



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

LISANA SIDQI ALIYA

0706197515

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

DEPOK

JULI 2010



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

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

LISANA SIDQI ALIYA

0706197515


**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
JULI 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 : Lisana Sidqi Aliya

NPM : 0706197515

Tanda Tangan : 

Tanggal : 19 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Lisana Sidqi Aliya
NPM : 0706197515
Program Studi : Sarjana Farmasi Ekstensi FMIPA UI
Judul Skripsi : Uji Sitotoksitas Hasil Fermentasi Isolat Kapang Endofit dari Ranting *Garcinia forbesii* King serta Daun 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 : Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS (.....)

Pembimbing : Dr. Abdul Mun'im MSi (.....)

Penguji : Dr. Maksum Radji, MBIomed (.....)

Penguji : Dr. Yahdiana Harahap, MS (.....)

Penguji : Sutriyo, MSi, Apt (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang senantiasa memberikan berkah dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Dalam pelaksanaan penelitian ini, penulis banyak mendapatkan bantuan berbagai pihak. Untuk itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Ibu Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS selaku Pembimbing I dan Kepala Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian ini serta banyak memberikan bimbingan, saran dukungan biaya dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MSi selaku Pembimbing II yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis dan memberikan bantuan serta saran selama penelitian berlangsung hingga tersusunya skripsi ini.
4. Dra. Juheini Amin, MSi selaku Pembimbing Akademik yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan saran dan masukan akademis kepada penulis selama menempuh masa studi di Departemen Farmasi.
5. Bapak Dr. dr. Abidin Widjanarko, SpPD, KHOM selaku Direktur SDM Rumah Sakit Kanker Dharmais atas izin penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan RSKD yang telah diberikan kepada penulis.
6. Ibu Dra. Wan Lelly Heffen, MSc serta seluruh staf Bagian Litbang RSKD yang telah bersedia membagi ilmu dan membimbing penulis selama penelitian di Litbang.
7. Seluruh staf pengajar, karyawan dan laboran Departemen Farmasi yang telah banyak memberikan bekal ilmu, berbagi pengalaman, dan pengetahuan kepada penulis selama masa studi di Departemen Farmasi.
8. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Kimia, Teknologi Farmasetika serta Lab. Farmakologi, terimakasih atas kebersamaannya selama masa penelitian di laborotarium.

9. Seluruh teman-teman angkatan 2007 Ekstensi Farmasi UI khususnya kepada Rizki Ayu, Dini K, Faizah, Juliati, Bernoulli, Bagus, Jati, Koba dan Dedy serta teman-teman 2ndfloor NH'ers, Fitriana, Riani dan Aurora, atas begitu banyak kebersamaan manis dan motivasi yang ditularkan.
10. My friend and statistic tutor David Brandt, thank you so much for the tutoring and advices you gave during my analysis period, and also for sharing the time and experiences with me.
11. Arpit Dave, for being an ingenious, sincere, and inspiring persona, thank you.
12. Dan akhirnya, tak henti penulis mengucapkan syukur dan berterimakasih kepada orang tua dan adik tercinta yang selalu dan selalu mencurahkan kasih sayang, motivasi, bantuan dan dukungan yang tak ternilai selama ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Harapan penulis, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan dunia farmasi.

Penulis
2010

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

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

Nama : Lisana Sidqi Aliya

NPM : 0706197515

Program Studi : Sarjana Farmasi Ekstensi

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 Sitotoksisitas Hasil Fermentasi Isolat Kapang Endofit dari Ranting *Garcinia forbesii* King serta Daun 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 pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 30 Mei 2010

Yang menyatakan



Lisana Sidqi Aliya

ABSTRAK

Nama : Lisana Sidqi Aliya
Program Studi : Farmasi Ekstensi 2007, Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Kampus Depok, Universitas Indonesia
Judul : Uji Sitotoksitas Hasil Fermentasi Isolat Kapang Endofit dari Ranting *Garcinia forbesii* King serta Daun dan Akar *Garcinia porrecta* Wall terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Endofit adalah organisme yang membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala negatif pada inangnya. Kapang endofit memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim dan metabolit sekunder yang memiliki khasiat terapeutik, sehingga menyimpan potensi kekayaan alam baru untuk dimanfaatkan di berbagai bidang farmasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya efek anti-kanker senyawa metabolit sekunder yang didapat dari hasil fermentasi empat isolat kapang endofit dari ranting tanaman *Garcinia forbesii* King serta daun dan akar *Garcinia porrecta* Wall. Dari hasil fermentasi keempat isolat, diperoleh ekstrak air, metanol, n-butanol dan etil asetat untuk masing-masing isolat, sehingga keseluruhan terdapat enambelas ekstrak uji. Pada keenambelas ekstrak uji tersebut telah dilakukan uji pendahuluan dengan metode BSLT untuk memilih delapan ekstrak terbaik. Delapan ekstrak terpilih kemudian diuji sitotoksitasnya terhadap sel MCF-7 melalui metode pewarnaan merah netral dan Spektrofotometri *ELISA Plate Reader*. Pada pengujian ini, digunakan sisplatin sebagai blanko positif. Berdasarkan hasil uji terhadap kedelapan ekstrak uji terpilih, diketahui bahwa seluruh ekstrak memiliki sitotoksitas rendah terhadap sel MCF-7.

Kata Kunci: Kapang Endofit; *Garcinia forbesii*; *Garcinia porrecta*; sel MCF-7.

xviii + 125 hal; gambar; tab; lamp
Bibliografi : 63 (1967-2010)

ABSTRACT

Name : Lisana Sidqi Aliya
Study Program : Pharmacy Extension Program 2007, Department of Pharmacy,
Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Depok Campus,
University of Indonesia
Title : Cytotoxicity Test of The Fermentation Products from
Endophytic Molds Isolated from Branch of *Garcinia forbesii*
King and as well as Leaf and Root of *Garcinia porrecta* Wall
to The Breast Cancer Cell Line MCF-7

Endophyte is microbes that colonize in the living tissues without causing any negative effect to their host plants. Endophytic fungi is capable to produce therapeutic enzymes and secondary metabolites, so they are predicted to become new resources in many pharmaceutical applications. The objective of the research is to understand the anti-cancer effect of the secondary metabolites resulted from fermentation products of four endophytic mold isolated from branch of *Garcinia forbesii* King and as well as leaf and root of *Garcinia porrecta* Wall. From the fermentation products of the fourth mold, water, methanol, n-butanol and ethyl acetate extracts had been collected from each isolates, so there were sixteen extracts as the total number of extracts to be tested. Pre-screening test had been carried out to the sixteenth extracts by using BSLT method to select eight best extracts. The eight selected extracts were tested for their cytotoxicity to the MCF-7 cell line by neutral red staining method and ELISA Plate Reader Spectrophotometry. In this study, cisplatin was used as the positive blank. From the cytotoxic testing of the eight selected extracts, it is found that all extracts had the low cytotoxic effect to the MCF-7 cell line.

Keywords: Endophytic Mold; *Garcinia forbesii*; *Garcinia porrecta*; MCF-7 cell line.

xviii + 125 pages; figures; tables; appendixes
Bibliography : 63 (1967-2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR RUMUS	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penulisan.....	2
1.3. Hipotesis	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Kapang Endofit	3
2.2. Tumbuhan Inang	3
2.3. Fermentasi	7
2.4. <i>Artemia salina</i> Leach	7
2.5. <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	8
2.6. Kanker	9
2.7. Kanker Payudara.....	10
2.8. Sel MCF-7	18
2.9. Kultur Sel	19
2.10. Uji Sitotoksitas secara <i>In Vitro</i>	21
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	23
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	23
3.2. Bahan	23
3.3. Peralatan	24
3.4. Cara Kerja	25
BAB 4. PEMBAHASAN	36
4.1. Tahap I	36
4.2. Tahap II	41
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1. Kesimpulan	48
5.2. Saran	48
DAFTAR ACUAN	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Kurva Pertumbuhan Biomassa selama Proses Fermentasi.....	7
2.2. Anatomi Payudara Normal dengan <i>Lobular Carcinoma In Situ</i> (LCIS) pada Gambar Perbesarannya.....	11
2.3. Anatomi Payudara Normal dengan <i>Ductal Carcinoma In Situ</i> (DCIS) pada Gambar Perbesarannya.....	12
2.4. Anatomi Payudara Normal dengan <i>Invasive Carcinoma Lobular</i> (ILC) pada Gambar Perbesarannya.....	12
2.5. Anatomi Payudara Normal dengan <i>Invasive Carcinoma Ductal</i> (IDC) pada Gambar Perbesarannya.....	12
4.1. Makroskopis Isolat 2.DP1.....	57
4.2. Mikroskopis Isolat 2.DP1.....	57
4.3. Makroskopis Isolat 4.RF1.. ..	58
4.4. Mikroskopis Isolat 4.RF1.....	58
4.5. Makroskopis Isolat 6.AP2.....	59
4.6. Mikroskopis Isolat 6.AP2.....	59
4.7. Makroskopis Isolat 12.RF3.. ..	60
4.8. Mikroskopis Isolat 12.RF3.....	60
4.9. Mikroskopis Sel MCF-7 sebelum Melekat pada Dasar Labu Kultur..	61
4.10. Mikroskopis Sel MCF-7 dalam Medium RPMI 1640 di Dalam Labu Kultur yang Diinkubasi pada 37°C selama 5 Hari.....	61
4.11. Mikroskopis Sel MCF-7 dalam Pelat Kultur Jaringan 96 Sumuran sebelum Dilakukan Pengujian.. ..	62
4.12. Mikroskopis Blanko Sel Negatif dalam Medium RPMI 1640 setelah Dilakukan Pengujian.. ..	62

4.13. Mikroskopis Sel setelah Dilakukan Pengujian dengan Sampel Konsentrasi Akhir 200 µg/ml.	62
4.14. Mikroskopis Sel setelah Dilakukan Pengujian dengan Blanko Sisplatin Konsentrasi Akhir 200 µg/ml.	62
4.15. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Larutan Uji 1 (Ekstrak Air Isolat 2.DP1) dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam.....	63
4.16. Grafik Hubungan antara konsentrasi larutan uji 2 (Ekstrak Air Isolat 4.RF1) dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam.....	63
4.17. Grafik Hubungan antara konsentrasi larutan uji 3 (Ekstrak Air Isolat 6.AP2) dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam.....	64
4.18. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Larutan Uji 4 (Ekstrak Air Isolat 12.RF3) dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam.....	64
4.19. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Larutan Uji 5 (Ekstrak Butanol Isolat 4.RF1) dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam.....	65
4.20. Grafik hubungan antara Konsentrasi Larutan Uji 6 (Ekstrak Butanol Isolat 6.AP2) dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam.....	65
4.21. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Larutan Uji 7 (Ekstrak Etil Asetat Isolat 2.DP1) dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam.....	66
4.22. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Larutan Uji 8 (Ekstrak Etil Asetat Isolat 4.RF1) dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam.....	66
4.23. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Larutan Blanko Sisplatin dengan Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi 24 Jam....	67

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Nilai LC ₅₀ Hasil BSLT Isolat Kapang Endofit.....	69
4.2. Serapan Merah Netral Larutan Uji 1 (Ekstrak Air Isolat 2.DP1) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	70
4.3. Serapan Merah Netral Larutan Uji 2 (Ekstrak Air Isolat 4.RF1) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	71
4.4. Serapan Merah Netral Larutan Uji 3 (Ekstrak Air Isolat 6.AP2) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	72
4.5. Serapan Merah Netral Larutan Uji 4 (Ekstrak Air Isolat 12.RF3) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	73
4.6. Serapan Merah Netral Larutan Uji 5 (Ekstrak Butanol Isolat 4.RF1) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	74
4.7. Serapan Merah Netral Larutan Uji 6 (Ekstrak Butanol Isolat 6.AP2) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	75
4.8. Serapan Merah Netral Larutan Uji 7 (Ekstrak Etil Asetat Isolat 2.DP1) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	76
4.9. Serapan Merah Netral Larutan Uji 8 (Ekstrak Etil Asetat Isolat 12.RF3) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	77
4.10. Serapan Merah Netral Kontrol DMSO dan Kontrol Negatif Sel MCF-7 pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37°C.....	78

4.11. Serapan Merah Netral Larutan Blanko Sisplatin dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	79
4.12. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 1 (Ekstrak Air Isolat 2.DP1) setelah Inkubasi Selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	80
4.13. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 2 (Ekstrak Air Isolat 4.RF1) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	81
4.14. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 3 (Ekstrak Air Isolat 6.AP2) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	82
4.15. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 4 (Ekstrak Air Isolat 12.RF3) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	83
4.16. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 5 (Ekstrak Butanol Isolat 4.RF1) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	84
4.17. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 6 (Ekstrak Butanol Isolat 6.AP2) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	85
4.18. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 7 (Ekstrak Etil Asetat Isolat 2.DP1) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	86
4.19. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 8 (Ekstrak Etil Asetat Isolat 4.RF3) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	87
4.20. Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Blanko Sisplatin setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C.....	88
4.21. Persamaan Garis yang Diperoleh Melalui Regresi Linier.....	89
4.22. Nilai LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) yang Diperoleh melalui Perhitungan dengan Menggunakan Persamaan Regresi Linier.....	90

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Desain Penelitian	92
2. Spesifikasi Sel MCF-7	93
3. Bagan Cara Kerja Fermentasi dan Ekstraksi.....	98
4. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Air Isolat 2.DP1 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	99
5. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Air Isolat 4.RF1 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	100
6. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Air Isolat 6.AP2 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	101
7. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Air Isolat 12.RF3 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	102
8. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Metanol Isolat 2.DP1 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	103
9. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Metanol Isolat 4.RF1 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	104
10. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Metanol Isolat 6.AP2 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	105
11. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Metanol Isolat 12.RF3 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	106
12. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Butanol Isolat 2.DP1 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	107

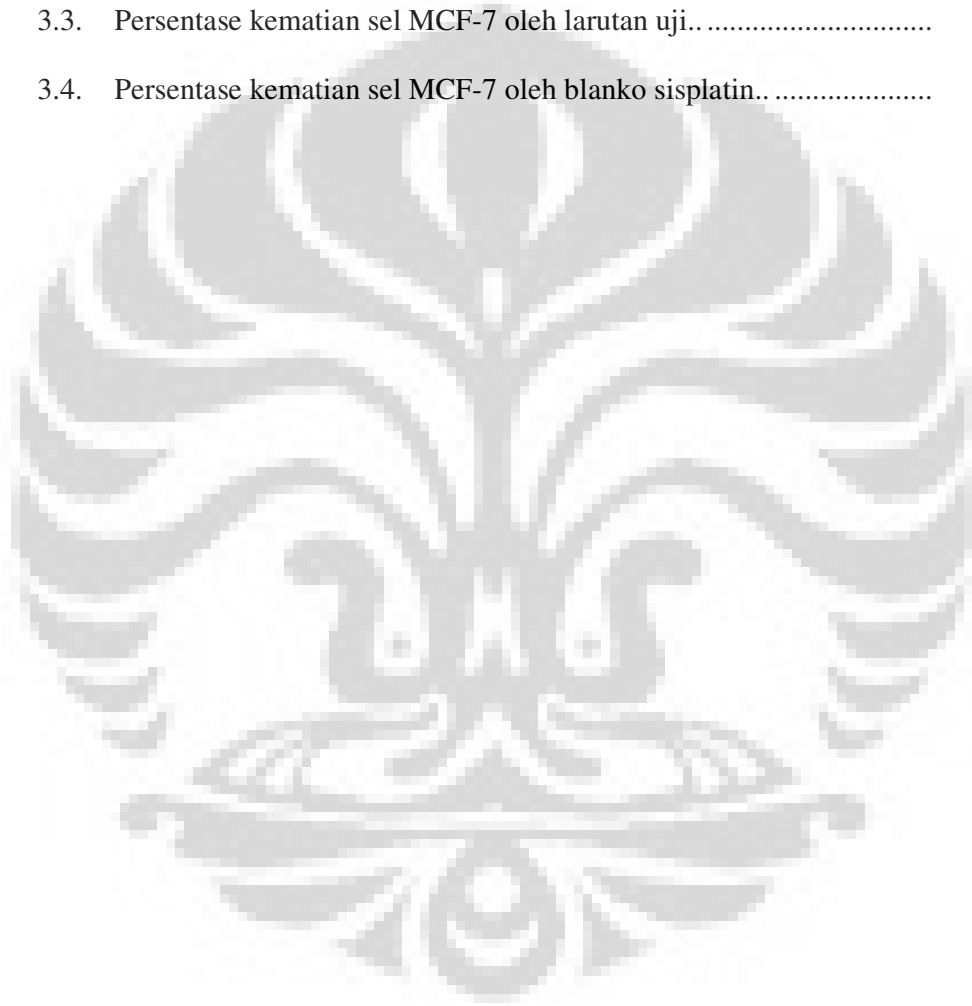
13. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Butanol Isolat 4.RF1 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	108
14. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Butanol Isolat 6.AP2 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	109
15. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Butanol Isolat 12.RF3 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	110
16. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat 2.DP1 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C..	111
17. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat 4.RF3 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	112
18. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat 6.AP2 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C	113
19. Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC ₅₀ Ekstrak Etil Asetat Isolat 12.RF3 terhadap Larva <i>Artemia salina</i> setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C..	114
20. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji.....	115
21. Perhitungan Konsentrasi Larutan Blanko Sisplatin..	115
22. Perhitungan Kepadatan Sel.....	116
23. Perhitungan Penyediaan Suspensi Sel untuk Pengujian..	117
24. Pemetaan pada Pelat Kultur Jaringan 96 Sumuran.....	118
25. Uji Distribusi Normal Shapiro-Wilk terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi selama 24 Jam..	120
26. Uji Homogenitas Levene terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi selama 24 Jam..	121
27. Uji Analisis Varians (ANOVA) terhadap Persentase Kematian Sel MCF-7 setelah Inkubasi selama 24 jam.....	122

28. Uji Beda Nyata Terkecil Data Persentase Kematian Sel MCF-7
setelah Inkubasi selama 24 Jam.. 123



DAFTAR RUMUS

Rumus	Halaman
3.1. Jumlah sel per ml.....	33
3.2. Kepadatan sel.....	34
3.3. Persentase kematian sel MCF-7 oleh larutan uji.....	35
3.4. Persentase kematian sel MCF-7 oleh blanko sisplatin.....	35



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker merupakan keadaan abnormal sel, di mana sekelompok sel mengalami pertumbuhan yang tidak terkontrol dengan tidak mengikuti aturan-aturan pembelahan sel. Kanker adalah penyebab utama kematian di seluruh dunia setelah penyakit kardiovaskuler (Hay *et al.*, 2003) dan diperkirakan akan mencapai angka 12 juta kematian pada 2030 (WHO, *n.d.*).

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang umumnya terjadi pada kaum wanita. Angka Walaupun sudah tampak adanya peningkatan pengobatan dan penurunan angka kematian di negara berkembang, tetapi angka kematian rata-rata akibat kanker payudara masih berkisar 38 kematian di tiap 100.000 wanita (Berry *et al.*, 2005).

Pengobatan kanker hingga saat ini difokuskan pada kemoterapi, radiasi dan pembedahan, sampai terapi alternatif dengan menggunakan obat herbal.

Beberapa jenis tanaman di Indonesia dikenal mampu menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas farmakologis sehingga dapat dimanfaatkan potensinya sebagai bahan baku obat. Namun demikian, kendala yang dihadapi dalam pemanfaatan tanaman adalah dalam hal budidaya, karena eksplorasi tanaman tanpa regenerasi akan merusak keseimbangan ekosistem (Radji, 2005). Untuk mengantisipasi hal tersebut, saat ini digalakkan pencarian sumber alternatif bahan baku obat melalui organisme endofit.

Beberapa spesies kapang endofit diketahui memiliki aktivitas terapeutik sama dengan tanaman inangnya dan diketahui memiliki berbagai enzim dan metabolit sekunder sehingga memiliki arti ekonomis karena menyimpan potensi sumber daya yang hampir tak terbatas (Strobel, Daisy, Castillo, 2005). Melalui pemanfaatan endofit, senyawa bioaktif dapat diperoleh melalui proses fermentasi sehingga dapat diproduksi berulang-ulang dalam waktu singkat tanpa eksplorasi tanaman inang secara total sehingga ekosistem tetap terjaga.

Telah dilakukan penelitian khasiat metabolit sekunder yang diperoleh hasil fermentasi kapang endofit. Beberapa khasiat farmakologis yang telah diuji

yaitu potensi toksisitas dan antimikroba, antiinflamasi, antimalaria, antiproliferasi dan antioksidan (Hay *et al.*, 2003; Taqwim, 2007; Nakatani *et al.*, 2004; Moonkarndi *et al.*, 2004). Selain itu, sedang diteliti dan dikembangkan pula isu terkini yang merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya, yaitu uji sitotoksitas. Dari beberapa penelitian, diketahui bahwa terdapat beberapa spesies kapang endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder seperti senyawa taksol dan xanton yang telah teruji memiliki aktivitas sitotoksik (Strobel, Richard, Arthur, 1997; Pompakakui *et al.*, 2006).

Dari data BSLT penelitian sebelumnya diketahui bahwa hasil fermentasi isolat kapang endofit dari *Garcinia forbesii* dan *Garcinia porrecta* mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba dan bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* (Taqwim, 2007), sehingga diduga memiliki aktivitas antikanker. Hal ini didukung oleh penelitian lain yang membuktikan bahwa sebagian besar senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba umumnya menunjukkan potensi antikanker karena sifat toksisitas yang dimilikinya (Lisdawati, 2002).

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

1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas hasil fermentasi isolat kapang endofit dari ranting *Garcinia forbesii* King serta isolat dari daun 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* dan *Garcinia porrecta* 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

Menurut Stone *et al.* (2000), endofit adalah mikroorganisme yang hidup secara berkoloni dalam jaringan tanaman yang pada umumnya tidak bersifat merugikan, dan dapat dibuktikan integrasinya dengan isolasi atau amplifikasi langsung inti DNA fungi yang terkolonisasi dalam tumbuhan (Haiyan *et al.*, 2005). Kapang endofit merupakan kapang yang seluruh siklus hidupnya berlangsung di dalam tubuh inang dan mampu membentuk koloni dengan hanya sedikit atau tidak membahayakan inangnya. Beberapa jenis kapang endofit dapat membentuk sporokarp akan tetapi belum banyak dipelajari secara luas (Moore, Landecker, 1997; Kubicek, Druzhinina, 2007).

Beberapa kapang endofit dapat diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan walaupun ditanam dalam berbagai kondisi ekologis dan geografis yang berbeda-beda. Keberadaan kapang endofit dapat terlokalisasi di salah satu organ ataupun sistemik, dan pada umumnya berada di ruang antar sel (Haiyan *et al.* 2005).

Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat dari koevolusi atau transfer genetik dari inang ke mikroba endofit (Tan, Zou, 2001). Metabolit sekunder yang dihasilkan kapang endofit pada umumnya identik dengan senyawa yang dihasilkan oleh inangnya (Strobel, Daisy, 2003).

Saat ini kapang endofit telah diperhitungkan sebagai sumber baru penghasil metabolit sekunder yang berpotensi tinggi untuk dimanfaatkan di bidang pengobatan (Strobel, Daisy, Castillo, 2005).

2.2. Tumbuhan Inang

Tanaman *Garcinia* dikenal sebagai sumber senyawa yang kaya akan xanton yang memiliki aktivitas biologis seperti antiinflamasi, antibakteri, antifungi, antioksidan, sitotoksik dan anti-HIV (Kosela *et al.*, 2000).

Beberapa senyawa yang telah berhasil diisolasi dari batang *Garcinia porrecta* yaitu porlanosterol, dulxanton E, dulxanton F, dulxanton F dan dulxanton G, serta ditemukan pula porxanton A yang merupakan senyawa xanton baru (Kardono *et al.*, 2006).

Sedangkan dari ranting *Garcinia forbesii* telah diisolasi dan diidentifikasi chromenoxanthone yang merupakan senyawa baru, forbexanton, dan senyawa xanton umum lainnya seperti pyranojacareubin dan 1,3,7-trihidroksi-2-(3-metilbut-2-enil)-xanton (Harrison, 1993).

2.2.1. *Garcinia porrecta* Wall/Laness

Garcinia porrecta merupakan pohon atau semak dengan damar atau getah. Daun selalu berhadapan bersilang, tunggal, bertulang daun menyirip, kerap kali tanpa daun penumpu. Pangkal daun berbentuk pelepah. Permukaan kulit batang kasar. Bakal buah beruang dua sampai banyak, ruang berbakal biji satu. Buah buni berdinding tebal. Tanaman tersebar di pulau Sumatra dan Maluku (Taqwim, 2002).

Adapun Klasifikasi *Garcinia porrecta* adalah sebagai berikut (Uniprot, *n.d.*, 2009):

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

2.2.2. *Garcinia forbesii* King

Garcinia forbesii merupakan pohon atau semak, dengan damar atau getah daun selalu berhadapan bersilang, tunggal, bertulang daun menyirip. Pangkal tangkai daun berbentuk pelepah. Bakal buah beruang dua sampai banyak, ruang berbakal biji satu. Bunga mekar pada malam hari dan memiliki aroma yang sangat kuat. Buah berbentuk bulat kecil dan berwarna merah (Taqwim, 2002).

