



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI SITOTOKSISITAS HASIL FERMENTASI ISOLAT KAPANG
ENDOFIT DARI RANTING *Garcinia forbesii* King SERTA
RANTING DAN AKAR *Garcinia porrecta* Wall TERHADAP SEL
KANKER PAYUDARA MCF-7**

SKRIPSI

**NURAINI PUSPITASARI
0606070895**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
DESEMBER 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI SITOTOKSISITAS HASIL FERMENTASI ISOLAT KAPANG
ENDOFIT DARI RANTING *Garcinia forbesii* King SERTA
RANTING DAN AKAR *Garcinia porrecta* Wall TERHADAP SEL
KANKER PAYUDARA MCF-7**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Farmasi**

NURAINI PUSPITASARI

0606070895

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
DESEMBER 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama = Nuraini Puspitasari
NPM = 0606070895
Tanda tangan = *Lay*
Tanggal = 3 Januari 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Nuraini Puspitasari
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Sitotoksisitas Hasil Fermentasi Isolat Kapang Endofit dari Ranting *Garcinia forbesii* King serta Ranting dan Akar *Garcinia porrecta* Wall terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS (.....)

Pembimbing II : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS (.....)

Penguji I : Dr. Maksum Radji, MS (.....)

Penguji II : Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc. (.....)

Penguji III : Dr. Abdul Mun'im, MS (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 3 Januari 2011

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil'alamin, sujud syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahuwata'ala atas limpahan rahmat dan karuniaNya yang tak terhingga sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga akhir penulisan skripsi. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa skripsi ini dapat terselesaikan berkat bantuan, bimbingan, dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI
2. Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS sebagai pembimbing I dan Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS sebagai pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, sumbangan pemikiran, motivasi, dan pengarahan dalam penyusunan skripsi.
3. Drs. Hayun M.Si sebagai pembimbing akademik atas pengarahan dan dorongan yang diberikan selama kegiatan akademis penulis.
4. dr. Sonar Soni Panigoro, SpB.Onk, M.Epid selaku Direktur Utama RS. Kanker Dharmais, drg. Sri Saptarini, MARS selaku Ketua Bagian SDM RSKD, DR. dr. Noorwati Sutandyo, spPD-KHOM selaku Kepala Bagian Penelitian dan Pengembangan RSKD dan Dra. Rizka A, M. Pharm, Apt selaku Kasubbag Bagian Penelitian RSKD atas penyediaan sarana dan fasilitas penelitian bagi penulis.
5. Dra. Wan Lelly Heffen, M.Sc, Apt selaku pembimbing lapangan di RS. Kanker Dharmais yang telah memberikan banyak bantuan, ilmu dan bimbingan selama penulis melakukan penelitian.
6. Bapak/Ibu laboran dan karyawan Departemen Farmasi, terutama Mbak Catur dan Mas Tri atas segala bantuan yang diberikan kepada penulis.
7. Seluruh karyawan Bagian Penelitian dan Pengembangan RS. Kanker Dharmais Terutama Pak Didin, Pak Kasman, Pak Tekun, Bu Dewi dan Mbak Yanti yang senantiasa membantu penulis dan memberikan saran dan masukan

serta dukungan selama penulis melakukan penelitian di RS. Kanker Dharmais.

8. Mahasiswa Farmasi angkatan 2006 yang telah memberikan banyak kenangan manis dan makna kebersamaan selama ini, terutama para pejuang di lab. Mikro Yoyon, Eka, Dudu, Ekosh dan Nanda atas kebersamaan, pemberian semangat dan saran kepada penulis. I love you so much guys!!!
9. Seluruh mahasiswa Farmasi yang tidak mungkin disebut namanya satu persatu, terima kasih banyak atas persahabatan dan bantuan yang diberikan kepada penulis.
10. Tak henti penulis mengucapkan terima kasih yang sebenarnya seribu kali pun tidak cukup untuk menandingi kasih sayang, bantuan, doa dan dukungan yang diberikan oleh Mama, Papa, Lutfi adikku terus menerus kepada penulis selama penelitian. Terima kasih banyak keluargaku, semoga penulis dapat terus membuat Mama Papa bangga dan bahagia.

Semoga segala kebaikan semua pihak yang telah membantu diberikan balasan dengan sebaik – baiknya balasan olehNya. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, namun penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang membacanya serta untuk perkembangan dunia kefarmasian.

Penulis

2010

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Nuraini Puspitasari
NPM : 0606070895
Program Studi : Sarjana
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

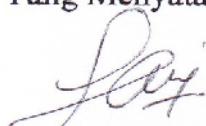
Uji Sitotoksitas Hasil Fermentasi Isolat Kapang Endofit dari Ranting *Garcinia forbesii* King serta Ranting dan Akar *Garcinia porrecta* Wall terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pengkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok
Pada tanggal: 3 Januari 2011

Yang Menyatakan


(Nuraini Puspitasari)

ABSTRAK

Nama : Nuraini Puspitasari
Program Studi: Farmasi
Judul : Uji Sitotoksitas Hasil Fermentasi Isolat Kapang Endofit dari Ranting *Garcinia forbesii* King serta Ranting dan Akar *Garcinia porrecta* Wall terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Kanker merupakan penyebab kematian utama di dunia. Bahkan di Indonesia kanker termasuk salah satu penyakit penyebab kematian utama, dimana kanker payudara menyebabkan kematian terbanyak di antara kanker lainnya. Berbagai pengobatan dilakukan untuk mengobati kanker, namun efek sampingnya besar dan harganya relatif mahal. Karena itu, dilakukan pengembangan obat baru untuk mengobati kanker, salah satunya adalah dengan menggunakan kapang endofit. Kapang endofit adalah kapang yang hidup di dalam jaringan tumbuhan lain yang lebih tinggi tanpa menimbulkan efek negatif pada tumbuhan inangnya. Beberapa kapang endofit menunjukkan aktivitas sitotoksik, untuk itu penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas sitotoksik isolat kapang endofit dari tumbuhan *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall terhadap sel MCF-7. Empat isolat kapang endofit dari kedua tumbuhan ini masing-masing diekstraksi dengan pelarut air, metanol, n-butanol dan etil asetat, sehingga total ekstrak yang dihasilkan adalah 16. Hasil *Brine Shrimp Lethality Test* menunjukkan 7 ekstrak mempunyai aktivitas toksik terbaik terhadap *Artemia salina*. Selanjutnya, ketujuh ekstrak ini diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel MCF-7 dengan metode merah netral. Hasil uji ini menunjukkan 6 dari 7 ekstrak mempunyai aktivitas sitotoksik karena memiliki LC_{50} kurang dari 100 $\mu\text{g/ml}$, yaitu 36,81; 42,27; 65,46; 86,7 $\mu\text{g/ml}$ untuk ekstrak etil asetat dan 66,98 dan 83,56 $\mu\text{g/ml}$ untuk ekstrak n-butanol.

Kata kunci : Kapang endofit, *Garcinia forbesii*, *Garcinia porrecta*, sel MCF-7
xv + 113 halaman; 25 gambar; 12 tabel; 24 lampiran
Bibliografi : 48 (1966-2010)

ABSTRACT

Name : Nuraini Puspitasari
Study Program : Pharmacy
Title : Cytotoxicity Test of The Fermentation Products from Endophytic Fungi Isolated from Branch of *Garcinia forbesii* King and as well as Branch and Root of *Garcinia porrecta* Wall to The Breast Cancer Cell Line MCF-7

Cancer is the main cause of death in the world. In Indonesia, cancer is one of diseases that cause most death, where breast cancers cause most death among other cancers. Various treatments performed to treat cancer, but their side effects are great and relatively expensive. Therefore, new drug developments are conducted to treat cancer, one of them is by using endophytic fungi. Endophytic fungi are fungi that live inside higher plant tissues without causing negative effects on their host plants. Some endophytic fungi shows cytotoxic activity, therefore this study aims to see cytotoxic activity of endophytic fungi isolated from *Garcinia forbesii* King and *Garcinia porrecta* Wall of MCF-7 cells. Four Isolates of endophytic fungi of both plants was extracted by water, methanol, n-butanol and ethyl acetate, so total extract produced were 16. Brine Shrimp Lethality Test result showed seven best extracts had toxic activity against *Artemia salina*. Furthermore, these seven extracts was tested for their cytotoxic activity against MCF-7 cells with neutral red method. The result showed 6 of 7 extracts had cytotoxic activity because they have LC₅₀ less than 100 µg/ml, specifically 36.81, 42.27, 65.46, 86.7 µg/ml from ethyl acetate extracts and 66.98 and 83.56 µg/ml for n-butanol extracts.

Keywords : Endophytic fungi, *Garcinia forbesii*, *Garcinia porrecta*, MCF-7 cell line.

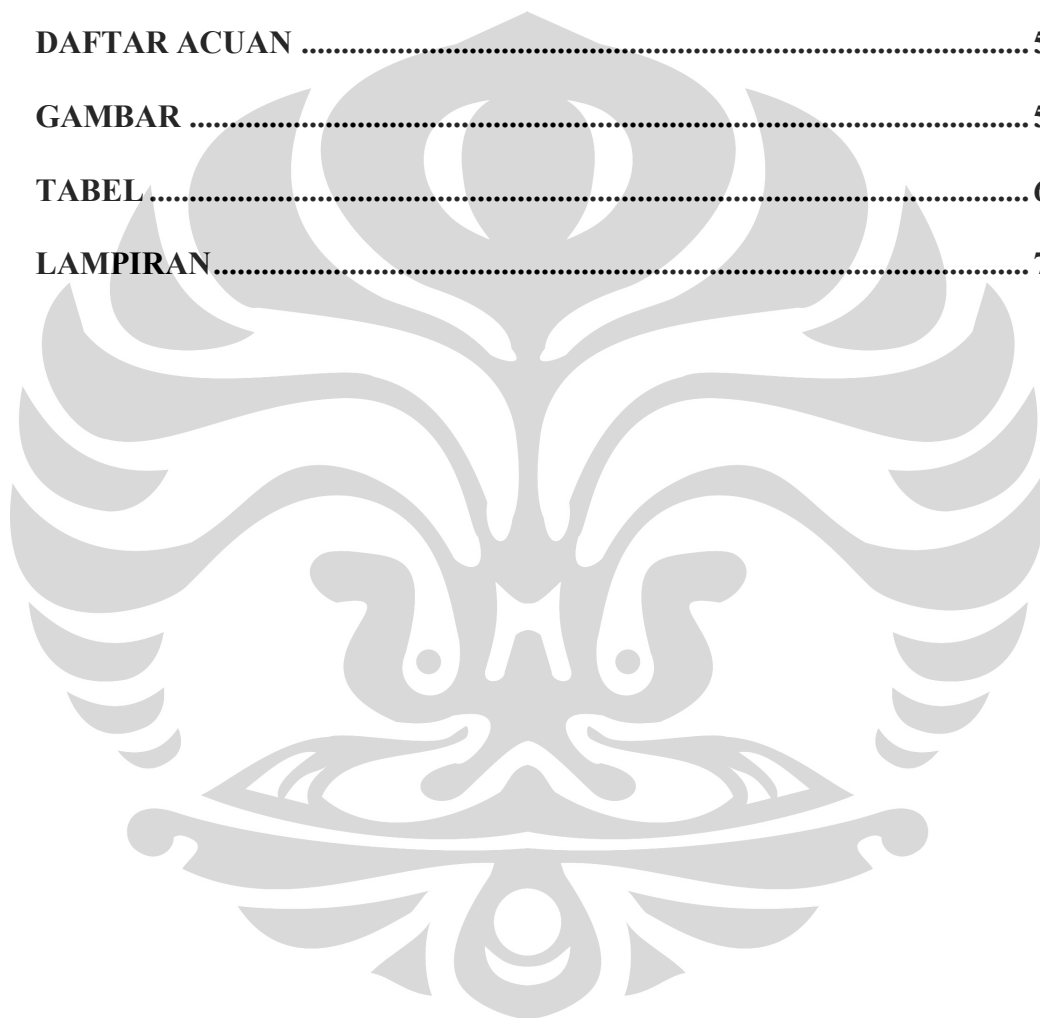
xv + 113 pages; 25 figures; 12 tables; 24 appendixes
Bibliography : 48 (1966-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	2
1.3. Hipotesis.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Kapang Endofit.....	4
2.2. Tumbuhan Inang.....	5
2.2.1. <i>Garcinia forbesii</i> King.....	5
2.2.1.1. Klasifikasi.....	5
2.2.1.2. Morfologi.....	5
2.2.1.3. Kandungan Kimia.....	6
2.2.2. <i>Garcinia porrecta</i> Wall.....	6
2.2.2.1. Klasifikasi.....	6
2.2.2.2. Morfolgi.....	6
2.2.2.3. Kandungan Kimia.....	7
2.3. Fermentasi.....	7
2.4. Kromatografi Lapis Tipis.....	9
2.5. <i>Artemia salina</i> Leach.....	10
2.6. Uji Toksisitas dengan <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	12
2.7. Kanker.....	12
2.8. Kanker Payudara.....	14
2.9. Sel MCF-7.....	20
2.10. Kultur Sel.....	20
2.11. Uji Sitotoksisitas Secara <i>In Vitro</i>	23
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	25
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	25
3.2. Bahan.....	25
3.2.1. Sampel.....	25
3.2.2. Sel Uji.....	25
3.2.3. Bahan Kimia.....	25

3.2.4. Medium	26
3.3. Peralatan	26
3.4. Cara Kerja	27
3.4.1. Peremajaan Isolat Kapang Endofit.....	27
3.4.1.1. Pembuatan Medium Lempeng PDA pada Cawan Petri.....	27
3.4.1.2. Pembuatan PDA Agar Miring.....	27
3.4.1.3. Peremajaan Isolat Kapang Endofit.....	27
3.4.2. Identifikasi Kapang Endofit.....	28
3.4.3. Isolasi Metabolit Sekunder dari Kapang Endofit.....	28
3.4.3.1. Pembuatan Medium Fermentasi	28
3.4.3.2. Fermentasi.....	28
3.4.3.3. Ekstraksi	28
3.4.3.4. Pengeringan Hasil Fermentasi.....	29
3.4.4. Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis ...	29
3.4.5. Uji Toksisitas dengan Menggunakan Metode BSLT.....	29
3.4.5.1. Penetasan Telur <i>Artemia salina</i> Leach.....	30
3.4.5.2. Uji Toksisitas.....	30
3.4.6. Uji Sitotoksisitas terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. 31	
3.4.6.1. Pembuatan Larutan Uji.....	31
3.4.6.2. Pembuatan Larutan Sisplatin (Blanko Positif) ...	31
3.4.6.3. Pembuatan Blanko DMSO 2%.....	31
3.4.6.4. Pembuatan Media RPMI 1640	31
3.4.6.5. Pembuatan Larutan <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS).....	32
3.4.6.6. Pembuatan Tripsin 0,25%	32
3.4.6.7. Pembuatan Larutan <i>Sodium Dodesil Sulfate</i> (SDS) 1%	33
3.4.6.8. Pembuatan Larutan Merah Netral 0,5%.....	33
3.4.6.9. Pencairan Sel MCF-7	33
3.4.6.10. Subkultur	33
3.4.6.11. Pemeliharaan Kultur Sel MCF-7.....	34
3.4.6.12. Perhitungan Kepadatan Sel MCF-7.....	34
3.4.6.13. Penyiapan Suspensi Sel MCF-7 untuk Pengujian.....	35
3.4.6.14. Pengujian Sitotoksisitas terhadap Sel MCF-7 ...	35
3.4.6.15. Perhitungan Persentase Kematian Sel MCF-7 ...	36
3.4.6.16. Analisis Data	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1. Hasil Identifikasi	38
4.1.1. Isolat RP1.....	38
4.1.2. Isolat AP3	38
4.1.3. Isolat RF2.....	39
4.1.4. Isolat RF5.....	39
4.2. Fermentasi dan Ekstraksi	39
4.3. Pemisahan Senyawa dengan KLT	41
4.4. Uji Toksisitas dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	42

4.5. Kulturasasi Sel	43
4.6. Jumlah Kepadatan Sel	44
4.7. Suspensi Penyedia Sel	44
4.8. Pengujian Sitotoksisitas	45
4.9. Hasil LC_{50}	46
4.10. Analisis Statistik Presentase Kematian Sel MCF-7	47
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1. Kesimpulan	49
5.2. Saran	49
DAFTAR ACUAN	50
GAMBAR	55
TABEL	67
LAMPIRAN.....	75



DAFTAR GAMBAR

4.1	Makroskopis Isolat RP1. Penampang Makroskopis Muka Koloni (Kiri) dan Sebalik Koloni (Kanan)	56
4.2	Mikroskopis Isolat RP1	56
4.3	Makroskopis Isolat AP3. Penampang Makroskopis Muka Koloni (Kiri) dan Sebalik Koloni (Kanan)	57
4.4	Mikroskopis Isolat AP3	57
4.5	Makroskopis Isolat RF2. Penampang Makroskopis Muka Koloni (Kiri) dan Sebalik Koloni (Kanan)	58
4.6	Mikroskopis Isolat RF2	58
4.7	Makroskopis Isolat RF5. Penampang Makroskopis Muka Koloni (Kiri) dan Sebalik Koloni (Kanan)	59
4.8	Mikroskopis Isolat RF5	59
4.9	Hasil Kromatografi Lapis Tipis dengan Eluen n-Heksan:Kloroform (3:2).....	60
4.10	Hasil Kromatografi Lapis Tipis dengan Eluen Kloroform:Etil Asetat (7:2).....	60
4.11	Hasil Kromatografi Lapis Tipis dengan Eluen n-Heksan:Aseton (9:1).....	60
4.12	Mikroskopis Sel MCF-7 sebelum Melekat pada Dasar Labu Kultur (Sesaat setelah Subkulturisasi)	61
4.13	Mikroskopis Sel MCF-7 dalam Medium RPMI 1640 di dalam Labu Kultur yang Diinkubasi pada 37°C Selama 5 Hari.....	61
4.14	Mikroskopis Sel MCF-7 dalam Pelat Kultur Jaringan 96 Sumuran sebelum Dilakukan Pengujian.....	62
4.15	Mikroskopis Blangko Negatif DMSO setelah Dilakukan Pengujian	62
4.16	Mikroskopis Sel setelah Dilakukan Pengujian dengan Sampel Konsentrasi Akhir 200 µg/ml	62
4.17	Mikroskopis Sel setelah Dilakukan Pengujian dengan Sisplatin Konsentrasi Akhir 200 µg/ml	62
4.18	Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak Etil Asetat Isolat AP3 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C.....	63
4.19	Grafik Hubungan Antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak Etil Asetat Isolat RF2 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C.....	63
4.20	Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak Etil Asetat Isolat RF5 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C.....	64
4.21	Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak Etil Asetat Isolat RP1 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C.....	64
4.22	Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak n-Butanol Isolat AP3 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C.....	65
4.23	Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak n-Butanol Isolat RF2 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C.....	65

4.24	Grafik Hubungan Antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak n-Butanol Isolat RF5 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C.....	66
4.25	Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Blanko Positif Sisplatin setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C.....	66

DAFTAR TABEL

4.1	Jumlah Ekstrak yang Diperoleh pada Proses Ekstraksi	68
4.2	Nilai LC ₅₀ Hasil BSLT Isolat Kapang Endofit.....	69
4.3	Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 1 (Ekstrak Etil Asetat Isolat AP3) setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37 °C.....	70
4.4	Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 2 (Ekstrak Etil Asetat Isolat RF2) setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37 °C.....	70
4.5	Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 3 (Ekstrak Etil Asetat Isolat RF5) setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37 °C.....	71
4.6	Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 4 (Ekstrak Etil Asetat Isolat RP1) setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37 °C.....	71
4.7	Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 5 (Ekstrak n-Butanol Isolat AP3) setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37 °C.....	72
4.8	Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 6 (Ekstrak n-Butanol Isolat RF2) setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37 °C.....	72
4.9	Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 7 (Ekstrak n-Butanol Isolat RF5) setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37 °C.....	73
4.10	Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Blanko Positif Sisplatin setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37 °C.....	73
4.11	Serapan Blanko Negatif Sel dan Blanko DMSO 2%.....	74
4.12	Nilai LC ₅₀ (µg/ml) yang Diperoleh Melalui Perhitungan dengan Menggunakan Persamaan Probit	74

DAFTAR LAMPIRAN

1. Bagan Kerja Penelitian	76
2. Spesifikasi Sel MCF-7	77
3. Bagan Cara Kerja Ekstraksi	82
4. Analisis Hasil LC ₅₀ pada Pengujian Toksisitas dengan BSLT Isolat AP3 Menggunakan Analisis Probit dengan Program SPSS 18.....	83
5. Analisis Hasil LC ₅₀ pada Pengujian Toksisitas dengan BSLT Isolat RP1 Menggunakan Analisis Probit dengan Program SPSS 18.....	86
6. Analisis Hasil LC ₅₀ pada Pengujian Toksisitas dengan BSLT Isolat RF2 Menggunakan Analisis Probit dengan Program SPSS 18.....	89
7. Analisis Hasil LC ₅₀ pada Pengujian Toksisitas dengan BSLT Isolat RF5 Menggunakan Analisis Probit dengan Program SPSS 18.....	92
8. Pembuatan Larutan Uji untuk Pengujian Sitotoksisitas terhadap Sel MCF-7.....	95
9. Pembuatan Larutan Blanko Positif Sisplatin untuk Pengujian Sitotoksisitas terhadap Sel MCF-7.....	96
10. Hasil LC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat AP3 Menggunakan Analisa Probit dengan Program SPSS 18	97
11. Hasil LC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat RF2 Menggunakan Analisa Probit dengan Program SPSS 18	98
12. Hasil LC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat RF5 Menggunakan Analisa Probit dengan Program SPSS 18	99
13. Hasil LC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat RP1 Menggunakan Analisa Probit dengan Program SPSS 18	100
14. Hasil LC ₅₀ Ekstrak n-Butanol Isolat AP3 Menggunakan Analisa Probit dengan Program SPSS 18	101
15. Hasil LC ₅₀ Ekstrak n-Butanol Isolat RF2 Menggunakan Analisa Probit dengan Program SPSS 18	102
16. Hasil LC ₅₀ Ekstrak n-Butanol Isolat RF5 Menggunakan Analisa Probit dengan Program SPSS 18	103
17. Hasil LC ₅₀ Blanko Positif Sisplatin Menggunakan Analisa Probit dengan Program SPSS 18	104
18. Perhitungan Kepadatan Sel	105
19. Perhitungan Penyediaan Suspensi Sel untuk Pengujian	106
20. Pemataan Pelat Uji Sitotoksisitas terhadap Sel MCF-7	107
21. Uji Distribusi Normal Shapiro-Wilk terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi selama 24 Jam	109
22. Uji Homogenitas Levene terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7 Setelah Inkubasi selama 24 jam	110
23. Uji Analisis Varians (ANAVA) terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi selama 24 Jam	111
24. Uji Beda Nyata Terkecil Data Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi selama 24 Jam	112

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker adalah suatu penyakit dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler (Nafrialdi & Gan, 1995). Penyakit ini merupakan penyebab kematian utama di dunia, bahkan pada tahun 2030 diperkirakan kematian karena kanker dapat mencapai 12 juta kematian (WHO, 2010). Penyakit ini menduduki peringkat ketujuh penyebab kematian utama di Indonesia setelah stroke, TBC, hipertensi, cedera, perinatal dan diabetes melitus (Depkes, 2008).

Kanker payudara pada wanita adalah penyakit kanker yang paling sering terjadi pada wanita baik di negara maju maupun di negara berkembang. Sepersepuluh dari semua kanker yang didiagnosa di seluruh dunia adalah kanker payudara wanita. Penyakit ini juga merupakan penyebab utama kematian wanita kanker di seluruh dunia. Lebih dari 1,1 juta kasus diagnosis dan lebih dari 410.000 pasien meninggal karenanya di dunia (Ferlay, Hery, Autier, & Sankaranarayanan, 2010). Kanker payudara merupakan kanker yang paling sering terjadi dan merupakan kanker penyebab kematian utama di Indonesia (GLOBOCAN, 2008).

Berbagai macam cara telah diupayakan untuk mengobati penyakit kanker, antara lain pembedahan, radioterapi dan kemoterapi. Namun ketiga usaha ini belum mampu untuk memberikan hasil yang memuaskan karena efek sampingnya besar dan biayanya relatif mahal. Oleh karena itu dicari cara pengobatan alternatif, antara lain dengan obat tradisional (Yarmalina, Lely, & Laupa, 2007). Pada penggunaan obat tradisional terdapat pertimbangan lain, yaitu dalam upaya pengembangan obat tradisional dibutuhkan jumlah bahan tanaman yang cukup banyak, sedangkan tanaman obat yang berpotensi dapat menyembuhkan kanker sangat terbatas. Berhubung dengan hal tersebut dicari alternatif lain untuk mempertahankan kelestarian tanaman obat di alam, yaitu dengan memanfaatkan mikroba endofit (Radji, 2005).

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman lain, tanpa merusak atau mengganggu tanaman tersebut. Endofit bisa berupa

bakteri atau jamur, namun yang sering diisolasi adalah jamur yang berupa kapang. Kapang endofit dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif karena biasanya memiliki kandungan senyawa yang sama dengan tumbuhan inangnya. Oleh karena itu, untuk memperoleh kandungan senyawa yang dibutuhkan tidak perlu mengambil banyak tumbuhan herbal, cukup dengan mengambil kapang endofitnya saja sehingga kelestarian alam akan tetap terjaga (Strobel, Daisy, & Castillo, 2005).

Salah satu tumbuhan yang terdapat kapang endofit hidup bersamanya adalah genus *Garcinia* yang merupakan salah satu tumbuhan yang tumbuh dan tersebar luas di Indonesia. *Garcinia forbesii* King memiliki senyawa forbesion sedangkan *Garcinia porrecta* Wall memiliki senyawa dulxanton dimana kedua senyawa ini memiliki aktivitas sitotoksik (Leong, Harrison, Bennett, & Tan, 1996; Kardono, Hanafi, Sherley, Kosela, & Harrison, 2006), dan kapang endofit yang tumbuh pada tumbuhan *Garcinia* ini telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba, antiviral, antimalaria, antiproliferasi dan antioksidan (Phongpaichit, et al., 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Taqwim (2008) menunjukkan kapang endofit yang terdapat pada *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* memiliki sifat antimikroba dan sifat toksik terhadap *Artemia salina* setelah dilakukan pengujian *Brine Shrimp Lethality Test*.

Berdasarkan penelitian tersebut maka dilakukanlah penelitian ini untuk menguji sitotoksisitas metabolit sekunder yang diperoleh dari hasil fermentasi isolat kapang endofit dari ranting *Garcinia forbesii* King serta ranting dan akar *Garcinia porrecta* Wall terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*.

1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik hasil fermentasi isolat kapang endofit dari ranting *Garcinia forbesii* King serta isolat dari ranting dan akar *Garcinia porrecta* Wall terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*.

1.3. Hipotesis

Ekstrak hasil fermentasi isolat kapang endofit tumbuhan *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall memiliki efek toksik terhadap larva *Artemia salina* pada uji BSLT, sehingga diharapkan memiliki efek sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kapang Endofit

Endofit adalah mikroba yang hidup pada tanaman tingkat tinggi, dimana mikroba ini membentuk koloni pada jaringan bagian dalam tanaman tanpa menimbulkan efek negatif pada tumbuhan inangnya. Mikroba yang sering ditemui pada endofit adalah bakteri dan jamur, namun yang paling sering diisolasi adalah jamur yang berupa kapang. Endofit memiliki biodiversitas yang sangat tinggi, bahkan dari satu tanaman dapat diisolasi hingga ratusan mikroorganisme (Tan & Zou, 2001).

Karena biodiversitas yang luar biasa luas, maka dalam memilih tanaman inangnya untuk dijadikan bahan penelitian harus memiliki ciri-ciri seperti tumbuhan dengan lingkungan yang unik, tumbuhan yang mempunyai sejarah *ethnobotanical* (digunakan pada masyarakat jaman dahulu sebagai obat tradisional), dan tumbuhan yang tumbuh pada area yang memiliki biodiversitas yang tinggi, sehingga mempunyai prospek bahwa endofitnya juga memiliki biodiversitas yang tinggi. Daerah hujan tropis, seperti yang terdapat di Indonesia, adalah contoh yang dapat mendeskripsikan lingkungan dengan biodiversitas tinggi. Pada area ini kompetisinya begitu hebat, sumber makanan terbatas dan seleksi alam berada dalam puncaknya. Hal ini memberikan nilai probabilitas yang tinggi bahwa hujan tropis memiliki sumber dari senyawa yang memiliki aktivitas biologis terbanyak, karena dibutuhkan inovasi kimia untuk bertahan hidup (Strobel, Daisy, & Castillo, 2005).

Kapang endofit memberikan hubungan simbiosis mutualistik kepada tumbuhan inangnya, dimana tumbuhan inang memberikan perlindungan dan nutrisi, sedangkan kapang endofit memberikan senyawa metabolit yang berguna untuk tumbuhan inang bertahan hidup (Tan & Zou, 2001). Salah satu contohnya adalah meningkatnya tingkat adaptasi tumbuhan inang, karena kapang endofit memberikan senyawa yang mampu memberikan perlindungan terhadap bakteri, fungi, nematoda, dan serangga (Kharkwal, Harsha, Sherameti, Oelmuller, &

Varma, 2008). Contoh lain adalah tumbuhan inang akan tumbuh lebih cepat, karena kapang endofit yang hidup bersamanya memberikan senyawa fitohormon seperti asam indol-3-asetat (IAA), sitokin dan senyawa lain. Kapang endofit juga akan meningkatkan ambilan nutrisi, seperti nitrogen dan fosfor, pada tumbuhan inang (Tan & Zou, 2001).

