

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK ISOLAT HASIL FERMENTASI KAPANG
ENDOFIT DARI *Garcinia forbesii* KING DAN *Garcinia porrecta*
WALL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

WILZAR FACHRI

0305050671



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN FARMASI

DEPOK

2009

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK ISOLAT HASIL FERMENTASI KAPANG
ENDOFIT DARI *Garcinia forbesii* KING DAN *Garcinia porrecta*
WALL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh :

WILZAR FACHRI

0305050671



DEPOK

2009

SKRIPSI : UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK ISOLAT HASIL FERMENTASI
KAPANG ENDOFIT DARI *Garcinia forbesii* KING DAN
Garcinia porrecta WALL TERHADAP SEL KANKER
PAYUDARA MCF-7

NAMA : WILZAR FACHRI

NPM : 0305050671

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009


Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS

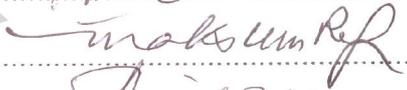
PEMBIMBING I

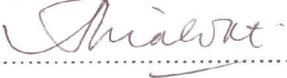

Dr. Yahdiana Harahap, MS

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana.....

Penguji I : Dr. Retnosari Andrajati, MS.....


Penguji II : Dr. Maksum Radji, M. Biomed.....


Penguji III : Dra. Azizahwati, MS.....


KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Atiek Soemiati, M.S, selaku pembimbing I, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, pendampingan, ilmu, motivasi, dukungan biaya, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, ilmu, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Dra. Juheini, MSi selaku pembimbing akademis
4. Papa, mama dan idan yang senantiasa memberikan doa dan segala kasih sayang kepada penulis selama ini.

5. Ibu Wan Lelly, MSc, Mba Dewi serta seluruh staf Rumah Sakit Kanker Dharmais yang telah bersedia membagi sedikit ilmu dan membimbing saya selama di Dharmais.
6. Dr. Adidin W., SpPD, KHOM selaku Direktur SDM Rumah Sakit Kanker Dharmais atas ijin dan penyediaan fasilitas penelitian.
7. Seluruh Staf pengajar, karyawan, laboran Departemen Farmasi FMIPA UI terutama laboratorium Mikrobiologi yang telah membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian.
8. Nita, dinda, ghita, wangi, K' chris, amie, eko dan K' tri atas tim yang solid dan telah berbagi ilmu selama penelitian.
9. Teman-teman kosan hasma, nuel, gina, okta, olin, atas semua bantuan yang diberikan selama penulis melakukan penelitian.
10. Teman-teman farmasi angkatan 2005 atas persahabatannya, kekompakan, dan dukungan kepada penulis.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga dapat terselesaikannya skripsi ini.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan semua pihak yang memerlukan.

Penulis

2009

ABSTRAK

Kanker payudara menduduki peringkat kedua setelah kanker mulut rahim, sebagai penyakit malignan yang paling banyak menyerang dan membunuh wanita Indonesia. Bahkan insiden kanker payudara di Indonesia dan dunia pada dekade terakhir memperlihatkan kecenderungan yang semakin meningkat. Oleh sebab itu penemuan akan bahan obat sangat dibutuhkan. Salah satunya yaitu dari isolat kapang endofit yang diketahui memiliki aktifitas toksisitas terhadap larva udang. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menemukan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan menggunakan pewarnaan merah netral dan pembacaan serapan dengan spektrofotometri *Elisa plate reader*. Hasil pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat tertinggi dengan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 233,39 $\mu\text{g/ml}$ dan 244,01 $\mu\text{g/ml}$ yang diperoleh dari isolat kapang endofit DP dan AF, sedangkan nilai LC_{50} untuk kontrol positif sisplatin sebesar 12,72 $\mu\text{g/ml}$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat isolat kapang endofit memiliki efek sitotoksik rendah karena memiliki nilai LC_{50} lebih besar dari 20 $\mu\text{g/ml}$.

Kata kunci : *elisa plate reader*; kanker payudara; MCF-7; merah netral; sitotoksik

xiii + 88 hlm; gbr; lamp; tab; lamp.

Bibliografi: 24 (1978-2009)

ABSTRACT

Breast cancer is in the second rank after cervix cancer in order of malignant disease that mostly kill an Indonesia women. There is significant increase in incident of breast cancer in Indonesia and in the world. Therefore, the research of new cancer drugs is necessary. One of them is from isolate endophytic fungi that is known have toxic activity to brine shrimp. The aim of this research is to investigate the cytotoxic activity on breast cancer cells MCF-7, using neutral red coloring and reading the absorbance with Elisa plate reader. Based on cytotoxic test analysis using ethyl acetate extract, this research get the highest value for endophyt isolate DP (233.39 $\mu\text{g/ml}$) and AF (244.01 $\mu\text{g/ml}$), and for Cysplatin as the positive control (12.72 $\mu\text{g/ml}$). The result showed that the ethyl acetate extract from endophyt has low cytotoxic effect because the LC_{50} value was more than 20 $\mu\text{g/ml}$.

Key word: breast cancer; cytotoxic; elisa plate reader; MCF-7; neutral red
xi + 88 pages; figures; tables; appendixes.

Bibliography: 24 (1978- 2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Kapang Endofit	5
B. Tumbuhan Inang.....	6
C. Kanker	9
D. Kanker Payudara	10
E. Uji Sitotoksisitas Secara <i>in vitro</i>	16
F. Sel MCF-7	18
G. Kultur Sel	19

BAB III. BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA	21
A. Lokasi Penelitian.....	21
B. Alat.....	21
C. Bahan.....	22
D. Cara Kerja.....	23
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
A. Hasil.....	35
B. Pembahasan	36
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	45
A. Kesimpulan	45
B. Saran	45
DAFTAR ACUAN	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kapang endofit isolat AF dari akar <i>G. forbesii</i> secara makroskopis dan mikroskopis (perbesaran 1000x).....	53
2. <i>Curvularia lunata</i> secara makroskopis dan mikroskopis	53
3. Kapang endofit isolat DP dari daun <i>G. porrecta</i> secara makroskopis dan mikroskopis (perbesaran 1000x).....	54
4. <i>Penicillium sp.</i> secara mikroskopis	54
5. Kapang endofit isolat BF dari batang <i>G. forbesii</i> secara makroskopis dan mikroskopis (perbesaran 400x)	55
6. Kapang endofit isolat BP dari batang <i>G. porrecta</i> secara makroskopis dan mikroskopis (perbesaran 1000x)	56
7. <i>Rhizomucor pucillus</i> secara makroskopis dan mikroskopis.....	56
8. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 tanpa perlakuan (Blanko negatif).....	57
9. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan DMSO 2%.....	57
10. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan ekstrak etil asetat isolat AF (Akar <i>G. forbesii</i>) konsentrasi 200 ppm.....	58
11. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan ekstrak etil asetat isolat DP (Daun <i>G. porrecta</i>) konsentrasi 200 ppm.....	58

12.	Gambar mikroskopis dari sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan ekstrak etil asetat isolat BF (Batang <i>G. forbesii</i>) konsentrasi 200 ppm.....	59
13.	Gambar mikroskopis dari sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan ekstrak etil asetat isolat BP (Batang <i>G. porrecta</i>) konsentrasi 200 ppm.....	59
14.	Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan sisplatin (Blanko positif) konsentrasi 100 ppm.....	60
15.	Kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji isolat AF (Akar <i>G. forbesii</i>) dengan persentase kematian sel MCF-7.....	61
16.	Kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji isolat DP (Daun <i>G. porrecta</i>) dengan persentase kematian sel MCF-7.....	61
17.	Kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji isolat BF (Batang <i>G. forbesii</i>) dengan persentase kematian sel MCF-7	62
18.	Kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji isolat BP (Batang <i>G. porrecta</i>) dengan persentase kematian sel MCF-7.....	62
19.	Kurva hubungan antara konsentrasi larutan blangko positif sisplatin dengan persentase kematian sel MCF-7.....	63
20.	Pelat kultur jaringan 96 sumuran.....	64

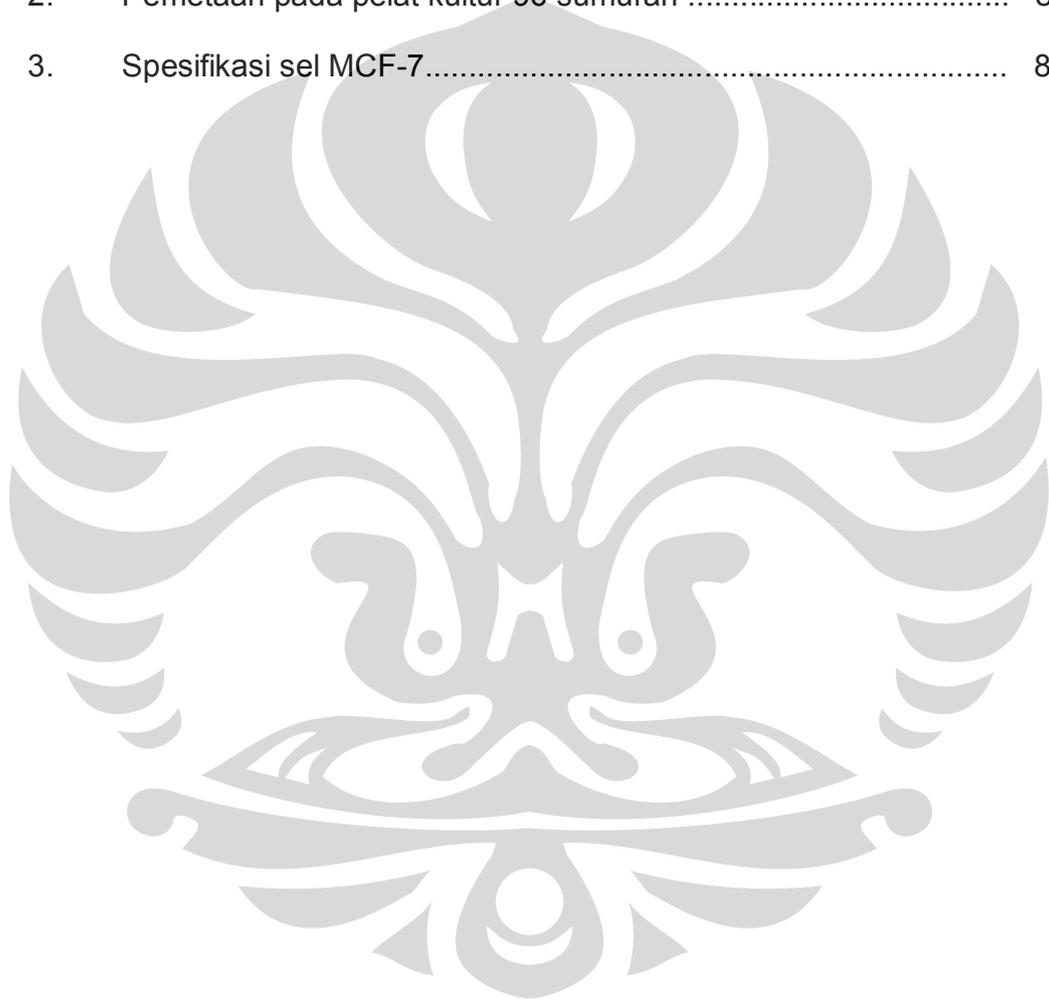
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Isolat Kapang Endofit.....	67
2. Konsentrasi akhir larutan uji isolat AF (Akar <i>G. forbesii</i>) dalam pelat 96 Sumuran	67
3. Konsentrasi akhir larutan uji isolat DP (Daun <i>G. porrecta</i>) dalam pelat 96 Sumuran	68
4. Konsentrasi akhir larutan uji isolat BF (Batang <i>G. forbesii</i>) dalam pelat 96 Sumuran	68
5. Konsentrasi akhir larutan uji isolat BP (Batang <i>G. porrecta</i>) dalam pelat 96 Sumuran	69
6. Konsentrasi akhir larutan sisplatin (balnko positif) dalam pelat 96 sumuran.....	69
7. Serapan merah netral larutan uji isolat AF (Akar <i>G. forbesii</i>) dalam larutan natrium dodesil sulfat pada panjang gelombang 492 nm setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C.....	70
8. Serapan merah netral larutan uji isolat DP (Daun <i>G. porrecta</i>) dalam larutan natrium dodesil sulfat pada panjang gelombang 492 nm setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C.....	71
9. Serapan merah netral larutan uji isolat BF (Batang <i>G. forbesii</i>) dalam larutan natrium dodesil sulfat pada panjang gelombang 492 nm setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C.....	72
10. Serapan merah netral larutan uji isolat BP (Batang <i>G. porrecta</i>) dalam larutan natrium dodesil sulfat pada panjang gelombang 492 nm setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C.....	73
11. Serapan merah netral larutan kontrol positif (sisplatin) dalam larutan natrium dodesil sulfat pada panjang gelombang 492 nm setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C.....	74

12.	Serapan merah netral larutan kontrol negatif dalam larutan natrium dodesil sulfat pada panjang gelombang 492 nm setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C.....	76
13.	Persentase kematian sel MCF-7 terhadap larutan uji ekstrak etil asetat isolat AF (Akar <i>G. forbesii</i>) setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C	77
14.	Persentase kematian sel MCF-7 terhadap larutan uji ekstrak etil asetat isolat DP (Daun <i>G. porrecta</i>) setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C	77
15.	Persentase kematian sel MCF-7 terhadap larutan uji ekstrak etil asetat isolat BF (Batang <i>G. forbesii</i>) setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C	78
16.	Persentase kematian sel MCF-7 terhadap larutan uji ekstrak etil asetat isolat BP (Batang <i>G. porrecta</i>) setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C	78
17.	Persentase kematian sel MCF-7 terhadap larutan sisplatin setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C	79
18.	Persamaan garis yang diperoleh melalui regresi linier dan digunakan untuk menghitung LC ₅₀ setelah inkubasi 24 jam.....	80
19.	Nilai LC ₅₀ (µg /ml) ekstrak etil asetat sampel isolat AF, DP, BF dan BP dan larutan sisplatin setelah inkubasi 24 jam.....	80

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan sel.....	83
2. Pemetaan pada pelat kultur 96 sumuran	84
3. Spesifikasi sel MCF-7.....	86



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Kanker payudara hampir mencapai kategori epidemik di negara-negara barat. Sekitar 20.000 kasus kanker payudara tercatat tiap tahunnya hanya pada wilayah England dan Wales di Inggris, yang merupakan negara dengan tingkat insiden kanker payudara terbesar di dunia (1). Diperkirakan satu dari sepuluh wanita di negara-negara Eropa dan Amerika Utara, akan mengalami kanker payudara selama hidupnya dan hal tersebut menjadikan penyakit malignan utama pembunuh wanita di negara-negara barat (2). Sementara di Indonesia, kanker payudara menduduki peringkat kedua setelah kanker mulut rahim yang paling banyak menyerang dan membunuh wanita Indonesia. Bahkan insiden kanker payudara pada dekade terakhir memperlihatkan kecenderungan yang semakin meningkat (3).

Untuk mengatasi penyakit kanker payudara saat ini dikembangkan berbagai terapi mulai dari terapi konvensional yaitu operasi, radiasi dan kemoterapi, terapi lanjutan seperti imunoterapi dan inhibisi angiogenesis sampai terapi alternatif dengan menggunakan ekstrak tumbuhan herbal (4). Tanaman telah lama diketahui merupakan salah satu sumber daya yang sangat penting dalam upaya pengobatan dan upaya mempertahankan

kesehatan manusia (5). Berdasarkan fungsi biologisnya, senyawa yang paling potensial dan memiliki efek farmakologis tersebut adalah senyawa metabolit sekunder. Salah satu aktivitas metabolit sekunder yaitu sebagai senyawa antikanker yang memiliki potensi sebagai agen sitotoksik sel kanker secara langsung maupun dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker. Contoh yang paling dikenal adalah senyawa vinkristin dan vinblastin yang terkandung dalam tumbuhan *Vinca rosea* yang telah terbukti memiliki aktivitas antitumor/tumor inhibitor dan telah digunakan dalam pengobatan kanker klinis kontemporer. (4)

Permasalahan yang timbul dari penggunaan ekstrak tumbuhan herbal adalah bagaimana cara menjaga tingkat produksi obat herbal tersebut dengan bahan baku obat herbal yang terbatas karena sebagian besar bahan baku obat herbal diambil dari tanaman induknya dan dikhawatirkan sumberdaya hayati ini akan musnah akibat adanya kendala budidaya. Salah satu upaya penanggulangannya adalah dengan penggunaan mikroba endofit yang diketahui memiliki kemampuan memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya sehingga dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder yang mungkin berguna dalam pengobatan kanker maupun penyakit lainnya (5, 6).

Penelitian terdahulu mengindikasikan bahwa metabolit sekunder kapang endofit *Garcinia forbesii* dan *Garcinia porrecta* memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan dan toksis terhadap larva udang pada uji dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (7, 8). Berdasarkan hasil

penelitian-penelitian tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas metabolit sekunder kapang endofit *Garcinia porrecta* dan *Garcinia forbesii* sebagai senyawa antikanker melalui uji sitotoksitas terhadap sel kanker payudara MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation*). Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara manusia sehingga hasil pengujian ini diharapkan dapat menunjukkan kemungkinan hasil metabolit sekunder kapang endofit *Garcinia porrecta* Wall dan *Garcinia forbesii* King menjadi terapi alternatif penyakit kanker payudara.

B. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian bertujuan untuk menguji apakah hasil fermentasi isolat kapang endofit *Garcinia forbesii* King yaitu isolat AF (Akar *G. forbesii*) dan isolat BF (Batang *G. forbesii*) serta *Garcinia porrecta* Wall yaitu isolat DP (Daun *G. porrecta*) dan isolat BP (Batang *G. porrecta*) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. KAPANG ENDOFIT

Mikroba endofit adalah mikroba yang mengkolonisasi atau tumbuh pada jaringan hidup tubuh tumbuhan tanpa menyebabkan efek negatif secara cepat dan nyata bagi tumbuhan tersebut. Mikroba tersebut terdiri dari jenis bakteri dan fungi/kapang (6, 9).

