhan dendrite sel CA3 hipokampalis yang dapat digunakan untuk terapi penyakit neurodegeneratif, stress dan meningkatkan memori.

Penelitian Pitella dkk (2009) mengatakan bahwa kandungan senyawa *flavanoid* dan *phenolic* yang terdapat pada *Centella asiatica* dapat berfungsi sebagai antioxidant dan antitumor sehingga dapat melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Peneliti menggunakan ekstrak air *Centella asiatica* (50 g/L) yang didalamnya mengandung kadar *phenolic* dan *flavanoid* sekitar 2.86 g/ 100 g dan 0.361 g/ 100 g yang diberikan kepada tikus yang mengalami *melanoma*, *breast cancer* dan *glioma*. Hasil yang didapat adalah *Centella asiatica* memiliki efek antioksidan yang lebih tinggi yaitu $IC_{50} = 31,25 \mu\text{g/mL}$ dibandingkan dengan yang terdapat pada asam ascorbic dan *butylated hydroxytoluene* (*BHT*) yang hanya mencapai $IC_{50} = 2,50 \mu\text{g/mL}$ dan $7,58 \mu\text{g/mL}$. Untuk efek antitumor, ekstrak air *Centella asiatica* dapat efektif menghambat tumor payudara dan melanoma dengan hasil $IC_{50} = 648 \mu\text{g/mL}$ dan $698 \mu\text{g/mL}$ sedangkan untuk menghambat glioma diperlukan IC_{50} yang lebih tinggi yaitu $1000 \mu\text{g/mL}$. Oleh karena itu efek cytotoxicitas *Centella asiatica* dapat terjadi pada dosis antara 10 – 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Menurut Lu dkk (2004), zat asiaticosid, salah satu jenis *Triterpenoid acids*, yang dikandung oleh ekstrak *Centella asiatica* dapat digunakan untuk meningkatkan proliferasi sel fibroblast dan matriks ekstraselular pada proses penyembuhan luka dengan menggunakan kadar asiaticosid sebesar 30 $\mu\text{g/ml}$.

Pada penelitian Omar dkk (2011), penggunaan ekstrak *Centella asiatica* tanpa mengambil salah satu zat kandungannya untuk melihat efek antioksidan, neuroprotektif dan cytotoxic terhadap neuroblastoma, sel SH-SY5Y didapatkan kadar 1-50 $\mu\text{g/ml}$ memberikan efek antioksidan dan neuroprotektif sedangkan pada kadar $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ akan memberikan efek cytotoxic terhadap sel SH-SY5Y.

Pada penelitian saat ini, penulis memilih kadar 10 – 20 $\mu\text{g/ml}$ untuk ekstrak *Centella asiatica* yang mengandung asiaticosid dan 10 – 20 mg/ml untuk ekstrak *Acalypha indica* Linn. Pemilihan ini didasarkan

dengan penelitian sebelumnya dan pada penelitian ini penulis ingin mengetahui efek yang dimiliki oleh masing – masing ekstrak terhadap tingkat proliferasi sel dan viabilitas relative sel dibandingkan dengan kontrol.

2.4. Pemeriksaan viabilitas sel dan proliferasi sel dengan metode 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

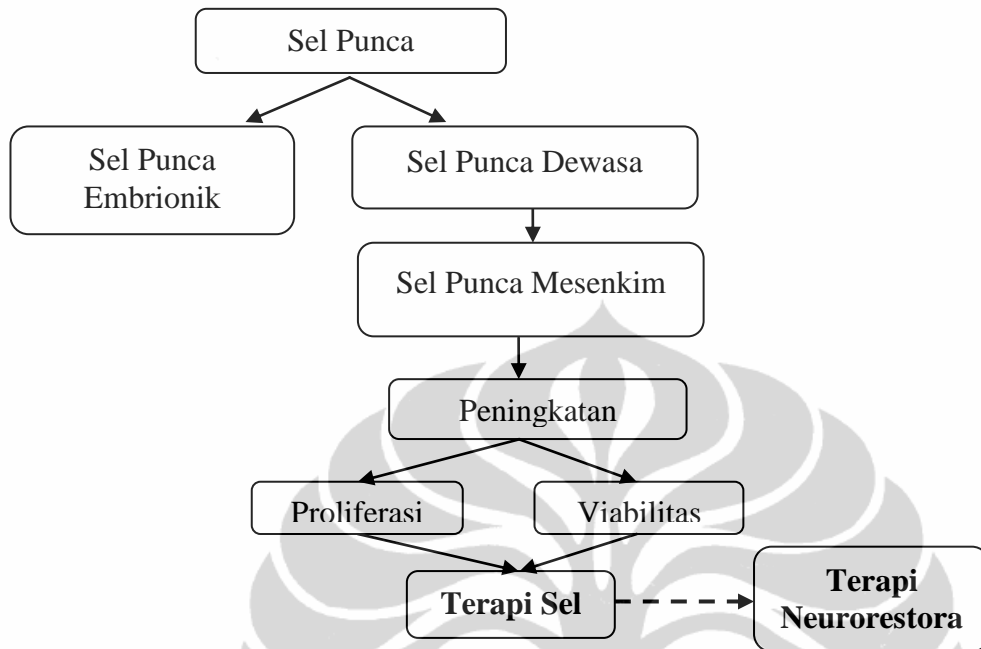
Pemeriksaan MTT merupakan salah satu pemeriksaan kolorimeterik yang mengukur aktifitas enzim dehidrogenase mitokondria yang memecah cincin tetrazolium dari 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) menghasilkan Kristal formazan berwarna ungu. Sifat Kristal tetrazolium yang terbentuk tidak mudah larut dalam air hanya dengan penambahan isopropanol Kristal baru dapat larut. Setelah Kristal terlarut, warna larutan yang terbentuk dapat diukur menggunakan microplate spectrofotometri/ELISA.

Kemampuan sel untuk memetabolisme MTT mengindikasikan baiknya mitokondria sel yang diuji sehingga dapat mengukur viabilitas sel secara kuantitatif, semakin banyak Kristal formazan yang terbentuk dapat mengindikasikan tingginya viabilitas sel sedangkan peningkatan warna absorbansi formazan mengindikasikan peningkatan proliferasi sel. Viabilitas relatif sel dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Viabilitas relative (\%)} = \frac{\text{Absorbansi (perlakuan)}}{\text{Absorbansi (kontrol)}} \times 100$$

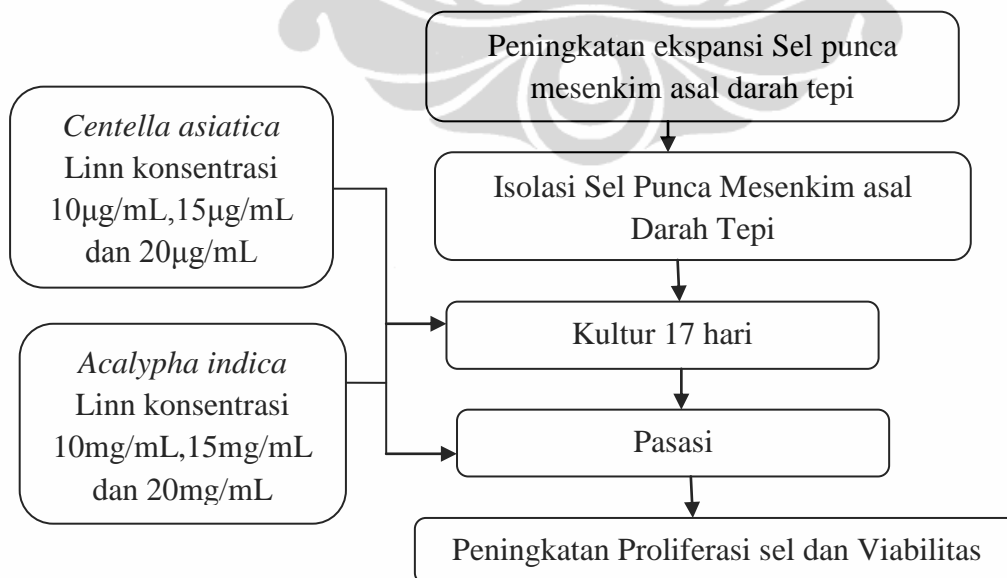
Penulis memilih pemeriksaan ini dikarenakan oleh masih adanya zat aktif yang terkandung dalam ekstrak *Centella asiatica* dan *Acalypha indica* Linn yang tidak diketahui efeknya terhadap kultur sel dan penulis tidak mengetahui apakah benar pada pembuatan ekstrak zat yang ada sesuai dengan kandungan yang sudah standar. Untuk menjawab hal ini penulis akan melakukan penelitian lebih lanjut tentang efek lain yang berpengaruh terhadap kultur sel kemudian.

3. KERANGKA TEORI



Gambar 2.5 Diagram Kerangka Teori

4. KERANGKA KONSEP



Gambar 2.6 Diagram Kerangka Konsep

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro* pada kultur sel mesenkim yang bertujuan untuk memperoleh data efek ekstrak *Centella asiatica* dan *Acalypha indica* Linn terhadap tingkat proliferasi sel dan persentase viabilitas relatif sel yang dibandingkan dengan kontrol agar dapat menjadi suatu alternatif dalam membantu proses ekspansi sel punca mesenkim asal darah tepi yang memiliki populasi sangat sedikit.

Kultur sel punca mesenkim ini diperoleh dari hasil isolasi darah tepi sukarelawan dewasa muda. Pengambilan dan pengumpulan darah tepi dilakukan oleh analis laboratorium klinik dengan memakai *Vacuet vacuum* ukuran 3 ml sebanyak 10 buah. Menurut Yolanda dkk (2010) efek neurogenesis dari ekstrak *Acalypha indica* Linn pada kultur jaringan hipokamus pada dosis 10 – 20 mg/ml. Menurut Lu dkk (2004), zat asiaticosid, salah satu jenis *Triterpenoid acids*, yang dikandung oleh ekstrak *Centella asiatica* dapat digunakan untuk meningkatkan proliferasi sel fibroblast dan matriks ekstraselular pada proses penyembuhan luka dengan menggunakan kadar asiaticosid sebesar 30 µg/ml. Pada penelitian Omar dkk (2011), penggunaan ekstrak *Centella asiatica* tanpa mengambil salah satu zat kandungannya untuk melihat efek antioksidan, neuroprotektif dan cytotoksik terhadap neuroblastoma, sel SH-SY5Y didapatkan kadar 1-50 µg/ml memberikan efek antioksidan dan neuroprotektif sedangkan pada kadar ≥ 100 µg/ml akan memberikan efek cytotoksik terhadap sel SH-SY5Y.

Pada penelitian ini akan diuji pengaruh ekstrak air *Acalypha indica* Linn pada dosis 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml dan ekstrak air *Centella asiatica* Linn pada dosis 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml pada kultur sel mesenkim. Tiap kelompok sel mesenkim diberikan ekstrak air *Acalypha indica* Linn dengan dosis 10 mg/ml (kelompok perlakuan A), 15 mg/ml (kelompok perlakuan B), 20 mg/ml (kelompok perlakuan C) dan diberikan

ekstrak *Centella asiatica* dengan dosis 10 µg/ml (kelompok perlakuan D), 15 µg/ml (kelompok perlakuan E), 20 µg/ml (kelompok perlakuan F) dengan 1 kelompok kontrol yang tidak diberi ekstrak sebagai pembanding. Selanjutnya tingkat proliferasi dan viabilitas sel diukur dengan menggunakan metode *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT).

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Cell Culture* PT. Kimia Farma (untuk kultur dan isolasi) dan Laboratorium *Cell Culture* Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya (untuk pengukuran absorbansi MTT dg *microreader*) pada bulan Januari 2011 hingga Juni 2011.

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1. Alat Penelitian

1. *Laminar air flow, ESCO class II Biohazard Safety Cabinet (BSC) type IEC 61010-1*
2. Mikroskop *inverted, Observer.A1 Zeiss* dengan *Axio Cam*
3. Mikroskop biasa, *Scope.A1 Zeiss*.
4. Inkubator, *Galaxy 170 R, New Brunswick an Eppendorf Company*
5. ELISA/microplate reader,
6. *Vorteks Mixer, Model VM-1000, Digisystem*
7. *Waterbath, Polyscience*
8. Timbangan gram,
9. Timbangan milligram, *Kern ABS/ABJ Version 1.3*
10. Sentrifuse, *EBA 20. Hettich Zentrifugen*
11. Cawan petri diameter 35 mm, *Corning*
12. *Multiwell Plate 96 well, IWAKI*
13. Kamar hitung/haemocytometer, *Bright – Line, Sigma - Aldrich*
14. Cover slip, *Bright – Line, Sigma - Aldrich*
15. Tabung sentrifuge ukuran 50 ml,
16. Tabung sentrifuge ukuran 15 ml,

17. *Screw Cap Tubes* ukuran 5 ml,
18. *Vacuet vacuum* dengan *EDTA* ukuran 3 mL
19. Pipet serologi ukuran 5, 10, 25 mL
20. Filter dengan pori 0,22 μm ,
21. Pipettor + pipette tips

3.3.2. Bahan Penelitian

1. Darah segar umur \pm 1 jam diambil dari laboratorium klinik Kimia Farma
2. Ekstrak air (infusa) *Acalypha indica* Linn (300 mg/ml), diperoleh dari Departemen Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
3. Ekstrak air *Centella asiatica* Linn (2500 μg *asiaticoside*/ml), diperoleh dari Unit Riset dan Pengembangan Laboratorium EBA, Kimia Farma
4. *Alfa Minimal Essential Medium (α -MEM) + Glutamax* stok, *GIBCO (1x)*, *Invitrogen*
5. *Ficol Histopaque 1077*, 100 mL, *Sigma*
6. *Fetal Bovine Serum (FBS)*, *Gibco*, 1 x
7. *Penisilin-Streptomisin (Penn-Strep)*,
8. *L-Glutamine*, 200 mM, 100 mL, 1 x, *Sigma*
9. *Phosphate Buffer Saline (PBS)*
10. *Trypsin-EDTA*, *SAFC Bioscience*, 1 x
11. Gas 5% O₂/5% CO₂/N₂ balans, PT. *Air Liquide* Indonesia
12. *Trypan blue* dengan *dilution factor* 1:10
13. *CellQuanti-MTT assay kit*, *BioAssay System*

3.4. Populasi Penelitian

3.4.1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah pria dewasa muda.

3.4.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah darah segar usia ± 1 jam dalam EDTA sebanyak ± 30 ml.

