



Antiproliferation Assay of Essential Oil of Curcuma Rhizoma (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Against P388 Leukemia Cell

**Ida Musfiroh^{1*}, Angga Geganaputra¹, Ajeng Diantini², Yasmiwar Susilawati³,
 Muchtaridi Muchtaridi¹**

¹Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

²Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

³Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

Submitted 05 May 2020; Revised 02 July 2020; Accepted 03 July 2020; Published 30 October 2020

*Corresponding author:ida.musfiroh@unpad.ac.id

Abstract

Leukemia or blood cancer is a disease which marked by abnormal increasing of blood producer's cells. Chemotherapies which used as anticancer have a many adverse effect and toxicity. The volatile oil of turmeric rhizome (*Curcuma xanthorrhiza*) contains sesquiterpene which has an pharmacological activity. The aimed of this research to assay the antiproliferation activity of volatile oil from curcuma rhizome to leukemia P388 cells using MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) method. The methods were contain of identification of volatile oil (produced from distillation water-steam) using organoleptic test and TLC, and activity test was using seven various concentrations, which were 0.1; 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/mL. The result showed that the sample can inhibit leukemia P388 cells with the value of IC₅₀ was 15.5 µg/mL. The volatile oil of Curcuma rhizome has an antiproliferative activity to leukemia P388 cell.

Keywords: Curcuma rhizome, MTT assay, leukemia cell P388, volatile oil

Uji Antiproliferasi Minyak Atsiri Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) pada Sel Leukimia P388

Abstrak

Leukimia atau sel kanker darah merupakan penyakit yang ditandai dengan perbanyakannya sel tak normal sel-sel pembentuk darah. Kemoterapi yang digunakan sebagai antikanker memiliki efek samping dan toksisitas. Minyak atsiri dari rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) mengandung senyawa sesquiterpen yang memiliki aktivitas farmakologis. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antiproliferasi minyak atsiri rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) pada sel leukemia P388 dengan metode MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Metode penelitian terdiri atas identifikasi minyak atsiri (dihasilkan dari destilasi uap-air) dengan uji organoleptis dan KLT, serta uji aktivitas menggunakan tujuh variasi konsentrasi, yaitu 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 µg/mL kemudian perhitungan nilai IC₅₀. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa terpenoid, dan dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia P388 dengan nilai IC₅₀ yaitu 15,5 µg/mL. Minyak atsiri rimpang temulawak memiliki aktivitas antiproliferasi pada sel leukimia P388.

Kata Kunci: Minyak atsiri, sel leukimia P388, temulawak, uji MTT

1. Pendahuluan

Leukemia atau kanker darah adalah sekelompok penyakit keganasan pada jaringan hematopoietik yang dicirikan adanya penggantian elemen sumsum tulang normal oleh sel darah abnormal atau sel leukemia, disebabkan oleh proliferasi tidak terkontrol dari sel darah immatur yang berasal dari sel induk hematopoietik.¹ Data statistik kanker USA jumlah kematian leukemia sebesar 7,5 per 100.000 populasi pada tahun 2018. Angka kematian akibat leukimia lebih banyak dibandingkan pada kasus kanker prostat dan kanker payudara.²

Secara historis, tanaman obat berperan dalam pengobatan dan pada saat ini, diketahui banyak produk alami menjadi bagian dari produk farmasi, dan sebagian besar berperan di bidang terapi kanker.³ Pengobatan pada leukemia saat ini kurang efisien, menghasilkan efek samping yang cukup besar, dan biaya cenderung mahal. Sehingga, alternatif pengobatan yang dapat dijadikan pilihan dalam tatalaksana pengobatan leukimia dapat bersumber dari bahan alam, maupun turunan dari senyawa bahan alam.⁴

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia dan secara tradisional digunakan untuk menyembuhkan penyakit diantaranya kerusakan hati, hipertensi, diabetes, kanker.^{5,6} Minyak atsiri rimpang *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. mengandung beberapa komponen derivat seskuiterpen yaitu, alfa dan beta turmeron.⁷