Kapang endofit adalah jenis kapang atau fungi yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya (5).

Kapang endofit telah ditemukan pada hampir semua jenis tanaman dan hampir seluruh jenis tanaman memiliki kapang endofit. Tetapi sebagian besar merupakan fungi yang tidak biasa ditemukan atau spesifik hanya terdapat dalam jenis inang tumbuhan tertentu. Walaupun tidak menutup kemungkinan terdapat beberapa jenis kapang endofit dalam satu jenis tumbuhan inang, dan sebaliknya satu jenis kapang endofit yang tumbuh dalam beberapa jenis tumbuhan inang (6, 9, 10).

Konsentrasi tertinggi endofit terdapat pada bagian batang, daun dan bunga. Sementara kapang endofit terdapat sedikit di dalam akar yang dikenal

sebagai *micorrhizal*. Hal ini mungkin terkait dengan fungsi kapang endofit tersebut, walaupun masih sedikit terdapat kontroversi, yaitu melindungi tanaman dari predator seperti serangga dan herbivora lainnya (6, 11, 12, 13). Sementara kapang *micorrhiza* diketahui memiliki fungsi terhadap tumbuhan inangnya dengan cara meningkatkan absorpsi nutrisi tanah seperti fosfor serta turut melindungi tumbuhan inang terhadap mikroba patogen tanah seperti jamur dan nematoda (6).

Tetapi secara umum telah diketahui bahwa kapang endofit mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat dari koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombinan*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (5, 6).

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang endofit tersebut pada umumnya identik atau sesuai dengan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan inangnya. Berbagai jenis metabolit kapang endofit tersebut telah diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antibiotika, antivirus, antikanker, anti malaria, antidiabetes, antioksidan, dan senyawa immunosupresif (5, 9).

B. TUMBUHAN INANG

Kapang endofit diisolasi dari tumbuhan *Garcinia porrecta* Wall. dan *Garcinia forbesii* King. Diketahui bahwa kedua jenis tanaman ini mengandung senyawa xanton. *Garcinia porrecta* Wall mengandung senyawa dulxanton E,

dulxanton F dan dulxanton G. Sementara *Garcinia forbesii* King mengandung senyawa xanton 1,3,7-trihidroksi-2-(3-metilbut-2-enil) - xanton, forbexanton dan pyranojacareubin (7).

1. *Garcinia porrecta* Wall / Laness.

Garcinia porrecta memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom/Regnum	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Theales
Famili	: Clusiaceae/Guttiferae
Genus	: <i>Garcinia</i>
Spesies	: <i>Garcinia porrecta</i> Laness. (syn <i>Garcinia cornea</i> L.)

Garcinia porrecta merupakan pohon atau semak, dengan damar atau getah. Daun selalu berhadapan bersilang, tunggal, bertulang daun menyirip, kerap kali tanpa daun penumpu. Pangkal tangkai daun bentuk pelepah. Permukaan kulit batang kasar. Bakal buah beruang dua sampai banyak, ruang berbakal biji satu. Kepala putik duduk atau hampir duduk. Buah buni berdinding tebal (14). Tanaman tersebar di pulau Sumatra dan Maluku (7).

2. *Garcinia forbesii* King.

Garcinia forbesii memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom/Regnum : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivision : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Theales
Famili : Clusiaceae/Guttiferae
Genus : *Garcinia*
Spesies : *Garcinia forbesii* King.

Garcinia forbesii merupakan pohon atau semak, dengan damar atau getah. Daun selalu berhadapan bersilang, tunggal, bertulang daun menyirip. Pangkal tangkai daun bentuk pelepah. Bakal buah beruang dua sampai banyak, ruang berbakal biji satu. Kepala putik duduk atau hampir duduk. Bunga mekar pada malam hari dan memiliki aroma yang sangat kuat. Buah berbentuk bulat kecil berwarna merah (7, 14).

C. KANKER

1. Tumor

Tumor atau neoplasma adalah pertumbuhan abnormal jaringan dimana proliferasi sel berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan jaringan dimana sel tersebut berasal. Perubahan fenotipik tersebut terjadi akibat adanya perubahan gen dari sel tersebut yang dapat terjadi akibat berbagai hal seperti mutasi genetik, senyawa karsinogen maupun gen bawaan yang diturunkan.

Terdapat dua jenis tumor yaitu *benign* (tumor jinak) dan *malignan* (tumor ganas). Tumor jinak memiliki morfologi dan sifat menyerupai jaringan atau sel tempatnya berasal. Tumor tersebut memiliki pertumbuhan yang lambat, tidak *invasif* atau menyebar keseluruh tubuh (bersifat lokal) dan seringkali berada didalam selaput kapsul jaringan *fibre* (15).

Sementara tumor malignan memiliki bentuk morfologi yang karakteristik yang jauh berbeda dengan sel asalnya. Tumor ini bersifat lebih *invasif* dan menyebar hingga ke seluruh bagian tubuh. Kemampuannya tersebut mampu merusak dan menghancurkan jaringan normal disebelahnya dan menyebar ke organ-organ lainnya membentuk tumor sekunder (metastasis), menjadikan jenis ini sangat berbahaya (15).

2. Kanker

Kanker adalah tumor malignan yaitu kelainan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol, disebabkan oleh berbagai faktor pengubah ekspresi gen yang menyebabkan ketidakseimbangan antara proliferasi/pertumbuhan dengan kematian sel yang berujung pada peningkatan populasi sel yang dapat menginvasi jaringan dan metastasis ke bagian yang jauh dan dapat menyebabkan sakit serta kematian (16).

D. KANKER PAYUDARA

1. Payudara

Payudara merupakan kelenjar yang tersusun atas 15 sampai 20 lobulus jaringan kelenjar dan dipisahkan oleh jaringan serabut ikat. Seluruh kelenjar tersebut melekat pada jaringan lemak yang memberikan bentuk membulat. Darah dialirkan melalui pembuluh arteri dan vena, dan terdapat pula sistem pembuluh limfe yang mengalirkan cairan limfe dari payudara.

Fungsi kelenjar payudara adalah sebagai penghasil susu yang penting dalam perkembangan bayi. Produksi susu terjadi di dalam lobulus, lalu dialirkan melalui saluran lactiferus menuju puting susu (17).

2. Kanker payudara

Kanker payudara disebabkan oleh pertumbuhan sel malignan di dalam payudara. Sel malignan tersebut seringkali berasal dari sel epitel kelenjar

susu maupun saluran *lactiferus*, dengan ciri-ciri memiliki pertumbuhan yang tidak terkontrol dan kemampuan untuk menginvasi jaringan normal baik secara lokal maupun tersebar hingga seluruh tubuh melalui proses metastasis (18).

Pada umumnya kanker payudara merupakan adenokarsinoma karena merupakan perkembangan dari sel epitelium kelenjar. Tetapi terdapat jenis kanker payudara lain yang sangat jarang yaitu bentuk sarkoma, berasal dari perkembangan sel jaringan ikat pada payudara (17).

Pada umumnya gejala awal kanker payudara yaitu benjolan pada payudara. Walaupun demikian, adanya benjolan tidak berarti terkena kanker. Karena penyakit sistik fibrosis pada payudara juga disertai dengan pembengkakan dan rasa sakit (18).

a. Faktor resiko

1). Kecenderungan genetik

Sekitar 5 persen kasus kanker payudara terkait dengan gen yang abnormal. Resiko terkena kanker payudara akan meningkat jika terdapat keluarga dekat yang terkena kanker payudara sebelum menopause.

2). Perbedaan geografis

Insiden kanker payudara di negara-negara Eropa utara, Amerika utara dan Australia delapan kali lebih besar daripada kasus kanker payudara di Asia dan Afrika. Meskipun demikian terdapat kecenderungan bahwa wanita yang berasal dari negara dengan tingkat insiden rendah akan mengalami

peningkatan resiko ketika pindah ke negara-negara dengan tingkat insiden yang tinggi.

3). Jenis makanan

Beberapa jenis makanan diketahui mampu meningkatkan resiko kanker payudara. Walaupun tidak diketahui secara pasti penyebabnya, tetapi mungkin akibat pengaruhnya terhadap sintesis dan metabolisme hormon.

4). Hormon-hormon wanita

Terdapat kecenderungan semakin lama seorang wanita terpajan oleh hormon wanita (terutama estrogen) akan meningkatkan resiko terkena kanker payudara.

5). Merokok

Merokok dapat menekan sistem imun tubuh, sehingga kemungkinan sel kanker yang terbentuk akan semakin besar karena menurunnya sistem imun tubuh yang penting dalam penghancuran sel kanker.

6). Faktor resiko lainnya

Terdapat beberapa faktor resiko lainnya, tetapi dengan sedikit bukti-bukti yang kuat. Sebagai contoh adalah konsumsi alkohol yang berkorelasi dengan kanker payudara.

b. Pemeriksaan kanker payudara dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut (15, 19):

1). *Mammography*

Teknik ini menggunakan sinar-X yang digunakan untuk memeriksa payudara. Penggunaan sinar-X dengan dosis yang rendah diperlukan untuk

mencegah terjadinya induksi sinar-X terhadap resiko perkembangan kanker payudara. Hingga sekarang, metode ini merupakan cara yang paling dapat dipercaya dalam mendeteksi kanker sedini mungkin.

2). Pemeriksaan payudara oleh tenaga medis

Pemeriksaan ini dilakukan oleh tenaga medis dengan cara pengukuran perubahan ukuran payudara serta palpasi untuk merasakan adanya benjolan pada payudara. Pemeriksaan ini perlu dilakukan karena pendeteksian kanker payudara dengan mamogram terkadang gagal dilakukan.

3). Pemeriksaan payudara sendiri

Pemeriksaan ini dilakukan untuk deteksi awal semua perubahan yang terjadi pada payudara sendiri. Pemeriksaan yang terbaik dilakukan satu minggu setelah akhir periode menstruasi. Sementara pada wanita yang telah menopause, pemeriksaan sebaiknya dilakukan pada tanggal yang sama setiap bulannya.

c. Diagnosis ditegakkan jika serangkaian tes telah dilakukan, yang meliputi (15,19):

- 1). Hasil tes *mammography* dinyatakan positif
- 2). Hasil pemeriksaan payudara dengan palpasi telah dilakukan
- 3). *Ultrasound* (USG) pada payudara

Menggunakan gelombang suara berfrekuensi tinggi untuk memindai adanya sel-sel atau pertumbuhan yang abnormal.

4). Penusukan jarum

Menggunakan jarum tipis untuk mengetahui kandungan material yang terdapat di dalam benjolan, apakah berupa cairan atau padatan.

5). Pembedahan

Pembedahan disini dilakukan untuk mengetahui dan memeriksa sel-sel yang terdapat dalam area yang dicurigai setelah pemeriksaan sebelumnya dengan *mammography* maupun *ultrasound*.

d. Pengobatan kanker payudara (15, 17)

1). Pembedahan

a) *Lumpectomy*

Pembedahan yang hanya meliputi pengangkatan benjolan yang terdapat di payudara.

b) *Mastectomy*

Terdiri dari pembedahan seluruh maupun sebagian payudara, biasanya bersama dengan pengangkatan seluruh nodus limfe payudara. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kanker payudara sekunder akibat metastasis.

2). Radioterapi

Radioterapi dilakukan setelah pembedahan, hal ini dikarenakan radioterapi hanya digunakan untuk mencegah penyebaran kanker payudara melalui proses metastasis. Selain itu radioterapi juga diperuntukkan untuk mengurangi rasa sakit yang ditimbulkan oleh kanker payudara yang telah

menyebar bahkan hingga ke tulang. Radioterapi dilakukan dengan menggunakan sinar-X yang dipancarkan langsung ke arah tumor.

3). Kemoterapi

Kemoterapi digunakan untuk pengobatan kanker yang telah menyebar ke seluruh jaringan. Kemoterapi biasa diberikan setelah pembedahan baik bersama dengan radioterapi maupun sendiri.

4). Terapi Hormonal

Penggunaan obat anti-estrogen yaitu tamoksifen, dalam pengobatan kanker payudara telah banyak dilakukan dan cukup efektif dalam penyembuhan kanker payudara terutama untuk tumor yang mengandung reseptor estrogen.

5). Imunoterapi (terapi biologis)

Imunoterapi menggunakan sistem imun tubuh yang melawan sel kanker baik secara langsung maupun tak langsung dan dengan efek samping yang lebih ringan. Salah satu obat yang digunakan adalah Hersepin, yaitu antibodi monoklonal (MOAB), yang bekerja dengan cara menghalangi pertumbuhan sel kanker dan peningkatan respon sistem imun tubuh.

E. UJI SITOTOKSISITAS SECARA *IN VITRO* (20, 21, 22, 23, 24)

Sitotoksik berarti memiliki sifat toksik (racun) terhadap sel. Sitotoksitas adalah kemampuan menghasilkan aktivitas toksik terhadap jenis sel tertentu. Sitotoksitas ditentukan untuk mengetahui potensi toksisitas dari suatu senyawa. Sehingga metode sitotoksik secara *in vitro* terhadap kultur sel kanker merupakan salah satu cara dalam penapisan awal senyawa antikanker yang potensial, selain secara *in vivo* menggunakan hewan coba.

Jika senyawa uji terbukti memiliki khasiat terapeutik terhadap berbagai biakan sel uji (*in vitro*), maka pengujian dapat dilanjutkan dengan menggunakan hewan coba (*in vivo*). Hal tersebut disebabkan dalam pengujian secara *in vitro* menggunakan kultur sel, memiliki beberapa keuntungan dibandingkan menggunakan metode *in vivo*. Keuntungan tersebut antara lain pelaksanaan lebih cepat, biaya relatif lebih murah dan zat uji yang dibutuhkan pun lebih sedikit dibandingkan metode *in vivo*.

Metode pengukuran uji sitotoksik secara *in vitro* dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode berikut:

1. Uji Sitotoksitas dengan MTT

Uji sitotoksik MTT merupakan salah satu pengujian sitotoksitas menggunakan metode sederhana dalam penghitungan jumlah sel baik untuk keperluan perhitungan sitotoksik maupun proliferasi sel, dengan standar pembacaan serapan pada mikropelat tanpa perlu adanya pemindahan sel.

Prinsip penggunaannya adalah penetapan kadar secara kolorimetri dengan menggunakan kemampuan selektif sel hidup untuk mereduksi komponen 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) berwarna kuning menjadi produk formazon berwarna ungu yang tidak larut.

Jumlah sel hidup kemudian diukur dengan ELISA *Plate Reader*, pada panjang gelombang 545 nm dan panjang gelombang referens 620 nm, dimana konsentrasi warna yang dihasilkan sebanding dengan jumlah sel yang hidup.

2. Uji Ambilan Merah Netral

Merah netral (*2-methyl-3-amino-7-dimethylamino-phenazine*) merupakan pewarna bersifat kationik lemah yang dapat terakumulasi di dalam lisosom sel hidup. Prinsipnya adalah setelah sel di perlakukan dengan zat uji dan diinkubasi selama 1-6 hari, sel kemudian di paparkan terhadap larutan merah netral selama 3 jam. Pada sel hidup, merah netral akan terakumulasi di dalam lisosom pada pengamatan secara mikroskopis. Sementara pada sel mati atau rusak, merah netral tidak akan terakumulasi di dalam lisosom dan akan tercuci pada proses pencucian sel. Merah netral pada sel hidup kemudian diekstraksi dan diukur serapannya secara spektrofotometri, sehingga kuantitas merah netral sel yang terukur sebanding dengan jumlah sel hidup.

3. Pewarnaan Diferensial

Metode ini didasarkan pada perbedaan pewarnaan yang dihasilkan oleh diasetil fluoresin dan propium iodide. Sel hidup mampu mengambil dan

menghidrolisis diasetil fluoresein menjadi fluoresein. Tetapi membran sel impermeabel terhadap fluoresein, sehingga sel hidup akan berfluoresensi hijau. Sementara sel mati akan terwarnai oleh propium iodida atau etidium bromida dan akan berfluoresens merah.

4. Eksklusi Zat Warna (*Dye Exclusion*)

Metode ini digunakan untuk menentukan integritas membran sel. Sel hidup akan impermeabel terhadap zat warna biru tripan. Sementara sel mati akan kehilangan integritas membran selnya, sehingga sel mati akan terwarnai sedangkan sel hidup tidak berwarna. Metode ini biasa digunakan dengan perhitungan sel menggunakan hemositometer.

F. SEL MCF-7

Sel MCF-7 adalah sel yang biasa digunakan sebagai model untuk kanker payudara epitelial jenis estrogen positif. Sel ini pada awalnya dikembangkan pada tahun 1973 oleh *Michigan Cancer Foundation*, berasal dari efusi pleural yang diambil dari seorang wanita dengan kanker payudara metastasis. Kemudian sel tersebut didistribusikan hingga ke seluruh penjuru dunia, dan saat ini terdapat beberapa jenis sel MCF-7 yang berbeda berdasarkan sifat fenotipiknya seperti perbedaaan respon terhadap estrogen maupun kemampuan dalam membentuk tumor pada tikus (25, 26).

G. KULTUR SEL

Kultur sel adalah suatu proses dimana sel ditumbuhkan dalam kondisi dan keadaan tertentu. Pada umumnya jenis sel yang digunakan adalah jenis sel mamalia baik manusia maupun hewan, serta beberapa jenis sel serangga (27). Kultur sel biasa dilakukan untuk berbagai keperluan penelitian tentang biologi sel, proses penyakit tertentu dan bahkan terapi potensial untuk penyakit tertentu (28).