3.4.3. Besar Sampel

Perhitungan besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus Federer :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Dengan t = jumlah kelompok perlakuan, n = jumlah sampel.

Pada penelitian ini terdapat 7 kelompok perlakuan (1 kelompok elativ dan 6 kelompok perlakuan), maka jumlah sampel adalah,

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus di atas, jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 3,5 sampel untuk tiap kelompok perlakuan namun peneliti memilih 6 sampel untuk tiap kelompok perlakuan, maka jumlah total sampel adalah 42 sampel. Semua total sampel diperoleh dari *pellet* darah yang sama.

3.5. Parameter dan Variabel Penelitian

- 1) Parameter penelitian adalah tingkat proliferasi sel dan viabilitas relatif sel.
- 2) Variabel bebas/independen (variabel yang mempengaruhi nilai variabel terikat) : kadar/dosis ekstrak *Acalypha indica* Linn dan *Centella asiatica* Linn
- 3) Variabel terikat/dependen (Variabel yang nilainya dipengaruhi variabel yang lain dan merupakan variabel yang akan dianalisa) : tingkat proliferasi sel dan viabilitas relatif sel.

Tabel 3.1 Parameter, variabel terikat dan variabel bebas

Variabel	Parameter	Cara Pengukuran	Skala	Satuan
Variabel Bebas	Kadar/dosis ekstrak <i>Acalypha indica</i> Linn			mg/mL
	Kadar/ dosis ekstrak <i>Centella asiatica</i> Linn			µg/mL
Variabel terikat/dependen	Viabilitas elative sel	Pemeriksaan MTT	numerik	% (persen)
	Tingkat Proliferasi sel	Pemeriksaan MTT	numerik	

3.6. Definisi Operasional

- Ekstrak air *Centella asiatica* Linn didapatkan dari laboratorium pengembangan Kimia Farma dengan konsentrasi asiaticoside sebesar 5%.
- *Acalypha indica* Linn yang digunakan merupakan ekstrak air yang diperoleh dari Departemen Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan bahan utama didapatkan dari daerah bekasi. Ekstrak air ini dibuat dari akar simplisia (akar *Acalypha indica* Linn kering) sebesar 30% yang didekok 2 kali masing-masing selama 30 menit lalu disaring dengan kain flannel sehingga didapatkan cairan infusa sebesar 100 ml.
- Parameter pengukuran pada penelitian ini dilakukan dengan pemeriksaan MTT untuk menilai viabilitas relatif sel dan tingkat proliferasi sel. MTT adalah bahan kimia larut air yang bila terpajan dengan enzim suksinil dehidrogenase mitokondria sel hidup akan diubah menjadi Kristal formazan ungu yang tidak larut dalam air. Kristal formazan ungu dapat dilarutkan dengan isopropanol, dan warna pada larutan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometri. Data yang didapat dikurangi dengan kontrol negatif yang hanya berisi media tanpa adanya sel.

- Untuk pengukuran viabilitas relatif sel diukur dengan membandingkan nilai absorbansi cawan perlakuan dengan nilai absorbansi kontrol sehingga didapatkan hasil dari persentase absorbansi yang menggambarkan viabilitas relatif dari sel.
- Untuk pengukuran tingkat proliferasi sel diukur dengan membandingkan nilai absorbansi yang didapat. Hal ini dianalogkan dengan semakin tinggi nilai absorbansi yang didapat menggambarkan semakin tingginya sel yang berproliferasi.

3.7. Cara Kerja

1. Spesimen Penelitian

Darah segar usia \pm 1 jam sebanyak 30 ml.

2. Pembuatan medium α -MEM komplet

Medium α -MEM komplet diperoleh dengan cara mencampur 88 mL α -MEM stok + 10 mL FBS + 1 mL Penn-Strep + 1 mL L-Glutamine. Pencampuran kesemuanya dilakukan dalam *Laminar air flow* dengan menjaga dan memperhatikan aspek sterilitas.

3. Pembuatan Larutan ekstrak air *Acalypha Indica* Linn dan *Centella asiatica* Linn

- Pembuatan infusa air *Acalypha indica* Linn (dilakukan oleh Staf Departemen Kimia FKUI), tumbuhan akar kucing diambil dari Bekasi, Jawa Barat. Akar dipisahkan, dicuci, kemudian dikeringkan dengan cara diangin - anginkan selama 1-2 hari. Sebanyak 300 gram akar kering ditimbang dan dibuat dekokta dengan penambahan akuades hingga 1000 mL dalam panic dekok (30%). Panci dekok kemudian dipanaskan diatas waterbath hingga suhu dalam panic mencapai 90-95°C. Pemanasan dilakukan selama 30 menit dengan sesekali diaduk sehingga mendapatkan cairan kira-kira 100 mL. Hasil dekok kemudian didinginkan, kemudian

disaring dengan kain flannel, ampas yang tersisa dipanaskan kembali dan airnya disaring kembali. Setelah disaring hasil saringan disimpan dalam botol penyimpanan dan diberi label *infusa Acalypha indica* Linn.

- Pembuatan Larutan ekstrak air *Centella asiatica* Linn (dilakukan oleh staff Laboratorium Pengembangan Kimia Farma, Bandung, tumbuhan pegagan diambil sejumlah Herba dikeringkan pada lemari pengering bersuhu 25°C untuk menghasilkan simplisia kering lalu dilakukan ekstraksi dengan air dalam ekstraktor pada suhu 90-95°C. Hasil ekstraksi diuapkan dalam *rotary-evaporator* diatas *waterbath* bersuhu 60°C pada tekanan 50 mBar hingga kering.

4. Pembuatan Larutan Ekstrak Air *Acalypha indica* Linn + α -MEM komplit dan ekstrak *Centella asiatica* Linn + α -MEM komplit

Pembuatan larutan ekstrak air *Acalypha indica* Linn dengan α -MEM komplit dilakukan dalam *laminar air flow* dengan kadar :

- 10 mg/mL : didapatkan dengan mencampur 167 μ L larutan ekstrak *Acalypha indica* Linn stok (300 mg/mL) + 4833 μ L α -MEM komplit.
- 15 mg/mL : didapatkan dengan mencampur 250,5 μ L larutan ekstrak *Acalypha indica* Linn stok (300 mg/mL) + 4749,5 μ L α -MEM komplit.
- 20 mg/mL : didaptkan dengan mencampur 334 μ L larutan ekstrak *Acalypha indica* Linn stok (300 mg/mL) + 4666 μ L α -MEM komplit

Pembuatan larutan ekstrak air *Centella asiatica* Linn dengan α -MEM komplit dilakukan dalam *laminar air flow* dengan kadar :

- 10 μ g/mL : didapatkan dengan mencampurkan 20 μ L larutan ekstrak air *Centella asiatica* Linn stok (2500 μ g/mL) + 4980 μ L α -MEM komplit

- 15 µg/mL : didapatkan dengan mencampurkan 30 µL larutan ekstrak air *Centella asiatica* Linn stok (2500 µg/mL) + 4970 µL α -MEM komplet
- 20 µg/mL : didapatkan dengan mencampurkan 40 µL larutan ekstrak air *Centella asiatica* Linn stok (2500 µg/mL) + 4960 α -MEM komplet

Selanjutnya semua tabung disimpan dalam lemari es dengan suhu 4°C sampai waktu penggunaan tiba.

5. Isolasi Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)

Darah segar diambil dari pembuluh darah vena sukarelawan sebanyak 30 ml dengan menggunakan *vacuet vacuum* ukuran 3 mL sebanyak 10 buah. Selanjutnya, darah yang terkumpul diambil dengan menggunakan pipet serologi 5 mL dan dimasukkan dalam 6 tabung sentrifuge ukuran 15 mL dengan volume yang sama. Kedalam 6 tabung sentrifuge 15 mL yang sama masukkan PBS sebanyak 5 mL pada masing – masing tabung lalu lakukan pencampuran agar homogen. Siapkan dalam 6 tabung sentrifuge 15 mL lain, *Ficol Histopaque 1077* sebanyak 5 mL pada masing – masing tabung. Selanjutnya, ambil darah yang sudah homogen dengan PBS menggunakan pipet serologis 10 mL lalu dialirkan melalui dinding secara perlahan –lahan ke dalam tabung yang berisi larutan *Ficol histopaque*. Usahakan jangan sampai tercampur. Lakukan sentrifuge selama 30 menit dengan kecepatan 2000 rpm setelah itu buang supernatant yang terbentuk dengan menggunakan pipet serologi. Lakukan pengambilan partikel – partikel pada lapisan interfase secara hati – hati dengan menggunakan pipet serologis lalu masukkan partikel yang diambil kedalam tabung sentrifuge 15 mL lalu tambahkan PBS untuk dilakukan proses pencucian. Proses pencucian dilakukan dengan menggunakan sentrifuge pada kecepatan 1600 rpm selama 10 menit lalu lakukan pembuangan supernatant dan proses ini diulang sebanyak 3 kali. Pada akhir dari proses setelah dilakukan pembuangan supernatant tambahkan pellet dengan medium α -MEM komplet.

6. Perhitungan Sel

Suspensi sel yang terbentuk diencerkan sebanyak 10 kali dengan mencampur 80 μL *PBS* + 10 μL *tryphan blue* + 10 μL suspensi sel. Ambil cairan hasil pengenceran sebanyak 10 μL lalu ditempelkan pada takik yang terdapat pada tepi kamar hitung agar cairan dapat mengalir dibawah *cover slip* dengan gerakan efek kapiler agar suspensi sel tersebar merata dalam kamar hitung. Kamar hitung diletakkan di bawah mikroskop dengan pembesaran objektif 20 kali. Hitung jumlah sel pada 2 x 4 kotak besar pada sudut kamar hitung. Jumlah sel dihitung dengan rumus (rerata jumlah 2 x 4 kotak besar) x 10^4 x faktor dilusi (10) didapatkan jumlah sel/mL.

7. Kultur *PBMC*

Sel *PBMC* yang sudah diisolasi dikultur dalam cawan petri dengan diameter 35 mm dan *multiwall 96 well*. Kultur primer sel *PBMC* yang dimasukkan ke dalam 2 cawan petri dengan jumlah sel 5×10^5 pada setiap cawan dan kedalam *multiwall 96 well* sebanyak 3000 sel/*well*. Semua kultur diinkubasi dalam incubator dengan 5% CO_2 /95% udara dengan suhu 37°C. Pada 3 hari pertama tidak dilakukan intervensi. Pada hari ketiga lakukan penggantian semua media beserta dilakukan pencucian dengan menggunakan *PBS*. Setelah itu medium kultur diganti tiap 48 jam sebanyak setengah dari volume cawan dan dilakukan pengamatan setiap hari dengan menggunakan mikroskop *inverted observer.A1 Zeiss*. Kultur dibiarkan tumbuh sampai hari ke 14.

8. Panen Sel dan *Plating*

Pada hari ke 14, kultur sel *PBMC* didalam cawan petri 35 mm dipanen dengan cara membuang medium yang ada kemudian dilakukan pencucian dengan *PBS* sebanyak 2 – 3 kali. Selanjutnya tiap cawan ditambahkan *trypsin-EDTA* 0,25% sebanyak 1 mL lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 – 20 menit. Lakukan pengamatan pada mikroskop *inverted* untuk melihat seberapa banyak sel yang sudah terlepas. Jika kira – kira 95% sel yang terlepas lakukan penambahan medium yang mengandung

serum sebanyak 1 mL untuk menginaktifkan *typsin*. Lakukan pengambilan medium dalam cawan untuk dipindahkan dalam tabung *sentrifuge* 15 mL lakukan pencucian pada cawan sampai sel dalam cawan terangkat ke permukaan. Selanjutnya lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan *pellet* di resuspensi dengan menggunakan α -MEM komplit. Jumlah sel dihitung dengan *typan blue* menggunakan *haemocytometer* dan didistribusikan pada *multiwall plate 96 well*. Jumlah sel pada *plate 96 well* adalah masing – masing 3000 sel/*well*.

9. Pemberian Ekstrak *Acalypha Indica* Linn dan *Centella asiatica* Linn

Pada kelompok kultur sel pada *multiwall 96 well* pada kultur primer perlakuan sudah dilakukan pada awal penanaman sel sedangkan waktu pendistribusian sel *MPC* yang sudah dipasasi dan ditanam pada *multiwall plate 96 well* lain, perlakuan dilakukan setelah 1 hari pasca penanaman. Rincian perlakuan adalah sebagai berikut:

- Kontrol : ditambahkan α -MEM komplit
- Perlakuan A : ditambahkan α -MEM komplit + ekstrak *Acalypha indica* Linn dengan dosis 10 mg/mL
- Perlakuan B : ditambahkan α -MEM komplit + ekstrak *Acalypha indica* Linn dengan dosis 15 mg/mL
- Perlakuan C : ditambahkan α -MEM komplit + ekstrak *Acalypha indica* Linn dengan dosis 20 mg/mL
- Perlakuan D : ditambahkan α -MEM komplit + ekstrak *Centella asiatica* Linn dengan dosis 10 μ g/mL
- Perlakuan E : ditambahkan α -MEM komplit + ekstrak *Centella asiatica* Linn dengan dosis 15 μ g/mL
- Perlakuan F : ditambahkan α -MEM komplit + ekstrak *Centella asiatica* Linn dengan dosis 20 μ g/mL

Perlakuan ini dilakukan pada kultur primer selama 17 hari dan pada kultur post pasasi selama 48 jam. Semua *plate* diinkubasikan kedalam incubator 5% CO₂/95% udara dengan suhu 37°C selama 48 jam dan

penggantian medium dilakukan setiap 48 jam. Jumlah media dalam masing – masing *well* sebesar 100 μ L.