Kadar minyak atsiri dalam rimpang temulawak bervariasi antara 7,3-29,5% dihitung berdasarkan bobot kering rimpang. Komponen paling dominan adalah seskuiterpen fenol *xanthorrhizol* (32%). Komponen utama lainnya dalam minyak atsiri yaitu β-curcumen (17,1%), zingiberen (13,2%), β-bisabolol (3,5%), dan α-curcumen (2,6%), dan mengandung sejumlah kecil senyawa kamfor.⁸ *Xanthorrhizol* adalah golongan senyawa seskuiterpen dan secara luas digunakan untuk pengobatan-pengobatan berbagai macam keadaan patologis. *Xanthorrhizol* telah dianalisis pada hewan percobaan yang diinduksi metastasis paru-

paru dan senyawa ini dapat menginhibisi pertumbuhan tumor dan aktivitas metastasis dari sel kanker.⁷ Rimpang temulawak dan *Xanthorrhizol* juga telah diteliti untuk penghambatan kanker hati, dan kanker payudara YBM-1, MCF dan T47D.⁹⁻¹²

Dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas antikanker minyak atsiri rimpang temulawak dalam penghambatannya terhadap sel-sel leukemia sebagai salah satu alternatif pengobatan kanker. Uji antiproliferasi secara invitro dengan metode MTT (*3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) dan pengukuran absorbansi menggunakan *ELISA Reader*.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, *ELISA plate reader*, *Laminar Air Flow Cabinet* (Clyde Apach), Inkubator CO₂, *High Speed Refrigerated Centrifuge* (Beckman), pendingin -80°C, labu kultur (Nunc), *pipette aid* (Gilson), *Inverted Microscope* (Nikon), otoklaf (KLP-KP 180), alat sentriguasi (Heralus), cawan petri dan alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium pengujian *in vitro*.

2.2. Bahan

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak atsiri temulawak yang diperoleh dengan metode destilasi uap air dari Balai Penelitian Tanaman Obat Jl. Manoko Lembang Jawa Barat, Silica Gel GF 254 (Merck), pengembang toluen (Bratachem), etil asetat (Bratachem), vanillin sulfat, medium RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), *Fetal Bovine Serum* (Sigma, St. Louis, MO, USA), dimetilsulfoksida 10%, larutan dapar fosfat/PBS (Sigma aldrich), *3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT/Sigma, St. Louis, MO, USA) dan *stop solution* (Natrium Dodesil Sulfat, 10 % dalam 0,1 N HCl).

2.3. Prosedur rinci

2.3.1. Identifikasi minyak atsiri rimpang temulawak

Minyak atsiri diperoleh rimpang temulawak yang berumur 10 bulan dengan metode destilasi uap air. Sampel dilakukan pemeriksaan secara organoleptis meliputi bentuk, warna dan bau. Selain itu juga dilakukan identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan fase diam silika gel GF 254, pengembang toluene-etil asetat (99:1) serta penampak bercak sinar UV (254 dan 366 nm) dan vanillin sulfat.

2.3.2. Uji Aktivitas

A. Penyiapan sel dan sampel

Suspensi sel dibuat sekitar 3×10^4 sel/mL diperoleh dari Laboratorium Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, ITB, kemudian diinokulasikan dalam plat mikro 96 lubang dasar rata dan kultivasi pada media RPMI 1640 dan diinkubasi pada inkubator CO_2 setelah penambahan 10% *Fetal Bovine Serum*.