Terdapat tiga karakteristik yang penting dan dibutuhkan untuk menjaga kualitas kultur sel, yaitu antara lain:

1. Kemurnian (*Purity*)

Kultur sel harus terbebas dari kontaminasi mikroba jenis apapun terkecuali mikroba uji.

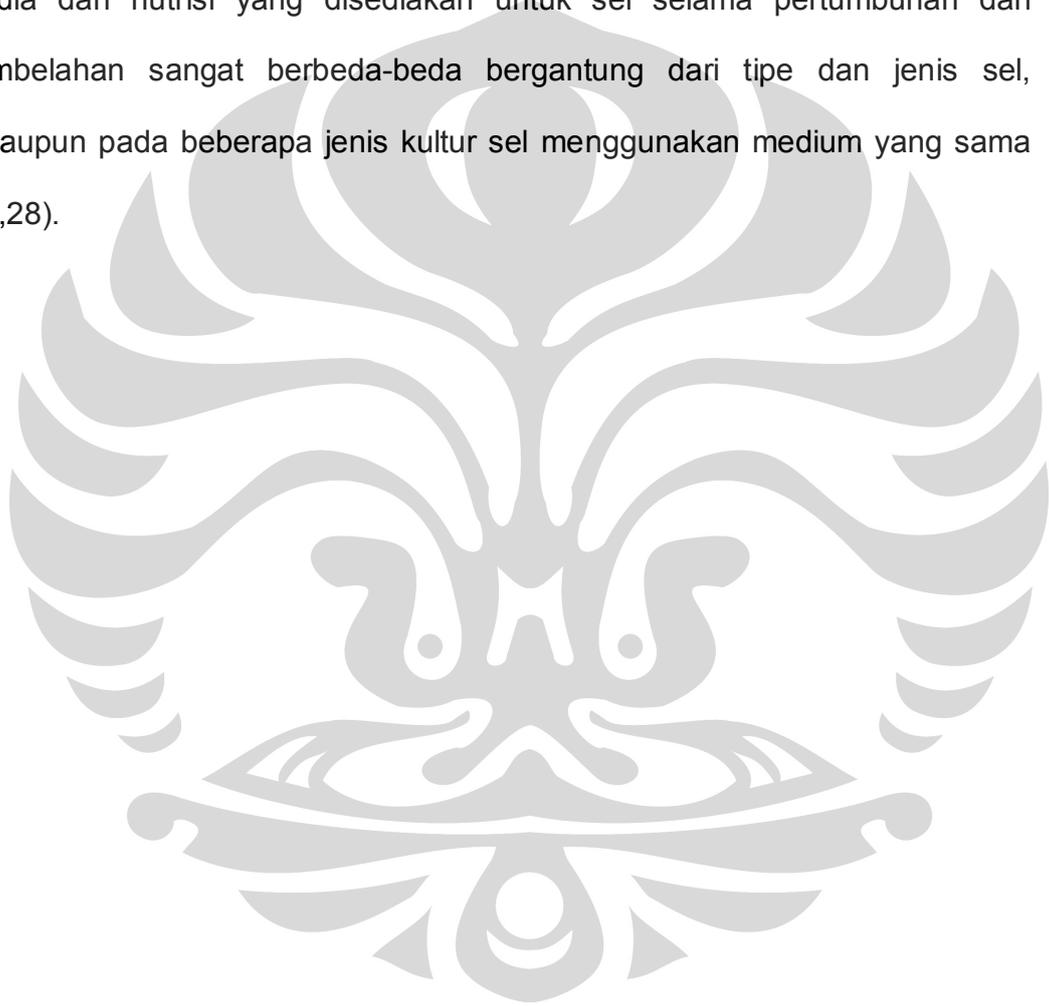
2. Identitas (*Identity*)

Kultur sel harus sesuai dengan jenisnya, dalam artian tidak boleh terjadi perubahan karakteristik selama kultur sel berlangsung kecuali jika telah diberi perlakuan tertentu yang diharapkan memang mampu mengubah sifat sel yang dikultur.

3. Stabilitas (*Stability*)

Sifat genotif dan fenotif sel tidak mengalami perubahan selama pertumbuhan *in vitro*.

Selama pertumbuhannya, kultur sel memerlukan media yang mampu menyediakan nutrisi serta kondisi optimal untuk tumbuh dan membelah. Media pada umumnya mengandung sumber karbon, nitrogen serta fosfor bersama dengan garam-garam mineral dan senyawa buffer. Komponen media dan nutrisi yang disediakan untuk sel selama pertumbuhan dan pembelahan sangat berbeda-beda bergantung dari tipe dan jenis sel, walaupun pada beberapa jenis kultur sel menggunakan medium yang sama (27,28).



BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI dan Laboratorium Kultur Jaringan dan Mikrobiologi Rumah Sakit Kanker Dharmais selama lebih kurang 5 bulan, yaitu sejak bulan Februari 2009 sampai Juni 2009.

B. ALAT

Kabinet laminar (*Laminar Air Flow Biological Safety Cabinet*, Forma Scientific), inkubator sel dengan aliran oksigen 95% dan karbondioksida 5% (Forma Scientific), tangki nitrogen cair (Locator JR Thermolyne), labu kultur jaringan 40 ml (*tissue culture flask*, Nunclon), pelat kultur jaringan 96 sumuran (*tissue culture plate*, Nunclon), mikroskop (Nikon TMS), labu bulat 1000 ml, cawan petri, tabung reaksi, mikroskop, ELISA *Plate Reader* (Stat Fax-2100, Awareness Technology Inc.), alat sentrifugasi (Porta Centrifuge), timbangan analitik (Precisa 300A), pH meter (Meterlab), hemositometer (improved Neubauer, Superior Marienfeld), penyaring berdiameter pori 0,2 µm steril (Nalgene), alat suntik 10 ml steril (Terumo), pipet serologik 10,0 ml

steril (Falcon), mikropipet (Eppendorft TM), tabung sentrifugasi (Falcon) dan tabung Eppendorf 1,5 ml.

C. BAHAN

1. Sampel

Empat isolat kapang endofit dari tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall yang diperoleh dari penelitian terdahulu di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi, FMIPA UI yaitu isolat AF yang diperoleh dari akar *Garcinia forbesii* King, isolat DP yang diperoleh dari daun *Garcinia porrecta* Wall, isolat BF yang diperoleh dari batang *Garcinia forbesii* King dan isolat BP yang diperoleh dari batang *Garcinia porrecta* Wall.

2. Sel uji

Sel MCF-7 (sel kanker payudara manusia) ATCC *cell lines* HTB-22TM yang diperoleh dari Institut Sains Biologi, Fakultas Biologi dan Sains Universitas Malaya.

3. Bahan Kimia

Dimetil sulfoksida (DMSO, Sigma), *Fetal Calf Serum* (FCS, Mycoplex), sisplatin (Platosin [®], Pharmachemie B.V.), penisilin-streptomisin (Meiji), merah netral, biru tripan, natrium dodesil sulfat, tripsin (Sigma), natrium bikarbonat, dinatrium hidrogen fosfat heptahidrat, kalium dihidrogen fosfat,

natrium klorida, kalsium karbonat (CaCO_3 , Merck), etanol 96%, etil asetat *p.a* (Merck) dan air suling (*aquadest*).

4. Medium

Peremajaan kapang endofit menggunakan *Potato Dextrosa Agar* (PDA, Difco), Fermentasi kapang endofit menggunakan *Potato Dextrose Yeast*, yang terdiri atas *Potato Dextrose Broth* (PDB, Difco), *Yeast Extract* (Oxoid) dan kalsium karbonat. Medium kultur sel kanker MCF-7 *Rosewell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640 Hybrimax, Sigma).

D. CARA KERJA

1. Peremajaan Isolat Kapang Endofit

- a. Pembuatan medium lempeng PDA (*Potato Dextrose Agar*) pada cawan petri (*PDA Plate*)

PDA (*Potato Dextrose Agar*) ditimbang sebanyak 39 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dalam *aquadest* hingga 1 liter. Seluruh bahan dicampur dan diaduk hingga larut dan homogen kemudian dipanaskan hingga mendidih dan selanjutnya disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C . Tuang ke dalam cawan petri, masing-masing sekitar 15 ml, biarkan media memadat.

b. Pembuatan medium PDA agar miring (*PDA Slant*)

PDA ditimbang sebanyak 39 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Seluruh bahan dicampur dan diaduk hingga larut dan homogen kemudian dipanaskan hingga mendidih dan selanjutnya disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Masukkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sekitar 15 ml. Letakkan tabung dalam posisi miring $\pm 45^\circ$ dan biarkan media memadat.

c. Peremajaan Isolat Kapang Endofit

Isolat kapang endofit yang tumbuh pada media isolasi selanjutnya diremajakan di dalam medium PDA. Peremajaan dilakukan dengan cara hifa dari tiap koloni dipindahkan dengan ose steril ke dalam medium *PDA plate* yang dikerjakan secara duplo, kemudian diinkubasi selama 5 – 7 hari pada suhu kamar. Setiap koloni kapang yang tumbuh pada medium *PDA plate* kemudian dipindahkan ke dalam media *PDA slant* yang kembali dikerjakan secara duplo dan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 – 7 hari. Setiap isolat kapang endofit dibuat duplo pada media *PDA plate* dan *PDA slant*, masing-masing digunakan sebagai kultur stok (*stock culture*) dan kultur kerja (*working culture*).

2. Identifikasi Kapang Endofit

Identifikasi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan cara mengamati bentuk morfologi koloni

jamur serta kecepatan pertumbuhan koloni. Sementara identifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan cara menggunakan pewarnaan dengan *lactofenol cotton-blue*. Caranya adalah hifa dari tiap koloni kapang diambil dengan ose steril dan diletakkan di tengah permukaan atas kaca objek, selanjutnya ditetaskan setetes alkohol 70 % dan *lactofenol cotton-blue*. Sebelum mengering preparat ditutup dengan kaca penutup dan siap untuk diamati di bawah mikroskop.

3. Isolasi Metabolit Sekunder

a. Pembuatan Medium Fermentasi Kapang Endofit

Fermentasi kapang endofit dilakukan di dalam medium PDY (*Potato Dextrose Yeast*). Untuk membuat PDY disiapkan medium *Potato Dextrose Broth* 24 gram, *Yeast Extract* 4 gram dan kalsium karbonat 5 gram. Seluruh bahan dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dengan aquadest hingga 1 liter. Aduk hingga homogen dan larut sambil dipanaskan hingga mendidih dan kemudian bahan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Kemudian dituang ke dalam labu erlenmeyer sebanyak 500 ml.

b. Fermentasi Kultur Kapang Endofit

Koloni kapang yang telah murni dalam medium PDA cawan petri diambil kira-kira 2 x 2 cm² berikut agar, lalu diinokulasikan masing-masing ke dalam erlenmeyer yang berisi 500 ml medium PDY. Kultur selanjutnya

diinkubasi dan di-*shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 14 hari pada suhu kamar.

c. Ekstraksi Kultur Hasil Fermentasi

Kultur suspensi koloni kapang hasil fermentasi selanjutnya dibagi menjadi beberapa bagian sama besar ke dalam tube sentrifugasi. Kemudian separuh dari bagian tersebut masing-masing diekstraksi menggunakan etil asetat separuh dari masing-masing volume kultur dan divorteks selama 5 menit. Selanjutnya tabung disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Fraksi ekstrak etil asetat kemudian diambil dan disaring dengan filter bakteri.

d. Pengeringan Hasil Fermentasi

Ekstrak etil asetat dikeringkan di dalam desikator secara aseptis.

4. Uji Sitotoksitas terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 (21, 23, 24, 26, 29, 30)

a. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak kering masing-masing isolat AF, DP, BF dan BP ditimbang sebanyak 20 mg di dalam tabung Eppendorf, dan dilarutkan dalam 1 ml DMSO, sehingga diperoleh larutan induk I dengan konsentrasi 20 μ g/ μ l . Larutan induk I kemudian dipipet 100 μ l kemudian diencerkan dengan 900 μ l medium RPMI 1640, sehingga diperoleh larutan induk II dengan konsentrasi 2 μ g/ μ l . Seluruh pengerjaan di lakukan secara aseptis di dalam ruang LAF (*Laminar Air Flow*).

Larutan induk II dipipet masing-masing sebanyak 50, 100, 150, 200 dan 250 μ l, kemudian dilakukan pengenceran dengan medium RPMI 1640 masing-masing sebanyak 950, 900, 850, 800 dan 750 μ l, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5 μ g / μ l.

b. Pembuatan Larutan Sisplatin (Blanko Positif) dan Larutan Blanko DMSO

Larutan sisplatin dengan konsentrasi 1 μ g / μ l dipipet masing-masing sebanyak 50, 100, 200, 300 dan 400 μ l, kemudian dilakukan pengenceran dengan medium RPMI 1640 masing-masing sebanyak 950, 900, 800, 700 dan 600 μ l, sehingga diperoleh konsentrasi akhir larutan sisplatin 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 dan 0,4 μ g/ μ l.

Larutan DMSO dipipet sebanyak 100 μ l dan ditambahkan 900 μ l RPMI, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi DMSO 10%. Larutan tersebut dipipet masing-masing sebanyak 200 μ l, lalu diencerkan dengan medium RPMI 1640 masing-masing sebanyak 800 μ l, sehingga diperoleh larutan DMSO dengan konsentrasi 2 %.

c. Pembuatan Medium Kultur RPMI 1640

Serbuk RPMI 1640 sebanyak 10,4 gram yang mengandung L-glutamin ditambahkan 2 gram natrium bikarbonat, 100 mg streptomisin kemudian dilarutkan dalam air suling hingga 1 liter. Larutan distabilkan pada pH 7,4 menggunakan pH meter lalu disterilisasi dengan filtrasi menggunakan bakteri filter 0,2 μ m. Medium kultur RPMI 1640 kemudian disimpan pada suhu 2 - 8°C.

d. Pembuatan Larutan Merah Netral 0,02%

Timbang dengan seksama merah netral (*2-methyl-3-amino-7-dimethylamino-phenazine*) 100 mg, larutkan dalam 5 ml etanol absolut dan 5 ml air suling. Larutan diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan dengan 49 ml air suling. Aduk hingga homogen kemudian saring.

e. Pembuatan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS)

Dinatrium hidrogen fosfat heptahidrat ditimbang sebanyak 1,52 gram, kalium dihidrogen fosfat ditimbang sebanyak 0,58 gram dan natrium klorida sebanyak 8,5 gram, kemudian dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Larutan distabilkan pada pH 7,4 menggunakan pH meter dan disterilisasi dengan autoklaf.

f. Pembuatan Larutan Tripsin 0,25%

Tripsin ditimbang sebanyak 0,25 gram dan dilarutkan dalam 100 ml PBS. Larutan disterilisasi filtrasi dan disimpan pada suhu -20°C .

g. Pembuatan Larutan Biru Tripan 0,4%

Biru tripan ditimbang sebanyak 0,2 gram dan dilarutkan dalam 50 ml air suling.

h. Pembuatan Larutan SDS 1%

Natrium dodesil sulfat ditimbang sebanyak 1 gram dan dilarutkan dalam 100 ml air suling.

i. Pencairan Sel MCF-7

Tabung berisi sel dikeluarkan dari tangki nitrogen cair dan dibenamkan dalam penagas air bersuhu 37°C selama 3 menit. Seluruh cairan sel dipipet

dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, ditambahkan 5 ml RPMI, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1500 putaran per menit selama 5 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 6 ml RPMI yang mengandung 20% FCS. Suspensi sel dipipet dan dimasukkan ke dalam labu kultur lalu diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator sel selama 3 hari.

j. Subkultur

Labu kultur berisi sel yang telah diinkubasi selama 3 hari dikeluarkan dari inkubator sel. Seluruh medium dalam labu kultur dipipet dan dibuang. Kultur sel dicuci sebanyak 3 kali, masing-masing dengan 10 ml PBS. Ke dalam labu kultur ditambahkan 3 ml PBS dan 1 ml tripsin, kemudian sel diinkubasi selama 10 menit dalam inkubator sel dan dilihat di bawah mikroskop untuk memastikan sel sudah tidak melekat pada dasar labu. Ke dalam labu kultur ditambahkan 1 ml RPMI. Seluruh cairan sel dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 6 ml RPMI yang mengandung 10 % FCS. Suspensi sel dibagi menjadi dua bagian, masing-masing sebanyak 3 ml dipipet dan dimasukkan ke dalam 2 buah labu kultur baru kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator sel.

k. Pemeliharaan Kultur Sel MCF-7

Sel diperiksa setiap hari di bawah mikroskop untuk memeriksa kemungkinan pencemaran oleh jamur atau bakteri. Apabila medium kultur

telah berubah warna maka akan diganti dengan medium RPMI 1640 bersuplemen yang baru.

I. Perhitungan Kepadatan Sel MCF-7

Kultur sel yang telah diinkubasi selama 3 hari diamati dengan mikroskop untuk mengetahui tingkat kepadatannya. Jika baik maka sel dapat digunakan, dan jika tidak maka sel harus diinkubasi kembali hingga kepadatannya optimal. Medium dalam labu kultur dipipet dan dibuang. Kultur sel dicuci sebanyak 3 kali, masing masing dengan 10 ml PBS. Ke dalam labu kultur ditambahkan 3 ml PBS dan 1 ml tripsin kemudian sel diinkubasi selama 10 menit dalam inkubator sel. Setelah 10 menit, labu dikeluarkan dari inkubator dan dilihat di bawah mikroskop untuk memastikan sel sudah tidak melekat pada dasar labu. Ke dalam labu ditambahkan 1 ml RPMI, cairan sel dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 1 ml RPMI. Suspensi sel dipipet sebanyak 100 μ l dan ditambahkan 900 μ l larutan biru tripan 0,4%.