10. Pemeriksaan Viabilitas dan proliferasi sel dengan metode MTT

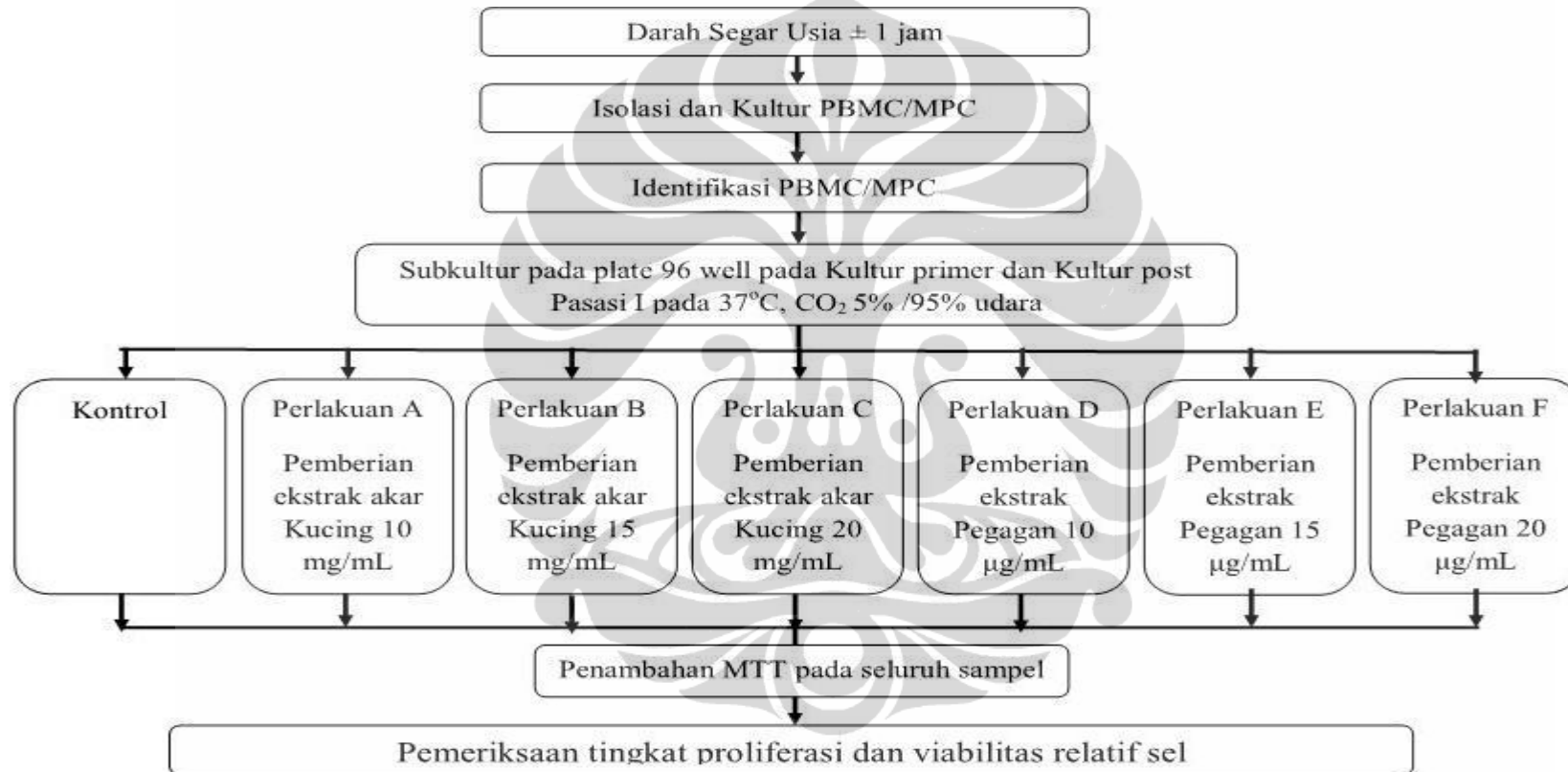
Setelah diberikan perlakuan dan diinkubasi selama 17 hari dan 48 jam, 20 μ L medium dari tiap *well multiwall plate 96 well* dibuang sehingga pada tiap *well* akan tersis 80 μ L medium. Pada tiap *well* tambahkan 15 μ L reagen *CellQuanti-MTT* (hasil pencampuran bubuk reagen *CellQuanti-MTT* dengan 10 mL *Assay Bufer* yang disimpan dalam kulkas pada suhu -20°C), diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Selanjutnya pada tiap *well* diberikan 100 μ L *Solubilization solution* yang terdapat pada *assay kit* lalu lakukan *orbital shaker* selama 1 jam pada suhu ruangan. Kemudian dilakukan pembacaan dengan *ELISA/microplate reader* pada panjang gelombang 550 – 620 nm. Untuk menentukan viabilitas relatif sel dihitung dengan rumus:

$$\text{Viabilitas relatif (\%)} = \frac{\text{Absorbance (kelompok perlakuan)} \times 100}{\text{Absorbance kontrol}}$$

3.8. Analisis Data

Pengolahan data dilakukan secara statistic dengan menggunakan program statistik komputer SPSS ver. 15. Langkah pertama dilakukan uji normalitas pada data yang ada, bila data mempunyai distribusi normal dan varian yang homogen dilanjutkan ke langkah kedua yaitu uji statistik parametrik dengan menggunakan uji *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan analisis *post-hoc*, namun bila data tidak normal dan setelah ditransformasi tetap tidak normal, dilakukan uji non-parameterik.

3.9. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alur Penelitian

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan pengambilan spesimen, isolasi dan kultur sel PBMC dengan perlakuan selama 17 hari didapatkan pertumbuhan sel PBMC dan diidentifikasi secara morfologis dengan *microskop inverted, Zeiss* dan dilakukan pasasi 1 serta mengulang perlakuan pada kultur hasil pasasi selama 48 jam.

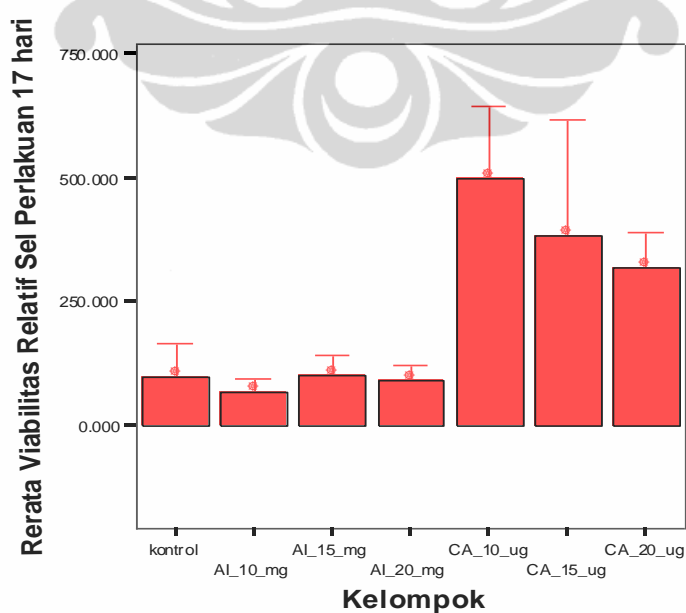


Gambar 4.1. Morfologi kultur PBMC, (A) Kontrol, (B) dg AI_10mg/mL, (C) dg AI_15mg/mL, (D) dg AI_20mg/mL, (E) dg CA_10µg/mL, (F) dg CA_15µg/mL, dan (G) dg CA_20µg/mL.

2.1 Pengaruh pemberian Ekstrak *Acalypha Indica* Linn dan Ekstrak *Centella Asiatica* Linn selama 17 hari pada Kultur Primer PBMC terhadap Persentase Viabilitas Relatif Sel

Hasil yang didapatkan pada pemeriksaan *MTT* untuk mengukur viabilitas relatif sel yang dilakukan dengan cara membandingkan nilai absorbansi cawan perlakuan. Pemeriksaan ini dilakukan secara *double triplo*, dibandingkan dengan kontrol didapatkan rerata viabilitas relatif sel pada kelompok kontrol sebesar 97,08%; kelompok perlakuan AI_10 mg sebesar 67,55%; kelompok perlakuan AI_15 mg sebesar 100,24%; kelompok perlakuan AI_20 mg sebesar 91,10%; kelompok perlakuan CA_10 μ g sebesar 499,04%; kelompok perlakuan CA_15 μ g sebesar 382,93%; dan kelompok perlakuan CA_20 μ g sebesar 320,192%. (lihat gambar 4.2 dan tabel 4.1).

Berdasarkan tes normalitas *Shapiro-Wilk*, didapatkan nilai signifikansi tiap kelompok perlakuan $> 0,05$, sehingga ditarik kesimpulan bahwa distribusi data pada seluruh kelompok perlakuan normal (lihat tabel 4.1).



Gambar 4.2. Rerata Persentase Viabilitas Relatif Sel pada kultur primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari

Tabel 4.1. Rerata Persentase Viabilitas Relatif Sel pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rerata Viabilitas relatif sel (%)	SD	Sig. Tes Shapiro-Wilk
Kontrol	6	97.08	66.94	0.371
AI_10mg	6	67.55	25.94	0,365
AI_15mg	6	100.24	40.81	0.444
AI_20mg	6	91.11	30.22	0.267
CA_10 μ g	6	499.04	138.61	0.577
CA_15 μ g	6	382.93	225.58	0,716
CA_20 μ g	6	320.19	67.34	0,800

Langkah selanjutnya dilakukan tes untuk menganalisa homogenitas varians antar kelompok, didapatkan hasil nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa homogenitas varian antar kelompok perlakuan tidak homogen. Oleh karena itu, perlu dilakukan transformasi data dengan cara \log_{10} dari data asli rerata viabilitas relatif sel. Dari hasil transformasi ini, didapatkan distribusi data tiap kelompok bersifat normal (lihat tabel 4.2), dan hasil tes homogenitas varians, didapatkan nilai signifikansi 0,085 ($p > 0,05$), sehingga varians antar kelompok perlakuan homogeny (lihat lampiran 1).

Tabel 4.2. Transformasi \log_{10} Data Rerata Persentase Viabilitas Relatif Sel pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rerata Viabilitas relatif sel (%)	SD	Sig. Tes Shapiro-Wilk
Kontrol	6	1.89	0.33	0.672
AI_10mg	6	1.80	0.17	0.399
AI_15mg	6	1.96	0.21	0.302
AI_20mg	6	1.94	0.16	0.211
CA_10 μ g	6	2.68	0.12	0.780
CA_15 μ g	6	2.51	0.30	0.728
CA_20 μ g	6	2.50	0.09	0.820

Untuk mengetahui perbedaan antara ketujuh kelompok perlakuan dilakukan uji *one way ANOVA*. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai F 17,522 dengan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), dengan demikian dapat disimpulkan bahwa rerata jumlah sel pada ketujuh kelompok perlakuan berbeda secara bermakna.

Untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara bermakna dilakukan pengujian *post-hoc* (lihat tabel 4.3). Dari hasil pengujian didapatkan bahwa dibandingkan dengan kelompok kontrol, kelompok perlakuan dengan ekstrak *Acalypha indica* tidak bermakna ($p > 0,05$) dalam efek viabilitas relatif sel, berbeda dengan hasil yang didapat dari kelompok perlakuan dengan menggunakan ekstrak *Centella asiatica*, memberikan nilai kemaknaan yang signifikan ($p < 0,05$). Namun jika dibandingkan antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dengan pemberian *Centella asiatica*, didapatkan hasil bahwa viabilitas relatif sel kelompok CA_10 μg lebih tinggi secara bermakna daripada viabilitas relatif sel kelompok CA_15 μg , dan kelompok CA_20 μg .

Tabel 4.3. Hasil Uji Kemaknaan Rerata Persentase Viabilitas Relatif Sel antar Kelompok pada Kultur primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari.

	Kontrol	AI_10mg	AI_15mg	AI_20mg	CA_10 μg	CA_15 μg	CA_20 μg
Kontrol	-	0.491**	0.540**	0.693**	0.000*	0.000*	0.000*
AI_10mg	0.491**	-	0.197**	0.281**	0.000*	0.000*	0.000*
AI_15mg	0.540**	0.197**	-	0.827**	0.000*	0.000*	0.000*
AI_20mg	0.693**	0.281**	0.827**	-	0.000*	0.000*	0.000*
CA_10 μg	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	-	0.160**	0.137**
CA_15 μg	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.160**	-	0.931**
CA_20 μg	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.137**	0.931**	-

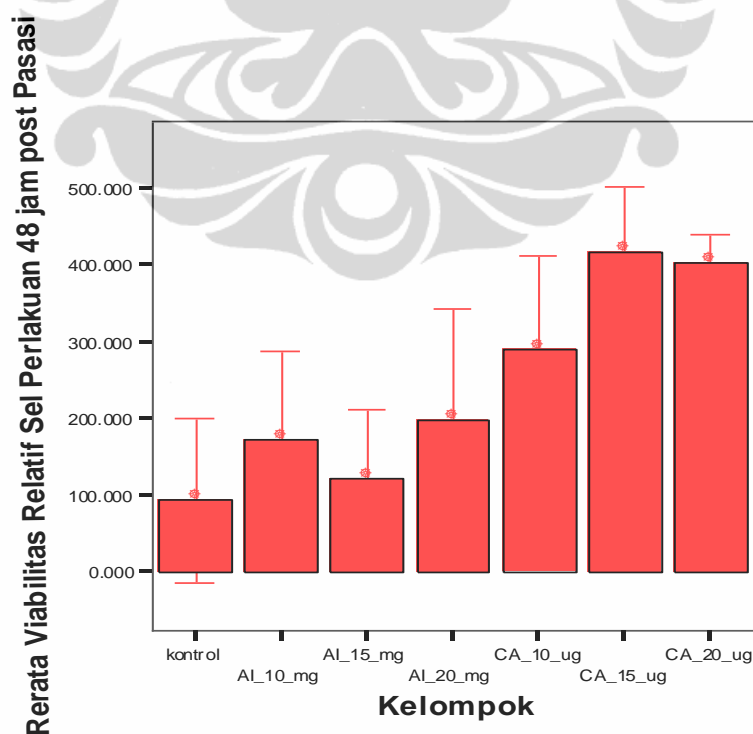
*P < 0.01

**P > 0.05

2.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak *Acalypha Indica* Linn dan Ekstrak *Centella Asiatica* Linn selama 48 jam pada subkultur PBMC terhadap Persentase Viabilitas Relatif Sel

Hasil yang didapatkan pada pemeriksaan MTT untuk mengukur viabilitas relatif sel yang dilakukan dengan cara membandingkan nilai absorbansi cawan perlakuan. Pemeriksaan ini dilakukan secara *double triplo*, dibandingkan dengan kontrol didapatkan rerata viabilitas relatif sel pada kelompok kontrol sebesar 93.33%; kelompok perlakuan AI_10 mg sebesar 173.33%; kelompok perlakuan AI_15 mg sebesar 122.22%; kelompok perlakuan AI_20 mg sebesar 198.56%; kelompok perlakuan CA_10 μ g sebesar 288.89%; kelompok perlakuan CA_15 μ g sebesar 416.66%; dan kelompok perlakuan CA_20 μ g sebesar 402.22%. (lihat gambar 4.3 dan tabel 4.4).