Kapang endofit dapat menghasilkan beberapa senyawa kimia, biasanya kandungannya sama dengan tanaman inang yang berhubungan dengan adanya rekombinasi genetik pada endofit terhadap tumbuhan inang yang terjadi dengan jangka waktu yang sangat lama (Tan & Zou, 2001). Jika endofit dapat menghasilkan senyawa aktif yang jarang dan penting seperti tumbuhan inangnya maka dalam mendapatkan senyawa-senyawa tersebut tidak harus menanam tumbuhan yang masa tumbuhnya sangat lama atau tumbuhan-tumbuhan yang sangat langka. Bahkan, jika dilihat dari segi ekonomi, produksi senyawa-senyawa bernilai tinggi ini lebih mudah sehingga menurunkan harga yang biasanya beredar pada masyarakat. Karena itu, kapang endofit menjadi salah satu sumber alternatif baru untuk berbagai pengobatan (Strobel, Daisy, & Castillo, 2005).

2.2. Tumbuhan Inang

2.2.1. *Garcinia forbesii* King

2.2.1.1. Klasifikasi (Backer & Bakhuizen, 1986)

Filum	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Kelas	:	Dicotyledonae
Bangsa	:	Guttiferales
Suku	:	Clusiaceae / Guttiferae
Marga	:	Garcinia
Jenis	:	<i>Garcinia forbesii</i> King

2.2.1.2. Morfologi

Garcinia forbesii disebut juga dengan buah Mundar atau Bundar di Kalimantan Selatan. Buah Mundar berwarna merah cerah, berbentuk bundar,

berkulit buah yang tipis dan lunak. Daging buah berwarna putih. dengan rasa manis, semakin dekat ke biji akan terasa asam segar. Berat/buah 40-60 gram. Biji berukuran kecil, pipih dengan berat 0,2 gram. Sepanjang ranting muncul buah berkelompok 2 sampai 7 butir (Saleh, Mawardi, Eddy, & Hatmoko, 2008).

2.2.1.3. Kandungan kimia

Garcinia forbesii memiliki senyawa xanton. Pada bagian cabangnya terdapat senyawa baru kromenoxanton, forbexanton dan senyawa yang telah diketahui sebelumnya yaitu, piranojacareubin and 1,3,7- trihidroksi-2,3-metilbut-2-enil-xanton (Harrison, Leong, Sia, & Sim, 1995) Senyawa lain yang terdapat di dalamnya adalah forbesion yang memiliki sifat sitotoksik (Leong, Harrison, Bennett, & Tan, 1996).

2.2.2. *Garcinia porrecta* Wall.

2.2.2.1. Klasifikasi (Backer & Bakhuizen, 1986)

Filum	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Kelas	:	Dicotyledonae
Bangsa	:	Guttiferales
Suku	:	Clusiaceae / Guttiferae
Marga	:	<i>Garcinia</i>
Jenis	:	<i>Garcinia porrecta</i> Wall

2.2.2.2. Morfologi

Bentuk kanopi ditemukan pada *Garcinia porrecta*, meskipun cabang pertama mulai tumbuh pada ketinggian 20 m tetapi masih menampilkan bentuk kanopi kerucut. Bentuk percabangan pada *G. porrecta* Wall berbentuk spiral terutama pada ketinggian diatas 7 meter. Duduk daunnya berpasangan saling berhadapan dengan bentuk daun melonjong. Warna daunnya hijau dengan permukaan licin. Bentuk bunga memutar dengan 4 sepal (kelopak

bunga) dan 4 petal (mahkota bunga). Warna bunganya adalah kuning, dan tangkainya berbentuk kotak. Tangkai sari tidak menghasilkan pollen (IPB, 2002).

2.2.2.3. Kandungan kimia

Tumbuhan ini kaya dengan xanton dan sering digunakan sebagai obat tradisional untuk menurunkan demam. Pada tumbuhan ini telah ditemukan senyawa xanton baru, yaitu porxanton dan porlanosterol. Selain itu tumbuhan ini juga memiliki senyawa xanton yang telah diketahui, yaitu dulxanton E, dulxanton F dan dulxanton G dimana ketiga senyawa ini memiliki sifat sitotoksik (Kardono, Hanafi, Sherley, Kosela, & Harrison, 2006).

2.3. Fermentasi

Istilah fermentasi berasal dari bahasa latin *fervere* yang berarti mendidih. Kata tersebut mendeskripsikan kerja khamir pada ekstrak buah atau malt. Penampakan mendidih itu disebabkan produksi gas karbon dioksida karena aktivitas katabolisme anaerob dari khamir pada gula-gula di dalam ekstrak (Gandjar, Wellyzar, & Ariyanti, 2006).

Tahap-tahap yang terjadi selama proses fermentasi adalah :

a) Fase Lag

Fase ini merupakan tahap adaptasi pada lingkungan yang baru (Gandjar, Wellyzar, & Ariyanti, 2006) sehingga pada tahap ini belum ada mikroorganisme yang tumbuh (Theodore & Srinivas, 2006).

b) Fase Log

Pada fase ini terjadi pertumbuhan sel yang sangat aktif (Gandjar, Wellyzar, & Ariyanti, 2006). Pertumbuhan sel terjadi secara eksponensial (Theodore & Srinivas, 2006).

c) Fase Stasioner

Tahap istirahat atau menurunnya aktivitas sel (Gandjar, Wellyzar, & Ariyanti, 2006) dan pada fase ini mikroorganisme akan mengeluarkan senyawa – senyawa metabolit (Theodore & Srinivas, 2006).

d) Fase Kematian

Mikroorganisme mengeluarkan senyawa metabolit yang bersifat toksik sehingga menyebabkan kematian mikroorganisme (Theodore & Srinivas, 2006).

Medium yang digunakan dalam proses fermentasi disebut sebagai medium fermentasi atau medium kultur. Medium fermentasi harus dapat menghasilkan produk fermentasi yang diinginkan dalam jumlah yang banyak dalam waktu yang cepat, dapat disterilisasi dengan mudah, menghasilkan jumlah produk yang konsisten (variasi jumlah tidak terlalu besar), murah dan mudah didapat dan tidak menyebabkan kerusakan lingkungan, sebelum, seiring dan setelah proses fermentasi (Theodore & Srinivas, 2006).

Medium fermentasi harus mengandung beberapa substrat yang penting untuk menunjang proses fermentasi antara lain :

a) Karbon

Senyawa ini digunakan sebagai energi. Karbon dapat diperoleh dari karbohidrat. Biasanya digunakan glukosa dan selulosa. Namun selain karbohidrat, karbon dapat diperoleh senyawa lain, seperti senyawa-senyawa hidrokarbon, alkohol atau bahkan asam-asam organik (Okafor, 2007). Minyak dan asam lemak juga digunakan sebagai sumber karbon seperti minyak zaitun, minyak biji kapas, minyak kacang kedelai dan minyak dari hewan (Theodore & Srinivas, 2006).

b) Nitrogen

Nitrogen digunakan sebagai sumber protein. Senyawa ini dapat diperoleh dari senyawa amonia atau garam nitrogen lain (Okafor, 2007). Amonia juga berfungsi untuk menjaga pH medium (Theodore & Srinivas, 2006).

c) Mineral

Senyawa ini merupakan bagian dari enzim atau digunakan untuk aktivasi enzim sehingga diperlukan keberadaannya dalam medium. Mineral utama yang diperlukan antara lain P, S, Mg dan Fe (Okafor, 2007).

d) Faktor Pertumbuhan

Senyawa ini diperlukan terutama untuk organisme-organisme yang tidak dapat memproduksinya. Senyawa yang termasuk faktor pertumbuhan adalah vitamin, asam amino dan nukleotida (Okafor, 2007).

e) Agen Pengkelat

Senyawa ini mencegah pembentukan dari endapan logam yang tidak larut. Senyawa ini akan membentuk kelat dengan logam yang ada. Namun senyawa ini tidak diperlukan dalam jumlah yang banyak, karena ada bahan lain yang dapat membentuk kompleks dengan logam seperti ekstrak ragi (Theodore & Srinivas, 2006).

2.4. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan bagian dari kromatografi cair, dimana fase geraknya berupa cairan dan fase diamnya berupa lapisan tipis pada permukaan pelat datar. Kromatografi lapis tipis, disebut juga dengan KLT, terkadang dikelompokkan dengan kromatografi kertas karena keduanya berupa kromatografi cair datar atau *planar liquid chromatography*. Pergerakan dari zat yang diuji merupakan hasil dari dua gaya yang berbeda, yaitu gaya dorong dari eluen dan gaya tertahan dari adsorben. Setiap molekul memiliki sifat yang berbeda-beda, apakah dia tertahan terhadap adsorben atau tetap melaju seiring dengan pergerakan dari fase gerak. Zat yang bergerak lebih lambat memiliki afinitas yang lebih besar terhadap adsorben sedangkan zat yang melaju lebih cepat memiliki afinitas yang lebih kecil dan solubilitas dalam pelarutnya lebih besar, sehingga pada hasil akhirnya diperoleh jarak yang berbeda-beda untuk setiap zat selama proses elusi (Fried & Sherma, 1999).

Hasil pemisahan dari kromatografi tipis dikatakan baik apabila pemisahan atau resolusinya terlihat jelas. Apabila belum terpisah, perlu dilakukan pergantian fase gerak, baik komposisinya atau pelarutnya ataupun mengganti fase diamnya untuk memperoleh hasil yang lebih baik (Teresa, Kaczmariski, & Prus, 2003). Adanya perbedaan jarak pada lapisan fase gerak disebabkan karena

perbedaan waktu setiap senyawa untuk tertahan pada lapisan adsorben (Fried & Sherma, 1999).

KLT jika dilihat dari fase diamnya padat dibagi menjadi dua, yaitu fase normal dan fase terbalik. Fase normal menggunakan silika atau alumina sebagai fase diamnya, dimana keduanya mempunyai sifat yang lebih polar dari fase geraknya, sehingga senyawa-senyawa yang lebih polar akan tertahan dengan kuat. Pada fase terbalik, silika gel yang diisi dengan minyak mineral atau berikatan kimia dengan hidrokarbon C₂-C₁₈ memiliki sifat yang kurang polar dibandingkan dengan eluennya, sehingga senyawa-senyawa non polar akan tertahan lebih kuat pada fase diam (Fried & Sherma, 1999).

2.5. *Artemia salina* Leach

Artemia salina telah diketahui oleh manusia selama ratusan tahun, dan mulai digunakan untuk makanan pada kultur untuk organisme-organisme larva pada tahun 1930 (Lavens & Sorgeloos, 1966).

Artemia salina memiliki klasifikasi sebagai berikut (Tafal, 1995) :

- Filum : Arthropoda
- Subfilum : Crustacea
- Kelas : Branchiopoda
- Bangsa : Anostraca
- Suku : Artemidae
- Marga : Artemia
- Jenis : *Artemia salina* Leach

Genus *Artemia* memiliki relasi yang dekat dengan zooplankton dan sering digunakan sebagai makanan hidup di akuarium. Siklus hidup *Artemia salina* dimulai dengan menetasnya telur (*cyst*) yang dorman yang di dalamnya terdapat embrio yang metabolismenya belum aktif. *Cyst* dapat dorman selama bertahun-tahun selama dibiarkan kering. Ketika *cyst* diletakkan di air laut, embrio akan mengambil air dan melanjutkan perkembangannya. Setelah 20 jam bagian

luar dari membran *cyst* terbuka (*breaking*) dan terlihat muncul embrio, namun embrio ini akan tetap berpegangan pada bagian bawah *cyst*, yang dinamakan sebagai *umbrella stage*. Setelah beberapa lama, *cyst* menetas sepenuhnya (*hatching*) dan naupili-naupili yang dapat berenang bebas telah lahir (Lavens & Sorgeloos, 1966).

Tahap penetasan telur *Artemia salina* memiliki hal-hal yang harus diperhatikan, antara lain adalah :

a) Hidrasi *cyst* dalam air laut

Telah diketahui sebelumnya bahwa *cyst* harus mengalami hidrasi dengan air laut agar dapat menetas. Namun jika dibandingkan dengan air laut asli, kecepatan penetasan telur lebih tinggi jika digunakan media air dengan salinitas yang lebih rendah. Karena itu tingkat kadar garam atau *salinity* harus sesuai (Sorgeloos & Persoone, 1975).

b) Oksigenasi medium

Kadar oksigen minimum yang diperlukan agar telur dapat menetas adalah 3 ppm. Di bawah itu kecepatan penetasan telur akan berkurang dan konsentrasi 0,6-0,8 ppm akan menghambat penetasan telur. Pemberian udara dengan aerator sangat berguna karena menjaga agar *artemia cyst* terdispersi, karena jika *cyst* berada di dasar wadah akan menjadi lebih anaerobik sehingga penetasan telur terhambat (Sorgeloos & Persoone, 1975).

c) Pengaturan cahaya

Penetasan *cyst* terjadi lebih baik dengan adanya cahaya. Pencahayaan terus-menerus dengan 1000 lux menghasilkan penetasan telur yang maksimal. Intensitas cahaya ini dapat diperoleh dengan memberikan lampu neon 60 watt dan jarak antara lampu dan wadah penetasan berkisar antara 2 cm (Sorgeloos, 1980).

d) Suhu

Suhu yang sesuai untuk penetasan telur *Artemia salina* biasanya 20°C-30°C namun pada suhu 30°C proses penetasannya lebih cepat. Pada suhu 33°-40°C metabolisme *cyst* akan terganggu secara reversibel, ketika suhu dikembalikan

ke suhu optimal maka metabolisme akan kembali seperti semula (Sorgeloos & Persoone, 1975).

e) pH

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan menetas *cyst* dalam salinitas yang rendah adalah pH medium. Enzim penetasan *cyst* memiliki aktivitas maksimal pada pH 8-9 sehingga pH medium sebaiknya dijaga agar tetap di atas 8. Hal ini dapat dilakukan dengan menambahkan Na_2CO_3 (1 mL dari larutan 0,5 M/liter medium) atau CaO (65 mg/liter medium) (Sorgeloos, 1980).

f) Banyaknya *cyst* dalam medium

Jika *cyst* terlalu banyak maka kebutuhan oksigen akan semakin banyak, namun jika konsentrasi oksigen semakin ditingkatkan (dengan menggunakan aerator yang lebih kuat) maka dapat terjadi *foaming* atau kematian pada naupili yang baru menetas. Karena itu jumlah *cyst* pada medium sebaiknya tidak melebihi 10 g/Liter (Sorgeloos, 1980).

2.6. Uji Toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Selain menggunakan hewan pengerat untuk uji toksisitas, larva udang (*Artemia salina* Leach) dapat juga digunakan untuk mengetahui sifat toksik bahan alam. Metode yang menggunakan larva udang untuk uji toksisitas disebut *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Metode ini dapat digunakan sebagai *bioassay guided fractionation* dari bahan alam karena mudah, cepat, murah dan cukup reproduksibel. Toksisitas ditentukan dengan melihat harga LC_{50} yang dihitung berdasarkan analisis probit (Harmita & Radji, 2008). Suatu senyawa dianggap bersifat toksik apabila nilai LC_{50} di bawah 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Meyer, 1982).

2.7. Kanker

Penyakit kanker merupakan salah satu penyakit yang sering kali menjadi menjadi isu kesehatan, baik pada tenaga kesehatan maupun masyarakat. Terdapat sekitar lebih dari 10 juta kasus kanker yang terjadi tiap tahun, 4,7 juta terjadi di

negara maju dan 5,5 juta terjadi di negara berkembang. Pada negara berkembang, kanker merupakan penyakit utama kedua yang menjadi penyebab kematian. Penyebab kematian di seluruh dunia 12% disebabkan oleh kanker. Setiap 20 tahun jumlah kematian karena kanker tiap tahunnya bahkan akan meningkat sekitar 6 juta hingga 10 juta kasus (WHO, 2002).

Faktor-faktor penyebab penyakit kanker dapat digolongkan menjadi 3 kelompok besar, yaitu faktor fisika (energi radiasi), faktor kimia (senyawa kimia) dan biologi (virus). Jika dilihat dari faktor fisika, sinar ultraviolet, sinar γ dan sinar-x bersifat karsinogenik. Sinar-sinar ini dapat merusak DNA secara langsung, seperti membentuk dimer pirimidin atau memutus rantai tunggal atau ganda bahkan ikatan silang dari DNA, atau secara tidak langsung, seperti pembentukan radikal bebas yang akan merusak DNA lain jika berikatan. Dilihat dari faktor kimia, banyak senyawa kimia yang bersifat karsinogen, seperti hidrokarbon aromatik polisiklik (benzo(a)piren, dimetilbenzantren), senyawa amina aromatik, nitrosamin, dietilbestrol, arsen, asbes dan lain-lain. Sedangkan dari unsur biologi, jika sel terinfeksi dengan virus onkogenik tertentu dapat mengalami transformasi maligna (Murray, Granner, Mayes, & Rodwel, 2001).

Sel kanker memiliki ciri-ciri tertentu, salah satunya adalah sel kanker dapat membentuk enzim telomerase yang dapat membentuk kembali sekuen heksonukleutida akhir, dimana DNA polimerase tidak dapat mereplikasi bagian ini, dan mempertahankan panjang dari telomer maka telomer tidak pernah memendek sehingga pada sel kanker tidak terdapat regulasi atau penurunan pertumbuhan sel. Ciri-ciri lain adalah sel kanker dapat mempertahankan adanya faktor pertumbuhan (*growth factor*) dengan adanya onkogen. Onkogen adalah gen yang dapat menyebabkan kanker. Selain itu sel kanker akan menginaktivasi kerja dari protein yang memberikan sinyal kepada sel normal untuk berhenti membelah yang disebut dengan *tumour suppressor gene* (TSG). Sel kanker juga memiliki ciri-ciri lain, yaitu menyebabkan terjadinya angiogenesis, yaitu terbentuknya pembuluh kapiler baru sehingga sel kanker mulai menyebar hingga terjadi proses metastasis. Proses metastasis adalah proses dimana tumor mulai dapat menginvasi organ atau jaringan lain sehingga terjadi pertumbuhan kanker sekunder (Hejmadi, 2009).

Kanker dibagi menjadi beberapa kategori, yaitu (Pendit, 1997):

a) Karsinoma

Karsinoma merupakan kanker pada jaringan epitel, termasuk sel-sel kulit, testis, ovarium, kelenjar penghasil mukus, sel penghasil melanin, payudara, serviks, kolon, rektum, lambung, pankreas dan esofagus.

b) Limfoma

Limfoma adalah kanker jaringan limfe yang mencakup kapiler limfe, lakteal, limpa, berbagai kelenjar limfe dan pembuluh limfe. Timus dan sum-sum tulang juga dapat dipengaruhi. Limfoma spesifik antara lain adalah penyakit Hodgkin (kanker kelenjar limfe dan limpa).

c) Sarkoma

Sarkoma adalah kanker jaringan ikat, termasuk sel-sel yang ditemukan di otot dan tulang.

d) Glioma

Glioma adalah kanker sel-sel glia (penunjang) di susunan syaraf pusat.

2.8. Kanker Payudara

Pada payudara wanita terdapat lobes dimana setiap lobes terdiri dari bagian-bagian yang lebih kecil yaitu lobul. Lobul memiliki kelenjar yang dapat menghasilkan susu. Ketika bayi lahir, susu akan mengalir dari lobul melalui saluran kecil yang disebut dengan *milk ducts* dan mengalir menuju puting. Payudara juga memiliki pembuluh limfa. Pembuluh ini terhubung pada massa jaringan yang bulat, kecil disebut nodus limfa. Kelompok-kelompok nodus limfa ini terdapat pada bagian bawah lengan dekat payudara (*axilla*), di atas tulang selangka dan bagian dada dibelakang tulang dada (Harris, Marc, Lippman, Morrow, Osborne, & Lippman, 2000).

Kanker payudara pada wanita adalah penyakit kanker yang paling sering terjadi pada wanita baik di negara maju maupun di negara berkembang. Sepersepuluh dari semua kanker yang didiagnosa di seluruh dunia adalah kanker payudara wanita. Penyakit ini juga merupakan penyebab utama kematian wanita kanker di seluruh dunia. Lebih dari 1,1 juta kasus diagnosis dan lebih dari 410.000

pasien meninggal karenanya di dunia (Ferlay, Hery, Autier, & Sankaranarayanan, 2010).

Terjadinya penyakit ini meningkat seiring dengan bertambahnya umur, meskipun kecepatan peningkatannya menurun setelah menopause. Karena itu terlambat menopause menyebabkan meningkatnya resiko terjadinya kanker. Hiperplasia atipikal dari *lobul* dan *ductal* juga dapat meningkatkan resiko kanker payudara. Faktor resiko lain yaitu radiasi ionisasi, terapi dengan estrogen dalam jangka waktu yang lama dan pengkonsumsian alkohol. Resiko paling tinggi terjadi jika dalam riwayat keluarga ada yang terkena kanker payudara (Hortobagyi, 1998).

Kanker payudara mempunyai gejala-gejala, antara lain adanya tonjolan atau bagian yang mengeras di dalam atau di dekat payudara atau lengan bawah, perubahan bentuk dan ukuran dari payudara, puting mencekung ke dalam payudara dan kulit pada payudara, areola atau puting menjadi bersisik, memerah atau membengkak (NCI, 2005).

Untuk mendiagnosis kanker payudara dapat dilakukan beberapa cara, yaitu (NCI, 2005):

a) Pemeriksaan Klinik Payudara

Pada diagnosis ini, payudara akan diperiksa dengan merasakan tonjolan yang tumbuh pada payudara, baik ukuran, bentuk maupun teksturnya. Tonjolan yang dihasilkan oleh tumor benigna berbeda dengan kanker. Tonjolan yang bersifat lembut, bulat dan dapat digerakkan merupakan ciri dari tumor benigna. Tonjolan yang bersifat keras dan menempel pada payudara merupakan ciri dari kanker.

b) Mammogram

Dianosis mammogram adalah melihat gambaran dari payudara melalui sinar x. dari gambar ini didapatkan hasil yang lebih detail pada area payudara yang abnormal. Gambar hasil sinar x ini digunakan untuk mempelajari tonjolan, bagian yang mengeras, puting dan perubahan pada ukuran atau bentuk dari payudara.

c) *Ultrasound*

Alat ultrasound ini mengeluarkan gelombang suara yang tidak dapat didengar oleh manusia. Gelombang ini akan berbalik arah jika mengenai suatu jaringan. Komputer menggunakan pola pengulangan ini untuk membentuk sebuah gambar yang dapat dilihat melalui monitor. Gambar yang dihasilkan dapat memperlihatkan tonjolan yang padat dan berisi cairan. Tonjolan yang berisi cairan dapat berupa *cyst*, bukan kanker. Jika tonjolan padat, maka ada kemungkinan tonjolan tersebut adalah kanker.

d) *Magnetic Resonance Imaging (MRI)*

MRI menggunakan kekuatan magnet yang dihubungkan dengan computer. Hasil dari MRI dapat memperlihatkan bagian yang detail dari jaringan payudara.

e) Biopsi

Diagnosis lain yang dapat dilakukan adalah biopsi, yaitu pembedahan yang dilakukan untuk mengangkat jaringan payudara untuk mengetahui adanya kanker atau tidak.

Terdapat beberapa jenis kanker payudara, diantaranya kanker payudara non-invasif antara lain *Ductal carcinoma in situ (DCIS)* dan *Lobular carcinoma in situ (LCIS)*, sedangkan kanker yang bersifat invasif IDC (*Invasif ductal carcinoma*) dan ILC (*Invasif lobul carcinoma*) (Ferlay, Hery, Autier, & Sankaranarayanan, 2010). Selain itu, jenis kanker payudara yang lain adalah *Paget's Disease* yang merupakan kasus kanker payudara yang langka, yaitu sel-sel kanker berada pada bagian puting. Bagian puting dan aerola menjadi bersisik, merah, gatal dan teriritasi. Jenis lainnya adalah IBC (*Inflammatory breast cancer*) yang merupakan kasus langka dan agresif dari kanker payudara. Kanker ini biasanya terjadi dengan memerahnya dan membengkaknya payudara, bukan hanya terjadinya benjolan-benjolan (Bellenir, 2009).

Kanker Payudara dibagi menjadi beberapa stadium. Stadium dibagi berdasarkan ukuran dari tumor dan seberapa luas kanker telah menyebar. Beberapa stadium kanker payudara antara lain (NCI, 2005):

a) Stadium 0 (Karsinoma in situ)

○ *Lobular carcinoma in situ* (LCIS)

Sel-sel abnormal membentuk barisan pada lobul. LCIS jarang menjadi kanker yang invasif, namun adanya LCIS meningkatkan resiko terjadinya kanker pada payudara.

○ *Ductal Carcinoma in situ* (DCIS)

Sel-sel abnormal membentuk barisan pada saluran duktal. DCIS disebut juga dengan *intraductal carcinoma*. Sel-sel abnormal belum menyebar keluar saluran duktal, namun jika tidak ditanggulangi maka dapat terjadi kanker.

b) Stadium I

Stadium ini merupakan tahap awal dari kanker payudara invasif. Ukuran tumor tidak lebih dari dua sentimeter. Sel-sel kanker belum menyebar ke jaringan lain.

c) Stadium II

Keadaan dari stadium II adalah salah satu dari dibawah ini

- Ukuran tumor tidak lebih dari dua sentimeter. Kanker telah menyebar ke nodus limfa di bawah lengan
- Ukuran tumor berkisar antara 2-5 sentimeter, namun kanker belum menyebar ke nodus limfa di bawah lengan
- Ukuran tumor berkisar antara 2-5 sentimeter, kanker telah menyebar ke nodus limfa di bawah lengan
- Ukuran tumor lebih dari 5 sentimeter, namun kanker belum menyebar ke nodus limfa di bawah lengan

d) Stadium III

Stadium ini dibagi menjadi stadium IIIA, IIIB dan IIIC

○ Stadium IIIA

- Ukuran tumor tidak lebih dari 5 sentimeter. Kanker telah menyebar ke nodus limfa lengan bawah yang telah menempel satu sama lain ke struktur lain atau kanker telah menyebar ke nodus limfa di belakang tulang dada.

- Ukuran tumor lebih dari 5 sentimeter. Kanker telah menyebar ke nodus limfa lengan bawah baik telah menempel atau belum ke struktur lain atau kanker telah menyebar ke nodus limfa di belakang tulang dada.

- Stadium IIIB

Stadium ini ditandai dengan tumor ukuran berapapun yang telah tumbuh hingga kulit payudara. Pada stadium ini terjadi pembengkakan dan adanya tonjolan pada payudara. Kanker telah menyebar ke nodus limfa lengan bawah dan telah menempel ke struktur lain, atau telah menyebar ke nodus limfa di belakang tulang dada. Terjadi *inflammatory breast cancer*, dimana payudara terlihat merah dan membengkak karena kanker menutup pembuluh limfa pada kulit payudara.

- Stadium IIIC

Stadium ini ditandai dengan tumor ukuran berapapun dan kanker telah menyebar ke nodus limfa di belakang tulang dada dan lengan bawah, atau nodus limfa di atas atau di bawah tulang selangka.

e) Stadium IV

Stadium ini merupakan kanker yang telah bermetastasis, dimana sel-sel kanker telah menyebar ke bagian tubuh yang lain.

Untuk Pengobatan kanker payudara dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain (Bellenir, 2009):

a) Pembedahan

Upaya pembedahan dilakukan untuk mengangkat kanker dari payudara. Proses pembedahan untuk mengangkat kanker dari payudara tanpa harus mengangkat payudaranya sekaligus dapat dilakukan dengan :

- *Lumpectomy*

Pembedahan ini dilakukan hanya untuk mengangkat tonjolan dan sedikit jaringan normal disekitarnya

- Masektomi Parsial

Pembedahan ini dilakukan untuk mengangkat bagian payudara yang terdapat kanker dan sedikit jaringan normal di sekitarnya.