Hemositometer bersih dengan kaca penutup diletakkan mendatar di atas meja. Lebih kurang 20 μ l dari suspensi sel dalam larutan biru tripan dipipet lalu ujung pipet disentuh dengan sudut 30° pada permukaan hemositometer dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Hemositometer dibiarkan terisi perlahan dengan daya kapilaritas. Hemositometer dengan bidang bergarisnya diletakkan di bawah lensa objektif perbesaran 10 kali dan fokus mikroskop diarahkan kepada garis-garis bagi hemositometer. Sel

dihitung dari keempat bidang besar pada sudut seluruh permukaan yang terbagi. Perhitungan dimulai dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri, lalu turun lagi kebawah dan dimulai lagi dari kiri ke kanan. Cara tersebut dilakukan pada keempat bidang besar. Sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau atas harus dihitung, sebaliknya sel yang menyinggung garis batas kanan atau bawah tidak dihitung.

Jumlah sel per ml dihitung dari jumlah rata-rata sel dalam keempat bidang besar dikalikan faktor pengenceran dan dibagi dengan volume satu bidang besar.

$$\text{jumlah sel per ml} = \frac{n \times 10}{10^{-4}}$$

Keterangan: n = jumlah rata-rata sel dalam keempat bidang besar

m. Penyiapan Suspensi Sel MCF-7 untuk Pengujian

Setelah kepadatan sel diketahui, sisa suspensi sel yang tidak digunakan dalam perhitungan kepadatan sel, yaitu sebanyak 900 μ l, digunakan untuk pengujian sitotoksitas dan diencerkan dengan medium RPMI 1640 yang mengandung 10 % FCS dengan perhitungan sebagai berikut:

$$P_1V_1 = P_2V_2$$

P_1 adalah kepadatan sel hasil perhitungan. V_1 adalah volume suspensi sel yang dibutuhkan untuk pengenceran. P_2 adalah kepadatan sel

yang dikehendaki dalam sumur uji dan V_2 adalah volume total suspensi sel yang akan diisikan ke dalam sumur uji.

n. Pengujian Sitotoksisitas Terhadap Sel MCF-7

Sebuah pelat kultur jaringan 96 sumuran digunakan untuk pengujian. Pelat terdiri dari 12 kolom yang diberi simbol 1 sampai 12 dan 8 baris yang diberi simbol A sampai H. Pelat diisikan larutan uji, blanko DMSO, kontrol positif dan kontrol negatif. Pelat diinkubasi selama 24 jam.

Ke dalam setiap sumuran pada pelat 96 dipipet dan dimasukkan 100 μ l suspensi sel MCF-7. Sel diinkubasi selama 1 hari dalam inkubator sel pada 37°C. Pada hari kedua, ke dalam sumur uji pelat 1 dan 2 ditambahkan 100 μ l larutan uji masing-masing dalam konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3, 0,4 dan 0,5 μ g/ μ l, sehingga diperoleh konsentrasi akhir 50, 100, 150, 200 dan 250 μ g/ml. Pada sumur kontrol negatif ditambahkan 100 μ l medium RPMI 1640, sedangkan pada sumur kontrol positif ditambahkan larutan sisplatin dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 dan 0,4 μ g/ μ l sehingga diperoleh konsentrasi akhir 25, 50, 100, 150 dan 200 μ g/ml. Pada sumur blanko pelat 1 dan 2, ditambahkan 100 μ l larutan DMSO dalam medium RPMI dengan konsentrasi 2%. Pelat kemudian kembali diinkubasi di dalam inkubator sel pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pada akhir periode inkubasi, ke dalam setiap sumuran ditambahkan 200 μ l merah netral 0,02% ke dalam tiap sumur. Kemudian diinkubasi kembali selama 2 jam pada suhu 37°C dalam inkubator sel. Setelah 2 jam, seluruh medium dibuang dan sel dicuci dengan 300 μ l PBS. Kemudian ke

dalam tiap sumuran ditambahkan 300 μ l natrium dodesil sulfat 1% dan sel diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C dalam inkubator sel. Kemudian pelat kultur jaringan dimasukkan ke dalam ELISA *Plate Reader* dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 492 nm dengan panjang gelombang *referens* 630 nm.

o. Perhitungan Persentase Kematian Sel MCF-7

1. Perhitungan persentase kematian sel MCF-7 oleh larutan uji dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\frac{\text{serapan blanko DMSO} - \text{serapan larutan uji}}{\text{serapan blanko DMSO}} \times 100 \%$$

2. Perhitungan persentase kematian sel MCF-7 oleh sisplatin dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\frac{\text{serapan kontrol negatif} - \text{serapan sisplatin}}{\text{serapan kontrol negatif}} \times 100 \%$$

5. Analisis Data

Dari data persentase kematian sel MCF-7, ditentukan nilai LC_{50} melalui analisis regresi linier.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Identifikasi Isolat Kapang Endofit

Digunakan 4 isolat kapang endofit dari hasil penelitian sebelumnya yang diperoleh dari tanaman inang *Garcinia porrecta* Wall dan *Garcinia forbesii* King yaitu isolat AF, DP, BF dan BP (7, 8). Hasil identifikasi menunjukkan kemungkinan besar bahwa isolat AF merupakan anggota genus *Curvularia* (7), isolat kapang DP merupakan genus *Penicillium*, isolat kapang BP merupakan genus *Rhizomucor*, sementara isolat kapang BF masih belum dapat diidentifikasi.

2. Pengujian Sitotoksisitas terhadap Sel MCF-7

Hasil pengujian sitotoksisitas larutan uji ekstrak etil asetat dari keempat isolat terhadap sel kanker payudara MCF-7 berupa persentase kematian sel MCF-7 dapat dilihat pada Tabel 13, 14, 15 dan 16. Dari data persentase kematian tersebut kemudian ditentukan nilai LC_{50} yang dapat dilihat pada Tabel 19.

B. PEMBAHASAN

Penelitian mengenai kapang endofit ini merupakan sebuah penelitian berkelanjutan yang dilakukan untuk mengetahui efek-efek yang ada dari metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang endofit sehingga diharapkan nantinya akan memberikan sumber daya baru bagi kehidupan khususnya dalam bidang farmasi dan kedokteran. Salah satunya yaitu dalam bidang pengobatan kanker, khususnya kanker payudara yang telah menduduki peringkat kedua setelah kanker mulut rahim yang paling banyak menyerang dan membunuh wanita Indonesia (3).

Serangkaian pengujian telah dilakukan terhadap isolat-isolat kapang endofit dari tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall. Uji-uji tersebut antara lain berupa uji aktivitas antibakteri, uji toksisitas terhadap larva udang, dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Selain itu tanaman *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall juga telah diketahui mengandung senyawa xanton yang memiliki aktivitas antiinflamasi, antibakteri, antifungi serta antioksidan dan kecenderungan bahwa kapang endofit mampu menghasilkan metabolit sekunder yang menyerupai tanaman induknya (5) sehingga diharapkan mampu memberikan hasil positif pada pengujian sitotoksitas terhadap sel kanker.

1. Identifikasi Isolat kapang Endofit

Sebelum identifikasi dilakukan, terlebih dahulu dilakukan peremajaan isolat kapang endofit yang akan digunakan. Peremajaan isolat dilakukan dari stok kultur yang tersimpan di dalam lemari pendingin. Stok kultur tersebut kemudian ditumbuhkan dalam medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) cawan petri, hal ini dilakukan agar sel-sel fungi mampu aktif kembali setelah fase 'dorman' dalam keadaan beku. Sementara penggunaan PDA agar miring bertujuan untuk pengawetan kapang dan pemurnian, karena kultur stok yang disimpan dalam lemari es dapat bertahan hingga 3 bulan.

Identifikasi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil identifikasi secara makroskopis untuk isolat AF berupa bentuk koloni halus, berwarna coklat kehitaman dengan tepi koloni berwarna coklat kekuningan. Pertumbuhan sangat cepat, dalam lima hari diameter koloni mencapai 5 cm. Pengamatan mikroskopis mengindikasikan bentuk spora yang menyerupai genus *Curvularia*.

Hasil identifikasi secara makroskopis untuk isolat DP berupa bentuk koloni halus, berwarna coklat kekuningan dengan tepi koloni berwarna kuning kecoklatan. Pertumbuhan sangat cepat, dalam lima hari diameter koloni mencapai 4,5 cm. Pengamatan mikroskopis mengindikasikan bentuk spora menyerupai genus *Penicillium*.

Hasil identifikasi secara makroskopis untuk isolat BF berupa bentuk koloni kasar, dengan tepi yang kasar dan beranyam. Berwarna putih dan pertumbuhan cukup lambat, dalam lima hari diameter koloni mencapai 1,5

cm. Pengamatan mikroskopis tidak berhasil memperoleh bentuk spora. Oleh karena itu, isolat tersebut masih belum dapat teridentifikasi.

Hasil identifikasi secara makroskopis untuk isolat BP berupa bentuk koloni halus, berwarna coklat keabu-abuan. Pertumbuhan sangat cepat, dalam lima hari diameter koloni mencapai 5 cm. Pengamatan mikroskopis mengindikasikan bentuk spora menyerupai genus *Rhizopus*. Namun berdasarkan hasil identifikasi makroskopis, kemungkinan besar isolat merupakan fungi dari genus *Rhizomucor*.

Pada penelitian ini, identifikasi hanya dilakukan untuk memastikan bahwa isolat yang akan digunakan adalah isolat-isolat yang potensial pada uji toksisitas penelitian sebelumnya (7). Isolat yang terpilih pada penelitian ini adalah isolat yang positif memiliki efek toksisitas terhadap BSLT dalam penelitian tersebut.

2. Fermentasi Isolat Kapang Endofit

Kapang yang telah cukup umur (berumur 7 hingga 14 hari) telah dapat difermentasi. Pemilihan keempat jenis isolat kapang endofit AF, DP, BF dan BP hal tersebut didasarkan pada efek toksisitas hasil fermentasi dengan etil asetat yang cukup tinggi berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, sehingga diharapkan juga memiliki efek sitotoksik yang cukup tinggi terhadap kultur sel kanker. Nilai toksisitas tersebut berkisar antara 40,62 μ g/ml untuk isolat AF, hingga 271,23 μ g/ml untuk isolat BF (7).

Fermentasi dilakukan dalam medium PDY (*Potato Dextrose Yeast*) yang terdiri atas PDB (*Potato Dextrose Broth*), *Yeast Extract* dan Kalsium Karbonat. Adapun penambahan kalsium karbonat yaitu untuk mencegah terjadinya keasaman akibat reaksi fermentasi yang terjadi sehingga tidak terjadi reaksi positif palsu akibat adanya senyawa asam hasil fermentasi yang dapat membunuh sel kanker uji. *Yeast extract* digunakan karena merupakan sumber nitrogen yang penting bagi pertumbuhan kapang.

Fermentasi dilakukan selama 14 hari pada suhu kamar diatas shaker dengan kecepatan putaran 150 rpm yang bertujuan untuk mempertahankan aerasi bagi kehidupan isolat kapang tersebut. Hasil fermentasi berupa suspensi kapang yang berwarna coklat kemerahan untuk isolat AF, coklat kekuningan untuk isolat DP, kuning kecoklatan untuk isolat BF dan coklat keabu-abuan untuk isolat BP sesuai dengan warna isolat masing-masing kapang pada medium PDA.

3. Ekstraksi dengan Etil Asetat

Hasil fermentasi isolat berupa suspensi kapang selanjutnya diekstraksi dengan etil asetat. Etil asetat digunakan karena menurut hasil penelitian sebelumnya, tingkat toksisitas ekstrak tersebut terhadap larva udang (uji *Brine Shrimp Lethality Test*) cukup tinggi dibandingkan dengan ekstrak lainnya, sehingga diperkirakan hasil fermentasi mengandung senyawa aktif berupa metabolit sekunder yang larut dalam pelarut etil asetat (7). Campuran tersebut disentrifugasi pada suhu rendah yang bertujuan untuk memisahkan

fraksi etil asetat dengan supernatan air dan biomassa kapang yang mengendap sebagai droplet.

Hasil ekstraksi kemudian disaring dengan filter bakteri untuk menghindari terjadinya kontaminasi baik dari kapang induk maupun kapang dan bakteri cemar. Selanjutnya ekstrak etil asetat dikeringkan secara aseptis di dalam desikator, hingga diperoleh ekstrak kering berupa kristal berwarna merah untuk AF, dan coklat kekuningan untuk DP, BF dan BP.

4. Kultur Sel

Sel MCF-7 dikultur dalam medium RPMI 1640 sesuai dengan spesifikasi sel yang membutuhkan cukup banyak nutrisi dalam pertumbuhannya. Medium ini membutuhkan karbondioksida 5% dalam fase gas untuk dapat mempertahankan kerja dapar bikarbonat dan HEPES sehingga dicapai pH optimal bagi pertumbuhan sel. Oleh karena itu selama fase pertumbuhannya, sel disimpan dalam inkubator sel ber-CO₂ (31).

Sel-sel yang hendak dikultur diperoleh dari kultur stok beku yang disimpan dalam tabung nitrogen cair bersuhu -181°C dan mengandung DMSO 5-10%. Tanpa DMSO sebagai agen krioprotektif, maka sel akan mati karena kerusakan akibat cedera mekanik oleh kristal es (31).

Sel-sel yang telah dikultur akan terus bertambah, dan pada akhirnya akan berkembang hingga menutupi seluruh substrat dalam labu kultur. Oleh sebab itu perlu dilakukan peremajaan yang dilakukan dengan cara membagi ke dalam labu kultur yang baru (subkultur).

Pada proses subkultur dilakukan pencucian dengan PBS yang bertujuan untuk menghilangkan antitripsin yang terkandung dalam serum medium. Selanjutnya dilakukan proses disosiasi sel dengan penambahan tripsin yang berfungsi untuk melepaskan sel antara satu sama lain maupun dengan substrat. Sehingga pada pengamatan dengan mikroskop, sel akan terlihat bulat dan mengambang (31).

Suspensi sel yang hendak digunakan dalam pengujian harus dihitung terlebih dahulu kepadatannya. Salah satu metodenya yaitu dengan menggunakan hemositometer menggunakan pewarna biru tripan. Pewarna tersebut hanya akan mewarnai sel yang mati, karena kemampuan membran sel hidup untuk mengeksklusi pewarna tersebut sehingga sel hidup akan tetap berwarna jernih.

5. Pengujian Sitotoksisitas Terhadap Sel MCF-7

Pada pembuatan larutan uji, ekstrak etil asetat dari tiap sampel dilarutkan kembali dalam DMSO hingga diperoleh konsentrasi 20 mg/ml, baru dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi yang dikehendaki. Pelarut DMSO digunakan karena inert dan dikhawatirkan ekstrak etil asetat tersebut tidak larut dalam air sementara jumlah yang tersedia cukup terbatas.

Pada percobaan ini digunakan siklofosamid dan sisplatin sebagai kontrol positif. Namun blanko positif yang digunakan untuk pengolahan data hasil uji pada penelitian ini sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya

menggunakan blanko positif sisplatin (23, 32). Sisplatin juga diketahui dapat digunakan dalam pengobatan kanker payudara (33).

Penambahan larutan uji, kontrol positif sisplatin dan blanko DMSO ke dalam pelat kultur 96 sumuran dilakukan setelah sel telah dipindahkan ke dalam pelat tersebut 24 jam sebelumnya. Hal ini dikarenakan sel harus berada pada fase log pertumbuhannya dan telah melekat sempurna pada dasar pelat kultur ketika hendak diuji. Selanjutnya sel kembali diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator sel.

Pada akhir periode inkubasi, sel diamati dengan mikroskop untuk mengetahui kematian sel yang terjadi. Pada kontrol negatif, sel terlihat hidup dan masih melekat pada dasar pelat (Gambar 8 dan 9). Sementara untuk kontrol positif dan sampel, sel terlihat berkurang dan mengalami kematian sesuai dengan konsentrasi sampel dan kontrol positif (Gambar 10, 11, 12, 13 dan 14). Kematian sel tersebut ditandai dengan perubahan warna sel dan sebagian besar sel telah hilang dari dasar pelat.

Pelat kemudian diwarnai dengan merah netral yang akan berpenetrasi ke dalam sel yang masih hidup dan terakumulasi di dalam lisosom. Sementara sel yang mati akan tercuci oleh PBS setelahnya, karena sel yang mati akan kehilangan daya lekat terhadap pelat atau substrat. Sel kemudian dilisis dengan natrium dodesil sulfat dan serapan merah netral diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 492 nm dengan panjang gelombang *referens* 630 nm. Serapan akan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup.