Adapun klasifikasi *Garcinia forbesii* adalah sebagai berikut (Uniprot, *n.d.*, 2009):

Kingdom/Regnum	: Plantae
Subkingdom	: Trachebionta
Superdivision	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Theales
Famili	: Clusiaceae/Guttiferae
Genus	: <i>Garcinia</i>
Spesies	: <i>Garcinia forbesii</i>

2.3. Fermentasi

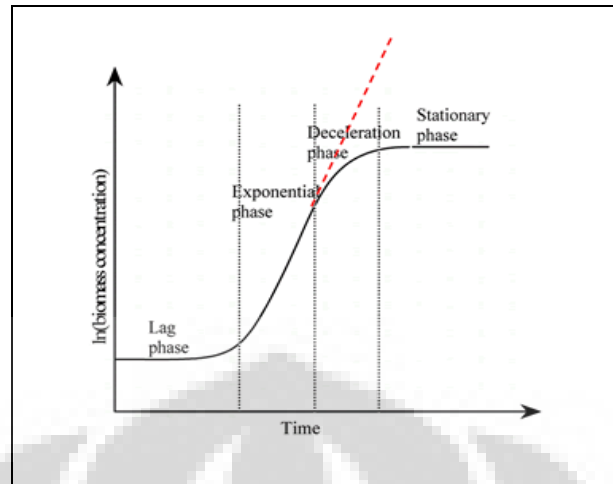
Istilah fermentasi berasal dari bahasa Latin *fervere* yang berarti mendidih. Kata tersebut mendeskripsikan kerja fungi pada malt dan fenomena mendidih yang terlihat disebabkan produksi gas karbon dioksida karena aktivitas katabolisme anaerob dari organisme tersebut (Stanbury, Whitaker, Hall 1995).

Terdapat dua metode fermentasi yang digunakan untuk memperoleh metabolit dari suatu mikroba yaitu fermentasi *batch* dan fermentasi kontinyu. Pada tipe *batch*, fermentasi diproses dalam beberapa siklus. Pada akhir siklus, produk metabolit akan dipanen berikut dengan mediumnya, dan wadah fermentor dapat kembali dipergunakan untuk fermentasi siklus berikutnya. Sedangkan pada tipe kontinyu, fermentasi dan pemanenan produk dilakukan secara terus menerus, diikuti dengan penambahan medium secara konstan (Okafor, 2007).

Ditinjau dari kondisi yang diperlukan, fermentasi dapat dibedakan menjadi beberapa kategori, yaitu fermentasi aerob obligat, anaerob obligat dan fakultatif. Pada fermentasi aerob obligat, organisme membutuhkan oksigen terlarut dalam kuantitas yang memadai untuk mendukung pertumbuhan dan pembentukan metabolitnya, kondisi ini dapat dicapai melalui pengadukan dan pengocokan. Sebaliknya, dalam fermentasi anaerob obligat, mikroba tidak memerlukan oksigen. Pada beberapa spesies, oksigen justru bersifat toksik dan menghambat pertumbuhan mikroba. Kondisi anaerob dapat dicapai dengan cara menyedot udara dan maksimalisasi volume fermentor dengan medium atau dengan menambahkan senyawa reduktor pada medium. Sedangkan fermentasi fakultatif tidak memerlukan kondisi khusus dan dapat berlangsung baik dengan kondisi lingkungan aerobik maupun anaerob (Okafor, 2007).

Selama proses fermentasi, mikroorganisme akan memperbanyak diri sesuai dengan kurva pertumbuhan biomassa (Gambar 2.1) yang diperoleh dengan cara menghitung massa sel pada kapang dalam waktu tertentu. Selama fermentasi berlangsung, pertumbuhan biomassa sel akan melalui beberapa fase, yaitu (Roosheroe, Sjamsuridzal, 2006):

- a. Fase lag, yaitu fase penyesuaian sel-sel dengan lingkungan dan pembentukan enzim-enzim untuk mengurai substrat.
- b. Fase akselerasi, yaitu fase mulai membelahnya sel-sel secara aktif.
- c. Fase eksponensial, merupakan fase perbanyak jumlah sel dengan aktivitas sel yang sangat meningkat. Pemanenan enzim-enzim yang dihasilkan umumnya dilakukan pada awal fase eksponensial ini.
- d. Fase deselerasi, yaitu fase di mana sel-sel mulai kurang aktif membelah. Pada fase ini dapat diperoleh biomassa sel dan senyawa-senyawa lain yang tidak lagi diperlukan oleh sel-sel.
- e. Fase stasioner, yaitu fase di mana pertambahan jumlah sel seimbang dengan kematian sel, sehingga menghasilkan garis horizontal pada kurva pertumbuhan. Sebagian besar senyawa metabolit sekunder diperoleh pada saat pertumbuhan sel telah mencapai fase stasioner ini.
- f. Fase kematian dipercepat, yaitu pada saat jumlah sel-sel mati atau inaktif lebih banyak daripada sel-sel hidup yang aktif membelah.



Gambar 2.1. Kurva Pertumbuhan Biomassa selama Proses Fermentasi [Sumber: Jurag Separation, *n.d.*]

2.4. *Artemia salina* Leach

Artemia salina atau *brine shrimp* adalah sejenis udang-udangan primitif yang pertama kali ditemukan pada tahun 1982 di danau air asin Urmia, Iran. Nama *Artemia salina* diberikan oleh Schlosser pada tahun 1755 (Alireza, 2008).

Adapun klasifikasi *Artemia salina* sebagai berikut (Belk, Brtek, 1995):

Kingdom/Regnum	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Subfilum	: Crustacea
Kelas	: Branchiopoda
Kelas	: Sarsostraca
Ordo	: Anostraca
Subordo	: Artemiina
Famili	: Artemiidae
Genus	: Artemia
Spesies	: <i>Artemia salina</i> Leach

Telur *Artemia salina* dapat diinaktivasi untuk beberapa tahun selama disimpan dalam kondisi lingkungan yang rendah oksigen atau dalam lingkungan yang terdehidrasi dan masih memiliki kemampuan untuk menetas apabila kondisi lingkungannya telah kembali normal, dinamakan kriptobiosis (Clegg, 2001).

Selama dalam tahap penetasan telur *Artemia salina*, harus diperhatikan faktor-faktor sebagai berikut:

1. Hidrasi telur dalam air laut

Telur harus mengalami kontak langsung dengan medium sehingga dapat terhidrasi dengan baik (Sorgeloos, Persoone, 1975).

2. Salinitas

Kadar garam yang dibutuhkan berkisar 5-70‰ (Sorgeloos, Persoone, 1975)

3. Oksigenasi medium

Kadar oksigen minimum yang diperlukan adalah 3 ppm. Di bawah kadar tersebut, kecepatan penetasan akan berkurang dan pada konsentrasi 0,6-0,8 ppm, akan menghambat penetasan telur (Sorgeloos, Persoone, 1975).

4. Pengaturan cahaya

Nauplii akan bergerak menuju cahaya (Sorgeloos, Persoone, 1975) karena sifat fototropiknya, sehingga mudah dipisahkan dari telurnya.

5. Suhu medium

Suhu penetasan berkisar antara 20°C-30°C namun pada suhu 30°C proses penetasan berlangsung lebih cepat (Sorgeloos, Persoone, 1975).

6. pH

Medium dijaga pada pH 8-10 dengan larutan NaHCO₃ (Hasan *et al.*, 2005).

Artemia salina memiliki fase pertumbuhan yang sangat cepat. Saat menetas, larva atau nauplius memiliki panjang 0,4–0,5 mm dan berwarna oranye kecoklatan karena terdapat kandungan kuning telur. Sekitar 12-20 jam kemudian nauplius tumbuh menjadi metanauplius yang berukuran sekitar 0,6 mm. Tahap dewasa dicapai sekitar tiga minggu setelah penetasan dengan biomassa 500 kali biomassa nauplius dan berukuran sekitar 8 mm. Masa hidup *Artemia salina* dewasa mencapai 4 bulan (Anderson, 1967).

2.5. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Brine Shrimp Lethality Test merupakan metode pengujian yang umum digunakan sebagai uji tahap pendahuluan pada skrining toksisitas suatu senyawa

bioaktif secara *in vivo* dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji (Anderson, Chang, McLaughlin, 1998; McLaughlin, 1991).

Toksistas suatu senyawa yang ditentukan melalui metode BSLT dilakukan dengan memonitor respons biologis, yaitu jumlah kematian larva sebanyak 50% dari populasi awal. Konsentrasi letal ($\mu\text{g/ml}$) untuk 50% kematian larva (LC_{50}) setelah 24 jam perlakuan yang dihitung dengan menggunakan analisis probit ditentukan sebagai ukuran toksistas senyawa (McLaughlin, 1991; Ferrigni, *et al.*, 1982). Suatu ekstrak kasar (*crude extract*) dinyatakan signifikan (toksik) apabila memiliki nilai $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g/ml}$ (Meyer, *et al.*, 1982).

2.6. Kanker

Di dalam tubuh, setiap sel normal akan tumbuh, berproliferasi dan kemudian mati dalam siklus yang teratur. Pada sel kanker terjadi pertumbuhan abnormal di mana proliferasi sel berlangsung lebih cepat akibat adanya perubahan atau kerusakan DNA sel yang bersifat irreversibel dan secara langsung mempengaruhi aktivitas sel tersebut (American Cancer Society, 2008).

Mutasi genetik tersebut dapat disebabkan oleh paparan sel dengan senyawa karsinogen, agen virus, maupun akibat ekspresi gen bawaan yang diturunkan. Mutasi genetik yang terjadi menyebabkan peningkatan proliferasi sel (hiperplasia) sehingga terjadi penumpukan sel yang tampak abnormal (displasia) yang disebut tumor, yaitu suatu massa sel terlokalisasi yang terbentuk dari sel-sel abnormal yang berasal dari jaringan yang mengalami mutasi tersebut (NCI, 1999).

Tumor jinak (*benigna*) memiliki pertumbuhan yang lambat dan tidak invasif (American Cancer Society, 2008). Apabila sel tumor mengalami pertumbuhan yang cepat sehingga bentuk sel menjadi abnormal, akan tetapi massa sel masih merupakan bagian dari jaringan di mana sel tersebut berasal maka disebut kanker *in situ*. Namun apabila sel-sel tersebut juga menginvasi jaringan sekitarnya atau terlepas dan mengikuti aliran darah atau limfa dan menempel di jaringan tubuh lainnya dan tumbuh menjadi tumor baru (bermetastasis) maka disebut kanker invasif yang bersifat malignan (*ganas*), atau yang dikenal dengan kanker (NCI, 1999).

Tipe kanker dapat dibedakan menjadi beberapa kategori, yaitu: (NCI-USNIH, *n.d*)

1. Karsinoma, yaitu kanker yang berasal dari jaringan epitel seperti kulit dan jaringan yang membungkus organ-organ internal. Kanker yang termasuk jenis ini misalnya kanker hati, usus besar, payudara dan serviks. Apabila karsinoma berasal dari jaringan kelenjar maka disebut sebagai adenokarsinoma.
2. Sarkoma, yaitu kanker yang berasal dari jaringan mesenkim seperti tulang, kartilago, jaringan lemak, otot, pembuluh darah atau jaringan ikat lainnya.
3. Leukimia, yaitu kanker yang berasal dari jaringan-jaringan yang memproduksi darah seperti sumsum tulang sehingga menyebabkan produksi sel darah abnormal dalam jumlah besar.
4. Limfoma dan myeloma, yaitu kanker yang berasal dari sistem imun.
5. Kanker SSP, yaitu kanker yang berasal dari jaringan otak dan korda spinalis.

2.7. Kanker Payudara

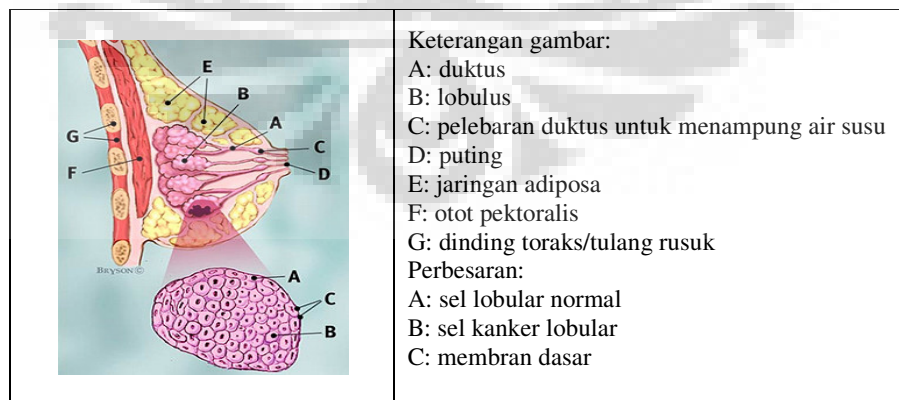
Kanker payudara disebabkan oleh pertumbuhan sel malignan di dalam payudara. Sel malignan tersebut seringkali berasal dari sel epitel kelenjar susu (*lobulus*) maupun saluran *lactiferus* (sistem duktal), dengan ciri-ciri memiliki pertumbuhan yang tidak terkontrol dan kemampuan untuk menginvasi jaringan normal baik secara lokal maupun tersebar hingga ke seluruh tubuh melalui proses metastasis. Pada umumnya gejala awal kanker payudara yaitu terdapatnya benjolan pada payudara (Nafrialdi, Ganiswara, 1995).

Kanker payudara diklasifikasikan berdasarkan asal sel kanker (sistem duktal dan lobulus), dan dari sifat invasifnya (*in situ* dan invasif) (WHO, 2002).

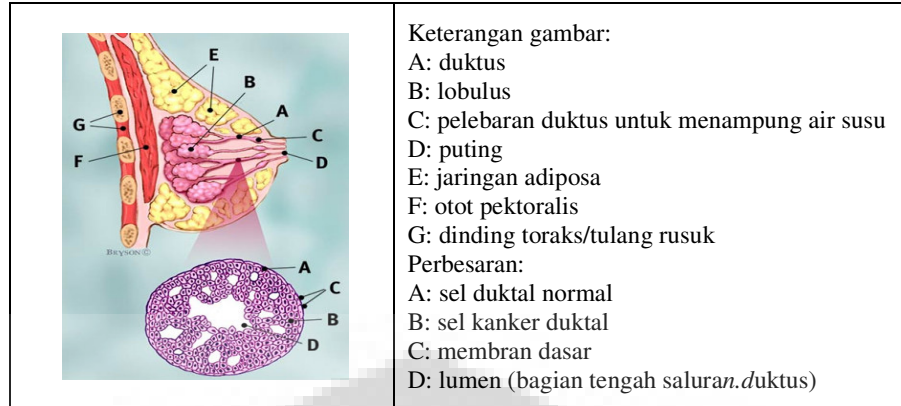
Karsinoma *in situ* (non-invasif) merupakan fase awal kanker di mana sel kanker belum menyebar ke dinding-dinding lobular maupun duktalnya. Terdapat dua tipe karsinoma payudara *in situ*, yaitu karsinoma *in situ* lobular (*lobular carcinoma in situ* [LCIS]) yang disebut juga neoplasia lobular (Gambar 2.2) dan karsinoma *in situ* duktal (*ductal carcinoma in situ* [DCIS]) yang merupakan tipe paling umum dijumpai pada kanker payudara tipe non-invasif (Gambar 2.3) (WHO, 2002).

Sedangkan kanker payudara tipe invasif diklasifikasikan menjadi beberapa jenis, yaitu (WHO, 2002):

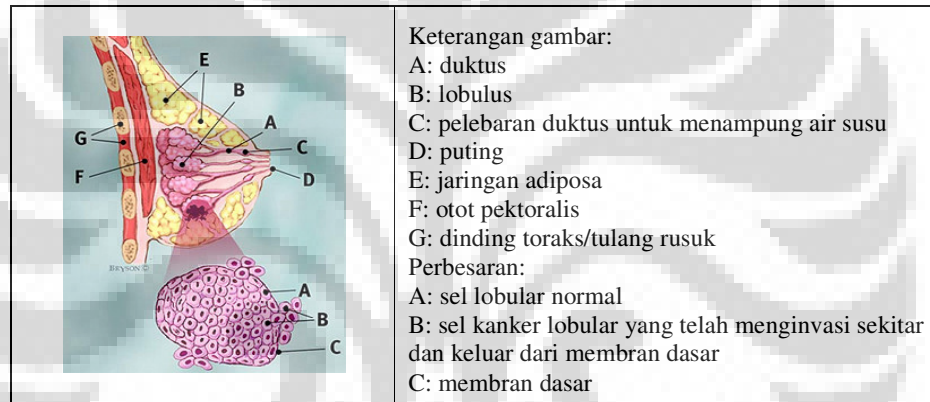
- Karsinoma Lobular Invasif (*invasive lobular carcinoma* [ILC]) yang berasal dari bagian lobul atau jaringan kelenjar susu (Gambar 2.4).
- Karsinoma Duktal Invasif (*invasive ductal carcinoma* [IDC]) yang berasal dari sistem duktal yang menembus dinding saluran dan menyebar ke jaringan lemak di sekitarnya (Gambar 2.5).
- Kanker Medula
Kanker medula merupakan tipe khusus IDC di mana terdapat batas yang memisahkan jaringan tumor dan jaringan payudara normal. Terdapat pula karakteristik khusus lain yaitu adanya sel sistem imun pada batas tersebut.
- Tumor Metaplastik
Pada tumor jenis ini terdapat sel-sel yang pada keadaan normal tidak ditemukan pada payudara, sel skuamosa atau sel-sel pembentuk tulang.
- Kanker Payudara Inflamatori
Tipe ini merupakan tipe kanker payudara khusus di mana sel-sel kanker telah menyebar ke saluran limfatik yang terletak dekat dengan kulit payudara. Payudara akan membengkak, kaku, nyeri dan lebih sensitif.
- Karsinoma Koloidal
Kanker duktal invasif tipe koloidal disebut juga karsinoma musinus (*mucinous carcinoma*), yaitu kanker yang dibentuk oleh sel-sel kanker penghasil mukus.



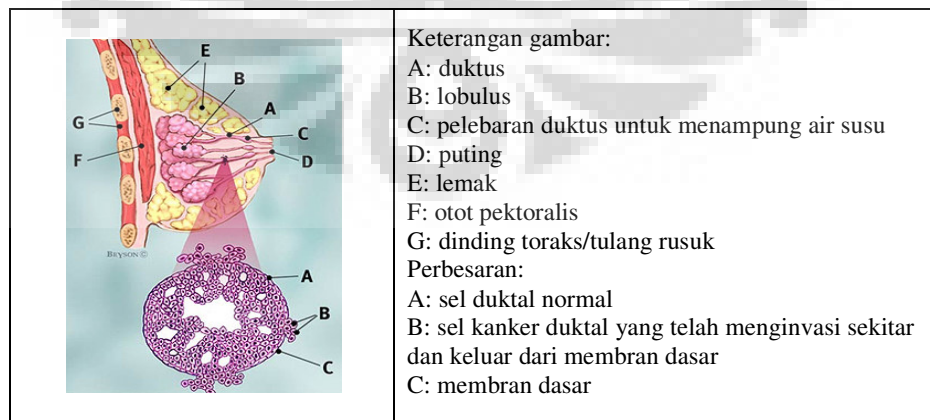
Gambar 2.2. Anatomi payudara normal dengan *Lobular Carcinoma In Situ* (LCIS) pada gambar perbesaran [Sumber: BC cancer Agency, 2010]



Gambar 2.3. Anatomi payudara normal dengan *Ductal Carcinoma In Situ* (DCIS) pada gambar perbesaran [Sumber: BC cancer Agency, 2010]



Gambar 2.4. Anatomi payudara normal dengan *Invasive Carcinoma Lobular* (ILC) pada gambar perbesaran [Sumber: BC cancer Agency, 2010]



Gambar 2.5. Anatomi payudara normal dengan *Invasive Carcinoma Ductal* (IDC) pada gambar perbesaran [Sumber: BC cancer Agency, 2010]

Risiko kanker payudara dapat meningkat pada beberapa keadaan biologis seseorang atau sifat genetis yang dimilikinya, yaitu:

1. Jenis Kelamin

Wanita lebih rentan terkena kanker payudara akibat efek paparan perangsangan pertumbuhan dari hormon wanita seperti estrogen dan progesteron secara konstan pada payudara (American Cancer Society, 2008).

2. Usia

Risiko kanker payudara meningkat seiring dengan penambahan usia. Sebagian besar kasus kanker payudara terjadi pada wanita di atas usia 60 tahun (NCI, 1999).

3. Riwayat Penyakit Kanker Payudara

Wanita yang pernah menderita kanker pada salah satu payudara memiliki risiko yang besar untuk dapat terkena kanker pada payudara yang lainnya (NCI, 1999).

4. Riwayat Keluarga

Risiko seorang wanita terkena kanker payudara akan meningkat apabila ibu, saudara atau anak perempuannya memiliki kanker payudara. Risiko meningkat pada wanita di atas 40 tahun (NCI, 1999).

5. Faktor Genetik

Sekitar 5-10% kasus kanker payudara diduga merupakan penyakit herediter yang diperoleh dari orang tua (American Cancer Society, 2008).

6. Densitas Payudara

Wanita yang mamogramnya menunjukkan jaringan payudara yang padat memiliki risiko kanker payudara yang besar (NCI, 1999).

7. Mutasi Genetik

Perubahan genetik yang dapat meningkatkan risiko kanker payudara di antaranya yaitu perubahan pada gen BRCA1, BRCA2 (NCI, 1999).

8. Riwayat Reproduksi dan Menstruasi (NCI, 1999)

- Menstruasi pertama di bawah umur 12 tahun meningkatkan risiko kanker payudara.
- Menopause setelah usia 55 tahun meningkatkan risiko kanker payudara.

9. Ras dan Etnis

Kanker payudara lebih sering terdiagnosa pada wanita kulit putih dibandingkan dengan wanita-wanita latin, asia, atau afro-amerika (NCI, 1999).

Selain itu, pengaruh eksternal juga ikut berperan secara signifikan dalam menyebabkan kanker, yaitu:

1. Fisika,

Contoh karsinogen fisika adalah paparan radiasi. Wanita yang pernah menjalani terapi radiasi pada dada (termasuk payudara) sebelum usia 30 tahun memiliki peningkatan risiko kanker payudara. Termasuk dalam hal ini, radiasi untuk terapi *Hodgkin's lymphoma*. Penelitian menunjukkan bahwa semakin muda usia seorang wanita yang menerima radiasi, maka risiko kanker payudara akan semakin besar (NCI, 1999).

2. Kimia

Menurut IARC (1998), konsumsi alkohol dalam jumlah besar dan beberapa jenis obat (1996), dapat meningkatkan risiko kanker (WHO, 2002). Contoh lain karsinogen kimia adalah vinil klorida yang dapat menyebabkan kanker hati (WHO, 2002).

3. Biologi

Berbagai virus seperti Virus Hepatitis B (lebih berperan dalam menyebabkan kanker hati) dan *human papilloma virus* (penyebab kanker serviks) dapat berperan sebagai agen biologi penyebab kanker (WHO, 2002).

Pada umumnya gejala kanker payudara ditemukan apabila benjolan sudah teraba oleh wanita itu sendiri. Gejala kedua yang tersering adalah cairan yang keluar dari puting berasal dari muara duktus satu payudara dan mungkin berdarah. Tanda-tanda lain dapat berupa adanya perlekatan pada kulit, lekukan pada kulit (akibat distorsi *ligamentus cooper*), dan rasa sedikit tidak enak atau tegang. Yang lebih jarang adalah retraksi puting payudara, pembengkakan lokal, eritema, atau nyeri setempat. Mungkin terjadi pembesaran kelenjar limfe regional. Jika penyakit telah berkembang lanjut, dapat terjadi pecahnya benjolan-benjolan pada kulit dan ulserasi (Abrahams, 1973).

Diagnosis atau pemeriksaan kanker payudara dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Pemeriksaan Fisik

Pemeriksaan ini bertujuan menemukan awal tumbuhnya massa di dalam payudara. Pemeriksaan fisik payudara dilakukan dengan lembut dengan cara inspeksi dan palpasi. Inspeksi adalah pemeriksaan secara visual kondisi payudara untuk melihat dilatasi pembuluh-pembuluh vena di bawah kulit akibat pembesaran tumor, kemerahan di suatu tempat, edema kulit, dan bentuk puting. Palpasi adalah pemeriksaan seluruh payudara menggunakan jari-jari tangan dengan meraba payudara. Pemeriksaan fisik dilakukan setiap bulan setelah selesai menstruasi atau saat payudara dalam keadaan rileks atau setiap saat tertentu bagi wanita menopause (NCI, 2005).

Tumor benigna terasa halus, lembut, berbentuk bulat dan fleksibel. Sedangkan benjolan abnormal yang keras dan kaku pada payudara lebih mengarah pada kanker (NCI, 2005).

2. Mammografi

Mammografi adalah prosedur pemeriksaan dengan sinar X yang akan memvisualisasikan struktur dalam payudara. Mammogram mampu mendeteksi massa yang terlalu kecil untuk dapat teraba oleh penderita maupun dokter serta dapat memberikan dugaan sifat keganasan massa tersebut (NCI, 2005).

3. Ultrasonografi

Alat ultrasonograf akan mengirimkan gelombang suara yang kemudian dipantulkan oleh jaringan. Gambar yang dihasilkan akan memperlihatkan bentuk dan konsistensi benjolan, apakah padat atau berisi cairan. Benjolan yang berisi cairan merupakan kista, sedangkan benjolan padat lebih mengarah pada kanker (NCI, 2005).

4. *Magnetic Resonance Imaging* (MRI)

MRI dapat menghasilkan detail gambaran jaringan payudara sehingga mempermudah diagnosis (NCI, 2005).

5. Biopsi

Biopsi untuk pemeriksaan histologik dapat berupa eksisional (seluruh massa diangkat atau insisional (sebagian massa diangkat). Benjolan kemudian dibekukan dan spesimen dianalisis secara mikroskopik yang berguna untuk menyatakan ada tidaknya sifat keganasan. Macam-macam biopsi yaitu:

- Penusukan Menggunakan Jarum Halus

Penusukan benjolan dilakukan untuk menentukan adanya kista payudara menggunakan jarum halus sehingga sifat massa dapat dibedakan antara kistik atau padat. Jarum halus digunakan untuk mengambil cairan dari dalam benjolan. Apabila cairan tersebut tampak mengandung sel, maka dilakukan pemeriksaan lebih lanjut untuk diagnosis kanker (NCI, 2005).