Sampel minyak atsiri dilarutkan dalam 100 μL DMSO (*dimethylsulfoxide*) 10%, dan dilakukan pengenceran sampel menggunakan PBS (*phosphate buffer solution*, Sigma Aldrich) sehingga diperoleh konsentrasi 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Masing-masing larutan sampel sebanyak 10 μL ditambahkan ke plat mikro sel. Kemudian dikocok menggunakan *mixer* plat mikro dan disimpan kembali dalam inkubator CO_2 selama 48 jam (dua hari).¹³

B. Uji antiproliferasi dengan metode MTT

Pada hari ke-3 dilakukan penambahan reagen MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) ke dalam masing-masing plat mikro sel yang telah diinkubasi selama dua hari sebelumnya, kemudian dikocok dengan *mixer* plat mikro selama ± 2 menit, disimpan kembali dalam inkubator CO_2 selama empat jam kemudian ditambahkan *stop solution* SDS (Sodium Dodesil Sulfat 10 % dalam 0,1 N HCl) dan dikocok dengan lembut. Kemudian disimpan kembali dalam inkubator CO_2 selama 24 jam. Pengukuran optical density dilakukan dengan *Reader Plate Micro* pada panjang gelombang 595 nm.¹³ Kemudian dihitung nilai IC_{50} .

C. Analisis data

Data hasil uji aktivitas antiproliferasi minyak atsiri rimpang temulawak terhadap sel leukemia P388 dianalisis menggunakan Desain Acak Sempurna ($\alpha=0,01$)

3. Hasil

3.1. Hasil identifikasi minyak atsiri

Hasil pemeriksaan sampel minyak atsiri rimpang temulawak secara organoleptis menunjukkan cairan berwarna kuning kecoklatan, berbau tajam, khas aromatik. Identifikasi dengan metode KLT pengembang toluen:etil asetat (99:1) menghasilkan spot warna-warna pada penampak bercak valinin sulfat. Terdapat bercak berwarna dengan nilai Rf 0,24 berwarna abu-abu, bercak dengan warna merah-ungu (Rf 0,9) dan bercak warna ungu (Rf 0,6). Hasil identifikasi ini



Gambar 1. Hasil Identifikasi minyak atsiri rimpang temulawak dengan KLT (fase diam silika gel GF254, pengembang toluen-etyl asetat (99:1); penampak bercak (i)UV 366 dan (ii)vanillin sulfat

Tabel 1. Hasil identifikasi minyak atsiri rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Noda KLT	Rf	UV 366	Vanilin sulfat
1	0,24	Hijau	Abu-abu
2	0,38	-	Merah muda
3	0,625	Biru	Ungu
4	0,90	-	Merah Ungu

ditunjukkan dalam Gambar 1 dan Tabel 1.

3.2. Hasil uji aktivitas

Hasil uji aktivitas antiproliferasi sampel minyak atsiri temulawak terhadap konsentrasi dengan nilai *optical density* ditunjukkan pada Tabel 2. Pada penelitian ini untuk memperoleh IC_{50} hasil dari pengukuran menggunakan ELISA *plate reader* dimasukkan ke dalam grafik semilogaritma, lalu hasil rata-rata kontrol positif (yang merupakan *optical density* dari medium dan sel) dibagi dua dan diplotkan ke dalam grafik. Konsentrasi yang didapatkan berdasarkan plot merupakan nilai IC_{50} . Aktivitas sitotoksik dinyatakan sebagai IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menginhibisi 50% sel leukemia P388. Nilai IC_{50} terhadap sel leukemia P388 pada minyak atsiri temulawak dapat dilihat pada Gambar 2, dimana setengah atau 50% nilai OD kontrol positif yaitu 0,026 diekstrapolasikan dalam grafik menggunakan kertas semilog dan diperoleh nilai log C adalah 1,19. Nilai Log C tersebut kemudian dikonversi menjadi konsentrasi (C) dan diperoleh 15,5 μ g/mL. Berdasarkan hal tersebut maka uji aktivitas antiproliferasi minyak atsiri rimpang temulawak menunjukkan nilai IC_{50} sebesar