Pembedahan juga dilakukan untuk mengangkat seluruh bagian payudara untuk menghilangkan kanker. Beberapa tipe pembedahannya antara lain :

- Masektomi total
Pembedahan yang dilakukan dengan mengangkat seluruh bagian payudara yang terkena kanker, Beberapa nodus limfa lengan bawah juga diangkat untuk dilakukan biopsi.
 - Masektomi Radikal yang dimodifikasi
Pembedahan yang dilakukan dengan mengangkat seluruh bagian payudara yang terkena kanker, banyak nodus limfa lengan bawah dan terkadang hingga bagian otot dada.
 - Masektomi radikal
Pembedahan yang dilakukan dengan mengangkat seluruh bagian payudara yang terkena kanker, otot dada di bawah payudara dan semua nodus limfa lengan bawah.
- b) Terapi Radiasi
Terapi ini merupakan pengobatan kanker dengan menggunakan sinar x berenergi tinggi atau radiasi tipe lain untuk membunuh sel kanker atau mencegah mereka tetap tumbuh. Terdapat dua jenis radiasi, yaitu radiasi eksternal yang menggunakan mesin di luar tubuh untuk mengirimkan radiasi kepada kanker dan radiasi internal yang menggunakan zat-zat radioaktif yang disimpan dalam jarum, kabel atau kateter dan diletakkan di dekat kanker.
- c) Kemoterapi
Kemoterapi adalah jenis pengobatan kanker yang menggunakan obat-obatan untuk menghentikan pertumbuhan dari sel-sel kanker, baik dengan membunuh sel maupun menghentikan pembelahan sel. Kemoterapi dibagi menjadi dua, yaitu kemoterapi sistemik dan kemoterapi regional. Kemoterapi sistemik adalah kemoterapi dimana obat-obatan dimasukkan secara oral atau injeksi sehingga obat mencapai sel kanker melalui peredaran darah. Kemoterapi regional adalah kemoterapi dimana obat-obatan diletakkan secara langsung ke dalam organ tubuh, sehingga obat-obatan akan menghasilkan efek pada organ tersebut dan sekitarnya.
- d) Terapi Hormon
Terapi hormon adalah pengobatan kanker yang menghilangkan hormon atau menghentikan aktivitasnya dan menghentikan pertumbuhan kanker. Contohnya

Terapi hormon dengan tamoxifen sering diberikan pada pasien stadium awal kanker payudara dan kanker payudara yang telah bermetastasis dan terapi hormon dengan aromatase inhibitor diberikan pada wanita pasca menopause yang mengidap kanker payudara.

2.9. Sel MCF-7

MCF-7 merupakan akronim dari *Michigan Cancer Foundation-7* yang merupakan institusi di mana sel ini berhasil dikembangkan oleh Herbert Soule dan tim pada tahun 1973 (Soule & al, 1975).

Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel MCF-7 berasal dari efusi pleura kanker payudara IDC (*Invasif Ductal Carcinoma*) stadium IV diangkat dari seorang pasien wanita ras kaukasia berumur 69 tahun dalam keadaan menopause. Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain mengekspresikan reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR) sehingga memiliki sifat yang responsif terhadap hormon (Sutherland, Watts, Lee, & Musgrove, 1999). Sel MCF-7 mampu bertahan dalam jangka waktu lama dan memiliki kemampuan membelah yang tak terbatas (*immortal*), melekat (*adesif*) dan membentuk kultur selapis pada dasar labu kultur (*monolayer*) (Freshney, 2005).

2.10. Kultur Sel

Kultur sel adalah kultur yang berasal dari suspensi sel yang diperoleh dari jaringan asli, kultur primer atau dari *cell line* secara enzimatik, mekanis atau disgregasi kimia (Freshney, 2005). Kultur sel pertama ditemukan pada tahun 1970 oleh Ross Harrison (Theodore & Srinivas, 2006) dan kultur sel semakin berkembang dan semakin banyak digunakan terutama pada abad 21 (Freshney, 2005).

Pengujian Menggunakan kultur sel memiliki beberapa keuntungan, antara lain (Freshney, 2005):

- a) Kemudahan dalam hal pengontrolan terhadap lingkungan fisikokimia (pH, suhu, tekanan osmotik, dan tekanan O₂ dan CO₂) yang dapat dikontrol dengan

tepat dan kondisi fisiologis (hormon dan konsentrasi nutrien) yang dapat dijaga untuk relatif konstan.

- b) Dapat memilih media selektif sehingga sel-sel yang terbentuk menjadi lebih homogen.
- c) Sel kultur juga bersifat ekonomis jika diuji sitotoksitas, karena penggunaan untuk reagen akan menjadi lebih sedikit apabila dibandingkan dengan injeksi secara *in vivo*, dimana 90% akan hilang dalam ekskresi dan distribusi ke jaringan lain yang bukan dimaksudkan untuk pengujian.
- d) Pengujian dengan sel kultur tersedia dalam bentuk mikrotiter dan robotik sehingga mekanisasinya menjadi lebih mudah. Proses perhitungannya pun mudah dan adanya sel kultur mengurangi penggunaan binatang percobaan dalam pengujian.

Terdapat dua jenis sel yang biasa digunakan dalam proses kulturisasi, yaitu (Theodore & Srinivas, 2006) :

a) *Adhesive cell*

Sel ini bersifat adhesif atau menempel pada substrat, sehingga sel ini akan membentuk lapisan tipis selapis (monolayer) di dasar labu kultur dan harus dilakukan tripsinisasi untuk proses subkultur.

b) *Suspension cell*

Sel ini tidak bersifat adhesif, sehingga untuk menumbuhkannya sel ini ditempatkan dalam media suspensi. Untuk proses subkultur tidak perlu dilakukan tripsinisasi, karena itu proses subkultur menjadi lebih mudah.

Sel yang tumbuh selama proses kulturisasi memiliki 3 tahap fase pertumbuhan, yaitu (Theodore & Srinivas, 2006) :

a) Fase Lag

Pada fase ini belum terjadi pertumbuhan sel karena sel sedang melakukan persiapan untuk melakukan pertumbuhan.

b) Fase Log

Pada fase ini terjadi pertumbuhan sel yang sangat cepat dengan menggunakan medium dari media kultur dan pertumbuhan sel terjadi secara eksponensial.

c) Fase Stasioner

Pada fase ini pertumbuhan akan melambat karena adanya akumulasi zat toksik akibat zat-zat buangan yang dilepaskan ketika tumbuh dan semakin sedikitnya nutrisi yang tersedia dalam media kultur.

Faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan sel pada kultur adalah pemilihan medium kultur jaringan. Terdapat banyak formula media untuk kultur jaringan dan masing-masing laboratorium harus menentukan medium mana yang paling cocok dengan kebutuhan masing-masing kultur. Selain menyediakan nutrisi pertumbuhan untuk sel, medium juga umumnya ditambahkan suplemen seperti antibiotik, fungisida atau keduanya untuk menghambat kontaminasi. Sifat fisikokimia yang harus dimiliki media kultur dan substrat lain dalam menumbuhkan sel kultur adalah (Freshney, 2005) :

a) pH

Kebanyakan sel akan tumbuh baik pada pH 7,4. Meskipun ada beberapa sel yang akan tumbuh optimum pada pH yang berbeda seperti sel fibroblas pada pH 7,4-7,7 dan sel epidermal pada pH 5,5.

b) CO₂ dan bikarbonat

Kandungan CO₂ dan bikarbonat yang terlarut akan menentukan pH dalam media.

c) Oksigen

Kandungan oksigen diperlukan untuk respirasi sel. Namun apabila kandungan oksigen terlalu banyak maka akan menjadi toksik bagi sel karena adanya pembentukan senyawa radikal bebas. Karena itu terkadang ke dalam medium juga ditambahkan zat-zat antioksidan untuk mencegah terjadinya pembentukan radikal bebas.

d) Dapar

Penambahan dapar pada media dilakukan dengan alasan adanya proses *open dishes* yang menyebabkan pH meningkat atau terjadinya produksi berlebih pada CO₂ dan asam laktat sehingga nilai pH menurun.

e) Osmolalitas

Osmolalitas yang biasa digunakan untuk kultur sel manusia adalah 290 mosmol/kg dan nilai ini biasanya merupakan osmolalitas optimum untuk kultur sel manusia secara *in vitro*.

f) Temperatur

Temperatur optimal untuk kultur sel bergantung pada temperatur dari hewan/manusia asal sel tersebut diambil, variasi temperatur anatomi (misalnya, suhu pada kulit dan testis akan lebih rendah dari suhu bagian tubuh lain) dan adanya faktor keselamatan yang memungkinkan adanya kesalahan pada saat penjagaan suhu pada regulator. Namun pada umumnya temperatur yang direkomendasikan untuk sel dari manusia dan hewan berdarah panas adalah 37°C.

g) Viskositas

Viskositas dalam medium kultur dipengaruhi oleh serum yang terdapat pada medium dan menyebabkan sedikit pengaruh pada pertumbuhan sel. Viskositas akan diperlukan pada saat pengadukan suspensi sel atau tripsinisasi dimana kerusakan sel dapat berkurang dengan meningkatnya viskositas. Untuk meningkatkan viskositas dapat digunakan *carboxymethylcellulose* (CMC) atau *polyvinylpyrrolidone* (PVP).

2.11. Uji Sitotoksitas Secara *In Vitro*

Uji sitotoksitas secara *in vitro* lebih banyak dipilih untuk menguji obat-obat antikanker yang merusak sel secara langsung karena biayanya lebih murah, mudah dihitung dan bersifat reproduibel (Freshney, 2005). Metode yang sering digunakan antara lain :

a) Uji Viabilitas Sel

Metode ini digunakan untuk mengukur proporsi sel yang hidup terhadap sel yang mati setelah menerima perlakuan yang traumatik. Kebanyakan metode ini berdasarkan pengrusakan integritas membran dengan metode pengambilan zat warna atau *dye uptake*. Zat warna dibagi menjadi dua, yaitu zat warna yang diserap oleh sel mati (seperti biru tripan, eritrosin dan *naphtalene black*) dan

zat warna yang diserap oleh sel hidup, (seperti diasetil fruooresein dan merah netral). Untuk uji sitotoksisitas dengan merah netral, sel yang hidup akan mengambil merah netral dari medium kultur dan menyimpannya pada bagian lisosom. Uji ini tidak menghitung jumlah sel tetapi pengurangan nilai absorbansi pada panjang gelombang 570 nm (Freshney, 2005).

b) Uji sitotoksisitas dengan metode MTT

Prinsip dari metode ini adalah terjadinya perubahan zat warna MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) yang larut air berwarna kuning yang akan direduksi oleh sel-sel hidup menjadi produk senyawa formazan yang berwarna ungu dan tidak larut dalam air. Adanya senyawa sitotoksik akan menyebabkan penurunan intensitas warna ungu dari formazan yang akan diimbangi dengan penurunan absorbansi pada spektrofotometer. Reaksi ini dapat dilakukan di pelat mikrotiter dan diukur serapannya pada panjang gelombang 570 nm. Parameter yang digunakan untuk hasil metode ini adalah IC_{50} yang merupakan konsentrasi yang dapat menurunkan nilai absorbansi sebanyak 50% dari absorbansi kontrol negatif (Freshney, 2005).

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI dan Laboratorium Kultur Jaringan dan Mikrobiologi Instalasi Penelitian dan Pengembangan Rumah Sakit Kanker Dharmais selama kurang lebih 8 bulan, terhitung sejak bulan Maret 2010 sampai Oktober 2010.

3.2. Bahan

3.2.1. Sampel

Isolat kapang endofit yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 4 isolat, yaitu isolat RP1, RF2, RF5 dan AP3 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI. Penamaan isolat mengikuti penamaan yang diberikan peneliti sebelumnya yang terdiri dari 3 digit tata nama. Digit pertama dan kedua merupakan kode asal tanaman di mana kapang endofit berasal, yaitu kode RP untuk ranting tanaman *Garcinia porrecta* Wall, kode RF untuk ranting *Garcinia forbesii* King dan kode AP untuk akar *Garcinia porrecta* Wall. Sedangkan digit terakhir merupakan nomor urut kapang yang menjelaskan digit kedua dan ketiga (nomor urut kapang yang diisolasi dari satu bagian tanaman yang sama).

3.2.2. 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 dengan spesifikasi yang dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.2.3. Bahan Kimia

Dimetil sulfoksida/DMSO (Sigma), *fetal calf serum* (Caisson Labs Inc.), sisplatin (Platosin®, PHarmachemie B.V.), *phosphate buffered saline*, penisilinstreptomisin (Gibco), HEPES, merah netral (Merck), biru tripan (Merck),

natrium dodesil sulfat (Merck), tripsin-EDTA (Gibco), NaHCO₃ (Merck), CaCO₃ (Merck), etil asetat teknis, n-butanol teknis, metanol teknis, *lactophenol cotton blue*, air laut (Pulau Belanda, Kepulauan Seribu Jakarta), air suling, aquabides.

3.2.4. Medium

- a. PDA cawan petri (*plate*) dan agar miring (*slant*) untuk peremajaan kapang 39 g *Potato Dextrose Agar/PDA* (Difco) dan 1 liter air suling.
- b. PDY untuk fermentasi kapang endofit *Potato Dextrose Yeast*, yang terdiri dari 24 g *Potato Dextrose Broth/PDB* (Difco), 4 g *Yeast Extract* (Oxoid), 5 g CaCO₃ dan 1 liter air suling.
- c. RPMI 1640 sebagai medium kultur sel kanker MCF-7 10,4 g serbuk *Rosewell Park Memorial Institute 1640/RPMI 1640* (Gibco), 2 g NaHCO₃, 100 mg penisilin-streptomisin (Gibco) dan 1 liter air suling.

3.3. Peralatan

Kabinet laminar (Forma Scientific), inkubator sel dengan aliran oksigen 95% dan karbondioksida 5% (Forma Scientific), tangki nitrogen cair (Locator JR Thermolyne), labu kultur jaringan/*culture flask* 40 ml (Nunclon), pelat kultur jaringan 96 sumuran/*tissue culture plate* (Nunclon), mikroskop (Nikon TMS dan Euromex), ELISA *Plate Reader* (Stat Fax-2100, Awareness Technology Inc.), sentrifugator (Kubota dan Porta Centrifuge), neraca analitik (Precisa 300A), vortex mixer (VM 2000), pH meter (Meterlab), hemositometer (Improved Neubauer, Superior Marienfeld), penyaring berdiameter pori 0,2 mm steril (Nalgene), spuit 10 ml steril (Terumo), pipet serologik 5,0 ml steril (Falcon), mikropipet (Eppendorf), tabung sentrifugasi (Falcon) dan tabung Eppendorf 1,0 ml (Eppendorf) dan program SPSS 18.

3.4 Cara Kerja

3.4.1. Peremajaan Isolat Kapang Endofit

3.4.1.1. Pembuatan Medium Lempeng PDA pada Cawan Petri

PDA (*Potato Dextrose Agar*) ditimbang sebanyak 39 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dalam 1 liter *air suling*. Kemudian diaduk hingga larut dan homogen kemudian dididihkan selama 1 menit hingga seluruh bahan larut sempurna. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu mencapai 45-50°C lalu dituang ke dalam cawan petri masing-masing secukupnya lalu media dibiarkan memadat (Taqwim, 2008).

3.4.1.2. Pembuatan PDA Agar miring

PDA (*Potato Dextrose Agar*) ditimbang sebanyak 39 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dalam 1 liter air suling. Kemudian diaduk hingga larut dan homogen kemudian dididihkan selama 1 menit hingga seluruh bahan larut sempurna. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu mencapai 45-50°C lalu tuang ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml dan tabung diletakkan miring 45°. Selanjutnya media dibiarkan memadat (Taqwim, 2008).

3.4.1.3. Peremajaan Isolat Kapang Endofit

Kapang endofit yang telah diisolasi dari tumbuhan inangnya dipindahkan dengan menggunakan ose steril ke lempeng PDA, hal ini dilakukan duplo. Selanjutnya lempeng PDA diinkubasi pada suhu 25°C (suhu kamar) selama 5 hari. Kemudian pada bagian hifa diambil sebagian dengan menggunakan ose steril lalu dipindahkan ke PDA agar miring, hal ini dilakukan duplo. Selanjutnya PDA agar miring dibagi menjadi dua yaitu *stock culture* dan *work culture* dimana *work culture* diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 hari dan *stock culture* disimpan pada suhu *freezer* (Taqwim, 2008).

3.4.2. Identifikasi Kapang Endofit

Untuk mengidentifikasi kapang endofit digunakan metode makroskopik dan mikroskopik. Metode makroskopik dilakukan dengan cara mengidentifikasi kapang endofit dengan mengamati bentuk morfologi dan kecepatan pertumbuhannya, sedangkan metode mikroskopik digunakan dengan cara pewarnaan dengan *lactofenol cotton blue*. Untuk melaksanakan metode mikroskopik ini adalah dengan mengambil bagian hifa dengan menggunakan ose steril ke kaca objek, lalu ditambahkan setetes larutan alkohol 70% dan *lactofenol cotton blue*. Kaca objek ditutup lalu diamati di bawah mikroskop (Taqwim, 2008).

3.4.3. Isolasi Metabolit Sekunder dari Kapang Endofit

3.4.3.1. Pembuatan Medium Fermentasi

Fermentasi kapang endofit dilakukan di dalam medium PDY (*Potato Dextrose Yeast*). Untuk membuat PDY, PDB (*Potato Dextrose Broth*) ditimbang sebanyak 24 g, *yeast extract* sebanyak 4 g dan 5 g kalsium karbonat ke dalam labu bulat, lalu dilarutkan dengan 1 liter air suling. Kemudian diaduk dengan pemanasan dan pengadukan sekali-kali dan dididihkan selama 1 menit untuk melarutkan serbuk dengan sempurna. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituang sebanyak 500 ml ke dalam labu Erlenmeyer 1000 ml (Fachri, 2009).

3.4.3.2. Fermentasi

Agar PDA pada cawan petri dipotong sebesar 2x2 cm² kemudian diinokulasi dalam PDY (*Potato Dextrose Broth*) sebanyak 500 ml. Setelah itu difermentasi dengan alat *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 14 hari (Fachri, 2009).

3.4.3.3. Ekstraksi

Suspensi koloni kapang endofit yang diperoleh dari proses fermentasi dibagi menjadi 3 bagian. Bagian pertama disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit dan supernatan yang diperoleh dipisahkan dari endapan biomasnya dan

menjadi larutan uji ekstrak air. Ke dalam endapan biomassa, ditambahkan pelarut metanol ditambahkan dan dihomogenkan dengan *vortex* selama 5 menit.

Setelah itu, campuran biomassa dan metanol disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit dan dipisahkan lapisan supernatan dari biomasanya. Supernatan yang diperoleh menjadi larutan uji ekstrak metanol. Suspensi koloni kapang bagian kedua dan ketiga masing-masing diekstraksi dengan etil asetat dan n-butanol (Taqwim, 2008). Larutan pengestrak ditambahkan ke dalam suspensi koloni kapang sebanyak 50% dari volume suspensi koloni kapang endofit yang diperoleh, dihomogenkan dengan vorteks selama 5 menit lalu disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian dipisahkan dari biomasanya dan menjadi larutan uji ekstrak etil asetat dan ekstrak butanol.

3.4.3.4. Pengeringan Hasil Fermentasi

Hasil ekstrak diuapkan dengan *waterbath* menggunakan cawan penguap dengan suhu 30-40°C, setelah ekstrak mengental, dipindahkan ke dalam vial-vial dimana bagian atasnya ditutup kertas aluminium foil yang telah dilubangi kecil-kecil. Setelah itu ekstrak kental di dalam vial dikeringkan di dalam oven yang bersuhu 30°C hingga kering.

3.4.4. Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis

Pemisahan senyawa dilakukan dengan cara mengelusi ekstrak yang diperoleh pada lempeng silika gel yang telah diaktivasi dengan cara dicuci dengan metanol kemudian dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Ekstrak kemudian ditotolkan pada lempeng dengan berbagai eluen dengan berbagai perbandingan dan dilihat bercak hasil elusi pada sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 240-366 nm.

3.4.5. Uji Toksisitas dengan Menggunakan Metode BSLT

3.4.5.1. Penetasan Telur *Artemia salina* Leach.

Penetasan telur dilakukan pada wadah bening seperti gelas kimia atau stoples yang diberi bahan plastik, negatif film atau kaca dengan menggunakan media air laut. Wadah penetasan dibagi menjadi dua bagian terang dan gelap oleh suatu sekat berlubang dengan ukuran lubang 0,5x0,5 cm². Bagian gelap digunakan untuk meletakkan telur yang akan ditetaskan dan dibuat dengan cara melapisi sebagian wadah dengan karton hitam. Sekat berlubang menjadi jalan bagi larva yang telah lahir untuk bergerak secara alamiah ke arah terang. Selama penetasan suhu harus dijaga agar tetap berkisar 25-30°C dengan menggunakan lampu pijar 40 watt (Sorgeloos & Persoone, 1975).

Sebagai media penetasan telur digunakan air laut yang diperoleh secara komersil dari Pulau Belanda Kepulauan Seribu Jakarta yang diambil pada jarak 5 m dari tepi laut dan pada kedalaman 3 m dengan salinitas 33-35%. Kadar oksigen yang dibutuhkan selama penetasan harus lebih dari 3 mg/l, sehingga media air laut harus diberi udara dengan aerator. Telur *Artemia salina* ditimbang 100-150 mg dan dimasukkan ke dalam wadah yang telah diisi air laut sebanyak 500 ml. Dalam waktu 36-24 jam biasanya telur-telur yang sudah menetas menjadi larva yang disebut dengan *naupili*. *Naupili* aktif yang telah berumur 48 jam digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian (Harmita & Radji, 2008).

3.4.5.2. Uji Toksisitas

Sampel yang akan diuji dibuat larutan induk dengan konsentrasi 5000 ppm, kemudian dari larutan induk dipipet dengan menggunakan mikropipet masing-masing 5µL, 50µL dan 500 µL ke dalam vial uji. Setelah dipipet kemudian larutan di dalam vial uji dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Selanjutnya setelah kering, larutan uji ditambahkan air laut berisi *Artemia salina* sebanyak 10 ekor sehingga volumenya mencapai 2,5 ml sehingga diperoleh konsentrasi 10, 100 dan 1000 ppm. Jika ekstrak tidak larut dalam air laut maka dapat dilarutkan dengan DMSO terlebih dahulu beberapa tetes. Untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan (triplikat). Untuk

kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel dan ditambahkan beberapa tetes DMSO apabila pada larutan uji ditambahkan. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan yang masih hidup dari tiap konsentrasi. Nilai toksisitas dihitung dengan cara probit (Juniarti, Osmeli, & Yuhernita, 2009).

3.4.6. Uji Sitotoksitas terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

3.4.6.1. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak dibuat konsentrasi 20.000 ppm dengan cara dilarutkan dalam DMSO. Larutan ini kemudian dinamakan larutan induk I. Larutan induk I kemudian dipipet sebanyak 50 μ l kemudian diencerkan dengan 950 μ l medium RPMI 1640, sehingga diperoleh larutan induk II dengan konsentrasi 1 μ g/ μ l. Seluruh pengerjaan dilakukan secara aseptis di dalam ruang LAF (*Laminar Air Flow*). Larutan induk II dipipet masing-masing sebanyak 20, 100, 200, 300, dan 400 μ l, kemudian dilakukan pengenceran dengan medium RPMI 1640 masing-masing sebanyak 980, 900, 800, 700, dan 600 μ l, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji 20, 100, 200, 30, dan 400 μ g/ml.

3.4.6.2. Pembuatan Larutan Sisplatin (Blanko Positif)

Sediaan sisplatin merupakan larutan dengan konsentrasi 10mg/20ml atau 500 ppm. Dari larutan ini dipipet sebanyak 100, 200, 400, 600, dan 800 μ l dan kemudian ditambahkan media RPMI 1640 masing-masing 900, 800, 600, 400, dan 200 μ l, sehingga diperoleh konsentrasi 50, 100, 200, 300, dan 400 ppm.

3.4.6.3. Pembuatan Blanko DMSO 2%

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

3.4.6.4. Pembuatan Media RPMI 1640

Media RPMI 1640 yang terdapat dalam *sachet* dengan berat 10,4 g dan mengandung L-glutamin dituang ke dalam gelas piala. Selanjutnya NaHCO_3 ditimbang sebanyak 2 g dan dapar HEPES ditimbang sebanyak 0,52 g dan dimasukkan ke dalam gelas piala. Kemudian ke dalam gelas piala ditambahkan aquabides sebanyak 800 ml sambil diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. kemudian dilakukan pengaturan pH dengan menambahkan NaOH 1M dan HCl 1M hingga pH menunjukkan angka 7,4. Selanjutnya antibiotik penisilin-streptomisin ditambahkan ke dalam larutan sebanyak 10 ml (sediaan penisilin-streptomisin yang tersedia mengandung 10.000 UI/ml penisilin dan 10.000 mg/ml). Setelah itu larutan dicukupkan volumenya dengan aquabides hingga 1000 ml. Selanjutnya larutan disaring dengan menggunakan filter bakteri dengan diameter 0,2 μm ke dalam botol *schott*. Setelah disaring, botol disegel dengan menggunakan parafilm dan disimpan dalam kulkas pada suhu -2°C hingga -8°C .

3.4.6.5. Pembuatan Larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS)

Sediaan PBS dengan konsentrasi 10 kali dipipet sebanyak 100 ml dan dimasukkan ke dalam gelas piala 1000 ml. Selanjutnya ditambahkan aquabides ke dalam gelas piala sebanyak 800 ml sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya dilakukan pengaturan pH dengan menambahkan HCl 1M dan NaOH 1M hingga pH menunjukkan angka 7,4. Setelah itu volum dicukupkan hingga 1000 ml dan larutan PBS dituang ke dalam botol *schott*. Selanjutnya botol disegel dengan parafilm dan disimpan dalam kulkas suhu -2°C hingga -8°C .

3.4.6.6. Pembuatan Tripsin 0,25%

Larutan sediaan tripsin 0,5% dicairkan dalam waterbath pada suhu 37°C . Selanjutnya sebanyak 10 ml larutan tripsin 0,5% dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung *conical*. Kemudian ke dalam tabung *conical* dicukupkan volumenya dengan PBS hingga 20 ml lalu dihomogenkan. Selanjutnya larutan tripsin disaring dengan menggunakan filter bakteri diameter 0,2 μm dan disimpan ke dalam tabung eppendorf 1 ml sebanyak 20 buah. Selanjutnya tabung eppendorf disegel dengan menggunakan parafilm dan disimpan di kulkas pada suhu freezer -20°C .

3.4.6.7. Pembuatan Larutan *Sodium Dodesil Sulfate* (SDS) 1%

Sodium dodesil sulfat ditimbang sebanyak 1 g lalu dilarutkan dalam 100 ml aquabides. Selanjutnya dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Setelah itu larutan SDS 1% disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.6.8. Pembuatan Larutan Merah Netral 0,5%

Larutan merah netral 1% dipipet sebanyak 25 ml dan dicukupkan volumenya dengan air suling hingga 50 ml, selanjutnya larutan dihomogenkan.

3.4.6.9. Pencairan Sel MCF-7

Tabung berisi sel dikeluarkan dari tangki nitrogen cair dan dimasukkan dalam penangas air bersuhu 37°C selama 3 menit. Seluruh cairan sel dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, ditambahkan 5 ml RPMI 1640 kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 6 ml RPMI 1640 yang mengandung 20% FCS. Suspensi sel dipipet dan dimasukkan ke dalam labu kultur lalu diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator.

3.4.6.10. Subkultur

Labu kultur berisi sel yang telah penuh dikeluarkan dari inkubator sel. Seluruh medium dalam labu kultur dipipet dan dibuang. Kultur sel dicuci sebanyak 2 kali, masing-masing dengan 10 ml PBS sambil digoyang-goyangkan. Kemudian ke dalam labu kultur ditambahkan 3 ml larutan tripsin (untuk melepaskan sel-sel yang melekat pada dasar labu kultur), kemudian sel diinkubasi selama 10 menit dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Ke dalam labu kultur ditambahkan 1 ml RPMI 1640. Seluruh cairan sel dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 6 ml RPMI 1640 yang mengandung 20% FCS. Suspensi sel dibagi menjadi dua bagian masing-masing sebanyak 3 ml yang dipipet dan dimasukkan ke dalam 2 buah labu kultur baru, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ sampai

tingkat kepadatannya baik, yaitu jika sel telah memenuhi seluruh permukaan labu kultur (Fachri, 2009).

3.4.6.11. Pemeliharaan Kultur Sel MCF-7

Sel diperiksa setiap hari di bawah mikroskop untuk memeriksa kemungkinan kontaminasi oleh jamur dan bakteri. Apabila medium kultur telah berubah warna maka harus diganti dengan medium RPMI 1640 yang baru (Fachri, 2009).

3.4.6.12. Perhitungan Kepadatan Sel MCF-7

Kultur sel yang telah diinkubasi selama 3 hari diamati dengan mikroskop untuk mengetahui tingkat kepadatannya. Apabila baik maka sel dapat digunakan, dan apabila tidak maka sel harus diinkubasi kembali hingga diperoleh kepadatan yang optimal. Medium dalam labu kultur dipipet dan dibuang. Kultur sel dicuci sebanyak 2 kali, masing-masing dengan 10 ml PBS. Ke dalam labu kultur ditambahkan 3 ml tripsin, kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam inkubator CO₂. Kemudian ke dalam labu ditambahkan 1 ml RPMI 1640, kemudian cairan selnya dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan kembali dalam 1 ml RPMI 1640. suspensi sel dipipet sebanyak 100 µl dan ditambahkan 900 µl larutan biru tripan 0,4% .

Hemositometer bersih dengan kaca penutup diletakkan mendatar di atas meja. Lebih kurang 20 µl suspensi sel dalam larutan biru tripan dipipet, lalu ujung pipet disentuhkan pada 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 hemositometer. Sel dihitung dari keempat bidang besar pada sudut seluruh permukaan yang terbagi. Perhitungan dimulai dari sudut kiri atas, lalu ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri, lalu turun lagi ke bawah 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 (Fachri, 2009). Jumlah sel per ml dihitung dari jumlah rata-rata sel dalam keempat bidang besar dikalikan faktor pengenceran dan dibagi dengan volume satu bidang besar (setiap bidang besar memiliki volume 10^{-4} ml).

