

**UJI AKTIVITAS FRAKSI N-HEKSANA EKSTRAK ETANOL
DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L.) SEBAGAI SEDIAAN
NANOPARTIKEL DALAM BENTUK *Self-Nano Emulsifying
Drug Delivery System* (SNEDDS) TERHADAP
SEL T47D DAN MCF-7**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada Program Studi Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia
Yogyakarta



Diajukan oleh:

ELDIVA ILKARIZKIA AYUSTRA

No. Mahasiswa : 16612057

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2020**

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrobbil'alamin...

“Allah akan meninggikan derajat orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang mempunyai ilmu pengetahuan beberapa derajat.”

(Al-Mujadilah: 11)

Alhamdulillahirobbil'alamin..

Pertama ku panjatkan syukur kepada Allah SWT

Yang telah membekali ku dengan ilmu

Serta memperkenalkan dengan orang-orang hebat dimasa perkuliahan

Hingga saat ini bisa menyelesaikan

gelar Sarjana Sains dengan segala skenario terbaik-Nya

Kupersembahkan karya sederhana hasil saya ketika kuliah untuk kalian..

Teruntuk yang paling istimewa ayah dan ibu yang selalu mendo'akan, memberikan semangat, nasihat dan dukungan yang luar biasa untukku, untuk adikku dan seluruh keluargaku tersayang, dosen pembimbing skripsi bapak Nurcahyo dan bu Amri yang senantiasa memberikan bimbingannya dan motivasinya, serta sahabat-sahabat saya yang ku sayangi anggota cek group sebelah dan idola cilik yang menemaniku berproses dari awal perkuliahan hingga saat ini, dan untuk teman-teman Kimia B 2016 yang telah berjuang bersama. Semoga kita semua kelak menjadi orang yang sukses dan berguna bagi Nusa, Bangsa dan Agama, Aamiin..

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat, hidayah, serta inayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Fraksi N-heksana Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Sebagai Sediaan Nanopartikel Dalam Bentuk *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) Terhadap Sel T47D dan MCF-7”** ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhai Allah SWT.

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat akademis yang harus ditempuh untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta. Seiring dengan terselesaikannya penyusunan skripsi ini, dengan penuh kesungguhan dan kerendahan hati, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan kesehatan jasmani dan rohani sehingga saya dapat menyusun skripsi ini dengan lancar hingga selesai.
2. Orang tua dan keluarga yang selalu memberikan doa, dukungan, nasihat dan semangat dalam penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
4. Ibu Prof. Is Fatimah selaku Ketua Jurusan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
5. Bapak Dr. Dwiwarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
6. Bapak Nurcahyo Iman Prakoso, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan jarak jauh, pengarahan, serta berbagai masukan dalam penyusunan skripsi.

7. Ibu Amri Setyawati, S.Si., M.Sc selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak memberikan arahan dan masukan dalam penyusunan skripsi ini.
8. Teman-teman terbaik selama perkuliahan Ridwan, Andri, Kurnia, Erdie, Rendi, Reliska, Amalia, Elfara, Tika yang telah saling memberikan dukungan, do'a dan semangatnya dalam segala hal.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan keterbatasan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun sehingga berguna bagi penulis untuk menyempurnakan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis maupun bagi pembaca.

Wassalam'alaikum warahmatullahi wabarakatuh



Yogyakarta, 18 Juni 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL	x
INTISARI	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Perkembangan Kanker Payudara.....	7
2.3 Perkembangan <i>Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System</i> (SNEDDS).....	12
BAB III DASAR TEORI	16
3.1 Tanaman Jambu Biji (<i>Psidium guajava</i> L.).....	16
3.2 Kanker Payudara.....	18
3.3 Sel T47D.....	18
3.4 Sel MCF-7	19
3.5 Ekstraksi	19
3.6 Fraksinasi.....	20
3.7 Penapisan Fitokimia	21
3.8 Teknologi Nanopartikel.....	21
3.9 Karakterisasi Nanopartikel	23
3.9.1 Ukuran dan distribusi partikel	23
3.9.2 Zeta potensial.....	23

3.10 Uji Sitotoksisitas.....	24
3.11 Metode MTT.....	24
3.12 ELISA Reader	25
3.13 <i>Liquid Chromatograph- Mass Spectrometry (LC-MS/MS)</i>	26
3.14 <i>Mass Spectroscopy (MS)</i>	29
3.15 Protokol Kurva Kalibrasi.....	30
3.16.1 Pembuatan kurva kalibrasi (JoVe, 2019).....	30
3.17 Hipotesis	31
BAB IV METODE PENELITIAN	32
4.1 Waktu dan Tempat Lokasi Penelitian.....	32
4.2 Alat dan Bahan	32
4.2.1 Alat	32
4.2.2 Bahan.....	32
4.3 Identifikasi Variabel	33
4.4 Tahapan Penelitian.....	33
4.4.1 Uji determinasi	33
4.4.2 Preparasi daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.).....	33
4.4.3 Tahap ekstraksi dengan metode maserasi.....	34
4.4.4 Fraksinasi.....	34
4.4.5 Analisis penapisan fitokimia	34
4.4.6 Karakterisasi menggunakan <i>Particle Size Analyzer (PSA)</i>	35
4.4.7 Uji aktivitas antikanker secara <i>in vitro</i> (CCRC, 2009).....	36
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	40
5.1 Uji Determinasi.....	40
5.2 Persiapan Sampel.....	40
5.3 Ekstraksi Daun Jambu biji.....	40
5.4 Fraksinasi.....	41
5.5 Analisis Penapisan Fitokimia	42
4.5.1 Analisis Hasil Penapisan Fitokimia.....	42
4.5.2 Uji alkaloid	43

4.5.3 Uji flavonoid.....	44
4.5.4 Uji terpenoid.....	45
4.5.5 Uji tanin/polifenol.....	46
5.6 Karakterisasi <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA).....	47
5.7 Uji Aktivitas Antikanker Secara <i>In Vitro</i> Dengan Metode MTT	49
5.8 Hasil pengujian aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel T47D	56
5.9 Hasil pengujian aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel MCF-7.....	57
5.10 Hasil Uji Sitotoksisitas Capryoll, Tween 20 dan PEG Terhadap Sel T47D, MCF-7 dan Sel Vero.....	58
5.11 Hasil Sitotoksisitas Terhadap Sel Vero	59
5.12 Analisis Kandungan Senyawa dalam Fraksi N-Heksana Menggunakan LC- MS/MS.....	64
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	69
6.1 Kesimpulan.....	69
6.2 Saran	69
DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN.....	79

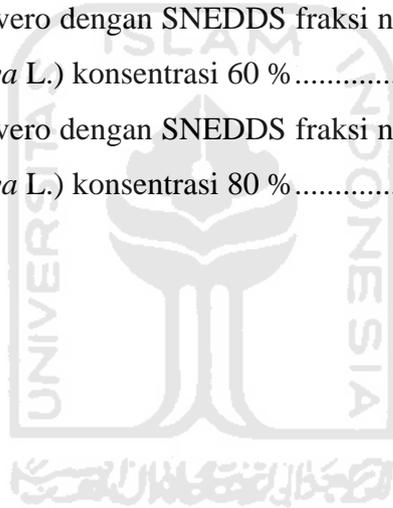
DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Berbagai kasus kanker di Indonesia (WHO, 2018)	1
Gambar 2. Daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.)	16
Gambar 3. Morfologi sel T47D (CCRC, 2009).....	18
Gambar 4. Morfologi sel MCF-7 (CCRC, 2009)	19
Gambar 5. Ilustrasi interaksi nanopartikel dalam tubuh (Martien dkk., 2012) ...	22
Gambar 6. Ilustrasi konsep penghantaran obat auto nanoemulsifikasi (Martien dkk., 2012)	22
Gambar 7. Reaksi reduksi MTT menjadi Formazan (Mosmann, 1983).....	25
Gambar 8. ELISA reader	26
Gambar 9. Desorpsi ion dari larutan (Ginting, 2012).....	28
Gambar 10. Mekanisme <i>electrospray ionization</i> (Ho dkk., 2003).....	30
Gambar 11. Reaksi alkaloid dengan reagen <i>Dragendorff</i> (Miroslav, 1971)	44
Gambar 12. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat	45
Gambar 13. Reaksi uji terpenoid dengan pereaksi <i>Liebermann Burchard</i>	46
Gambar 14. Morfologi Sel T47D dan MCF-7 sebelum dilakukan <i>treatment</i>	51
Gambar 15. Morfologi sel T47D dan MCF-7 setelah dilakukan <i>treatment</i>	52
Gambar 16. Morfologi sel vero (a) sebelum <i>treatment</i> dan (b) sesudah <i>treatment</i>	62
Gambar 17. Kromatogram fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) dengan LC-MS/MS	65
Gambar 18. Spektrum massa fraksi n-heksana daun jambu biji dengan waktu retensi (a) 8,86 (b) 9,19 (c) 9,37 (d) 10,46 (e) 10,72 (f) 11,24.	66
Gambar 19. Struktur senyawa fraksi n-heksana daun jambu biji (a) <i>3-Tert-butyl-4-methoxyphenol</i> (b) <i>petasilone</i> (c) <i>hyptatic acid</i> (d) <i>stigmastan-3,6-dione</i>	67

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) dengan LC-MS/MS.....	11
Tabel 2. Variabel penelitian	33
Tabel 3. Hasil maserasi serbuk daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.).....	41
Tabel 4. Hasil fraksinasi daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.).....	42
Tabel 5. Hasil uji fitokimia ekstrak daun jambu biji fraksi n-heksana.....	42
Tabel 6. Kandungan senyawa dalam ekstrak etanol daun <i>Psidium guajava</i> L. (Adeyemi dkk., 2009).....	43
Tabel 7. Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji.....	47
Tabel 8. Nilai IC ₅₀ uji aktivitas antikanker.....	54
Tabel 9. Hasil uji aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel T47D.....	56
Tabel 10. Hasil uji aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel MCF-7.....	57
Tabel 11. Tabel sitotoksitas Capryoll, Tween dan PEG terhadap sel T47D, MCF-7 dan sel Vero	59
Tabel 12. Hasil uji aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel Vero.....	59
Tabel 13. Nilai IC ₅₀ sel vero.....	60
Tabel 14. Nilai SI (<i>Selectivity Indeks</i>) hasil uji sitotoksitas	61
Tabel 15. Hubungan konsentrasi, ukuran partikel dan nilai IC ₅₀ terhadap sel T47D, MCF-7 dan Vero	62
Tabel 16. Senyawa yang teridentifikasi dalam fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) dengan LC-MS/MS	67
Tabel 17. Absorbansi sel kanker payudara T47D SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 40%	82
Tabel 18. Absorbansi sel kanker payudara T47D SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 60%	83