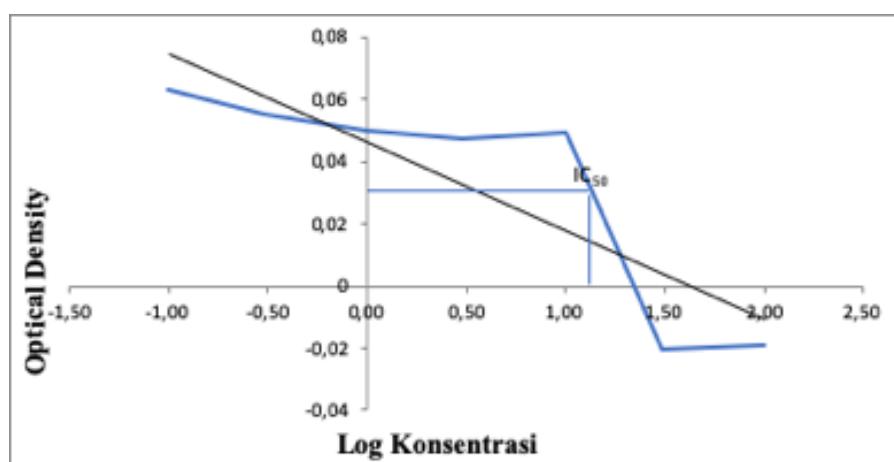
15,5 μ g/mL, dan menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia P388 sebanyak 50 %.

3.3. Hasil analisis data dengan statistik

Analisis data uji aktivitas antiproliferasi minyak atsiri rimpang temulawak dilakukan menggunakan perhitungan ANOVA dengan $\alpha=0,01$ ditunjukkan pada Tabel 3, diketahui $F_{\text{hitung}} = 3$ lebih kecil dibandingkan dengan $F_{\text{tabel}} (6,14)$. Nilai F_{hitung} adalah 4,46, oleh karena itu uji aktivitas ini menunjukkan H_0 diterima, artinya tidak terdapat perbedaan yang nyata terhadap pengaruh peningkatan konsentrasi yang digunakan dari minyak atsiri rimpang temulawak terhadap inhibis sel leukemia P388.¹⁷

4. Pembahasan

Berdasarkan pemeriksaan organoleptis sampel merupakan minyak atsiri temulawak hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa minyak atsiri rimpang temulawak berwarna kuning kecoklatan, berbau tajam dan khas aromatik.¹⁰ Sementara itu, hasil KLT pada identifikasi sampel minyak atsiri rimpang temulawak menunjukkan



Gambar 2. Grafik IC_{50} minyak atsiri temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) pada sel leukimia P388 dengan metode MTT

Tabel 2. Hasil pengukuran *optical density* minyak atsiri rimpang temulawak pada sel leukemia P388

C ($\mu\text{g/mL}$)	Optical density (OD) \pm SD
0,1	0,063 \pm 0,003
0,3	0,055 \pm 0,002
1,0	0,051 \pm 0,002
3,0	0,046 \pm 0,003
10,0	0,049 \pm 0,008
30,0	-0,02 \pm 0,019
100,0	-0,019 \pm 0,002
Kontrol normal	0,052

adanya beberapa senyawa, berdasarkan pada warna-warna yang dihasilkan pada sinar UV 366 dan penampak bercak valinin sulfat. Bercak berwarna diantaranya menunjukkan senyawa golongan monoterpen alkohol dan esternya yang merupakan golongan senyawa terpenoid dengan nilai Rf 0,24 berwarna abu-abu, seperti salah satunya adalah borneol. Kemudian bercak dengan warna merah-ungu (Rf 0,9) menunjukkan senyawa kamfor dan bercak warna ungu (Rf 0,6) menunjukkan senyawa sineol.¹⁰

Parameter yang digunakan dalam pengukuran uji aktivitas adalah tingkat kekeruhan yang menunjukkan nilai *optical density* (OD) mana menunjukkan tingkat pertumbuhan suatu sel. Pengukuran *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer yang diukur pada panjang gelombang 595 nm.¹³ Dalam bidang mikrobiologi *optical density* (OD) digunakan sebagai satuan hitungan, karena *optical density* (OD) sebanding dengan kepekatan sel didalam suspensi biakan.^{14,15} IC₅₀ dihitung sebagai aktivitas antiproliferasi untuk melihat konsentrasi sampel yang dibutuhkan dalam menginhibisi 50% sel leukemia P388.