- Biopsi Inti (*core biopsy*)

Pada prosedur ini digunakan jarum untuk mengangkat jaringan payudara dan dilakukan pemeriksaan untuk menentukan adanya kemungkinan keganasan. Prosedur ini disebut juga biopsi jarum (NCI, 2005).

6. Uji Lain

Laboratorium patologi akan menganalisis spesimen jaringan kanker baik yang diambil melalui metode biopsi maupun pembedahan total (American Cancer Society and National Comprehensive Cancer Network, 2006).

- *Hormon Receptor Test*

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah jaringan memiliki reseptor hormon tertentu (estrogen atau progesteron) untuk merangsang pertumbuhannya (NCI, 2005). Sel-sel kanker yang merespons kedua hormon tersebut melalui reseptor estrogen (RE) dan reseptor progesteron (RP) digolongkan sebagai reseptor hormon positif (RE positif dan/atau RP positif) (American Cancer Society and National Comprehensive Cancer Network, 2006). Apabila suatu kanker tidak memiliki kedua reseptor tersebut, maka kanker tersebut digolongkan sebagai reseptor hormon negatif (RE negatif dan RP negatif).

Sel-sel kanker yang bersifat RE atau RP-positif dapat dihentikan kecepatan pertumbuhannya dengan terapi obat-obat yang bekerja baik melalui mekanisme blokade efek kedua hormon maupun melalui

penurunan kadar estrogen dalam tubuh (American Cancer Society and National Comprehensive Cancer Network, 2006).

- *HER2 Test*

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah jaringan memiliki suatu protein yang disebut *human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2)* atau *HER-2/neu* (NCI, 2005). Tumor dengan level *HER-2/neu* yang tinggi dikategorikan sebagai HER-2 positif.

Tumor *HER-2/neu* memiliki kecenderungan untuk tumbuh dan menyebar lebih cepat dibandingkan kanker payudara lainnya. Tipe ini dapat diterapi dengan obat-obat yang mencegah stimulasi pertumbuhan sel-sel oleh kanker protein *HER-2/neu* (American Cancer Society and National Comprehensive Cancer Network, 2006).

Kanker payudara memerlukan perlakuan sedini mungkin untuk mencegah perkembangan atau penyebaran lebih lanjut sel-sel kanker yang telah terbentuk. Tindakan medis yang dapat ditempuh untuk mengobati kanker payudara, baik untuk memperkecil ukuran kanker maupun untuk mengangkat jaringan kankernya adalah sebagai berikut (American Cancer Society and National Comprehensive Cancer Network, 2006):

1. Pembedahan

Tipe pembedahan untuk penanganan kanker payudara tergantung pada luasnya tumor dan ada tidaknya metastasis. Pembedahan yang dilakukan dapat berupa lumpektomi (pengangkatan benjolan), mastektomi parsial (pengangkatan benjolan dan sebagian jaringan di sekitarnya), mastektomi sederhana (pengangkatan benjolan dan seluruh payudara), dan mastektomi radikal (pengangkatan benjolan, payudara, jaringan sekitarnya dan kelenjar getah bening di ketiak).

2. Radioterapi

Radioterapi dilakukan setelah pembedahan untuk mencegah penyebaran sisa-sisa sel kanker yang masih tertinggal di sekitar jaringan payudara dan untuk mengurangi rasa sakit yang ditimbulkan oleh kanker yang telah menyebar hingga ke tulang. Radioterapi dilakukan dengan menggunakan sinar-X yang dipancarkan langsung pada kanker payudara.

3. Kemoterapi

Kemoterapi digunakan untuk pengobatan kanker yang telah bermetastasis ke jaringan tubuh lainnya di mana tindakan pembedahan semata tidak efektif lagi dalam menanggulangi kanker yang telah terbentuk secara luas. Kemoterapi dapat diberikan sebelum pembedahan (neoadjuvan) untuk memperkecil ukuran tumor dan setelah pembedahan (adjuvan).

4. Terapi Hormonal

Penggunaan obat-obat antiestrogen seperti tamoksifen telah banyak digunakan dalam terapi kuratif kanker payudara dan cukup efektif dalam pengobatan sel kanker yang mengandung reseptor estrogen dan reseptor progesteron positif.

2.8. 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, *et al.*, 1973).

Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang diisolasi pada tahun 1970 dari seorang wanita ras Kaukasia berusia 69 tahun (Soule, *et al.*, 1973). Sel MCF-7 tersebut terbentuk dari efusi pleura yang timbul pada saat postmenopause di mana penderita telah menjalani terapi radiasi dan terapi endokrin sebelum munculnya efusi tersebut (Clarke, *et al.*, 1996). Sel MCF-7 adalah sel kanker adenokarsinoma epitelial yang berasal dari bagian duktal dan bersifat invasif (*invasive ductal carcinoma*) (Soule, *et al.*, 1973). Sel MCF-7 mampu bertahan dalam jangka waktu lama dan memiliki kemampuan membelah yang tak terbatas (immortal), melekat (adhesif) dan membentuk kultur selapis pada dasar labu kultur (monolayer) (Freshney, 2005).

Dalam kaitannya dengan respon hormonal, sel MCF-7 memiliki reseptor estrogen (RE positif) (Lampiran 28) sehingga pertumbuhan sel MCF-7 dirangsang dengan adanya paparan dengan hormon estrogen.

2.9. Kultur Sel

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi sel jaringan hidup, kultur sel primer, atau biakan dari sel dengan cara disagregasi secara enzimatis (Heffen, 2010). Kultur primer yang mengalami subkulturisasi dinamakan sel selapis (*cell line*).

Setelah mengalami disagregasi atau subkulturisasi, sebagian besar sel yang diambil dari jaringan padat akan tumbuh menjadi selapis sel adesif (melekat) pada substrat, kecuali sel-sel tersebut mengalami transformasi sehingga tidak bergantung pada tempat perlekatan (*anchorage independent*) pada saat berproliferasi (Heffen, 2010).

Pada tingkat kultur, siklus pertumbuhan sel meliputi tiga fase, yaitu fase lag, fase log dan fase stasioner. Fase lag merupakan tahap pertumbuhan di mana sel melakukan adaptasi pada lingkungan, mengumpulkan nutrisi dan memulai perlekatan pada dasar labu serta penyebaran pada substrat. Fase log merupakan fase peningkatan populasi sel secara eksponensial. Sampling dilakukan saat kultur mengalami fase log, karena pada tahap ini kecepatan metabolisme sel dalam keadaan optimum sehingga populasi sel mencapai jumlah tertinggi dan diharapkan hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas optimal senyawa uji.

Kondisi yang perlu diperhatikan dalam menumbuhkan kultur sel adalah sebagai berikut (Heffen, 2010):

1. Sifat Fisikokimia Substrat

a. pH

Meskipun pH tumbuh optimum berbeda-beda, tetapi sebagian besar sel tumbuh secara optimum pada pH sekitar 7,4.

b. CO₂ dan Bikarbonat

Konsentrasi CO₂ dan bikarbonat yang terlarut dalam medium akan menentukan pH kultur. Pada beberapa biakan sel yang membutuhkan kondisi pH tertentu dapat digunakan dapar untuk menstabilkan pH.

c. Dapar

Media kultur harus didapar apabila berada dalam dua kondisi, yaitu apabila media dalam wadah terbuka, di mana adanya CO₂ dapat

meningkatkan pH medium, dan terjadi produksi berlebih CO_2 dan asam laktat pada kultur yang konsentrat sehingga dapat menurunkan pH. Meskipun demikian, CO_2 eksogen tetap diperlukan oleh sel untuk mencegah hilangnya CO_2 dan bikarbonat dari medium secara total, terutama pada kultur dengan konsentrasi sel rendah.

d. Oksigen

Komposisi gas yang terpenting adalah konsentrasi oksigen dalam medium. Pada sel, oksigen diperlukan untuk respirasi terutama pada proses glikolisis. Akan tetapi oksigen terlarut dalam jumlah berlebih dapat menimbulkan efek toksik akibat terbentuknya radikal bebas. Oleh karena kondisi tersebut, perlu diperhatikan konsentrasi atau tekanan oksigen dalam medium.

e. Osmolalitas

Tekanan osmolalitas plasma manusia adalah sekitar 290 mosmol/kg, sehingga osmolalitas sel *in vitro* diatur pada nilai tersebut. Walaupun demikian, menurut Waymouth (1970), sebagian besar sel dapat mentolerir rentang osmolalitas antara 260 mosmol/kg sampai 320 mosmol/kg. Kultur pada cawan petri lebih baik ditumbuhkan pada medium yang sedikit hipotonik untuk mengkompensasi terjadinya evaporasi selama inkubasi.

f. Temperatur

Temperatur optimal kultur sel bergantung pada temperatur tubuh manusia/hewan asal, variasi temperatur pada organ tubuh tertentu, dan pertimbangan adanya kesalahan kecil pada alat selama inkubasi.

g. Viskositas

Viskositas medium kultur dipengaruhi terutama oleh kandungan serum dan hanya sedikit memberikan pengaruh pada pertumbuhan. Viskositas menjadi faktor penting apabila suspensi sel harus diaduk atau akan dibagi-bagi setelah tripsinisasi.

2. Keseimbangan Garam dalam Larutan

Keseimbangan garam larutan terdiri dari garam-garam anorganik seperti natrium bikarbonat, dan dalam beberapa kasus termasuk juga keseimbangan glukosa (organik) yang akan berpengaruh pada osmolalitas larutan.

3. Media Lengkap

Media lengkap adalah media yang dilengkapi oleh nutrisi atau kebutuhan tertentu seperti asam amino, vitamin, garam, glukosa, suplemen organik, hormon dan faktor pertumbuhan serta antibiotik.

2.10. Uji Sitotoksitas secara *In Vitro*

Uji sitotoksitas adalah pengujian kemosisitivitas sel yang dimaksudkan untuk mengetahui proporsi viabilitas sel uji setelah diberi perlakuan, didasarkan pada kemampuan sel viabel dalam hal inkorporasi/ambilan zat warna (Heffen, 2010). Uji viabilitas dapat menitikberatkan pada penurunan integritas membran di mana zat warna tertentu (seperti biru tripan, eritrosin atau hitam naftalen) terabsorpsi oleh sel viabel yang seharusnya bersifat impermeabel terhadap pewarna-pewarna tersebut. Dapat pula didasarkan atas prinsip ambilan zat warna oleh sel viabel (seperti diasetil fluoresin atau merah netral).

- Uji Eksklusi Zat Warna

Berdasarkan protokol Kaltenbach *et al.* (2005), sel viabel bersifat impermeabel terhadap hitam naftalen, Biru tripan dan zat warna lainnya (Freshney, 2005). Sel viabel tidak berwarna sedangkan sel mati akan terwarnai akibat kehilangan integritas membrannya. Hasil pewarnaan selanjutnya dianalisis secara mikroskopik dan dihitung persentase sel viabelnya yang tidak terwarnai.

- Uji Ambilan Merah Netral

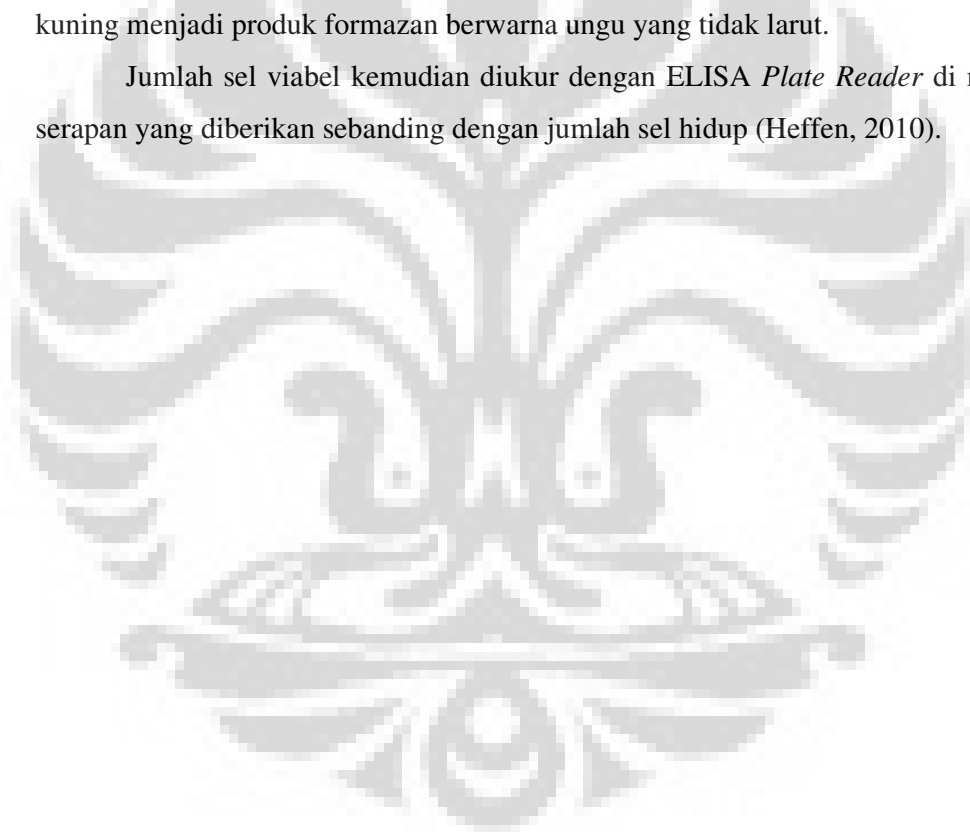
Viabilitas sel juga dapat ditentukan dengan uji ambilan merah netral. Merah netral merupakan senyawa kationik lemah yang dapat berpenetrasi melalui membran sel melalui difusi non-ionik dan terakumulasi di dalam lisosom. Adanya perubahan struktur pada membran lisosom (pada sel mati/non-viabel) mengakibatkan lisosom menjadi impermeabel terhadap merah netral, sehingga sel viabel dapat dibedakan dari sel mati. Sel viabel yang telah meretensi merah netral dilisis dan serapan merah netral dalam larutan tersebut diukur secara spektrofotometri (Heffen, 2010). Pengujian ini tidak digunakan untuk menghitung jumlah sel total, akan tetapi dengan pengujian ini akan terlihat

penurunan serapan yang berkorelasi dengan jumlah sel viabel setelah perlakuan.

Uji viabilitas juga dapat dilakukan berdasarkan kemampuan sel viabel dalam mereduksi zat tertentu seperti MTT. Uji sitotoksik MTT merupakan salah satu pengujian sitotoksisitas menggunakan metode sederhana dalam penghitungan jumlah sel, baik untuk keperluan penghitungan sitotoksik maupun proliferasi sel, dengan standar pembacaan pada mikropelat tanpa perlu adanya pemindahan sel.

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

Jumlah sel viabel kemudian diukur dengan *ELISA Plate Reader* di mana serapan yang diberikan sebanding dengan jumlah sel hidup (Heffen, 2010).



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 7 bulan, terhitung sejak bulan September 2009 sampai Maret 2010.

3.2. Bahan

3.2.1. Sampel

Isolat kapang endofit yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 4 isolat, yaitu isolat 2.DP1, 4.RF1, 6.AP2 dan 12.RF3 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI. Penamaan isolat mengikuti penamaan yang diberikan peneliti sebelumnya yang terdiri dari 4 digit tata nama. Digit pertama merupakan nomor urut isolat secara keseluruhan. Digit kedua dan ketiga merupakan kode asal tanaman di mana kapang endofit berasal, yaitu kode DP untuk daun 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*, penisilin-streptomisin (Gibco), HEPES, merah netral (Merck), biru tripan (Merck), natrium dodesil sulfat (Merck), tripsin-EDTA (Gibco), NaHCO₃ (Merck), CaCO₃ (Merck), etil asetat p.a (Merck), n-butanol p.a (Merck), metanol p.a (Merck), *lactophenol cotton blue* (Laboratorium Parasitologi FK UI) dan air suling.

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), evaporator rotasi vakum (IKA), *freeze dryer* (Scanvac), pH meter (Meterlab), hemositometer (Improved Neubauer, Superior Marienfeld), penyaring berdiameter pori 0,2 µm steril (Nalgene dan Ministart), spuit 10 ml steril (Terumo), pipet serologik 5,0 ml steril (Falcon), mikropipet (Eppendorf), tabung sentrifugasi (Falcon) dan tabung Eppendorf 1,0 ml (Eppendorf), Program Probit 1.5 dan SPSS 15.

3.4. Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap (Lampiran 1). Pada tahap pertama akan diperoleh ekstrak kering hasil fermentasi kapang endofit yang akan diuji aktivitasnya, diawali dengan pembuatan medium untuk peremajaan isolat kapang endofit, kemudian dilakukan identifikasi, fermentasi dan ekstraksi metabolit sekunder.

Pada tahap II, ekstrak yang diperoleh kemudian diuji aktivitas sitotoksiknya, dimulai dari pembuatan larutan uji, larutan sisplatin sebagai blangko positif, larutan blangko DMSO, medium kultur RPMI 1640 dan reagen-reagen lain. Selanjutnya dilakukan pencairan dan subkulturisasi sel MCF-7. Kultur sel dihitung kepadatannya dan disuspensikan untuk dilakukan pengujian sitotoksitas ekstrak hasil fermentasi terhadap sel MCF-7 tersebut.

3.4.1. Tahap I

3.4.1.1. Peremajaan Isolat Kapang Endofit

a. Pembuatan Medium PDA pada cawan petri

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

b. Pembuatan Medium PDA agar miring

PDA ditimbang sebanyak 39 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu bulat dan dilarutkan dalam air suling hingga 1 liter. Seluruh bahan dicampur dan diaduk hingga larut dan homogen kemudian dipanaskan hingga mendidih dan

selanjutnya disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sekitar 15 ml, diletakkan dalam posisi miring $\pm 45^\circ$ dan didiamkan hingga media memadat.

c. Peremajaan Isolat Kapang Endofit

Isolat kapang endofit yang tumbuh pada media isolasi selanjutnya diremajakan di dalam medium PDA. Peremajaan dilakukan dengan cara hifa dari tiap koloni dipindahkan dengan ose steril ke dalam medium PDA pada cawan petri, kemudian diinkubasi selama 10-14 hari pada suhu kamar (Maretyani, 2006). Setiap koloni kapang yang tumbuh kemudian dipindahkan ke dalam media agar miring. Setiap isolat kapang endofit dibuat duplo pada media PDA cawan petri dan agar miring, masing-masing digunakan sebagai kultur stok (*culture stock*) dan kultur kerja (*working culture*) (Yulia, 2004).

3.4.1.2. Identifikasi Kapang Endofit

Identifikasi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan cara mengamati bentuk morfologi koloni jamur serta kecepatan pertumbuhan koloni. Sementara indentifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan cara menggunakan pewarnaan dengan *lactofenol cotton-blue*. Caranya adalah hifa dari tiap koloni kapang diambil dengan ose steril dan diletakkan di tengah permukaan atas kaca objek yang telah dibersihkan dengan setetes alkohol 70%, kemudian ditetaskan dengan pewarna *lactofenol cotton-blue*. Preparat ditutup dengan kaca penutup dan kelebihan pewarna LCFB diserap dengan kertas saring. Preparat diamati di bawah mikroskop (Taqwim, 2002).

3.4.1.3. Isolasi Metabolit Sekunder

a. Pembuatan Medium Fermentasi Kapang Endofit

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

b. Fermentasi Kultur Kapang Endofit

Koloni kapang yang telah murni dalam medium PDA cawan petri diambil sebesar kira-kira 2x2 cm² berikut agar, kemudian diinokulasikan masing-masing ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 500 ml medium PDY. Kultur selanjutnya diinkubasi dan diaduk pada kecepatan 150 rpm selama 14 hari pada suhu kamar (Yulia, 2004).

c. Ekstraksi Kultur Hasil Fermentasi

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 lapisan biomasanya dan menjadi larutan uji ekstrak air. Ke dalam lapisan biomassa, ditambahkan pelarut metanol ditambahkan dan dihomogenkan dengan vorteks selama 5 menit. Setelah homogen, campuran biomassa dan metanol disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit dan dipisahkan lapisan supernatan dari biomasanya (Yulia, 2004). Supernatan yang diperoleh menjadi larutan uji ekstrak metanol.

Suspensi koloni kapang bagian kedua dan ketiga masing-masing diekstraksi dengan etil asetat (Kubicek, Druzhinina, 2007) dan n-butanol. Larutan

pengekstrak 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 biomasnya dan menjadi larutan uji ekstrak etil asetat dan ekstrak butanol.

Masing-masing supernatan yang diperoleh dari proses tersebut disaring dengan filter bakteri dengan diameter pori 0,22 μm (Kubicek and Druzhinina, 2007). Supernatan (larutan uji ekstrak air) kemudian dikeringkan dengan metode liofilisasi (*freeze drying*) sedangkan larutan uji ekstrak metanol, etil asetat dan butanol dikeringanginkan di dalam desikator atau dipekatkan dengan menggunakan evaporator rotasi vakum pada suhu tidak lebih dari 50°C (Kubicek, Druzhinina, 2007). Skema kerja sebagaimana dijelaskan pada Lampiran 3.

d. Pengeringan Hasil Fermentasi

Ekstrak n-butanol kemudian dikentalkan menggunakan evaporator rotasi vakum pada suhu di bawah 50°C (Kubicek, Druzhinina, 2007) dan disimpan dalam desikator secara aseptis.

3.4.1.4. Uji BSLT

a. Penetasan Telur *Artemia salina* Leach.

Penetasan telur dilakukan pada wadah bening dengan menggunakan media air laut. Wadah penetasan dibagi menjadi dua bagian terang dan gelap oleh suatu sekat berlubang. Bagian gelap digunakan untuk meletakkan telur yang akan ditetaskan. Sekat berlubang menjadi jalan bagi larva yang telah menetas untuk bergerak secara alamiah ke arah terang. Wadah penetasan dilengkapi dengan penerangan dengan cahaya pijar/neon agar suhu penetasan 25°C tetap terjaga selama embriogenesis (McLaughlin, 1991; Ferrigni, *et al.*; Meyer, *et al.*, 1982).

Sebagai media penetasan telur digunakan air laut buatan dengan kadar garam (NaCl) 15 g/l dan NaHCO₃ 0,15 g/l. Dalam waktu sekitar 24-36 jam telur

akan menetas menjadi larva yang disebut dengan *naupili*. *Naupili* aktif yang telah berumur 48 jam digunakan sebagai hewan uji.

b. Uji Toksisitas

Dari ekstrak kering dibuat larutan induk 5000 µg/ml dengan menggunakan pelarut masing-masing. Dari larutan induk dipipet masing-masing 4 µl, 40 µl dan 400 µl ke dalam multiwell 24 sumuran dan dibiarkan hingga tidak berbau pelarut. Sepuluh larva *Artemia salina* kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran dan ditambahkan air laut hingga 2 ml, sehingga konsentrasi akhir dalam tiap sumuran adalah 10, 100 dan 1000 µg/ml. Sebagai kontrol negatif diberi perlakuan yang sama tanpa penambahan sampel. Masing-masing perlakuan dibuat triplo. Pengujian diamati 24 jam kemudian dengan menghitung jumlah larva yang mati dari tiap konsentrasi dan dihitung nilai LC₅₀ masing-masing ekstrak uji menggunakan program probit (Taqwim, 2002).

3.4.2. Tahap II

3.4.2.1. Uji Sitotoksisitas terhadap Sel kanker Payudara MCF-7

a. Pembuatan Larutan Uji

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

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

Larutan uji ekstrak air isolat 2.DP1 disebut sebagai larutan uji 1, ekstrak air isolat 4.RF1 sebagai larutan uji 2, ekstrak air isolat 6.AP2 sebagai larutan uji 3, ekstrak air isolat 12.RF3 sebagai larutan uji 4, ekstrak butanol isolat 4.RF1 sebagai larutan uji 5, ekstrak butanol isolat 6.AP2 sebagai larutan uji 6, ekstrak etil asetat isolat 2.DP1 sebagai larutan uji 7, ekstrak air isolat 4.RF1 sebagai larutan uji 8.

b. Pembuatan Larutan Sisplatin (Blangko Positif)

Larutan sisplatin dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dipipet masing-masing sebanyak 50, 100, 200, 300 dan 400 μl , kemudian dilakukan pengenceran dengan medium RPMI 1640 masing-masing sebanyak 950, 900, 850, 800, 700 dan 600 μl , sehingga diperoleh konsentrasi akhir sisplatin 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 dan 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

c. Pembuatan Larutan Blangko DMSO

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

d. Pembuatan Medium Kultur RPMI 1640

Kalibrasi gelas piala untuk volume 1 liter. Isi dengan air suling steril sebanyak 900 ml. Masukkan serbuk medium RPMI 1640 yang mengandung L-glutamin sebanyak 10,4 gram lalu tutup dengan *aluminium foil*. Letakkan gelas piala di atas pengaduk magnetik lalu aduk sampai larut. Masukkan 2 ml penisilin-streptomisin, 2 g natrium bikarbonat, dan 0,52 g dapar HEPES, aduk kembali. Larutan distabilkan pada pH 7,2 dengan menggunakan pH meter. Biarkan campuran teraduk homogen, kemudian cukupkan volume dengan air suling sampai 1 liter. Masukkan selang karet silikon, botol kultur dan filter ke dalam

laminar air flow dan dipasang pada alat *pulsed pump*. Ujung selang lain dimasukkan ke dalam gelas piala. Hidupkan pompa dan saring dengan bakteri filter 0,2 μm .