Berdasarkan tes normalitas *Shapiro-Wilk*, didapatkan nilai signifikansi tiap kelompok perlakuan $> 0,05$, sehingga ditarik kesimpulan bahwa distribusi data pada seluruh kelompok perlakuan normal (lihat tabel 4.4).



Gambar 4.3. Rerata Persentase Viabilitas Relatif Sel pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam

Tabel 4.4. Rerata Persentase Viabilitas Relatif Sel pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rerata Viabilitas relatif sel (%)	SD	Sig. Tes Shapiro-Wilk
Kontrol	6	93.33	102.07	0.073
AI_10mg	6	173.33	108.07	0.738
AI_15mg	6	122.22	85.03	0.270
AI_20mg	6	198.56	137.98	0.101
CA_10 μ g	6	288.89	116.29	0.505
CA_15 μ g	6	416.66	81.62	0.577
CA_20 μ g	6	402.22	35.69	0.930

Langkah selanjutnya dilakukan tes untuk menganalisa homogenitas varians antar kelompok, didapatkan hasil nilai signifikansi 0,098 ($p > 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa homogenitas varian antar kelompok perlakuan telah homogen. Untuk mengetahui perbedaan antara ketujuh kelompok perlakuan dilakukan uji *one way ANOVA*. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai F 10.168 dengan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), dengan demikian dapat disimpulkan bahwa rerata jumlah sel pada ketujuh kelompok perlakuan berbeda secara bermakna.

Untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda secara bermakna dilakukan pengujian *post-hoc*. Dari hasil pengujian didapatkan bahwa dibandingkan dengan kelompok kontrol, kelompok perlakuan dengan ekstrak *Acalypha indica* tidak bermakna ($p > 0,05$) dalam efek viabilitas relatif sel, berbeda dengan hasil yang didapat dari kelompok perlakuan dengan menggunakan ekstrak *Centella asiatica*, memberikan nilai kemaknaan yang signifikan ($p < 0,05$). Pada perbandingan antar kelompok perlakuan *Acalypha indica* Linn, nilai persentase viabilitas relatif sel kelompok perlakuan AI_20 mg berbeda namun tidak bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Untuk kelompok perlakuan *Centella asiatica* Linn berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol dimana nilai rerata viabilitas relatif sel mengalami kenaikan sesuai dengan dosis yang diberikan.

Tabel 4.5. Hasil Uji Kemaknaan Rerata Persentase Viabilitas Relatif Sel antar Kelompok pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam

	Kontrol	AI_10mg	AI_15mg	AI_20mg	CA_10 μ g	CA_15 μ g	CA_20 μ g
Kontrol	-	0.174***	0.620***	0.077***	0.002**	0.000**	0.000**
AI_10mg	0.174***	-	0.381***	0.665***	0.053***	0.000**	0.000**
AI_15mg	0.620***	0.381***	-	0.194***	0.007**	0.000**	0.000**
AI_20mg	0.077***	0.665***	0.194***	-	0.126***	0.001**	0.001**
CA_10 μ g	0.002**	0.053***	0.007**	0.126***	-	0.033*	0.057***
CA_15 μ g	0.000**	0.000**	0.000**	0.001**	0.033*	-	0.804***
CA_20 μ g	0.000**	0.000**	0.000**	0.001**	0.057***	0.804***	-

*P < 0.05

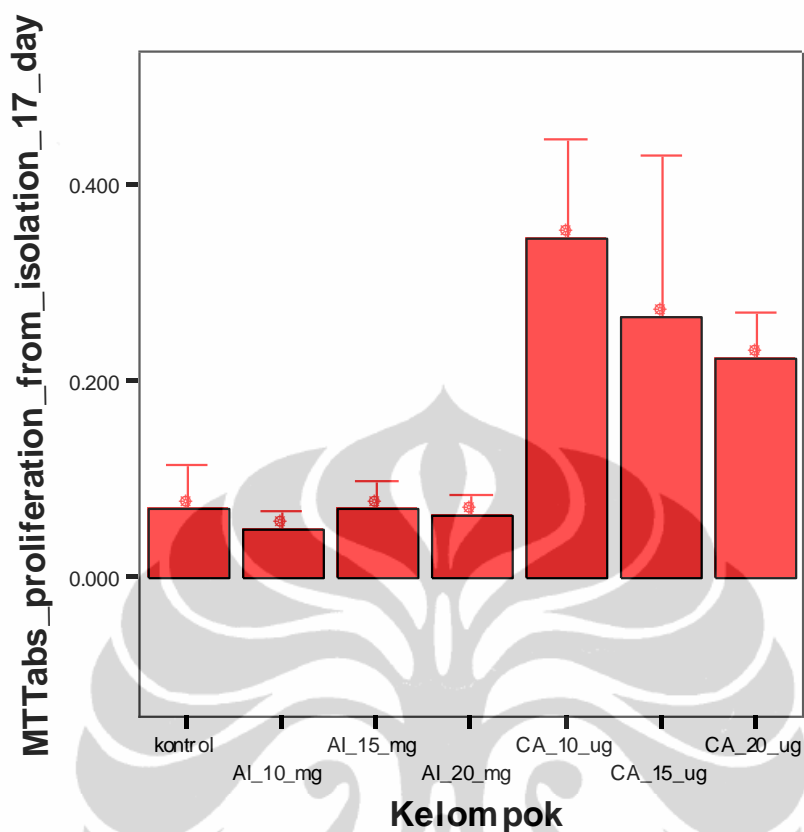
**P < 0.01

***P > 0.05

2.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak *Acalypha Indica* Linn dan Ekstrak *Centella Asiatica* Linn selama 17 hari pada Kultur Primer PBMC terhadap Tingkat Proliferasi Sel.

Pemeriksaan MTT digunakan untuk menilai tingkat proliferasi sel dengan menilai absorbansi dari setiap cawan pada setiap kelompok perlakuan, nilai absorbansi yang lebih tinggi menunjukkan tingkat proliferasi sel yang lebih tinggi pula.

Dari hasil pemeriksaan MTT untuk mengukur tingkat proliferasi sel yang dilakukan secara *double triplo*, didapatkan absorbansi setelah dikurangi dengan absorbansi negatif, pada kelompok kontrol sebesar 0.069; kelompok perlakuan AI_10 mg sebesar 0.049; kelompok perlakuan AI_15 mg sebesar 0,070; kelompok perlakuan AI_20 mg sebesar 0,063; kelompok perlakuan CA_10 μ g sebesar 0.346; kelompok perlakuan CA_15 μ g sebesar 0.266; dan kelompok perlakuan CA_20 μ g sebesar 0,222 (lihat tabel 4.6 dan gambar 4.4)



Gambar 4.4. Rerata Absorbansi Pemeriksaan MTT pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari.

Tabel 4.6. Rerata Absorbansi Pemeriksaan MTT untuk Tingkat Proliferasi sel pada Kultur Primer PBMC dengan perlakuan selama 17 hari

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rerata Absorbansi	SD	Sig. Tes Shapiro-Wilk
Kontrol	6	0.069	0.044	0.236
AI_10mg	6	0.049	0.018	0.545
AI_15mg	6	0.070	0.028	0.444
AI_20mg	6	0.063	0.021	0.267
CA_10 μ g	6	0.346	0.096	0.577
CA_15 μ g	6	0.266	0.156	0.716
CA_20 μ g	6	0.222	0.047	0.800

Langkah selanjutnya dilakukan tes untuk menganalisa homogenitas varians antar kelompok dengan *Levene statistic*, memberikan hasil nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa varian antar kelompok perlakuan tidak homogen, sehingga diperlukan suatu transformasi data. Dari hasil transformasi data dilakukan pengujian ulang homogenitas varians yang memberikan hasil nilai signifikansi 0,124 ($p > 0,05$), sehingga ditarik kesimpulan bahwa varian antar kelompok perlakuan sudah homogeny (lihat lampiran 1).

Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antara ketujuh kelompok perlakuan dilakukan uji *one way ANOVA*. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai F 18,590 dengan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa rerata jumlah sel pada ketujuh kelompok perlakuan berbeda secara bermakna.

Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok yang berbeda secara bermakna, dilakukan uji *post-hoc* dengan hasil bahwa tingkat proliferasi sel pada kelompok perlakuan dengan ekstrak *Centella asiatica* lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol sedangkan kelompok perlakuan dengan ekstrak *Acalypha indica* tidak lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan dengan ekstrak *Centella asiatica*, kelompok perlakuan CA_10 μg memperlihatkan tingkat proliferasi sel paling tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Kemudian tingkat proliferasi sel mengalami penurunan pada kelompok perlakuan CA_15 μg dan CA_20 μg .

Tabel 4.7. Hasil Uji Kemaknaan Rerata Absorbansi Pemeriksaan MTT antar Kelompok pada Kultur Primer PBMC dengan Perlakuan selama 17 hari

	Kontrol	AI_10mg	AI_15mg	AI_20mg	CA_10 μ g	CA_15 μ g	CA_20 μ g
Kontrol	-	0.368**	0.733**	0.912**	0.000*	0.000*	0.000*
AI_10mg	0.368**	-	0.217**	0.313**	0.000*	0.000*	0.000*
AI_15mg	0.733**	0.217**	-	0.818**	0.000*	0.000*	0.000*
AI_20mg	0.912**	0.313**	0.818**	-	0.000*	0.000*	0.000*
CA_10 μ g	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	-	0.140**	0.118**
CA_15 μ g	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.140**	-	0.928**
CA_20 μ g	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.118**	0.928**	-

*P < 0.01

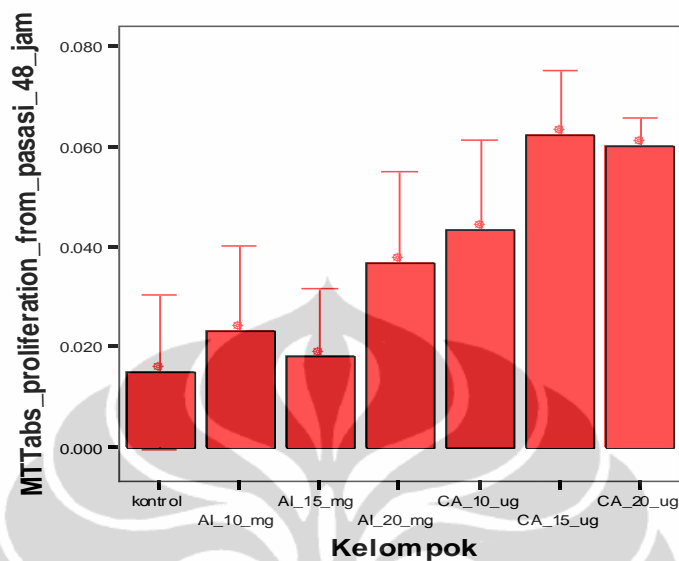
**P > 0.05

2.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak *Acalypha Indica Linn* dan Ekstrak *Centella Asiatica Linn* selama 48 jam pada Subkultur PBMC terhadap Tingkat Proliferasi Sel

Dari hasil pemeriksaan MTT untuk mengukur tingkat proliferasi sel yang dilakukan secara *double triplo*, didapatkan absorbansi setelah dikurangi dengan absorbansi negative, pada kelompok kontrol sebesar 0.015; kelompok perlakuan AI_10 mg sebesar 0.023; kelompok perlakuan AI_15 mg sebesar 0,018; kelompok perlakuan AI_20 mg sebesar 0,037; kelompok perlakuan CA_10 μ g sebesar 0.043; kelompok perlakuan CA_15 μ g sebesar 0.063; dan kelompok perlakuan CA_20 μ g sebesar 0,060 (lihat tabel 4.8 dan gambar 4.5)

Tabel 4.8. Rerata Absorbansi Pemeriksaan MTT untuk Tingkat Proliferasi Sel pada Subkultur PBMC dengan Perlakuan selama 48 jam

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rerata Absorbansi	SD	Sig. Tes Shapiro-Wilk
Kontrol	6	0.015	0.015	0.127
AI_10mg	6	0.023	0.016	0.360
AI_15mg	6	0.018	0.013	0.270
AI_20mg	6	0.037	0.017	0.026
CA_10 μ g	6	0.043	0.017	0.505
CA_15 μ g	6	0.063	0.012	0.577
CA_20 μ g	6	0.060	0.005	0.093



Gambar 4.5. Rerata Absorbansi Pemeriksaan MTT pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam

Dilakukan tes untuk menganalisa homogenitas varians antar kelompok dengan *Levene statistic*, memberikan hasil nilai signifikansi 0,504 ($p > 0,05$), sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa varian antar kelompok perlakuan homogen.

Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antara ketujuh kelompok perlakuan dilakukan uji *one way ANOVA*. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai F 11.006 dengan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa rerata jumlah sel pada ketujuh kelompok perlakuan berbeda secara bermakna.

Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok yang berbeda secara bermakna, dilakukan uji *post-hoc* dengan hasil bahwa tingkat proliferasi sel pada kelompok perlakuan dengan ekstrak *Centella asiatica* lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol sedangkan kelompok perlakuan dengan ekstrak *Acalypha indica*, kelompok perlakuan AI_10 mg dan AI_20 mg memberikan tingkat proliferasi lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok perlakuan dengan ekstrak *Centella asiatica*, kelompok perlakuan

CA_15 μg dan CA_20 μg memperlihatkan tingkat proliferasi sel paling tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok perlakuan CA_10 μg dan kelompok kontrol.