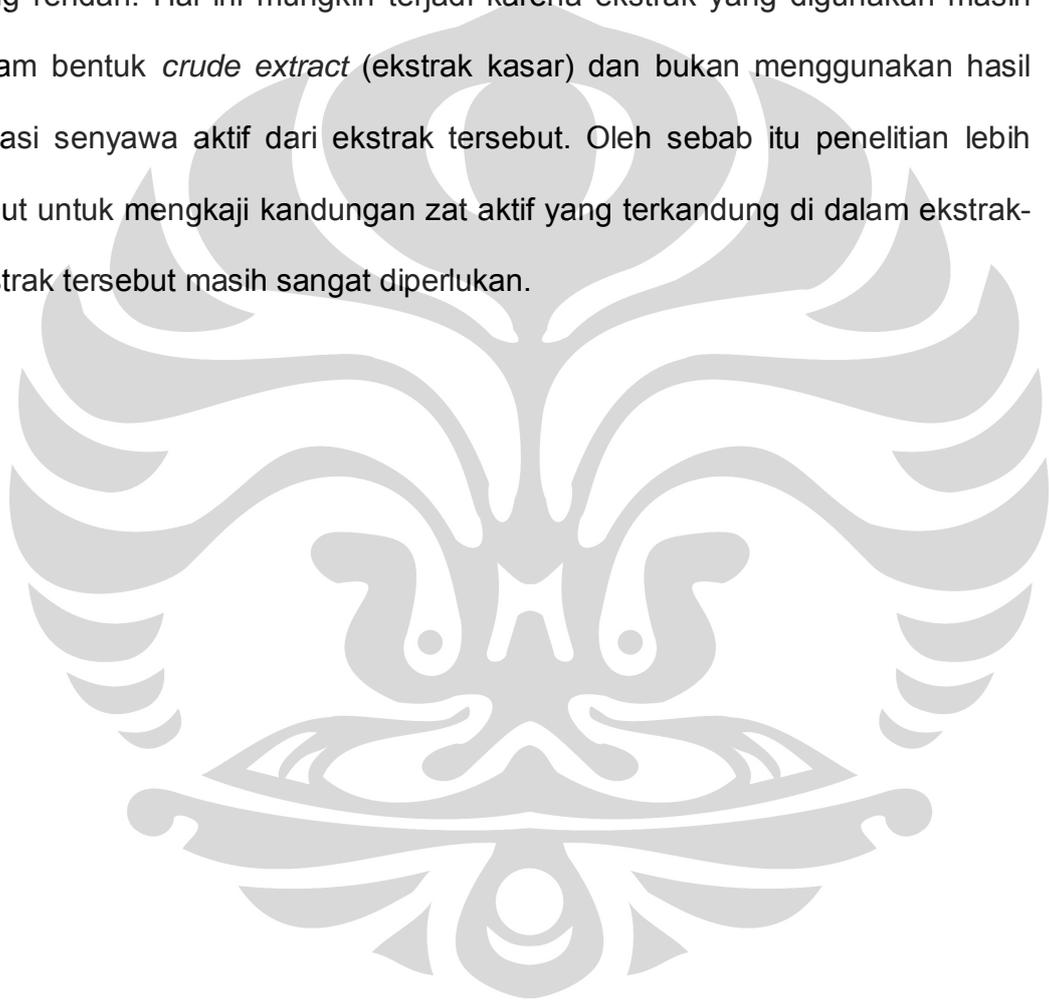
Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji ekstrak etil asetat isolat AF, DP, dan BP (Gambar 15, 16 dan 18) serta kontrol positif sisplatin (Gambar 19) dengan persentase kematian sel setelah inkubasi 24 jam menunjukkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi larutan sampel yang diberikan sebanding dengan kematian sel. Akan tetapi terdapat penyimpangan untuk larutan uji isolat BF (Gambar 17) dimana persentase kematian sel pada konsentrasi 250 $\mu\text{g/ml}$ jauh lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi 100, 150 dan 200 $\mu\text{g/ml}$. Penyimpangan tersebut terjadi, mungkin disebabkan oleh kurang homogenya pencampuran larutan sampel dengan suspensi sel, jumlah sel yang terdapat dalam tiap sumuran tidak sama dan menempelnya larutan sampel pada dinding sumuran akibat larutan sampel yang terlalu pekat sehingga tidak terjadi kontak dengan sel.

Nilai LC_{50} yang diperoleh dengan analisis regresi linier merupakan nilai yang menunjukkan sifat sitotoksik bahan uji baik sampel maupun blanko positif. Pada percobaan diperoleh larutan uji ekstrak etil asetat sampel AF, DP, BF dan BP serta kontrol positif sisplatin, berturut-turut memiliki nilai LC_{50} sebesar 244,01; 233,39; 732,77; 295,57 dan 12,72 $\mu\text{g/ml}$. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa larutan kontrol positif sisplatin bersifat lebih toksik terhadap sel MCF-7 dibandingkan dengan larutan sampel isolat AF, DP, BF dan BP.

Ekstrak etil asetat dari keempat isolat kapang endofit memiliki nilai LC_{50} yang lebih besar dari 20 $\mu\text{g/ml}$. Oleh karena itu sesuai dengan Geran

(34), maka keempat ekstrak etil asetat tersebut dinyatakan memiliki efek sitotoksik yang rendah.

Nilai LC_{50} yang cukup besar dari keempat isolat tersebut, mengindikasikan bahwa keempat ekstrak tersebut memiliki efek sitotoksik yang rendah. Hal ini mungkin terjadi karena ekstrak yang digunakan masih dalam bentuk *crude extract* (ekstrak kasar) dan bukan menggunakan hasil isolasi senyawa aktif dari ekstrak tersebut. Oleh sebab itu penelitian lebih lanjut untuk mengkaji kandungan zat aktif yang terkandung di dalam ekstrak-ekstrak tersebut masih sangat diperlukan.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Ekstrak etil asetat dari isolat kapang endofit AF (Akar *G. forbesii*), DP (Daun *G. porrecta*), BF (Batang *G. forbesii*) dan BP (Batang *G. porrecta*) memiliki efek sitotoksik rendah terhadap sel MCF-7 karena keempatnya memiliki nilai LC_{50} lebih dari 20 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etil asetat DP bersifat lebih toksik terhadap sel MCF-7 dibandingkan dengan ketiga ekstrak etil asetat isolat lainnya.

B. SARAN

Sebaiknya penelitian terhadap zat aktif yang terkandung didalam hasil fermentasi tersebut dapat dilakukan lebih lanjut. Pengujian efek sitotoksik dan efek lainnya dari ekstrak hasil fermentasi isolat kapang endofit sebaiknya juga dilakukan terhadap jenis *cell lines* lainnya. Sehingga diharapkan nantinya akan mampu diperoleh khasiat yang nyata dari isolat tersebut.

DAFTAR ACUAN

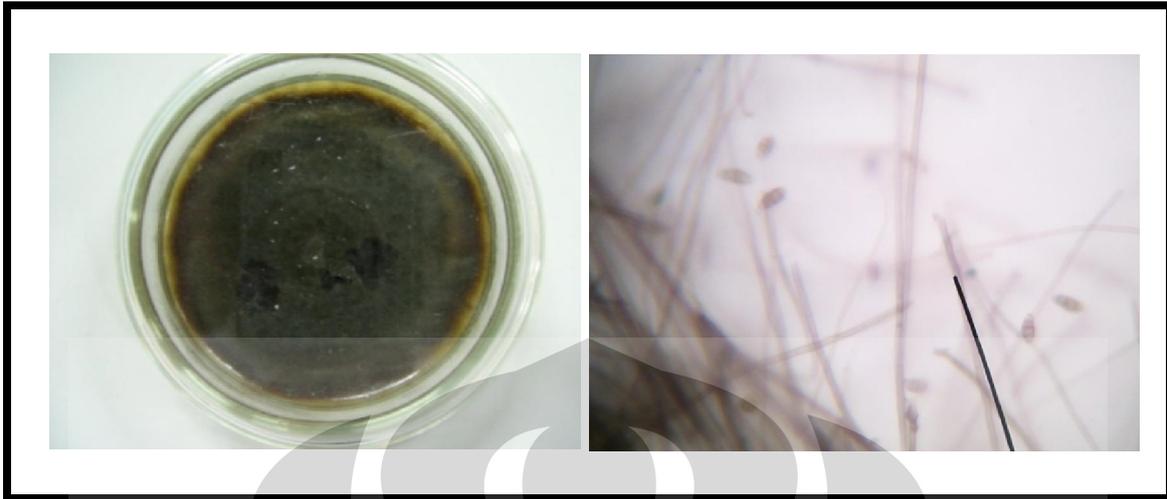
1. Tobias, Jeffrey. *Cancer, What Every Patient Needs to Know*. London: Bloomsbury Publishing, 1995:16 - 129
2. Souhami, Robert. *Cancer and Its Management*. 5th ed. Victoria: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd, 2005:216 - 233
3. Tjindarbumi. *Diagnosis dan Pencegahan Kanker Payudara, Kursus Singkat Deteksi Dini dan Pencegahan Kanker*. 6-8 November. FKCI-POI. Jakarta.1995.
4. Kintzios, SE, dan Maria G. Barberaki, ed. *Plants That Fight Cancer*. New York : CRC Press, 2004:1 - 53
5. Radji, M. Peranan Bioteknologi & Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II No. 3, 2005:113 – 126
6. Owen, NL, and Nicholas Hundley. *Endophytes – The Chemical Synthesizers Inside Plants*. *Science Progress*.
7. Taqwim, SF. Uji Toksisitas dan Uji Antibakteri Metabolit Sekunder Kapang Endofit *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall. Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok, 2007.
8. Farida, Yuyun. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Hasil Fermentasi Kapang Endofit dari *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall. Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok, 2008.
9. Kubicek, CP, Karl Esser dan Irina SD. ed. *The Mycota: Environmental and Microbial Relationship*. Vol.4. 2nd ed. Springer. 2007: 215-221
10. University of Sydney. *Endophyte*. University of Sydney. 2004. http://bugs.bio.usyd.edu.au/Mycology/Plant_Interactions/Endophytes/inGeneral.shtml. [cited: 18 Jan. 2009]
11. Morris, KN. *A Good Infection*. http://grounds-mag.com/mag/grounds-maintenance_good_infection. [cited: 23 Jan. 2009. pk. 07.30]
12. Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N dan Herre EA. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree.

- Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):15649-54. Epub 2003 Dec 11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14671327>. [cited: 27 Juni 2009 pk. 22.00]
13. Clay, Keith, Jenny Holah dan Jennifer AR. Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 August 30; 102(35): 12465–12470. http://books.google.com.sg/books?id=gpzZ-PoWRfkC&pg=PA221&lpg=PA220&dq=endophyte&as_brr=3. [cited: 27 Juni 2009 pk. 22.40]
 14. Steenis, CGGJV. Flora. Jakarta: PT Pradnya Paramita, 1978.
 15. Ogden, Joy. Understanding Breast Cancer. West Sussex: John Willey & Sons Ltd, 2004.
 16. Ruddon, R. W. Cancer Biology. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007
 17. Smith, Jane., and David J. Leaper. Breast Lumps: Guide to Diseases of The Breast. London: Hodder and Stoughton educational, 1994.
 18. Longe, JL. ed. The Gale Encyclopedia of Cancer: A Guide to Cancer and Its Treatments. 2nd ed. China: Thomson Gale, 2005.
 19. Fletcher, SW. Pasien information: Breast cancer screening. UpToDate, Inc., Oktober 2008. <http://www.uptodate.com/patients/content/topic.do?topicKey=~DCaa.M5ZjsZk>, [cited: 11 Jan 2009]
 20. Turksten, Kursad. Embryonic Stem Cell Protocols. Humana Press. 2006: 385-388
 21. Brown, Roger, Uta Böger-Brown. Cytotoxic drug resistance mechanisms. Humana Press. 1999: 25
 22. Landis, WG, Jane SH, Joseph WG dan Michael AL. Environmental Toxicology and Risk Assessment. Atlanta: ASTM International. 1993: 215-216
 23. Syafhan, NF. Uji Sitotoksitas Sediaan Jadi Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl.) terhadap Sel MCF-7 (Sel Kanker Payudara) secara *in vitro*. Skripsi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok, 2005.

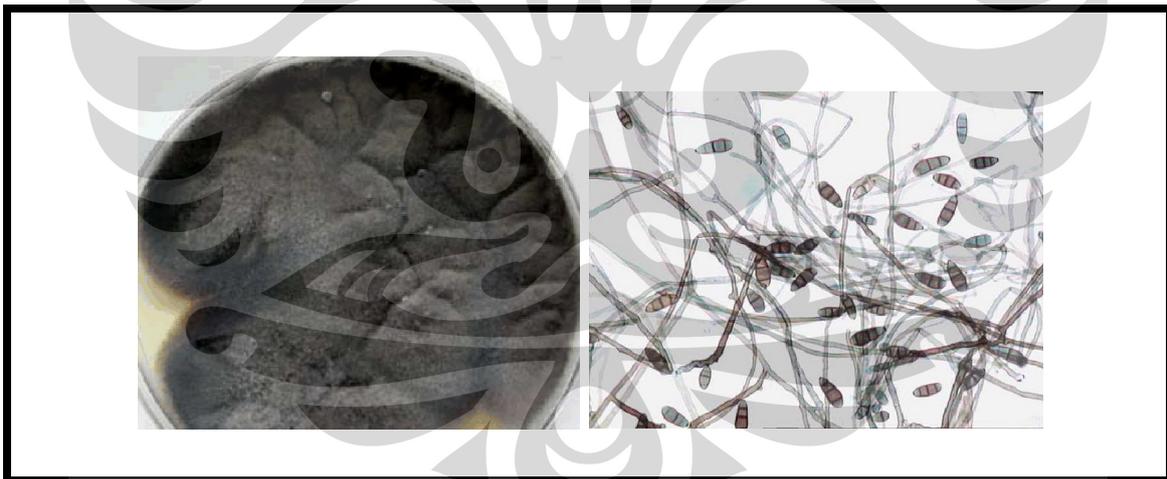
24. Siregar, Fazwishni and Siti M. S. Akbar. Cytotoxicity of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) latex on fibroblast by MTT assay. *Medical journal of indonesia*, Vol.9, No.4, Oktober - Desember 2000.
25. Nugoli, Melanie, *et. al.* Genetic Variability in MCF-7 Sublines: Evidence of Rapid Genomic and RNA Expression Profile Modifications. BioMed Central Ltd (2003). <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/3/13>. [cited: 23 Jan. 2009. pk. 08.00]
26. Harahap, Y, Wan Lelly H, Rizka Fahmia. Cytotoxicity Test of Curcuma mangga (*curcuma mangga*, vahl and Van Zyp) in Traditional Medicine to Human Breast Cancer Cell (MCF-7 Cell) in Vitro, Proceeding The International Symposium on Recent Progress in Curcumin Research, Univ Gajah Mada, 4-5 September 2006.
27. Houp, RC. Cell culture. *Journal of Validation Technology*. 2008. <http://proquest.umi.com/pqdweb>. [cited: 30 Jan 2009. pk. 17.04]
28. Freshney, RI. ed. Culture of Human Stem Cell. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2007, 2-3.
29. Grossmann, ME, *et al.* Effects of Adiponectin on Breast Cancer Cell Growth and Signaling. *British Journal of Cancer*. 2008.
30. Harahap, Y, Reksodiputro A., Wan Lelly H., Mirna K. Uji Sitotoksitas In Vitro Sediaan Jadi Biological Response Modifier terhadap Sel Ca Ski (Sel Kanker Serviks), Kongres ISFI, Bali 17-18 Juni 2005.
31. Freshney, RI. Culture of animal Cells: A Manual of Basic Technique. New York: Wiley-Liss, 1994: 57-84, 260-270.
32. Syarmalina, Audhia DBS dan Wan LH. Uji Sitotoksik Supernatan Hasil Fermentasi Kapang Endofit Buah Mahkota Dewa (*phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) terhadap Sel Kanker Payudara. *Profarma*. Vol.1. 2007
33. Thackery, Ellen. The Gale Encyclopedia of Cancer: A-K. Michigan: Gale Group, 2002: 820-823.
34. Yacob HB. Aktiviti sitotoksik ekstrak *Mamordica charantia* ke Atas Sel CaSki. Kuala Lumpur: University Malaya, 2002: 49 (Lihat Geran: 1972)



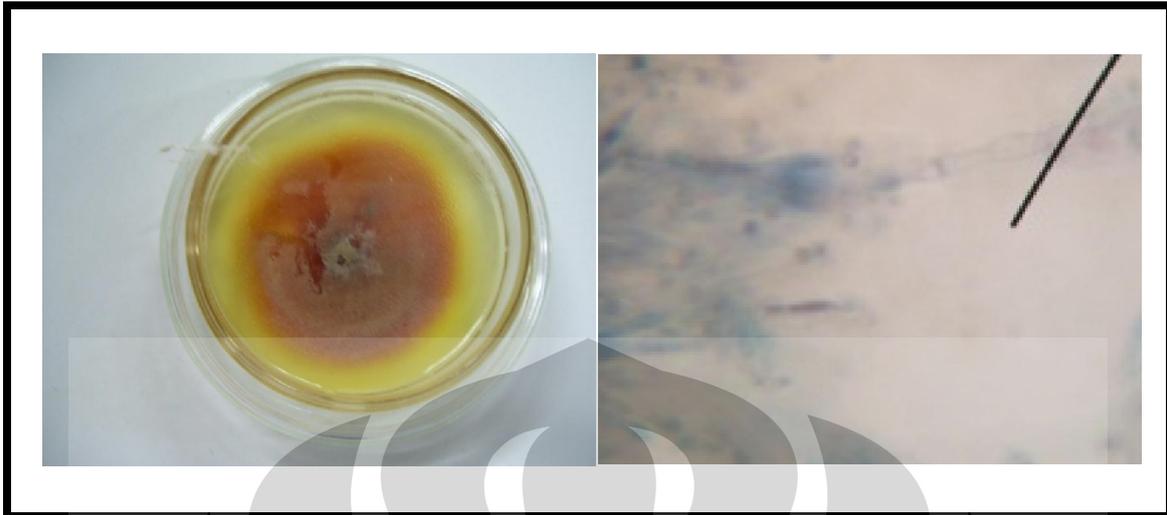
GAMBAR



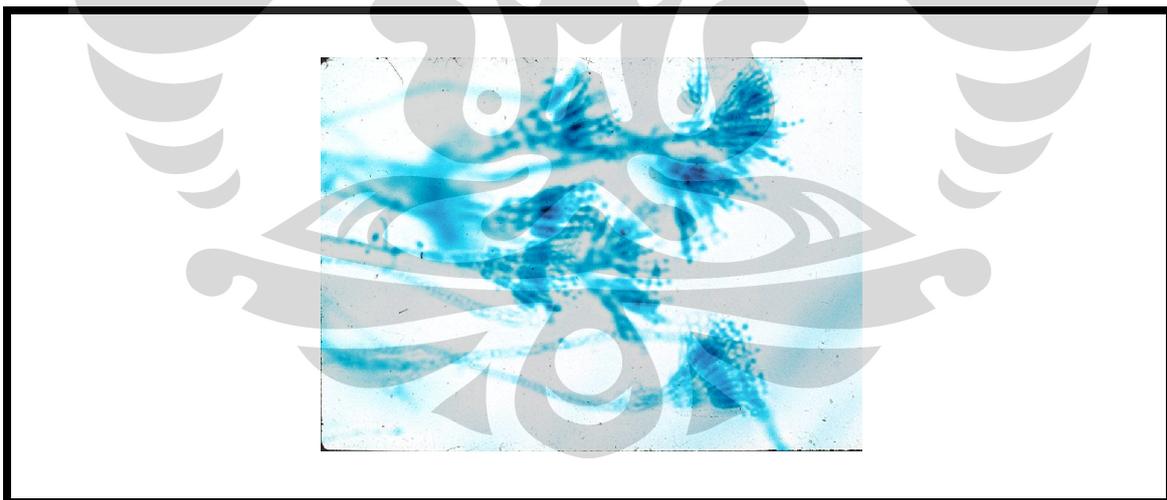
Gambar 1. Kapang endofit isolat AF dari akar *G. forbesii* secara makroskopis dan mikroskopis (perbesaran 1000x)