Larutan medium RPMI 1640 disimpan pada suhu 2-8°C (Freshney, 2005).

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

Sebanyak 1 kemasan PBS yang mengandung 0,58 g Na_2HPO_4 , 0,1 g KH_2PO_4 , 4 g NaCl dan 0,1 g KCl dilarutkan dalam 500 ml air suling dan distabilkan pada pH 7,4 menggunakan pH meter dan disterilisasi dengan autoklaf.

f. Pembuatan Larutan Tripsin 0,25%

Sebanyak 10 ml Trypsin-EDTA 0,5% dipipet kemudian dicampur dengan 20 ml PBS dan disterilisasi filtrasi menggunakan filter 0,2 μl .

Larutan disimpan pada suhu -20°C (Freshney, 2005).

g. Pencairan Sel MCF-7 (*thawing*)

Tabung berisi sel dikeluarkan dari tangki nitrogen cair dan dibenamkan dalam penangas air bersuhu 37°C sampai mencair (\pm 60 detik). Seluruh cairan sel dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, ditambahkan 2 ml RPMI 1640 yang mengandung 20% FCS kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit pada temperatur ruang. 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 dalam inkubator pada suhu 37°C, 5% CO_2 . Sel diperiksa 24 jam kemudian untuk memastikan bahwa sel telah melekat di dasar labu kultur (Phelan, 1998).

h. Pemeliharaan Kultur Sel MCF-7

Sel diperiksa setiap hari di bawah mikroskop untuk memeriksa kemungkinan kontaminasi. Apabila medium kultur telah berubah warna maka harus diganti dengan medium RPMI 1640 bersuplemen yang baru (Phelan, 1998).

i. Subkulturisasi Sel

Labu kultur berisi sel yang telah diinkubasi dikeluarkan dari inkubator sel. Seluruh medium dalam labu kultur dipipet dan dibuang. Kultur sel dicuci sebanyak 1 atau 2 kali, masing-masing dengan 10 ml PBS. Ke dalam labu kultur ditambahkan 3 ml PBS dan 1 ml tripsin, kemudian sel diinkubasi selama 10 menit dalam inkubator sel. Dasar labu diketuk perlahan untuk membantu pelepasan sel kemudian dilihat di bawah mikroskop untuk memastikan sel sudah tidak melekat pada dasar labu. Ke dalam labu kultur ditambahkan 2 ml RPMI 1640 (Phelan, 1998). Seluruh cairan sel dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 6 ml RPMI 1640 yang mengandung 10% 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 sel.

j. 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 3 kali, masing-masing dengan 10 ml PBS. Ke dalam labu kultur ditambahkan 3 ml PBS dan 1 ml tripsin, kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam inkubator sel. Setelah 10 menit, labu dikeluarkan dari inkubator dan dilihat di bawah mikroskop untuk memastikan sel sudah tidak melekat di dasar labu

kultur. Ke dalam labu kultur ditambahkan 1 ml RPMI 1640, kemudian cairan selnya dipipet dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi lalu disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh disuspensikan kembali dalam 1 ml RPMI 1640. suspensi sel dipipet sebanyak 100 μ l dan ditambahkan 900 μ l larutan biru tripan 0,4% (Phelan, 1998).

Hemositometer bersih dengan kaca penutup diletakkan mendatar di atas meja. Lebih kurang 20 μ l 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 (Phelan, 1998).

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) (Phelan, 1998).

$$\text{Jumlah sel per ml} = \frac{n \times 10}{10^{-4}} \quad (3.1)$$

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

k. 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 (Freshney, 2005):

$$P_1V_1 = P_2V_2 \quad (3.2)$$

Keterangan: P_1 adalah kepadatan sel hasil perhitungan. V_1 adalah volume suspensi sel yang dibutuhkan untuk pengenceran. P_2 adalah kepadatan sel yang dikehendaki dalam sumur uji dan V_2 adalah volume total suspensi sel yang akan diisikan ke dalam sumur uji.

I. Pengujian Sitotoksisitas Terhadap Sel MCF-7

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

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

Pada akhir periode inkubasi, seluruh medium dibuang dan ke dalam setiap sumuran ditambahkan 200 μ l merah netral 0,5% dan diinkubasi kembali selama 2 jam pada suhu 37°C dalam inkubator sel. Setelah 2 jam, merah netral dibuang dan sel dicuci dengan 300 μ l PBS. Ke dalam tiap sumuran ditambahkan 300 μ l natrium dodesil sulfat 1% dan sel diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C dalam inkubator sel. Pelat kultur jaringan kemudian dimasukkan ke dalam ELISA *Plate Reader* dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 492 nm dengan panjang gelombang referens 630 nm.

m. Perhitungan Persentase Kematian Sel MCF-7

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

$$\frac{\text{Serapan blanko DMSO}-\text{Serapan larutan uji}}{\text{Serapan blanko DMSO}} \times 100\% \quad (3.3)$$

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

$$\frac{\text{Serapan kontrol negatif} - \text{Serapan Sisplatin}}{\text{Serapan kontrol negatif}} \times 100\% \quad (3.4)$$

3.4.2.2. 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 PEMBAHASAN

4.1. Tahap I

Pada penelitian kali ini digunakan 4 isolat kapang endofit yang berasal dari 2 spesies tanaman dari genus *Garcinia*, yaitu *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall, yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi FMIPA UI. Isolat yang digunakan yaitu isolat 4.RF1 dan isolat 12.RF3 yang berasal dari ranting *Garcinia forbesii* King, serta isolat 2.DP1 dan isolat 6.AP2 yang masing-masing berasal dari bagian daun dan akar *Garcinia porrecta* Wall.

Tanaman dari genus *Garcinia* dipilih karena merupakan salah satu genus tumbuhan yang banyak dimanfaatkan dalam pengobatan secara tradisional, dan diketahui banyak mengandung senyawa xanthon yang dikenal memiliki aktivitas farmakologis (Maretyani, 2006). Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa genus *Garcinia* memiliki berbagai aktivitas farmakologis seperti antimikroba, antimalaria, antiproliferasi dan antioksidan, serta antikanker (Hay, *et al.*, 2003; Moonkarndi *et al.*, 2004; Atika, 2007; Radji, Soemiati, Indani, 2004).

Secara umum, penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, tahap pertama yaitu tahapan isolasi metabolit sekunder yang mencakup peremajaan isolat, fermentasi dan ekstraksi, sedangkan tahapan kedua merupakan tahap uji aktivitas sitotoksik menggunakan kultur sel kanker payudara MCF-7.

Sebelum difermentasi untuk memperoleh metabolit aktifnya, isolat kapang diremajakan terlebih dahulu dengan cara ditanam pada media PDA cawan petri dan agar miring untuk mengaktifkan kembali spora dan hifa yang dorman selama penyimpanan pada suhu rendah. PDA merupakan media yang terpilih yang umum digunakan untuk menumbuhkan kapang endofit karena nutrisi yang dikandungnya cukup kaya untuk menunjang pertumbuhan kapang endofit yang pada umumnya bersifat *slow growing*. Hampir semua jenis kapang dapat tumbuh pada media ini (Bacon, 1999).

Koloni yang telah ditanam selama 7 hari kemudian diamati makroskopik dan mikroskopiknya. Pengamatan secara makroskopis meliputi pengukuran laju pertumbuhan koloni dan penampang koloni dan sebalik koloni. Sedangkan secara mikroskopis, dilakukan pengamatan struktur hifa di bawah mikroskop, yang meliputi ada tidaknya septa dan inti, bentuk sporangiofor atau konidiofor serta spora atau konidia yang dihasilkan. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan cara mengambil hifa dengan ose steril dan diletakkan di atas kaca objek, kemudian ditetesi dengan setetes alkohol 70% dan *lactophenol cotton blue*. Zat warna *lactophenol cotton blue* memiliki empat komposisi utama, yaitu fenol yang akan mematikan sel sekaligus mendeaktivasi enzim litik selular sehingga sel-sel mati tidak lisis dan tetap terjaga strukturnya; asam laktat yang berfungsi sebagai pengawet struktur fungi; *cotton blue* yang akan mewarnai kitin pada dinding sel fungi; dan gliserol yang mencegah presipitasi dari *cotton blue* (Environmental Leverage, 2003).

4.1.1. Identifikasi Isolat

a. Isolat 2.DP1

Kapang endofit 2.DP1 berasal dari bagian daun tanaman *Garcinia porrecta*. Pada pengamatan makroskopis, koloni berwarna putih pada umur 2 hari dan berubah menjadi koloni beludru hijau setelah berumur lebih dari 3 hari. Tampak adanya eksudat tidak berwarna yang dengan bertambahnya umur akan menjadi kehijauan pada usia 1 sampai 2 minggu, lebih dari 2 minggu eksudat berubah kekuningan dan setelah lebih dari 3 minggu, eksudat akan menghilang. Pada penampang sebalik koloni teramati adanya difusi zat warna oranye kemerahan pada medium PDA (Gambar 4.1). Pada usia 14 hari diameter koloni sebesar 9 cm. Pada pengamatan mikroskopik dengan perbesaran 400x, terlihat sangat banyak spora berwarna hijau pada preparat dan teramati adanya phialides yang berbentuk seperti kuas berwarna hijau (Gambar 4.2) yang menyerupai karakter spesifik spesies *Penicillium purpurogenum* (Gambar 4.2).

b. Isolat 4.RF1

Kapang endofit 4.RF1 berasal dari ranting tanaman *Garcinia forbesii* King. Pada pengamatan makroskopis, isolat ini memiliki hifa berwarna putih dengan warna coklat pada bagian tengah. Pada usia 14 hari diameter koloni sebesar 4 cm. Pada penampang sebalik koloni, terlihat warna kuning kecoklatan pada bagian tengah yang dikelilingi oleh hifa berwarna putih (Gambar 4.3). Pengamatan secara mikroskopik pada perbesaran 400x memperlihatkan hifa yang tidak bersekat, memiliki konidiofor yang merupakan cabang pendek dari hifa vegetatif sehingga tampak seperti tonjolan-tonjolan kecil (Gambar 4.4).

c. Isolat 6.AP2

Kapang endofit 6.AP2 berasal dari bagian akar tanaman *Garcinia porrecta*. Pada pengamatan makroskopis, permukaan koloni berwarna kuning kecoklatan dengan serabut-serabut hifa berwarna putih yang membentuk lingkaran pada bagian tertentu. Bagian tengah koloni berwarna kuning kecoklatan yang teramati pula pada penampang sebalik koloni (Gambar 4.5). Pada usia 14 hari diameter koloni sebesar 8 cm. Pengamatan mikroskopis dengan perbesaran 400x teramati makrokonidia dengan 4-6 septa yang memanjang dan berujung membulat/oval (Gambar 4.6).

d. Isolat 12.RF3

Kapang endofit 12.RF3 juga berasal dari ranting tanaman *Garcinia forbesii*. Pada pengamatan makroskopis, permukaan koloni terlihat seperti beludru halus berwarna putih dengan sebalik koloni berwarna putih dengan bagian tengah kecoklatan (Gambar 4.7). Pada usia 14 hari diameter koloni sebesar 8 cm. Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 400x memperlihatkan struktur hifa yang sangat halus dan belum berhasil teramati struktur spesifiknya sehingga belum dapat teridentifikasi (Gambar 4.8).

4.1.2. Fermentasi dan Ekstraksi

Selanjutnya, proses fermentasi dilakukan pada saat koloni mencapai pertumbuhan optimum, yaitu pada saat umur koloni berkisar antara 7–14 hari, dilakukan dengan cara menginkokulasikan koloni berikut agar dalam 500 ml medium *Potato Dextrose Yeast* (PDY) yang mengandung sumber karbon yang berasal dari *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan sumber nitrogen dari ekstrak ragi (*yeast extract*). Fermentasi dilakukan selama 14 hari pada suhu kamar di bawah kondisi penggojokan dengan *rotary shaker* dengan putaran 150 rpm yang dimaksudkan untuk meningkatkan aerasi medium sehingga kadar oksigen yang dibutuhkan selama fermentasi aerob dapat tetap dipertahankan (Wahyudi, 1998). Penambahan kalsium karbonat bertujuan untuk meningkatkan pH medium yang akan menurun dengan adanya asam-asam yang diproduksi selama fermentasi. Fermentasi dihentikan setelah 14 hari, yaitu pada saat pertumbuhan koloni telah mencapai fase stasioner (Soemiati, 2000). Hal tersebut dikarenakan metabolit sekunder sudah terkumpul dan siap dipanen pada fase stasioner (Roosheroe, Sjamsuridzal, 2006).

Suspensi koloni isolat yang telah difermentasi selanjutnya dapat diekstraksi menggunakan berbagai organik yang berbeda polaritasnya seperti metanol, butanol dan etil asetat untuk memperoleh metabolit sekundernya. Metanol digunakan untuk mengekstraksi biomassa kapang yang telah dipisahkan dari supernatannya (Yulia, 2004), sedangkan butanol dan etil asetat digunakan untuk mengekstraksi suspensi koloni hasil fermentasi (Mackeen, *et al.*, 2002). Biomassa atau suspensi koloni yang telah ditambahkan dengan pelarut kemudian divorteks dengan menggunakan vorteks selama 5 menit yang bertujuan untuk menarik metabolit sekunder ke fraksi pelarut organik. Campuran selanjutnya disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan fraksi-fraksi campuran. Fraksi pelarut organik yang diperoleh kemudian difiltrasi menggunakan bakteri filter dengan diameter pori 0,2 μm untuk menghilangkan miselia fungi yang masih terbawa dan bakteri yang berpotensi sebagai kontaminan (Kubicek, Druzhinina, 2007). Ekstrak kemudian dipekatkan menggunakan evaporator rotasi vakum dengan kondisi suhu di bawah 50°C dan dikeringkan

secara aseptis dalam desikator untuk menghindari kerusakan senyawa apabila dikeringkan pada suhu tinggi (Kubicek, Druzhinina, 2007). Karena pengeringan ekstrak air dengan cara pemanasan pada suhu rendah tidak memungkinkan, maka pengeringan dilakukan dengan cara liofilisasi dengan menggunakan *freeze dryer*. Bagan cara kerja fermentasi dan ekstraksi dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.1.3. Pengujian Toksisitas Metode BSLT

Pengujian praskrining dilakukan pada keenambelas ekstrak dengan metode BSLT menggunakan Larva *Artemia salina* yang berumur 48 jam (*nauplii*) untuk memperoleh 8 ekstrak terbaik berdasarkan nilai LC_{50} masing-masing ekstrak.

Hasil BSLT keenambelas ekstrak uji yang diperoleh dengan program Probit (Lampiran 4-19) menunjukkan hasil yang cukup berbeda antara satu ekstrak dengan ekstrak lainnya. Ekstrak metanol menunjukkan hasil yang paling kurang aktif dibandingkan dengan ekstrak lainnya, hal ini terlihat dari nilai LC_{50} yang besar, yaitu antara 100 – 400 $\mu\text{g/ml}$ untuk 3 ekstrak methanol dan satu ekstrak dinyatakan tidak aktif karena memiliki nilai LC_{50} yang lebih besar dari 1000 $\mu\text{g/ml}$. Artinya ekstrak metanol kurang toksik dibandingkan dengan ekstrak lainnya. Hal ini diduga karena metanol hanya digunakan untuk mengekstraksi biomassa yang telah dipisahkan dari suspensi hasil fermentasi, dengan tujuan untuk menarik metabolit sekunder yang mungkin masih terdapat di dalam sel. Berdasarkan hasil tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan melalui fermentasi ini diproduksi di luar biomassa kapang dan tersuspensi di dalam medium dan tidak terakumulasi di dalam biomassa.

Ekstrak yang paling aktif dari keempat jenis ekstrak adalah ekstrak air. Hal ini terlihat dari nilai LC_{50} yang kecil, yaitu di bawah 50 $\mu\text{g/ml}$. Nilai LC_{50} selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Dengan membandingkan prosedur kerja antara ekstrak air dan ekstrak organik (etil asetat dan butanol), dapat ditarik dugaan mengapa dapat terjadi demikian, yaitu karena supernatan air digunakan seluruhnya tanpa fraksinasi, sedangkan ekstrak etil asetat dan butanol masing-masing merupakan hasil

fraksinasi dari suspensi fermentasi. Dengan demikian, jumlah metabolit sekunder pada ekstrak air jauh lebih besar dibandingkan dengan ekstrak organik.

Kesulitan dalam melakukan pengujian ini adalah dalam mempertahankan larva *Artemia salina* agar tetap hidup, sehingga percobaan harus dilakukan berulang kali sampai diperoleh hasil yang baik. Larva *Artemia salina* hanya dapat hidup dalam rentang pH tertentu, yaitu antara 8-10 sehingga perlu ditambahkan sedikit NaHCO_3 dalam medium air laut (Hasan *et al.*, 2005). Selain itu, suhu medium juga dapat mempengaruhi kehidupan larva, sehingga selama penetasan dan percobaan, wadah disinari oleh lampu agar tetap terjaga suhunya, yaitu sekitar 25°C . Selama penetasan, aerasi medium juga harus dijaga untuk mempertahankan kadar oksigen terlarut, yaitu sekitar 3 ppm, oleh karena itu wadah penetasan harus dilengkapi dengan *aerator* (Sorgeloos, Persoone, 1975).

Permasalahan lain adalah pada saat melakukan pengujian di dalam multiwell 24. Ekstrak yang sudah mengering pada dinding sumur menjadikannya lebih sukar larut pada saat dicampur kembali dengan medium air laut buatan, sehingga konsentrasi akhir ekstrak terlarut menjadi bias. Sebagai alternatif untuk mengatasi permasalahan serupa pada percobaan selanjutnya, dapat dipergunakan DMSO sebagai pengganti pelarut organik dapat langsung dilakukan pengujian tanpa perlu menguapkan pelarut organik terlebih dahulu.

4.2. Tahap II

4.2.1. Kulturing Sel

Pada pengujian sitotoksitas, digunakan kultur sel kanker payudara manusia MCF-7 sebagai sel uji. Kulturing sel harus dilakukan dengan teknik aseptis untuk mencegah terjadinya kontaminasi mikroorganisme pada kultur yang akan menyebabkan kematian sel akibat kompetisi nutrisi medium dengan kontaminan. Kontaminasi ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dan kekeruhan pada medium, terbentuknya lapisan tipis yang pada permukaan medium yang akan segera memisah apabila labu kultur digoyangkan, serta terlihat

adanya benda asing dalam kultur sel apabila diamati di bawah perbesaran mikroskop (Freshney, 2005).

Dalam penelitian ini digunakan medium RPMI 1640 karena medium tersebut memiliki nutrisi yang cukup untuk menunjang pertumbuhan sel. Medium RPMI yang digunakan dilengkapi dengan L-Glutam. Selama fase pertumbuhan, sel diinkubasi dalam inkubator berkarbondioksida dengan kadar 5% untuk mempertahankan dapar bikarbonat dan HEPES agar pH optimal (7,4) bagi pertumbuhan sel tetap terjaga (Phelan, 1998).

Kultur sel akan mengalami peningkatan kepadatan akibat proliferasi sel yang terus menerus selama fase log atau fase pertumbuhan sampai kapasitas medium dalam menyediakan nutrisi terlampaui, yang justru akan menghambat pertumbuhan sel. Apabila kultur sel telah memenuhi seluruh permukaan substrat, maka perlu dilakukan subkulturisasi dalam memperbanyak kultur sel dengan cara membagi dan memindahkan kultur sel ke dalam labu kultur yang lain.

Sel MCF-7 merupakan tipe sel yang melekat (*adherent*) atau *anchorage dependent* (Gambar 4.9, 4.10). Serum yang ditambahkan ke dalam medium RPMI 1640 mengandung antitripsin yang menyebabkan perlekatan sel pada dinding dan dasar labu kultur. Oleh sebab itu, pada proses subkulturisasi, kultur sel dicuci dengan PBS untuk menghilangkan efek antitripsin serum dalam medium, selain itu untuk melepaskan adhesi sel dari dasar labu maka ditambahkan tripsin ke dalam kultur sel dan diinkubasi selama 10 menit dalam inkubator sel untuk optimalisasi kerja tripsin.

4.2.2. Jumlah Kepadatan Sel

Sel yang terdapat dalam 4 bidang besar pada hemositometer sebanyak 71 sel dengan rata-rata 17,75 sel tiap bidang. Maka kepadatan sel adalah $1,75 \times 10^6$ sel/ml (Lampiran 22).

Jumlah sel yang dibutuhkan untuk pengujian sitotoksitas menurut ATCC adalah $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ sel/ml atau $10^3 - 10^5$ sel dalam tiap sumur. Jumlah tersebut merupakan jumlah yang umum dipakai agar serapan dapat cukup besar sehingga dapat terdeteksi dengan baik oleh alat (Clarke, *et al.*, 1996). Oleh karena itu,

sebelum digunakan untuk uji sitotoksitas, sel yang telah disubkulturisasi, terlebih dahulu dihitung kepadatannya menggunakan hemositometer dengan metode pewarnaan biru tripan.

Prinsip pewarnaan dengan biru tripan yaitu membran sel viabel bersifat impermeabel terhadap zat warna tersebut sehingga sel hidup tetap jernih sedangkan sel mati akan terwarnai dan berwarna kebiruan karena telah kehilangan integritas membran selnya (Phelan, 1998).

4.2.3. Penyediaan Suspensi Sel Uji

Sel yang terhitung dalam labu kultur sebanyak $1,75 \times 10^6$ sel/ml dibagi untuk mengisi pelat kultur jaringan 96 sumuran (pembulatan dihitung 100 sumuran) dengan tiap sumur berisi 100 μ l suspensi sel dalam medium RPMI 1640 yang mengandung FCS 10%. Kepadatan sel yang dikehendaki adalah 6×10^4 sel/ml, sehingga suspensi yang dibutuhkan untuk pengujian adalah 0,34 ml. Medium RPMI 1640 (yang mengandung FCS 10%) yang dibutuhkan adalah sebanyak 9,66 ml (Lampiran 23).

4.2.4. Pengujian Sitotoksitas

Berdasarkan nilai perhitungan serapan merah yang diperoleh dari hasil pengujian sitotoksitas (Tabel 4.2 – 4.11) menunjukkan bahwa pada konsentrasi tertinggi (250 μ g/ml), larutan uji yang memberikan nilai persentase kematian sel tertinggi adalah ekstrak air isolat 2.DP1 (65,81%) sedangkan ekstrak yang memberi nilai persentase kematian terendah adalah ekstrak air 4.RF1 (39,93%). Persentase kematian sel dari tiap-tiap ekstrak yang selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.12 – 4.21.

Pengujian sitotoksitas dimulai dengan memasukkan sel MCF-7 yang telah dihitung kepadatannya ke dalam pelat kultur jaringan 96 sumuran dan diinkubasi terlebih dahulu selama 24 jam untuk memperoleh kondisi optimum pengujian, yaitu pada saat sel mencapai fase log. Setelah inkubasi, sumuran berisi suspensi sel diberi perlakuan yang berbeda-beda, yaitu dilakukan penambahan

larutan uji dalam DMSO, sisplatin sebagai kontrol positif, dan blangko DMSO kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Pemetaan sumuran dapat dilihat pada Lampiran 24. Digunakan DMSO sebagai pelarut karena DMSO dapat berpenetrasi ke dalam sel dan dikategorikan bersifat non toksik sampai pada konsentrasi 3% (Wadhvani, *et al.*, 2009). Pada akhir masa inkubasi, sel diamati kembali di bawah mikroskop untuk membandingkan struktur sel antara sebelum dan setelah diberikan perlakuan dan untuk melihat kematian yang terjadi. Setelah perlakuan, pada sumur blanko negatif, sel masih terlihat hidup dan melekat pada dasar sumuran, sedangkan pada sumuran uji, sel tampak mengalami kematian yang terlihat dari perubahan struktur morfologinya. Sel viabel yang melekat pada dasar sumuran tampak jernih berbentuk bulat atau memanjang menyerupai daun, sedangkan sel mati berbentuk serpihan berwarna hitam.

Setelah inkubasi dan pengamatan mikroskopis, seluruh medium dibuang dan kultur dicuci dengan PBS untuk menghilangkan sel mati yang telah kehilangan daya adhesinya. Ke dalam tiap-tiap sumuran ditambahkan pewarna merah netral yang akan diabsorpsi oleh sel viabel. Setelah diinkubasi selama 40 menit dalam inkubator sel, pewarna dibuang dan sel dicuci kembali dengan PBS untuk menghilangkan sisa merah netral dan sel mati yang masih terdapat dalam sumuran.

Sel viabel kemudian dilisis untuk membebaskan merah netral yang terkandung dalam sel dengan menggunakan larutan SDS 1%. Serapan merah netral dalam larutan SDS diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 492 nm dengan panjang gelombang referensi 630 nm. Serapan yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel yang masih aktif melakukan metabolisme (sel viabel) sehingga persentase kematian sel dapat dihitung dengan membandingkannya dengan blangko DMSO.

Dari grafik hubungan antara konsentrasi, baik konsentrasi larutan uji maupun blanko sisplatin, dengan persentase kematian sel terlihat adanya peningkatan kematian sel seiring dengan meningkatnya konsentrasi. Meskipun demikian terdapat beberapa data yang menghasilkan grafik yang kurang linier, yaitu pada ekstrak air isolat 2.DP1, 6.AP2, 12.RF3 dan ekstrak butanol isolat 6.AP2 (Gambar 4.15, 4.16, 4.17, 4.21) hal ini dapat disebabkan karena tidak

meratanya jumlah sel yang terdapat dalam tiap sumuran atau kurang homogennya campuran larutan uji atau blanko dengan medium dalam sumuran sehingga terjadinya kontak antara larutan uji dengan sel kurang optimal.