Tabel 19. Absorbansi sel kanker payudara T47D SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 80%	84
Tabel 20. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 40 %	85
Tabel 21. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 60 %	86
Tabel 22. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 80 %	87
Tabel 23. Absorbansi sel vero dengan SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 40 %	88
Tabel 24. Absorbansi sel vero dengan SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 60 %	89
Tabel 25. Absorbansi sel vero dengan SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) konsentrasi 80 %	90



**Uji Aktivitas Fraksi n-Heksana Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji
(*Psidium guajava* L.) Sebagai Sediaan Nanopartikel Dalam Bentuk
Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)
Terhadap Sel T47D dan MCF-7**

Eldiva Ilkarizkia Ayustra
16612057

INTISARI

Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki banyak potensi tetapi masih belum banyak dimanfaatkan. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antikanker payudara dari fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji sebagai sediaan nanopartikel dalam bentuk *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) terhadap sel T47D dan MCF-7. Pertama-tama proses ekstraksi daun jambu biji dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana dan dilakukan uji fitokimia. Pembuatan nanopartikel fraksi n-heksana menggunakan metode SNEDDS. Sediaan nanopartikel yang dihasilkan dianalisis ukuran partikel, *polydispers index*, dan zeta potensialnya. Sediaan nanopartikel dengan metode SNEDDS dengan perbandingan minyak:surfaktan:ko-surfaktan (10:70:20) dengan konsentrasi ekstrak 80% memiliki ukuran yang paling kecil sebesar 335,46 nm. Sediaan nanopartikel dilakukan uji aktivitas secara in vitro menggunakan sel T47D dan MCF-7 serta uji sitotoksitas terhadap sel vero. Konsentrasi larutan uji yang digunakan yaitu 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 µg/mL. Nilai IC₅₀ nanoemulsi fraksi n-heksana 40%; 60%; dan 80% berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 5,988; 8,404; dan 9,323 µg/mL. Nilai IC₅₀ nanoemulsi fraksi n-heksana 40%; 60%; dan 80% berturut-turut terhadap sel MCF-7 sebesar 154,539; 140,393 dan 109,414 µg/mL. Nilai IC₅₀ nanoemulsi fraksi n-heksana 40%; 60%; dan 80% berturut-turut terhadap sel Vero sebesar 147,922; 137,408 dan 141,38 µg/mL. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa nanoemulsi fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji memiliki aktivitas, efektivitas, serta selektivitas sebagai antikanker. Kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana yaitu senyawa *stigmastan-3,6-dione* dengan berat molekul 429,3729 m/z .

Kata kunci : Fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), antikanker, SNEDDS, sel T47D dan MCF-7.

**Activity Test of n-Hexane Fraction of Guava Leaf (*Psidium guajava* L.)
Ethanol Extract as Nanoparticle Preparation In The Form of
Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)
Against Cells T47D and MCF-7**

Eldiva Ilkarizkia Ayustra
16612057

ABSTRACT

Guava leaf (*Psidium guajava* L.) is one of the plants that has a lot of potential but is still not widely used. In this study, an activity of breast anticancer was carried out from n-hexane fraction of guava leaves ethanol extract as nanoparticle preparations in the form of *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) against T47D and MCF-7 cells. First the process of extracting guava leaf is done using maceration method with 96% ethanol solvent, then fractionation using n-hexane solvent and phytochemical tests. Preparation of n-hexane fraction nanoparticles using the SNEDDS method. The nanoparticle preparation produced were analyzed for particle size, polydispersity index, and potential zeta. The nanoparticle preparation using SNEDDS method with the ratio of oil: surfactant: co-surfactant (10:70:20) with 80% extract concentration has the smallest size of 335,46 nm. The nanoparticles were tested in vitro using T47D and MCF-7 cells and cytotoxicity test for vero cells. The concentration of the test solution used is 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 and 15,625 µg/mL. IC₅₀ value of n-hexane fraction nanoemulsion 40%; 60%; and 80% in a row against T47D cells by 5,988; 8,404; and 9,323 µg/mL. IC₅₀ value of n-hexane fraction nanoemulsion 40%; 60%; and 80% in a row against MCF-7 cells by 154,539; 140,393 and 109,414 µg/mL. IC₅₀ value of n-hexane fraction nanoemulsion 40%; 60%; and 80% in a row against Vero cells by 147,922; 137,408 and 141,38 µg/mL. From the results of this study can be concluded that the nanoemulsion of n-hexane fraction has activity, effectiveness and selectivity as an anticancer. The largest active compound in the n-hexane fraction is *stigmastan-3,6-dione* with a molecular weight of 429,3729 m/z.

Keywords: N-hexane fraction of guava leaves (*Psidium guajava* L.), anticancer, SNEDDS, T47D and MCF-7 cells.

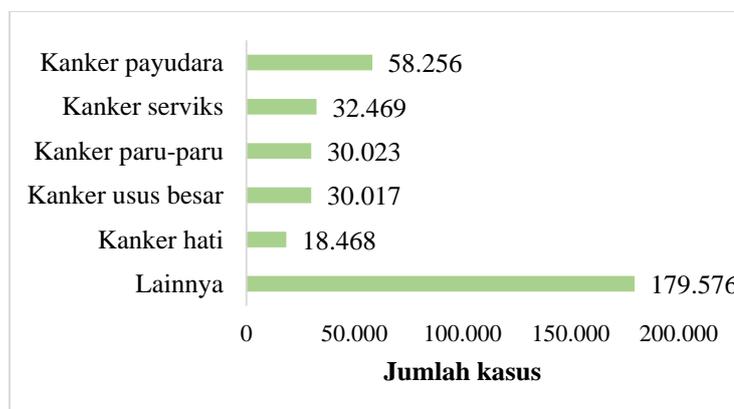
BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan golongan penyakit yang dikarakterisasi oleh pertumbuhan dan penyebaran sel yang tidak normal dan tidak terkendali. Salah satu jenis kanker yang menduduki tingkat prevalensi tinggi adalah kanker payudara. Kanker payudara muncul akibat terganggunya sistem pertumbuhan sel di dalam jaringan payudara. Kanker payudara merupakan kanker yang paling sering terjadi pada wanita dengan perkiraan kejadian sebanyak 1,38 juta kasus baru per tahun (Eccles dkk., 2013). Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO) tahun 2011, kematian akibat kanker payudara di Indonesia mencapai 20.052 atau 1,41% dari total kasus kematian.

Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* 2018 dari WHO menunjukkan kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker payudara yakni 58.256 kasus atau 16,7% dari total 348.809 kasus kanker. Merujuk data yang dipaparkan Kementerian Kesehatan (Kemenkes) per 31 Januari 2019 menyatakan, angka kanker payudara di Indonesia mencapai 42,1 orang per 100.000 penduduk. Rata-rata kematian akibat kanker payudara ini mencapai 17 orang per 100.000 penduduk. Berbagai kasus kanker di Indonesia menurut WHO 2018 ditunjukkan pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Berbagai kasus kanker di Indonesia (WHO, 2018)

Angka penderita kanker payudara dan serviks mengalami peningkatan setiap tahunnya dan masih minimnya pengobatan yang efektif memicu para peneliti untuk melakukan penelitian terhadap kemungkinan bahan alam sekitar yang berpotensi sebagai agen antikanker. Beberapa penemuan antikanker telah dilakukan, diantaranya melalui isolasi senyawa aktif dari bahan alam, pencarian senyawa metabolit sekunder untuk menghambat pertumbuhan sel kanker secara spesifik, dan sintesis senyawa organik yang dikenal memiliki aktivitas antikanker.

Seiring dengan meningkatnya tingkat kematian akibat kanker, proses pengobatan juga berkembang lebih luas dengan pengobatan secara medis dan pengobatan tradisional. Kemoterapi merupakan salah satu pengobatan medis yang banyak diikuti oleh penderita kanker. Namun pengobatan secara medis memiliki banyak efek samping bagi penderita kanker (Maharani, 2009). Adanya efek samping dari penggunaan obat tersebut perlu dilakukan pengembangan obat herbal dengan memanfaatkan tanaman-tanaman yang mengandung senyawa aktif sebagai obat (Lusia, 2006). Pengembangan obat herbal bisa berasal dari ekstrak tanaman seperti pada daun jambu biji. Daun jambu biji memiliki khasiat seperti antibakteri, antioksidan, antikanker, anti ulkus (Power dkk., 2012).

Penelitian tentang antikanker mulai banyak dikembangkan diantaranya yaitu telah dilakukan uji aktivitas terhadap sel T47D dari ekstrak etanol daun jambu biji secara *in vitro* oleh Dwitiyanti (2015) dengan nilai IC_{50} yang diperoleh dari ekstrak etanol 70% daun jambu biji adalah sebesar 27,54 $\mu\text{g/mL}$. Namun, pada penelitian Dwitiyanti (2015) terdapat kekurangan yaitu yang dilakukan uji aktivitas hanya berupa ekstrak yang masih mengandung banyak senyawa sehingga belum diketahui senyawa aktif yang spesifik dalam daun jambu biji yang dapat berperan sebagai antikanker.

Penelitian lain dilakukan oleh Nita (2019) mengenai uji aktivitas terhadap sel T47D, MCF-7, dan Hela dari fraksi etanol, etil asetat dan n-heksana daun jambu biji secara *in vitro* dengan nilai IC_{50} fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 279,23; 21,53; dan 8,89 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel MCF-7

sebesar 16,15; 53,01; dan 5,04 $\mu\text{g}/\text{m}$, dan Nilai IC_{50} fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel vero 1579,375 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 164,844 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dan 124,301 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksana memiliki aktivitas dan efektivitas serta selektivitas sebagai antikanker.