Gambar 2. *Curvularia lunata* secara makroskopis dan mikroskopis (Sumber gambar: www.mycology.adelaide.edu.au dan <http://micol.fcien.edu.uy/atlas/Deuteromycetes.htm>)



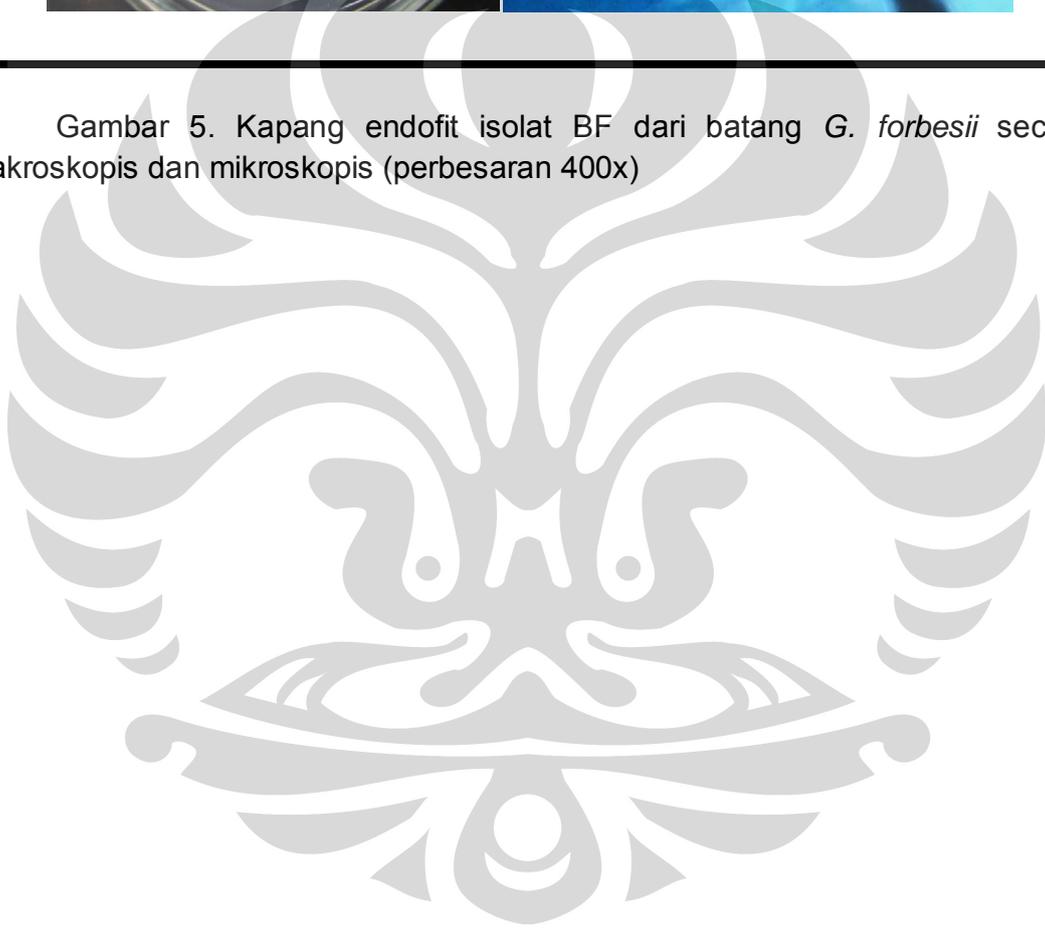
Gambar 3. Kapang endofit isolat DP dari daun *G. porrecta* secara makroskopis dan mikroskopis (perbesaran 1000x)

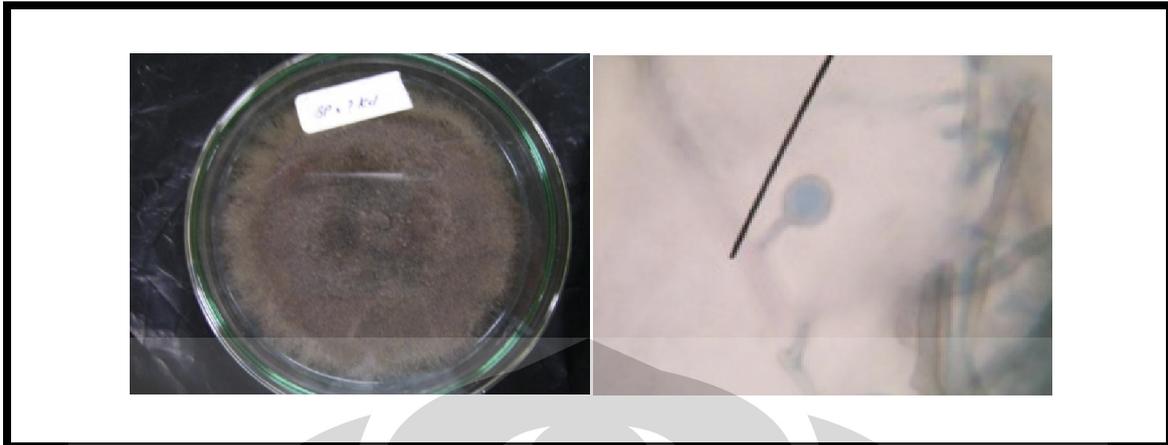


Gambar 4. *Penicillium* sp. secara mikroskopis (Sumber gambar: http://botit.botany.wisc.edu/images/332/Deuteromycetes/Penicillium_D_pa_sw_s_o_sl/Penicillium_conrdiophores_tjv.html)

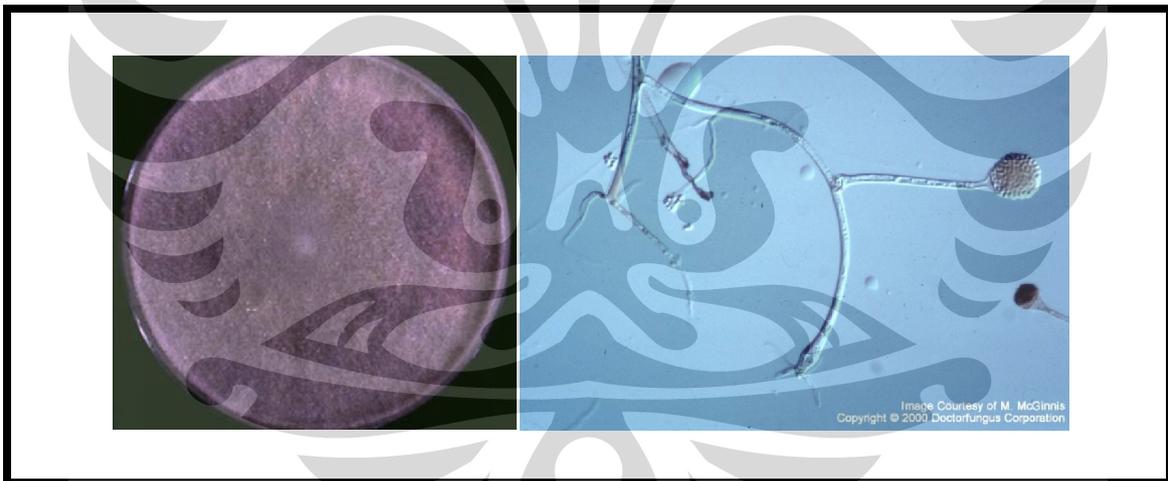


Gambar 5. Kapang endofit isolat BF dari batang *G. forbesii* secara makroskopis dan mikroskopis (perbesaran 400x)

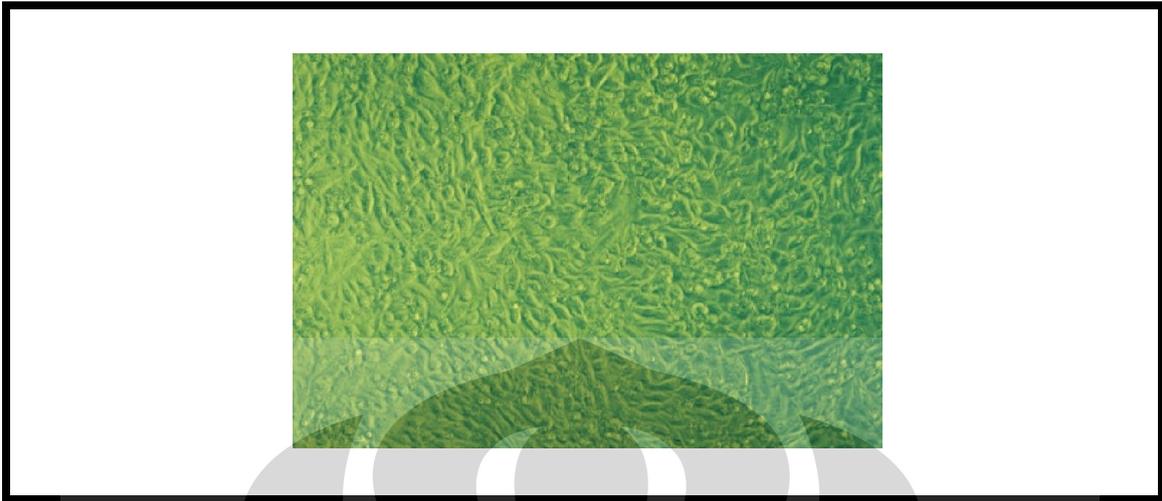




Gambar 6. Kapang endofit isolat BP dari batang *G. porrecta* secara makroskopis dan mikroskopis (perbesaran 1000x)



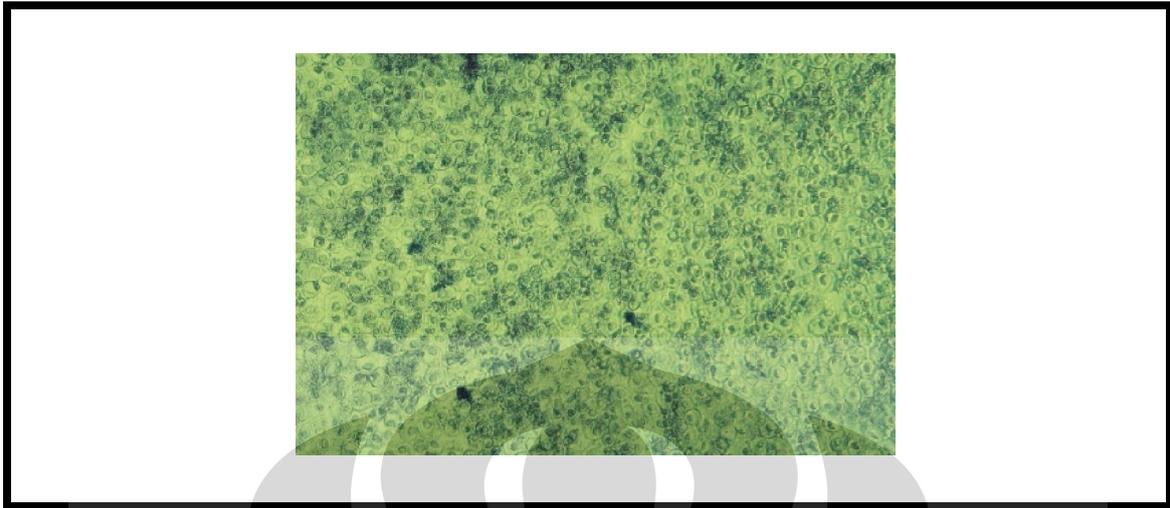
Gambar 7. *Rhizomucor pusillus* secara makroskopis dan mikroskopis (Sumber gambar: <http://www.gefor.4t.com/hongos/rhizomucorpusillus.html>)



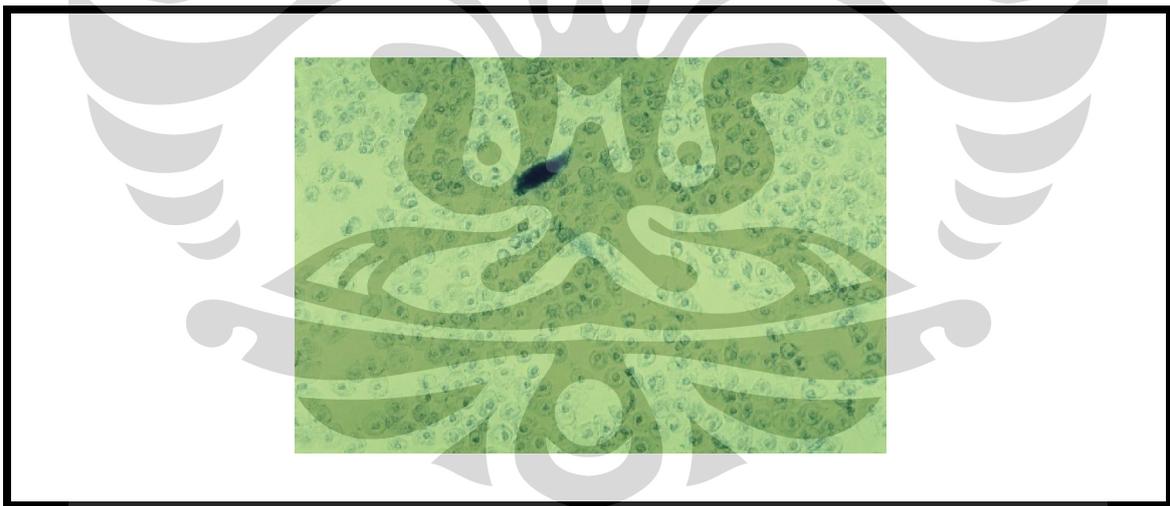
Gambar 8. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 tanpa perlakuan (Blanko negatif)



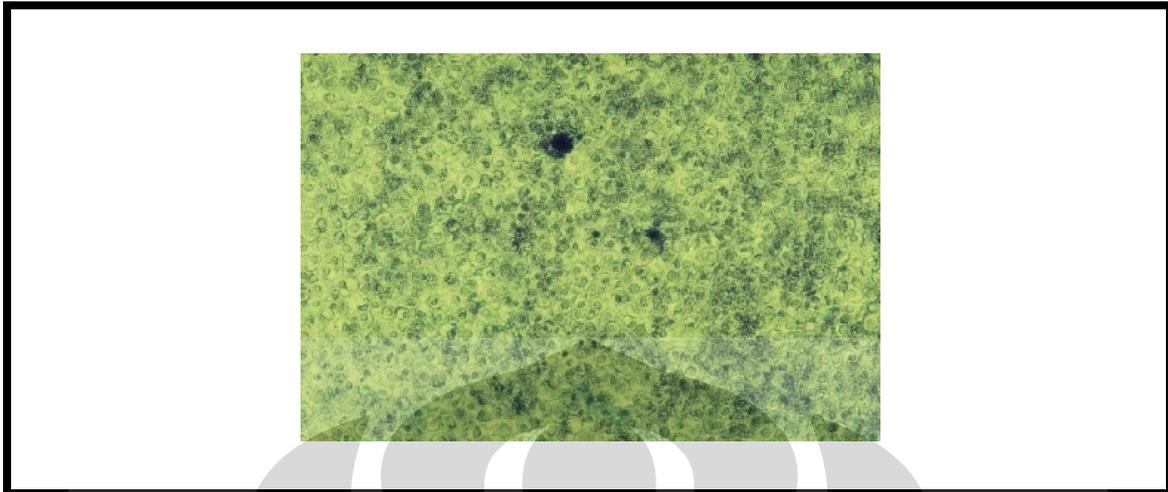
Gambar 9. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan DMSO 2%



Gambar 10. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan ekstrak etil asetat isolat AF (Akar *G. forbesii*) konsentrasi 200 ppm.