4.2.5. Nilai LC₅₀

Nilai LC₅₀ terendah diberikan oleh ekstrak air isolat 2.DP1, yaitu sebesar 184,52 µg/ml, sedangkan ekstrak air 4.RF1 memiliki nilai LC₅₀ tertinggi, yaitu 407,95 µg/ml. Sebagai blanko positif, sisplatin memiliki nilai LC₅₀ sebesar 78,94 µg/ml. Nilai LC₅₀ yang selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.22.

Nilai LC₅₀ adalah nilai yang menggambarkan konsentrasi minimum yang dibutuhkan untuk menginhibisi sel MCF-7 sebanyak 50% dari jumlah awal, diperoleh dengan menggunakan analisis regresi linier. Semakin kecil nilai LC₅₀ suatu larutan uji, maka dikatakan bahwa potensi aktivitas sitotoksiknya semakin tinggi. Dibandingkan dengan blanko sisplatin yang memiliki nilai LC₅₀ 8,60 µg/ml, seluruh ekstrak yang diuji memiliki nilai LC₅₀ yang cukup besar. Ekstrak yang memiliki nilai LC₅₀ paling rendah adalah ekstrak air isolat 2.DP1 yaitu dengan nilai LC₅₀ 184,52 µg/ml, dan yang paling kurang toksik adalah ekstrak air 4.RF1 dengan nilai LC₅₀ 407,95 µg/ml. Menurut NCI, suatu ekstrak apabila memiliki nilai LC₅₀ yang lebih besar dari 20 µg/ml maka dikatakan inaktif (Zhang, 2007).

Dibandingkan dengan percobaan lain yang menggunakan metode MTT, nilai LC₅₀ blanko positif sisplatin dalam penelitian ini cukup besar, yaitu 8,60 µg/ml. Hal ini dapat disebabkan karena metode yang digunakan dalam penelitian yaitu metode pengukuran serapan merah netral yang kurang akurat dibandingkan dengan metode MTT. Hal ini karena pada metode MTT, sel viable akan mereduksi MTT menjadi senyawa ungu formazan yang memberikan serapan tanpa melalui proses pencucian sel sebagaimana pada metode merah netral, sehingga serapan yang dihasilkan lebih akurat dalam mencitrakan jumlah sel hidup.

Nilai LC₅₀ larutan uji yang cukup besar dapat juga dikarenakan larutan uji masih merupakan ekstrak kasar. Apabila yang digunakan adalah senyawa murni

hasil isolasi ekstrak, diharapkan senyawa murni tersebut memiliki daya toksisitas yang tidak jauh berbeda dengan blanko positifnya.

Seluruh grafik hubungan antara konsentrasi dengan persentase kematian sel menunjukkan adanya peningkatan persentase kematian sel seiring dengan peningkatan konsentrasi larutan uji dan blanko sisplatin. Gambar grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel dapat dilihat pada Gambar 4.15 – 4.23.

4.2.6. 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 25.

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 26.

Hasil analisis varian satu arah menunjukkan semua data persentase kematian sel MCF-7 pada berbagai konsentrasi larutan uji memiliki perbedaan yang signifikan (Lampiran 27). Perbedaan antara masing-masing perlakuan dianalisis lebih lanjut menggunakan uji beda nyata terkecil dengan hasil yang dapat dilihat pada Lampiran 28.

Uji ANOVA digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa persentase kematian sel antar kelompok perlakuan memiliki perbedaan bermakna yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 (Lampiran

27). Untuk mengetahui hubungan dan besarnya perbedaan persentase kematian sel antara kelompok perlakuan, maka dilakukan analisis lebih lanjut, yaitu uji beda nyata terkecil. Dari hasil analisis ini, masing-masing ekstrak uji dibandingkan persentase kematiannya dengan blanko sisplatin dengan level signifikansi 0,05. Hasilnya, setiap kelompok perlakuan memiliki nilai signifikansi $< 0,05$ sehingga terdapat perbedaan bermakna pada data persentase sel MCF-7 antar kelompok perlakuan dengan blanko sisplatin. Artinya ekstrak uji memiliki nilai toksisitas yang jauh berbeda dibandingkan dengan blanko sisplatin, di mana blanko memberikan nilai persentase kematian yang lebih besar dibandingkan larutan uji



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

1. Berdasarkan hasil uji BSLT keenambelas ekstrak uji, diperoleh 8 ekstrak uji terbaik, yaitu ekstrak air isolat 2.DP1, 4.RF1, 6.AP2 dan 12.RF3, ekstrak butanol isolat 4.RF1 dan 6.AP2, ekstrak etil asetat isolat 2.DP1 dan 4.RF1.
2. Berdasarkan nilai LC_{50} dari hasil uji sitotoksitas terhadap sel MCF-7 secara *in vitro*, kedelapan ekstrak uji memiliki aktivitas sitotoksik yang rendah karena memiliki nilai LC_{50} lebih dari 20 $\mu\text{g/ml}$.

5.2. SARAN

1. Sebaiknya dipergunakan DMSO sebagai pengganti pelarut organik agar pengujian BSLT dapat dilakukan tanpa perlu menguapkan pelarut organik terlebih dahulu.
2. Pada uji BSLT sebaiknya digunakan multiwell yang terbuat dari kaca atau digunakan vial karena pelarut etil asetat bereaksi dengan plastik pada well. Selain itu penggunaan vial lebih mempermudah pengamatan kematian larva *Artemia salina*.
- 3.

DAFTAR ACUAN

- Abrahams, G.D. (1973). Gangguan Pertumbuhan, Proliferasi dan Diferensiasi Sel. Dalam Price, S., Wilson, L.M. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit Edisi Keempat* (Wijaya Caroline, Penerjemah). Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Alireza, A. (2008). Historical Record on Brine Shrimp *Artemia* More Than One Thousand Years Ago from Urmia Lake, Iran. *J Biol Res-Thessalon*, 9, 113-114.
- American Cancer Society and National Comprehensive Cancer Network. (2006). *Breast Cancer: Treatment Guidelines for Patients*. Version VIII. USA: Author.
- American Cancer Society. (2008). *Breast Cancer*. USA: Author.
- Anderson, D.T. (1967). Larval Development and Segment Formation in The Branchiopod Crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* L. (Anostraca), *Aust J Zool*, 15, 47-91.
- Anderson, J.E., Chang, C.J., McLaughlin, J.L. (1998). Bioactive Components of *Allamanda schottii*. *J Nat Prod*, 51(2), 307-308.
- Atika, D. (2007). *Uji Aktivitas Antimikroba Hasil Fermentasi Kapang Endofit yang Diisolasi dari Akar, Batang, Daun Tanaman Garcinia fruticosa Lauterb dan Garcinia lateriflora Blume serta Akar dan Daun Tanaman Garcinia Cowa Roxb*. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Bacon, C.W. (1999). Isolation, Culture, and Maintenance of Endophytic fungi of Grasses. In: Labeda, D.P, ed. *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. New York: McGraw-Hill, 259-282.

- BC Cancer Agency. (2010). *Types of Breast Cancer*. April 17, 2010.
 <<http://www.bccancer.bc.ca/nr/bcca/asp/PrintPreview.asp?GUIDS={E74D74FF-9D8E-4FF1-8B39-92E61EFE5310}>>.
- Belk, D., Brtek, J. (1995). Checklist of the Anostraca. *Hydrobiologia*, 298, 315--353.
- Berry, D.A., *et al.* (2005). Cancer Intervention and Surveillance Modeling Network (CISNET) Collaborators. Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer. *N Engl J Med*, 353, 1784-1792.
- Clarke, R., *et al.* (1996). In Vitro Models of Breast Cancer. In Haris J.R., Lipman M.E., Morrow M., Osborne C.K. (Eds). *Disease of The Breast*. 2nd ed. Lippincott and William & Wilkins.
- Clegg, J.S. (2001). Cryptobiosis – A Peculiar State of Biological Organization. *Comp Biochem Physiol, Part B*, 128(4), 613-624.
- Environmental Leverage. (2003). *Bacteria and Filament Staining*. Illinois.: November 16, 2009.
<http://www.environmentalleverage.com/Staining.htm>>
- Ferrigni, N.R., *et al.* (1982). Modification and Evaluation of The Potato Disc Assay and Antitumor Screening of Euphorbiaceae Seeds. *J Nat Prod*, 45, 679-686.
- Freshney, R.I. (2005). Cytotoxicity. In: *Culture of Animal Cells: A Manual Basic Technique*. 5th ed. John Wiley & Sons.
- Haiyan, L., *et al.* (2005). Screening for Endophytic Fungi with Antitumor and Antifungal Activities from Chinese Medicinal Plants. *World J Microbiol Biotechnol*, 21, 1515-1519.
- Harrison, L.J., *et al.* (1993). Xanthones from *Garcinia forbesii*. *Phytochemistry*, 33(3), 727-728.

- Hasan, M., *et al.* (2005). Toxicity of Four Synthetic Plant Hormones IAA, NAA, 2,4-D and GA against *Artemia salina* Leach. *Int J Agri Biol*, 7(2), 240-242.
- Hay, A., *et al.* (2003). Antimalarial Xanones from *Callophilium caledonicum* and *Garcinia viellardii*. *Life Sci*, 75, 3077-3085.
- Heffen, W.L. (2010). *Induction of Apoptosis by Ziderone Isolated from Curcuma zedoaria (Berg) Roscoe*. Thesis Chemistry Department, Faculty of Science, University of Malaya. Kuala Lumpur: Chemistry Department, Faculty of Science, University of Malaya.
- Jurag Separation. (*n.d.*). April 17, 2010.
<<http://www.jurag.dk/images/BiomassGrowthCurve.gif>>.
- Kardono, L.B.S., *et al.* (2006). Bioactive Constituents of *Garcinia porrecta* and *G. parvifolia* Grown in Indonesia. *Pak J Bio Sci*, 9(3), 483-486.
- Kosela, S., *et al.* (1999). Dulxanthone E: A pyranoxanthone from the leaves of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry*, 52, 1375-1377.
- Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2007). *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*, 2nd ed. Springer.
- Lisdawati, V. (2002). Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*), Toksisitas, Efek Antioksidan dan Efek Antikanker Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi. PT Mahkota Dewa Indonesia. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Mackeen, M., *et al.* (2002). Antifungal *Garcinia* Acid Ester from Fruit *Garcinia atroviridis*. *J Naturforsch* 75(c), 291-295.
- Maretyani, L. (2006). *Penapisan dan Pemurnian Fraksi yang Dihasilkan Bakteri dan Kapang Endofitik yang Memiliki Aktivitas sebagai Antijamur dan Antibakteri*. Skripsi Fakultas Farmasi. Jakarta: Universitas Pancasila.

- McLaughlin, J.L. (1991). Crown Gall Tumours in Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation. In Hostettman, K. (Ed). *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press., 6, 1-36.
- Mettlin, C. (1999). Global Breast Cancer Statistic. *CA Cancer J Clin*, 49, 138-144
- Meyer, B.N., *et al.* (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 54, 31.
- Moonkarndi, P., *et al.* Antiproliferation, Antioxidation and Induction of Apoptosis by *Garcinia mangostana* (Mangosteen) on SKBR3 Human Breast Cancer Cell Line. (2004). *J Ethnopharmacol*, 90, 161-166.
- Moore, E., Landecker. (1997). *Fundamentals of The Fungi*. New Jersey: Prentice Hall International.
- Nafrialdi, Ganiswara, S. (1995). Antikanker dan Imunosupresan. *Farmakologi dan Terapi, Edisi 4*. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Nakatani, K., *et al.* (2004). Gamma-Mangostin Xanthone Acts as A Strong Anti-Inflammatory. *Mol Pharmacol*.
- National Cancer Institute. (1999). *Cell Biology and Cancer*. Washington: BSCS and Videodiscovery.
- National Cancer Institute. (2005). *What You Need To Know About Breast Cancer*. USA: NIH Publication No 05-1556.
- National Cancer Institute – United States of National Institute of Health. (*n.d.*) *What Is Cancer?*. September 17, 2009.
<<http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>>.

- Okafor, N. (2007). *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. New Hampshire: Science Publishers.
- Phelan, M.C. (1998). Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology*, 1.1.1–1.1.10.
- Pompakakui, S., *et al.* (2006). Cytotoxic Activity of Four Xanthenes from *Emericella varicolor*, An Endophytic Fungus Isolated from *Croton oblongifolius*. *Arch Pharm Res*, 29(2), 140-144.
- Radji, M., Soemiati, A., Indani, N. (2004). Uji Mutagenisitas dan Antikanker Ekstrak Aseton dan n-Heksana dari Kulit Batang Sesoot (*Garcinia picrorrhiza* Miq). *Majalah Ilmu Kefarmasian*, I(2), 69-78.
- Radji, M. (2005, Desember). Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, II(3), 113-126.
- Roosheroe, I.G., Sjamsuridzal, W. (2006). *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Soemiati, A. (2000). *Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Kimia Serta Uji Aktivitas Biologi dari Buah Tanaman Garcinia dulcis Kurz dan Kulit Batang serta Akar Tanaman Garcinia picrorrhiza Miq*. Ringkasan Disertasi Departemen Kimia UI. Depok: Pascasarjana Departemen Kimia Universitas Indonesia.
- Sorgeloos, P., Persoone, G. (1975). Technology Improvements for 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.D., *et al.* (1973). A Human Cell Line from A Pleural Effusion Derived from A Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (1995). *Principles of Fermentation Technology* 2nd ed. Oxford, UK: Tarrytown, NY, USA: Pergamon.

State University of New York College of Environmental Science and Forestry.
(2009). *Indoor Air Quality and Indoor Air Sampling for Molds*. Oktober
26, 2009.

http://www.esf.edu/ecenter/eis/images/clip_clip_image007.gif.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. (2005). Novel Natural Products From
Rainforest Endophytes. In Zhang, L., Demain, A.L. (Ed.). *Natural
Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*. Totowa: Humana.

Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their
Natural Products. *Microbiol Mol Biol R*, 67(4), 491-502.

Strobel, G., Richard, T., Arthur, B. (1997). *Acremonium* sp. – Leucinostatin A
Producing Endophyte of European Yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*,
128, 97-108.

Strobel, G. (2005). Harnessing Endophytes for Industrial Microbiology. *Curr
Opin Microbiol*, 9, 240-244.

Tan, R.X., Zou, W.X. (2001). Endophytes: A Rich Source of Functional
Metabolites. *Nat Prod Rep*, 18, 448-459.

Taqwim, S.F. (2007). *Uji Antimikroba dan Uji Sitotoksisitas dengan Metode
Brine Shrimp Lethality Test Metabolit Sekunder Kapang Endofit Hasil
Isolasi dari Akar, Batang, dan Daun Tanaman Garcinia forbesii King*.
Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.

Uniprot. (n.d). Oktober 26, 2009. <http://www.uniprot.org/taxonomy/231907>.

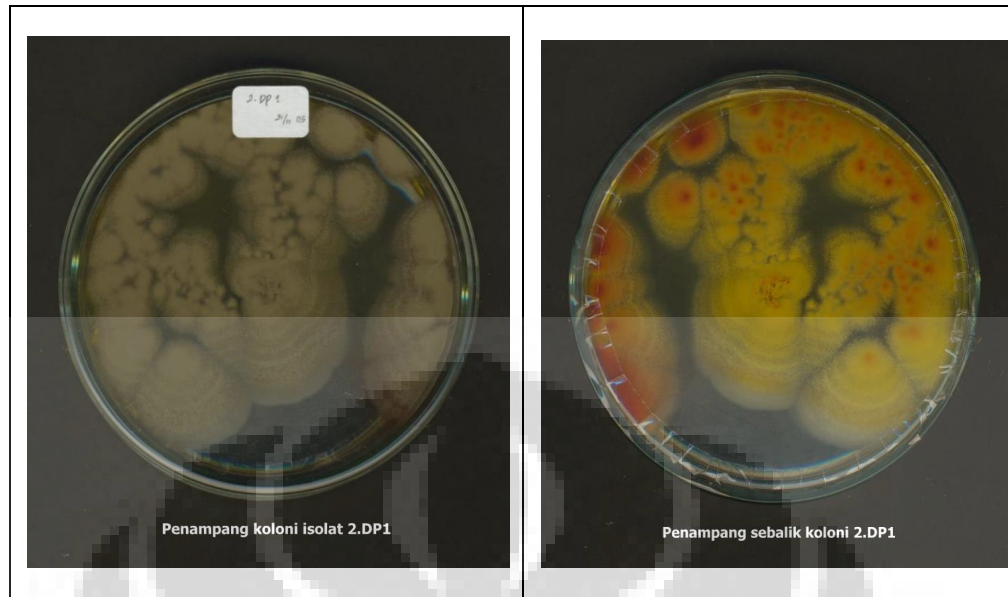
Wadhvani, T., *et al.* (2009). Effect of Various Solvents on Bacterial Growth in
Context of Determining MIC of Various Antimicrobials. *Internet J
Microbiol*, 7(1).

Wahyudi, P. (1998). Mikroba Endofitik Sebagai Penghasil Materi yang
Bermanfaat. *BPPT*, 1761/H/98: 1-9.

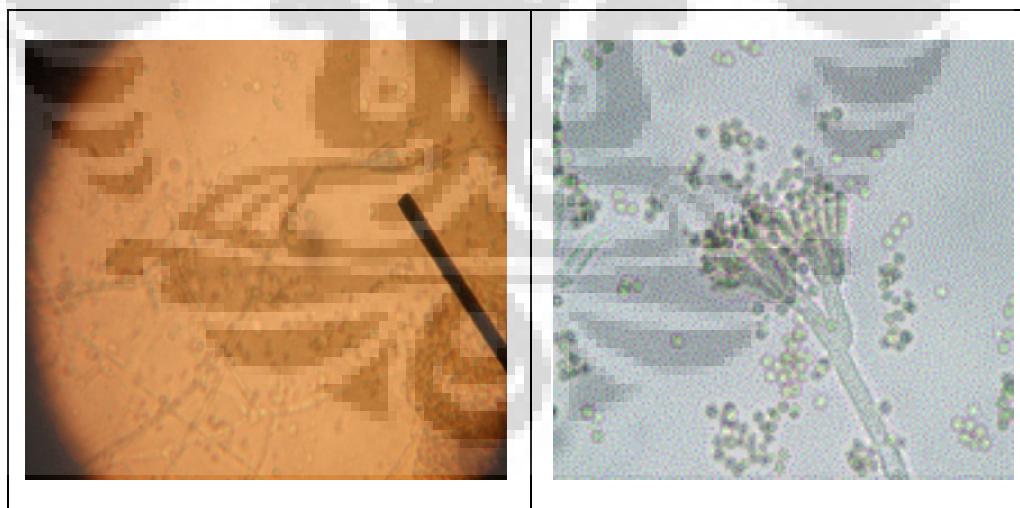
- World Health Organization. (2002). *National Cancer Control Programmes: Policies and Managerial Guidelines*. 2nd ed. Geneva: Author.
- World Health Organization. (n.d). *Breast Cancer: Prevention and Control*. April 16, 2010. <<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>>
- Yang, X., *et al.* (1994). A Fungal Endophyte-Tree Relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. *J Ethnopharmacol*, 1-8.
- Yulia, P.R. (2004). *Isolasi dan Seleksi Kapang Endofit Penghasil Antimikroba pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional Indonesia*. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Universitas Indonesia.
- Zhang, M., *et al.* (2007). Measuring Cytotoxicity: A New Perspective on LC₅₀. *Int J Cancer*, 27(1A), 35-38.



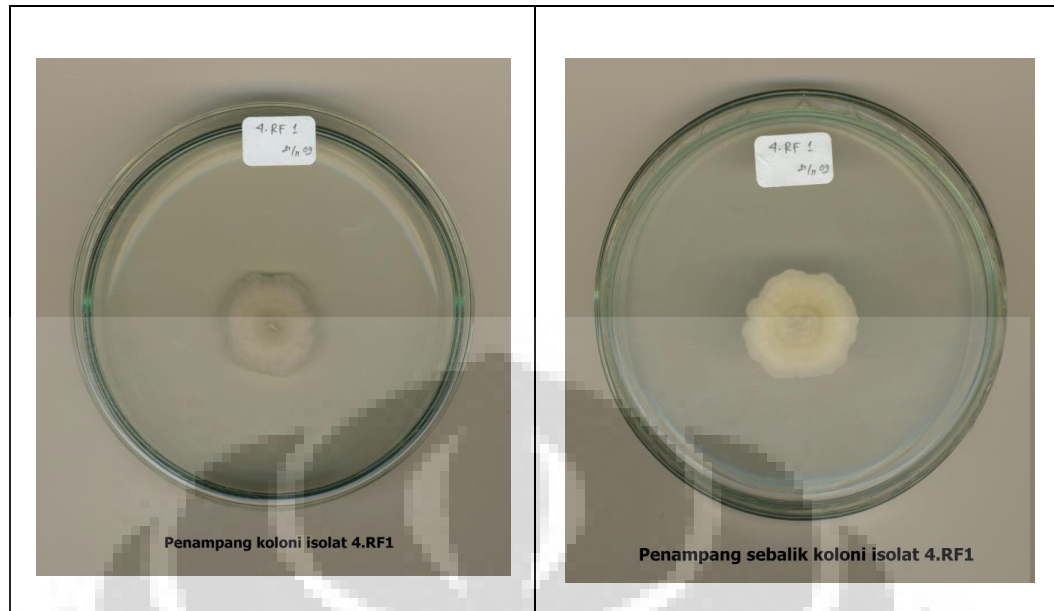
GAMBAR



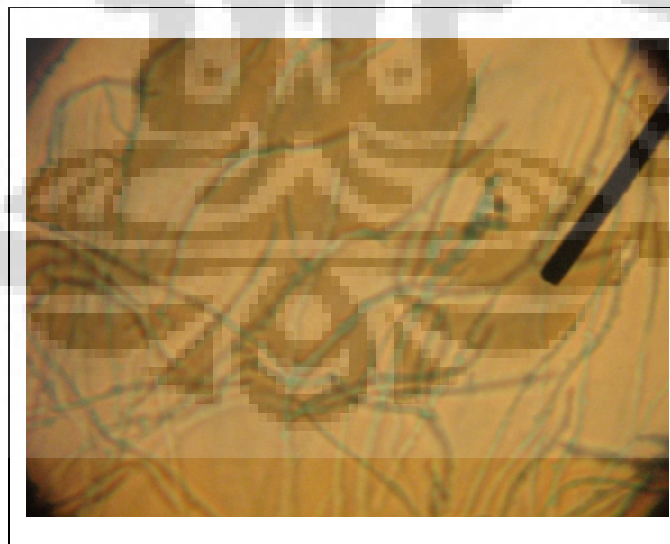
Gambar 4.1. Makroskopis isolat 2.DP1. Penampang makroskopis muka koloni (kiri) dan sebalik koloni (kanan) isolat 2.DP1.



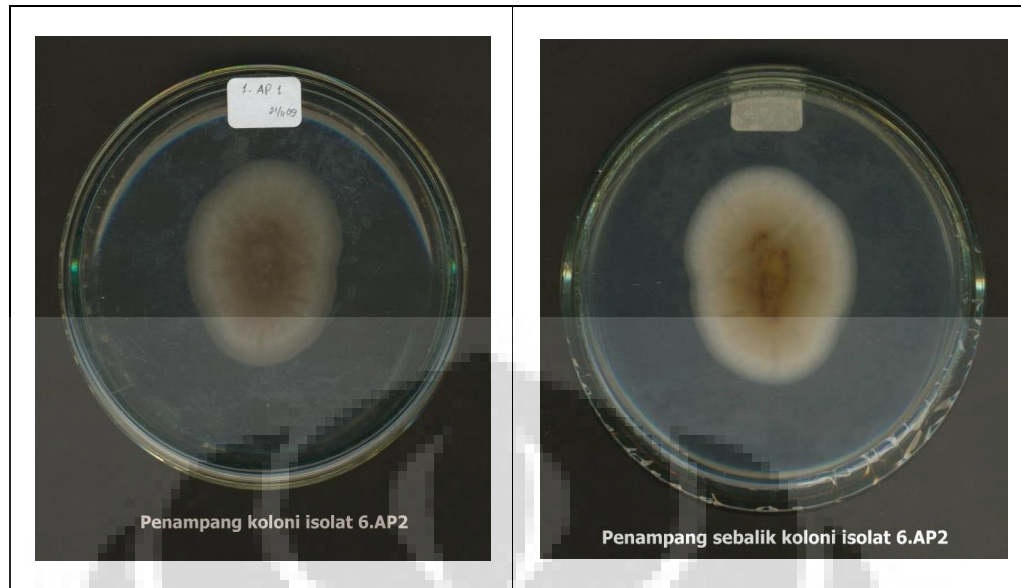
Gambar 4.2. Mikroskopis isolat 2.DP1, tampak adanya philiades yang seperti kuas (kiri); mikroskopis pembanding *Penicillium purpurogenum* (kanan) [Sumber: State University of New York College of Environmental Science and Forestry, 2009]



Gambar 4.3. Makroskopis Isolat 4.RF1. Penampang makroskopis muka koloni (kiri) dan penampang sebalik koloni (kanan) isolat 4.RF1.