Tabel 4.9. Hasil Uji Kemaknaan Rerata Absorbansi Pemeriksaan MTT antar Kelompok pada Subkultur PBMC dengan perlakuan selama 48 jam

	Kontrol	AI_10mg	AI_15mg	AI_20mg	CA_10 μg	CA_15 μg	CA_20 μg
Kontrol	-	0.320***	0.689***	0.012*	0.002**	0.000**	0.000**
AI_10mg	0.320***	-	0.549***	0.111***	0.021*	0.000**	0.000**
AI_15mg	0.689***	0.549***	-	0.032*	0.005**	0.000**	0.000**
AI_20mg	0.012*	0.111***	0.032*	-	0.437***	0.004**	0.007**
CA_10 μg	0.002**	0.021*	0.005**	0.437***	-	0.026*	0.047*
CA_15 μg	0.000**	0.000**	0.000**	0.004**	0.026*	-	0.795***
CA_20 μg	0.000**	0.000**	0.000**	0.007**	0.047*	0.795***	-

*P < 0.05

**P < 0.01

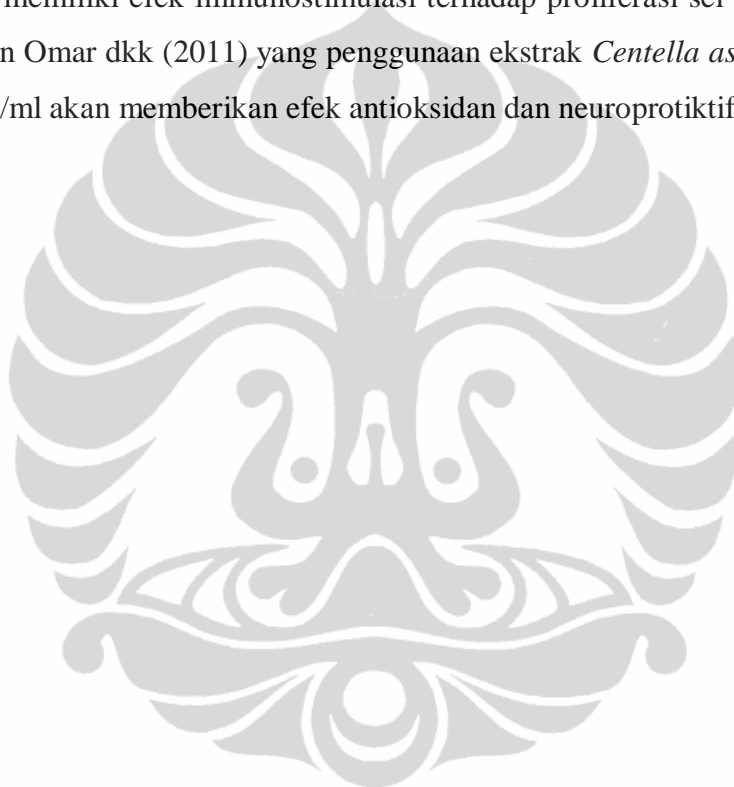
***P > 0.05

Hasil nilai viabilitas relatif sel dan nilai tingkat proliferasi pada pemberian ekstrak air *Acalypha indica* selama 17 hari terhadap kultur primer, tidak bermakna dibandingkan dengan kontrol sangat kontras dengan apa yang didapat pada penelitian Yolanda dkk yang menggunakan sel hipokampus tikus yang sudah mengalami keadaan hipoksia dimana hasilnya sangat bermakna seiring dengan penambahan kadar ekstrak *Acalypha indica*. Penulis menduga bahwa teknik pembuatan ekstrak air *Acalypha indica* dan sel yang digunakan dapat terjadi perbedaan hasil yang didapat.

Hasil yang berbeda didapatkan pada pemberian ekstrak air *Acalypha indica* selama 48 jam pada subkultur dimana nilai viabilitas relatif sel dan nilai tingkat proliferasi sel memperlihatkan peningkatan sesuai dengan kenaikan kadar namun kenaikannya tidak bermakna secara signifikan.

Nilai viabilitas relatif sel dan nilai tingkat proliferasi sel pada kelompok perlakuan dengan ekstrak *Centella asiatica* selama 17 hari pada kultur primer yang memberikan hasil yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kontrol meskipun ada penurunan hasil dengan bertambahnya kadar ekstrak *Centella*

asiatica. Menurut penulis hal ini disebabkan oleh kurang tahannya sel *PBMC* yang belum beradaptasi dengan lingkungan media kultur dimana sel punca mesenkim masih dalam proses istirahat. Berbeda dengan nilai viabilitas relatif sel dan tingkat proliferasi sel pada kelompok perlakuan dengan ekstrak *Centella asiatica* selama 48 jam pada subkultur yang memberikan hasil yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kontrol. Hal ini sesuai Punturee dkk (2005) yang dalam penelitiannya mendapatkan bahwa hanya tanaman herbal *Centella asiatica* yang memiliki efek immunostimulasi terhadap proliferasi sel *PBMC* dan hasil penelitian Omar dkk (2011) yang penggunaan ekstrak *Centella asiatica* pada kadar 1-50 $\mu\text{g/ml}$ akan memberikan efek antioksidan dan neuroprotiktif .



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Viabilitas relatif sel pada kultur primer *PBMC* pada pemberian ekstrak *Centella asiatica* Linn selama 17 hari pada dosis 10 - 20 µg/mL lebih tinggi secara bermakna bila dibandingkan dengan viabilitas relatif sel pada kultur primer *PBMC* selama 17 hari tanpa pemberian ekstrak *Centella asiatica* Linn namun dengan bertambahnya dosis terjadi penurunan viabilitas relatif sel.
2. Viabilitas relatif sel pada kultur primer *PBMC* pada pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn selama 17 hari pada dosis 10 - 20 mg/mL tidak memberikan nilai bermakna bila dibandingkan dengan viabilitas relatif sel pada kultur primer *PBMC* selama 17 hari tanpa pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn.
3. Viabilitas relatif sel pada Subkultur *PBMC* pada pemberian ekstrak *Centella asiatica* Linn selama 48 jam pada dosis 10 - 20 µg/mL lebih tinggi secara bermakna bila dibandingkan dengan viabilitas relatif sel pada Subkultur *PBMC* selama 48 jam tanpa pemberian ekstrak *Centella asiatica* Linn dan didapatkan kenaikan persentase viabilitas relatif sel dengan peningkatan dosis.
4. Viabilitas relatif sel pada Subkultur *PBMC* pada pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn selama 48 jam pada dosis 10 - 20 mg/mL tidak memberikan nilai bermakna bila dibandingkan dengan viabilitas relatif sel pada Subkultur *PBMC* selama 48 jam tanpa pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn.
5. Tingkat proliferasi sel pada kultur primer *PBMC* pada pemberian ekstrak *Centella asiatica* Linn selama 17 hari pada dosis 10 - 20 µg/mL lebih tinggi secara bermakna bila dibandingkan dengan tingkat proliferasi sel pada kultur primer *PBMC* selama 17 hari tanpa pemberian ekstrak *Centella asiatica* Linn namun dengan bertambahnya dosis terjadi penurunan tingkat proliferasi sel.

6. Tingkat proliferasi sel pada kultur primer *PBMC* pada pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn selama 17 hari pada dosis 10 - 20 mg/mL tidak memberikan nilai bermakna bila dibandingkan dengan tingkat proliferasi sel pada kultur primer *PBMC* selama 17 hari tanpa pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn.
7. Tingkat proliferasi sel pada Subkultur *PBMC* pada pemberian ekstrak *Centella asiatica* Linn selama 48 jam pada dosis 10 - 20 µg/mL lebih tinggi secara bermakna bila dibandingkan dengan tingkat proliferasi sel pada Subkultur *PBMC* selama 48 jam tanpa pemberian ekstrak *Centella asiatica* Linn. Terjadi kenaikan proliferasi sel dengan penambahan dosis ekstrak.
8. Tingkat proliferasi sel pada Subkultur *PBMC* pada pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn selama 48 jam pada dosis 10 - 20 mg/mL tidak memberikan nilai bermakna bila dibandingkan dengan tingkat proliferasi sel pada Subkultur *PBMC* selama 48 jam tanpa pemberian ekstrak *Acalypha indica* Linn.

Berdasarkan hasil diatas, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Centella asiatica* dengan kadar 10 – 20 µg/mL lebih memberikan efek dalam meningkatkan proliferasi sel dan viabilitas relatif sel pada Subkultur *PBMC*.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan isolasi sel punca mesenkim asal darah tepi dengan penanda permukaan mesenkim (misalnya CD105) untuk menambah tingkat kepercayaan hasil penelitian.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan komponen lain yang dikandung ekstrak *Acalypha indica* dan ekstrak *Centella asiatica* yang mungkin memiliki efek proliferasi sel dan *cytotoxic* yang dapat meningkatkan atau menghambat proses siklus sel.
3. Perlu dilakukan penelitian uji toksisitas terhadap kandungan zat aktif dari ekstrak *Centella asiatica* dan ekstrak *Acalypha indica* untuk mengetahui zat aktif apa saja yang berefek pada proses siklus sel terutama sel punca dewasa.

DAFTAR REFERENSI

- William L. Fodor (2003), *Review: Tissue Engineering and Cell based Therapies from bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate*, Reproductive Biology and Endocrinology, 1:102
- AM Parr *et al* (2007), *Review: Bone marrow-derived Mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system Injury. Bone marrow transplantation*, 40: 609 – 619.
- Sangnyon Kim *et al* (2006), *Neural differentiation potential of Peripheral blood - and bone marrow - derived precursor cells. Brain Res*, 1123 (1): 27 – 33.
- D. Baksh *et al* (2004), *Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*, J Cell. Mol. Med, 8 (3): 301-316
- Danny Halim dkk (2010), *Buku Stem Cells: Dasar Teori dan Aplikasi Klinik*, Erlangga Medical Series, hal. 8 – 40.
- Rahul Sarugaser *et al* (2009), *Human Mesenchymal Stem Cells self renew and differentiate according to a deterministic hierarchy*, Plos One, 4 (8):e6498
- Andrew J. Rosenbaum (2008), *Review: The use of mesenchymal Stem Cells in tissue Engineering, organogenesis*, 4 (1):23 -27.
- Robert J. Deans *et al* (2000), *Mesenchymal Stem Cells : Biology and Potential Clinical Uses*, Experimental Hematology, 28:875-884.
- Yasumasa Kuroda *et al* (2010), *Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations*, Development Biology.
- Qian Liu *et al* (2011), *Adult Peripheral Blood Mononuclear Cell transdifferentiate in vitro and integrate into the retina in vivo*, Cell Biology International Immediate Publication.
- Rocky S Tuan *et al* (2003). *Review: Adult mesenchymal Stem cells and Cell - based tissue engineering. Arthritis Res Ther.* , 5 : 32 – 45.
- Sussane Kern *et al* (2006), *Comparative Analysis of Mesenchymal Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or Adipose tissue*, Stem Cells, 24:1294-1301.
- Nagy A. Habib *et al* (2007), *Stem Cell: Repair and Regeneration vol.2*, Imperial College Press.

- Guolong Yu *et al* (2009), *Systemic delivery of Umbilical Cord Blood Cells for stroke therapy : A review*, *Restorative Neurology and Neuroscience*, 27: 41-54.
- Oscar K. Lee *et al* (2004), *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*, *Blood*, 103: 1669-1675.
- David F. Moore *et al* (2005), *Using Peripheral Blood Mononuclear Cells to Determine a Gene Expression Profile of Acute Ischemic Stroke: A Pilot Investigation*, *Circulation*, 111: 212-221.
- Daniela Cesselli *et al.*(2009), *Multipotent Progenitor Cell are Present in Human Peripheral Blood*, *Cirs. Res.* , 104:1225-1234.
- Min – Soo Seo *et al.* (2009), *Isolation and Characterization of canine umbilical Cord Blood – derived Mesenchymal Stem Cells*. *J. Vet. Sci.*, 10(3): 181 - 187.
- Yael Porat *et al.* (2006), *Isolation of an adult blood – derived Progenitor Cell Proliferation Capable of Deferentiation into angiogenic, Myocardial, and Neural Lineages*. *British Journal of Haematology*, 135: 703 – 714.
- David T. Harris. (2008), *Cord Blood Stem Cells: A Review of Potential Neurological Applications*. *Stem Cell Rev* , 4: 369 – 274.
- Khamitta Punturee *et al* (2005), *Immunomodulatory effects of Thai medicinal plants on the mitogen stimulated proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro*, *Chiang Mai Med Bull*, 44(1): 1-12.
- RuchiG. Marwah *et al* (2006), *Antioxidant Capacity of some edible and wound healing plant in oman*, Elsevier.
- K.G Mohandas Rao *et al* (2006), *Centella asiatica (L) Leaf Extract Treatment During the Growth Spurt period Enhances Hippocampal CA3 Neuronal Dendritic Arborization in Rats*. *eCAM*, 3(3): 349 – 357.
- Khasiat Akar Kucing (*Acalypha Indica*). [homepage on internet] Available from:URL:http://penadakwah.multiply.com/journal/item/112/Khasiat_Akar_Kucing_Acalypha_indica
- A. Nahrstedt *et al* (2006), *Flavanoid from Acalypha Indica*. *Fitoterapia*, 77: 484 - 486.
- Acalypha indica* Linn. [homepage on internet] Available from: URL: http://www.globinmed.com/index.php?option=com_content&view=article&id=79285:acalypha-indica-linn&catid=703:a
- Ernie H. Purwaningsih *et al.* (2008), *Neuro-protection and Neuro-Therapy Effects of Acalypha Indica Linn. Water extract ex vivo on musculus gastrocnemius frog*. *Makara Kesehatan*, 12: 70 – 75.

- Yolanda (2010), *Pengaruh Estrak air Acalypha indica Linn (akar kucing) terhadap Neurogenesis pada kultur Jaringan Hipokampalis Tikus pasca Hipoksia*. Tesis Biomedik UI 2010.
- Luo Lu *et al* (2004), *Asiaticoside induction for Cell-Cycle progression, Proliferation and Collagen Synthesis in Humal Dermal Fibroblasts*, International Journal of Dermatology; **43**; 801–807
- Norfaizatul Shalida Omar *et al* (2011), *Centella asiatica modulates neuron cell survival by altering caspase-9 pathway*, Journal of Medicinal Plants Research; 5(11); 2201-2109
- Bercine M. Martin (1994), *Tissue Culture Techniques: an Introduction*, Birkhauser.
- Committee on the biological and biomedical Application of Stem Cell Research (2003), *Stem Cells and The Future of Regeneration Medicine*, National Academy press, 19-39.
- R. Ian Freshney (2006), *Basic Principles of Cells Culture*, Culture of Cells for Tissue Engineering, John Wiley &son.
- Davor Solter (2005), *What is a Stem Cell? Stem Cell: Nuclear Reprogramming and Therapeutic Applications*: Norvatis Foundation Symposium 265.
- Olle Lindvall *et al.*(2005), *Stem Cell Therapy for Human Brain Disorders*, Kidney International; 68; 1937-39
- Ippokratis Pountos *et al.* (2007), *Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application*, Injury, Int. J. Care Injured, 38S4: S23-S33
- Nathaniel S. Hwang *et al* *Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Their Role in Regenerative Medicine*, Interdisciplinary Reviews, system Biology, Wiley.
- Sirikul Manochantr *et al.* (2010), *Isolation, Characterization and Neural Differentiation Potential of Amnion Derived Mesenchymal Stem Cells*, J Med Assoc Thai, 93 (Suppl. 7):S183-S191.
- Claire Westwood *et al* , *The Biology of human mesenchymal stem cells*.
- Panagiola A. Sutiropoulou *et al* (2006), *Cell Culture medium Composition and Translational Adult Bone marrow derived stem cell Research*. Stem Cell, 24:1409-1410.
- Oh Young Bang *et al.* (2005), *Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Stroke Patients*, Ann Neurol, 57: 874-882

Mai Ho *et al.* (2006) *Comparison of Standard surface Chemistries for Culturing mesenchymal stem cells prior to neural differentiation*, *Biomaterial*, 27: 4333-4339.