Penelitian lain dari daun jambu biji diantaranya sebagai anti inflamasi (Ojowele, 2006), antimalaria (Tona dkk., 1998), antimikroba (Arima dan Danno, 2002; Chah dkk., 2006; Prabu dkk., 2006), antioksidan (Ariati, 2016), dan antibakteri (Agustina, 2018). Penelitian aktivitas daun jambu biji sebagai antikanker masih sangat terbatas. Berdasarkan Sato dkk. (2010), hanya ada tujuh penelitian yang berhubungan dengan pengujian aktivitas antikanker dari jambu biji menggunakan kultur sel. Adapun sel kanker yang telah digunakan untuk uji aktivitas antikanker dari jambu biji ini antara lain adalah sel kanker prostat (Ryu dkk., 2012), kanker usus (Lee dan Park, 2010), kanker serviks (Joseph dan Priya, 2010), kanker lambung (Manthey dkk., 2001), kanker mulut dan kanker sel darah (Manosroi dkk., 2006), kanker payudara (Lema, 2014; Widyasari, 2019), kanker kolon (Maharani, 2017), kanker payudara dan kanker serviks (Nita, 2019).

Nanoteknologi akhir-akhir ini telah banyak menarik perhatian bagi peneliti dan ilmuwan, karena diyakini mempunyai banyak kegunaan. Partikel nano adalah sistem pengiriman obat terbaru yang dapat meningkatkan tingkat pengiriman obat ke reseptor. Pengembangan sistem pengiriman obat berdasarkan teknologi farmasi, suatu formulasi yang bisa meningkatkan kemampuan senyawa aktif untuk menembus sangat dibutuhkan, salah satunya adalah *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS). SNEDDS adalah sediaan yang terdiri dari minyak, surfaktan dan co-surfaktan. Pembuatan formulasi bahan alam salah satunya adalah dengan teknik SNEDDS. Metode ini digunakan untuk dapat meningkatkan ketersediaan hayati zat aktif di dalam tubuh, menambah kelarutan, laju disolusi dan absorpsi zat aktif di dalam tubuh terutama untuk obat-obat yang memiliki kelarutan rendah di dalam air (Anindhita dan Oktiviani, 2016).

Penelitian aktivitas daun jambu biji sebagai antikanker dalam bentuk SNEDDS masih sangat terbatas. Penelitian lain dalam bentuk SNEDDS sebagai antikanker diantaranya Huda dan Iis (2016) melakukan karakterisasi SNEDDS minyak buah merah (*Pandanus conoideus Lam.*) sebagai antikanker payudara terhadap sel T47D dan diperoleh IC_{50} terkecil yaitu 58,99 $\mu\text{L}/\text{mL}$, serta pembuatan SNEDDS minyak buah merah (*Pandanus conoideus Lam.*) sebagai antikanker payudara terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} sebesar 85,20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Setiawan dkk., 2018).

Hasil dari pengujian aktivitas antikanker dari daun jambu biji tersebut menunjukkan bahwa daun jambu biji sangat berpotensi sebagai obat antikanker karena dapat mencegah ataupun menghambat pertumbuhan sel kanker (Rishika dan Sharma, 2012). Daun jambu biji merupakan tanaman obat yang memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) merupakan jenis tumbuhan yang melimpah, mudah dicari dan belum dimanfaatkan secara optimal. Pada bagian-bagian jambu biji seperti daun, buah, dan bahkan kulit memiliki potensi penggunaan sebagai agen terapi terhadap kanker (Sato dkk., 2016). Ekstrak daun jambu biji memiliki kelarutan rendah yang berakibat pada bioavailabilitas oral yang kurang maksimal sehingga sesuai dibuat dalam bentuk SNEDDS untuk meningkatkan kelarutan zat aktif.

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antikanker fraksi n-heksana dari daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dalam bentuk SNEDDS terhadap sel kanker T47D dan MCF-7. Pada penelitian sebelumnya belum ditemukan uji aktivitas dari fraksi daun jambu biji terhadap sel T47D dan MCF-7 dalam bentuk sediaan SNEDDS. Pengujian dilakukan dalam bentuk fraksi bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam daun jambu biji yang berperan sebagai antikanker. Sediaan nanopartikel dipilih karena ukurannya yang nano dapat mengatasi kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, dan memodifikasi sistem penghantaran obat sehingga obat dapat langsung menuju daerah yang

spesifik (Mohanraj dan Chen, 2006). Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui efektivitas serta selektivitas fraksi n-heksana dalam bentuk sediaan nanopartikel terhadap sel T47D dan MCF-7. Hal tersebut dikarenakan dengan mengetahui selektivitas dari nanoemulsi fraksi n-heksana dengan beberapa konsentrasi diharapkan dapat dikembangkan sebagai agen antikanker.

Proses uji aktivitas antikanker dilakukan dengan melakukan preparasi sampel terlebih dahulu dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Selanjutnya dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak kasar menggunakan pelarut n-heksana. Ekstrak hasil fraksinasi kemudian diformulasi dalam bentuk SNEDDS dengan perbandingan Capryoll:Tween:PEG yaitu 10:70:20. Hasil dari formulasi kemudian diuji menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dan dilakukan uji aktivitas antikanker senyawa secara *in vitro* menggunakan metode *Microtetrazolium* (MTT) *assay* untuk mengukur efek pencegahan pertumbuhan terhadap sel kanker payudara.

Sel uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu sel T47D dan MCF-7. Sel T47D digunakan dalam pengujian secara *in vitro* karena mudah penanganannya dan memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas (Burdall dkk., 2000). Sel MCF-7 diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik metastasis *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang wanita berusia 69 tahun dengan etnis kaukasian bergolongan darah O dengan Rh+ (CCRC, 2009). Aktivitas penghambatan fraksi daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D dan MCF-7 dibandingkan efektivitasnya. Tahap akhir dilakukan uji LC-MS/MS terhadap fraksi n-heksana untuk mengetahui kandungan senyawa yang berperan dalam penghambatan sel kanker tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana formulasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan metode SNEDDS yang paling optimal?
2. Bagaimana aktivitas dan efektifitas dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D dan MCF-7 sebagai antikanker?

3. Senyawa apa yang terkandung dalam fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) tersebut?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui formulasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang paling optimal.
2. Mengetahui aktivitas dan efektifitas dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D dan MCF-7 sebagai antikanker.
3. Mengetahui komponen senyawa aktif dalam fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) tersebut.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang paling optimal digunakan sebagai agen antikanker.
2. Memberikan informasi mengenai aktivitas dan efektivitas nanoemulsi fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D dan MCF-7 sebagai antikanker.
3. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kandungan senyawa dalam fraksi n-heksana serta potensi tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.) sebagai bahan baku pembuatan sediaan nanopartikel sebagai obat alternatif kanker payudara.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perkembangan Kanker Payudara

Kanker adalah penyebab utama kematian di negara maju secara ekonomi dan penyebab utama kedua kematian di negara berkembang (WHO, 2008). Kanker merupakan penyakit yang dikarakterisasi oleh pertumbuhan tak terkendali dan penyebaran sel yang abnormal. Pemicu kanker dapat disebabkan oleh faktor internal maupun eksternal. Faktor eksternal seperti asap rokok, zat kimia, radiasi dan organisme penginfeksi, sedangkan untuk faktor internal seperti mutasi genetik, hormon, sistem imun dan mutasi pada sistem metabolisme. Kanker terjadi akibat adanya sel yang kehilangan kontrol genetik dan bertindak sebagai *aberrant precursor*. Sel kanker tumbuh secara tidak beraturan dan menjadi berbeda dengan sel normal (Gonzalez, 2005).

Kanker payudara merupakan kanker yang menginvasi jaringan payudara. Kanker payudara merupakan penyakit degeneratif yang jumlah penderitanya terus meningkat. Secara global, kanker payudara merupakan kanker yang paling sering terjadi pada wanita dengan perkiraan kejadian sebanyak 1,38 juta kasus per tahun (Eccles, 2013). Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* 2018 dari *World Health Organization* (WHO) menunjukkan kasus kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia adalah kanker payudara yakni 58.256 kasus atau 16,7% dari total 348.809 kasus kanker.

2.2 Perkembangan Daun Jambu Biji (*Psidium guajava L.*) Sebagai Obat

Jambu biji (*Psidium guajava L.*) adalah tanaman tropis yang berasal dari Brasil yang disebarkan ke Indonesia melalui Thailand. Jambu biji kaya akan vitamin A dan C serta pada daunnya terkandung beberapa senyawa kimia antara lain flavonoid, kuersetin, tanin, saponin, minyak atsiri dan alkaloid. Penelitian Tanaz dkk., (2014) melaporkan bahwa flavonoid, tanin, alkaloid, minyak atsiri dan beberapa komponen tersebut memiliki kemampuan farmakologi sebagai antidiare, antiinflamasi, hipoglikemi, antihipertensi, dan kemampuan farmakologi

lainnya. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang termasuk golongan fenol alam terbesar dan terdapat hampir di semua tumbuhan hijau. Flavonoid memiliki banyak khasiat dan aktivitas biologi antara lain sebagai antioksidan, antikanker dan anti inflamasi.

Jambu biji (*Psidium guajava* L.) telah dikenal memiliki aktivitas diantaranya sebagai anti inflamasi (Ojowele, 2006), antimalaria (Tona dkk., 1998), antimikroba (Arima dan Danno, 2002; Chah dkk., 2006; Prabu dkk., 2006), antioksidan (Ariati, 2016), dan antibakteri (Agustina, 2018). Penelitian aktivitas daun jambu biji sebagai antikanker masih sangat terbatas. Berdasarkan Sato dkk., (2010), hanya ada tujuh penelitian yang berhubungan dengan pengujian aktivitas antikanker dari jambu biji menggunakan kultur sel. Adapun sel kanker yang telah digunakan untuk uji aktivitas antikanker dari jambu biji ini antara lain adalah sel kanker prostat (Ryu dkk., 2012), kanker usus (Lee dan Park, 2010), kanker serviks (Joseph dan Priya, 2010), kanker lambung (Manthey dkk., 2001), kanker mulut dan kanker sel darah (Manosroi dkk., 2006), kanker payudara (Lema, 2014; Widyasari, 2019), kanker kolon (Maharani, 2017), kanker payudara dan kanker serviks (Nita, 2019).