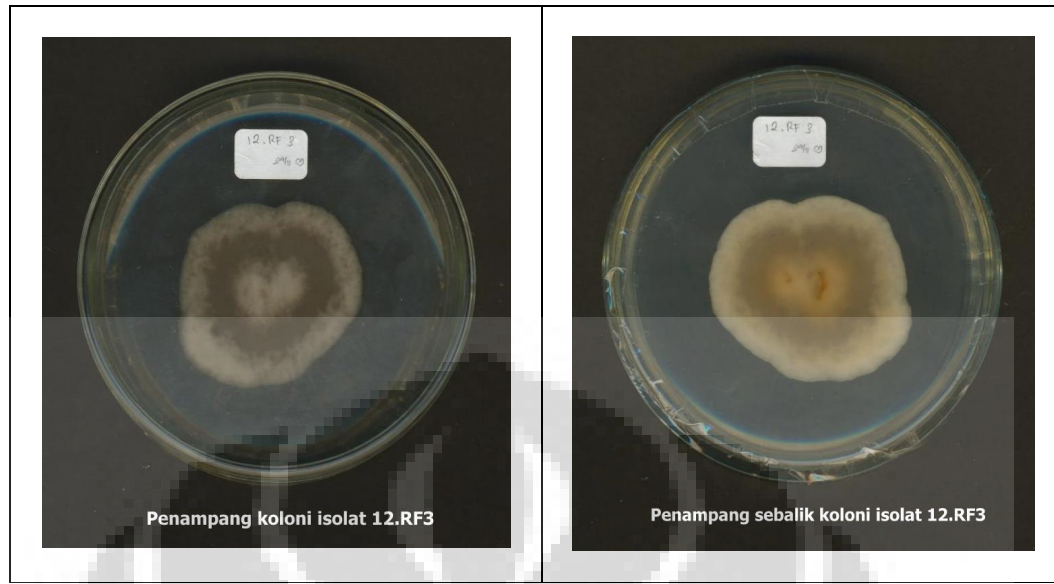
Gambar 4.4. Mikroskopis isolat 4.RF1



Gambar 4.5. Makroskopis Isolat 6.AP2. Penampang makroskopis muka koloni (kiri) dan penampang sebalik koloni (kanan) isolat 6.AP2.



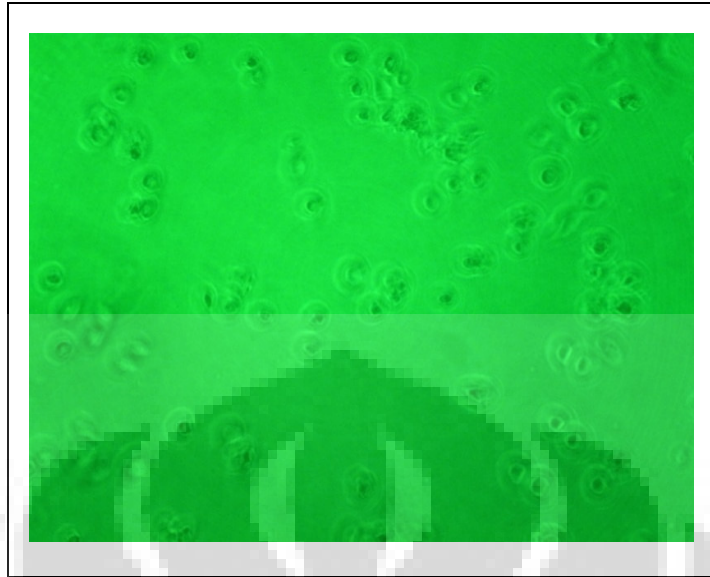
Gambar 4.6. Mikroskopis isolat 6.AP2. Terdapat pembesaran di ujung-ujung hifa (kiri), tampak adanya makrokonidia bersepta 4-6 ruas (kanan).



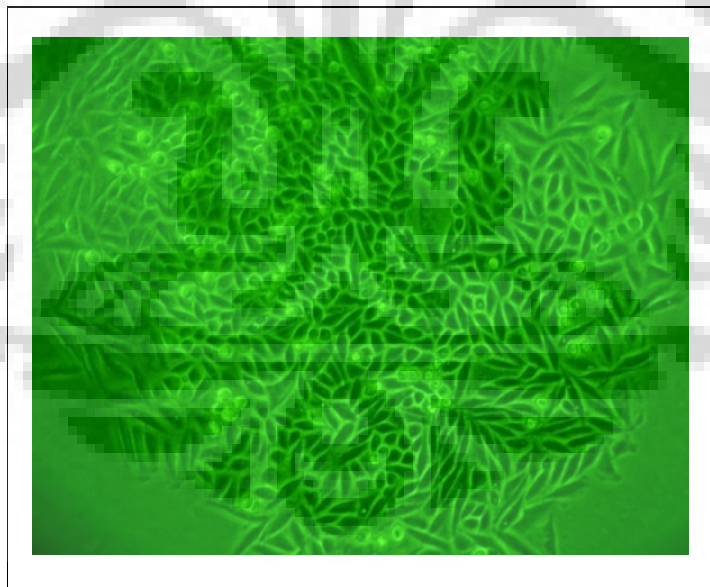
Gambar 4.7. Makroskopis isolat 12.RF3. Penampang makroskopis muka koloni (kiri) dan penampang sebalik koloni (kanan) isolat 12.RF3.



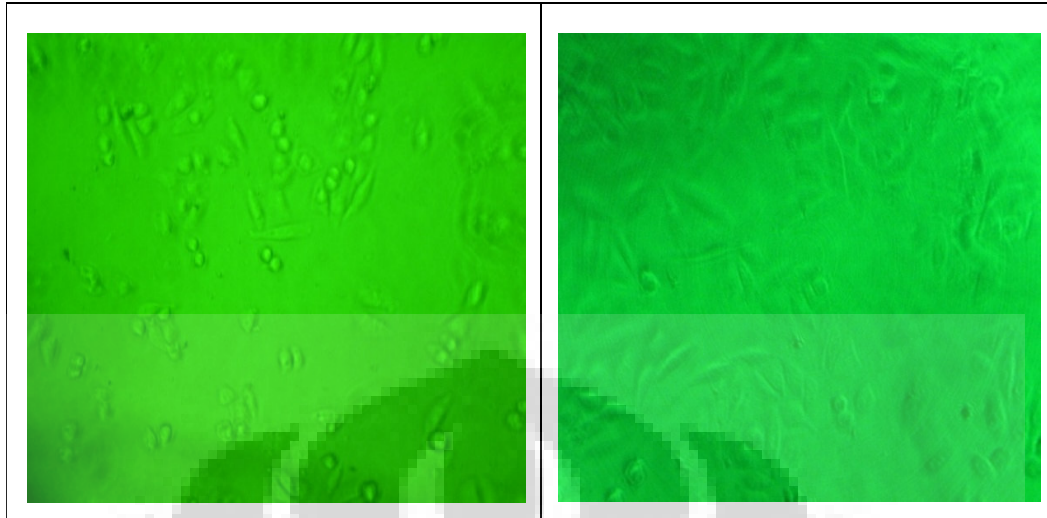
Gambar 4.8. Mikroskopis isolat 12.RF3



Gambar 4.9. Mikroskopis sel MCF-7 sebelum melekat pada dasar labu kultur (sesaat setelah subkulturisasi).

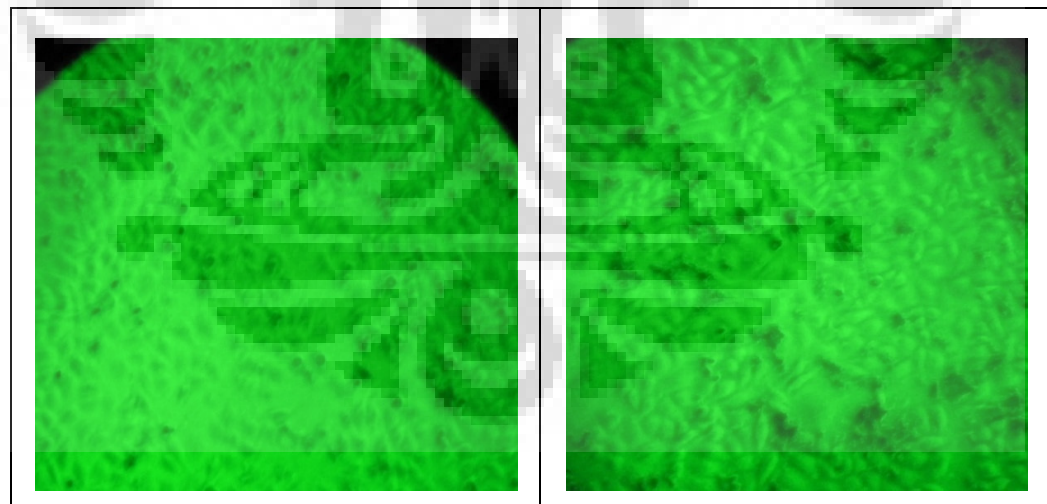


Gambar 4.10. Mikroskopis sel MCF-7 dalam medium RPMI 1640 di dalam labu kultur yang diinkubasi pada 37°C selama 5 hari.



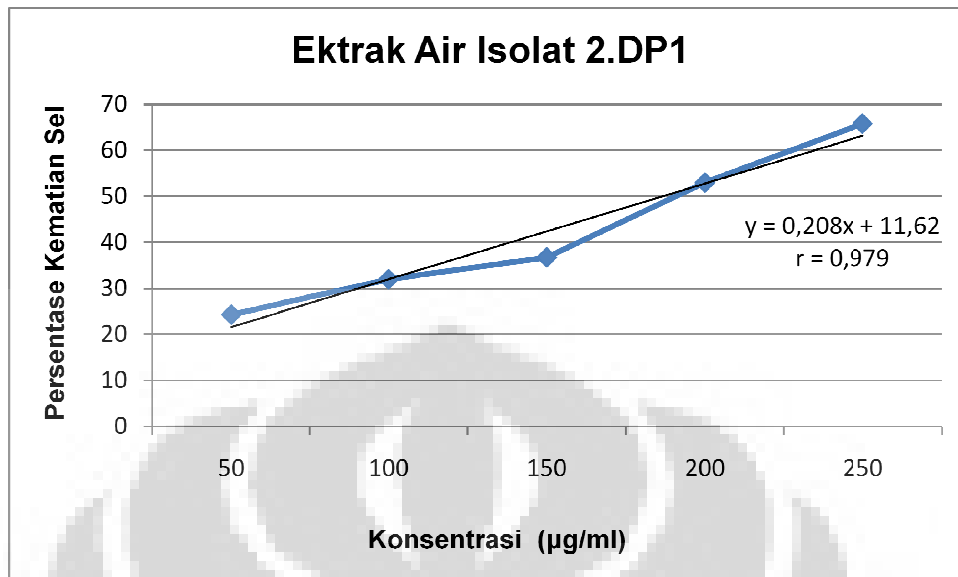
Gambar 4.11. Mikroskopis sel MCF-7 dalam pelat kultur jaringan 96 sumuran sebelum dilakukan pengujian.

Gambar 4.12. Mikroskopis sel negatif dalam medium RPMI 1640 setelah dilakukan pengujian.

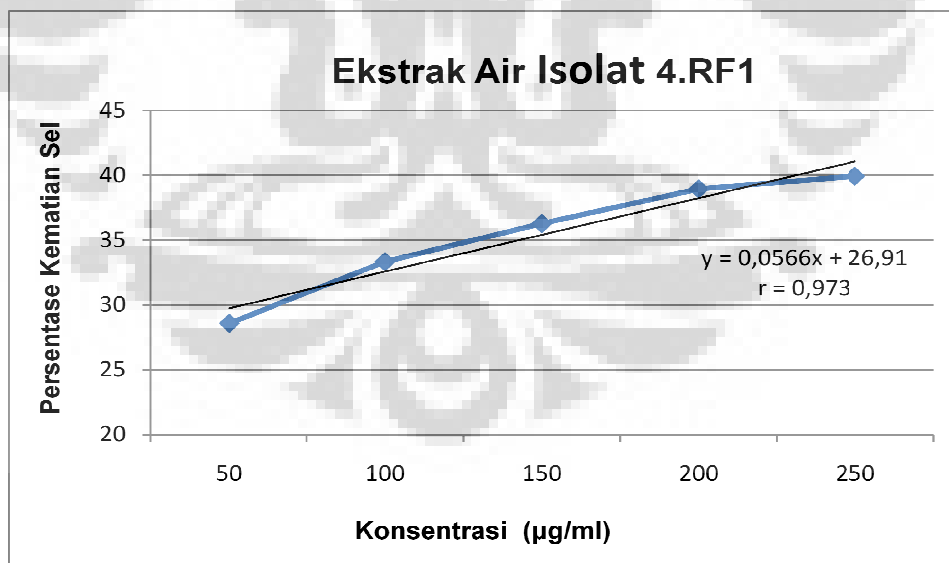


Gambar 4.13. Mikroskopis sel setelah dilakukan pengujian dengan sampel konsentrasi akhir 200 µg/ml.

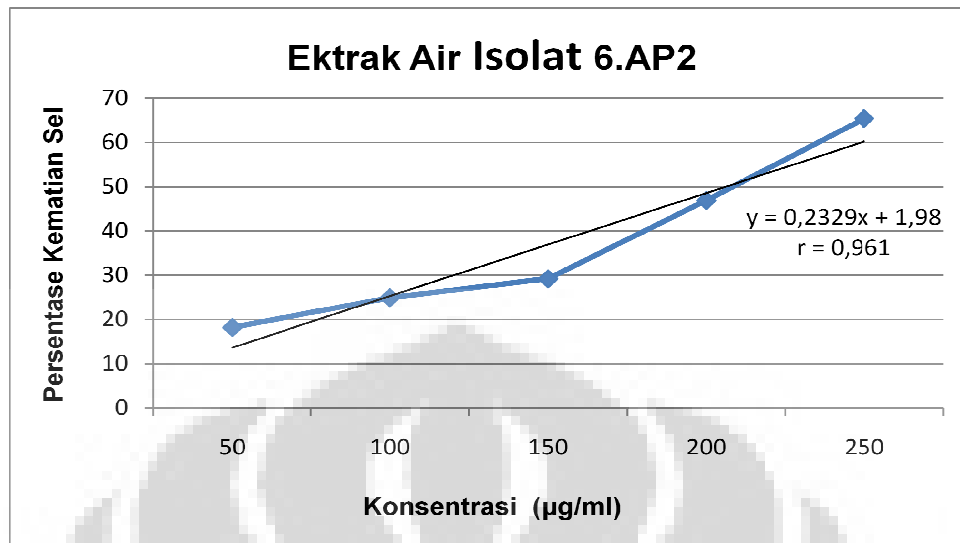
Gambar 4.14. Mikroskopis sel setelah dilakukan pengujian dengan blanko sislpatin konsentrasi akhir 200 µg/ml.



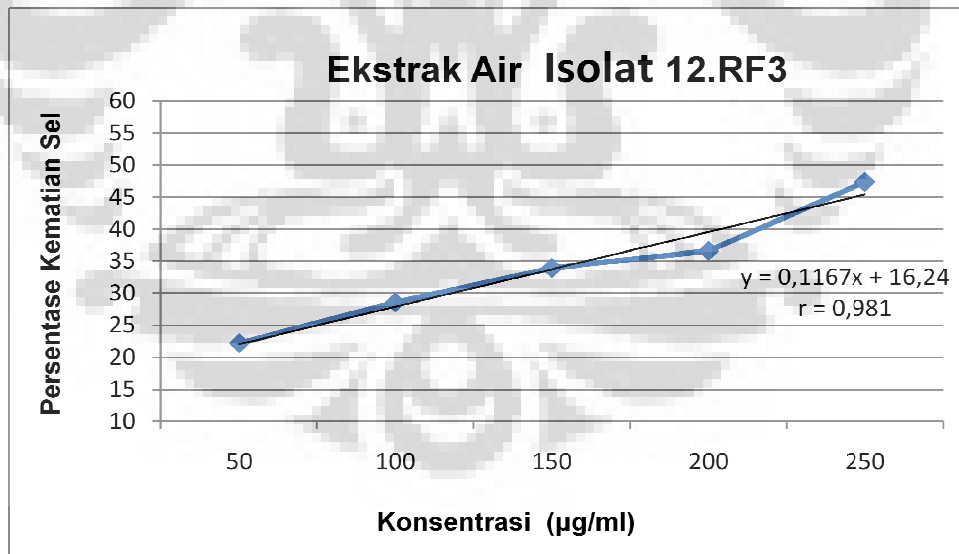
Gambar 4.15. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji 1 (ekstrak air isolat 2.DP1) dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



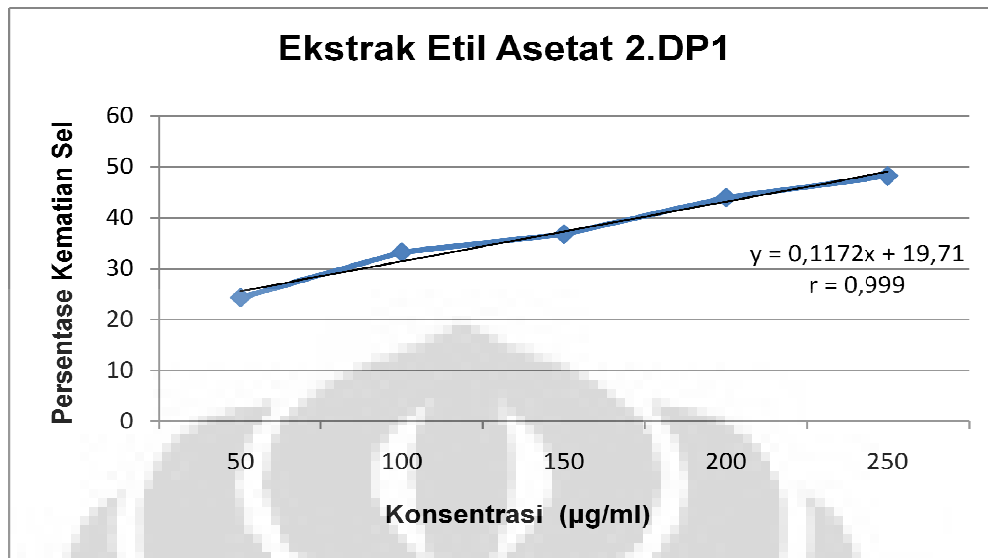
Gambar 4.16. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji 2 (ekstrak air isolat 4.RF1) dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



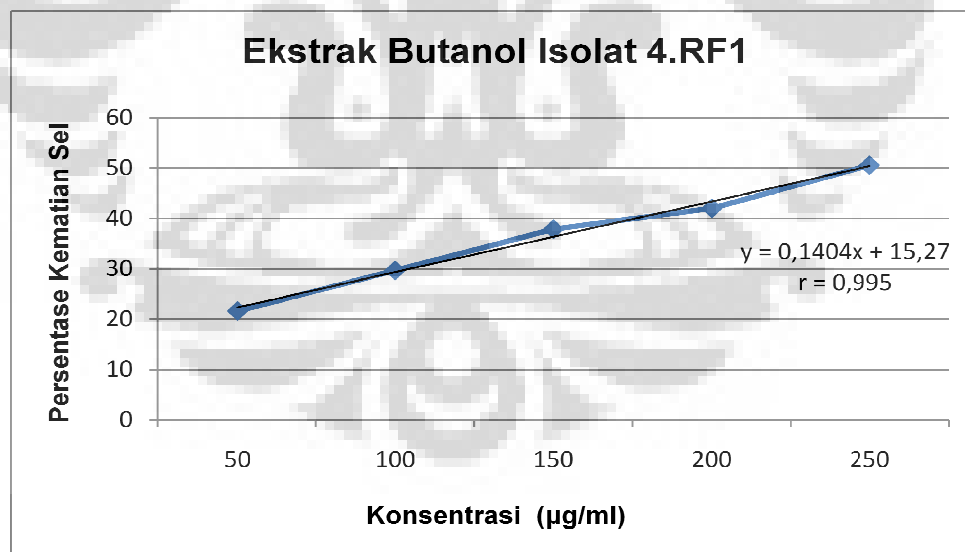
Gambar 4.17. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji 3 (ekstrak air isolat 6.AP2) dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



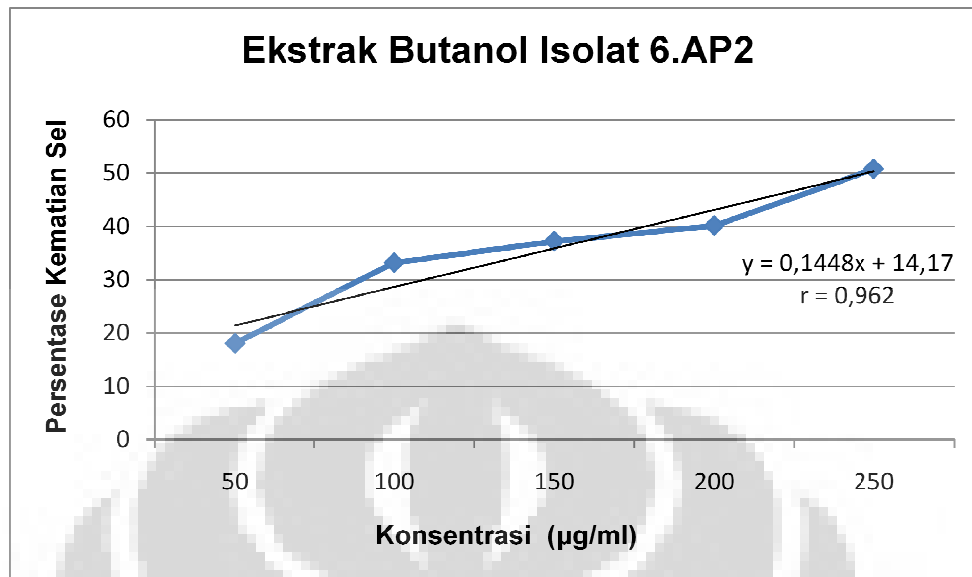
Gambar 4.18. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji 4 (ekstrak air isolat 12.RF3) dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



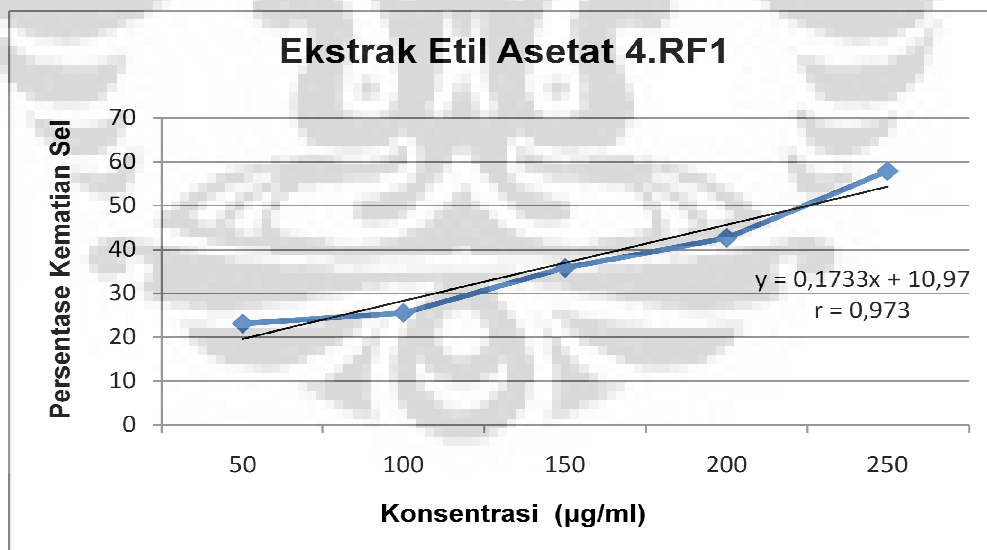
Gambar 4.19. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji 5 (ekstrak etil asetat isolat 2.DP1) dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



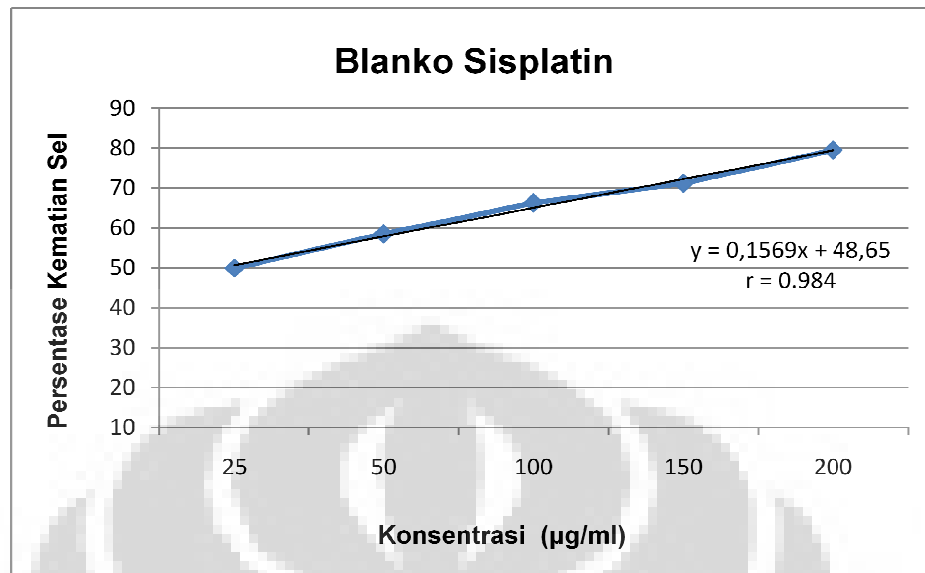
Gambar 4.20. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji 6 (ekstrak butanol isolat 4.RF1) dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



Gambar 4.21. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji 7 (ekstrak butanol isolat 6.AP2) dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



Gambar 4.22. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji 8 (ekstrak etil asetat isolat 4.RF1) dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



Gambar 4.23. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan blanko sisplatin dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam



Tabel 4.1
 Nilai LC₅₀ Hasil BSLT Isolat Kapang Endofit

Nama dan Asal Isolat	Nilai LC ₅₀ (µg/ml)			
	Air	Metanol	n-Butanol	Etil Asetat
Isolat 2.DP1	39.333*	299.396	147,964	31,599*
Isolat 4.RF1	30,492*	128,014	90,620*	8,183*
Isolat 6.AP2	9.012*	>1000	10,229*	129,446
Isolat 12.RF3	38,594*	421,577	153,932	>1000