Sabine Wislet-Gendebien *et al.* (2005), *Astrocytic and Neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin*, *Brain Research Bulletin*, 68: 95-102.

Christine Fehrer *et al.* (2005), *Mesenchymal Stem Cells aging*, *Experimental Gerontology*, 40: 926-930

Zhen-Yu Bian *et al.* (2009), *Increased Number of Mesenchymal Stem Cell-like Cells in Pheripheral Blood of Patient with Bone Sarkoma*, *Archives of Medical Research*; 40; 163-168.

Ran Barzilay *et al.* (2006) *Adult Stem Cells for Neuronal Repair*, *IMAJ*, 8: 61-66

Jie Deng *et al.* (2006), *Mesenchymal Stem Cells Spontaneously Express Neural Proteins in Culture and are Neurogenic after Transplantation*, *Stem Cells*, 24: 1054-1064.

Jie Li Chen *et al.* (2006), *Neurorestorative Treatment of Stroke: Cell and Pharmacological Approaches. The Journal of the America Society for Experimental Neurotherapeutics*, 3: 466 – 473.

Zheng Gang Zhang *et al.* (2009), *Review: Neurorestorative Therapies for Stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. Lancet Neurol*, 8: 491 – 500.

Balakrishnan N *et al.* (2009), *The Evaluation of Nitric Oxide Scavenging Activity of Acalypha Indica Linn Root*, *Asian J. Research Chem.* 2(2).

Thomas M. Walter, *Review of Acalypha indica, Linn in Traditional Siddha*

Acalypha indica Linn. [homepage on internet] Available from: URL: <http://www.google.co.id/url?sa=t&source=web&cd=7&ved=0CCYQFjAG&url=http%3A%2F%2Fimages.toiusd.multiply.multiplycontent.com%2Fattachment%2F0%2FRjtU4QoKCp8AAAif7ao1%2Facalypha%2520indica.doc%3Fkey%3Dtoiusd%3Ajournal%3A21%26nmid%3D19377666&rct=j&q=acalypha%20indica&ei=AwbpTfCuEsbHrQfqaWAAQ&usg=AFQjCNFSShhEXo2eJvcZqhYy5kzIFRacoQ&cad=rja>

R.D Jebakumar Solomon *et al.* (2005), *Isolation, identification and study of antimicrobial property of a bioactive compound in an Indian medicinal plant Acalypha indica (Indian-nettle)*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 1231-1236.

Ernie H. Purwaningsih *et al.* (2010), *The nerve protection and in vivo therapeutic effect of Acalypha indica extract in frogs*, *Med J Indones*, 19:96-102.

S Shakir Jamil *et al.* (2007), *Centella asiatica* (Linn): Review, Natural Product Radiance, 6(2): 158-170.

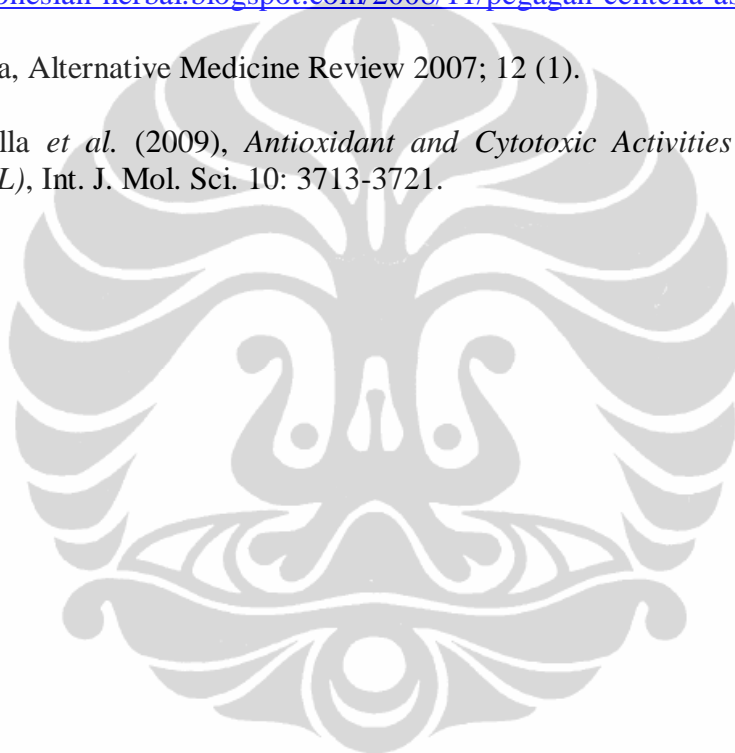
K.G Mohandas RAD *et al.* (2005), *Centella asiatica* (Linn) induced behavioural changes during growth spurt period in neonatal rats, Neuroanatomy, 4:18-23.

Sakshi Singh *et al.*(2010), *Centella asiatica* Linn : A plant with Immense Medicinal Potential but Threatened, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 4: issue 2.

Centella asiatica Linn. [homepage on internet] Available from: URL: <http://indonesian-herbal.blogspot.com/2008/11/pegagan-centella-asiatica.html>

Centella asiatica, Alternative Medicine Review 2007; 12 (1).

Frederico Pittella *et al.* (2009), *Antioxidant and Cytotoxic Activities of Centella asiatica* (L), Int. J. Mol. Sci. 10: 3713-3721.



Lampiran 1: Hasil analisis Statistik data viabilitas relatif sel pada kultur primer selama 17 hari

Kelompok		Statistic	Std. Error	
Rerata Viabilitas Relatif Sel Perlakuan 17 hari	kontrol	Mean	97.08017	
		95% Confidence Interval for Mean	26.82684	
		Lower Bound		
		Upper Bound	167.33349	
		5% Trimmed Mean	95.69907	
		Median	80.04800	
		Variance	4481.487	
		Std. Deviation	66.943911	
		Minimum	27.193	
		Maximum	191.827	
		Range	164.634	
		Interquartile Range	135.269	
		Skewness	.606	.845
		Kurtosis	-1.486	1.741
AI_10_mg		Mean	67.54833	
		95% Confidence Interval for Mean	40.33013	
		Lower Bound		
		Upper Bound	94.76654	
		5% Trimmed Mean	67.04087	
		Median	63.46200	
		Variance	672.678	
		Std. Deviation	25.936043	
		Minimum	40.385	
		Maximum	103.846	
		Range	63.461	
		Interquartile Range	53.726	
		Skewness	.444	.845
		Kurtosis	-1.463	1.741
AI_15_mg		Mean	100.24050	
		95% Confidence Interval for Mean	57.41066	
		Lower Bound		
		Upper Bound	143.07034	
		5% Trimmed Mean	100.96167	
		Median	106.73100	
		Variance	1665.640	
		Std. Deviation	40.812258	
		Minimum	44.712	
		Maximum	142.788	
		Range	98.076	
		Interquartile Range	84.014	

	Skewness		-.396	.845
	Kurtosis		-1.756	1.741
AI_20_mg	Mean		91.10567	12.336616
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	59.39339	
		Upper Bound	122.81795	
	5% Trimmed Mean		91.37280	
	Median		98.07700	
	Variance		913.153	
	Std. Deviation		30.218415	
	Minimum		53.365	
	Maximum		124.038	
	Range		70.673	
	Interquartile Range		58.774	
	Skewness		-.320	.845
	Kurtosis		-2.276	1.741
CA_10_ug	Mean		499.03850	56.587951
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	353.57454	
		Upper Bound	644.50246	
	5% Trimmed Mean		494.23078	
	Median		472.35550	
	Variance		19213.177	
	Std. Deviation		138.611605	
	Minimum		359.135	
	Maximum		725.481	
	Range		366.346	
	Interquartile Range		241.946	
	Skewness		.853	.845
	Kurtosis		-.055	1.741
CA_15_ug	Mean		382.93267	92.093910
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	146.19774	
		Upper Bound	619.66760	
	5% Trimmed Mean		380.28846	
	Median		322.35600	
	Variance		50887.729	
	Std. Deviation		225.583087	
	Minimum		105.288	
	Maximum		708.173	
	Range		602.885	
	Interquartile Range		401.683	
	Skewness		.466	.845
	Kurtosis		-1.027	1.741
CA_20_ug	Mean		320.19233	27.492263

95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	249.52122
	Upper Bound	390.86345
5% Trimmed Mean		319.47120
Median		315.86550
Variance		4534.947
Std. Deviation		67.342016
Minimum		239.423
Maximum		413.942
Range		174.519
Interquartile Range		133.414
Skewness	.244	.845
Kurtosis	-1.291	1.741

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rerata Viabilitas Relatif Sel Perlakuan 17 hari						
kontrol	.238	6	.200(*)	.899	6	.371
AI_10_mg	.229	6	.200(*)	.899	6	.365
AI_15_mg	.168	6	.200(*)	.911	6	.444
AI_20_mg	.261	6	.200(*)	.880	6	.267
CA_10_ug	.184	6	.200(*)	.930	6	.577
CA_15_ug	.192	6	.200(*)	.947	6	.716
CA_20_ug	.155	6	.200(*)	.957	6	.800

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Rerata Viabilitas Relatif Sel Perlakuan 17 hari

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.134	6	35	.000

A. Hasil Analisis Statistik Transformasi data viabilitas relative sel pada kultur primer selama 17 hari

	Kelompok		Statistic	Std. Error		
tran_MTTabs_viabilitas_relatif_17D	kontrol	Mean	1.8881	.13659		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.5370		
			Upper Bound	2.2392		
		5% Trimmed Mean		1.8914		
		Median		1.9025		
		Variance		.112		
		Std. Deviation		.33457		
		Minimum		1.43		
		Maximum		2.28		
		Range		.85		
		Interquartile Range		.68		
		Skewness		-.184	.845	
		Kurtosis		-1.442	1.741	
		Al_10_mg		Mean	1.8024	.06917
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.6246
					Upper Bound	1.9802
				5% Trimmed Mean		1.8014
Median				1.8025		
Variance				.029		
Std. Deviation				.16943		
Minimum				1.61		
Maximum				2.02		
Range				.41		
Interquartile Range				.36		
Skewness				.040	.845	
Kurtosis				-1.703	1.741	
Al_15_mg				Mean	1.9643	.08405
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.7483
					Upper Bound	2.1804
				5% Trimmed Mean		1.9712
		Median		2.0263		
		Variance		.042		
		Std. Deviation		.20588		
		Minimum		1.65		
		Maximum		2.15		
		Range		.50		
		Interquartile Range		.40		
		Skewness		-.790	.845	
		Kurtosis		-1.061	1.741	
		Al_20_mg		Mean	1.9372	.06412
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.7723
					Upper Bound	2.1020
				5% Trimmed Mean		1.9401

	Median		1.9868
	Variance		.025
	Std. Deviation		.15706
	Minimum		1.73
	Maximum		2.09
	Range		.37
	Interquartile Range		.31
	Skewness		-.523 .845
	Kurtosis		-2.041 1.741
CA_10_ug	Mean		2.6848 .04749
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.5628
		Upper Bound	2.8069
	5% Trimmed Mean		2.6823
	Median		2.6727
	Variance		.014
	Std. Deviation		.11633
	Minimum		2.56
	Maximum		2.86
	Range		.31
	Interquartile Range		.21
	Skewness		.495 .845
	Kurtosis		-.917 1.741
CA_15_ug	Mean		2.5080 .12143
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.1959
		Upper Bound	2.8202
	5% Trimmed Mean		2.5160
	Median		2.5025
	Variance		.088
	Std. Deviation		.29744
	Minimum		2.02
	Maximum		2.85
	Range		.83
	Interquartile Range		.48
	Skewness		-.663 .845
	Kurtosis		.379 1.741
CA_20_ug	Mean		2.4973 .03753
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.4009
		Upper Bound	2.5938
	5% Trimmed Mean		2.4973
	Median		2.4993
	Variance		.008
	Std. Deviation		.09194
	Minimum		2.38
	Maximum		2.62
	Range		.24
	Interquartile Range		.18
	Skewness		-.019 .845
	Kurtosis		-1.410 1.741

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
tran_MTTabs_viabilitas_relatif_17D	kontrol	.170	6	.200(*)	.942	6	.672
	AI_10_mg	.191	6	.200(*)	.904	6	.399
	AI_15_mg	.207	6	.200(*)	.887	6	.302
	AI_20_mg	.266	6	.200(*)	.866	6	.211
	CA_10_ug	.162	6	.200(*)	.955	6	.780
	CA_15_ug	.194	6	.200(*)	.949	6	.728
	CA_20_ug	.157	6	.200(*)	.960	6	.820

* This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

tran_MTTabs_viabilitas_relatif_17D

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.046	6	35	.085

ANOVA

tran_MTTabs_viabilitas_relatif_17D

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.778	6	.796	17.522	.000
Within Groups	1.591	35	.045		
Total	6.369	41			