Penelitian yang dilakukan oleh Dwitiyanti (2015) melaporkan uji aktivitas terhadap sel T47D dari ekstrak etanol daun jambu biji secara *in vitro* oleh Dwitiyanti (2015), nilai LC_{50} yang diperoleh dari ekstrak etanol 70% daun jambu biji tersebut adalah sebesar 27,54 $\mu\text{g/mL}$. Namun, pada penelitian Dwitiyanti (2015) tersebut terdapat kekurangan yaitu yang dilakukan uji aktivitas hanya berupa ekstrak yang masih mengandung banyak sekali senyawa. Sehingga belum diketahui senyawa aktif yang spesifik dalam daun jambu biji yang dapat berperan sebagai antikanker.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Nita (2019) melaporkan uji aktivitas terhadap sel T47D, MCF-7 dan Hela dari fraksi etanol, etil asetat dan n-heksan daun jambu biji secara *in vitro* dengan nilai IC_{50} fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 279,23; 21,53; dan 8,89 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel

MCF-7 sebesar 16,15; 53,01; dan 5,04 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel HeLa sebesar 72,53; 76,36; dan 48,83 $\mu\text{g/mL}$ dan Nilai IC_{50} fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel vero 1579,375 $\mu\text{g/mL}$, 164,844 $\mu\text{g/mL}$, dan 124,301 $\mu\text{g/mL}$. Hasil dari pengujian aktivitas antikanker menggunakan daun jambu biji ini menunjukkan bahwa daun jambu sangat berpotensi sebagai obat antikanker karena dapat menghambat atau mencegah pertumbuhan sel kanker (Rishika dan Sharma, 2012).

Berbagai metode ekstraksi bahan tanaman yang telah dilakukan antara lain metode maserasi, soklet, perkolasi, infundasi, digestasi, dekokta dan destilasi (Senja dkk., 2014). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu maserasi dengan pelarut etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) karena pada prinsipnya pelarut harus memenuhi *pharmaceuticalgrade*. Metode maserasi mempunyai keuntungan lebih dibandingkan metode ekstraksi lainnya dalam isolasi senyawa bahan alam, karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi kontak sampel dan pelarut yang cukup lama, dan dengan terdistribusinya pelarut organik yang terus menerus ke dalam sel tumbuhan mengakibatkan perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga pemecahan dinding dan membran sel dan metabolit sekunder yang berada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik, dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut yang digunakan untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut akibat kontak langsung dan waktu yang cukup lama dengan sampel (Djarwis, 2004). Pada penelitian yang dilakukan oleh Fajar dkk., (2011) melaporkan bahwa metode maserasi yang dilakukannya pada ekstraksi daun jambu biji menghasilkan rendemen sebesar 18,47%.

Pada penelitian ini dilakukan tahap fraksinasi untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya menggunakan pelarut n-heksana. Proses fraksinasi pada penelitian ini mengacu pada beberapa penelitian sebelumnya salah satunya yang dilakukan oleh Nita (2019) dimana fraksinasi dilakukan dengan

kolom fraksinasi menggunakan pelarut non polar, semi polar dan diakhiri dengan pelarut polar terhadap daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). Fraksi yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator*.

Dewasa ini ditemukan teknik kultur yang *relative* cepat dan mudah untuk pengujian antikanker yaitu teknik *in vitro*. Teknik kultur *in vitro* merupakan teknik isolasi secara aseptik dimana sel ditumbuhkan dalam suatu media buatan dalam sebuah tabung (Pandiangan, 2011). Sel yang digunakan dalam uji aktivitas ini menggunakan sel T47D dan MCF-7 karena untuk mengetahui aktivitas nanoemulsi fraksi n-heksana daun jambu biji sebagai agen antikanker.

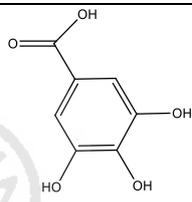
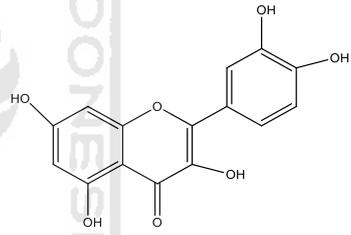
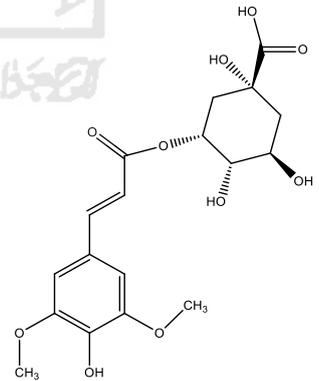
Sel T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Sel MCF-7 diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik metastasis *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang wanita berusia 69 tahun dengan etnis kaukasian bergolongan darah O dengan Rh+. Sel MCF-7 diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik metastasis *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang wanita berusia 69 tahun dengan etnis kaukasian bergolongan darah O dengan Rh+ (CCRC, 2009).

Continuous cell line sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, dan memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas (Dwitiyanti, 2015). Beberapa penelitian yang menggunakan teknik kultur *in vitro* diantaranya Heti (2008) yaitu menguji sitotoksik ekstrak etanol herba sisik naga terhadap sel T47D. Pandiangan (2011) menguji aktivitas antikanker senyawa katarantina yang diperoleh dari *kalus Catharanthus roseus* terhadap sel leukemia P388, Fitrya dan Lenny (2009) menguji aktivitas antikanker dari senyawa flavonoid yang berasal pada akar tumbuhan tunjuk langit (*Helmynthostachis zeylanica* Linn.) terhadap sel murine P388. Penelitian Nita (2019) menguji aktivitas antikanker fraksi etanol, n-heksana dan etil asetat terhadap sel T47D, MCF-7 dan HeLa.

Penelitian mengenai kandungan senyawa dalam ekstrak daun jambu biji dengan menggunakan LC-MS/MS jarang dilakukan. Berdasarkan studi literatur

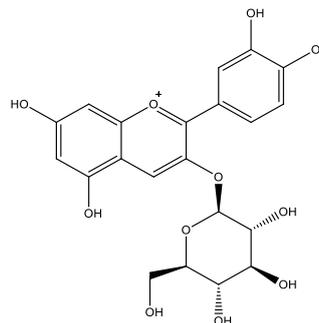
yang telah dilakukan didapatkan beberapa penelitian terkait kandungan senyawa dalam ekstrak daun jambu biji, diantaranya yaitu oleh Chiari dkk., (2017), Fang dkk., (2002), Flores dkk., (2015), Moon dkk., (2011), Rojas dkk., (2017), Díaz dkk., (2016), Nita (2019). Beberapa senyawa yang terdeteksi pada LC-MS/MS ditunjukkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan LC-MS/MS

Nama senyawa	[M-H] ⁻ (m/z)	Struktur
Gallic acid ^{a b}	168,9913	
Quercetin ^{a b}	257,1420	
3-Sinapoylquinic acid ^a	369,0139	

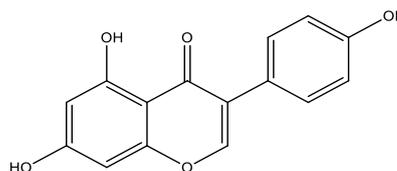
Cyanidin-3-O-
glucoside^{a c d}

447,9736



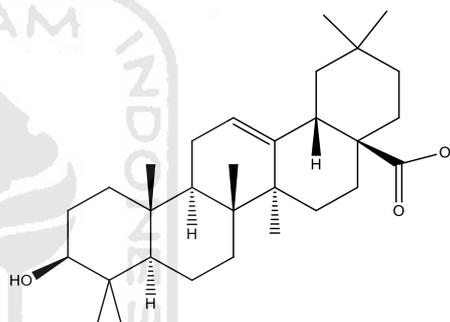
Genistein^e

271,1227



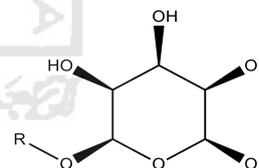
Oleanolic acid^e

203,1921



Glycoside^{a f}

325,2029



^aNita, 2019 ^bRojas-Garbanzo dkk., 2017 ^cFlores dkk., 2015 ^dDiaz-se-Cerio dkk., 2016
^eMoon dkk., 2011 ^fFang dkk., 2002

2.3 Perkembangan *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS)

Sekarang ini sedang dikembangkan suatu sistem dalam penghantar obat. Sediaan nanopartikel memiliki beberapa kelebihan seperti mampu menembus sel target dengan lebih cepat. Sediaan nanopartikel diartikan sebagai formulasi suatu partikel yang terdispersi pada ukuran nanometer atau skala per seribu mikron. Batasan ukuran partikel menurut beberapa ahli untuk sistem penghantar obat masih terdapat perbedaan. Hal ini dikarenakan ukuran nanopartikel pada sistem

penghantaran obat berbeda dengan teknologi nanopartikel secara umum. Nanopartikel obat secara umum harus terkandung obat dengan jumlah yang cukup dalam matriks pada tiap butir partikel, sehingga memerlukan ukuran yang relatif lebih besar dibanding nanopartikel non-farmasetik. Meskipun demikian secara umum tetap disepakati bahwa nanopartikel merupakan partikel yang memiliki ukuran dibawah 1 mikron (Buzea dkk., 2007).

Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) merupakan perkembangan terkini sistem nanoemulsi atau bisa disebut auto-emulsifikasi (Wahdha dkk., 2011). Konsep dari teknologi ini adalah formulasi antara minyak, surfaktan, co-surfaktan yang mengandung obat. Sistem ini selanjutnya akan masuk ke saluran cerna dan bercampur dengan cairan usus yang mengandung air. Ketika formula bercampur dengan cairan usus, maka akan terjadi emulsifikasi spontan yang menghasilkan globul berukuran nanometer. Sistem autoemulsi yang berhasil dibuat dengan metode ini menunjukkan karakter yang baik, dimana emulsifikasi membentuk nanopartikel terjadi secara spontan dengan ukuran partikel bervariasi tergantung media dispersi dengan rata-rata 170 nm. Sistem ini dapat melepaskan obat secara keseluruhan di dalam media dalam 20 menit dan stabil karena tidak dipengaruhi oleh perbedaan tingkat keasaman (Date dan Nagarsenker, 2007).