Keterangan:

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

Tabel 4.2
 Serapan Merah Netral Larutan Uji 1 (Ekstrak Air Isolat 2.DP1) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
50	0,204	0,207	0,212	0,208
	0,201	0,209	0,210	0,207
100	0,182	0,186	0,189	0,186
	0,196	0,197	0,191	0,195
150	0,175	0,175	0,174	0,175
	0,172	0,174	0,172	0,173
200	0,146	0,143	0,148	0,146
	0,128	0,129	0,128	0,128
250	0,098	0,092	0,090	0,093
	0,104	0,100	0,103	0,102

Tabel 4.3
 Serapan Merah Netral Larutan Uji 2 (Ekstrak Air Isolat 4.RF1) dalam Larutan
 Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama
 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
50	0,200	0,204	0,201	0,202
	0,192	0,198	0,195	0,195
100	0,180	0,185	0,186	0,184
	0,179	0,185	0,182	0,182
150	0,172	0,175	0,175	0,173
	0,184	0,184	0,187	0,185
200	0,177	0,166	0,170	0,171
	0,166	0,166	0,168	0,167
250	0,169	0,164	0,164	0,165
	0,161	0,167	0,164	0,164

Tabel 4.4
 Serapan Merah Netral Larutan Uji 3 (Ekstrak Air Isolat 6.AP2) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
50	0,220	0,222	0,228	0,223
	0,224	0,233	0,229	0,229
100	0,207	0,205	0,219	0,210
	0,201	0,206	0,208	0,205
150	0,190	0,192	0,198	0,193
	0,197	0,194	0,194	0,195
200	0,163	0,164	0,166	0,164
	0,146	0,148	0,141	0,145
250	0,105	0,101	0,101	0,102
	0,093	0,095	0,095	0,094

Tabel 4.5
 Serapan Merah Netral Larutan Uji 4 (Ekstrak Air Isolat 12.RF3) dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
50	0,230	0,237	0,237	0,235
	0,215	0,208	0,214	0,212
100	0,199	0,199	0,195	0,198
	0,194	0,196	0,195	0,195
150	0,191	0,194	0,195	0,193
	0,180	0,180	0,181	0,180
200	0,181	0,186	0,189	0,185
	0,174	0,173	0,172	0,173
250	0,148	0,142	0,141	0,144
	0,148	0,148	0,145	0,147

Tabel 4.6
 Serapan Merah Netral Larutan Uji 5 (Ekstrak Butanol Isolat 4.RF1) dalam
 Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah
 Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
50	0,207	0,220	0,215	0,214
	0,223	0,226	0,231	0,227
100	0,189	0,185	0,202	0,192
	0,195	0,183	0,204	0,194
150	0,186	0,169	0,181	0,179
	0,171	0,156	0,182	0,170
200	0,162	0,160	0,158	0,160
	0,160	0,174	0,141	0,158
250	0,132	0,139	0,134	0,135
	0,135	0,136	0,146	0,139

Tabel 4.7
 Serapan Merah Netral Larutan Uji 6 (Ekstrak Butanol Isolat 6.AP2) dalam
 Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah
 Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
50	0,257	0,252	0,258	0,255
	0,227	0,222	0,222	0,224
100	0,202	0,207	0,203	0,204
	0,179	0,182	0,186	0,182
150	0,174	0,170	0,170	0,171
	0,185	0,182	0,181	0,183
200	0,176	0,173	0,174	0,174
	0,168	0,160	0,162	0,163
250	0,140	0,146	0,144	0,143
	0,137	0,134	0,132	0,134

Tabel 4.8
 Serapan Merah Netral Larutan Uji 7 (Ekstrak Etil Asetat Isolat 2.DP1) dalam
 Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah
 Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
50	0,202	0,206	0,212	0,207
	0,195	0,212	0,218	0,208
100	0,189	0,189	0,185	0,188
	0,186	0,188	0,173	0,182
150	0,170	0,177	0,171	0,173
	0,179	0,174	0,176	0,176
200	0,160	0,163	0,163	0,162
	0,155	0,153	0,151	0,153
250	0,140	0,140	0,144	0,141
	0,141	0,140	0,144	0,142

Tabel 4.9
 Serapan Merah Netral Larutan Uji 8 (Ekstrak Etil Asetat Isolat 4.RF1) dalam
 Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm Setelah
 Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
50	0,212	0,202	0,216	0,210
	0,222	0,209	0,233	0,221
100	0,217	0,209	0,216	0,214
	0,204	0,207	0,199	0,203
150	0,179	0,175	0,172	0,175
	0,186	0,187	0,183	0,185
200	0,156	0,156	0,158	0,157
	0,163	0,165	0,166	0,165
250	0,125	0,125	0,120	0,123
	0,117	0,116	0,112	0,116

Tabel 4.10
 Serapan Merah Netral Kontrol DMSO dan Kontrol Negatif Sel MCF-7 pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 jam pada Suhu 37°C

Kontrol (-)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
DMSO 2%	0,262	0,260	0,264	0,262
	0,277	0,270	0,273	0,273
Kontrol Negatif Sel	0,251	0,255	0,241	0,249
	0,284	0,286	0,287	0,286

Tabel 4.11
 Serapan Merah Netral Larutan Blanko Sisplatin dalam Larutan Natrium Dodesil Sulfat pada Panjang Gelombang 492 nm setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan			Rata-rata
	I	II	III	
25	0,142	0,142	0,145	0,143
	0,151	0,147	0,145	0,148
50	0,115	0,117	0,124	0,119
	0,128	0,139	0,138	0,135
100	0,095	0,101	0,093	0,099
	0,100	0,099	0,104	0,101
150	0,084	0,080	0,083	0,082
	0,098	0,100	0,097	0,098
200	0,058	0,058	0,059	0,058
	0,065	0,062	0,061	0,063

Tabel 4.12
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 1 (Ekstrak Air Isolat 2.DP1)
 setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50	25,27	24,18	22,34	23,93
	26,37	23,44	23,08	24,30*
100	33,33	31,87	30,77	31,99*
	28,21	27,84	30,04	28,70
150	35,90	35,90	36,26	36,02
	37,00	36,26	37,00	36,75*
200	46,52	47,62	45,79	46,64
	53,11	52,75	53,11	52,99*
250	64,10	66,30	67,03	65,81*
	61,90	63,37	62,27	62,51

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.13
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 2 (Ekstrak Air Isolat 4.RF1)
 setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50	26,74	25,27	26,37	26,13
	29,67	27,47	28,57	28,57*
100	34,07	32,23	31,87	32,72
	34,43	32,23	33,33	33,33*
150	37,00	35,90	35,90	36,27*
	32,60	32,60	31,50	32,23
200	35,16	39,19	37,73	37,36
	39,19	39,19	38,46	38,95*
250	38,10	39,93	39,93	39,32
	41,03	38,83	39,93	39,93*

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.14
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 3 (Ekstrak Air Isolat 6.AP2)
 setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50	19,41	18,68	16,48	18,19*
	17,95	14,65	16,12	16,24
100	24,18	24,91	19,78	22,96
	26,37	24,54	23,81	24,91*
150	30,40	29,67	27,47	29,18*
	27,84	28,94	28,94	28,57
200	40,29	39,93	39,19	39,80
	46,52	45,79	48,35	46,89*
250	61,54	63,00	63,00	62,51
	65,93	65,20	65,20	65,44*

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.15
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 4 (Ekstrak Air Isolat 12.RF3)
 setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50	15,75	13,19	13,19	14,04
	21,25	23,81	21,61	22,22*
100	27,11	27,11	28,57	27,60
	28,94	28,21	28,57	28,57*
150	30,04	28,94	28,57	29,18
	34,07	34,07	33,70	33,95*
200	33,70	31,87	30,77	32,11
	36,26	36,63	37,00	36,63*
250	45,79	47,99	48,35	47,38*
	45,79	45,79	46,89	46,16

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.16
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 5 (Ekstrak Butanol Isolat
 4.RF1) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50	24,18	19,41	21,25	21,61*
	18,32	17,22	15,38	16,97
100	30,77	32,23	26,01	29,67*
	28,57	32,97	25,27	28,94
150	31,87	38,10	33,70	34,56
	37,36	42,86	33,33	37,85*
200	40,66	41,39	42,12	41,39
	41,39	36,26	48,35	42,00*
250	51,65	49,08	50,92	50,55*
	50,55	50,18	46,52	49,08

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.17
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 6 (Ekstrak Butanol Isolat
 6.AP2) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50	5,861	7,692	5,495	6,349
	16,85	18,68	18,68	18,07*
100	26,01	2418	25,64	25,28
	34,43	33,33	31,87	33,21*
150	36,26	37,73	37,73	37,24*
	32,23	33,33	33,70	33,09
200	35,53	36,63	36,26	36,14
	38,46	41,39	40,66	40,17*
250	48,72	46,52	47,25	47,50
	49,82	50,92	51,65	50,80*

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.18
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 7 (Ekstrak Etil Asetat Isolat
 2.DP1) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi (µg/ml)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50	26,01	24,54	22,34	24,30*
	28,57	22,34	20,15	23,69
100	30,77	30,77	32,23	31,26
	31,87	31,14	36,63	33,21*
150	37,73	35,16	37,36	36,75*
	34,43	36,26	35,53	35,41
200	41,39	40,29	40,29	40,66
	43,22	43,96	44,69	43,96*
250	48,72	48,72	47,25	48,23*
	48,35	48,72	47,25	48,11

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.19
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Larutan Uji 8 (Ekstrak Etil Asetat Isolat
 4.RF1) setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
50	22,34	26,01	20,88	23,08*
	18,68	23,44	14,65	18,92
100	20,51	23,44	20,88	21,61
	25,27	24,18	27,11	25,52*
150	34,43	35,90	37,00	35,78*
	31,87	31,50	32,97	32,11
200	42,86	42,86	42,12	42,61*
	40,29	39,56	39,19	39,68
250	54,21	54,21	56,04	54,82
	57,14	57,51	58,97	57,87*

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.20
 Persentase Kematian Sel MCF-7 dari Blanko Sisplatin setelah Inkubasi selama 24
 Jam pada Suhu 37°C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Kematian			Rata-rata
	I	II	III	
25	50,00	50,00	50,01	50,00*
	47,20	48,60	49,30	48,25
50	59,79	59,09	56,64	58,51*
	55,24	51,40	51,75	52,80
100	66,78	64,69	67,48	66,32*
	65,03	65,38	63,64	64,68
150	70,63	72,03	70,98	71,21*
	65,73	65,03	66,08	65,61
200	79,72	79,72	79,37	79,60*
	77,27	78,32	78,67	78,09

Keterangan:

(*) merupakan nilai persentase kematian terbesar yang diambil untuk dianalisis secara statistik

Tabel 4.21
 Persamaan Garis yang Diperoleh Melalui Regresi Linier

Perlakuan	Persamaan Garis	R ²	r
Larutan uji ekstrak air 4.RF1	$y = 0,0566x + 26,91$	0,947	0,973
Larutan uji ekstrak air 12.RF3	$y = 0,1167x + 16,24$	0,963	0,981
Larutan uji ekstrak air 6.AP2	$y = 0,2329x + 1,98$	0,924	0,961
Larutan uji ekstrak air 2.DP1	$y = 0,208x + 11,62$	0,959	0,979
Larutan uji ekstrak butanol 4.RF1	$y = 0,1404x + 15,27$	0,990	0,995
Larutan uji ekstrak butanol 6.AP2	$y = 0,1448x + 14,17$	0,924	0,962
Larutan uji ekstrak etil asetat 4.RF1	$y = 0,1733x + 10,97$	0,946	0,973
Larutan uji ekstrak etil asetat 2.DP1	$y = 0,1172x + 19,71$	0,981	0,999
Larutan blanko sisplatin	$y = 0,1569x + 48,65$	0,993	0,984

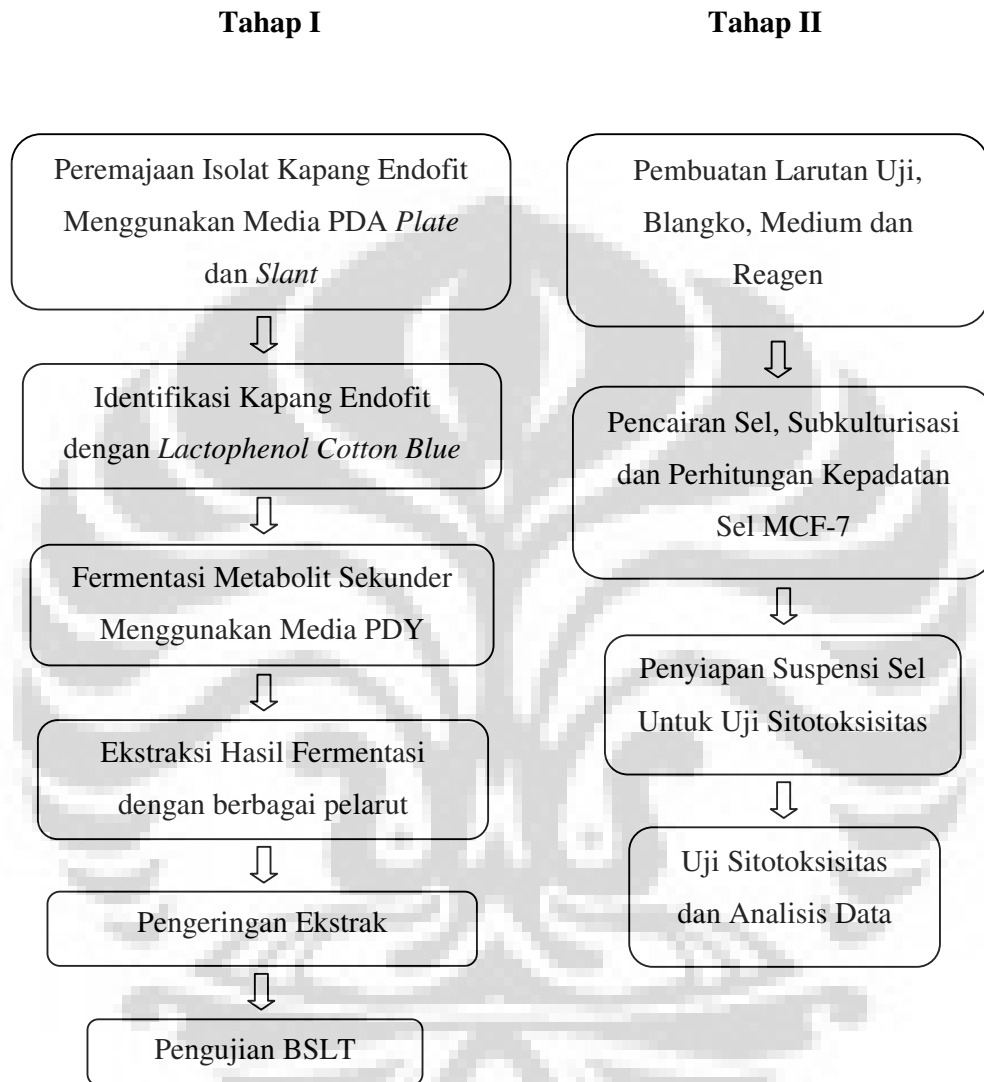
Tabel 4.22
Nilai LC₅₀ (µg/ml) yang Diperoleh melalui Perhitungan dengan Menggunakan
Persamaan Regresi Linier

Perlakuan	Nilai LC ₅₀ (µg/ml)
Larutan uji ekstrak air 4.RF1	407,95
Larutan uji ekstrak air 12.RF3	289,29
Larutan uji ekstrak air 6.AP2	206,18
Larutan uji ekstrak air 2.DP1	184,52
Larutan uji ekstrak butanol 4.RF1	247,36
Larutan uji ekstrak butanol 6.AP2	247,44
Larutan uji ekstrak etil asetat 4.RF1	225,22
Larutan uji ekstrak etil asetat 2.DP1	258,45
Larutan blanko sisplatin	8,60



LAMPIRAN

Lampiran 1
Bagan Desain Penelitian



Lampiran 2
Spesifikasi Sel MCF-7



Cell Biology

ATCC® Number: **HTB-22™** Price: **\$272.00**

Designations: MCF7

Depositors: CM McGrath

[Biosafety Level:](#) 1

Shipped: frozen

Medium & Serum: [See Propagation](#)

Growth Properties: adherent

Organism: *Homo sapiens* (human)
epithelial

Morphology:

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. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.

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

Receptors: estrogen receptor, expressed

Antigen Expression: Blood Type O; Rh+

DNA Profile (STR): Amelogenin: X
CSF1PO: 10

Universitas Indonesia

(lanjutan)

D13S317: 11
 D16S539: 11,12
 D5S818: 11,12
 D7S820: 8,9
 TH01: 6
 TPOX: 9,12
 vWA: 14,15

Cytogenetic Analysis:	modal number = 82; range = 66 to 87. The stemline chromosome numbers ranged from hypertriploidy to hypotetraploidy, with the 2S component occurring at 1%. There were 29 to 34 marker chromosomes per S metaphase; 24 to 28 markers occurred in at least 30% of cells, and generally one large submetacentric (M1) and 3 large subtelocentric (M2, M3, and M4) markers were recognizable in over 80% of metaphases. No DM were detected. Chromosome 20 was nullisomic and X was disomic.
Isoenzymes:	AK-1, 1 ES-D, 1-2 G6PD, B GLO-I, 1-2 PGM1, 1-2 PGM3, 1
Age:	69 years adult
Gender:	female
Ethnicity:	Caucasian
Comments:	The 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 (CO ₂), 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

(lanjutan)

medium for culture vessels of other sizes.

Note: if floating cells are present, it is recommended that they be 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 remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor.
3. Add 2.0 to 3.0 ml of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes). Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37C to facilitate dispersal.
4. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
5. 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.
6. Resuspend the cell pellet in fresh growth medium. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
7. 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): ATCC [30-2003](#)
recommended serum: ATCC [30-2020](#)
purified DNA: ATCC [HTB-22D](#)
purified RNA: ATCC HTB-22R
0.25% (w/v) Trypsin - 0.53 mM EDTA in Hank' BSS (w/o Ca++, Mg++): ATCC [30-2101](#)
Cell culture tested DMSO: ATCC [4-X](#)

References: 21405: Sugarman BJ, *et al.* Recombinant human tumor necrosis

(lanjutan)

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

(lanjutan)

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: 35-45, 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](#)

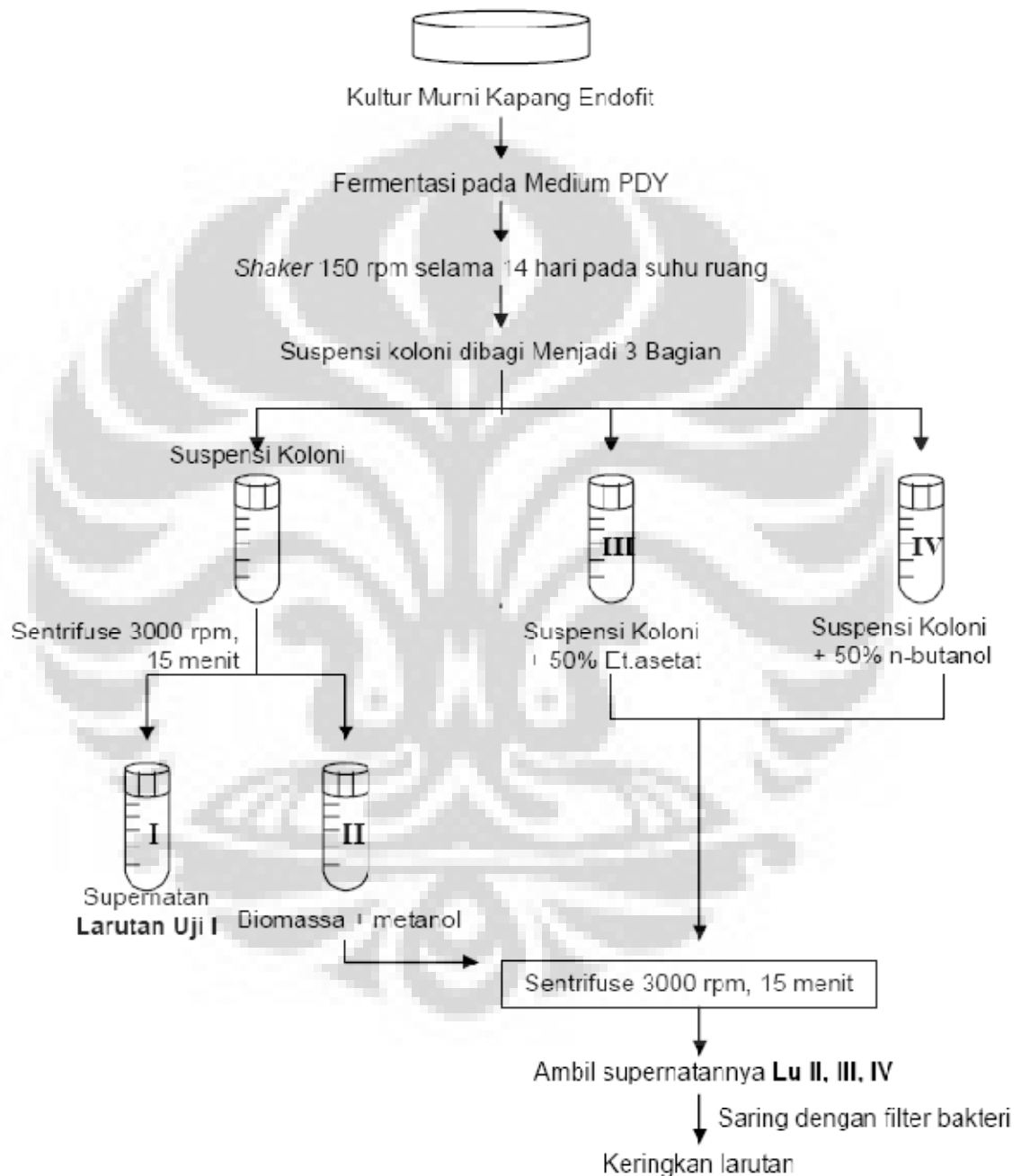
32568: Lee JH, *et al.* The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. J. Biol. Chem. 271: 4561-4568, 1996. PubMed: [8626812](#)

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 Fermentasi dan Ekstraksi



Lampiran 7
Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC₅₀ Ekstrak Air Isolat 2.DP1 terhadap
Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA
Probit 1.5)

Ekstrak Air Isolat 2.DP1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	12	0.4000	0.3793
100.0000	30	18	0.6000	0.5862
1000.0000	30	23	0.7667	0.7586
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 0.005
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Air Isolat 2.DP1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.001	0.000	0.118
LC/EC 50.00	39.333	2.051	151.808

Lampiran 5
Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC₅₀ Ekstrak Air Isolat 4.RF1 terhadap
Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA
Probit 1.5)

Ekstrak Air Isolat 4.RF1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	2	0.0667	0.0000
10.0000	30	13	0.4333	0.3905
100.0000	30	18	0.6000	0.5697
1000.0000	30	29	0.9667	0.9641
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 2.795
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Air Isolat 4.RF1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.092	0.000	0.859
LC/EC 50.00	30.492	8.010	70.470

Lampiran 6
Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC₅₀ Ekstrak Air Isolat 6.AP2 terhadap
Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA
Probit 1.5)

Ekstrak Air Isolat 6.AP2

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	17	0.5667	0.5515
100.0000	30	24	0.8000	0.7930
1000.0000	30	30	1.0000	1.0000
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 1.494
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Air Isolat 6.AP2

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.041	0.000	0.442
LC/EC 50.00	9.012	1.438	21.108

Lampiran 7

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC₅₀ Ekstrak Air Isolat 12.RF3 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Air Isolat 12.RF3

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	2	0.0667	0.0000
10.0000	30	13	0.4333	0.3904
100.0000	30	16	0.5333	0.4980
1000.0000	30	28	0.9333	0.9283
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 3.370
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Air 12.RF3

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.050	0.000	0.681
LC/EC 50.00	38.594	8.597	98.059

Lampiran 8

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Metanol Isolat 2.DP1 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Metanol Isolat 2.DP1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Adjusted for Controls
Control	30	2	0.0667	0.0000
10.0000	30	9	0.3000	0.2497
100.0000	30	13	0.4333	0.3926
1000.0000	30	19	0.6333	0.6070
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 0.051
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Metanol Isolat 2.DP1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.004	0.000	0.470
LC/EC 50.00	299.396	49.198	16678.391

Lampiran 9

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Metanol Isolat 4.RF1
terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C
(EPA Probit 1.5)

Ekstrak Metanol Isolat 4.RF1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	2	0.0667	0.0000
10.0000	30	13	0.4333	0.3926
100.0000	30	14	0.4667	0.4283
1000.0000	30	20	0.6667	0.6427
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 0.560
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

*
* NOTE
*
* Slope not significantly different from zero.
* LC/EC fiducial limits cannot be computed.
*

Ekstrak Metanol Isolat 4.RF1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.000		
LC/EC 50.00	125.014		

Lampiran 10
 Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC₅₀ Ekstrak Metanol Isolat 6.AP2
 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada 37°C
 (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Metanol Isolat 6.AP2

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	6	0.2000	0.1724
100.0000	30	10	0.3333	0.3103
1000.0000	30	15	0.5000	0.4828
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= -0.000
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Metanol Isolat 6.AP2

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.009	0.000	0.873
LC/EC 50.00	1248.780	235.028	55477060.000

Lampiran 11
 Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC₅₀ Ekstrak Metanol Isolat 12.RF3
 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C
 (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Metanol Isolat 12.RF3

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	7	0.2333	0.2076
100.0000	30	19	0.6333	0.6210
1000.0000	30	14	0.4667	0.4487