Dependent Variable: tran_MTTabs_viabilitas_relatif_17D
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	AI_10_mg	.08573	.12309	.491	-.1641	.3356
	AI_15_mg	-.07620	.12309	.540	-.3261	.1737
	AI_20_mg	-.04904	.12309	.693	-.2989	.2008
	CA_10_ug	-.79673(*)	.12309	.000	-1.0466	-.5468
	CA_15_ug	-.61991(*)	.12309	.000	-.8698	-.3700
	CA_20_ug	-.60922(*)	.12309	.000	-.8591	-.3593
AI_10_mg	kontrol	-.08573	.12309	.491	-.3356	.1641
	AI_15_mg	-.16193	.12309	.197	-.4118	.0879
	AI_20_mg	-.13477	.12309	.281	-.3847	.1151
	CA_10_ug	-.88246(*)	.12309	.000	-1.1323	-.6326
	CA_15_ug	-.70564(*)	.12309	.000	-.9555	-.4558
	CA_20_ug	-.69495(*)	.12309	.000	-.9448	-.4451
AI_15_mg	kontrol	.07620	.12309	.540	-.1737	.3261
	AI_10_mg	.16193	.12309	.197	-.0879	.4118
	AI_20_mg	.02716	.12309	.827	-.2227	.2770
	CA_10_ug	-.72053(*)	.12309	.000	-.9704	-.4706
	CA_15_ug	-.54371(*)	.12309	.000	-.7936	-.2938
	CA_20_ug	-.53302(*)	.12309	.000	-.7829	-.2831
AI_20_mg	kontrol	.04904	.12309	.693	-.2008	.2989
	AI_10_mg	.13477	.12309	.281	-.1151	.3847
	AI_15_mg	-.02716	.12309	.827	-.2770	.2227
	CA_10_ug	-.74769(*)	.12309	.000	-.9976	-.4978
	CA_15_ug	-.57087(*)	.12309	.000	-.8207	-.3210
	CA_20_ug	-.56018(*)	.12309	.000	-.8101	-.3103
CA_10_ug	kontrol	.79673(*)	.12309	.000	.5468	1.0466
	AI_10_mg	.88246(*)	.12309	.000	.6326	1.1323
	AI_15_mg	.72053(*)	.12309	.000	.4706	.9704
	AI_20_mg	.74769(*)	.12309	.000	.4978	.9976
	CA_15_ug	.17682	.12309	.160	-.0731	.4267
	CA_20_ug	.18751	.12309	.137	-.0624	.4374
CA_15_ug	kontrol	.61991(*)	.12309	.000	.3700	.8698
	AI_10_mg	.70564(*)	.12309	.000	.4558	.9555
	AI_15_mg	.54371(*)	.12309	.000	.2938	.7936
	AI_20_mg	.57087(*)	.12309	.000	.3210	.8207
	CA_10_ug	-.17682	.12309	.160	-.4267	.0731
	CA_20_ug	.01069	.12309	.931	-.2392	.2606
CA_20_ug	kontrol	.60922(*)	.12309	.000	.3593	.8591
	AI_10_mg	.69495(*)	.12309	.000	.4451	.9448
	AI_15_mg	.53302(*)	.12309	.000	.2831	.7829
	AI_20_mg	.56018(*)	.12309	.000	.3103	.8101
	CA_10_ug	-.18751	.12309	.137	-.4374	.0624
	CA_15_ug	-.01069	.12309	.931	-.2606	.2392

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

B. Hasil analisis statistic data proliferasi sel pada kultur primer selama 17 hari

	Kelom pok		Statis tic	Std. Error			
MTTabs_proliferation_from_isolation_17_day	kontrol	Mean	.06933	.017998			
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.02307			
			Upper Bound	.11560			
		5% Trimmed Mean	.06815				
		Median	.05550				
		Variance	.002				
		Std. Deviation	.044085				
		Minimum	.027				
		Maximum	.133				
		Range	.106				
		Interquartile Range	.089				
		Skewness	.731	.845			
		Kurtosis	-1.453	1.741			
		Al_10_mg		Mean	.04850	.007402	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.02947	
					Upper Bound	.06753	
				5% Trimmed Mean	.04833		
Median	.04900						
Variance	.000						
Std. Deviation	.018130						
Minimum	.028						
Maximum	.072						
Range	.044						
Interquartile Range	.037						
Skewness	.038			.845			
Kurtosis	-1.811			1.741			
Al_15_mg				Mean	.06950	.011552	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.03980	
					Upper Bound	.09920	
				5% Trimmed Mean	.07000		
		Median	.07400				
		Variance	.001				
		Std. Deviation	.028297				

	Minimum		.031	
	Maximum		.099	
	Range		.068	
	Interquartile Range		.058	
	Skewness		-.396	.845
	Kurtosis		-1.756	1.741
AI_20_mg	Mean		.06317	.00855 3
	95% Confidenc e Interval for Mean	Lower Boun d	.04118	
		Upper Boun d	.08515	
	5% Trimmed Mean		.06335	
	Median		.06800	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.02095 2	
	Minimum		.037	
	Maximum		.086	
	Range		.049	
	Interquartile Range		.041	
	Skewness		-.320	.845
	Kurtosis		-2.276	1.741
CA_10_mg	Mean		.34600	.03923 4
	95% Confidenc e Interval for Mean	Lower Boun d	.24514	
		Upper Boun d	.44686	
	5% Trimmed Mean		.34267	
	Median		.32750	
	Variance		.009	
	Std. Deviation		.09610 4	
	Minimum		.249	
	Maximum		.503	
	Range		.254	
	Interquartile Range		.168	
	Skewness		.853	.845
	Kurtosis		-.055	1.741
CA_15_mg	Mean		.26550	.06385 2
	95% Confidenc e Interval for Mean	Lower Boun d	.10136	
		Upper Boun d	.42964	
	5% Trimmed Mean		.26367	
	Median		.22350	
	Variance		.024	
	Std. Deviation		.15640	

			4	
	Minimum		.073	
	Maximum		.491	
	Range		.418	
	Interquartile Range		.279	
	Skewness		.466	.845
	Kurtosis		-1.027	1.741
CA_20_mg	Mean		.22200	.019061
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.17300	
		Upper Bound	.27100	
	5% Trimmed Mean		.22150	
	Median		.21900	
	Variance		.002	
	Std. Deviation		.046690	
	Minimum		.166	
	Maximum		.287	
	Range		.121	
	Interquartile Range		.093	
	Skewness		.244	.845
	Kurtosis		-1.291	1.741

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MTTabs_proliferasi_from_isolation_17_day	kontrol	.259	6	.200(*)	.872	6	.236
	AI_10_mg	.192	6	.200(*)	.925	6	.545
	AI_15_mg	.168	6	.200(*)	.911	6	.444
	AI_20_mg	.261	6	.200(*)	.880	6	.267
	CA_10_mg	.184	6	.200(*)	.930	6	.577
	CA_15_mg	.192	6	.200(*)	.947	6	.716
	CA_20_mg	.155	6	.200(*)	.957	6	.800

* This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

MTTabs_proliferasi_from_isolation_17_day

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.186	6	35	.000

C. Hasil analisis statistic transformasi data proliferasi pada kultur primer selama 17 hari

	Kelompok		Statistic	Std. Error	
tran_MTTabs_proliferasi_17D	kontrol	Mean	-1.2349	.11585	
		95% Confidence Interval for Mean			
			Lower Bound	-1.5327	
			Upper Bound	-.9372	
		5% Trimmed Mean	-1.2363		
		Median	-1.2566		
		Variance	.081		
		Std. Deviation	.28376		
		Minimum	-1.57		
		Maximum	-.88		
		Range	.69		
		Interquartile Range	.60		
		Skewness	.174	.845	
		Kurtosis	-1.732	1.741	
		AI_10_mg		Mean	-1.3418
95% Confidence Interval for Mean					
	Lower Bound			-1.5237	
	Upper Bound			-1.1600	
5% Trimmed Mean	-1.3412				
Median	-1.3121				
Variance	.030				
Std. Deviation	.17329				
Minimum	-1.55				
Maximum	-1.14				
Range	.41				
Interquartile Range	.36				
Skewness	-.308			.845	
Kurtosis	-1.954			1.741	
AI_15_mg				Mean	-1.1947
		95% Confidence Interval for Mean			
			Lower Bound	-1.4108	
			Upper Bound	-.9787	
		5% Trimmed Mean	-1.1879		
		Median	-1.1327		
		Variance	.042		
		Std. Deviation	.20588		

	Minimum		-1.51	
	Maximum		-1.00	
	Range		.50	
	Interquartile Range		.40	
	Skewness		-.790	.845
	Kurtosis		-1.061	1.741
AI_20_mg	Mean		-1.2219	.06412
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		
			-1.3867	
		Upper Bound		
			-1.0571	
	5% Trimmed Mean		-1.2189	
	Median		-1.1722	
	Variance		.025	
	Std. Deviation		.15706	
	Minimum		-1.43	
	Maximum		-1.07	
	Range		.37	
	Interquartile Range		.31	
	Skewness		-.523	.845
	Kurtosis		-2.041	1.741
CA_10_ug	Mean		-.4742	.04749
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		
			-.5963	
		Upper Bound		
			-.3521	
	5% Trimmed Mean		-.4768	
	Median		-.4863	
	Variance		.014	
	Std. Deviation		.11633	
	Minimum		-.60	
	Maximum		-.30	
	Range		.31	
	Interquartile Range		.21	
	Skewness		.495	.845
	Kurtosis		-.917	1.741
CA_15_ug	Mean		-.6510	.12143
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		
			-.9632	
		Upper Bound		
			-.3389	
	5% Trimmed Mean		-.6430	
	Median		-.6566	
	Variance		.088	
	Std. Deviation		.29744	

	Minimum		-1.14	
	Maximum		-.31	
	Range		.83	
	Interquartile Range		.48	
	Skewness		-.663	.845
	Kurtosis		.379	1.741
CA_20_ug	Mean		-.6617	.03753
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		
				-.7582
		Upper Bound		-.5652
	5% Trimmed Mean		-.6618	
	Median		-.6597	
	Variance		.008	
	Std. Deviation		.09194	
	Minimum		-.78	
	Maximum		-.54	
	Range		.24	
	Interquartile Range		.18	
	Skewness		-.019	.845
	Kurtosis		-1.410	1.741

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
tran_MTTabs_proliferasi_17D						
kontrol	.181	6	.200(*)	.921	6	.511
AI_10_mg	.204	6	.200(*)	.902	6	.388
AI_15_mg	.207	6	.200(*)	.887	6	.302
AI_20_mg	.266	6	.200(*)	.866	6	.211
CA_10_ug	.162	6	.200(*)	.955	6	.780
CA_15_ug	.194	6	.200(*)	.949	6	.728
CA_20_ug	.157	6	.200(*)	.960	6	.820

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

tran_MTTabs_proliferasi_17D

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.818	6	35	.124

ANOVA

tran_MTTabs_proliferation_17D

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.590	6	.765	18.590	.000
Within Groups	1.440	35	.041		
Total	6.030	41			

Dependent Variable: tran_MTTabs_proliferation_17D

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
kontrol	Al_10_mg	.10690	.11712	.368	-.1309	.3447	
	Al_15_mg	-.04021	.11712	.733	-.2780	.1976	
	Al_20_mg	-.01305	.11712	.912	-.2508	.2247	
	CA_10_ug	-.76073(*)	.11712	.000	-.9985	-.5230	
	CA_15_ug	-.58392(*)	.11712	.000	-.8217	-.3462	
	CA_20_ug	-.57323(*)	.11712	.000	-.8110	-.3355	
Al_10_mg	kontrol	-.10690	.11712	.368	-.3447	.1309	
	Al_15_mg	-.14711	.11712	.217	-.3849	.0907	
	Al_20_mg	-.11995	.11712	.313	-.3577	.1178	
	CA_10_ug	-.86764(*)	.11712	.000	-1.1054	-.6299	
	CA_15_ug	-.69082(*)	.11712	.000	-.9286	-.4531	
	CA_20_ug	-.68013(*)	.11712	.000	-.9179	-.4424	
Al_15_mg	kontrol	.04021	.11712	.733	-.1976	.2780	
	Al_10_mg	.14711	.11712	.217	-.0907	.3849	
	Al_20_mg	.02716	.11712	.818	-.2106	.2649	
	CA_10_ug	-.72053(*)	.11712	.000	-.9583	-.4828	
	CA_15_ug	-.54371(*)	.11712	.000	-.7815	-.3059	
	CA_20_ug	-.53302(*)	.11712	.000	-.7708	-.2953	
Al_20_mg	kontrol	.01305	.11712	.912	-.2247	.2508	
	Al_10_mg	.11995	.11712	.313	-.1178	.3577	
	Al_15_mg	-.02716	.11712	.818	-.2649	.2106	
	CA_10_ug	-.74769(*)	.11712	.000	-.9855	-.5099	
	CA_15_ug	-.57087(*)	.11712	.000	-.8086	-.3331	
	CA_20_ug	-.56018(*)	.11712	.000	-.7979	-.3224	
CA_10_ug	kontrol	.76073(*)	.11712	.000	.5230	.9985	
	Al_10_mg	.86764(*)	.11712	.000	.6299	1.1054	
	Al_15_mg	.72053(*)	.11712	.000	.4828	.9583	
	Al_20_mg	.74769(*)	.11712	.000	.5099	.9855	
	CA_15_ug	.17682	.11712	.140	-.0610	.4146	
	CA_20_ug	.18751	.11712	.118	-.0503	.4253	
CA_15_ug	kontrol	.58392(*)	.11712	.000	.3462	.8217	
	Al_10_mg	.69082(*)	.11712	.000	.4531	.9286	
	Al_15_mg	.54371(*)	.11712	.000	.3059	.7815	
	Al_20_mg	.57087(*)	.11712	.000	.3331	.8086	
	CA_10_ug	-.17682	.11712	.140	-.4146	.0610	
	CA_20_ug	.01069	.11712	.928	-.2271	.2485	
CA_20_ug	kontrol	.57323(*)	.11712	.000	.3355	.8110	

g						
AI_10_mg	.68013(*)	.11712	.000	.4424	.9179	
AI_15_mg	.53302(*)	.11712	.000	.2953	.7708	
AI_20_mg	.56018(*)	.11712	.000	.3224	.7979	
CA_10_ug	-.18751	.11712	.118	-.4253	.0503	
CA_15_ug	-.01069	.11712	.928	-.2485	.2271	

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

D. Hasil analisis statistic data viabilitas relatif sel pada kultur post pasasi selama 48 jam

Kelompok		Statistic	Std. Error	
Rerata Viabilitas Relatif Sel Perlakuan 48 jam post Pasasi	kontrol	Mean	93.3333 3	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound - 13.7799 4	
			Upper Bound 200.446 60	
		5% Trimmed Mean	91.4814 8	
		Median	56.6665 0	
		Variance	10417.7 74	
		Std. Deviation	102.067 498	
		Minimum	.000	
		Maximum	220.000	
		Range	220.000	
		Interquartile Range	215.000	
		Skewness	.672	.845
		Kurtosis	-1.992	1.741
	AI_10_mg		Mean	173.333 33
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 59.9166 3	
			Upper Bound 286.750 04	
		5% Trimmed Mean	170.740 70	
		Median	173.333 00	
		Variance	11679.9 89	
		Std. Deviation	108.073 999	
		Minimum	46.667	
		Maximum	346.667	