Date dkk., (2010) melaporkan bahwa karakteristik SNEDDS dipengaruhi oleh komponen penyusunnya, yaitu minyak, surfaktan dan ko-surfaktan. Komponen minyak dalam formulasi SNEDDS berperan dalam menentukan ukuran emulsi yang terbentuk karena minyak merupakan pembawa utama zat aktif dalam SNEEDS. Surfaktan berperan dalam memperkecil ukuran tetesan emulsi serta menjaga zat aktif dalam jangka waktu lama pada tempat absorpsi. Tween 80 merupakan surfaktan non-ionik yang stabil untuk emulsi dan aman bagi tubuh. Nugroho dkk., (2018) melaporkan bahwa penggunaan surfaktan tween 20 dengan berat molekul dan rendahnya viskositas dapat membantu terbentuknya nanoemulsi yang lebih luas dengan ukuran partikel yang lebih kecil. Co-surfaktan dalam formulasi SNEDDS berperan membantu surfaktan dalam menurunkan tegangan

permukaan air dan minyak, meningkatkan disolusi zat aktif serta memperbaiki dispersibilitas dan absorpsi zat aktif. Menurut Rowe dkk., (2009) Propilen glikol merupakan ko-surfaktan yang dapat membantu absorpsi obat. Semakin besar kemampuan surfaktan dan ko-surfaktan dalam mengurangi tegangan antarmuka akan semakin membentuk nanoemulsi yang stabil (Villar dkk., 2012).

Penelitian aktivitas daun jambu biji sebagai antikanker dalam bentuk SNEDDS masih sangat terbatas. Penelitian Nugroho dkk., (2017) yaitu formulasi SNEDDS ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) sebagai analgesik menggunakan formula Isopropil miristat sebagai minyak, Tween 80 sebagai surfaktan dan PEG 400 sebagai co-surfaktan serta diperoleh ukuran 77,1 nm. Intan (2017) melakukan optimasi sediaan SNEDDS dari ekstrak kloroform daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan perbandingan Tween 80 (surfaktan) : PEG 400 (ko-surfaktan) : minyak kemiri = 1:5:1 dengan ukuran partikel yang diperoleh 14 nm. Penelitian lain dalam bentuk SNEDDS sebagai antikanker diantaranya Huda dan Iis (2016) melakukan karakterisasi SNEDDS minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) sebagai antikanker payudara terhadap sel T47D dan diperoleh IC_{50} terkecil yaitu 58,99 $\mu\text{L}/\text{mL}$, pembuatan SNEDDS minyak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) sebagai antikanker payudara terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} sebesar 85,20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Setiawan dkk., 2018).

Indonesia termasuk salah satu negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Kini tumbuhan banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat. Oleh karena itu sekarang sedang dikembangkan senyawa bahan alam. Dalam penelitian ini menggunakan potensi daun jambu biji. Beragam penelitian terkini telah membuktikan bahwa jambu biji memiliki beragam khasiat kesehatan seperti antidiare, antibakteri, meningkatkan kadar trombosit darah, menurunkan gula darah dan antikanker (Trubus, 2013). Ekstrak daun jambu biji mempunyai kelarutan yang rendah yang berakibat pada bioavailabilitas oral yang kurang maksimal. Sehingga diperlukan pengembangan sistem penghantaran obat dengan

membentuk sediaan *Self Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS). Dimana menurut Singh dkk., (2009) formulasi sediaan SNEDDS akan meningkatkan disolusi dari zat aktif, meningkatkan transpor melalui sistem limfatik usus dan meningkatkan absorpsi dan bioavaibilitas zat aktif dari saluran cerna.



BAB III DASAR TEORI

3.1 Tanaman Jambu Biji (*Psidium guajava* L.)

3.1.1 Klasifikasi tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Jambu biji (*Psidium guajava* L.) dikenal juga dengan nama lain *Psidium aromaticum* Blanco. Tanaman ini berasal dari daerah Amerika Tropik antara Mexico sampai Peru, menyebar ke daerah Asia oleh pedagang Spanyol dan Portugis (Verheij and Coronel, 1999). Jambu biji merupakan tanaman yang termasuk famili *Myrtaceae* yang banyak tumbuh di Indonesia. Jambu biji merupakan tumbuhan yang sudah dimanfaatkan oleh masyarakat, namun pemanfaatannya hanya sebatas pada buahnya saja tetapi pemanfaatan daunnya hanya sebagian kecil saja untuk mengatasi beberapa penyakit.



Gambar 2. Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Menurut Parimin (2005) berdasarkan tata nama tumbuhan, tanaman jambu biji termasuk ke dalam klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Sub Divisi : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledonae*
Ordo : *Myrtales*
Famili : *Myrtaceae*
Genus : *Psidium*
Spesies : *Psidium guajava* Linn

3.1.2 Kandungan dan Kegunaan Daun Jambu Biji

Daun jambu biji sebagian jumlah besar mengandung fenolik, termasuk asam galat (348), *Chatechin* (102), *epicatecin* (60), *quercetin* (102), dan rutin (100) (Chen dkk., 2009). Analisis fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan kromatografi gas dan kromatografi gas-spektrometri massa sementara diidentifikasi 60 senyawa, seperti β -*eudesmol* (11,98%), α -*copaene* (7,97%), *phytol* (7,95%), α -*patchoulene* (3,76%), β -*caryophyllene oxide* (3,63%), *caryophylla-3* (15), 7 (14) -*dien-6-ol* (2,68%), (E) -*methyl isoeugenol* (1,90%), α -*terpineol* (1,76%), dan *octadecane* (1,23%) (Ryu dkk., 2012). Analisis fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan LCMS/MS diperoleh senyawa *ellagitanins* (473,2023 m/z), isomer asam *trihydroxycinnamoylquinic* (369,0139 m/z), *sinapoylquinic* (368,9941 m/z), *gallic acid* (168,9913 m/z), *glycoside* (325,2029 m/z), dan *cyanidin-3-O-glycoside* (447,2036 m/z) (Nita, 2019).

Bagian tanaman yang sering digunakan sebagai obat adalah daunnya, karena daunnya diketahui mengandung senyawa tanin 9-12%, minyak atsiri, minyak lemak dan asam malat (DepKes, 1989). Daun jambu biji banyak mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, saponin, tanin, polifenol, flavonoid, dan minyak atsiri (Dalimarta, 2006). Jambu biji (*Psidium guajava* L.) dikenal memiliki aktivitas diantaranya sebagai antimikroba (Arima dan Danno, 2002; Chan dkk., 2006; Prabu dkk., 2006), antimalaria (Tona dkk., 1998), antidiabetes (Ojeweke, 2005; Muhtar dkk., 2006) antimutagen (Grover dan Bala, 1993) dan untuk mengobati penyakit gigi (Razak dkk., 2006).

Penelitian aktivitas daun jambu biji sebagai obat antikanker masih sangat terbatas. Berdasarkan Sato dkk., (2010) hanya ada beberapa penelitian yang berhubungan dengan pengujian aktivitas antikanker dari daun jambu biji menggunakan kultur sel. Adapun sel kanker yang digunakan untuk uji aktivitas antikanker dari daun jambu biji antara lain yaitu kanker lambung (Manthey dkk., 2001), kanker mulut dan kanker sel darah (Manosroi dkk., 2006), kanker usus (Lee dan Park, 2010), kanker serviks (Joseph dan Priya, 2010) kanker prostat

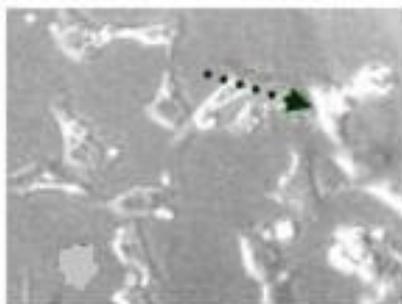
(Ryu dkk., 2012). Pengobatan kanker dengan menggunakan tanaman herbal seperti daun jambu biji lebih aman dibandingkan dengan pengobatan secara kemoterapi atau radiasi (Itharat dan Oraiku, 2007).

3.2 Kanker Payudara

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan karena adanya genom abnormal yang ditandai dengan adanya sinyal proliferasi secara terus-menerus, rusaknya gen penekan pertumbuhan, tidak adanya proses kematian sel, replikasi sel tidak terkendali, adanya rangsangan angiogenesis, sel mampu mengalami metastasis dan menginvasi jaringan-jaringan sekitarnya (Hanahan dkk., 2001). Kanker payudara adalah jenis kanker yang paling banyak ditemui pada wanita. Kanker jenis ini merupakan penyebab utama kematian pada wanita akibat kanker (Richie dan Swanson, 2003). Kanker disebabkan oleh pertumbuhan sel jaringan tubuh yang tidak normal dan tidak terkendali. Sel kanker dapat menyebar melalui pembuluh darah dan bermetastatis di tempat lain karena sel kanker bersifat ganas dan tumbuh cepat (Departemen Kesehatan, 2007). Selain itu, kanker payudara lebih banyak terjadi di negara berkembang dan dapat terjadi mulai dari umur kurang dari 40 tahun hingga lebih dari 65 tahun (ACS, 2013).

3.3 Sel T47D

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall dkk., 2003).

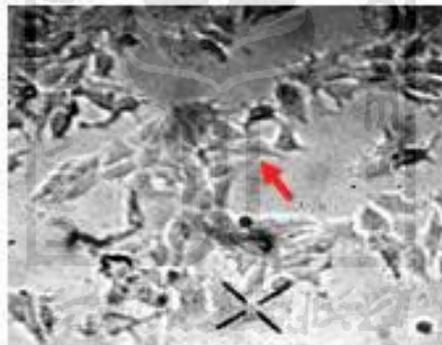


Gambar 3. Morfologi sel T47D (CCRC, 2009)

Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Missence mutation* terjadi pada residu 194 (dalam zinc-binding domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan *response element* pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi *cell cycle*. Sel T47D merupakan sel kanker payudara ER/PR-positif (Schafer dkk., 2000). Induksi estrogen eksogen mengakibatkan peningkatan proliferasinya (Verma dkk., 1998). Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin (Zampieri dkk., 2002).

3.4 Sel MCF-7

Sel MCF-7 adalah salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel MCF-7 ini memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi, mengekspresikan reseptor estrogen dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Mchetner dkk., 1998).



Gambar 4. Morfologi sel MCF-7 (CCRC, 2009)

3.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu komponen dari suatu campuran berdasarkan proses distribusi terhadap dua macam pelarut yang tidak saling bercampur (Petrucci, 1987). Berbagai senyawa aktif yang terdapat dalam simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan lain-lain. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Ditjen POM, 2000).