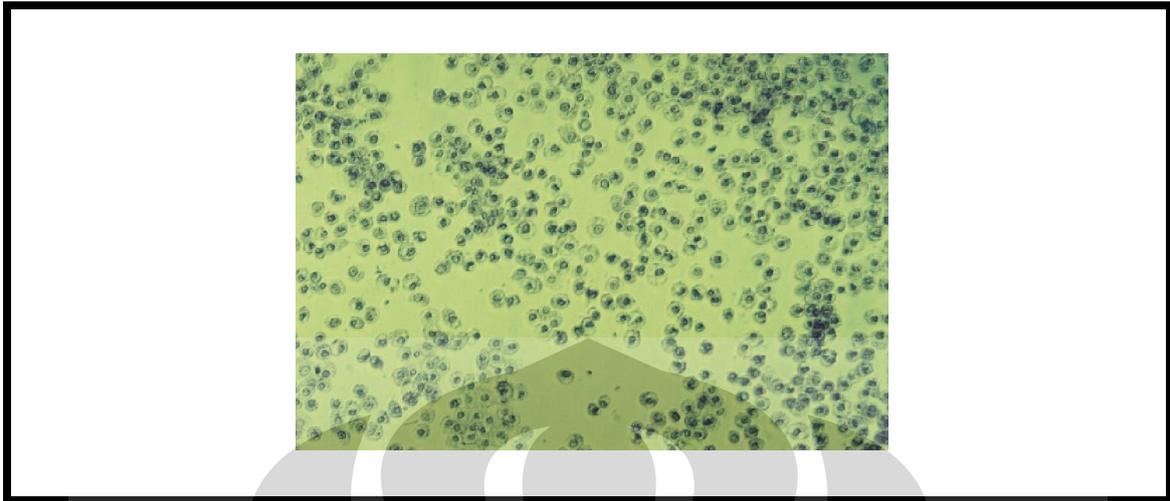
Gambar 11. Gambar mikroskopis dari sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan ekstrak etil asetat isolat DP (Daun *G. porrecta*) konsentrasi 200 ppm



Gambar 12. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan ekstrak etil asetat isolat BF (Batang *G. forbesii*) konsentrasi 200 ppm

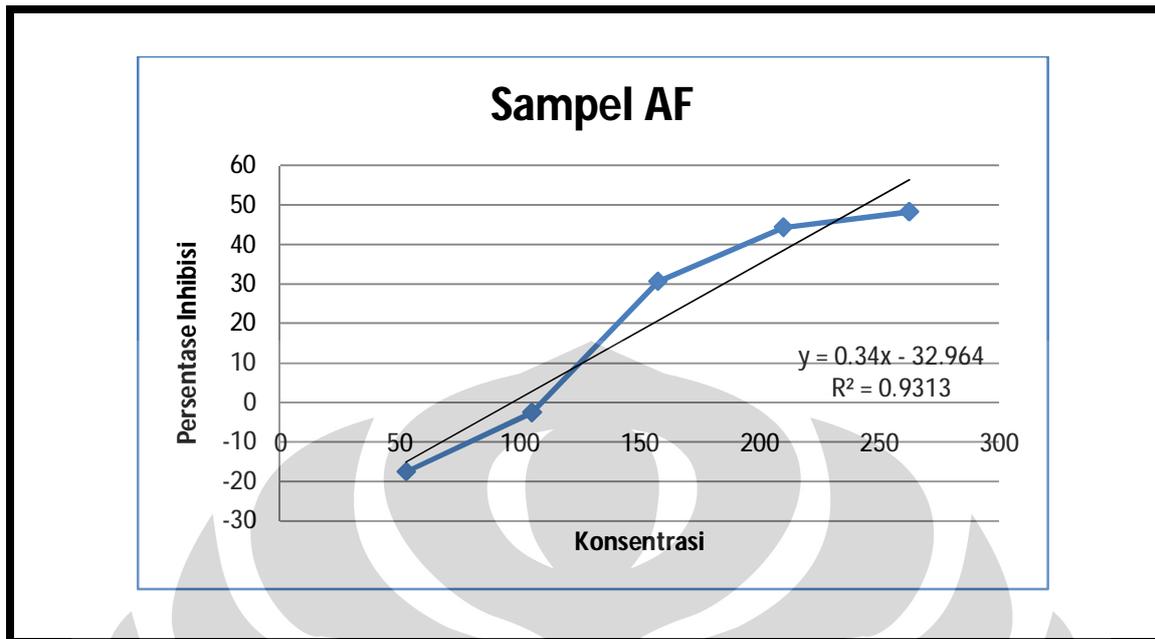


Gambar 13. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan ekstrak etil asetat isolat BP (Batang *G. porrecta*) konsentrasi 200 ppm

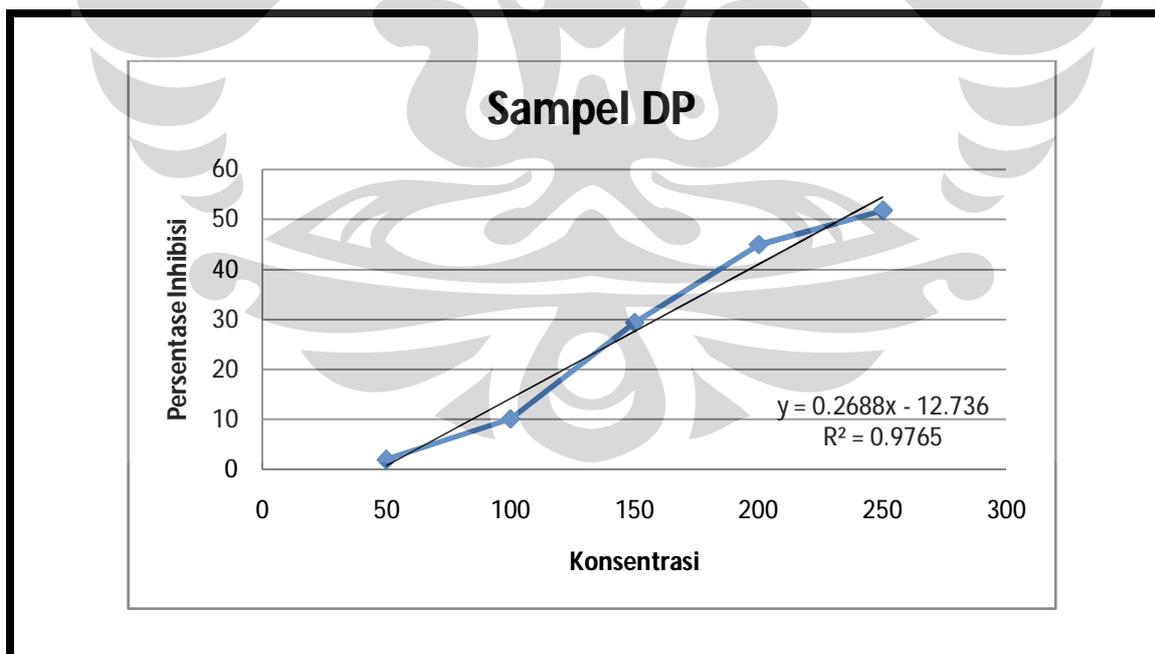


Gambar 14. Gambar mikroskopis sel kanker payudara MCF-7 setelah diuji dengan sisplatin (Blanko positif) konsentrasi 100 ppm

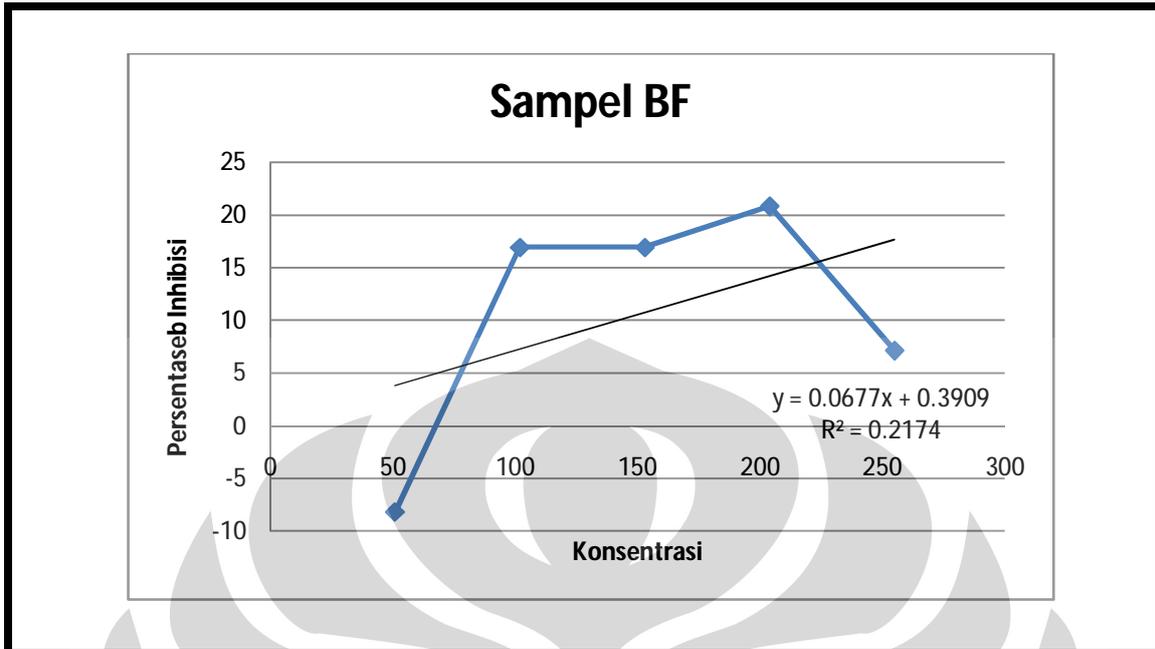




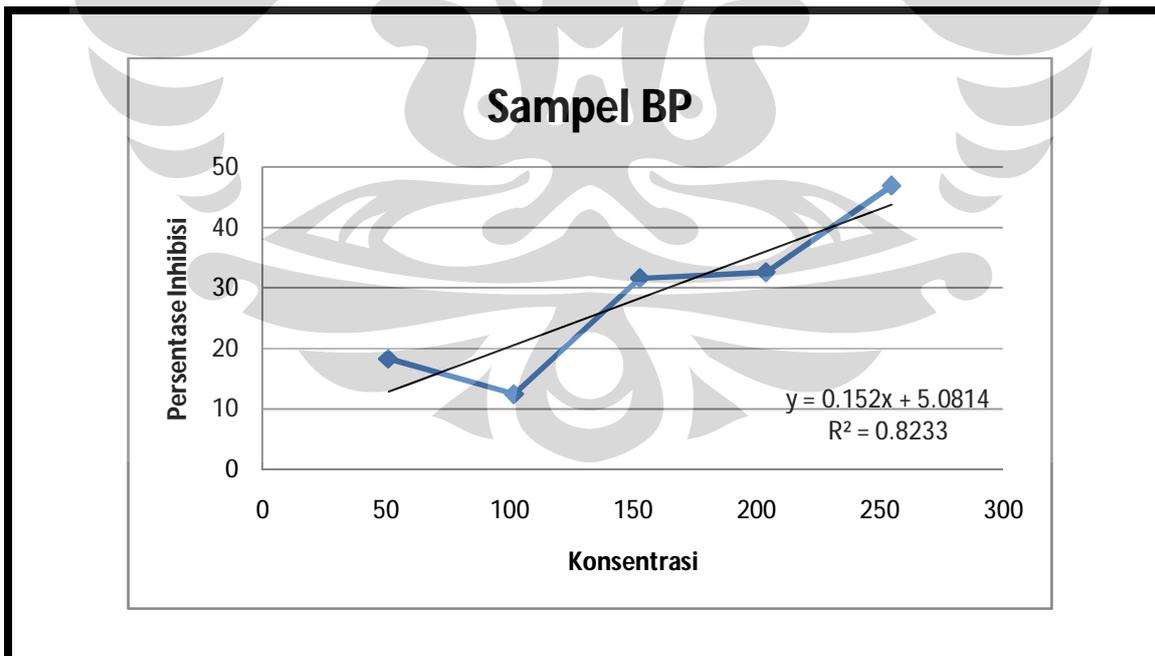
Gambar 15. Kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji isolat AF (Akar *G. forbesii*) dengan persentase kematian sel MCF-7



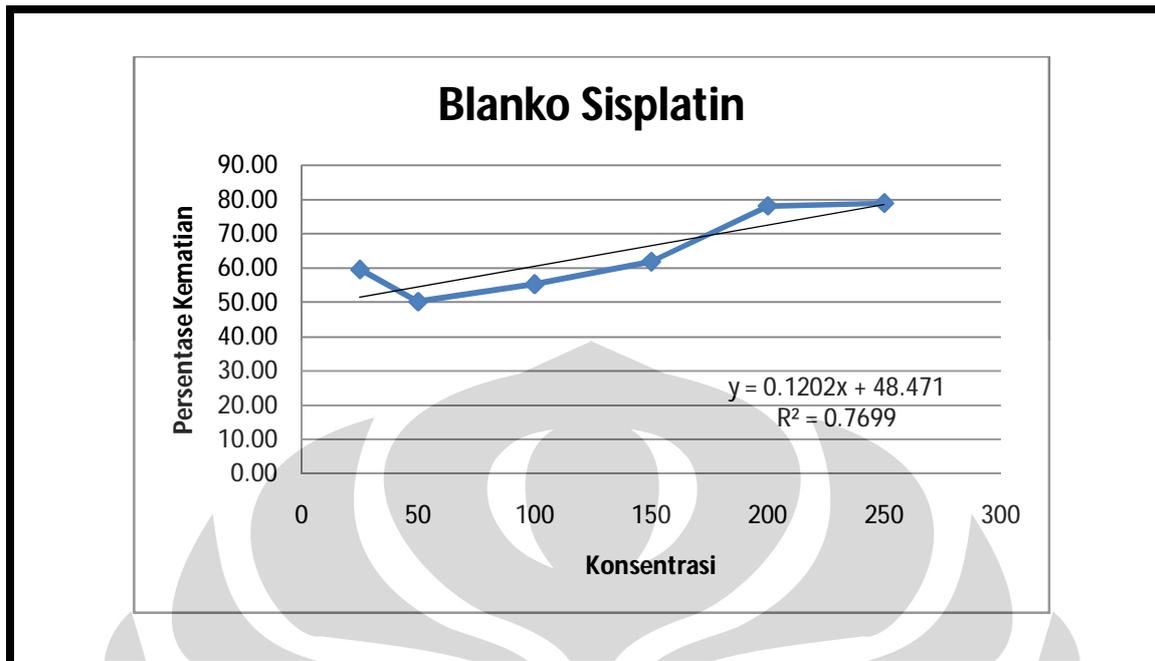
Gambar 16. Kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji isolat DP (Daun *G. porrecta*) dengan persentase kematian sel MCF-7



Gambar 17. Kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji isolat BF (Batang *G. forbesii*) dengan persentase kematian sel MCF-7



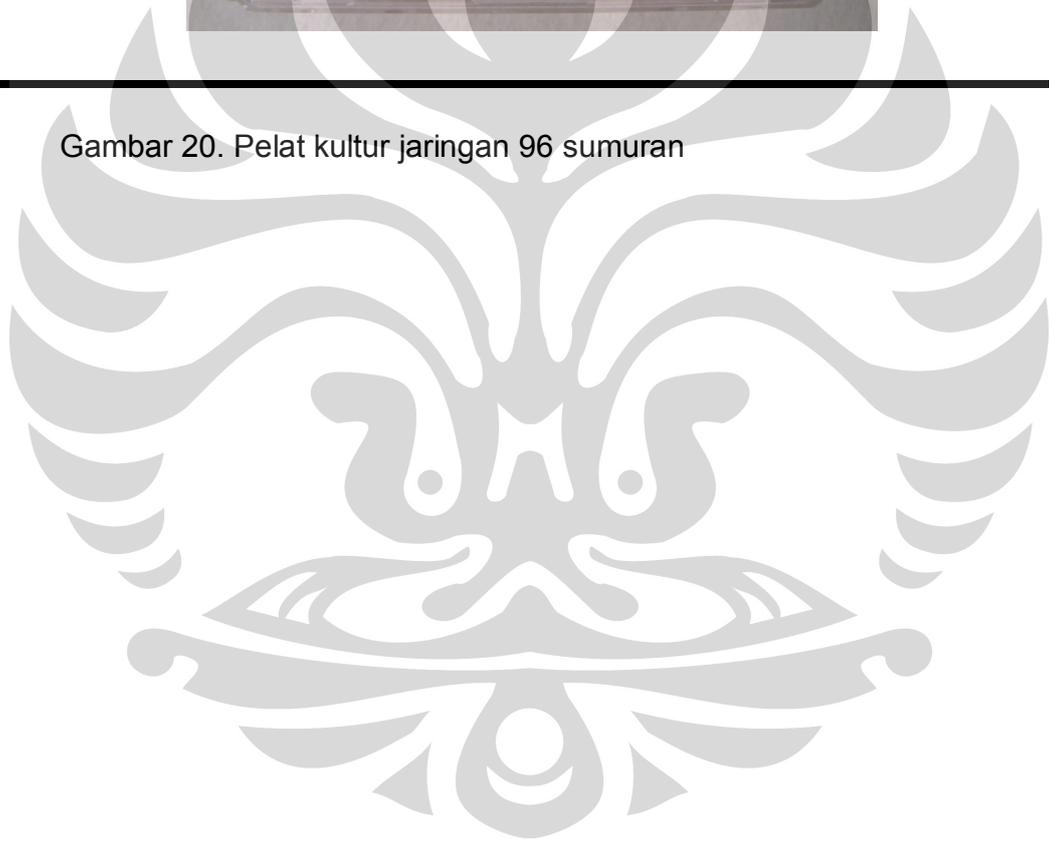
Gambar 18. Kurva hubungan antara konsentrasi larutan uji isolat BP (Batang *G. porrecta*) dengan persentase kematian sel MCF-7



Gambar 19. Kurva hubungan antara konsentrasi larutan blanko positif sisplatin dengan persentase kematian sel MCF-7



Gambar 20. Pelat kultur jaringan 96 sumuran





Tabel 1
Isolat Kapang Endofit

No.	Kode Isolat	Tanaman Asal	Bagian Tanaman
1.	AF	<i>G. forbesii</i>	Akar
2.	DP	<i>G. porrecta</i>	Daun
3.	BF	<i>G. forbesii</i>	Batang
4.	BP	<i>G. porrecta</i>	Batang

Tabel 2
Konsentrasi Akhir Larutan Uji Isolat AF (Akar *G. forbesii*) dalam Pelat 96
Sumuran

No	Konsentrasi larutan uji (i g/i l)	Volume larutan uji (il)	Volume suspensi sel (i l)	Konsentrasi akhir (i g/ml)
1	0,105	100	100	52,5
2	0,210	100	100	105,0
3	0,315	100	100	157,5
4	0,420	100	100	210,0
5	0,525	100	100	262,5

Tabel 3

Konsentrasi Akhir Larutan Uji Isolat DP (Daun *G. porrecta*) dalam Pelat 96 Sumuran

No	Konsentrasi larutan uji (i g/i l)	Volume larutan uji (i l)	Volume suspensi sel (i l)	Konsentrasi akhir (ig /ml)
1	0,100	100	100	50,1
2	0,200	100	100	100,1
3	0,300	100	100	150,2
4	0,400	100	100	200,2
5	0,501	100	100	250,3