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

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

3.4.6.13. 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:

$$P_1 V_1 = P_2 V_2$$

Keterangan: P_1 adalah kepadatan sel hasil perhitungan. V_1 adalah volum suspensi sel yang dibutuhkan untuk pengenceran. P_2 adalah kepadatan sel yang dikehendaki dalam sumur uji dan V_2 adalah volum total suspensi sel yang akan diisikan ke dalam sumur uji suspensi sel yang dikehendaki untuk mengisi tiap sumuran sebanyak 100 μ L adalah dengan kepadatan 30000 sel/ml (Fachri, 2009).

3.4.6.14. Pengujian Sitotoksitas 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 diinkubasikan selama 24 jam. Pemetaan pelat uji sitotoksitas dapat dilihat di Lampiran 20.

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 ditambahkan 100 μ l larutan uji masing-masing dalam konsentrasi 20, 100, 200, 300, dan 400 μ g/ml, sehingga diperoleh konsentrasi akhir 10, 50, 100, 150, dan 200 μ g/ml. Pada sumur kontrol negatif ditambahkan 100 μ l medium RPMI 1640, sedangkan pada sumur kontrol positif

ditambahkan larutan sisplatin dengan konsentrasi 50, 100, 200, 300, dan 400 µg/ml sehingga diperoleh konsentrasi akhir 25, 50, 100, 150 dan 200 µg/ml. Pada sumur blanko ditambahkan 100 µl larutan DMSO dalam medium RPMI 1640 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 µl merah netral 0,5% 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 200 µl PBS. Kemudian ke dalam tiap sumuran ditambahkan 200 µl 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 570 nm (Fachri, 2009).

3.4.6.15. Perhitungan Persentase Kematian Sel MCF-7

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

$$\frac{\text{Serapan kontrol DMSO} - \text{Serapan larutan uji}}{\text{Serapan kontrol DMSO}} \times 100\%$$

Sedangkan perhitungan persentase kematian sel MCF-7 oleh sisplatin dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

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

3.4.6.16. Analisis Data

Dari data persentase kematian sel MCF-7, ditentukan nilai LC_{50} melalui analisis regresi linier, analisis varian (ANOVA) satu arah untuk melihat hubungan antar perlakuan dengan persentase kematian sel dan uji beda nyata terkecil sebagai analisis lanjutan ANOVA. Sebelumnya dilakukan uji kenormalan Shapiro-Wilk dan homogenitas Levene terlebih dahulu.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian kali ini digunakan 4 isolat kapang endofit dari dua tumbuhan yaitu *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall. Keempat kapang isolat itu antara lain RP1 dan AP3 yang berasal dari ranting dan akar *Garcinia porrecta* dan RF2 dan RF5 yang keduanya berasal dari ranting *Garcinia forbesii*. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa kedua tumbuhan ini mempunyai beberapa aktivitas farmakologis, seperti antimikroba, antiviral, antimalaria, antiproliferasi dan antioksidan (Phongpaichit, et al., 2007) begitu juga kapang endofit yang terdapat bersamanya, memiliki beberapa aktivitas biologis, seperti antioksidan dan antimikroba (Harrison, Leong, Sia, & Sim, 1993).

Penelitian yang dilakukan oleh Taqwim (2008) menunjukkan bahwa kapang endofit yang diisolasi olehnya memiliki aktivitas antimikroba dan sifat toksisitas terhadap udang *Artemia salina*. Penelitian dilakukan lebih lanjut oleh penulis untuk melihat aktivitas farmakologisnya sebagai antikanker yang diujikan terhadap sel kanker payudara MCF-7.

Untuk melakukan pengujian dilakukan terlebih dahulu peremajaan terhadap isolat-isolat yang merupakan stok koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI. Peremajaan kapang dilakukan dengan menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA), karena media ini umum digunakan untuk menumbuhkan jamur (Stevens, 1974).

Selanjutnya dilakukan identifikasi pada keempat isolat kapang endofit yang telah diremajakan. Identifikasi dilakukan dengan dua cara, yaitu identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Untuk identifikasi makroskopis diamati warna, permukaan dan kecepatan pertumbuhan.

Identifikasi yang dilakukan secara mikroskopis dilakukan dengan cara menambahkan larutan *lactofenol cotton blue* ke hifa yang diambil dari isolat yang kemudian diletakkan di gelas objek. *Lactofenol cotton blue* akan mematikan fungsi karena adanya fenol. Fenol dengan konsentrasi tinggi akan menon-aktifkan enzim-enzim selular namun tidak menyebabkan sel fungi lisis. Kemudian pewarna

cotton blue akan mewarnai kitin pada dinding sel fungi (*Lactofenol*, 2006). Setelah ditetaskan maka objek gelas ditutup dan diamati di bawah mikroskop.

4.1. Hasil Identifikasi

4.1.1. Isolat RP1

Isolat ini diisolasi dari bagian ranting tumbuhan *Garcinia porrecta* Wall. Identifikasi secara makroskopis menunjukkan bahwa isolat ini memiliki kecepatan pertumbuhan dimana pada umur 11 hari dapat tumbuh dengan diameter sepanjang 4,3 cm. Warna dari isolat ini adalah putih seluruhnya dengan permukaan berbulu sangat halus atau hampir rata. Pada beberapa peremajaan isolat ini mengeluarkan eksudat yang berwarna kekuningan. Warna di sebalik penampang adalah jingga dan dapat merubah warna media turut menjadi jingga.

Untuk identifikasi secara mikroskopis, pada perbesaran 400 kali isolat ini mempunyai hifa yang sangat halus dan konidiofor yang membulat. Isolat ini mempunyai sangat sedikit konidia, dan ditemukan dengan bentuk bulatan-bulatan kecil.

4.1.2. Isolat AP3

Isolat ini diisolasi dari bagian akar tumbuhan *Garcinia porrecta* Wall. Identifikasi secara makroskopis menunjukkan bahwa isolat ini memiliki kecepatan pertumbuhan yang paling lambat di antara kecepatan pertumbuhan keempat isolat lainnya. Isolat ini pada hari ke 7 hanya tumbuh dengan diameter 3 cm. Isolat ini memiliki warna putih pada awal pertumbuhannya, namun pada hari ke 5 bagian tengahnya mulai membentuk gumpalan dan berwarna sedikit kecokelatan. Warna sebalik penampang menunjukkan isolat ini memiliki warna putih dan tidak merubah warna medianya.

Untuk identifikasi secara mikroskopis, isolat ini memiliki hifa yang bersekat dan memiliki konidia yang berwarna kecokelatan dilihat pada perbesaran mikroskop 400 kali.

4.1.3. Isolat RF2

Isolat ini diisolasi dari bagian ranting tumbuhan *Garcinia forbesii* King. Isolat ini berwarna hitam kehijauan dan warna sebalik penampang juga memiliki warna yang sama. Permukaan isolat ini sangat kasar, dan pada hari ke 7 dapat tumbuh dengan diameter 4 cm. Untuk identifikasi secara mikroskopis dengan perbesaran 400 kali, dapat dilihat hifa memanjang berwarna hitam, memiliki konidia yang melonjong dan berkelompok.

4.1.4. Isolat RF5

Isolat ini diisolasi dari bagian ranting tumbuhan *Garcinia forbesii* Knig. Isolat ini memiliki warna ungu muda dengan bagian tepi berwarna putih, baik tampak depan maupun sebaliknya. Isolat ini tidak merubah warna media. Pada hari ke 7 isolat ini dapat tumbuh hingga diameter 4,2 cm. Isolat ini memiliki banyak spora, sehingga pada proses peremajaan seringkali terjadi penyebaran spora dalam cawan petri sehingga menghasilkan banyak bercak. Untuk identifikasi mikroskopis dengan perbesaran 400 kali, isolat ini memperlihatkan hifa yang pendek dengan ujung membulat dan konidia yang sangat banyak berbentuk bulat kecil.

4.2. Fermentasi dan Ekstraksi

Proses fermentasi dilakukan agar kapang endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder yang untuk selanjutnya digunakan untuk pengujian sitotoksisitas terhadap sel MCF-7. Kapang endofit yang digunakan untuk proses fermentasi adalah kapang yang telah berumur 7-14 hari, dimana pertumbuhan kapang endofit sedang berlangsung secara optimum. Proses fermentasi dilakukan dengan cara menginokulasikan potongan kapang endofit sebesar $2 \times 2 \text{ cm}^2$ ke dalam media fermentasi, yaitu *Potato Dextrose Yeast* (PDY) yang dibuat dengan cara menambahkan *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebagai sumber karbon dan *Yeast Extract* sebagai sumber nitrogen (Theodore & Srinivas, 2006). Media PDY ini juga perlu ditambahkan kalsium karbonat, untuk meningkatkan pH larutan karena pada proses fermentasi ini dihasilkan beberapa senyawa asam.

Setelah diinokulasikan ke dalam media PDY selanjutnya dilakukan penggojokan dengan menggunakan alat *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Hal ini dimaksudkan untuk menambahkan kadar oksigen dalam media sehingga kebutuhan oksigen untuk proses fermentasi aerob tetap terjaga. Fermentasi dilakukan selama 14 hari, dimana pada hari ke-14 kapang endofit telah mencapai kondisi stasioner. dan kondisi ini diperlukan untuk memanen hasil metabolit sekunder secara maksimum (Kubicek & Druzhinina, 2007).

Hasil fermentasi isolat kapang endofit berupa suspensi, dimana isolat akan membentuk gumpalan-gumpalan kecil berbentuk bulatan-bulatan kecil di dasar labu dan beberapa isolat merubah warna dari media, seperti RF5 yang mengubah warna media menjadi kehijauan dan RF2 yang mengubah warna media menjadi berwarna hitam. Suspensi ini yang digunakan untuk proses selanjutnya yaitu proses ekstraksi. Suspensi hasil fermentasi dibagi menjadi 3 bagian, bagian pertama digunakan untuk memperoleh ekstrak air dan metanol, bagian kedua digunakan untuk memperoleh ekstrak n-butanol dan bagian ketiga digunakan untuk memperoleh ekstrak etil asetat. Proses ekstraksi menggunakan pelarut yang berbeda-beda berdasarkan polaritasnya, yaitu air, metanol, n-butanol dan etil asetat. Hal ini dimaksudkan untuk memperoleh senyawa dengan polaritas yang berbeda dan dapat diketahui pelarut mana yang dapat melarutkan metabolit sekunder dengan aktivitas sitotoksisitas terbaik.

Bagian suspensi pertama dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk menghasilkan endapan dan supernatan dimana supernatan dikumpulkan menjadi ekstrak air. Endapan yang dihasilkan ditambahkan metanol, kemudian *divortex* selama 5 menit agar metabolit sekunder dapat tertarik seluruhnya, lalu kembali di sentrifugasi. Supernatan dikumpulkan dan menjadi ekstrak metanol. Bagian kedua dan ketiga ditambahkan pelarut masing-masing, yaitu n-butanol dan etil asetat, kemudian *divortex* selama 5 menit. Setelah itu, disentrifugasi dan supernatan dikumpulkan sehingga diperoleh ekstrak n-butanol dan ekstrak etil asetat. Hasil ekstraksi kemudian dikeringkan dengan cara penguapan di *waterbath* dengan suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ini kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 30°-35°C hingga kering. Ekstrak terbanyak yang diperoleh adalah ekstrak air, dan

ekstrak yang paling sedikit diperoleh adalah ekstrak etil asetat. Berat ekstrak yang diperoleh untuk masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 4.1.

4.3. Pemisahan Senyawa dengan KLT

Pemisahan dilakukan untuk melihat berapa macam senyawa yang terdapat pada ekstrak. Keenambelas ekstrak dilarutkan pada pelarut masing-masing kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel dan dielusi menggunakan eluen yang berbeda-beda.

Pada proses elusi dengan pelarut n-heksan dan kloroform dengan perbandingan 3:2, lempeng silika gel ditotolkan dengan larutan uji berturut-turut ekstrak n-butanol isolat RF5 dan AP3, serta ekstrak etil asetat isolat RF5, RP1, RF2 dan AP3. Proses elusi memperlihatkan bahwa eluen ini mampu memisahkan ekstrak n-butanol AP3 dengan adanya satu spot jika dilihat di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm.

Pada elusi dengan eluen kloroform dan etil asetat dengan perbandingan 7:2, lempeng silika gel ditotolkan dengan larutan uji berturut-turut ekstrak n-butanol RF5, RP1, AP3, dan RF2 serta ekstrak etil asetat AP3 dan RP1. Hasilnya menunjukkan bahwa eluen ini mampu memisahkan ekstrak RF2 menjadi dua spot, dan ekstrak etil asetat AP3 menjadi satu spot jika dilihat di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm.

Pada proses elusi dengan eluen n-heksan dan aseton dengan perbandingan 9:1, lempeng silika gel ditotolkan berturut-turut ekstrak n-butanol RF5, RP1, RF2 dan AP3. Hasilnya menunjukkan bahwa eluen ini mampu memisahkan ekstrak n-butanol AP3 menjadi satu spot jika dilihat di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm.

Ekstrak polar seperti ekstrak air dan metanol belum dapat dipisahkan. Ketika dilakukan proses elusi terjadi *tailing* atau spot yang sangat memanjang menghasilkan resolusi yang sangat buruk. Hal ini disebabkan karena banyaknya senyawa yang terlarut dalam air dan metanol sehingga sulit untuk dipisahkan menggunakan kromatografi lapis tipis.

4.4. Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Pengujian ini dilakukan untuk mencari ekstrak dengan toksisitas terbaik yang selanjutnya akan diuji aktivitas sitotoksitasnya terhadap MCF-7. Pertama-tama dilakukan penetasan telur *Artemia salina*. Penetasan dilakukan di dalam wadah yang dibagi menjadi dua bagian dengan menggunakan sekat berlubang $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$. Salah satu bagiannya dilapisi dengan karton berwarna hitam sehingga bagian ini menjadi gelap. Bagian gelap ini digunakan untuk penetasan telur *Artemia salina*. Selanjutnya larva yang telah menetas akan bergerak menuju bagian yang terang (Harmita & Radji, 2008). Media penetasan menggunakan air laut, dengan menambahkan aerator untuk memenuhi kebutuhan oksigen sebanyak 3 ppm. Suhu penetasan harus dijaga pada suhu $25^{\circ}\text{--}30^{\circ}\text{C}$ sehingga apabila diperlukan digunakan lampu pijar dengan daya 40 watt (Sorgeloos & Persoone, 1975). Namun ketika dilakukan orientasi tanpa penggunaan lampu, larva *Artemia salina* dapat menetas dengan baik, sehingga untuk penetasan telur *Artemia salina* selanjutnya tidak digunakan lampu pijar.

Kesulitan yang dialami penulis adalah pengujian blanko DMSO. Penulis menggunakan DMSO untuk melarutkan ekstrak yang tidak larut air laut, yaitu ekstrak n-butanol dan etil asetat. Namun sulit untuk mengukur berapa tetes DMSO yang diperlukan, karena jika DMSO terlalu sedikit maka ekstrak tidak larut sempurna, namun jika DMSO terlalu banyak maka pada saat pengujian maka pada blanko banyak larva yang mati. Namun penulis dapat menentukan banyak DMSO yang diperlukan untuk melarutkan ekstrak tanpa banyak larva yang mati pada blanko yaitu 4 tetes.

Hasil pengujian toksisitas dengan *Artemia salina* menunjukkan bahwa ekstrak dengan toksisitas tertinggi adalah ekstrak etil asetat dan ekstrak butanol, karena nilai LC_{50} untuk kedua ekstrak ini dibawah nilai $1000 \mu\text{g/ml}$. Suatu ekstrak dinyatakan toksik apabila nilai LC_{50} adalah kurang dari $1000 \mu\text{g/ml}$. (Meyer, 1982) Sedangkan untuk ekstrak air seluruhnya memiliki nilai di atas $1000 \mu\text{g/ml}$ dan ekstrak metanol hanya ekstrak dari isolat RP1 saja yang bersifat toksik.

Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa yang bersifat toksik bersifat semi polar karena terdapat lebih banyak pada pelarut semi polar yaitu etil asetat dan n-butanol. Karena itu, 7 ekstrak dengan hasil toksisitas terbaik akan dilanjutkan

untuk pengujian sitotoksitas terhadap MCF-7. Hal ini dilakukan karena diharapkan ekstrak yang toksik akan mampu mematikan sel MCF-7 pada pengujian sitotoksitas. Nilai LC_{50} untuk masing-masing ekstrak dan ekstrak terpilih untuk pengujian selanjutnya dapat dilihat pada Tabel 4.2.

4.5. Kultivasi sel.

Sel kanker payudara MCF-7 yang digunakan untuk pengujian sitotoksitas ini pertama-tama dikultur terlebih dahulu untuk memperbanyak sel. Untuk proses kultivasi sel ini dilakukan dalam *laminar air flow* untuk mencegah terjadinya kontaminasi dari mikroorganisme. Terjadinya kontaminasi menyebabkan terjadi kompetisi antara sel dengan mikroorganisme untuk mendapatkan nutrisi dari medium. Pertumbuhan mikroorganisme lebih cepat dari sel, sehingga sel akan kekurangan nutrisi dan dapat menyebabkan kematian sel. Adanya kontaminasi ditandai dengan perubahan warna media atau adanya benda asing dalam media (Freshney, 2005).

Media yang digunakan untuk proses kultivasi ini adalah RPMI 1640, karena nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan sel tersedia dalam media ini. Untuk media pertumbuhan sel digunakan RPMI 1640 yang telah ditambahkan L-glutamin sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan sel. Selain itu pada media ini ditambahkan dapar bikarbonat dan HEPES agar pH 7,4 untuk pertumbuhan optimum tetap terjaga.

Pada proses ini, sel akan terus bertambah banyak, karena proses proliferasi yang dilakukan oleh sel. Namun semakin banyak sel yang tumbuh maka semakin banyak nutrisi yang dibutuhkan. Apabila sel semakin banyak, maka nutrisi dalam media akan berkurang sehingga terjadi kompetisi antar sel dalam mendapatkan nutrisi, hal ini menyebabkan proses pertumbuhan sel terhambat. Karena itu perlu dilakukan proses pergantian media agar sel mendapat nutrisi baru sehingga tidak perlu terjadi kompetisi. Jika sel mulai terlihat padat, maka perlu dilakukan subkulturisasi agar sel dapat terus tumbuh dan memperoleh kultur sel yang lebih banyak. Proses subkultur dilakukan dengan membagi dan memindahkan kultur sel ke dalam labu kultur yang lain (Freshney, 2005).

Sel MCF-7 memiliki sifat melekat atau adesif, dan media RPMI 1640 mengandung zat anti tripsin yang membiarkan sel melekat pada dasar labu kultur. Untuk proses subkulturisasi, sel yang melekat harus dilepaskan agar dapat dipindahkan ke medium lain. Karena itu sel dalam labu kultur dicuci dengan PBS untuk menghilangkan efek anti-tripsin dalam medium. Setelah itu ditambahkan tripsin untuk melepas sel yang melekat. Namun proses inkubasi sel dalam tripsin tidak boleh terlalu lama, karena sel dapat rusak jika terpapar tripsin terlalu lama.

4.6. Jumlah kepadatan sel

Jumlah sel yang digunakan untuk pengujian sitotoksitas adalah 10^4 - 10^5 sel untuk setiap sumuran (Taher, Idris, & Arbain, 2007), hal ini dikarenakan jumlah sel tersebut dapat terdeteksi dengan baik sehingga dapat memberikan serapan yang tinggi pada saat pengujian. Untuk mengetahui kepadatan sel yang diperoleh maka dilakukan penghitungan sel menggunakan alat haemositometer dan proses pewarnaan dengan biru tripan. Untuk pewarnaan digunakan biru tripan karena senyawa ini dapat menembus sel yang mati dan tidak dapat menembus sel hidup karena sifat impermeabel pada dinding selnya, sehingga sel hidup dapat diamati di bawah mikroskop dan dihitung kepadatannya. Sel hidup akan tetap jernih sedangkan sel yang mati akan berwarna biru (Freshney, 2005).

Pada proses penghitungan diperoleh 401 sel pada 4 bidang besar, dengan jumlah sel rata-rata 100,25 sehingga kepadatan sel yang diperoleh adalah $9,02 \times 10^6$ sel untuk 900 μ l (Lampiran 18).

4.7. Suspensi Penyedia sel

Sel yang terhitung dalam labu kultur sebanyak $9,02 \times 10^6$ sel/ml dibagi untuk mengisi pelat kultur jaringan 96 sumuran (pembulatan dihitung 100 sumuran) dengan tiap sumur berisi 100 ml suspensi sel dalam medium RPMI 1640 dalam FCS 20%. Kepadatan sel yang dikehendaki adalah 30000 sel/ml, sehingga suspensi yang dibutuhkan untuk pengujian adalah 49,89 μ l, dan dibulatkan menjadi 50 μ l. Medium RPMI 1640 (yang mengandung FCS 20%) yang dibutuhkan adalah sebanyak 9.950 μ l (Lampiran 19).

4.8. Pengujian Sitotoksitas

Untuk pengujian sitotoksitas pertama-tama dilakukan pemasukan sel ke dalam pelat sumuran 96 yang kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hal ini dimaksudkan agar sel berada pada fase log, dimana pada kondisi ini sel mempunyai kondisi optimum untuk dilakukan pengujian. Setelah dilakukan inkubasi, ke dalam sumuran yang berisi suspensi sel diberi perlakuan yang berbeda-beda, yaitu penambahan larutan uji dengan konsentrasi yang berbeda-beda, larutan blanko DMSO 2 % dan larutan sisplatin sebagai kontrol positif. Pelat sumuran kemudian kembali diinkubasi selama 24 jam. Pemetaan pada pelat sumuran dapat dilihat pada Lampiran 20. Pada masa akhir inkubasi, dilihat perbedaan struktur sel pada blanko DMSO, sisplatin dan larutan uji di bawah mikroskop. Pada sumuran yang mengandung larutan DMSO terlihat sel masih berbentuk pipih dan lonjong yang padat, meskipun terlihat beberapa sel yang mati yang berbentuk bulatan yang mengkerut dan berwarna kehitaman. Pada yang mengandung larutan uji, terlihat peningkatan jumlah sel yang mati pada konsentrasi yang semakin tinggi. Pada sumuran yang mengandung larutan sisplatin, jumlah sel yang mati lebih banyak dibandingkan dengan larutan uji dan larutan blanko DMSO. Bentuk-bentuk sel setelah diberi perlakuan dapat dilihat pada Gambar 14-17. Kemudian larutan uji dibuang dengan menggunakan mikropipet dan dicuci dengan PBS untuk menghilangkan sisa-sisa sel yang mati. Proses ini harus dilakukan dengan sangat hati-hati supaya sel yang melekat di dasar sumuran tidak ikut terbang.

Selanjutnya, dilakukan proses pewarnaan dengan merah netral. Pada proses ini, merah netral akan masuk ke dalam sel yang hidup atau viable. Setelah disimpan kembali dalam inkubator selama 30-40 menit, pewarna merah netral dibuang dengan mikropipet dan dicuci dengan PBS untuk menghilangkan sisa merah netral dan sisa sel yang mati. Selanjutnya sel dilisis dengan menggunakan SDS 1 % supaya merah netral keluar dari sel. Serapan merah netral kemudian diukur dengan menggunakan ELISA *plate reader*, pada panjang gelombang 570 nm. Serapan yang dihasilkan akan berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup. Presentase kematian sel dapat dihitung dengan mengurangi serapan blanko DMSO dengan serapan larutan uji.

Berdasarkan nilai perhitungan serapan merah yang diperoleh dari hasil pengujian sitotoksitas (Tabel 4.3 – 4.9) menunjukkan bahwa pada konsentrasi tertinggi (200 $\mu\text{g/ml}$), larutan uji yang memberikan nilai persentase kematian sel tertinggi adalah ekstrak etil asetat isolat RP1 (85,98%) sedangkan ekstrak yang memberi nilai persentase kematian terendah adalah ekstrak n-butanol isolat AP3 (64,67%).

4.9. Hasil LC_{50}

Nilai LC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian sel hingga 50%. Suatu senyawa dianggap aktif atau memiliki aktivitas sitotoksik apabila memiliki nilai LC_{50} di bawah 100 $\mu\text{g/ml}$ (Sahranavard, et al., 2009).

Sebanyak 6 ekstrak mempunyai aktivitas sitotoksik karena memiliki nilai LC_{50} di bawah 100 $\mu\text{g/ml}$, dan hanya satu ekstrak saja yang tidak memiliki kemampuan sitotoksik yaitu ekstrak butanol isolat AP3 dengan nilai LC_{50} sebesar 142,56 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etil asetat isolat AP3 memiliki aktivitas sitotoksik terbesar dengan LC_{50} 36,81 $\mu\text{g/ml}$. Nilai LC_{50} untuk seluruh ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.12

Jika dibandingkan dengan kontrol positif sisplatin maka dapat dilihat bahwa nilai LC_{50} dari ketujuh ekstrak yang diuji memiliki nilai yang cukup jauh dengan nilai LC_{50} dari sisplatin, yaitu sebesar 7,36 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan bahwa potensi keenam ekstrak untuk dijadikan obat anti kanker masih cukup rendah.

Grafik yang memperlihatkan hubungan antara log konsentrasi dan persen kematian menunjukkan terdapat beberapa ekstrak yang tidak memenuhi syarat garis linier. Gambar grafik untuk sampel dapat dilihat pada gambar 18-24. Hal ini terjadi karena persen kematian yang diperoleh cukup bervariasi sehingga menyebabkan garis menjadi tidak linier. Nilai persen kematian yang bervariasi dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain karena tidak homogenya larutan uji dalam sumuran sehingga kontak antara larutan uji dengan sel menjadi tidak maksimal. Alasan lain karena metode merah netral kurang akurat dibandingkan dengan metode MTT. Metode merah netral melalui proses pencucian dengan PBS

pada saat pengujian, sehingga ada kemungkinan sel yang ada di dasar sumuran ikut terbuang pada proses pencucian sehingga hasil akan menjadi bias. Pada metode MTT tidak melalui proses pencucian, karena sel yang hidup akan mereduksi MTT menjadi senyawa ungu formazan sehingga tidak perlu dilakukan proses pencucian.

Grafik hubungan antara log konsentrasi dengan persen kematian sisplatin menunjukkan hasil yang cukup linier. Persen kematian meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi. Grafik untuk kontrol positif sisplatin dapat dilihat pada Gambar 25.

4.10. Analisis statistik persentase kematian sel MCF-7

Data persentase kematian sel MCF-7 dianalisis secara statistik nilai distribusi normal dan homogenitasnya menggunakan metode distribusi normal Shapiro-Wilk dan homogenitas Levene yang keduanya menunjukkan bahwa data persentase kematian sel MCF-7 terdistribusi secara normal dan homogen. Berdasarkan analisis tersebut, dilakukan analisis selanjutnya menggunakan metode analisis varian (ANOVA) satu arah.

Uji distribusi normal dengan metode analisis Shapiro-Wilk menunjukkan semua data persentase kematian sel MCF-7 pada berbagai konsentrasi larutan uji terdistribusi secara normal. Hasil analisis uji distribusi normal Shapiro-Wilk dapat dilihat pada Lampiran 21.

Uji homogenitas dengan metode Levene menunjukkan semua data persentase kematian sel MCF-7 pada berbagai konsentrasi larutan uji terdistribusi secara homogen. Hasil analisis uji homogenitas Levene dapat dilihat pada Lampiran 22.

Hasil analisis varian satu arah menunjukkan semua data persentase kematian sel MCF-7 pada berbagai konsentrasi larutan uji memiliki perbedaan yang signifikan (Lampiran 23). Perbedaan antara masing-masing perlakuan dianalisis lebih lanjut menggunakan uji beda nyata terkecil dengan hasil yang dapat dilihat pada Lampiran 24.

Pada uji beda nyata terkecil dapat dilihat bahwa persen kematian sel MCF-7 antar sampel tidak memberikan perbedaan yang bermakna, namun semua sampel mempunyai perbedaan bermakna terhadap blanko DMSO. Hal ini menunjukkan

bahwa sampel mempunyai aktivitas sitotoksik karena nilainya jauh berbeda dengan blanko DMSO. Jika dibandingkan antara sampel dan sisplatin maka yang mempunyai perbedaan yang bermakna hanya ekstrak etil asetat isolat RF2 dan ekstrak butanol isolat AP3 dan RF5. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik ketiga sampel ini memiliki nilai yang jauh dengan aktivitas sitotoksik dari kontrol positif sisplatin.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Berdasarkan hasil uji BSLT keenambelas ekstrak uji, diperoleh 7 ekstrak uji yang berpotensi untuk diuji lebih lanjut, yaitu ekstrak etil asetat isolat AP3, RP1, RF2 dan RF5 serta ekstrak n-butanol isolat AP3, RF2 dan RF5.
- 5.1.2. Berdasarkan nilai LC_{50} dari hasil uji sitotoksisitas terhadap sel MCF-7 secara *in vitro*, enam ekstrak memiliki aktivitas sitotoksik karena memiliki nilai LC_{50} kurang dari 100 $\mu\text{g/ml}$, yaitu ekstrak etil asetat isolat AP3, RP1, RF2 dan RF5 dengan nilai 36,81; 86,7; 42,27 dan 65,46 $\mu\text{g/ml}$ serta ekstrak n-butanol isolat RF2 dan RF5 dengan nilai 66,98 dan 83,56 $\mu\text{g/ml}$.