Parameter sitotoksik yang digunakan dalam mengukur aktivitas minyak atsiri rimpang temulawak ini menggunakan prinsip kemampuan konversi substrat 3-(4,5-

dimetilthiazol-2-il)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) menjadi formazan ungu oleh enzim suksinat dehidrogenase pada sel hidup. Reagen MTT akan memberikan warna pada sel leukemia P388 yang terinhibisi yang dimetabolisme oleh aktivitas enzim suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel yang bertahan hidup untuk menghasilkan reaksi farmazan yang berwarna ungu.¹³

Hasil uji aktivitas minyak atsiri temulawak terhadap sel leukemia P388 menunjukkan bahwa 50% sel leukemia P388 dapat dihambat oleh minyak atsiri rimpang temulawak pada konsentrasi 15,5 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa minyak atsiri temulawak bersifat sebagai antiproliferasi pada sel leukemia P388 yang dapat disebabkan oleh aktivitas senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya diantaranya yaitu senyawa terpenoid sebagaimana hasil pada identifikasi dengan KLT. Hal ini juga telah dijelaskan dalam beberapa penelitian sebelumnya, diantaranya yaitu bahwa senyawa ar-tumeron dalam minyak atsiri bersifat antiproliferatif melalui mekanisme apoptosis yang diinduksi oleh aktivitas antioksidan dan antiplatelet pada sel leukemia manusia dan murine 313-316, senyawa golongan terpenoid dalam minyak atsiri temulawak diketahui mampu menghambat aktivasi karsinogen kimia,

Tabel 3. Perhitungan ANOVA uji aktivitas minyak atsiri rimpang temulawak pada sel leukemia P388

Sumber	db	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel} $\alpha = 0,01$ (6,14)
Konsentrasi	6	0,0186	0,003	3	4,46
Galat	14	0,0141	0,001		
Total	20	0,0327			

dan menginaktivasi pengaktifan genotoksik serta menghambat jalur transduksi yang penting untuk perkembangan tumor,¹⁶ juga adanya senyawa xanthorrhizol dalam rimpang temulawak diketahui dapat menghambat sel kanker payudara Ymb-I, T47D dan MCF-7.¹⁰⁻

¹² Namun, berdasarkan uji statistik hasil uji aktivitas ini menunjukkan tidak ada pengaruh nyata peningkatan konsentrasi minyak atsiri rimpang temulawak terhadap kenaikan aktivitasnya. Hal ini perlu dilakukan uji lebih lanjut pada variasi konsentrasi yang berbeda agar dapat mengetahui efektivitas dan tingkat keamanan penggunaan minyak atsiri rimpang temulawak dalam penghambatan sel leukemia P388.I

5. Simpulan

Minyak atsiri rimpang temulawak mempunyai aktivitas antiproliferasi terhadap sel leukemia P388 yang diuji menggunakan metode MTT dengan nilai $IC_{50} = 15,5 \mu\text{g}/\text{mL}$. Aktivitas ini dapat disebabkan oleh adanya kandungan senyawa golongan terpenoid yang ditunjukkan dalam hasil identifikasi menggunakan KLT. Oleh karena itu dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa aktif tunggal pada minyak atsiri rimpang temulawak yang memiliki peran penting dalam aktivitasnya menghambat proliferasi sel leukemia P388.