Proses memilih pelarut yang akan digunakan harus diperhatikan kandungan kimia (metabolit sekunder) yang akan diekstraksi. Sifat yang penting adalah sifat kepolaran. Senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut yang sama tingkat kepolarannya, dan senyawa non polar akan lebih mudah larut dalam pelarut non polar. Derajat kepolaran pelarut ditentukan oleh besar tetapan dielektriknya, yaitu semakin besar nilai konstanta dielektrik suatu pelarut maka polaritasnya semakin besar (Ditjen POM, 1992).

Proses maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena sebagian besar senyawa bahan alam tidak tahan panas. Proses maserasi akan terjadi kontak antara sampel dan pelarut yang cukup lama sehingga menghasilkan ekstrak yang jauh lebih besar (Baraja, 2008). Kelebihan metode maserasi yaitu sederhana, relatif murah, kontak antara sampel dan pelarut yang cukup lama serta dapat menghindari komponen senyawa yang tidak tahan terhadap panas. Kekurangannya yaitu membutuhkan waktu yang lama dan pelarut yang digunakan relatif banyak (Voight, 1995).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan cara dingin yaitu maserasi dengan pelarut etanol (C_2H_5OH). Berdasarkan beberapa literatur yang didapat menyatakan bahwa ekstrak etanol 70% memiliki toksisitas yang paling rendah dibandingkan ekstrak lainnya. Sehingga pada penelitian ini digunakan etanol dengan konsentrasi 70% (Damar dkk., 2014).

3.6 Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Dimana pada penelitian ini fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana yang bersifat nonpolar. Tingkat kepolaran suatu pelarut dilihat dari konstanta dielektrik, momen dipol, dan kelarutannya terhadap air, dimana semakin tinggi semakin polar.

Fraksinasi dan isolasi lebih lanjut terhadap senyawa dalam ekstrak kasar dilakukan untuk memperoleh senyawa dengan tingkat kepolaran tertentu yang lebih murni sehingga dapat memperjelas pangaruhnya pada uji *bioessay* yang

dilakukan menggunakan kromatografi kolom, yang merupakan pemisahan terbaik untuk memisahkan campuran dalam jumlah banyak (Sastrohamidjojo, 1985).

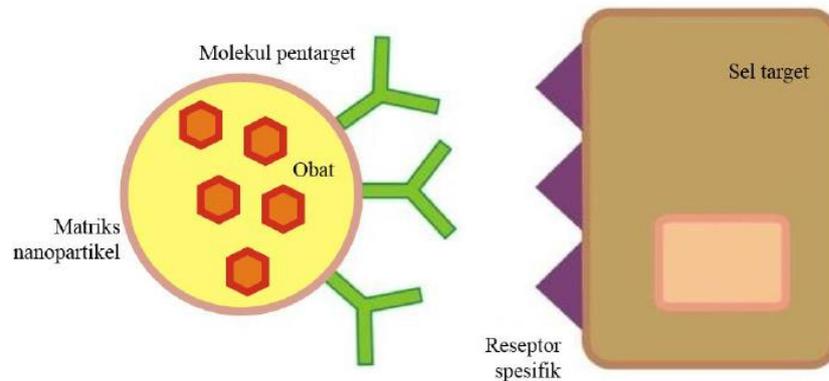
3.7 Penapisan Fitokimia

Penapisan dalam penelitian merupakan suatu tahap awal yang bertujuan memperoleh gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam suatu sampel yang sedang diteliti. Metode penapisan kimia dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan pereaksi warna. Penapisan kimia pada penelitian ini diantaranya uji kandungan senyawa tanin/polifenol, alkaloid, flavonoid dan terpenoid menurut prosedur yang telah dilakukan Harbone (1987) dan DepKes (1995).

3.8 Teknologi Nanopartikel

Nanopartikel dideskripsikan sebagai formulasi suatu partikel yang terdispersi pada ukuran nanometer atau skala per seribu mikron. Pada beberapa sumber menyebutkan bahwa nanopartikel memiliki ukuran antara 1-1000 nm. Saat ini telah dikembangkan formulasi sediaan obat dalam ukuran nanopartikel. Beberapa kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal, kemampuan untuk menembus dinding sel yang lebih tinggi, baik melalui difusi maupun opsonifikasi dan fleksibilitasnya untuk dikombinasi dengan berbagai teknologi lain sehingga membuka potensi yang luas untuk dikembangkan pada berbagai keperluan dan target (Bezua dkk., 2007). Kelebihan lain dari nanopartikel adalah adanya peningkatan afinitas dari sistem karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama (Kawashima, 2009). Oleh karena itu nanopartikel merupakan solusi yang baik karena dapat memberikan efek farmakologis pada dosis yang lebih kecil (efisien) (Hu dan Li, 2011).

Nanopartikel pada sediaan farmasi dapat berupa sistem obat dalam matriks seperti nanosfer, nanokapsul, nanoliposom, nanoemulsi dan nanospray. Pengembangan terkini sistem nanoemulsi untuk aplikasi oral melalui saluran gastrointestinal adalah teknologi auto-emulsifikasi *Self-nanoemulsifying drug delivery system* (SNEEDs) (Wadhwa dkk., 2011).



Gambar 5. Ilustrasi interaksi nanopartikel dalam tubuh (Martien dkk., 2012)

Konsep dari teknologi SNEDDS ini adalah formulasi antara minyak, surfaktan dan co-surfaktan. Pada penelitian ini Capryol-90 digunakan sebagai fasa minyak, Tween-20 sebagai surfaktan dan PEG-400 digunakan sebagai co-surfaktan. Sistem ini selanjutnya akan masuk ke saluran cerna dan bercampur dengan cairan usus yang mengandung air. Ketika formula bercampur dengan cairan usus, maka akan terjadi emulsifikasi spontan yang menghasilkan globul berukuran nanometer. Sistem ini dapat melepas obat secara keseluruhan didalam media dalam 20 menit dan stabil karena tidak dipengaruhi oleh perbedaan tingkat keasaman (Date dan Nagarsenker, 2007).



Gambar 6. Ilustrasi konsep penghantaran obat auto nanoemulsifikasi (Martien dkk., 2012)

Sediaan diberikan dalam kombinasi obat, minyak, surfaktan dan kosurfaktan yang kemudian akan mengalami proses emulsifikasi spontan didalam cairan cerna saat mengalami pencampuran dengan cairan usus. Nanoemulsi

selanjutnya akan mengalami proses absorpsi seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 6.**

3.9 Karakterisasi Nanopartikel

Nanopartikel memiliki karakteristik tertentu. Karakteristik nanopartikel yang perlu diketahui antara lain ukuran partikel, distribusi partikel dan zeta potensial dari nanopartikel yang dihasilkan. Distribusi ukuran, diameter partikel rata-rata dan muatan mempengaruhi stabilitas fisik dan distribusi nanopartikel. Morfologi permukaan, ukuran dan bentuk keseluruhan ditentukan oleh teknik mikroskop elektron (Bathia, 2016).

3.9.1 Ukuran dan distribusi partikel

Ukuran dan distribusi partikel merupakan karakteristik utama yang perlu diamati dalam suatu sistem nanopartikel. Ukuran nanopartikel yang kecil akan mengakibatkan pelepasan obat yang cepat. Semakin kecil ukuran partikel maka luas permukaannya semakin besar. Semakin dekat letak obat dengan permukaan partikel karena berukuran kecil maka semakin cepat pula pelepasannya. Sedangkan partikel yang ukurannya lebih besar akan lebih banyak menampung obat sehingga obat bisa lebih lambat dalam pelepasannya. Ukuran partikel yang terlalu kecil lebih cenderung mengalami agregasi selama penyimpanan dan pengangkutan dispersi nanopartikel. Sehingga diperlukan teknik untuk membentuk partikel dengan ukuran kecil namun dengan stabilitas yang baik (Bathia, 2016).

3.9.2 Zeta potensial

Zeta potensial adalah muatan partikel dalam medium spesifik ataupun medium pendispersinya. Nilai zeta potensial yang baik yaitu lebih dari ± 30 mV atau mendekati ± 30 mV. Zeta potensial akan menunjukkan besarnya gaya tolak menolak antara muatan partikel yang sama dan berdekatan. Nilai zeta potensial yang tinggi (positif atau negatif) akan mencegah terjadinya agregasi dari partikel dan mampu memberikan stabilitas yang baik. Apabila nilai zeta potensial dari suatu nanopartikel terlalu kecil, akan terjadi gaya tarik-menarik yang lebih besar

dibandingkan gaya tolak-menolak sehingga dapat menyebabkan terjadinya koagulasi dan flokulasi (Amalia dkk., 2015).

3.10 Uji Sitotoksitas

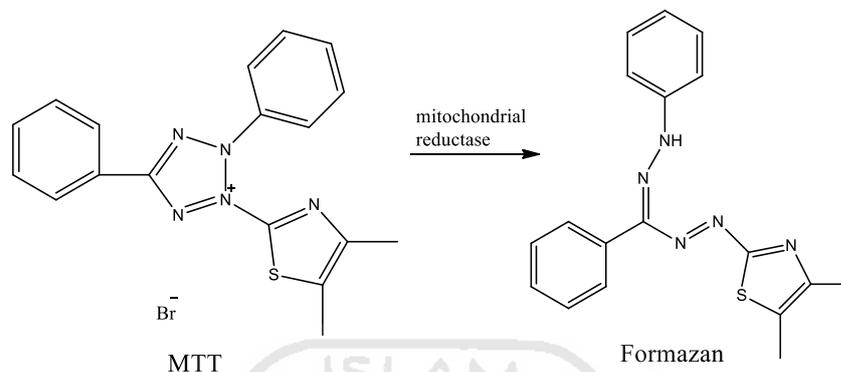
Salah satu usaha menemukan antikanker baru adalah melalui penelitian terhadap tanaman obat yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk mengobati atau menghambat sel kanker (Raharjo dkk., 2014). Sekarang ini telah ada teknik kultur *in vitro*, yaitu teknik untuk mengisolasi secara aseptik dalam tabung dan ditumbuhkan dalam media buatan. Sel yang digunakan dalam uji aktivitas ini menggunakan sel T47D dan MCF-7 karena penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi ekstrak daun jambu biji sebagai agen antikanker yang berasal dari bahan alam (Dwitiyanti, 2015).