5.2. Saran

- 5.2.1. Perlu dilakukan identifikasi senyawa yang bersifat sitotoksik terhadap sel MCF-7 dari ekstrak etil asetat isolat AP3, RP1, RF2 dan RF5 dan ekstrak n-butanol isolat RF2 dan RF5.
- 5.2.2. Perlu dilakukan isolasi senyawa yang bersifat sitotoksik terhadap sel MCF-7 dari ekstrak etil asetat isolat AP3, RP1, RF2 dan RF5 dan ekstrak n-butanol isolat RF2 dan RF5.

DAFTAR ACUAN

- Backer, C., dan Bakhuizen, V. (1986). *Flora of Java*. Netherland: The Rijksherbarium Leyden.
- Bellenir, K. (2009). *Breast Cancer Sourcebook 3rd Edition*. USA: Omnigraphics, Inc.
- Departemen Kesehatan. (2008). *Profil Kesehatan Indonesia 2008*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Fachri, W. (2009). *Uji aktivitas sitotoksik isolat hasil fermentasi kapang endofit dari Garcinia forbesii King dan Garcinia porrecta Wall terhadap sel kanker payudara MCF-7*. Skripsi Sarjana Farmasi FMIPA UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Ferlay, J., et al. (2010). Global Burden of Breast Cancer. Dalam C. Li, *Breast Cancer Epidemiology*. Berlin: Springerlink.
- Freshney, R. (2005). *Culture of Animal cell: A Manual of Basic Technique Fifth Edition*. John Wiley & Sons Inc.
- Fried, B., & Sherma, J. (1999). *Thin Layer Chromatography 4th Edition*. New York: Marcel Dekker.
- Gandjar, I., Wellyzar, S., & Ariyanti, O. (2006). *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- GLOBOCAN. (2008). *Country Fast Statistic Indonesia*. November 25, 2010. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=360#KEY>
- Lactofenol Cotton Blue Stain*. (2006). Oktober 7, 2010. <https://www.hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/LactophenolCottonBISn.htm>
- Harmita, & Radji, M. (2008). *Buku Ajar Analisis Hayati*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.

- Harris, R., et al. (2000). *Diseases of the Breast, 2nd edition*. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- Harrison, J. L., et al. (1995). Xanthones from *Garcinia forbesii*. *Phytochemistry*, 33(3), 727-728.
- Hejmadi, M. (2009). *Introduction to Cancer Biology*. Moomna Hejmadi & Venus Publishing.
- Hortobagyi, G. (1998). A Review : Treatment of breast cancer. *New Eng J Med*, 339(14), 975-984.
- IPB.(2002). *Laporan Akhir Riset Unggulan Strategis Nasional Pengembangan Buah-Buahan Unggulan Indonesia*. Bogot: Institut Pertanian Bogor.
- Juniarti, D., Osmeli, & Yuhernita. (2009). Kandungan senyawa kimia, Uji toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazyl) dari ekstrak daun saga. *Makara Sains*, 13(1), 50-54.
- Kardono, L., et al. (2006). Bioactive Constituent of *Garcinia porrecta* and *G. parvifolia* Grown in Indonesia. *Pak J Bio Sci*, 9(3), 483-484.
- Kharkwal, et al. (2008). Novel Symbiotrophic Endophytes. Dalam A. Varma, *Mycorrhiza* (pp. 756-757). Berlin: Springer-Verlag .
- Kubicek, C., & Druzhinina, I. (2007). *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationship 2nd Edition*. Springer.
- Kumala, S., et al.(2006). Isolation of Endophytic Fungi from *Brucea javanica* L. (Merr.) and Cytotoxic Evaluation of Their n-butanol Extract from Fermentation Broth. *Pak J Bio Sci*, 9(5), 825-832.
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1966). *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. Belgium: Food Agriculture Organization.
- Leong, Y., Harrison, L., Bennett, G., & Tan, H. (1996). Forbesione, a Modified Xanthone from *Garcinia forbesii*. *J Chem Res Synop*, 392–393.

- Meyer, B. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 54, 31.
- Murray, R., et al. (2001). *Biokimia Harper Edisi 25*. Jakarta: Penerbit Kedokteran Jakarta.
- Nafrialdi, & Gan, S. (1995). Antikanker dan Imunosupresan. In S. Ganiswara, *Farmakologi dan Terapi edisi 4* (hal. 686). Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- NCI. (2005). *What You Need To Know About Breast Cancer*. USA: NIH Publication No 05-1556.
- Okafor, N. (2007). *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. New Hampshire: Science Publisher.
- Pendit, B. (1997). *Buku Saku Patofisiologi*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Phongpaichit, S., et al. (2007). Biological Activities of Extract from Endophytic Fungi Isolated from Garcinia Plants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* , 51,517-525.
- Radji, M. (2005). Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* , (2)3, 113-126.
- Sahranavard, S., et al. (2009). Cytotoxic activities of selected medicinal plants from Iran and phytochemical evaluation of the most potent extract. *Res Pharm Sci*, 4(2), 133-137.
- Saleh, M., et al. (2008). *Determinasi dan morfologi buah eksotis potensial di lahan rawa*. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Sorgeloos, P. (1980). The use of Brine Shrimp *Artemia* in Aquaculture. Dalam G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, & E. Jaspers, *The Brine Shrimp Artemia* (hal. 25-46). Wetteren: Universa Press.

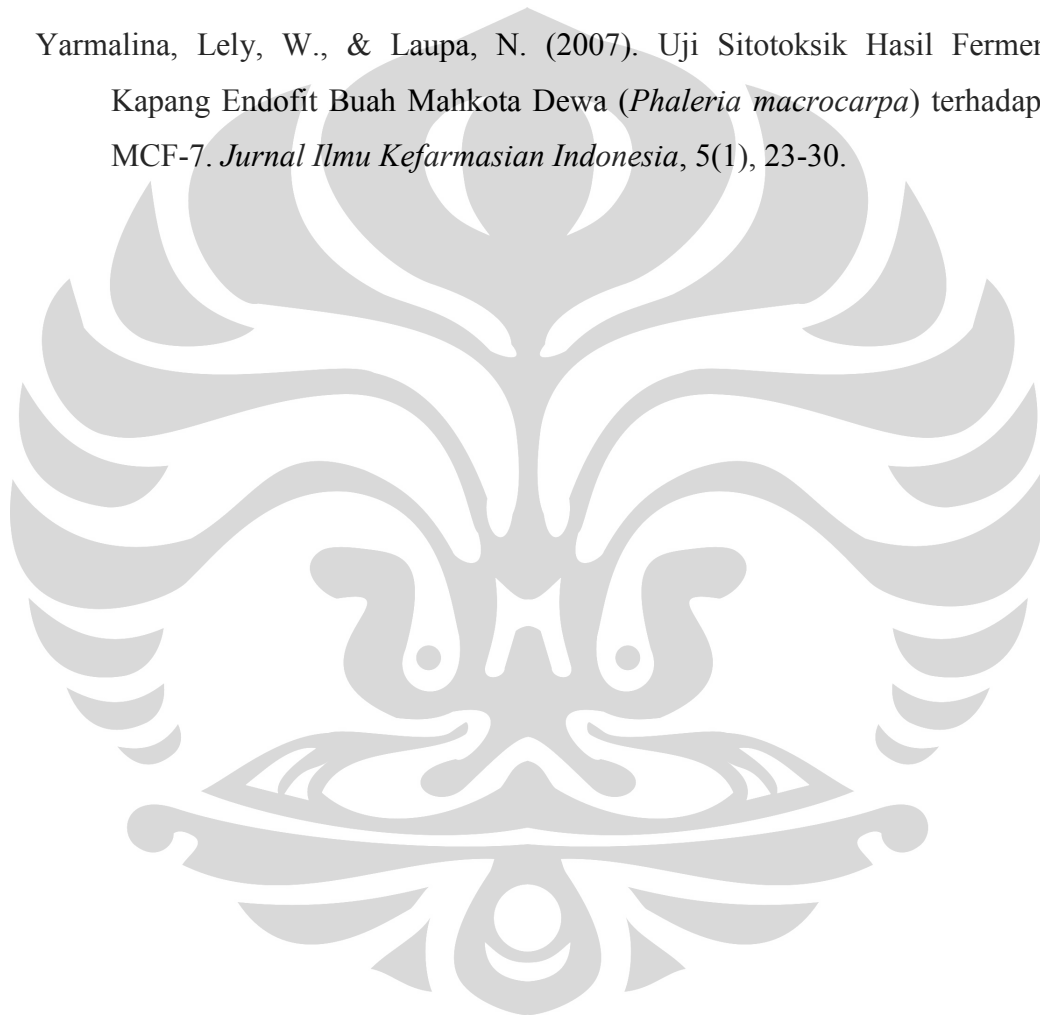
- Sorgeloos, P., & Persoone, G. (1975). Technology Improvements for the Cultivating the Invertebrates as Food for Fishes and Crustaceas II Hatching and Culturing of the Brine Shrimp *Artemia salina* L. *Aquaculture*, 6, 303-317.
- Soule, H., & al, e. (1975). A Human Cell Line from A Pleural Effusion Derived. *J Natl Cancer Inst*, 51 , 1409-1416.
- Stevens, R. B. (1974). *Mycology Guidebook*. Washington: University of Washington Press.
- Strobel, G., Daisy, B., & Castillo, U. (2005). Novel Natural Product from Rainforest Endophytes. In L. Zhang, & A. Demain, *Natural Products Drug Discoveries and Therapeutic Medicine* (hal. 330-335, 342-344). New Jersey: Humana Press.
- Sutherland, R., et al. (1999). Breast Cancer. In J. Masters, & W. Palsson, *Human Cell Culture vol II* (hal. 79-106). Great Britain: Kluwer Academic Publisher.
- Tafal, H. (1995). *Pengantar Biologi Laut*. Semarang: IKIP Press.
- Taher, M., Idris, S., & Arbain, D. (2007). Antimicrobial, antioxidant and Cytotoxic activities of *Garcinia eugenifolia* and *Calophyllum enervosum*. *Iran J Pharmacol Ther*, 6(1): 93-98.
- Tan, R., & Zou, W. (2001). Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, 18: 488-459.
- Taqwim, S. (2002). *Toksisitas dan uji antibakteri metabolit sekunder kapang endofit Garcinia Forbesii King dan Garcinia porrecta Wall terhadap Straptococcus aereus, Bacillus subtilis, Eschericia coli, Salmonella typhosa dan Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi Sarjana Farmasi FMIPA UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Teresa, K., Kaczmariski, K., & Prus, W. (2003). *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. New York: Marcell Dekker.

Theodore, L., & Srinivas, S. (2006). *Biotechnology*. Minnesota: University of Minnesota.

WHO. (2002). *National cancer control programmes : policies and managerial guidelines 2nd ed.* World Health Organization.

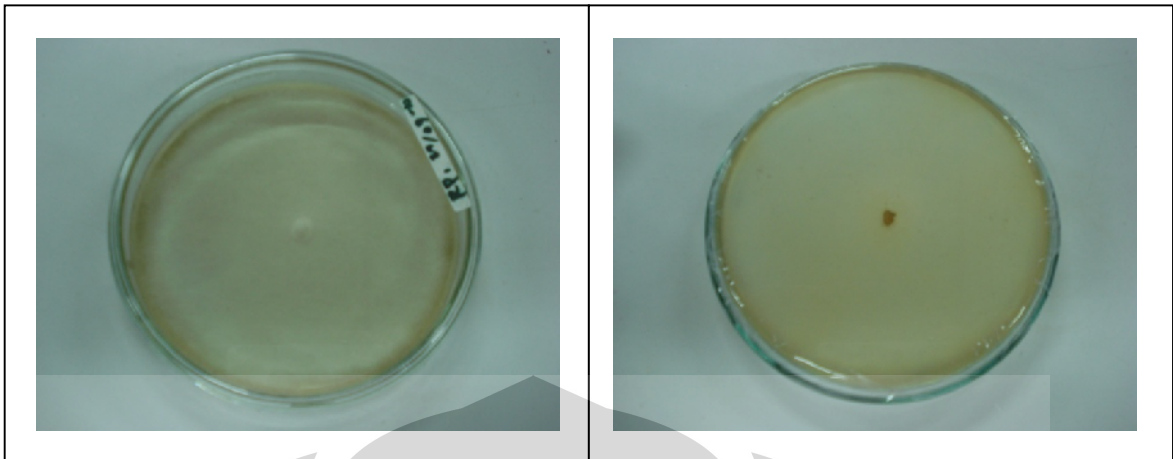
WHO. (2010). *Quick Cancer Facts*. Januari 2, 2010, from <http://www.who.int/cancer/en>

Yarmalina, Lely, W., & Laupa, N. (2007). Uji Sitotoksik Hasil Fermentasi Kapang Endofit Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap Sel MCF-7. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5(1), 23-30.





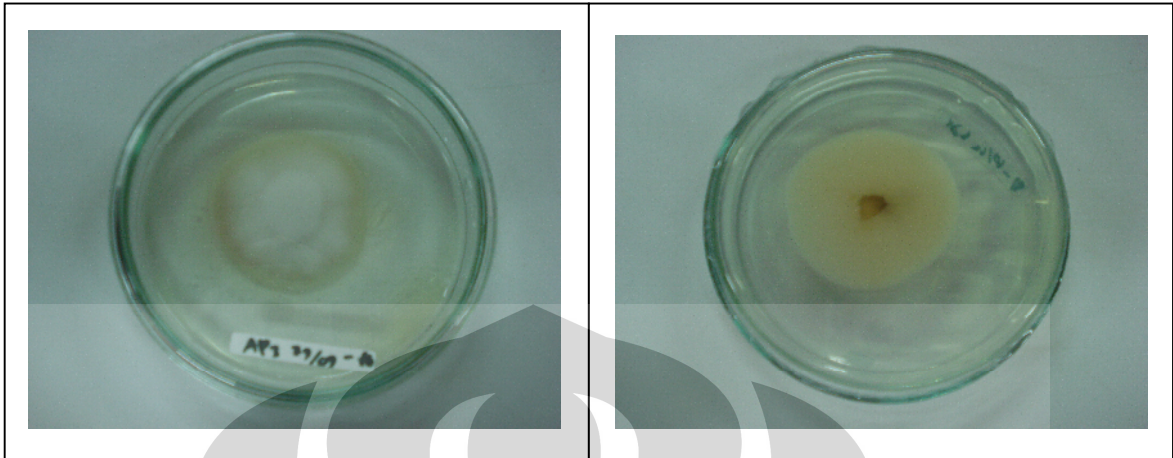
GAMBAR



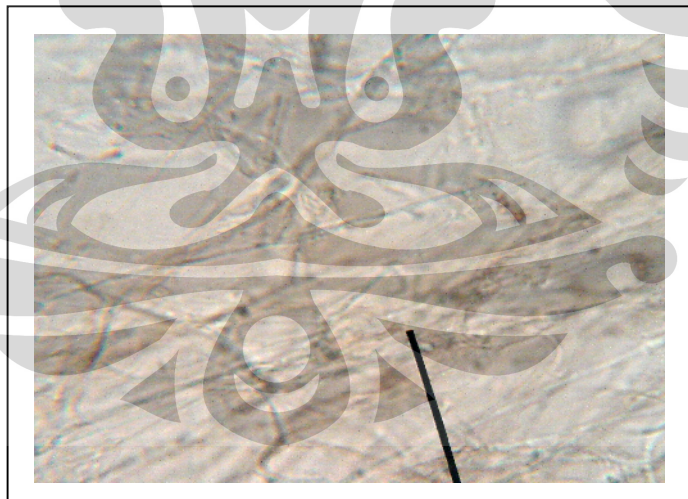
Gambar 4.1. Makroskopis Isolat RP1. Penampang Makroskopis Muka Koloni (Kiri) dan Sebalik Koloni (Kanan)



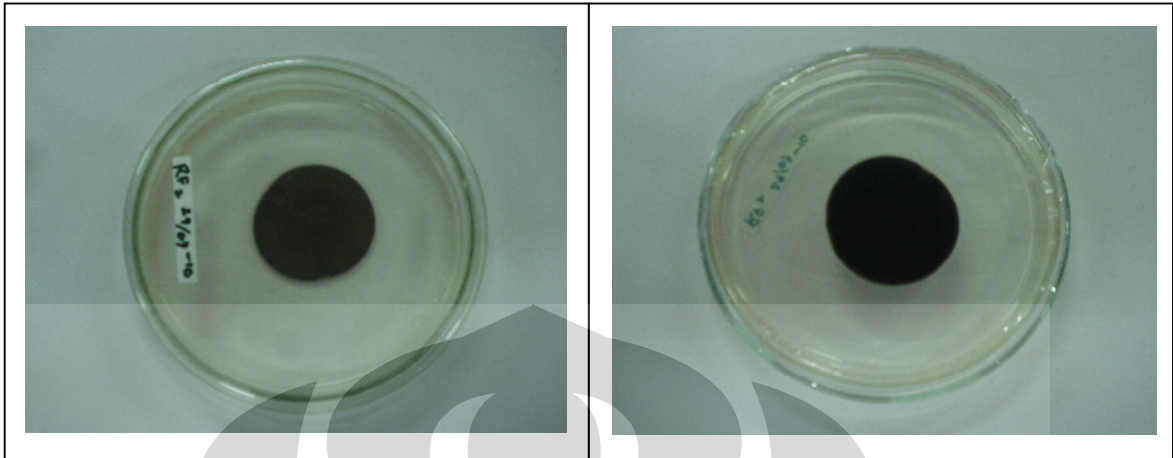
Gambar 4.2. Mikroskopis isolat RP1



Gambar 4.3. Makroskopis Isolat AP3. Penampang Makroskopis Muka Koloni (Kiri) dan Sebalik Koloni (Kanan)



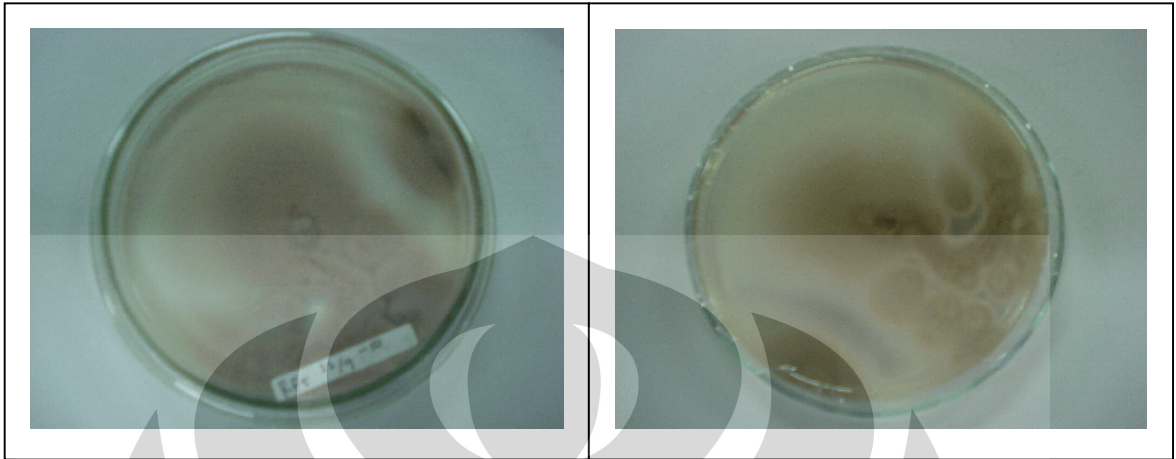
Gambar 4.4. Mikroskopis Isolat AP3



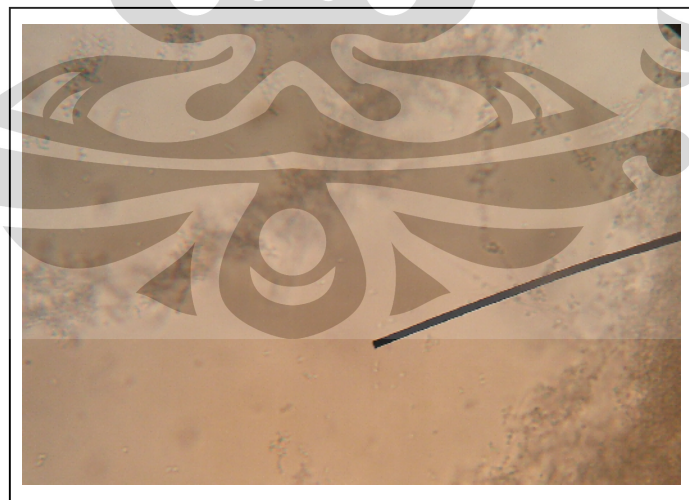
Gambar 4.5. Makroskopis Isolat RF2. Penampang Makroskopis Muka Koloni (Kiri) dan Sebalik Koloni (Kanan)



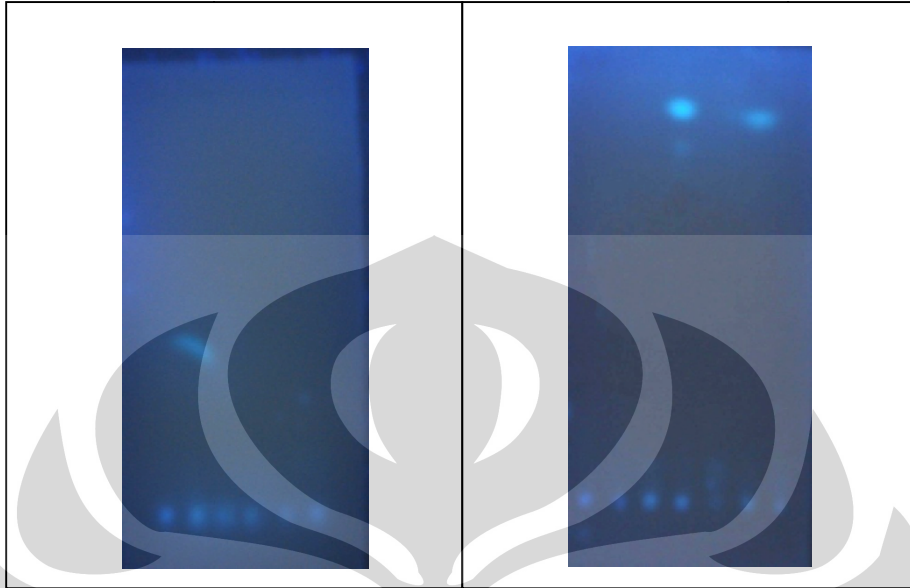
Gambar 4.6. Mikroskopis Isolat RF2



Gambar 4.7. Makroskopis Isolat RF5. Penampang Makroskopis Muka Koloni (Kiri) dan Sebalik Koloni (Kanan)



Gambar 4.8. Mikroskopis Isolat RF5

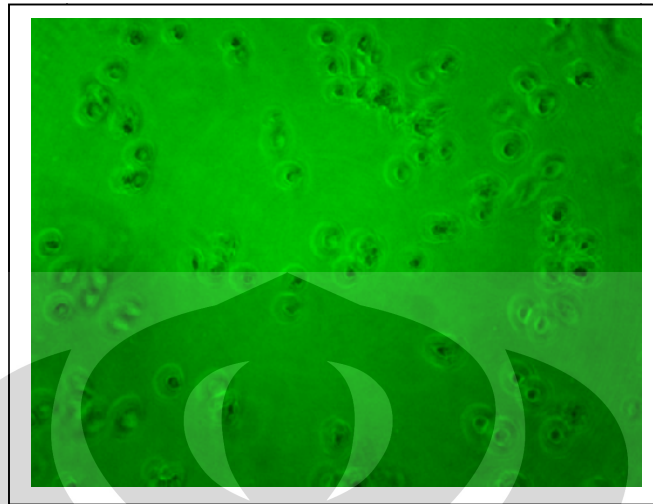


Gambar 4.9. Hasil Kromatografi Lapis Tipis dengan Eluen n-Heksan : Kloroform (3:2)

Gambar 4.10. Hasil Kromatografi Lapis Tipis dengan Eluen Kloroform : Etil Asetat (7:2)



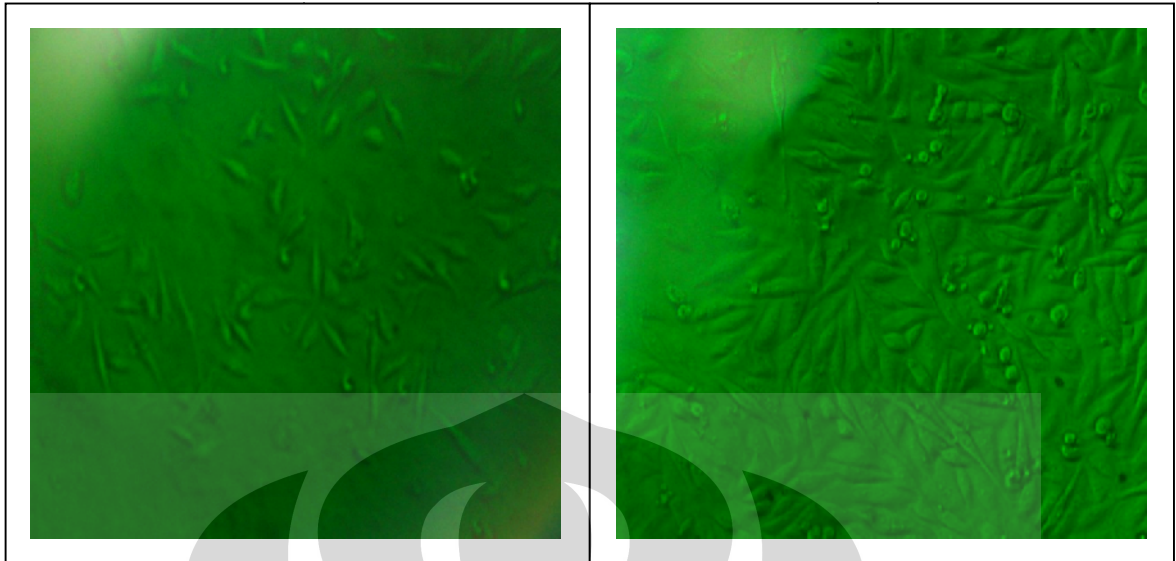
Gambar 4.11. Hasil Kromatografi Lapis Tipis dengan Eluen n-Heksan : aseton (9:1)



Gambar 4.12. Mikroskopis sel MCF-7 sebelum Melekat pada Dasar Labu Kultur
(Sesaat setelah Subkulturisasi)



Gambar 4.13. Mikroskopis Sel MCF-7 dalam Medium RPMI 1640 di dalam Labu Kultur yang Diinkubasi pada 37°C selama 5 Hari.



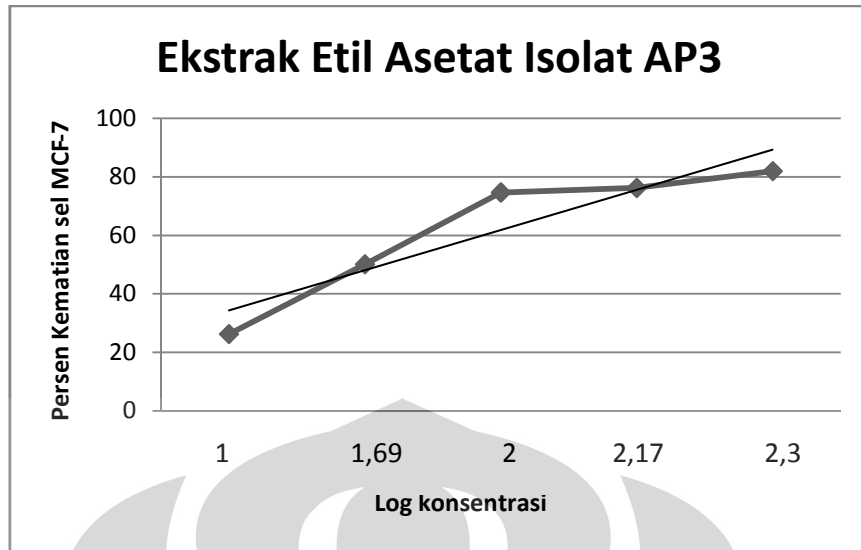
Gambar 4.14. Mikroskopis Sel MCF-7 dalam Pelat Kultur Jaringan 96 Sumuran sebelum Dilakukan Pengujian.

Gambar 4.15. Mikroskopis Blanko Negatif DMSO setelah Dilakukan Pengujian.

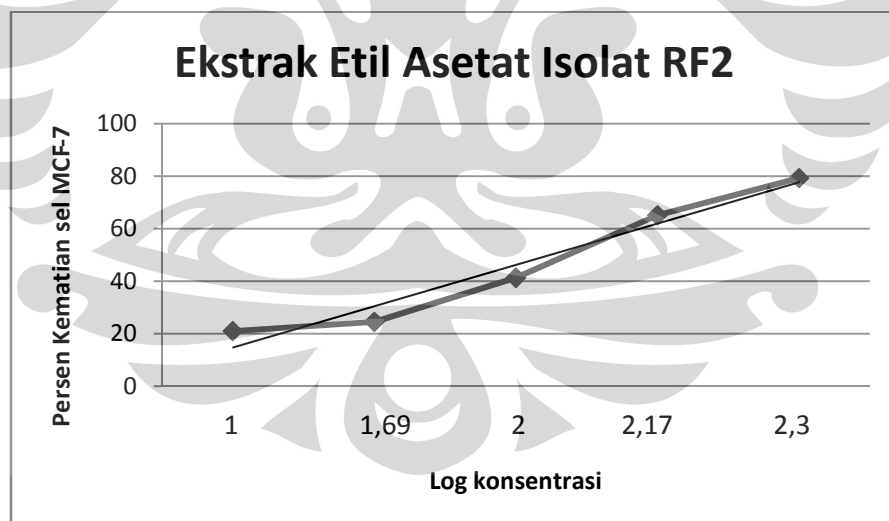


Gambar 4.16. Mikroskopis Sel setelah Dilakukan Pengujian dengan Sampel Konsentrasi Akhir 200 $\mu\text{g/ml}$.