	Range		300.000	
	Interquartile Range		169.999	
	Skewness		.615	.845
	Kurtosis		.031	1.741
Al_15_mg	Mean		122.222 00	34.712251
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	32.9913 2	
		Upper Bound	211.452 68	
	5% Trimmed Mean		120.617 06	
	Median		96.6665 0	
	Variance		7229.64 2	
	Std. Deviation		85.0273 04	
	Minimum		33.333	
	Maximum		240.000	
	Range		206.667	
	Interquartile Range		171.667	
	Skewness		.647	.845
	Kurtosis		-1.600	1.741
Al_20_mg	Mean		198.555 50	56.329854
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	53.7550 0	
		Upper Bound	343.356 00	
	5% Trimmed Mean		200.987 61	
	Median		250.000 00	
	Variance		19038.3 15	
	Std. Deviation		137.979 401	
	Minimum		20.000	
	Maximum		333.333	
	Range		313.333	
	Interquartile Range		284.834	
	Skewness		-.726	.845
	Kurtosis		-1.842	1.741
CA_10_ug	Mean		288.888 83	47.474462
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	166.851 84	
		Upper Bound	410.925 82	
	5% Trimmed Mean		289.506 15	

	Median	323.333	
		50	
	Variance	13522.9	
		47	
	Std. Deviation	116.288	
		208	
	Minimum	133.333	
	Maximum	433.333	
	Range	300.000	
	Interquartile Range	215.000	
	Skewness	-.403	.845
	Kurtosis	-1.379	1.741
CA_15_ug	Mean	416.666	33.322249
		67	
	95% Lower Bound		
	Confidence Interval for Mean	331.009	
		10	
	Upper Bound	502.324	
		24	
	5% Trimmed Mean	419.259	
		30	
	Median	423.333	
		50	
	Variance	6662.23	
		4	
	Std. Deviation	81.6225	
		08	
	Minimum	273.333	
	Maximum	513.333	
	Range	240.000	
	Interquartile Range	110.000	
	Skewness	-1.053	.845
	Kurtosis	1.888	1.741
CA_20_ug	Mean	402.222	14.572062
		00	
	95% Lower Bound		
	Confidence Interval for Mean	364.763	
		32	
	Upper Bound	439.680	
		68	
	5% Trimmed Mean	403.209	
		67	
	Median	410.000	
		00	
	Variance	1274.07	
		0	
	Std. Deviation	35.6941	
		16	
	Minimum	353.333	
	Maximum	433.333	
	Range	80.000	
	Interquartile Range	65.000	
	Skewness	-.359	.845
	Kurtosis	-2.249	1.741

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rerata Viabilitas Relatif Sel Perlakuan 48 jam post Pasasi	kontrol	.226	6	.200(*)	.810	6	.073
	AI_10_mg	.189	6	.200(*)	.950	6	.738
	AI_15_mg	.270	6	.197	.880	6	.270
	AI_20_mg	.285	6	.140	.827	6	.101
	CA_10_ug	.205	6	.200(*)	.920	6	.505
	CA_15_ug	.252	6	.200(*)	.930	6	.577
	CA_20_ug	.308	6	.077	.823	6	.093

* This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Rerata Viabilitas Relatif Sel Perlakuan 48 jam post Pasasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.963	6	35	.098

ANOVA

Rerata Viabilitas Relatif Sel Perlakuan 48 jam post Pasasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	608573.796	6	101428.966	10.168	.000
Within Groups	349124.860	35	9974.996		
Total	957698.655	41			

Dependent Variable: Rerata Viabilitas Relatif Sel Perlakuan 48 jam post Pasasi
LSD

(I) Kelom pok	(J) Kelompok	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
kontrol	AI_10_mg	-80.000000	57.662801	.174	-197.06171	37.06171
	AI_15_mg	-28.888667	57.662801	.620	-145.95038	88.17304
	AI_20_mg	-105.222167	57.662801	.077	-222.28388	11.83954
	CA_10_ug	-195.555500(*)	57.662801	.002	-312.61721	-78.49379
	CA_15_ug	-323.333333(*)	57.662801	.000	-440.39504	-206.27162
	CA_20_ug	-308.888667(*)	57.662801	.000	-425.95038	-191.82696
AI_10_mg	kontrol	80.000000	57.662801	.174	-37.06171	197.06171
	AI_15_mg	51.111333	57.662801	.381	-65.95038	168.17304
	AI_20_mg	-25.222167	57.662801	.665	-142.28388	91.83954
	CA_10_ug	-115.555500	57.662801	.053	-232.61721	1.50621
	CA_15_ug	-243.333333(*)	57.662801	.000	-360.39504	-126.27162
	CA_20_ug	-228.888667(*)	57.662801	.000	-345.95038	-111.82696
AI_15_mg	kontrol	28.888667	57.662801	.620	-88.17304	145.95038
	AI_10_mg	-51.111333	57.662801	.381	-168.17304	65.95038
	AI_20_mg	-76.333500	57.662801	.194	-193.39521	40.72821
	CA_10_ug	-166.666833(*)	57.662801	.007	-283.72854	-49.60512
	CA_15_ug	-294.444667(*)	57.662801	.000	-411.50638	-177.38296
	CA_20_ug	-280.000000(*)	57.662801	.000	-397.06171	-162.93829
AI_20_mg	kontrol	105.222167	57.662801	.077	-11.83954	222.28388
	AI_10_mg	25.222167	57.662801	.665	-91.83954	142.28388
	AI_15_mg	76.333500	57.662801	.194	-40.72821	193.39521
	CA_10_ug	-90.333333	57.662801	.126	-207.39504	26.72838
	CA_15_ug	-218.111167(*)	57.662801	.001	-335.17288	-101.04946
	CA_20_ug	-203.666500(*)	57.662801	.001	-320.72821	-86.60479
CA_10_ug	kontrol	195.555500(*)	57.662801	.002	78.49379	312.61721
	AI_10_mg	115.555500	57.662801	.053	-1.50621	232.61721
	AI_15_mg	166.666833(*)	57.662801	.007	49.60512	283.72854
	AI_20_mg	90.333333	57.662801	.126	-26.72838	207.39504
	CA_15_ug	-127.777833(*)	57.662801	.033	-244.83954	-10.71612
	CA_20_ug	-113.333167	57.662801	.057	-230.39488	3.72854
CA_15_ug	kontrol	323.333333(*)	57.662801	.000	206.27162	440.39504
	AI_10_mg	243.333333(*)	57.662801	.000	126.27162	360.39504
	AI_15_mg	294.444667(*)	57.662801	.000	177.38296	411.50638
	AI_20_mg	218.111167(*)	57.662801	.001	101.04946	335.17288
	CA_10_ug	127.777833(*)	57.662801	.033	10.71612	244.83954
	CA_20_ug	14.444667	57.662801	.804	-102.61704	131.50638
CA_20_ug	kontrol	308.888667(*)	57.662801	.000	191.82696	425.95038
	AI_10_mg	228.888667(*)	57.662801	.000	111.82696	345.95038
	AI_15_mg	280.000000(*)	57.662801	.000	162.93829	397.06171
	AI_20_mg	203.666500(*)	57.662801	.001	86.60479	320.72821
	CA_10_ug	113.333167	57.662801	.057	-3.72854	230.39488
	CA_15_ug	-14.444667	57.662801	.804	-131.50638	102.61704

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

E. Hasil analisis statistic data proliferasi sel pada kultur post pasasi selama 48 jam

	Kelompok		Statistic	Std. Error		
MTTabs_proliferasi_from_pasasi_48_jam	kontrol	Mean	.01500	.006039		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.00052		
			Upper Bound	.03052		
		5% Trimmed Mean	.01483			
		Median	.01150			
		Variance	.000			
		Std. Deviation	.014792			
		Minimum	.000			
		Maximum	.033			
		Range	.033			
		Interquartile Range	.032			
		Skewness	.506	.845		
		Kurtosis	-1.873	1.741		
		AI_10_mg		Mean	.02333	.006672
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.00618
Upper Bound	.04048					
5% Trimmed Mean	.02265					
Median	.01800					
Variance	.000					
Std. Deviation	.016342					
Minimum	.007					
Maximum	.052					
Range	.045					
Interquartile Range	.026					
Skewness	1.259			.845		
Kurtosis	1.273			1.741		
AI_15_mg				Mean	.01833	.005207
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.00495
		Upper Bound	.03172			
		5% Trimmed Mean	.01809			
		Median	.01450			
		Variance	.000			
		Std. Deviation	.012754			
		Minimum	.005			
		Maximum	.036			
		Range	.031			

	Interquartile Range	.026	
	Skewness	.647	.845
	Kurtosis	-1.600	1.741
AI_20_mg	Mean	.03683	.007097
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.01859
		Upper Bound	.05508
	5% Trimmed Mean	.03798	
	Median	.04250	
	Variance	.000	
	Std. Deviation	.017383	
	Minimum	.003	
	Maximum	.050	
	Range	.047	
	Interquartile Range	.020	
	Skewness	-1.977	.845
	Kurtosis	4.162	1.741
CA_10_mg	Mean	.04333	.007121
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.02503
		Upper Bound	.06164
	5% Trimmed Mean	.04343	
	Median	.04850	
	Variance	.000	
	Std. Deviation	.017443	
	Minimum	.020	
	Maximum	.065	
	Range	.045	
	Interquartile Range	.032	
	Skewness	-.403	.845
	Kurtosis	-1.379	1.741
CA_15_mg	Mean	.06250	.004998
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.04965
		Upper Bound	.07535
	5% Trimmed Mean	.06289	
	Median	.06350	
	Variance	.000	
	Std. Deviation	.012243	
	Minimum	.041	
	Maximum	.077	
	Range	.036	
	Interquartile Range	.017	

	Skewness	-1.053	.845
	Kurtosis	1.888	1.741
CA_20_mg	Mean	.06033	.002186
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.05471
		Upper Bound	.06595
	5% Trimmed Mean	.06048	
	Median	.06150	
	Variance	.000	
	Std. Deviation	.005354	
	Minimum	.053	
	Maximum	.065	
	Range	.012	
	Interquartile Range	.010	
	Skewness	-.359	.845
	Kurtosis	-2.249	1.741

Tests of Normality

	Kelom pok	Kolmogorov- Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statis tic	df	Sig.	Statis tic	df	Sig.
MTTabs_proliferation_from_pasasi_48_jam	kontrol	.247	6	.200(*)	.839	6	.127
	AI_10_mg	.247	6	.200(*)	.898	6	.360
	AI_15_mg	.270	6	.197	.880	6	.270
	AI_20_mg	.314	6	.065	.762	6	.026
	CA_10_mg	.205	6	.200(*)	.920	6	.505
	CA_15_mg	.252	6	.200(*)	.930	6	.577
	CA_20_mg	.308	6	.077	.823	6	.093

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

MTTabs_proliferation_from_pasasi_48_jam

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.903	6	35	.504

ANOVA

MTTabs_proliferation_from_pasasi_48_jam

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.014	6	.002	11.006	.000
Within Groups	.007	35	.000		
Total	.021	41			

Dependent Variable: MTTabs_proliferation_from_pasasi_48_jam
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
kontrol	AI_10_mg	-.008333	.008262	.320	-.02511	.00844
	AI_15_mg	-.003333	.008262	.689	-.02011	.01344
	AI_20_mg	-.021833(*)	.008262	.012	-.03861	-.00506
	CA_10_ug	-.028333(*)	.008262	.002	-.04511	-.01156
	CA_15_ug	-.047500(*)	.008262	.000	-.06427	-.03073
	CA_20_ug	-.045333(*)	.008262	.000	-.06211	-.02856
AI_10_mg	kontrol	.008333	.008262	.320	-.00844	.02511
	AI_15_mg	.005000	.008262	.549	-.01177	.02177
	AI_20_mg	-.013500	.008262	.111	-.03027	.00327
	CA_10_ug	-.020000(*)	.008262	.021	-.03677	-.00323
	CA_15_ug	-.039167(*)	.008262	.000	-.05594	-.02239
	CA_20_ug	-.037000(*)	.008262	.000	-.05377	-.02023
AI_15_mg	kontrol	.003333	.008262	.689	-.01344	.02011
	AI_10_mg	-.005000	.008262	.549	-.02177	.01177
	AI_20_mg	-.018500(*)	.008262	.032	-.03527	-.00173
	CA_10_ug	-.025000(*)	.008262	.005	-.04177	-.00823
	CA_15_ug	-.044167(*)	.008262	.000	-.06094	-.02739
	CA_20_ug	-.042000(*)	.008262	.000	-.05877	-.02523
AI_20_mg	kontrol	.021833(*)	.008262	.012	.00506	.03861
	AI_10_mg	.013500	.008262	.111	-.00327	.03027
	AI_15_mg	.018500(*)	.008262	.032	.00173	.03527
	CA_10_ug	-.006500	.008262	.437	-.02327	.01027
	CA_15_ug	-.025667(*)	.008262	.004	-.04244	-.00889
	CA_20_ug	-.023500(*)	.008262	.007	-.04027	-.00673
CA_10_ug	kontrol	.028333(*)	.008262	.002	.01156	.04511
	AI_10_mg	.020000(*)	.008262	.021	.00323	.03677
	AI_15_mg	.025000(*)	.008262	.005	.00823	.04177
	AI_20_mg	.006500	.008262	.437	-.01027	.02327
	CA_15_ug	-.019167(*)	.008262	.026	-.03594	-.00239

	CA_20_ug	-.017000(*)	.008262	.047	-.03377	-.00023
CA_15_ug	kontrol	.047500(*)	.008262	.000	.03073	.06427
	AI_10_mg	.039167(*)	.008262	.000	.02239	.05594
	AI_15_mg	.044167(*)	.008262	.000	.02739	.06094
	AI_20_mg	.025667(*)	.008262	.004	.00889	.04244
	CA_10_ug	.019167(*)	.008262	.026	.00239	.03594
	CA_20_ug	.002167	.008262	.795	-.01461	.01894
CA_20_ug	kontrol	.045333(*)	.008262	.000	.02856	.06211
	AI_10_mg	.037000(*)	.008262	.000	.02023	.05377
	AI_15_mg	.042000(*)	.008262	.000	.02523	.05877
	AI_20_mg	.023500(*)	.008262	.007	.00673	.04027
	CA_10_ug	.017000(*)	.008262	.047	.00023	.03377
	CA_15_ug	-.002167	.008262	.795	-.01894	.01461

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