Keuntungan dari metode *in vitro* antara lain membutuhkan bahan uji yang sedikit untuk kultur primer manusia dari berbagai organ target dan dapat digunakan pada langkah awal pengembangan obat, serta memberikan informasi secara langsung efek potensial pada sel target manusia. Akhir dari uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat maksimal yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Uji sitotoksik menggunakan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik dimana semakin besar nilai IC_{50} , maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Heti, 2008).

3.11 Metode MTT

Metode MTT merupakan metode yang paling sering digunakan dalam pengujian *in vitro*. Pengujian ini memiliki beberapa keuntungan seperti cepat, sensitif, akurat dan mampu mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya dapat digunakan untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Doyle dan Griffiths, 2000). Metode MTT merupakan uji *in vitro* menggunakan kultur sel. Prinsip metode MTT adalah reduksi pada sel dengan pemecahan garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-definil tetrazolium bromid) berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan. Pemecahan

garam tetrazolium menjadi formazan dilakukan oleh enzim suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel. Penambahan larutan *stopper* berfungsi untuk memecah sel, sehingga dapat melarutkan garam formazan (Duval dkk., 2002). Reaksi reduksi MTT ditunjukkan pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Reaksi reduksi MTT menjadi Formazan (Mosmann, 1983).

Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat diserap dengan spektrofotometri visibel yang berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif. Alat yang digunakan dalam pengukuran adalah ELISA *reader* dengan panjang gelombang yang dapat menyerap adalah 540-690 nm, namun yang biasa digunakan yaitu panjang gelombang 590 nm. Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Hasil persen sel hidup dapat dikonversikan menjadi nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang dapat menghambat hidup sel 50% (Duval dkk., 2012).

3.12 ELISA Reader

Prinsip ELISA (*Enzym immunosorbent assay*) adalah mendeteksi adanya antibodi atau antigen dalam sampel. Metode ini banyak digunakan untuk deteksi antibodi berdasarkan prinsip ikatan antigen-antibodi spesifik. Aplikasi metode ini digunakan untuk skrining maupun konfirmasi diagnosa suatu penyakit. ELISA digunakan untuk pembacaan nilai absorbansi untuk mengetahui nilai IC_{50} sampel (Duvalet dkk., 2012).



Gambar 8. ELISA reader

3.13 *Liquid Chromatograph- Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*

Sejak tahun 1970-an, instrumen *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) telah populer dalam penelitian di bidang ilmu pengetahuan kimia dan bidang terkait lainnya. Namun pengetahuan akan teknik ionisasi yang lebih spesifik seperti ionisasi tekanan atmosfer (*atmospheric pressure ionization/API*) dan metode ionisasi lainnya yang lebih unggul membuat sebagian besar ilmuwan sepakat untuk menggunakan spektrometri massa yang lebih spesifik (Voseger dan Seger, 2008).

Liquid Chromatograph- Mass Spectrometry (LC-MS/MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. LC-MS/MS mulai digunakan untuk penelitian bioanalisis pada akhir 1980-an (Bowers, 1989; Covey dkk., 1986). Menurut (Vogeser dan Seger 2008) kelebihan dari teknologi LC-MS/MS meliputi:

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor.
2. Aplikasi yang luas dan sistem yang praktis. Berbeda dengan GCMS, penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Selain itu mampu mengukur analit yang sangat polar dan persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.

3. Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.
4. Kaya informasi. Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion akan memilah dan mengidentifikasi massa sesuai rasio fragmentasinya (m/z). Komponen paling pentingnya adalah sumber ion (*ionsource*) yang menghasilkan ion dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menseleksi ion. LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa sumber ion dan analisis massa yang disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang dianalisa. Masing-masing sumber ion dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan (Agilent Technologies, 2001). Komponen-komponen dari instrumen LC-MS adalah sebagai berikut:

a. Pompa

Pompa bertanggung jawab dalam pemberian aliran fase gerak yang konstan selama analisis. Secara umum terdapat 2 jenis pompa yang biasa digunakan, yaitu pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran konstan. Pompa dengan tekanan konstan lebih umum digunakan dalam kolom HPLC. Pompa HPLC yang baik harus menghasilkan laju alir 0,5-10 mL/menit dengan tekanan maksimum 40-50 Mpa, laju alir yang konstan dengan variasi kurang dari 0,5% (Gunzler and Williams, 2001).

b. Kolom

HPLC fasa terbalik atau *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) lebih banyak digunakan karena kekuatan elusi fase gerak yang lebih mudah diatur, equilibrasi antara kolom dan fase diam lebih cepat daripada NP-HPLC (*Normal Phase High Performance Liquid Chromatography*), jarang menggunakan elusi gradient (Guenzler and Williams, 2001).

c. Fase Gerak

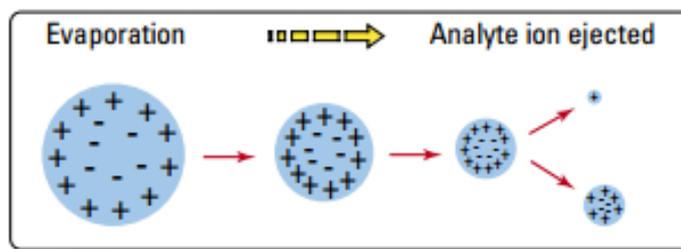
Fase gerak yang umum digunakan dalam RP-HPLC yaitu air, asetonitril, dan metanol yang ideal untuk LC-MS. Sebelum dianalisis menggunakan LCMS, solven harus dihilangkan gasnya yang dapat dilakukan dengan cara sonifikasi, helium sparging, atau membran vakum (Gunzler and Williams, 2001).

d. Sumber Ion

Pada sumber ion, dilakukan proses ionisasi dari molekul analit dari dalam sampel sehingga dapat diaplikasikan pada spektrometer massa. Terdapat beberapa metode ionisasi yang dapat digunakan dalam spektrometer massa (Hoffman dan Stroobant, 2007) yaitu *electrospray ionization* (ESI), *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI), dan *atmospheric pressure photoionization* (APPI). ESI lebih banyak digunakan dalam analisis (Ginting, 2012).

ESI bergantung pada pelarut yang digunakan untuk memungkinkan analit mampu terionkan dengan baik sebelum mencapai spektrometri massa. Eluen LC disemprotkan bersamaan dengan *gas nebulizer* ke dalam bidang elektrostatis pada tekanan atmosfer yang akan menyebabkan disosiasi molekul analit lebih lanjut (Ginting, 2012).

Pada saat bersamaan gas yang dipanaskan menyebabkan menguapnya pelarut sehingga tetesan analit menyusut, konsentrasi muatan dalam tetesan meningkat. Keadaan akan memaksa ion untuk bermuatan melebihi kekuatan kohesif atau ion dikeluarkan ke dalam fase gas. Ion-ion yang tertarik akan melewati pipa kapiler, selanjutnya akan diteruskan kedalam *mass analyzer* (Ginting, 2012).



Gambar 9. Desorpsi ion dari larutan (Ginting, 2012)

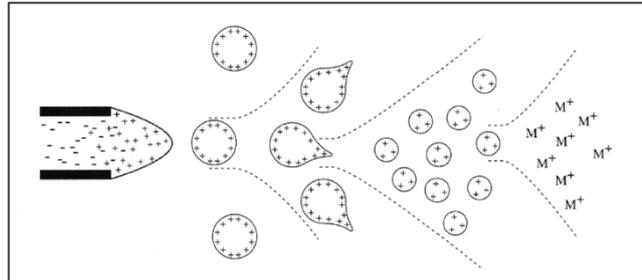
3.14 *Mass Spectroscopy (MS)*

Spektroskopi massa merupakan metode yang menganalisa senyawa berdasarkan berat molekulnya. Keunggulan dari MS yaitu menganalisa suatu data berdasarkan berat molekul dan masing-masing senyawa memiliki berat molekul yang berbeda-beda. Sehingga MS dapat mengidentifikasi suatu analit secara absolut. Jika dibandingkan dengan detektor lain seperti detektor UV, detektor UV menganalisa suatu analit berdasarkan karakteristik dari retensi analit tersebut, namun banyak senyawa yang memiliki karakteristik retensi yang mirip. Sehingga detektor UV tidak dapat mengatakan dua senyawa yang dianalisis tersebut sama secara absolut (Ardrey, 2003).

LC-MS modern dilengkapi dengan sumber ion dimana pelarut dipisahkan dari sampel terionisasi menuju vakum dalam spektrometri massa (McMaster, 2005). *Mass Spectroscopy (MS)* dirancang untuk mengukur rasio massa permuatan (m/z) ion pada fase gas. MS terdiri dari tiga elemen yaitu *ion source*, *mass analyzer*, dan detektor. *Ion source* merupakan komponen yang dapat membuat analit masuk ke dalam spektrometer dan terionisasi. *Mass analyzer* memisahkan ion dengan massa permuatan dan jumlah ion yang dihasilkan dicatat oleh detektor. *Electrospray ionization (ESI)* adalah metode ionisasi sebelum analisis menggunakan MS (Ho dkk., 2003).

Teknik LC-ESI-MS merupakan metode analisis yang sering dikembangkan. Metode LC digunakan untuk memisahkan campuran senyawa menjadi komponen-komponennya. MS digunakan untuk identifikasi senyawa berdasarkan berat molekul dan fragmentasi ion yang terbentuk. Sebelum diidentifikasi dengan MS, analit harus mengalami ionisasi melalui proses ESI (McMaster, 2005). Transfer bentuk ionik dari larutan menuju fase gas melalui metode ESI terdiri dari tiga tahap, yaitu penyebaran semprotan halus dari droplet

bermuatan, penguapan pelarut dan pengeluaran ion dari droplet bermuatan tinggi (Ho dkk., 2003). Mekanisme electrospray dapat dilihat pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Mekanisme *electrospray ionization* (Ho dkk., 2003)

3.15 Protokol Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dapat digunakan untuk memprediksi konsentrasi sampel yang tidak diketahui. Secara umum, seperangkat sampel standar dibuat pada berbagai konsentrasi dengan kisaran yang mencakup tidak diketahui minat dan respon instrumental pada setiap konsentrasi dicatat. Untuk akurasi lebih lanjut dan untuk memahami kesalahan respons pada setiap konsentrasi dapat diulang sehingga bar kesalahan diperoleh. Kurva kalibrasi dapat digunakan untuk menghitung batas deteksi dan batas kuantitasi (JoVe, 2019).