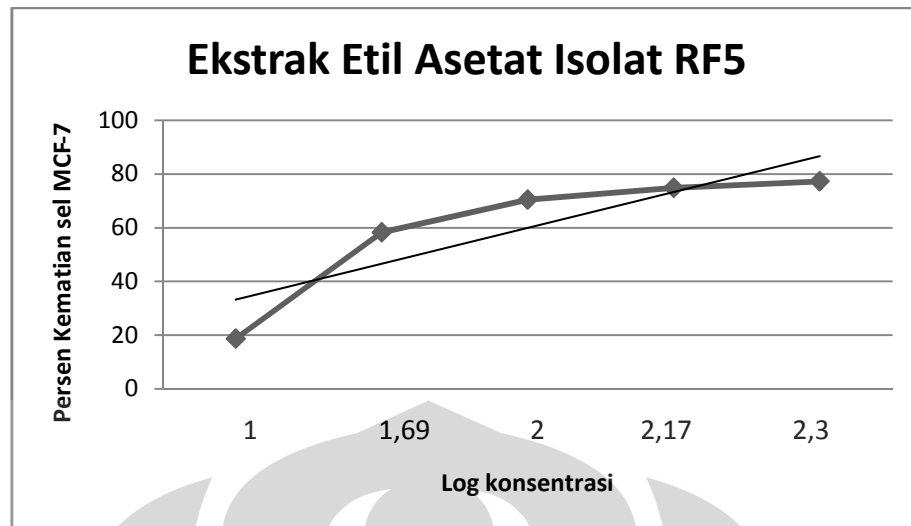
Gambar 4.17. Mikroskopis Sel setelah Dilakukan Pengujian dengan Sisplatin Konsentrasi Akhir 200 $\mu\text{g/ml}$



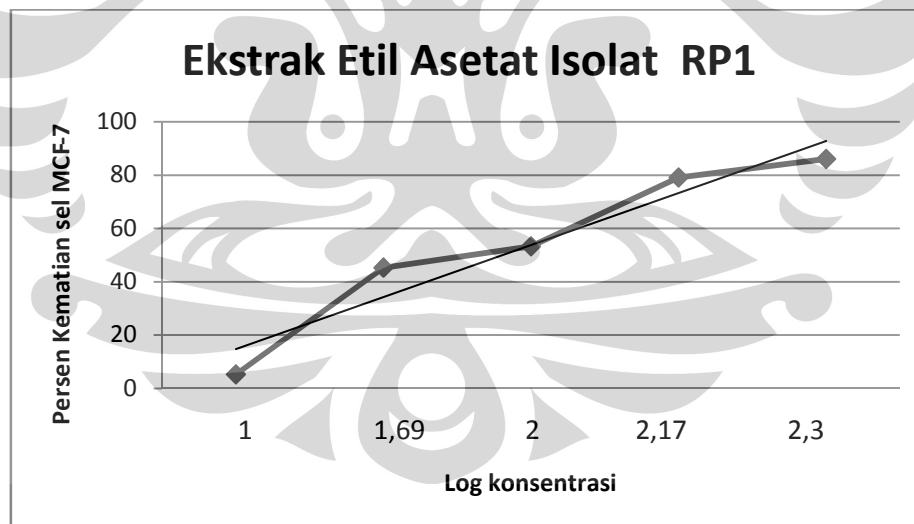
Gambar 4.18. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak Etil Asetat Isolat AP3 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C



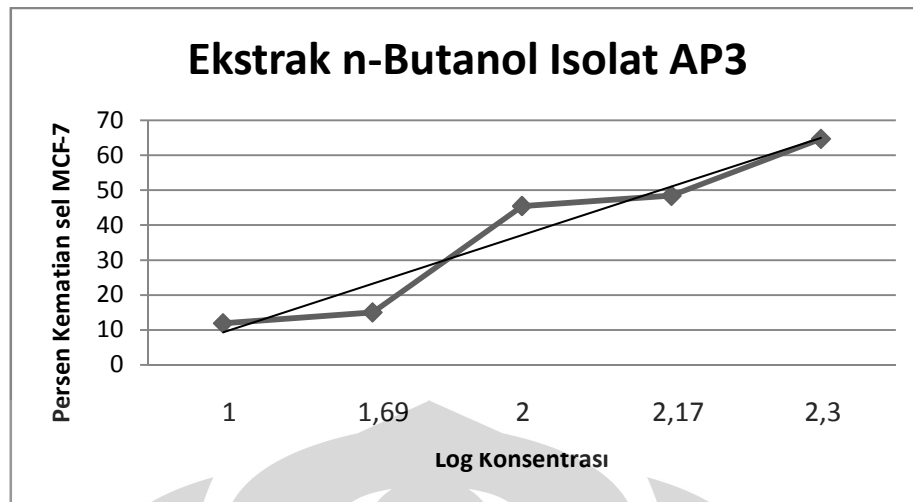
Gambar 4.19. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak Etil Asetat Isolat RF2 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C



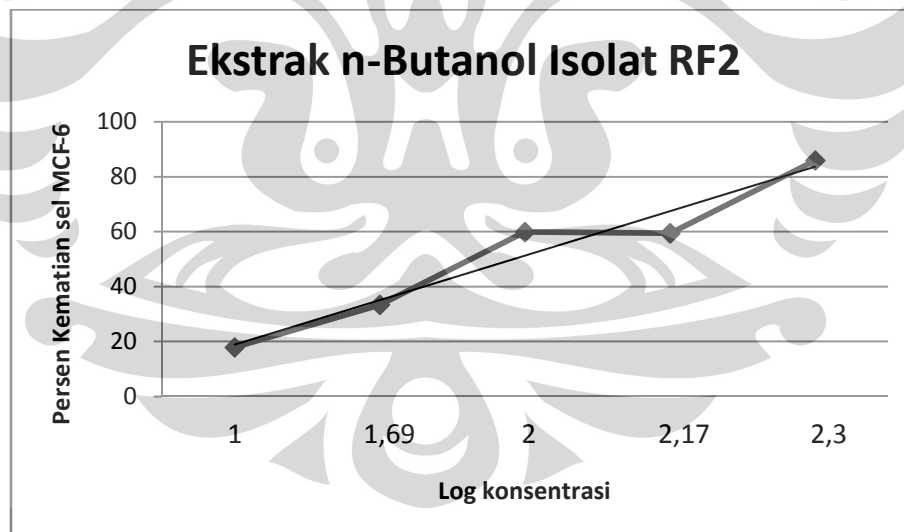
Gambar 4.20. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak Etil Asetat Isolat RF5 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C



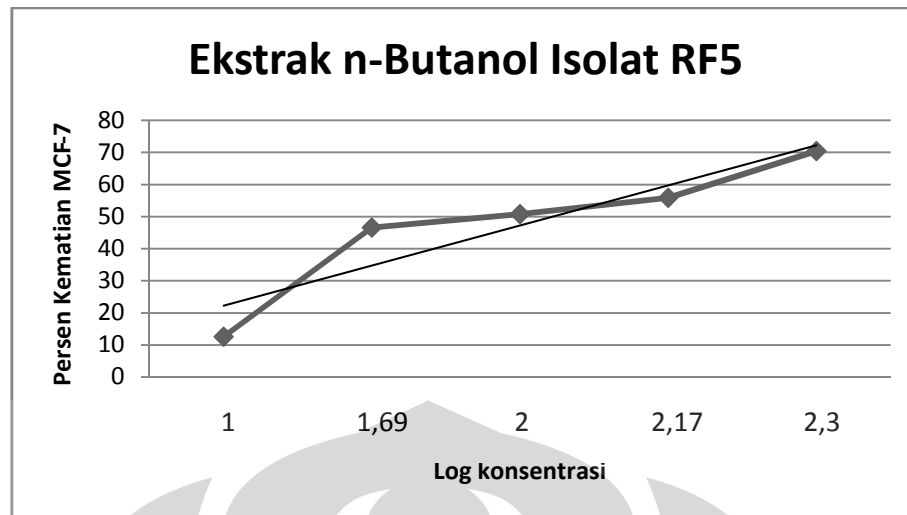
Gambar 4.21. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian sel MCF-7 dari Ekstrak Etil Asetat Isolat RP1 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C



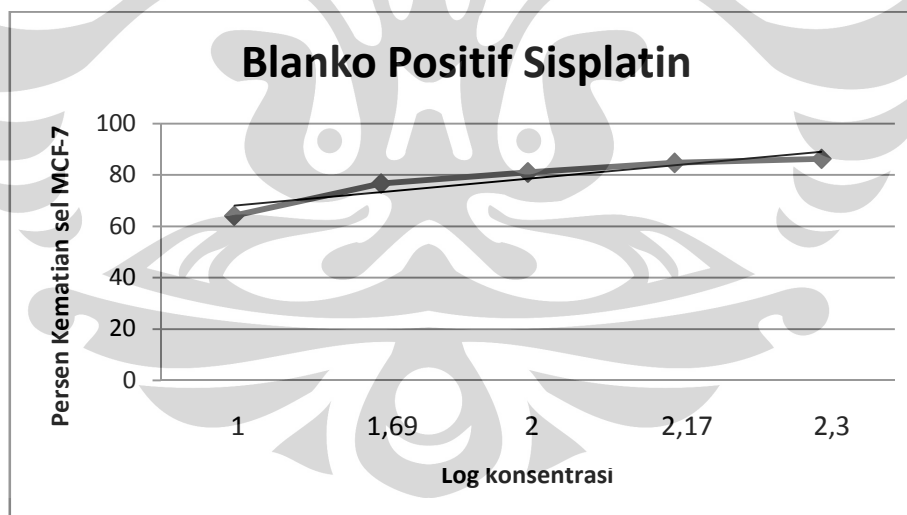
Gambar 4.22. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak n-Butanol Isolat AP3 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C



Gambar 4.23. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak n-Butanol Isolat RF2 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C



Gambar 4.24. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Ekstrak n-Butanol Isolat RF5 setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C



Gambar 4.25. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi dengan Persen Kematian Sel MCF-7 dari Blanko Positif Sisplatin setelah Inkubasi 24 Jam pada Suhu 37°C



TABEL

Tabel 4.1
Jumlah Ekstrak yang Diperoleh pada Proses Ekstraksi

Isolat	Ekstrak	Berat (mg)
AP3	Air	862
	Metanol	106,4
	Butanol	42,6
	Etil asetat	21
RP1	Air	237,4
	Metanol	102,6
	Butanol	49,2
	Etil asetat	22,5
RF2	Air	255,1
	Metanol	167,3
	Butanol	25,3
	Etil asetat	25,1
RF5	Air	119,1
	Metanol	96,5
	n-Butanol	29,7
	Etil asetat	26,9

Tabel 4.2
 Nilai LC₅₀ Hasil BSLT Isolat Kapang Endofit

Nama Isolat	Nilai LC ₅₀ (µg/ml)			
	Air	Metanol	Butanol	Etil asetat
Isolat RP1	>1000	833,66	792,28	693,98*
Isolat AP3	>1000	>1000	769,26*	420,65*
Isolat RF2	>1000	>1000	464,21*	657,26*
Isolat RF5	>1000	>1000	625,79*	611,69*

Keterangan:

(*) merupakan isolat terpilih yang akan diuji sitotoksitasnya menggunakan sel kanker payudara MCF-7

Tabel 4.3

Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan uji 1 (Ekstrak Etil Asetat Isolat AP3) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37 °C

Konsentrasi	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
10	0,159	0,334	64,9	26,27*
50	0,195	0,226	56,95	50,11*
100	0,114	0,115	74,61*	74,61
150	0,108	0,097	76,16*	78,59
200	0,082	0,085	81,89*	81,23

Keterangan:

(*) merupakan persen kematian terpilih yang akan digunakan untuk perhitungan LC₅₀

Tabel 4.4

Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 2 (Ekstrak Etil Asetat Isolat RF2) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37 °C

Konsentrasi	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
10	0,439	0,358	3,09	20,97*
50	0,342	0,392	24,5*	13,46
100	0,382	0,266	15,67	41,28*
150	0,298	0,158	34,22	65,12*
200	0,187	0,094	58,72	79,25*

Keterangan:

(*) merupakan persen kematian terpilih yang akan digunakan untuk perhitungan LC₅₀

Tabel 4.5

Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 3 (Ekstrak Etil Asetat Isolat RF5) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37 °C

Konsentrasi	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
10	0,334	0,368	26,26	18,76*
50	0,191	0,189	57,84	58,28*
100	0,17	0,134	62,47	70,42*
150	0,136	0,114	69,98	74,83*
200	0,144	0,103	68,21	77,26*

Keterangan:

(*) merupakan persen kematian terpilih yang akan digunakan untuk perhitungan LC₅₀

Tabel 4.6

Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 4 (Ekstrak Etil Asetat Isolat RP1) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37 °C

Konsentrasi	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
10	0,244	0,429	47,02	5,29*
50	0,248	0,417	45,25*	7,95
100	0,211	0,176	53,42*	61,15
150	0,111	0,095	75,5	79,03*
200	0,066	0,068	85,43	85,98*

Keterangan:

(*) merupakan persen kematian terpilih yang akan digunakan untuk perhitungan LC₅₀

Tabel 4.7

Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 5 (Ekstrak n-Butanol Isolat AP3) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37 °C

Konsentrasi	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
10	0,323	0,399	28,69	11,92*
50	0,264	0,385	41,72	15,01*
100	0,121	0,247	73,29	45,47*
150	0,378	0,234	16,55	48,34*
200	0,233	0,16	48,56	64,67*

Keterangan:

(*) merupakan persen kematian terpilih yang akan digunakan untuk perhitungan LC₅₀

Tabel 4.8

Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 6 (Ekstrak n-Butanol Isolat RF2) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37 °C

Konsentrasi	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
10	0,372	0,332	17,89*	26,71
50	0,302	0,246	33,33*	45,70
100	0,113	0,182	75,05	59,82*
150	0,184	0,048	59,38*	89,40
200	0,064	0,079	85,87*	82,56

Keterangan:

(*) merupakan persen kematian terpilih yang akan digunakan untuk perhitungan LC₅₀

Tabel 4.9

Serapan dan Presentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 7 (Ekstrak n-Butanol Isolat RF5) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37 °C

Konsentrasi	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
10	0,396	0,22	12,58*	51,43
50	0,242	0,201	46,58*	55,63
100	0,217	0,223	52,09	50,77*
150	0,12	0,2	73,51	55,85*
200	0,17	0,134	62,47	70,42*

Keterangan:

(*) merupakan persen kematian terpilih yang akan digunakan untuk perhitungan LC_{50}

Tabel 4.10

Serapan dan Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Blanko Positif Sisplatin setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37 °C

Konsentrasi	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
10	0.13	0.183	74.51	64.12*
50	0.13	0.097	76.67*	75.49
100	0.078	0.134	74.51	80.98*
150	0.119	0.125	84.70*	73.73
200	0.07	0.094	86.27*	81.57

Keterangan:

(*) merupakan persen kematian terpilih yang akan digunakan untuk perhitungan LC_{50}

Tabel 4.11
Serapan Blanko Negatif Sel dan Blanko DMSO 2%

Blanko negatif sel	Blanko DMSO 2%
0,510*	0,427
0,318	0,398
0,304	0,391
0,283	0,244
0,181	0,453*
0,328	0,359
0,244	0,116
0,225	0,125

Keterangan:

(*) merupakan serapan yang digunakan dalam perhitungan persen kematian sel MCF-7 terhadap larutan uji (blanko DMSO 2%) dan persen kematian sel MCF-7 terhadap larutan blanko positif sisplatin (blanko negatif sel)

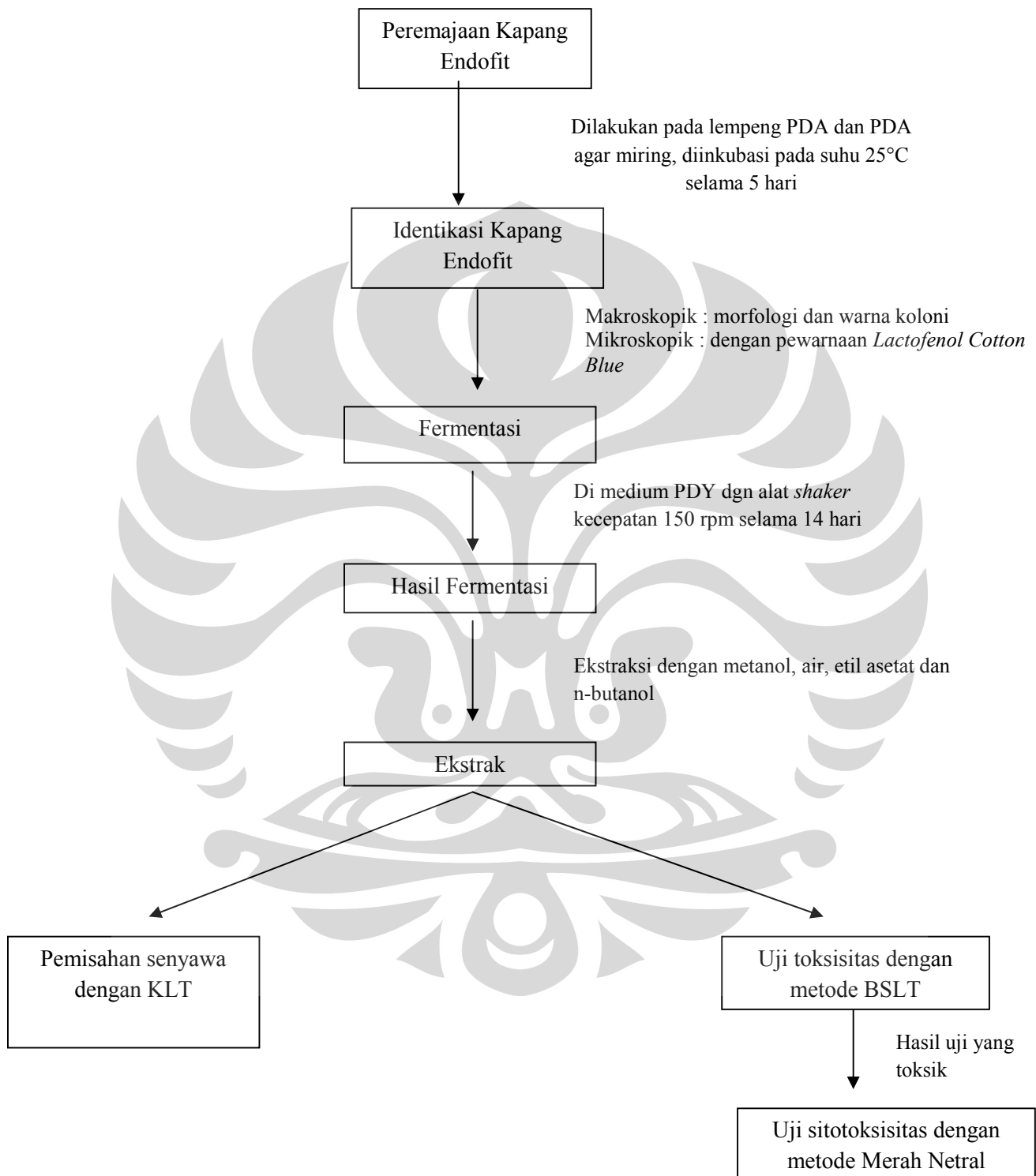
Tabel 4.12
Nilai LC₅₀ (µg/ml) yang Diperoleh Melalui Perhitungan dengan Menggunakan
Persamaan Probit

Perlakuan	Nilai LC ₅₀ (µg/ml)
Larutan uji ekstrak etil asetat AP3	36,81
Larutan uji ekstrak etil asetat RF2	86,70
Larutan uji ekstrak etil asetat RF5	42,27
Larutan uji ekstrak etil asetat RP1	65,46
Larutan uji ekstrak butanol AP3	142,56
Larutan uji ekstrak butanol RF2	66,98
Larutan uji ekstrak butanol RF5	83,56
Larutan kontrol positif sisplatin	7,36



LAMPIRAN

Lampiran 1 Bagan Kerja Penelitian



Lampiran 2 Spesifikasi Sel MCF-7

ATCC® Number: HTB-22™

Designations: MCF7

Depositors: CM McGrath

Biosafety Level: 1

Shipped: frozen

Medium & Serum: See Propagation

Growth Properties: adherent

Organism: *Homo sapiens* (human)

Morphology: epithelial

Source:
Organ: mammary gland; breast
Disease: adenocarcinoma
Derived from metastatic site: pleural effusion
Cell Type: epithelial

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

Applications: transfection host (Nucleofection technology from Lonza Roche FuGENE® Transfection Reagents)

Receptors: estrogen receptor, expressed

Antigen Expression: Blood Type O; Rh+

DNA Profile Amelogenin: X

(STR):
 CSF1PO: 10
 D13S317: 11
 D16S539: 11,12
 D5S818: 11,12
 D7S820: 8,9

(Lanjutan)

THO1: 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 MCF7 line retains several characteristics of differentiated mammary epithelium including ability to process estradiol via cytoplasmic estrogen receptors and the capability of forming domes. The cells express the WNT7B oncogene [PubMed: 8168088]. 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: The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 0.01 mg/ml bovine insulin; fetal bovine serum to a final concentration of 10% . Atmosphere: air, 95%; carbon dioxide (CO2), 5% Temperature: 37.0°C
Subculturing:	Protocol: Volumes used in this protocol are for 75 sq cm flasks; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes. Note: if floating cells are present, it is recommended that they be

(Lanjutan)

transferred at the first two (2) subcultures as described below. It is not necessary to transfer floating cells for subsequent subcultures.

1. Remove culture medium to a centrifuge tube.
2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin - 0.53 mM EDTA solution to
3. remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor.
4. 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 37C to facilitate dispersal.
5. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
6. Transfer the cell suspension to the centrifuge tube with the medium and cells from step 1, and centrifuge at approximately 125 xg for 5 to 10 minutes. Discard the supernatant.
7. Resuspend the cell pellet in fresh growth medium. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
8. Incubate cultures at 37C.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:3 to 1:6 is recommended

Medium Renewal: 2 to 3 times per week

Preservation:	Freeze medium: Complete growth medium supplemented with 5% (v/v) DMSO Storage temperature: liquid nitrogen vapor phase
Doubling Time:	29 hrs
Related Products:	Recommended medium (without the additional supplements or serum described under ATCC Medium): <u>ATCC 30-2003</u> recommended serum: <u>ATCC 30-2020</u> purified DNA: <u>ATCC HTB-22D</u> purified RNA: <u>ATCC HTB-22R</u> 0.25% (w/v) Trypsin - 0.53 mM EDTA in Hank' BSS (w/o Ca++, Mg++): <u>ATCC30-2101</u> Cell culture tested DMSO: <u>ATCC 4-X</u>

(Lanjutan)

References:

- 21405: Sugarman BJ, et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 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. *Int. J. Cancer* 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. *Cancer Res.* 43: 2831-2835, 1983. PubMed: [6850594](#)
- 23079: Lan MS, et al. Polypeptide core of a human pancreatic tumor mucin antigen. *Cancer Res.* 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. *Cancer Res.* 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. *Cancer Res.* 54: 2615-2621, 1994. PubMed: [8168088](#)
- 23217: Soule HD, et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409-1416, 1973. PubMed: [4357757](#)
- 25065: Bellet D, et al. Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells. *Cancer Res.* 57: 516-523, 1997. PubMed: [9012484](#)
- 32275: Littlewood-Evans AJ, et al. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 57: 5386-5390, 1997. PubMed: [9393764](#)
- 32278: Komarova EA, et al. Intracellular localization of p53 tumor suppressor protein in gamma-irradiated cells is cell cycle regulated and determined by the nucleus. *Cancer Res.* 57: 5217-5220, 1997. PubMed: [9393737](#)
- 32285: van Dijk MA, et al. A functional assay in yeas for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma. *Cancer Res.* 57: 3478-3485, 1997. PubMed: [9270016](#)
- 32288: Landers JE, et al. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res.* 57: 3562-3568, 1997. PubMed: [9270029](#)
- 32344: Umekita Y, et al. Human prostate tumor growth in athymic mice: inhibition by androgens and stimulation by finasteride. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11802-11807, 1996. PubMed: [8876218](#)
- 32467: Zamora-Leon SP, et al. Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1847-1852, 1996. PubMed: [8700847](#)
- 32488: Geiger T, et al. Antitumor activity of a PKC-alpha antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted into nude mice. *Anticancer Drug Des.* 13: 35-

(Lanjutan)

45, 1998. PubMed: [9474241](#)

32547: Jang SI, et al. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J. Biol. Chem.* 271: 24105-24114, 1996. PubMed: [8798649](#)

32568: Lee JH, et al. The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. *J. Biol. Chem.* 271: 4561-4568, 1996. PubMed: [8626812](#)

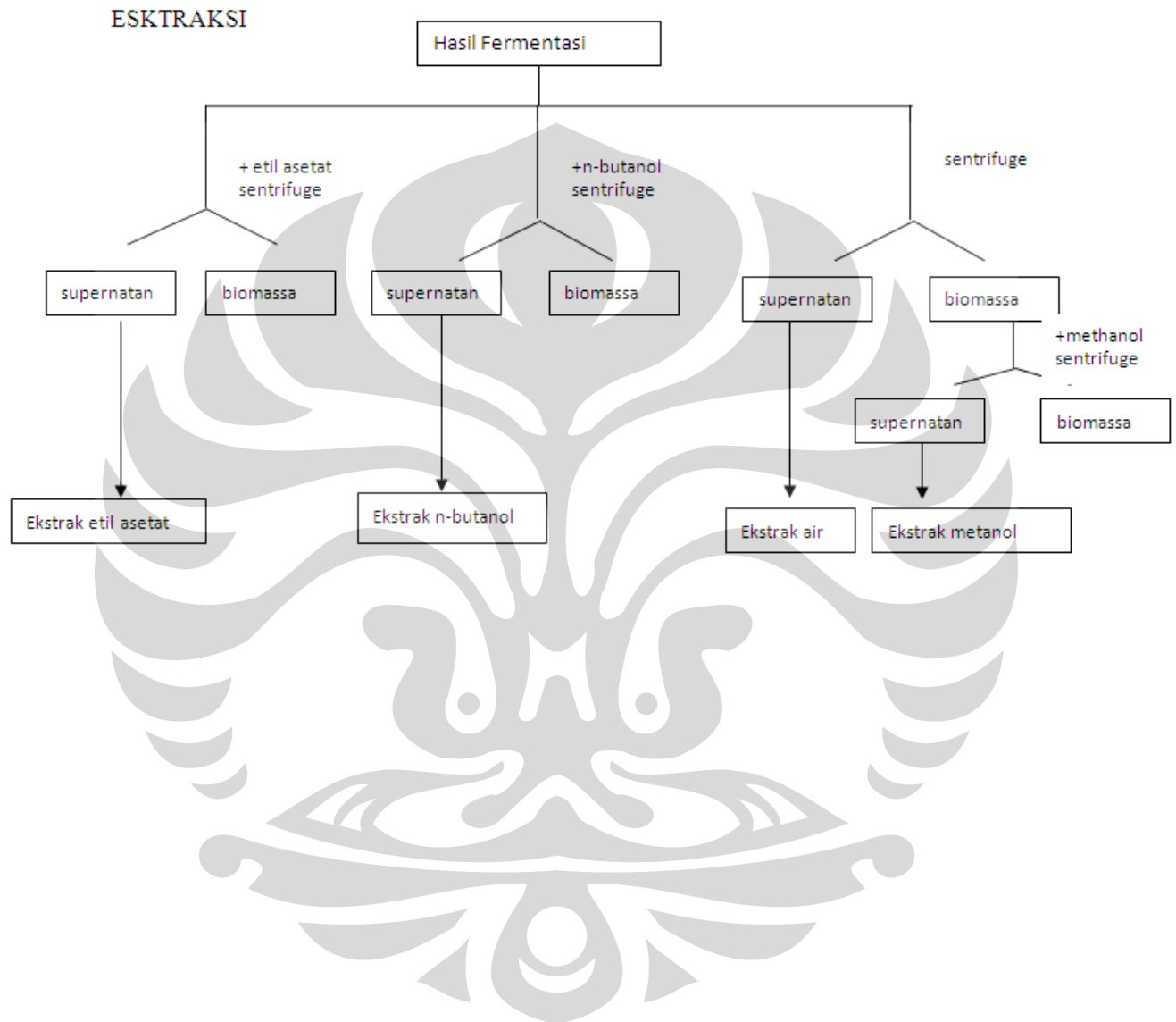
32582: Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 136-140, 1996. PubMed: [8552591](#)

32925: Zhu X, et al. Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6091-6095, 1996. PubMed: [8650224](#)

38764: Bacus SS, et al. Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. *Mol. Carcinog.* 3: 350-362, 1990. PubMed: [1980588](#)



Lampiran 3
Bagan Cara Kerja Ekstraksi



Lampiran 4

Analisis Hasil LC₅₀ pada Pengujian Toksisitas dengan BSLT Isolat AP3
Menggunakan Analisis Probit dengan Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	920.446	31	.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

ekstrak	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a n-butanol	.010	-98.059	.	.
	.020	3.573	.	.
	.030	68.055	.	.
	.040	116.563	.	.
	.050	156.020	.	.
	.060	189.604	.	.
	.070	219.051	.	.
	.080	245.417	.	.
	.090	269.396	.	.
	.100	291.469	.	.
	.150	382.855	.	.
	.200	455.486	.	.
	.250	517.797	.	.
	.300	573.754	.	.
	.350	625.607	.	.
	.400	674.810	.	.
	.450	722.415	.	.
	.500	769.264	.	.
	.550	816.114	.	.
	.600	863.719	.	.
.650	912.922	.	.	
.700	964.775	.	.	
.750	1020.732	.	.	
.800	1083.043	.	.	
.850	1155.674	.	.	
.900	1247.060	.	.	
.910	1269.133	.	.	
.920	1293.112	.	.	
.930	1319.478	.	.	
.940	1348.925	.	.	
.950	1382.509	.	.	
.960	1421.966	.	.	
.970	1470.473	.	.	
.980	1534.956	.	.	
.990	1636.588	.	.	
Air	.010	609.807	.	.