Tabel 4

Konsentrasi Akhir Larutan Uji Isolat BF (Batang *G. forbesii*) dalam Pelat 96 Sumuran

No	Konsentrasi larutan uji (i g/i l)	Volume larutan uji (i l)	Volume suspensi sel (i l)	Konsentrasi akhir (ig /ml)
1	0,102	100	100	51,0
2	0,204	100	100	102,0
3	0,306	100	100	153,0
4	0,408	100	100	204,0
5	0,510	100	100	255,0

Tabel 5

Konsentrasi Akhir Larutan Uji Isolat BP (Batang *G. porrecta*) dalam Pelat 96 Sumuran

No	Konsentrasi larutan uji (i g/i l)	Volume larutan uji (il)	Volume suspensi sel (i l)	Konsentrasi akhir (i g/ml)
1	0,102	100	100	51,0
2	0,204	100	100	102,0
3	0,306	100	100	153,0
4	0,408	100	100	204,0
5	0,510	100	100	255,0

Tabel 6

Konsentrasi Akhir Larutan Sisplatin (Blanko Positif) dalam Pelat 96 Sumuran

No	Konsentrasi larutan uji (i g/i l)	Volume larutan uji (il)	Volume suspensi sel (i l)	Konsentrasi akhir (i g/ml)
1	0,050	100	100	25,0
2	0,100	100	100	50,0
3	0,200	100	100	100,0
4	0,300	100	100	150,0
5	0,400	100	100	200,0
6	0,500	100	100	250,0

Tabel 7

Serapan Merah Netral Larutan Uji Isolat AF (Akar *G. forbesii*) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi	Pembacaan			Rata-rata
	I	II	III	
50 ppm	0,262	0,273	0,311	0,282
	0,367	0,365	0,424	0,385
	0,421	0,398	0,426	0,415
100 ppm	0,270	0,307	0,300	0,292
	0,302	0,307	0,328	0,312
	0,336	0,327	0,357	0,340
150 ppm	0,187	0,188	0,189	0,188
	0,212	0,200	0,193	0,202
	0,275	0,237	0,234	0,249
200 ppm	0,164	0,168	0,156	0,163
	0,192	0,187	0,174	0,184
	0,171	0,163	0,162	0,165
250 ppm	0,167	0,151	0,162	0,160
	0,173	0,161	0,176	0,170
	0,143	0,153	0,144	0,147

Tabel 8

Serapan Merah Netral Larutan Uji Isolat DP (Daun *G. porrecta*) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi	Pembacaan			Rata-rata
	I	II	III	
50 ppm	0,347	0,303	0,318	0,323
	0,252	0,246	0,267	0,255
	0,324	0,322	0,327	0,324
100 ppm	0,335	0,280	0,325	0,313
	0,198	0,190	0,207	0,198
	0,303	0,315	0,331	0,316
150 ppm	0,245	0,238	0,236	0,240
	0,206	0,207	0,216	0,210
	0,211	0,194	0,204	0,203
200 ppm	0,135	0,139	0,120	0,131
	0,144	0,147	0,148	0,146
	0,221	0,231	0,232	0,228
250 ppm	0,135	0,127	0,162	0,141
	0,156	0,151	0,176	0,161
	0,140	0,137	0,144	0,140

Tabel 9

Serapan Merah Netral Larutan Uji Isolat BF (*Batang G. forbesii*) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi	Pembacaan			Rata-rata
	I	II	III	
50 ppm	0,349	0,398	0,391	0,379
	0,279	0,284	0,277	0,280
	0,350	0,313	0,351	0,338
100 ppm	0,301	0,251	0,284	0,279
	0,242	0,240	0,244	0,242
	0,242	0,251	0,241	0,245
150 ppm	0,250	0,309	0,287	0,282
	0,279	0,271	0,242	0,264
	0,208	0,227	0,218	0,218
200 ppm	0,224	0,224	0,166	0,205
	0,259	0,275	0,268	0,267
	0,236	0,270	0,261	0,256
250 ppm	0,225	0,281	0,279	0,262
	0,348	0,307	0,325	0,327
	0,251	0,261	0,288	0,267

Tabel 10

Serapan Merah Netral Larutan Uji Isolat BP (Batang *G. porrecta*) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi	Pembacaan			Rata-rata
	I	II	III	
50 ppm	0,197	0,164	0,157	0,173
	0,287	0,304	0,270	0,287
	0,304	0,291	0,286	0,294
100 ppm	0,235	0,270	0,220	0,242
	0,276	0,289	0,267	0,277
	0,290	0,287	0,285	0,287
150 ppm	0,219	0,194	0,190	0,201
	0,199	0,217	0,213	0,210
	0,221	0,249	0,191	0,220
200 ppm	0,166	0,181	0,178	0,175
	0,227	0,247	0,241	0,238
	0,228	0,218	0,179	0,208
250 ppm	0,157	0,160	0,157	0,158
	0,190	0,184	0,184	0,186
	0,140	0,150	0,143	0,144

Tabel 11

Serapan Merah Netral Larutan Sisplatin (Kontrol Positif) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi	Pembacaan			Rata-rata
	I	II	III	
25 ppm	0,078	0,09	0,083	0,084
	0,110	0,122	0,111	0,114
	0,102	0,117	0,105	0,108
	0,097	0,110	0,100	0,102
50 ppm	0,167	0,195	0,18	0,181
	0,102	0,105	0,077	0,095
	0,095	0,106	0,105	0,102
	0,121	0,135	0,121	0,126
100 ppm	0,095	0,09	0,097	0,094
	0,136	0,127	0,137	0,133
	0,107	0,118	0,108	0,111
	0,113	0,112	0,114	0,113
150 ppm	0,099	0,137	0,129	0,122
	0,085	0,089	0,095	0,090
	0,076	0,08	0,076	0,077
	0,087	0,102	0,100	0,096

Tabel 11 (Lanjutan)

Serapan Merah Netral Larutan Sisplatin (Kontrol Positif) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi	Pembacaan			Rata-rata
	I	II	III	
200 ppm	0,053	0,058	0,058	0,056
	0,045	0,051	0,048	0,048
	0,058	0,061	0,065	0,061
	0,052	0,057	0,057	0,055
250 ppm	0,053	0,06	0,057	0,057
	0,041	0,043	0,042	0,042
	0,057	0,064	0,061	0,061
	0,050	0,056	0,053	0,053

Tabel 12

Serapan Merah Netral Larutan Kontrol Negatif dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm Setelah Inkubasi 24 Jam

Perlakuan	Pembacaan			Rata-rata
	I	II	III	
DMSO 2%	0,365	0,366	0,371	0,367
	0,332	0,328	0,350	0,337
	0,246	0,250	0,250	0,249
	0,288	0,277	0,260	0,275
Kontrol Sel	0,581	0,567	0,556	0,568
	0,405	0,396	0,392	0,398
	0,323	0,297	0,337	0,319
	0,337	0,387	0,309	0,344
	0,174	0,168	0,153	0,165

Tabel 13

Persentase Kematian Sel MCF-7 terhadap Larutan Uji Ekstrak Etil Asetat Isolat AF (Akar *G. forbesii*) Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (g/ml)	Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
52,5	12,31	-19,83	-29,05	-12,19
105	9,09	2,87	-5,73	2,08
157,5	41,54	37,29	22,67	33,83
210	49,42	42,68	48,59	46,89
262,5	50,25	47,14	54,39	50,59

Tabel 14

Persentase Kematian Sel MCF-7 terhadap Larutan Uji Ekstrak Etil Asetat Isolat DP (Daun *G. porrecta*) Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (g/ml)	Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50,05	-0,34	20,70	-0,86	6,50
100,1	2,56	38,33	1,63	14,17
150,15	25,47	34,80	36,87	32,38
200,2	59,16	54,50	29,10	47,58
250,25	56,05	49,93	56,36	54,12

Tabel 15

Persentase Kematian Sel MCF-7 terhadap Larutan Uji Ekstrak Etil Asetat Isolat BF (Batang *G. forbesii*) Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
51	-17,96	12,93	-5,11	-3,38
102	13,34	24,75	23,92	20,67
153	12,31	17,90	32,31	20,84
204	36,36	16,87	20,50	24,57
255	18,63	-1,58	17,08	11,37

Tabel 16

Persentase Kematian Sel MCF-7 terhadap Larutan Uji Ekstrak Etil Asetat Isolat BP (Batang *G. porrecta*) Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
51	46,31	10,75	8,68	21,91
102	24,85	13,76	10,65	16,42
153	37,50	34,80	31,48	34,59
204	45,58	25,89	35,22	35,56
255	50,87	42,16	55,12	49,38

Tabel 17

Persentase Kematian Sel MCF-7 terhadap Larutan Sisplatin Setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
25	66,85	54,70	57,21	59,58
50	28,41	62,49	59,58	50,16
100	62,75	47,17	56,02	55,31
150	51,79	64,47	69,36	61,87
200	77,68	80,98	75,70	78,12
250	77,55	83,36	75,96	78,96

Tabel 18

Persamaan Garis yang Diperoleh Melalui Regresi Linier dan Digunakan Untuk Menghitung LC_{50} Setelah Inkubasi 24 Jam

Perlakuan	Persamaan Garis	R^2	r
Larutan uji sampel isolat AF	$y = 0,34x - 32,964$	0,931	0,965
Larutan uji sampel isolat DP	$y = 0,2688x - 12,736$	0,977	0,988
Larutan uji sampel isolat BF	$y = 0,0677x + 0,3909$	0,217	0,466
Larutan uji sampel isolat BP	$y = 0,152x + 5,0814$	0,823	0,907
Larutan sisplatin	$y = 0,1202x + 48,471$	0,770	0,877

Tabel 19

Nilai LC_{50} (ig /ml) Ekstrak Etil Asetat Sampel Isolat AF, DP, BF, BP dan Larutan Sisplatin Setelah Inkubasi 24 jam

Perlakuan	Nilai LC_{50}
Larutan uji sampel isolat AF	244,01
Larutan uji sampel isolat DP	233,39
Larutan uji sampel isolat BF	732,77
Larutan uji sampel isolat BP	295,57
Larutan sisplatin	12,72

Keterangan:

Isolat AF (Akar *G. forbesii*)

Isolat DP (Daun *G. forbesii*)

Isolat BF (Batang *G. forbesii*)

Isolat BP (Batang *G. porrecta*)



Lampiran 1

Perhitungan suspensi sel MCF-7 yang digunakan dalam pengujian

Pada perhitungan kepadatan sel dengan hemositometer, diperoleh:

- a. Jumlah rata-rata sel dalam keempat bidang besar = 35
- b. Faktor pengenceran = 10
- c. Volume satu bidang besar = 10^{-4}

Kepadatan sel = $35 \times 10 \times 1/10^{-4} = 3.500.000 \text{ sel/ml}$

Untuk mengisi 96 sumuran yang diperlukan untuk pengujian masing-masing dengan 100 μ l suspensi sel dengan kepadatan 200.000 sel/ml (20000 sel/sumuran), maka perlu dibuat suspensi sel dengan komposisi berikut:

$$3.500.000 \text{ sel/ml} \times 900 \text{ } \mu\text{l} = 200.000 \text{ sel/ml} \times V_2$$

$$V_2 = 15750 \text{ } \mu\text{l}$$

$$V_2 = 15,75 \text{ ml}$$

Maka medium RPMI 1640 dengan 10 % FCS yang dibutuhkan = 15,75 ml

Lampiran 2

Pemetaan pada pelat kultur jaringan 96 sumuran

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Perlakuan	Sumuran
Larutan uji sampel isolat AF (50 ppm)	A2, B2, C2
Larutan uji sampel isolat AF (100 ppm)	D2, E2, F2
Larutan uji sampel isolat AF (150 ppm)	A3, B3, C3
Larutan uji sampel isolat AF (200 ppm)	D3, E3, F3
Larutan uji sampel isolat AF (250 ppm)	G2, G3, G4
Larutan uji sampel isolat DP (50 ppm)	A4, B4, C4
Larutan uji sampel isolat DP (100 ppm)	D4, E4, F4
Larutan uji sampel isolat DP (150 ppm)	A5, B5, C5
Larutan uji sampel isolat DP (200 ppm)	D5, E5, F5
Larutan uji sampel isolat DP (250 ppm)	H2, H3, H4

Perlakuan	Sumuran
Larutan uji sampel isolat BF (50 ppm)	A6, B6, C6
Larutan uji sampel isolat BF (100 ppm)	D6, E6, F6
Larutan uji sampel isolat BF (150 ppm)	A7, B7, C7
Larutan uji sampel isolat BF (200 ppm)	D7, E7, F7
Larutan uji sampel isolat BF (250 ppm)	G5, G6, G7
Larutan uji sampel isolat BP (50 ppm)	A8, B8, C8
Larutan uji sampel isolat BP (100 ppm)	D8, E8, F8
Larutan uji sampel isolat BP (150 ppm)	A9, B9, C9
Larutan uji sampel isolat BP (200 ppm)	D9, E9, F9
Larutan uji sampel isolat BP (250 ppm)	H5, H6, H7
Larutan sisplatin (25 ppm)	A10, B10, C10
Larutan sisplatin (50 ppm)	D10, E10, F10
Larutan sisplatin (100 ppm)	A11, B11, C11
Larutan sisplatin (150 ppm)	D11, E11, F11
Larutan sisplatin (200 ppm)	A12, B12, C12
Larutan sisplatin (250 ppm)	D12, E12, F12
Larutan kontrol sel negatif	A1, B1, C1, D1
Larutan blanko DMSO 2 %	E1, F1, G1, H1

Lampiran 3

Spesifikasi Sel MCF-7

Cell Lines			
ATCC [®] Number:	HTB-22™	Price:	\$185.00
Designations:	MCF7 [MCF-7]	Depositors:	CM McGrath
Biosafety Level:	1	Shipped:	frozen
Medium & Serum:	<u>See Propagation</u>	Growth Properties:	adherent
Organism:	<i>Homo sapiens</i> (human)	Morphology:	epithelial
Source:	Organ: mammary gland; breast Cell type: epithelial Disease: adenocarcinoma Derived from metastatic site: pleural effusion		
Cellular Products:	insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) BP-2; BP-4; BP-5		
Permits/Forms:	In addition to the MTA mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits.		
Receptors:	estrogen receptor, positive, expressed		
Antigen Expression:	Blood Type O; Rh+		

Lampiran 3 (lanjutan)

Spesifikasi Sel MCF-7

Subculturing:	<p>Protocol: 1. Remove and discard culture medium. 2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor. 3. Add 2.0 to 3.0 ml of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes). Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal. 4. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting. 5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels. 6. Incubate cultures at 37°C. Subcultivation ratio: A subcultivation ratio of 1:3 to 1:6 is recommended Medium renewal: 2 to 3 times per week</p>
Doubling Time:	29 hrs
Related Products:	<p>Recommended medium (without the additional supplements or serum described under ATCC Medium): ATCC 30-2003 recommended serum: ATCC 30-2020 purified DNA: ATCC HTB-22D purified RNA: ATCC HTB-22R</p>
References:	<p>21405: Sugarman BJ , et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. <i>Science</i> 230: 943-945, 1985. PubMed: 3933111 22871: Takahashi K , Suzuki K . Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. <i>Int. J. Cancer</i> 55: 453-458, 1993. PubMed: 8375929 23046: Brandes LJ , Hermonat MW . Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. <i>Cancer Res.</i> 43: 2831-2835, 1983. PubMed: 6850594 23079: Lan MS , et al. Polypeptide core of a human pancreatic tumor mucin antigen. <i>Cancer Res.</i> 50: 2997-3001, 1990. PubMed: 2334903 23107: Pratt SE , Pollak MN . Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. <i>Cancer Res.</i> 53: 5193-5198, 1993. PubMed: 7693333 23113: Huguet EL , et al. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. <i>Cancer Res.</i> 54: 2615-2621, 1994. PubMed: 8168088 1416, 1973. PubMed: 4357757</p>

Lampiran 3 (lanjutan)

Spesifikasi Sel MCF-7

DNA Profile (STR):	Amelogenin: X CSF1PO: 10 D13S317: 11 D16S539: 11,12 D5S818: 11,12 D7S820: 8,9 TH01: 6 TPOX: 9,12 vWA: 14,15
Cytogenetic Analysis:	modal number = 82; range = 66 to 87. The stemline chromosome numbers ranged from hypertriploidy to hypotetraploidy, with the 2S component occurring at 1%. There were 29 to 34 marker chromosomes per S metaphase; 24 to 28 markers occurred in at least 30% of cells, and generally one large submetacentric (M1) and 3 large subtelocentric (M2, M3, and M4) markers were recognizable in over 80% of metaphases. No DM were detected. Chromosome 20 was nullisomic and X was disomic.
Isoenzymes:	AK-1, 1; ES-D, 1-2; G6PD, B; GLO-I, 1-2; PGM1, 1-2; PGM3, 1
Age:	69 years adult
Gender:	female
Ethnicity:	Caucasian
Comments:	The cells express the WNT7B oncogene [PubMed: 8168088]. The MCF7 line retains several characteristics of differentiated mammary epithelium including ability to process estradiol via cytoplasmic estrogen receptors and the capability of forming domes. Contains the Tx-4 oncogene. Growth of MCF7 cells is inhibited by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha). Secretion of IGFBP's can be modulated by treatment with anti-estrogens.
Propagation:	ATCC complete growth medium: Minimum essential medium (Eagle) with 2 mM L-glutamine and Earle's BSS adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino acids and 1 mM sodium pyruvate and supplemented with 0.01 mg/ml bovine insulin, 90%; fetal bovine serum, 10% Temperature: 37°C Atmosphere: air, 95%; carbon dioxide (CO ₂), 5%
Preservation:	Freeze medium: Complete growth medium supplemented with 5% (v/v) DMSO Storage temperature: liquid nitrogen vapor phase