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 6.804
 Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level) = 3.841

*

WARNING

* The tabular chi-square value exceeds the calculated
 * chi-square value for heterogeneity. This is evidence that
 * the probit model may not be appropriate for these data.
 * The results reported for this data set may not be valid,
 * and should be interpreted with appropriate caution.
 *

*

NOTE

* Slope not significantly different from zero.
 * LC/EC fiducial limits cannot be computed.
 *

Ekstrak Metanol Isolat 12.RF3

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.000		
LC/EC 50.00	421.577		

Lampiran 12

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Butanol Isolat 2.DP1 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Butanol Isolat 2.DP1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	11	0.3667	0.3444
100.0000	30	12	0.4000	0.3789
1000.0000	30	21	0.7000	0.6894
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 1.420
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Butanol Isolat 2.DP1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.001	0.000	0.180
LC/EC 50.00	147.964	19.719	2226.902

Lampiran 13

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Butanol Isolat 4.RF1 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Esktrak Butanol Isolat 4.RF1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	12	0.4000	0.3793
100.0000	30	15	0.5000	0.4827
1000.0000	30	20	0.6667	0.6551
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 0.093
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Esktrak Butanol Isolat 4.RF1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.000	0.000	0.047
LC/EC 50.00	90.620	0.031	10522.317

Lampiran 14

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Butanol Isolat 6.AP2 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Butanol Isolat 6.AP2

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	16	0.5333	0.5171
100.0000	30	23	0.7667	0.7585
1000.0000	30	29	0.9667	0.9655
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 0.409
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Butanol Isolat 6.AP2

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.016	0.000	0.280
LC/EC 50.00	10.229	1.207	26.580

Lampiran 15

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Butanol Isolat 12.RF3 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Butanol Isolat 12.RF3

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	12	0.4000	0.3788
100.0000	30	11	0.3667	0.3443
1000.0000	30	21	0.7000	0.6894
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 2.711
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Butanol Isolat 12.RF3

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.000	0.000	0.115
LC/EC 50.00	153.932	12.933	8445.150

Lampiran 16

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Etil Asetat Isolat 2.DP1 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Etil Asetat Isolat 2.DP1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	15	0.5000	0.4828
100.0000	30	16	0.5333	0.5172
1000.0000	30	17	0.5667	0.5517
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= -0.000
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

 * NOTE
 *
 * Slope not significantly different from zero.
 * LC/EC fiducial limits cannot be computed.
 *

Ekstrak Etil Asetat Isolat 2.DP1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.000		
LC/EC 50.00	31.599		

Lampiran 17

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Etil Asetat Isolat 4.RF1 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Etil Asetat Isolat 4.RF1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	16	0.5333	0.5172
100.0000	30	20	0.6667	0.6552
1000.0000	30	24	0.8000	0.7931
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 0.010
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

Ekstrak Etil Asetat Isolat 4.RF1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.000	0.000	0.018
LC/EC 50.00	8.183	0.000	48.823

Lampiran 18

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Etil Asetat Isolat 6.AP2 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Etil Asetat Isolat 6.AP2

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Adjusted for Controls
Control	30	1	0.0333	0.0000
10.0000	30	13	0.4333	0.4138
100.0000	30	17	0.5667	0.5517
1000.0000	30	16	0.5333	0.5173
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 0.558
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

 *
 * NOTE
 *
 * Slope not significantly different from zero.
 * LC/EC fiducial limits cannot be computed.
 *

Ekstrak Etil Asetat Isolat 6.AP2

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.000		
LC/EC 50.00	129.446		

Lampiran 19

Analisis Probit untuk Mengetahui Nilai LC_{50} Ekstrak Etil Asetat Isolat 12.RF3 terhadap Larva *Artemia salina* setelah Inkubasi selama 24 Jam pada Suhu 37°C (EPA Probit 1.5)

Ekstrak Etil Asetat 12.RF3

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	30	2	0.0667	0.0000
10.0000	30	2	0.0667	0.0087
100.0000	30	7	0.2333	0.1857
1000.0000	30	10	0.3333	0.2919
Chi - Square for Heterogeneity (calculated)				= 0.848
Chi - Square for Heterogeneity (tabular value at 0.05 level)				= 3.841

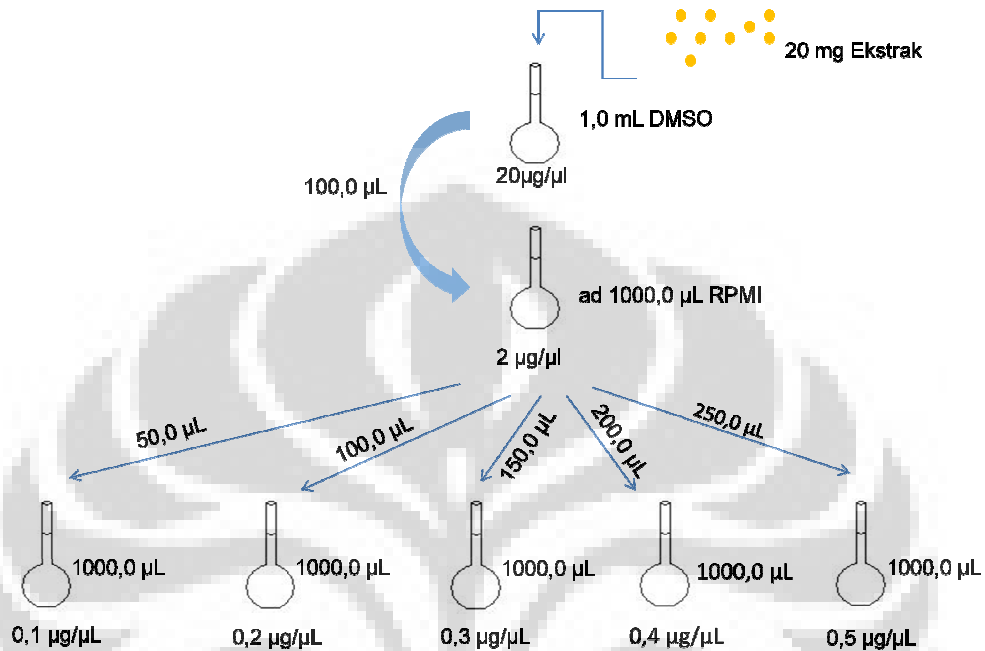
 *
 * NOTE
 *
 * Slope not significantly different from zero.
 * LC/EC fiducial limits cannot be computed.
 *

Ekstrak Etil Asetat 12.RF3

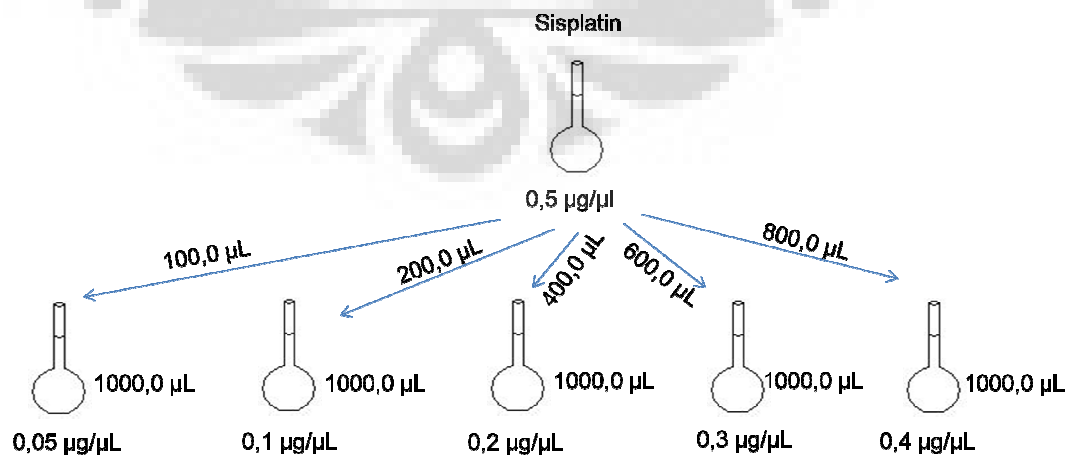
Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1.00	1.010		
LC/EC 50.00	6068.269		

Lampiran 20
Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji



Lampiran 21
Perhitungan Konsentrasi Larutan Blanko Sisplatin



Lampiran 22
Perhitungan Kepadatan Sel

- Jumlah sel yang terdapat dalam keempat bidang besar sebanyak 71 sel.
Rata-rata jumlah sel tiap bidang = $\frac{71}{4} = 17,75$
- Setiap bidang besar pada hemositometer memiliki volume 10^{-4} ml.
- Faktor pengenceran = 10

$$\begin{aligned} \text{Sehingga jumlah sel/ml} &= \frac{\text{rata-rata jumlah sel} \times \text{faktor pengenceran}}{10^{-4}} \\ &= \frac{17,75 \times 10}{10^{-4}} \\ &= 1,75 \times 10^6 \text{ sel/ml} \end{aligned}$$

Lampiran 23
Perhitungan Penyediaan Suspensi Sel untuk Pengujian

Jumlah sel yang diinginkan adalah 6×10^4 sel/ml, maka suspensi sel uji yang dibutuhkan untuk mengisi 96 sumur adalah:

$$P_1 \times V_1 = P_2 \times V_2$$

$$P_1 = \text{Jumlah kepadatan sel yang telah dihitung} = 1,75 \times 10^6 \text{ sel/ml}$$

$$V_1 = \text{Volume yang dibutuhkan}$$

$$P_2 = \text{Jumlah kepadatan sel yang diinginkan dalam sumur uji} = 6 \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

$$V_2 = \text{Volume total sumur uji} = 0,1 \text{ ml} \times 100 \text{ sumur} = 10 \text{ ml}$$

$$P_1 \times V_1 = P_2 \times V_2$$

$$1,75 \times 10^6 \text{ sel/ml} \times V_1 = 6 \times 10^4 \text{ sel/ml} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,34 \text{ ml}$$

$$V_1 = 34 \mu\text{l}$$

Sehingga volume total medium RPMI yang mengandung 20% FCS yang dibutuhkan adalah $10 \text{ ml} - 0,34 \text{ ml} = 9,66 \text{ ml}$

Lampiran 24
Pemetaan pada Pelat Kultur Jaringan 96 Sumuran

H	B	F	E	D	C	B	A	
8 (50)	7 (50)	6 (50)	5 (50)	4 (50)	3 (50)	2 (50)	1 (50)	1
8 (50)	7 (50)	6 (50)	5 (50)	4 (50)	3 (50)	2 (50)	1 (50)	2
8 (100)	7 (100)	6 (100)	5 (100)	4 (100)	3 (100)	2 (100)	1 (100)	3
8 (100)	7 (100)	6 (100)	5 (100)	4 (100)	3 (100)	2 (100)	1 (100)	4
8 (150)	7 (150)	6 (150)	5 (150)	4 (150)	3 (150)	2 (150)	1 (150)	5
8 (150)	7 (150)	6 (150)	5 (150)	4 (150)	3 (150)	2 (150)	1 (150)	6
8 (200)	7 (200)	6 (200)	5 (200)	4 (200)	3 (200)	2 (200)	1 (200)	7
8 (200)	7 (200)	6 (200)	5 (200)	4 (200)	3 (200)	2 (200)	1 (200)	8
8 (250)	7 (250)	6 (250)	5 (250)	4 (250)	3 (250)	2 (250)	1 (250)	9
8 (250)	7 (250)	6 (250)	5 (250)	4 (250)	3 (250)	2 (250)	1 (250)	10
+	+	+	+	+	DMSO 2%	Sel	-	11
+	+	+	+	+	DMSO 2%	Sel	-	12

Keterangan:

1. Sumur A₁ – A₁₀ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan uji 1 dalam berbagai konsentrasi:
 - a. A₁ & A₂; larutan uji 1 konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - b. A₃ & A₄; larutan uji 1 konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - c. A₅ & A₆; larutan uji 1 konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl
 - d. A₇ & A₈; larutan uji 1 konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl
 - e. A₉ & A₁₀; larutan uji 1 konsentrasi 0,5 µg/µl; konsentrasi akhir 250 µg/µl
2. Sumur B₁ – B₁₀ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan uji 2 dalam berbagai konsentrasi:
 - a. B₁ & B₂; larutan uji 2 konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - b. B₃ & B₄; larutan uji 2 konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - c. B₅ & B₆; larutan uji 2 konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl
 - d. B₇ & B₈; larutan uji 2 konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl
 - e. B₉ & B₁₀; larutan uji 2 konsentrasi 0,5 µg/µl; konsentrasi akhir 250 µg/µl
3. Sumur C₁ – C₁₀ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan uji 3 dalam berbagai konsentrasi:
 - a. C₁ & C₂; larutan uji 3 konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - b. C₃ & C₄; larutan uji 3 konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - c. C₅ & C₆; larutan uji 3 konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl

(lanjutan)

- d. C₇ & C₈; larutan uji 3 konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl
- e. C₉ & C₁₀; larutan uji 3 konsentrasi 0,5 µg/µl; konsentrasi akhir 250 µg/µl
4. Sumur D₁ – D₁₀ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan uji 4 dalam berbagai konsentrasi:
 - a. D₁ & D₂; larutan uji 4 konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - b. D₃ & D₄; larutan uji 4 konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - c. D₅ & D₆; larutan uji 4 konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl
 - d. D₇ & D₈; larutan uji 4 konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl
 - e. D₉ & D₁₀; larutan uji 4 konsentrasi 0,5 µg/µl; konsentrasi akhir 250 µg/µl
5. Sumur E₁ – E₁₀ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan uji 5 dalam berbagai konsentrasi:
 - a. E₁ & E₂; larutan uji 5 konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - b. E₃ & E₄; larutan uji 5 konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - c. E₅ & E₆; larutan uji 5 konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl
 - d. E₇ & E₈; larutan uji 5 konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl
 - e. E₉ & E₁₀; larutan uji 5 konsentrasi 0,5 µg/µl; konsentrasi akhir 250 µg/µl
6. Sumur F₁ – F₁₀ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan uji 6 dalam berbagai konsentrasi:
 - a. F₁ & F₂; larutan uji 6 konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - b. F₃ & F₄; larutan uji 6 konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - c. F₅ & F₆; larutan uji 6 konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl
 - d. F₇ & F₈; larutan uji 6 konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl
 - e. F₉ & F₁₀; larutan uji 6 konsentrasi 0,5 µg/µl; konsentrasi akhir 250 µg/µl
7. Sumur G₁ – G₁₀ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan uji 7 dalam berbagai konsentrasi:
 - a. G₁ & G₂; larutan uji 7 konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - b. G₃ & G₄; larutan uji 7 konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - c. G₅ & G₆; larutan uji 7 konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl
 - d. G₇ & G₈; larutan uji 7 konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl
 - e. G₉ & G₁₀; larutan uji 7 konsentrasi 0,5 µg/µl; konsentrasi akhir 250 µg/µl
8. Sumur H₁ – H₁₀ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan uji 8 dalam berbagai konsentrasi:
 - a. H₁ & H₂; larutan uji 8 konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - b. H₃ & H₄; larutan uji 8 konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - c. H₅ & H₆; larutan uji 8 konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl
 - d. H₇ & H₈; larutan uji 8 konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl
 - e. H₉ & H₁₀; larutan uji 8 konsentrasi 0,5 µg/µl; konsentrasi akhir 250 µg/µl
9. Sumur B₁₁ dan B₁₂ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl RPMI 1640
10. Sumur C₁₁ dan C₁₂ berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl DMSO 2%
11. Sumur E_{11 & 12} – H_{11 & 12} berisi 100 µl suspensi sel dan 100 µl larutan blanko sisplatin dalam berbagai konsentrasi:
 - a. D₁₁ & D₁₂; sisplatin konsentrasi 0,05 µg/µl; konsentrasi akhir 25 µg/µl
 - b. E₁₁ & E₁₂; sisplatin konsentrasi 0,1 µg/µl; konsentrasi akhir 50 µg/µl
 - c. F₁₁ & F₁₂; sisplatin konsentrasi 0,2 µg/µl; konsentrasi akhir 100 µg/µl
 - d. G₁₁ & G₁₂; sisplatin konsentrasi 0,3 µg/µl; konsentrasi akhir 150 µg/µl
 - e. H₁₁ & H₁₂; sisplatin konsentrasi 0,4 µg/µl; konsentrasi akhir 200 µg/µl

50

Lampiran 25

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 : H_0 = Data persentase kematian sel MCF-7 tidak
terdistribusi secara normal

H_1 = Data persentase kematian sel MCF-7 terdistribusi
secara normal

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H_0 ditolak jika signifikansi > 0,05

Hasil :

Tests of Normality

Larutan Uji	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi Air 4.RF1	.179	5	.200*	.935	5	.633
Air 12.RF3	.180	5	.200*	.985	5	.958
Air 6.AP2	.257	5	.200*	.918	5	.518
Air 2.DP1	.231	5	.200*	.945	5	.705
Butanol 4.RF1	.154	5	.200*	.991	5	.984
Butanol 6.AP2	.211	5	.200*	.968	5	.863
Etil Asetat 4.RF1	.192	5	.200*	.935	5	.631
Etil Asetat 2.DP1	.162	5	.200*	.978	5	.925
Blanko Sisplatin	.142	5	.200*	.993	5	.990

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

a. Lilliefors Significance Correction

Kesimpulan : Nilai signifikansi data semua perlakuan > 0,05 maka H_0
ditolak, H_1 diterima sehingga data persentase kematian
sel dinyatakan terdistribusi secara normal.

Lampiran 26

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 : H_0 = Data persentase kematian sel MCF-7 tidak homogen
 H_1 = Data persentase kematian sel MCF-7 homogen

Level Signifikansi : 0,025

Kriteria Pengujian : H_0 ditolak dan H_1 diterima jika signifikansi $> 0,05$

Hasil :

Test of Homogeneity of Variances

Konsentrasi			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.595	8	36	.161

yKesimpulan : Nilai signifikansi data semua perlakuan $> 0,05$ maka H_0
ditolak sehingga data persentase kematian sel dinyatakan
homogen.

Lampiran 27

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 : H_0 = Tidak ada perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan
 H_1 = Ada perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan
- Level Signifikansi : 0,05
- Kriteria Pengujian : H_0 ditolak dan H_1 diterima jika signifikansi < 0,05
- Hasil :

ANOVA

Konsentrasi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3766.960	8	470.870	2.941	.012
Within Groups	5763.832	36	160.106		
Total	9530.793	44			

- Kesimpulan : Nilai signifikansi perlakuan < 0,05 maka H_0 ditolak sehingga terdapat perbedaan bermakna pada data persentase sel MCF-7 antar perlakuan.

Lampiran 28

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 : H_0 = Tidak ada perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan
 H_1 = Ada perbedaan bermakna pada data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H_0 ditolak dan H_1 diterima jika signifikansi < 0,05

Hasil :

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Konsentrasi

LSD

(I) Larutan Uji	(J) Larutan Uji	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Air 4.RF1	Air 12.RF3	-1.66000	8.00266	.837	-14.5701	17.8901
	Air 6.AP2	-1.51200	8.00266	.851	-17.7421	14.7181
	Air 2.DP1	-6.95800	8.00266	.390	-23.1881	9.2721
	Butanol 4.RF1	-.92600	8.00266	.909	-17.1561	15.3041
	Butanol 6.AP2	-.48800	8.00266	.952	-16.7181	15.7421
	Etil Asetat 4.RF1	-1.56200	8.00266	.846	-17.7921	14.6681
	Etil Asetat 2.DP1	-1.88000	8.00266	.816	-18.1101	14.3501
	Blanko Sisplatin	-29.71800*	8.00266	.001	-45.9481	-13.4879
Air 12.RF3	Air 4.RF1	-1.66000	8.00266	.837	-17.8901	14.5701
	Air 6.AP2	-3.17200	8.00266	.694	-19.4021	13.0581
	Air 2.DP1	-8.61800	8.00266	.289	-24.8481	7.6121
	Butanol 4.RF1	-2.58600	8.00266	.748	-18.8161	13.6441
	Butanol 6.AP2	-2.14800	8.00266	.790	-18.3781	14.0821
	Etil Asetat 4.RF1	-3.22200	8.00266	.690	-19.4521	13.0081
	Etil Asetat 2.DP1	-3.54000	8.00266	.661	-19.7701	12.6901
	Blanko Sisplatin	-31.37800*	8.00266	.000	-47.6081	-15.1479

(lanjutan)

Air 6.AP2	Air 4.RF1	1.51200	8.00266	.851	-14.7181	17.7421
	Air 12.RF3	3.17200	8.00266	.694	-13.0581	19.4021
	Air 2.DP1	-5.44600	8.00266	.501	-21.6761	10.7841
	Butanol 4.RF1	.58600	8.00266	.942	-15.6441	16.8161
	Butanol 6.AP2	1.02400	8.00266	.899	-15.2061	17.2541
	Etil Asetat 4.RF1	-.05000	8.00266	.995	-16.2801	16.1801
	Etil Asetat 2.DP1	-.36800	8.00266	.964	-16.5981	15.8621
	Blanko Sisplatin	-28.20600*	8.00266	.001	-44.4361	-11.9759
Air 2.DP1	Air 4.RF1	6.95800	8.00266	.390	-9.2721	23.1881
	Air 12.RF3	8.61800	8.00266	.289	-7.6121	24.8481
	Air 6.AP2	5.44600	8.00266	.501	-10.7841	21.6761
	Butanol 4.RF1	6.03200	8.00266	.456	-10.1981	22.2621
	Butanol 6.AP2	6.47000	8.00266	.424	-9.7601	22.7001
	Etil Asetat 4.RF1	5.39600	8.00266	.504	-10.8341	21.6261
	Etil Asetat 2.DP1	5.07800	8.00266	.530	-11.1521	21.3081
	Blanko Sisplatin	-22.76000*	8.00266	.007	-38.9901	-6.5299
Butanol 4.RF1	Air 4.RF1	.92600	8.00266	.909	-15.3041	17.1561
	Air 12.RF3	2.58600	8.00266	.748	-13.6441	18.8161
	Air 6.AP2	-.58600	8.00266	.942	-16.8161	15.6441
	Air 2.DP1	-6.03200	8.00266	.456	-22.2621	10.1981
	Butanol 6.AP2	.43800	8.00266	.957	-15.7921	16.6681
	Etil Asetat 4.RF1	-.63600	8.00266	.937	-16.8661	15.5941
	Etil Asetat 2.DP1	-.95400	8.00266	.906	-17.1841	15.2761
	Blanko Sisplatin	-28.79200*	8.00266	.001	-45.0221	-12.5619
Butanol 6.AP2	Air 4.RF1	.48800	8.00266	.952	-15.7421	16.7181
	Air 12.RF3	2.14800	8.00266	.790	-14.0821	18.3781
	Air 6.AP2	-1.02400	8.00266	.899	-17.2541	15.2061
	Air 2.DP1	-6.47000	8.00266	.424	-22.7001	9.7601
	Butanol 4.RF1	-.43800	8.00266	.957	-16.6681	15.7921
	Etil Asetat 4.RF1	-1.07400	8.00266	.894	-17.3041	15.1561
	Etil Asetat 2.DP1	-1.39200	8.00266	.863	-17.6221	14.8381
	Blanko Sisplatin	-29.23000*	8.00266	.001	-45.4601	-12.9999
Etil Asetat 4.RF1	Air 4.RF1	1.56200	8.00266	.846	-14.6681	17.7921
	Air 12.RF3	3.22200	8.00266	.690	-13.0081	19.4521
	Air 6.AP2	.05000	8.00266	.995	-16.1801	16.2801
	Air 2.DP1	-5.39600	8.00266	.504	-21.6261	10.8341
	Butanol 4.RF1	.63600	8.00266	.937	-15.5941	16.8661
	Butanol 6.AP2	1.07400	8.00266	.894	-15.1561	17.3041
	Etil Asetat 2.DP1	-.31800	8.00266	.969	-16.5481	15.9121
	Blanko Sisplatin	-28.15600*	8.00266	.001	-44.3861	-11.9259

(lanjutan)

Etil Asetat 2.DP1	Air 4.RF1	1.88000	8.00266	.816	-14.3501	18.1101
	Air 12.RF3	3.54000	8.00266	.661	-12.6901	19.7701
	Air 6.AP2	.36800	8.00266	.964	-15.8621	16.5981
	Air 2.DP1	-5.07800	8.00266	.530	-21.3081	11.1521
	Butanol 4.RF1	.95400	8.00266	.906	-15.2761	17.1841
	Butanol 6.AP2	1.39200	8.00266	.863	-14.8381	17.6221
	Etil Asetat 4.RF1	.31800	8.00266	.969	-15.9121	16.5481
	Blanko Sisplatin	-27.83800*	8.00266	.001	-44.0681	-11.6079
Blanko Sisplatin	Air 4.RF1	29.71800*	8.00266	.001	13.4879	45.9481
	Air 12.RF3	31.37800*	8.00266	.000	15.1479	47.6081
	Air 6.AP2	28.20600*	8.00266	.001	11.9759	44.4361
	Air 2.DP1	22.76000*	8.00266	.007	6.5299	38.9901
	Butanol 4.RF1	28.79200*	8.00266	.001	12.5619	45.0221
	Butanol 6.AP2	29.23000*	8.00266	.001	12.9999	45.4601
	Etil Asetat 4.RF1	28.15600*	8.00266	.001	11.9259	44.3861
	Etil Asetat 2.DP1	27.83800*	8.00266	.001	11.6079	44.0681

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

Kesimpulan : Dibandingkan dengan blanko sisplatin, setiap kelompok perlakuan memiliki nilai signifikansi $< 0,05$ sehingga terdapat perbedaan bermakna pada data persentase sel MCF-7 antar kelompok perlakuan dengan blanko sisplatin.