	.020	711.439		
	.030	775.921		
	.040	824.428		
	.050	863.885		
	.060	897.470		
	.070	926.916		
	.080	953.282		
	.090	977.261		
	.100	999.334		
	.150	1090.720		
	.200	1163.351		
	.250	1225.662		
	.300	1281.620		
	.350	1333.472		
	.400	1382.675		
	.450	1430.280		
	.500	1477.130		
	.550	1523.980		
	.600	1571.584		
	.650	1620.787		
	.700	1672.640		
	.750	1728.597		
	.800	1790.908		
	.850	1863.539		
	.900	1954.926		
	.910	1976.998		
	.920	2000.977		
	.930	2027.343		
	.940	2056.790		
	.950	2090.374		
	.960	2129.831		
	.970	2178.339		
	.980	2242.821		
	.990	2344.453		
Metanol	.010	406.776		
	.020	508.408		
	.030	572.891		
	.040	621.398		
	.050	660.855		
	.060	694.439		
	.070	723.886		
	.080	750.252		
	.090	774.231		
	.100	796.304		
	.150	887.690		
	.200	960.321		
	.250	1022.632		
	.300	1078.589		
	.350	1130.442		
	.400	1179.645		
	.450	1227.250		
	.500	1274.099		
	.550	1320.949		
	.600	1368.554		
	.650	1417.757		

	.700	1469.610		
	.750	1525.567		
	.800	1587.878		
	.850	1660.509		
	.900	1751.895		
	.910	1773.968		
	.920	1797.947		
	.930	1824.313		
	.940	1853.760		
	.950	1887.344		
	.960	1926.801		
	.970	1975.308		
	.980	2039.791		
	.990	2141.423		
Etil asetat	.010	-446.676		
	.020	-345.044		
	.030	-280.561		
	.040	-232.054		
	.050	-192.597		
	.060	-159.013		
	.070	-129.566		
	.080	-103.200		
	.090	-79.221		
	.100	-57.148		
	.150	34.238		
	.200	106.869		
	.250	169.180		
	.300	225.137		
	.350	276.990		
	.400	326.193		
	.450	373.798		
	.500	420.648		
	.550	467.497		
	.600	515.102		
	.650	564.305		
	.700	616.158		
	.750	672.115		
	.800	734.426		
	.850	807.057		
	.900	898.443		
	.910	920.516		
	.920	944.495		
	.930	970.861		
	.940	1000.308		
	.950	1033.892		
	.960	1073.349		
	.970	1121.856		
	.980	1186.339		
	.990	1287.971		

a. A heterogeneity factor is used.

Lampiran 5
Analisis Hasil LC₅₀ pada Pengujian Toksisitas dengan BSLT Isolat RP1
Menggunakan Analisis Probit dengan Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	126.325	31	.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

ekstrak	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a n-butanol	.010	-1842.348	-13850.845	-698.280
	.020	-1533.608	-11928.973	-512.549
	.030	-1337.722	-10712.783	-391.533
	.040	-1190.365	-9800.140	-298.247
	.050	-1070.501	-9059.615	-220.528
	.060	-968.478	-8430.932	-152.755
	.070	-879.024	-7881.197	-91.835
	.080	-798.929	-7390.400	-35.864
	.090	-726.085	-6945.431	16.431
	.100	-659.033	-6537.217	65.950
	.150	-381.416	-4867.266	291.133
	.200	-160.776	-3579.836	509.897
	.250	28.514	-2532.324	754.564
	.300	198.502	-1677.745	1060.402
	.350	356.021	-1009.317	1467.274
	.400	505.492	-520.912	1999.223
	.450	650.106	-178.166	2643.681
	.500	792.428	68.193	3368.874
	.550	934.749	257.460	4151.161
	.600	1079.364	414.099	4981.726
.650	1228.834	552.657	5863.521	
.700	1386.354	682.409	6809.069	
.750	1556.342	810.286	7841.609	
.800	1745.631	942.914	9001.161	
.850	1966.272	1088.927	10361.341	
.900	2243.888	1264.116	12081.286	
.910	2310.941	1305.405	12497.730	
.920	2383.784	1349.898	12950.501	
.930	2463.880	1398.431	13448.736	
.940	2553.334	1452.205	14005.618	
.950	2655.357	1513.044	14641.233	
.960	2775.221	1583.941	15388.581	
.970	2922.578	1670.361	16308.090	
.980	3118.464	1784.189	17531.468	
.990	3427.204	1961.674	19461.586	
Air	.010	563.132	-3534.072	3644.344
	.020	871.872	-2440.275	4658.150

.030	1067.758	-1859.762	5414.844
.040	1215.115	-1477.529	6038.539
.050	1334.979	-1197.906	6577.161
.060	1437.002	-979.868	7055.579
.070	1526.456	-802.367	7488.732
.080	1606.551	-653.299	7886.433
.090	1679.395	-525.128	8255.526
.100	1746.448	-412.876	8601.006
.150	2024.064	2.149	10081.116
.200	2244.704	286.333	11303.125
.250	2433.994	505.768	12375.870
.300	2603.982	687.590	13354.465
.350	2761.501	845.522	14271.832
.400	2910.972	987.520	15150.188
.450	3055.586	1118.705	16006.208
.500	3197.908	1242.690	16853.775
.550	3340.229	1362.275	17705.743
.600	3484.844	1479.861	18575.360
.650	3634.314	1597.766	19477.809
.700	3791.834	1718.533	20432.342
.750	3961.822	1845.361	21465.931
.800	4151.112	1982.888	22620.584
.850	4371.752	2138.971	23970.694
.900	4649.368	2329.934	25674.866
.910	4716.421	2375.268	26087.264
.920	4789.264	2424.203	26535.593
.930	4869.360	2477.650	27028.915
.940	4958.814	2536.919	27580.301
.950	5060.837	2604.005	28209.670
.960	5180.701	2682.170	28949.750
.970	5328.058	2777.373	29860.475
.980	5523.944	2902.545	31072.509
.990	5832.684	3097.014	32985.644
Metanol			
.010	-1024.562	-9669.701	-66.487
.020	-715.822	-7781.651	153.067
.030	-519.936	-6597.167	305.789
.040	-372.579	-5716.849	431.399
.050	-252.715	-5010.480	543.275
.060	-150.692	-4418.591	647.841
.070	-61.238	-3908.953	748.858
.080	18.858	-3462.169	848.843
.090	91.701	-3065.711	949.649
.100	158.754	-2711.064	1052.734
.150	436.370	-1399.533	1636.338
.200	657.010	-620.546	2363.544
.250	846.300	-155.280	3190.458
.300	1016.288	144.472	4051.122
.350	1173.808	358.870	4912.024
.400	1323.278	526.805	5764.443
.450	1467.893	667.778	6610.674
.500	1610.214	792.449	7457.556
.550	1752.536	907.267	8314.291
.600	1897.150	1016.602	9192.159
.650	2046.621	1123.849	10105.267
.700	2204.140	1232.101	11072.314

	.750	2374.128	1344.758	12120.075
	.800	2563.418	1466.341	13290.670
	.850	2784.058	1604.189	14659.016
	.900	3061.674	1773.263	16385.076
	.910	3128.727	1813.524	16802.548
	.920	3201.571	1857.047	17256.289
	.930	3281.666	1904.664	17755.440
	.940	3371.120	1957.575	18313.185
	.950	3473.143	2017.603	18949.612
	.960	3593.007	2087.740	19697.720
	.970	3740.364	2173.454	20617.934
	.980	3936.250	2286.643	21841.951
	.990	4244.990	2463.599	23772.598
Etil asetat	.010	-1977.513	-14535.587	-805.594
	.020	-1668.773	-12609.666	-623.912
	.030	-1472.887	-11390.072	-506.300
	.040	-1325.530	-10474.252	-416.191
	.050	-1205.666	-9730.625	-341.573
	.060	-1103.643	-9098.833	-276.910
	.070	-1014.189	-8545.928	-219.160
	.080	-934.094	-8051.862	-166.458
	.090	-861.250	-7603.489	-117.566
	.100	-794.197	-7191.707	-71.616
	.150	-516.581	-5500.364	132.175
	.200	-295.941	-4182.147	320.151
	.250	-106.651	-3087.689	517.873
	.300	63.337	-2160.983	751.585
	.350	220.857	-1391.497	1057.397
	.400	370.327	-791.550	1477.805
	.450	514.941	-360.310	2033.769
	.500	657.263	-60.382	2705.394
	.550	799.585	157.361	3459.203
	.600	944.199	328.666	4275.103
	.650	1093.669	474.769	5149.354
	.700	1251.189	608.343	6091.079
	.750	1421.177	738.012	7121.827
	.800	1610.467	871.262	8280.756
	.850	1831.107	1017.166	9641.045
	.900	2108.723	1191.712	11361.634
	.910	2175.776	1232.811	11778.268
	.920	2248.620	1277.091	12231.252
	.930	2328.715	1325.386	12729.726
	.940	2418.169	1378.891	13286.876
	.950	2520.192	1439.425	13922.796
	.960	2640.056	1509.969	14670.498
	.970	2787.413	1595.968	15590.427
	.980	2983.299	1709.264	16814.338
	.990	3292.039	1885.979	18745.226

a. A heterogeneity factor is used.

Lampiran 6
 Analisis Hasil LC₅₀ pada Pengujian Toksisitas dengan BSLT Isolat RF2
 Menggunakan Analisis Probit dengan Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	867.109	31	.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

ekstrak	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT ^a	n-butanol	.010	-410.902	-78614.153	323.162
		.020	-308.356	-67213.222	439.602
		.030	-243.294	-59992.328	526.112
		.040	-194.350	-54569.578	600.436
		.050	-154.538	-50166.382	668.686
		.060	-120.652	-46425.638	733.845
		.070	-90.941	-43152.451	797.690
		.080	-64.337	-40228.286	861.440
		.090	-40.143	-37575.492	926.035
		.100	-17.872	-35140.368	992.271
		.150	74.337	-25165.742	1373.947
		.200	147.621	-17486.065	1925.130
		.250	210.492	-11353.267	2853.678
		.300	266.953	-6740.352	4582.068
		.350	319.272	-3852.279	7570.161
		.400	368.917	-2341.479	11635.267
		.450	416.950	-1547.426	16235.968
		.500	464.221	-1080.939	21078.703
		.550	511.492	-774.297	26081.282
		.600	559.525	-553.687	31255.426
	.650	609.171	-383.173	36660.819	
	.700	661.490	-243.275	42397.086	
	.750	717.950	-122.187	48617.305	
	.800	780.822	-11.675	55568.137	
	.850	854.106	95.455	63691.868	
	.900	946.314	208.325	73935.300	
	.910	968.585	232.914	76412.071	
	.920	992.780	258.678	79103.696	
	.930	1019.383	285.976	82064.312	
	.940	1049.095	315.323	85371.998	
	.950	1082.981	347.487	89145.737	
	.960	1122.793	383.716	93580.954	
	.970	1171.737	426.262	99035.482	
	.980	1236.799	479.966	106289.182	
	.990	1339.345	559.347	117727.172	
Air	---	.010	483.142	-42702.010	2188.867

.020	585.688	-31746.151	2750.380	
.030	650.750	-25000.198	3311.829	
.040	699.694	-20121.625	3930.331	
.050	739.506	-16357.814	4637.966	
.060	773.392	-13372.154	5458.210	
.070	803.104	-10982.974	6406.062	
.080	829.707	-9073.961	7484.963	
.090	853.902	-7556.708	8685.098	
.100	876.173	-6355.850	9985.601	
.150	968.381	-3146.896	17132.949	
.200	1041.665	-1893.128	24110.041	
.250	1104.537	-1247.027	30525.286	
.300	1160.997	-846.878	36466.443	
.350	1213.316	-568.340	42064.070	
.400	1262.962	-358.485	47430.121	
.450	1310.995	-191.047	52657.437	
.500	1358.266	-51.432	57827.044	
.550	1405.537	69.231	63015.603	
.600	1453.570	176.782	68302.805	
.650	1503.215	275.387	73780.107	
.700	1555.534	368.322	79563.337	
.750	1611.995	458.525	85814.440	
.800	1674.866	549.149	92785.161	
.850	1748.150	644.467	100920.703	
.900	1840.359	752.204	111169.269	
.910	1862.630	776.560	113646.273	
.920	1886.824	802.384	116337.838	
.930	1913.428	830.064	119298.073	
.940	1943.139	860.158	122605.010	
.950	1977.025	893.510	126377.562	
.960	2016.837	931.487	130811.031	
.970	2065.781	976.567	136263.025	
.980	2130.843	1034.076	143512.920	
.990	2233.389	1119.986	154944.381	
Metanol	.010	-41.462	-85120.794	760.348
	.020	61.084	-73719.484	876.409
	.030	126.146	-66496.984	961.312
	.040	175.090	-61071.749	1033.152
	.050	214.902	-56665.257	1098.106
	.060	248.788	-52920.387	1159.139
	.070	278.500	-49642.178	1217.962
	.080	305.103	-46712.000	1275.698
	.090	329.298	-44052.073	1333.160
	.100	351.569	-41608.538	1390.987
	.150	443.777	-31564.388	1703.138
	.200	517.061	-23729.245	2098.855
	.250	579.933	-17234.164	2665.119
	.300	636.393	-11794.916	3567.177
	.350	688.712	-7465.760	5114.187
	.400	738.358	-4454.279	7678.612
	.450	786.391	-2666.274	11285.361
	.500	833.662	-1654.935	15583.244
	.550	880.933	-1046.989	20284.520
	.600	928.966	-647.000	25279.284
	.650	978.611	-361.064	30569.255

	.700	1030.930	-141.701	36226.057
	.750	1087.391	37.350	42388.312
	.800	1150.262	192.387	49294.621
	.850	1223.546	335.519	57382.349
	.900	1315.755	479.353	67594.817
	.910	1338.026	509.818	70065.712
	.920	1362.220	541.427	72751.492
	.930	1388.824	574.583	75706.250
	.940	1418.535	609.858	79008.008
	.950	1452.421	648.100	82775.668
	.960	1492.233	690.679	87204.535
	.970	1541.177	740.056	92652.233
	.980	1606.239	801.491	99898.201
	.990	1708.785	890.694	111326.370
Etil asetat	.010	-181.149	-85347.286	622.927
	.020	-78.603	-73946.187	739.199
	.030	-13.541	-66723.842	824.257
	.040	35.403	-61298.737	896.226
	.050	75.215	-56892.357	961.293
	.060	109.101	-53147.587	1022.426
	.070	138.813	-49869.469	1081.340
	.080	165.416	-46939.372	1139.157
	.090	189.611	-44279.518	1196.692
	.100	211.882	-41836.049	1254.583
	.150	304.090	-31792.065	1566.901
	.200	377.374	-23956.621	1962.318
	.250	440.246	-17460.081	2527.123
	.300	496.706	-12016.392	3424.740
	.350	549.025	-7676.290	4960.804
	.400	598.671	-4646.496	7506.915
	.450	646.704	-2840.812	11095.985
	.500	693.975	-1817.851	15382.246
	.550	741.246	-1203.024	20076.641
	.600	789.279	-798.824	25067.195
	.650	838.924	-510.137	30354.415
	.700	891.243	-288.857	36009.300
	.750	947.704	-108.391	42170.140
	.800	1010.575	47.746	49075.348
	.850	1083.859	191.782	57162.173
	.900	1176.068	336.405	67373.851
	.910	1198.339	367.022	69844.594
	.920	1222.533	398.782	72530.223
	.930	1249.137	432.091	75484.829
	.940	1278.848	467.521	78786.431
	.950	1312.734	505.923	82553.932
	.960	1352.546	548.670	86982.631
	.970	1401.490	598.229	92430.147
	.980	1466.552	659.872	99675.907
	.990	1569.098	749.341	111103.809

a. A heterogeneity factor is used.

Lampiran 7
 Analisis Hasil LC₅₀ pada Pengujian Toksisitas dengan BSLT Isolat RF5
 Menggunakan Analisis Probit dengan Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	2712.515	31	.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

ekstrak	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a n-butanol	.010	-224.114	.	.
	.020	-124.522	.	.
	.030	-61.334	.	.
	.040	-13.800	.	.
	.050	24.865	.	.
	.060	57.775	.	.
	.070	86.631	.	.
	.080	112.467	.	.
	.090	135.965	.	.
	.100	157.594	.	.
	.150	247.146	.	.
	.200	318.319	.	.
	.250	379.379	.	.
	.300	434.213	.	.
	.350	485.025	.	.
	.400	533.240	.	.
	.450	579.889	.	.
	.500	625.799	.	.
	.550	671.708	.	.
	.600	718.357	.	.
.650	766.572	.	.	
.700	817.384	.	.	
.750	872.218	.	.	
.800	933.278	.	.	
.850	1004.451	.	.	
.900	1094.003	.	.	
.910	1115.633	.	.	
.920	1139.130	.	.	
.930	1164.967	.	.	
.940	1193.823	.	.	
.950	1226.733	.	.	
.960	1265.398	.	.	
.970	1312.931	.	.	
.980	1376.119	.	.	
.990	1475.711	.	.	

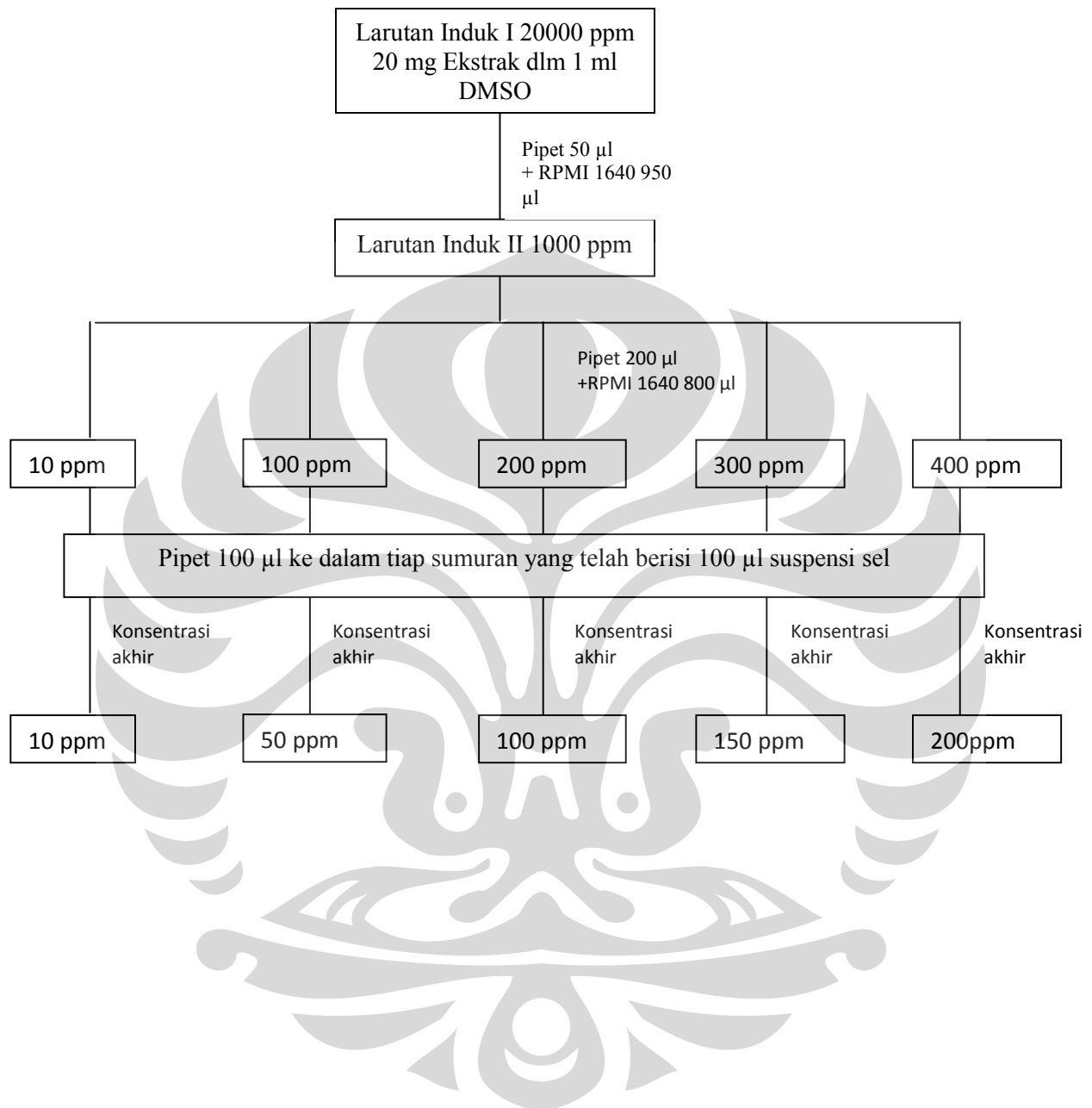
Air	.010	607.574		
	.020	707.166		
	.030	770.354		
	.040	817.887		
	.050	856.552		
	.060	889.462		
	.070	918.318		
	.080	944.155		
	.090	967.652		
	.100	989.282		
	.150	1078.834		
	.200	1150.007		
	.250	1211.067		
	.300	1265.901		
	.350	1316.712		
	.400	1364.928		
	.450	1411.577		
	.500	1457.486		
	.550	1503.396		
	.600	1550.044		
	.650	1598.260		
	.700	1649.072		
	.750	1703.906		
	.800	1764.966		
	.850	1836.139		
	.900	1925.691		
	.910	1947.320		
	.920	1970.818		
	.930	1996.654		
	.940	2025.510		
	.950	2058.420		
	.960	2097.085		
	.970	2144.619		
	.980	2207.807		
	.990	2307.398		
Metanol	.010	250.910		
	.020	350.502		
	.030	413.690		
	.040	461.223		
	.050	499.888		
	.060	532.798		
	.070	561.654		
	.080	587.491		
	.090	610.988		
	.100	632.618		
	.150	722.170		
	.200	793.343		
	.250	854.403		
	.300	909.237		
	.350	960.048		
	.400	1008.264		
	.450	1054.913		
	.500	1100.822		
	.550	1146.732		
	.600	1193.380		

	.650	1241.596	
	.700	1292.408	
	.750	1347.242	
	.800	1408.302	
	.850	1479.475	
	.900	1569.027	
	.910	1590.656	
	.920	1614.154	
	.930	1639.990	
	.940	1668.846	
	.950	1701.756	
	.960	1740.421	
	.970	1787.955	
	.980	1851.143	
	.990	1950.734	
Etil asetat	.010	-238.220	
	.020	-138.628	
	.030	-75.440	
	.040	-27.906	
	.050	10.759	
	.060	43.669	
	.070	72.524	
	.080	98.361	
	.090	121.859	
	.100	143.488	
	.150	233.040	
	.200	304.213	
	.250	365.273	
	.300	420.107	
	.350	470.919	
	.400	519.134	
	.450	565.783	
	.500	611.692	
	.550	657.602	
	.600	704.251	
	.650	752.466	
	.700	803.278	
	.750	858.112	
	.800	919.172	
	.850	990.345	
	.900	1079.897	
	.910	1101.526	
	.920	1125.024	
	.930	1150.861	
	.940	1179.716	
	.950	1212.626	
	.960	1251.291	
	.970	1298.825	
	.980	1362.013	
	.990	1461.605	

a. A heterogeneity factor is used.

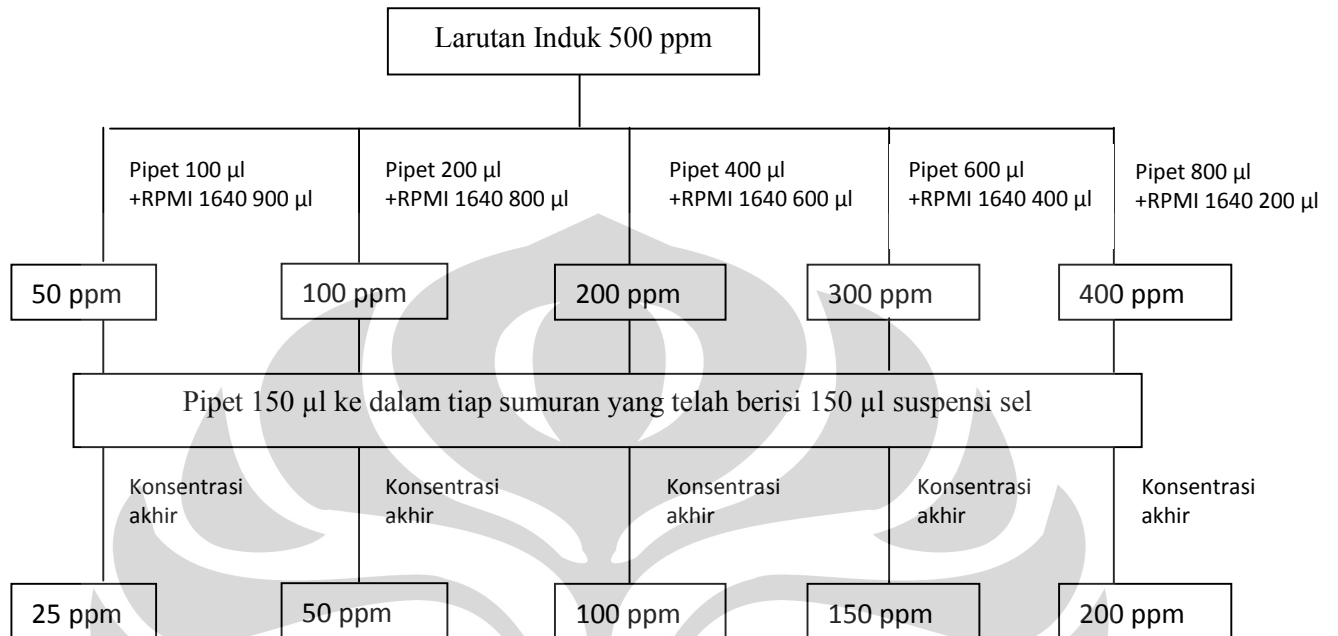
Lampiran 8

Pembuatan Larutan Uji Untuk Pengujian Sitotoksitas terhadap Sel MCF-7



Lampiran 9

Pembuatan Larutan Blanko Positif Sisplatin untuk Pengujian Sitotoksitas terhadap Sel MCF-7



Lampiran 10
 Hasil LC₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat AP3 Menggunakan Analisa Probit dengan
 Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	2.607	3	.456 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-.349	-.948	.043
	.020	-.124	-.664	.229
	.030	.018	-.484	.347
	.040	.125	-.348	.436
	.050	.212	-.238	.509
	.060	.286	-.144	.570
	.070	.351	-.062	.624
	.080	.410	.011	.673
	.090	.462	.078	.717
	.100	.511	.139	.758
	.150	.713	.393	.927
	.200	.873	.594	1.062
	.250	1.011	.766	1.179
	.300	1.134	.919	1.284
	.350	1.249	1.060	1.383
	.400	1.357	1.192	1.479
	.450	1.463	1.318	1.573
	.500	1.566	1.439	1.669
	.550	1.669	1.557	1.767
	.600	1.774	1.672	1.873
	.650	1.883	1.785	1.987
	.700	1.998	1.898	2.114
	.750	2.121	2.015	2.257
	.800	2.259	2.139	2.421
	.850	2.419	2.280	2.616
	.900	2.621	2.453	2.865
	.910	2.669	2.495	2.926
	.920	2.722	2.540	2.992
	.930	2.781	2.589	3.065
	.940	2.846	2.644	3.146
	.950	2.920	2.706	3.239
	.960	3.007	2.779	3.349
	.970	3.114	2.869	3.484
	.980	3.256	2.987	3.663
	.990	3.481	3.174	3.947

Lampiran 11
 Hasil LC₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat RF2 Menggunakan Analisa Probit dengan
 Program SPSS 18

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	26.551	3	.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a .010	-.024	.	.
.020	.206	.	.
.030	.352	.	.
.040	.462	.	.
.050	.551	.	.
.060	.627	.	.
.070	.693	.	.
.080	.753	.	.
.090	.807	.	.
.100	.857	.	.
.150	1.064	.	.
.200	1.228	.	.
.250	1.369	.	.
.300	1.496	.	.
.350	1.613	.	.
.400	1.724	.	.
.450	1.832	.	.
.500	1.938	.	.
.550	2.044	.	.
.600	2.152	.	.
.650	2.263	.	.
.700	2.380	.	.
.750	2.507	.	.
.800	2.648	.	.
.850	2.812	.	.
.900	3.019	.	.
.910	3.069	.	.
.920	3.123	.	.
.930	3.182	.	.
.940	3.249	.	.
.950	3.325	.	.
.960	3.414	.	.
.970	3.524	.	.
.980	3.670	.	.
.990	3.900	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

Lampiran 12
 Hasil LC₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat RF5 Menggunakan Analisa Probit dengan
 Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	2.318	3	.509 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT	.010	-.207	-.758	.157
	.020	.008	-.487	.335
	.030	.144	-.316	.449
	.040	.247	-.187	.535
	.050	.330	-.082	.604
	.060	.401	.007	.664
	.070	.463	.085	.716
	.080	.519	.155	.762
	.090	.570	.219	.805
	.100	.616	.277	.844
	.150	.810	.518	1.007
	.200	.963	.710	1.137
	.250	1.095	.873	1.249
	.300	1.213	1.018	1.351
	.350	1.323	1.152	1.447
	.400	1.427	1.277	1.539
	.450	1.527	1.396	1.630
	.500	1.626	1.511	1.723
	.550	1.725	1.622	1.819
	.600	1.826	1.730	1.921
	.650	1.930	1.837	2.032
	.700	2.040	1.944	2.154
	.750	2.158	2.054	2.291
	.800	2.290	2.173	2.448
	.850	2.443	2.308	2.634
	.900	2.636	2.474	2.872
	.910	2.683	2.514	2.930
	.920	2.734	2.557	2.993
	.930	2.789	2.604	3.062
	.940	2.852	2.657	3.140
	.950	2.923	2.717	3.228
	.960	3.006	2.787	3.332
	.970	3.109	2.873	3.461
	.980	3.245	2.987	3.632
	.990	3.460	3.167	3.901

Lampiran 13
 Hasil LC₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat RP1 Menggunakan Analisa Probit dengan
 Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	7.283	3	.063 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a			
.010	.638	-.368	1.048
.020	.776	-.127	1.147
.030	.864	.026	1.210
.040	.929	.141	1.258
.050	.983	.234	1.297
.060	1.029	.313	1.330
.070	1.069	.383	1.359
.080	1.104	.445	1.386
.090	1.137	.501	1.410
.100	1.167	.553	1.432
.150	1.291	.765	1.525
.200	1.390	.933	1.601
.250	1.474	1.074	1.668
.300	1.550	1.200	1.730
.350	1.621	1.313	1.791
.400	1.688	1.418	1.851
.450	1.752	1.515	1.913
.500	1.816	1.606	1.979
.550	1.880	1.691	2.050
.600	1.944	1.772	2.129
.650	2.011	1.848	2.218
.700	2.081	1.921	2.319
.750	2.157	1.993	2.433
.800	2.242	2.069	2.567
.850	2.341	2.151	2.728
.900	2.465	2.249	2.936
.910	2.495	2.272	2.987
.920	2.527	2.297	3.042
.930	2.563	2.324	3.103
.940	2.603	2.354	3.172
.950	2.649	2.388	3.250
.960	2.702	2.428	3.342
.970	2.768	2.477	3.456
.980	2.856	2.541	3.608
.990	2.994	2.641	3.849

a. A heterogeneity factor is used.