Daftar Pustaka

- Rofinda, Z.D. Tinjauan Pustaka Kelainan Hemostasis pada Leukemia. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2012;1(2):68-74.
- Hao T., Talley Min Li., Buck, A., Chen, WY. An Emerging Trend of Rapid Increase of Leukemia but not All Cancers in The Aging Population in the United States/ Scientific Reports. 2019; 9(1207):1-13.
- Elrayess, R.A., Nageh, H. Anticancer Natural Products: A Review. *Cancer Studies and Molecular Medicine*. 2019;5(1):14-25.
- David B, Wolfender J.L, Dias DA. The Pharmaceutical Industry and Natural Products: Historical Status and New Trends. *Phytochemistry Reviews*. 2015;14:299-315.
- Saleh, N.A.M., Ismail, S., and Halim, M.R. Effects of Curcuma xanthorrhiza Extracts and Their Constituents on Phase II Drug-metabolizing Enzymes Activity. *Pharmacognosy Research*. 2016;8(4):309-315.
- Akhila N., Augustine A., Sreeraj Gopi. Non-Curcuminoids from Turmeric and Their Potential in Cancer Therapy and Anticancer Drug Delivery Formulations. *Biomolecule*. 2019;9(1):1-67.
- Jacob, James N., Toloue, Masoud. Biological Studies of Turmeric Oil, Part 1: Selective in vitro Anticancer Activity of Turmeric Oil (TO) and TO-Paclitaxel Combination. *Natural Product Communication*. 2013;8(6):807-810.
- Ibrahim,J., Fadlina,C.S., Muhammad,N.Q., Fhataheya,B. Correlation between Chemical Composition of Curcuma domestica and Curcuma xanthorrhiza and Their Antioxidant Effect on Human Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;1-12.
- Oon, S.F., Nallappan, M., Tee, T.T., Shohaimi, S., Kassim, N.K., Sa'ariwijaya, M.S.F., Cheah, Y.H. Xanthorrhizol: a Review of Its Pharmacological Activities and Anticancer Properties. *Cancer Cell International*. 2015;15(100):1-15
- Udin, Z., Cytotoxic Activity Of Xanthorrhizol From Curcuma Xanthorrhiza Roxb.'S Volatile Oil Toward Ymb-I Breast Cancer Cell. *Indonesian Journal of Applied Chemistry*. 2013;15(1): 23-29.
- Musfiroh, I., Udin. L.Z., Diantini, A., Levita, J, Mustarichie, R., dan Muchtaridi. Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak, Fraksi Etil Asetat Dan Isolat Rimpang Temulawak (Curcuma Xanthorrhiza Roxb.) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Bionatura*. 2011;13(2):93–100.
- Musfiroh, I., Muchtaridi, M., Muhtadi, A., Diantini, A., Hasanah, A.N., Udin, Z., Susilawati, Y., Mustarichie, R., Kartasasmita, R.E., Ibrahim, S. Cytotoxicity Studies of Xanthorrhizol

- and Its Mechanism Using Molecular Docking Simulation and Pharmacophore Modelling. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013;3(06): 007-015.
13. Xu, X., Gao, X., Jin, L., Bhadury, P.S., Yuan, K., Hu, D., Song, B., Yang, S. Antiproliferation and Cell Apoptosis Inducing Bioactivities of Constituents from Dysosma versipellis in PC3 and Bcap-37 Cell Lines. Cell Divison. 2011; 6(14): 1-12.
14. Koutsoni, Olga S., Kalliopi Karampetsou, and Eleni Dotsika. In vitro Screening of Antileishmanial Activity of Natural Product Compounds: Determination of IC₅₀, CC₅₀ and SI Values. Bio Protocol. 2019; 9(21):1-3
15. Smee, Donald F., Brett L. Hurst, W. Joseph Evans, Nathan Clyde, Sean Wright, Christopher Peterson, Kie-Hoon Jung, and Craig W. Day. Evaluation of Cell Viability Dyes in Antiviral Assays with RNA Viruses that Exhibit Different Cytopathogenic Properties. Journal of Virological Methods. 2017;246: 51-57.
16. Aqeela, A., Ghalib, O., Khan, M.A., Jose, J., Afzal, M. Chemistry and Biochemistry of Terpenoids from Curcuma and Related Species. Journal of Biologically Active Products from Nature. 2013;3(1):1–20.
17. Barton, B., Peat, Jennifer., Medical Statixtics : A Guide to SPSS, Data Analysis and Critical Appraisal, Second Edition, John Wiley & Sons. Ltd., USA. 2014 :113.
18. Rahman Ab., Jamalludin. Biref Guidelines for Methods and Statistics in Medical Research, Springer, Singapore. 2015: 78.