Lampiran 14
 Hasil LC₅₀ Ekstrak n-Butanol Isolat AP3 Menggunakan Analisa Probit dengan
 Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	14.416	3	.002 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT ^a	.010	.306	-8.704	1.094
	.020	.522	-7.303	1.217
	.030	.660	-6.414	1.296
	.040	.763	-5.747	1.357
	.050	.847	-5.204	1.407
	.060	.919	-4.743	1.450
	.070	.981	-4.340	1.488
	.080	1.038	-3.978	1.522
	.090	1.089	-3.651	1.554
	.100	1.136	-3.349	1.584
	.150	1.330	-2.108	1.714
	.200	1.485	-1.136	1.832
	.250	1.618	-.322	1.953
	.300	1.737	.371	2.100
	.350	1.848	.943	2.307
	.400	1.952	1.363	2.625
	.450	2.054	1.630	3.072
	.500	2.154	1.799	3.606
	.550	2.253	1.918	4.190
	.600	2.355	2.013	4.809
	.650	2.460	2.098	5.463
	.700	2.570	2.177	6.162
	.750	2.689	2.258	6.921
	.800	2.822	2.342	7.772
	.850	2.977	2.437	8.767
	.900	3.172	2.552	10.023
	.910	3.219	2.579	10.327
	.920	3.270	2.609	10.658
	.930	3.326	2.641	11.021
	.940	3.389	2.677	11.427
	.950	3.460	2.718	11.890
	.960	3.544	2.766	12.434
	.970	3.647	2.824	13.104
	.980	3.785	2.902	13.994
	.990	4.001	3.023	15.398

a. A heterogeneity factor is used.

Lampiran 15
 Hasil LC₅₀ Ekstrak n-Butanol Isolat RF2 Menggunakan Analisa Probit dengan
 Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	16.583	3	.001 ^b

- a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.
- b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	.087	-6.551	.913
	.020	.291	-5.600	1.033
	.030	.420	-4.997	1.109
	.040	.517	-4.544	1.167
	.050	.597	-4.176	1.214
	.060	.664	-3.863	1.255
	.070	.723	-3.589	1.291
	.080	.776	-3.343	1.323
	.090	.824	-3.120	1.353
	.100	.868	-2.916	1.380
	.150	1.051	-2.070	1.498
	.200	1.197	-1.404	1.596
	.250	1.322	-.839	1.687
	.300	1.434	-.339	1.777
	.350	1.538	.111	1.873
	.400	1.637	.520	1.982
	.450	1.732	.885	2.118
	.500	1.826	1.197	2.300
	.550	1.920	1.444	2.546
	.600	2.015	1.629	2.863
	.650	2.114	1.769	3.241
	.700	2.218	1.883	3.674
	.750	2.330	1.984	4.162
	.800	2.455	2.082	4.720
	.850	2.601	2.185	5.382
	.900	2.784	2.306	6.224
	.910	2.828	2.334	6.428
	.920	2.876	2.365	6.650
	.930	2.929	2.398	6.895
	.940	2.988	2.434	7.168
	.950	3.055	2.475	7.481
	.960	3.134	2.523	7.849
	.970	3.232	2.582	8.301
	.980	3.361	2.658	8.904
	.990	3.565	2.778	9.854

a. A heterogeneity factor is used.

Lampiran 16
 Hasil LC₅₀ Ekstrak n-Butanol Isolat RF5 Menggunakan Analisa Probit dengan
 Program SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	4.726	3	.193 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-.102	-.738	.293
	.020	.135	-.428	.486
	.030	.286	-.231	.608
	.040	.399	-.083	.701
	.050	.491	.037	.776
	.060	.569	.139	.840
	.070	.638	.228	.896
	.080	.700	.308	.947
	.090	.756	.381	.993
	.100	.807	.448	1.035
	.150	1.020	.724	1.211
	.200	1.190	.942	1.353
	.250	1.335	1.127	1.476
	.300	1.466	1.291	1.589
	.350	1.587	1.439	1.697
	.400	1.702	1.576	1.804
	.450	1.813	1.703	1.913
	.500	1.922	1.820	2.027
	.550	2.031	1.930	2.149
	.600	2.142	2.036	2.279
	.650	2.257	2.140	2.418
	.700	2.378	2.246	2.569
	.750	2.509	2.358	2.734
	.800	2.654	2.481	2.920
	.850	2.823	2.622	3.138
	.900	3.037	2.798	3.415
	.910	3.088	2.840	3.482
	.920	3.144	2.886	3.554
	.930	3.206	2.936	3.634
	.940	3.274	2.992	3.724
	.950	3.353	3.056	3.826
	.960	3.445	3.132	3.946
	.970	3.558	3.224	4.094
	.980	3.708	3.346	4.291
	.990	3.945	3.539	4.601

Lampiran 17
 Hasil LC₅₀ Blanko Positif Sisplatin Menggunakan Analisa Probit dengan Program
 SPSS 18

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.540	3	.910 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	-2.109	-5.699	-.825
	.020	-1.761	-5.037	-.588
	.030	-1.539	-4.616	-.437
	.040	-1.373	-4.300	-.324
	.050	-1.237	-4.043	-.232
	.060	-1.122	-3.824	-.153
	.070	-1.021	-3.632	-.084
	.080	-.931	-3.460	-.022
	.090	-.848	-3.304	.034
	.100	-.773	-3.160	.085
	.150	-.459	-2.565	.299
	.200	-.210	-2.092	.470
	.250	.004	-1.687	.616
	.300	.196	-1.324	.748
	.350	.374	-.987	.871
	.400	.543	-.668	.988
	.450	.706	-.360	1.101
	.500	.867	-.058	1.214
	.550	1.028	.243	1.328
	.600	1.191	.547	1.445
	.650	1.360	.856	1.571
	.700	1.538	1.174	1.713
	.750	1.730	1.492	1.891
	.800	1.944	1.778	2.156
	.850	2.193	2.017	2.561
	.900	2.506	2.259	3.127
	.910	2.582	2.314	3.267
	.920	2.664	2.374	3.421
	.930	2.755	2.438	3.590
	.940	2.856	2.510	3.779
	.950	2.971	2.590	3.995
	.960	3.107	2.685	4.250
	.970	3.273	2.800	4.565
	.980	3.494	2.953	4.983
	.990	3.843	3.192	5.643

Lampiran 18
Perhitungan Kepadatan Sel

Jumlah sel yang terdapat dalam keempat bidang besar sebanyak 401 sel.

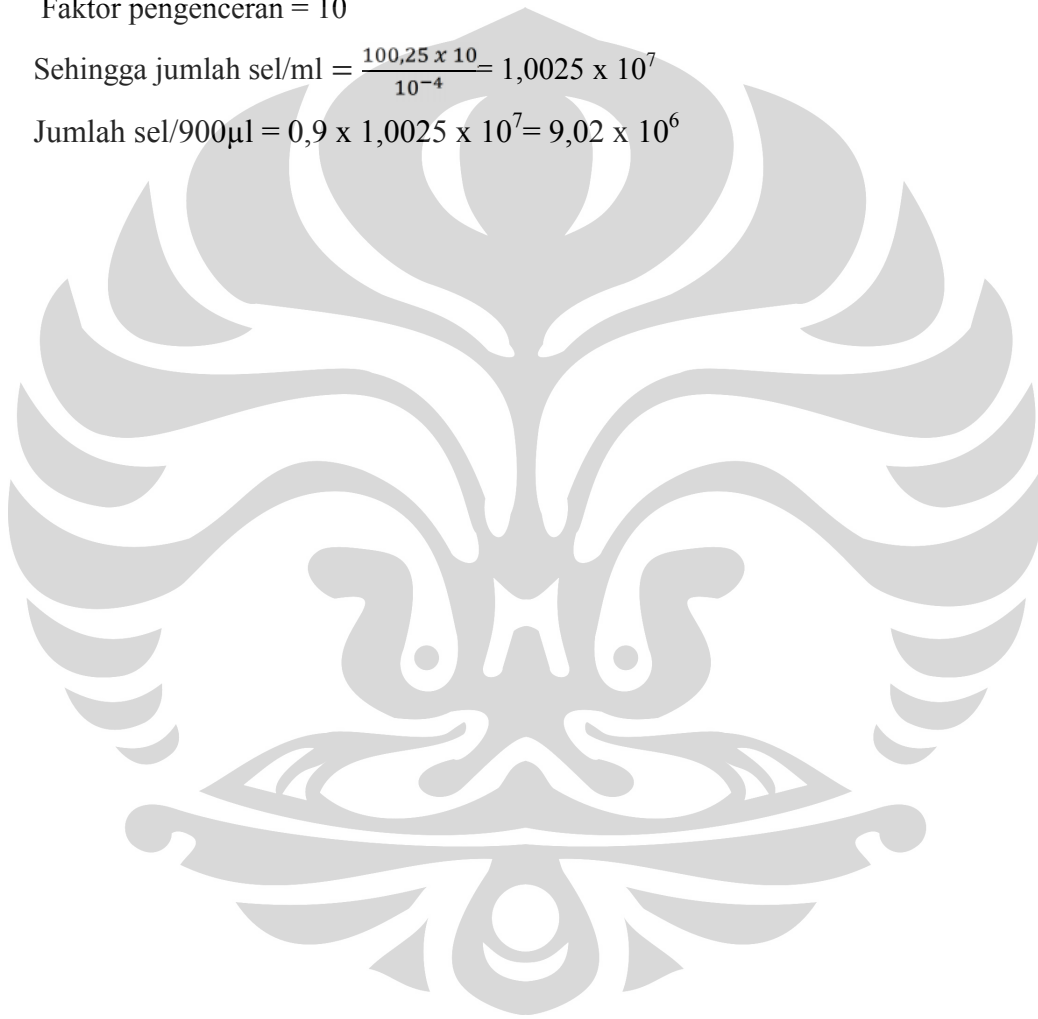
$$\text{Rata-rata jumlah sel tiap bidang} = \frac{401}{4} = 100,25$$

Setiap bidang besar pada hemositometer memiliki volume 10^{-4} ml.

Faktor pengenceran = 10

$$\text{Sehingga jumlah sel/ml} = \frac{100,25 \times 10}{10^{-4}} = 1,0025 \times 10^7$$

$$\text{Jumlah sel/900}\mu\text{l} = 0,9 \times 1,0025 \times 10^7 = 9,02 \times 10^6$$



Lampiran 19

Perhitungan Penyediaan Suspensi Sel untuk Pengujian

Jumlah sel yang diinginkan adalah 3×10^4 sel/ml, maka suspensi sel uji yang dibutuhkan untuk mengisi 96 sumur adalah:

$$P1 \times V1 = P2 \times V2$$

P1 = Jumlah kepadatan sel yang telah dihitung = $9,02 \times 10^6$ sel/ml

V1 = Volume yang dibutuhkan

P2 = Jumlah kepadatan sel yang diinginkan dalam sumur uji = 3×10^4 sel/ml

V2 = Volume total sumur uji = $0,1 \text{ ml} \times 100 \text{ sumur} = 10 \text{ ml}$

$$P1 \times V1 = P2 \times V2$$

$$9,02 \times 10^6 \text{ sel/ml} \times V1 = 3 \times 10^4 \text{ sel/ml} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 49,89 \mu\text{l} \text{ dibulatkan menjadi } 50 \mu\text{l}$$

$$\text{Volume RPMI yang ditambahkan} = 10.000 \mu\text{l} - 50 \mu\text{l} = 9950 \mu\text{l}$$

Lampiran 20
Pemetaan Pelat Uji Sitotoksitas terhadap Sel MCF-7

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	sel	sel	sel	sel	sel	sel	sel	sel
2	1(10)	2(10)	3(10)	4(10)	5(10)	6(10)	7(10)	+(25)
3	1(10)	2(10)	3(10)	4(10)	5(10)	6(10)	7(10)	+(25)
4	1(50)	2(50)	3(50)	4(50)	5(50)	6(50)	7(50)	+(50)
5	1(50)	2(50)	3(50)	4(50)	5(50)	6(50)	7(50)	+(50)
6	1(100)	2(100)	3(100)	4(100)	5(100)	6(100)	7(100)	+(100)
7	1(100)	2(100)	3(100)	4(100)	5(100)	6(100)	7(100)	+(100)
8	1(150)	2(150)	3(150)	4(150)	5(150)	6(100)	7(150)	+(150)
9	1(150)	2(150)	3(150)	4(150)	5(150)	6(150)	7(150)	+(150)
10	1(200)	2(200)	3(200)	4(200)	5(200)	6(150)	7(200)	+(200)
11	1(200)	2(200)	3(200)	4(200)	5(200)	6(200)	7(200)	+(200)
12	DMSO 2%	DMSO 2%	DMSO 2%	DMSO 2%	DMSO 2%	DMSO 2%	DMSO 2%	DMSO 2%

1. Sumur A2-A11 berisi 100 μ L suspensi sel dan 100 μ L larutan uji 1 dalam berbagai konsentrasi :
 - a. A2 & A3; larutan uji 1 konsentrasi 0,02 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 10 μ g/mL
 - b. A4 & A5; larutan uji 1 konsentrasi 0,1 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 50 μ g/mL
 - c. A6 & A7; larutan uji 1 konsentrasi 0,2 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 100 μ g/mL
 - d. A8 & A9; larutan uji 1 konsentrasi 0,3 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 150 μ g/mL
 - e. A10 & A11; larutan uji 1 konsentrasi 0,4 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 200 μ g/mL
2. Sumur B2-B11 berisi 100 μ L suspensi sel dan 100 μ L larutan uji 2 dalam berbagai konsentrasi :
 - a. B2 & B3; larutan uji 2 konsentrasi 0,02 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 10 μ g/mL
 - b. B4 & B5; larutan uji 2 konsentrasi 0,1 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 50 μ g/mL
 - c. B6 & B7; larutan uji 2 konsentrasi 0,2 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 100 μ g/mL
 - d. B8 & B9; larutan uji 2 konsentrasi 0,3 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 150 μ g/mL
 - e. B10 & B11; larutan uji 2 konsentrasi 0,4 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 200 μ g/mL
3. Sumur C2-C11 berisi 100 μ L suspensi sel dan 100 μ L larutan uji 3 dalam berbagai konsentrasi :
 - a. C2 & C3; larutan uji 3 konsentrasi 0,02 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 10 μ g/mL
 - b. C4 & C5; larutan uji 3 konsentrasi 0,1 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 50 μ g/mL
 - c. C6 & C7; larutan uji 3 konsentrasi 0,2 μ g/ μ L; konsentrasi akhir 100 μ g/mL

- d. C8 & C9; larutan uji 3 konsentrasi 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- e. C10 & C11; larutan uji 3 konsentrasi 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
4. Sumur D2-D11 berisi 100 μL suspensi sel dan 100 μL larutan uji 4 dalam berbagai konsentrasi :
 - a. D2 & D3; larutan uji 4 konsentrasi 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - b. D4 & D5; larutan uji 4 konsentrasi 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - c. D6 & D7; larutan uji 4 konsentrasi 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - d. D8 & D9; larutan uji 4 konsentrasi 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - e. D10 & D11; larutan uji 4 konsentrasi 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
5. Sumur E2-E11 berisi 100 μL suspensi sel dan 100 μL larutan uji 5 dalam berbagai konsentrasi :
 - a. E2 & E3; larutan uji 5 konsentrasi 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - b. E4 & E5; larutan uji 5 konsentrasi 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - c. E6 & E7; larutan uji 5 konsentrasi 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - d. E8 & E9; larutan uji 5 konsentrasi 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - e. E10 & E11; larutan uji 5 konsentrasi 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
6. Sumur F2-F11 berisi 100 μL suspensi sel dan 100 μL larutan uji 6 dalam berbagai konsentrasi :
 - a. F2 & F3; larutan uji 6 konsentrasi 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - b. F4 & F5; larutan uji 6 konsentrasi 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - c. F6 & F7; larutan uji 6 konsentrasi 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - d. F8 & F9; larutan uji 6 konsentrasi 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - e. F10 & F11; larutan uji 6 konsentrasi 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
7. Sumur G2-G11 berisi 100 μL suspensi sel dan 100 μL larutan uji 7 dalam berbagai konsentrasi :
 - a. G2 & G3; larutan uji 7 konsentrasi 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - b. G4 & G5; larutan uji 7 konsentrasi 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - c. G6 & G7; larutan uji 7 konsentrasi 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - d. G78 & G9; larutan uji 7 konsentrasi 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - e. G10 & G11; larutan uji 7 konsentrasi 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
8. Sumur H2-H11 berisi 100 μL suspensi sel dan 100 μL larutan control positif sisplatin dalam berbagai konsentrasi :
 - f. H2 & H3; larutan uji 8 konsentrasi 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - g. H4 & H5; larutan uji 8 konsentrasi 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - h. H6 & H7; larutan uji 8 konsentrasi 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - i. H8 & H9; larutan uji 8 konsentrasi 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - j. H10 & H11; larutan uji 8 konsentrasi 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; konsentrasi akhir 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
9. Sumur A1-H1 berisi 100 μL suspensi sel
10. Sumur A12-H12 berisi 100 μl suspensi sel dan 100 μl dan blangko DMSO 2%

Lampiran 21

Uji Distribusi Normal Shapiro-Wilk terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7
setelah Inkubasi selama 24 Jam

Tujuan : Untuk mengetahui apakah data persentase kematian sel
MCF-7 terdistribusi secara normal atau tidak

Hipotesis :

H₀ = Data persentase kematian sel MCF-7 tidak terdistribusi secara normal

H₁ = Data persentase kematian sel MCF-7 terdistribusi secara normal

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H₀ ditolak jika signifikansi > 0,05

Hasil :

Tests of Normality							
sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
permati	AP3 etil asetat	.309	5	.135	.861	5	.232
	RF2 etil asetat	.204	5	.200*	.913	5	.483
	RF5 etil asetat	.273	5	.200*	.789	5	.066
	RP1 etil asetat	.195	5	.200*	.931	5	.605
	AP3 butanol	.243	5	.200*	.894	5	.377
	RF2 butanol	.221	5	.200*	.960	5	.805
	RF5 butanol	.288	5	.200*	.906	5	.447
	sisplatin	.216	5	.200*	.881	5	.314
	blanko DMSO	.184	5	.200*	.984	5	.954

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Kesimpulan :

Nilai signifikansi data semua perlakuan > 0,05 maka H₀ ditolak, H₁ diterima sehingga data persentase kematian sel dinyatakan terdistribusi secara normal.

Lampiran 22

Uji Homogenitas Levene terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah
Inkubasi selama 24 Jam

Tujuan : Untuk mengetahui apakah data persentase kematian sel
MCF-7 homogen atau tidak

Hipotesis :

H₀ = Data persentase kematian sel MCF-7 tidak homogen

H₁ = Data persentase kematian sel MCF-7 homogen

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian : H₀ ditolak dan H₁ diterima jika signifikansi > 0,05

Hasil :

Test of Homogeneity of Variances

permati

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.400	8	36	.230

Kesimpulan :

Nilai signifikansi data semua perlakuan > 0,05 maka H₀ ditolak sehingga data persentase kematian sel dinyatakan homogen.

Lampiran 23

Uji Analisis Varians (ANOVA) terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi selama 24 jam

Tujuan : Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan

Hipotesis :

H₀ = Tidak ada perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan

H₁ = Ada perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H₀ ditolak dan H₁ diterima jika signifikansi < 0,05

Hasil :

ANOVA
permati

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10620.846	8	1327.606	2.601	.024
Within Groups	18376.378	36	510.455		
Total	28997.224	44			

Kesimpulan :

Nilai signifikansi perlakuan < 0,05 maka H₀ ditolak sehingga terdapat perbedaan bermakna pada data persentase sel MCF-7 antar perlakuan.

Lampiran 24

Uji Beda Nyata Terkecil Data Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi
selama 24 Jam

Tujuan : Untuk mengetahui hubungan perbedaan yang terdapat pada data persentase kematian sel MCF-7 antar kelompok perlakuan yang dibandingkan

Hipotesis :

H₀ = Tidak ada perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan

H₁ = Ada perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H₀ ditolak dan H₁ diterima jika signifikansi < 0,05

Hasil :

Multiple Comparisons
permati
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
AP3 etil asetat	RF2 etil asetat	15.58400	14.28923	.283	-13.3959	44.5639
	RF5 etil asetat	1.89800	14.28923	.895	-27.0819	30.8779
	RP1 etil asetat	8.05000	14.28923	.577	-20.9299	37.0299
	AP3 butanol	24.70600	14.28923	.092	-4.2739	53.6859
	RF2 butanol	10.55200	14.28923	.465	-18.4279	39.5319
	RF5 butanol	14.56800	14.28923	.315	-14.4119	43.5479
	sisplatin	-16.74102	14.28923	.249	-45.7209	12.2389
	blangko DMSO	41.33741*	14.28923	.006	12.3575	70.3173
RF2 etil asetat	AP3 etil asetat	-15.58400	14.28923	.283	-44.5639	13.3959
	RF5 etil asetat	-13.68600	14.28923	.345	-42.6659	15.2939
	RP1 etil asetat	-7.53400	14.28923	.601	-36.5139	21.4459
	AP3 butanol	9.12200	14.28923	.527	-19.8579	38.1019
	RF2 butanol	-5.03200	14.28923	.727	-34.0119	23.9479
	RF5 butanol	-1.01600	14.28923	.944	-29.9959	27.9639
	sisplatin	-32.32502*	14.28923	.030	-61.3049	-3.3451
	blangko DMSO	25.75341	14.28923	.080	-3.2265	54.7333
RF5 etil asetat	AP3 etil asetat	-1.89800	14.28923	.895	-30.8779	27.0819
	RF2 etil asetat	13.68600	14.28923	.345	-15.2939	42.6659
	RP1 etil asetat	6.15200	14.28923	.669	-22.8279	35.1319
	AP3 butanol	22.80800	14.28923	.119	-6.1719	51.7879
	RF2 butanol	8.65400	14.28923	.549	-20.3259	37.6339

	RF5 butanol	12.67000	14.28923	.381	-16.3099	41.6499
	sisplatin	-18.63902	14.28923	.200	-47.6189	10.3409
	blangko DMSO	39.43941*	14.28923	.009	10.4595	68.4193
RP1 etil asetat	AP3 etil asetat	-8.05000	14.28923	.577	-37.0299	20.9299
	RF2 etil asetat	7.53400	14.28923	.601	-21.4459	36.5139
	RF5 etil asetat	-6.15200	14.28923	.669	-35.1319	22.8279
	AP3 butanol	16.65600	14.28923	.251	-12.3239	45.6359
	RF2 butanol	2.50200	14.28923	.862	-26.4779	31.4819
	RF5 butanol	6.51800	14.28923	.651	-22.4619	35.4979
	sisplatin	-24.79102	14.28923	.091	-53.7709	4.1889
	blangko DMSO	33.28741*	14.28923	.026	4.3075	62.2673
AP3 butanol	AP3 etil asetat	-24.70600	14.28923	.092	-53.6859	4.2739
	RF2 etil asetat	-9.12200	14.28923	.527	-38.1019	19.8579
	RF5 etil asetat	-22.80800	14.28923	.119	-51.7879	6.1719
	RP1 etil asetat	-16.65600	14.28923	.251	-45.6359	12.3239
	RF2 butanol	-14.15400	14.28923	.329	-43.1339	14.8259
	RF5 butanol	-10.13800	14.28923	.483	-39.1179	18.8419
	sisplatin	-41.44702*	14.28923	.006	-70.4269	-12.4671
	blangko DMSO	16.63141	14.28923	.252	-12.3485	45.6113
RF2 butanol	AP3 etil asetat	-10.55200	14.28923	.465	-39.5319	18.4279
	RF2 etil asetat	5.03200	14.28923	.727	-23.9479	34.0119
	RF5 etil asetat	-8.65400	14.28923	.549	-37.6339	20.3259
	RP1 etil asetat	-2.50200	14.28923	.862	-31.4819	26.4779
	AP3 butanol	14.15400	14.28923	.329	-14.8259	43.1339
	RF5 butanol	4.01600	14.28923	.780	-24.9639	32.9959
	sisplatin	-27.29302	14.28923	.064	-56.2729	1.6869
	blangko DMSO	30.78541*	14.28923	.038	1.8055	59.7653
RF5 butanol	AP3 etil asetat	-14.56800	14.28923	.315	-43.5479	14.4119
	RF2 etil asetat	1.01600	14.28923	.944	-27.9639	29.9959
	RF5 etil asetat	-12.67000	14.28923	.381	-41.6499	16.3099
	RP1 etil asetat	-6.51800	14.28923	.651	-35.4979	22.4619
	AP3 butanol	10.13800	14.28923	.483	-18.8419	39.1179
	RF2 butanol	-4.01600	14.28923	.780	-32.9959	24.9639
	sisplatin	-31.30902*	14.28923	.035	-60.2889	-2.3291
	blangko DMSO	26.76941	14.28923	.069	-2.2105	55.7493
sisplatin	AP3 etil asetat	16.74102	14.28923	.249	-12.2389	45.7209
	RF2 etil asetat	32.32502*	14.28923	.030	3.3451	61.3049
	RF5 etil asetat	18.63902	14.28923	.200	-10.3409	47.6189
	RP1 etil asetat	24.79102	14.28923	.091	-4.1889	53.7709
	AP3 butanol	41.44702*	14.28923	.006	12.4671	70.4269
	RF2 butanol	27.29302	14.28923	.064	-1.6869	56.2729
	RF5 butanol	31.30902*	14.28923	.035	2.3291	60.2889
	blangko DMSO	58.07843*	14.28923	.000	29.0985	87.0583
blangko DMSO	AP3 etil asetat	-41.33741*	14.28923	.006	-70.3173	-12.3575
	RF2 etil asetat	-25.75341	14.28923	.080	-54.7333	3.2265
	RF5 etil asetat	-39.43941*	14.28923	.009	-68.4193	-10.4595
	RP1 etil asetat	-33.28741*	14.28923	.026	-62.2673	-4.3075
	AP3 butanol	-16.63141	14.28923	.252	-45.6113	12.3485
	RF2 butanol	-30.78541*	14.28923	.038	-59.7653	-1.8055
	RF5 butanol	-26.76941	14.28923	.069	-55.7493	2.2105
	sisplatin	-58.07843*	14.28923	.000	-87.0583	-29.0985

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.