3.16.1 Pembuatan kurva kalibrasi (JoVe, 2019)

1. Data dalam *spreadsheet* dan digunakan program komputer untuk memplot data vs konsentrasi. Jika setidaknya rangkap tiga diambil untuk setiap titik, bar kesalahan dapat diplot dari standar deviasi dari pengukuran kesalahan dari setiap titik. Untuk beberapa kurva, data mungkin perlu diplot dengan sumbu sebagai log untuk mendapatkan garis. Persamaan yang mengatur kurva kalibrasi umumnya diketahui sebelumnya, sehingga plot log digunakan ketika ada log dalam persamaan.
2. Periksa kurva kalibrasi. Apakah terlihat linier? Apakah ada bagian yang terlihat non-linier (misalnya mencapai batas respons instrumental)? Untuk memeriksa, pastikan semua data regresi linier menggunakan perangkat lunak. Jika koefisien determinasi (R^2) tidak tinggi, hapus beberapa titik di awal atau akhir kurva yang tampaknya tidak sesuai dengan garis dan

lakukan regresi linier lagi. Tidak dapat diterima apabila menghapus titik di tengah hanya karena memiliki bar kesalahan besar. Dari analisis ini tentukan bagian kurva apa yang linier.

3. *Output* dari kurva linier harus berupa persamaan $y = mx + b$, dimana m adalah kemiringan dan b adalah intersep- y . Satuan untuk kemiringan adalah satuan/konsentrasi sumbu y , absorbansi/ μM . Unit untuk intersep- y adalah unit sumbu- y . Koefisien determinasi (R^2) diperoleh. Semakin tinggi R^2 , semakin baik pula kecocokannya, kecocokan sempurna memberikan R^2 sebesar 1. Program ini juga dapat memberikan estimasi kesalahan pada kemiringan dan intersep.

3.17 Hipotesis

1. Perbandingan minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan dalam pembuatan nanopartikel dengan metode SNEDDS mempengaruhi ukuran partikel yang dihasilkan berdasarkan penelitian Balakumar dkk., (2013).
2. Uji aktivitas antikanker fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium gujava* L.) terhadap sel T47D dan MCF-7 telah dilakukan oleh Nita (2019) dan memperoleh nilai IC_{50} sebesar 6,95 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel T47D dan 4,38 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel MCF-7. Diharapkan pada penelitian ini dimana dengan sediaan nanopartikel dapat diperoleh nilai IC_{50} yang lebih rendah dan memiliki aktivitas serta efektivitas yang lebih baik.
3. Mengetahui komponen senyawa yang berperan sebagai antikanker pada fraksi n-heksana.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai September 2019 sampai Maret 2020 di Laboratorium Riset Kimia Universitas Islam Indonesia, Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya seperangkat alat gelas, neraca analitik, inkubator, kertas saring, klem dan statif, kolom kromatografi, penyaring vakum, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *Ultrasonic homogenizer* model 300 V/T, botol vial, *plate 96-well, yellow tip, blue tip, laminar air flow (LAF)*, sentrifugator, vorteks, *conical tube, rotary evaporator (Heidolph)*, *Particle Size Analyzer (Horiba Scientific, Nano Particle Analyzer SZ-100)*, *Enzym Linked Immunosorbent (ELISA) reader (Benchmark)* dan *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) UPLC-QToF-MS/MS System (Waters)*.

4.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), etanol 96% (Merck), n-heksana p.a (Merck), aseton (Merck), silica gel 60 (Merck), HCl pekat (Merck), reagen *Dragendroff*, FeCl₃ 1% (Merck), H₂SO₄ pekat (Merck), PBS (*Phospat Buffer Saline*) (Gibco), media kultur *Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640 Hybri-Max[®], sigma)*, media kultur *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*, tripsin-EDTA, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) (Sigma), SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dalam 0,1 N HCl (Merck), formaldehid (Merck), MTT 5 mg/mL (50 mg MTT dan

10 mL PBS), aluminium foil, *tissue*, capryoll, tween 20, PEG (pharmaceutical grade), *aquadest*, sel T47D, sel MCF-7 dan sel Vero.

Formula	Capryoll	Tween 20	PEG	Konsentrasi % fraksi
1	10	70	20	40
2	10	70	20	60
3	10	70	20	80

4.3 Identifikasi Variabel

Pada penelitian ini variabel yang digunakan ditunjukkan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Variabel penelitian

4.4 Tahapan Penelitian

Proses penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu uji determinasi, preparasi sampel, ekstraksi, fraksinasi, uji fitokimia, pembuatan sediaan nanopartikel, uji aktivitas antikanker secara *in vitro*, analisis dengan instrumen.

4.4.1 Uji determinasi

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Sistemika Tumbuhan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Sampel yang digunakan berupa tanaman jambu biji mulai dari bagian pucuk daun hingga bagian akar.

4.4.2 Preparasi daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun dari jambu biji (*Psidium guajava* L.) diasumsikan sebagai variabel bebas dimana bahan baku tersebut didapatkan dari membeli kepada penyedia bahan baku di Yogyakarta. Bahan baku tersebut diangin-anginkan sampai kering. Sebanyak 1 kg sampel kering selanjutnya dihaluskan hingga menjadi serbuk. Serbuk disimpan dalam botol untuk langkah penelitian selanjutnya.

4.4.3 Tahap ekstraksi dengan metode maserasi

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi yaitu dengan memasukkan 700 gram serbuk kering simplisia ke dalam botol kemudian ditambahkan etanol 96% kedalam botol hingga seluruh simplisia terendam dan botol ditutup rapat. Serbuk simplisia direndam selama kurang lebih 12 jam pertama sambil sesekali diaduk agar zat aktif yang terdapat pada simplisia terlarut. Maserat dan filtrat dipisahkan dengan menggunakan kertas saring, diulangi proses penyaringan minimal dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu ± 50 °C hingga kental. Ekstrak kental kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40 °C untuk menghilangkan sisa pelarut sehingga ekstrak yang dihasilkan bebas etanol (Departemen Kesehatan, 2008).

4.4.4 Fraksinasi

Tahapan fraksinasi pada penelitian ini mengikuti petunjuk dari Aditya dkk., (2017). Ekstrak kental etanol sebanyak 139,1 gram diimpregnasi menggunakan silika dan dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana. Larutan fraksi n-heksana yang diperoleh kemudian dilakukan evaporasi untuk memisahkan pelarut dan ekstraknya menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak dari fraksi n-heksana tersebut.

4.4.5 Analisis penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang diperoleh.

4.4.5.2 Identifikasi alkaloid

Menurut Harborne (1987), uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak fraksi n-heksana kedalam 5 mL pelarutnya, kemudian dibagi menjadi dua tabung. Tabung pertama dijadikan sebagai blanko atau tabung kontrol sebagai pembanding. Tabung kedua fraksi n-heksana ditambah 3 tetes pereaksi *Dragendorff*. Terbentuknya endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut

mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi *Dragendorff* akan terbentuk endapan merah jingga.

4.4.5.3 Identifikasi flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak fraksi ke dalam 5 mL pelarutnya, kemudian dibagi menjadi dua tabung. Tabung pertama dijadikan sebagai blanko atau tabung kontrol. Tabung kedua ekstrak fraksi n-heksana ditambahkan 0,05 g serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid (Harbone, 1987).

4.4.5.4 Identifikasi tanin/polifenol

Uji tanin/polifenol dilakukan dengan melarutkan ekstrak fraksi n-heksana dalam 5 mL pelarutnya, kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%. Uji positif ditandai dengan munculnya warna hitam atau biru tua (Harbone, 1987).

4.4.5.5 Identifikasi terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak fraksi n-heksana dengan 0,5 mL pelarutnya, kemudian ditambah asam asetat anhidrat 0,5 mL dan asam sulfat pekat 2 mL melalui dinding tabung. Uji positif steroid ditandai dengan terbentuknya cincin biru kehijauan dan adanya terpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan larutan (Ciulei, 1984).

4.4.6 Karakterisasi menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA)

Pembuatan sediaan nanopartikel

Pembuatan sediaan nanopartikel dengan menambahkan 0,125 mL Capryoll, 0,875 mL Tween 20, 0,25 mL PEG 400 kedalam masing-masing formulasi. Konsentrasi 40% dengan sampel fraksi sebanyak 0,5 gram, Konsentrasi 60% dengan sampel fraksi sebanyak 0,75 gram dan untuk konsentrasi 80% menggunakan sampel fraksi sebanyak 1 gram. Setiap penambahan disonikasi selama 4x2 menit pada masing-masing formulasi.

Ukuran partikel

Sebanyak 1 mL sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji dilarutkan dalam 100 mL akuades, diaduk perlahan hingga membentuk dispersi. Selanjutnya diukur ukuran partikel masing-masing formulasi menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) (Bathia, 2016).

Zeta potensial

Sediaan nanopartikel yang telah dibuat dilarutkan dalam akuades (1:100) dicampur dengan ultrasonik sampai homogen, kemudian larutan jernih ditentukan nilai zeta potensialnya menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) (Rahayu, 2016).

4.4.7 Uji aktivitas antikanker secara *in vitro* (CCRC, 2009)

Proses uji sitotoksik ekstrak etanol daun jambu biji terhadap sel kanker payudara T47D dan MCF-7 dilakukan dengan petunjuk yang termuat dalam jurnal penelitian Dwitiyanti (2015) yaitu pada tahap awal dilakukan persiapan media kultur RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Insitute*) yang selanjutnya dilakukan pengaktifan sel T47D, pemanenan dan perhitungan sel T47D (Doyle dan Griffith, 2000). Tahap selanjutnya yaitu dilakukan uji sitotoksitas dengan metode perhitungan langsung, dimana konsentrasi sampel uji yang digunakan yaitu 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.7.1 Penyiapan sel

Sel kanker payudara T47D dan MCF-7 diambil dari Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada (UGM). Sel kanker dikeluarkan dari *freezer* ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), dihangatkan dalam penangas air pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2-3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan kedalam *conical tube* yang telah berisi 10 mL media RPMI (*Rosewell Park Memorial Insitute*) untuk sel T47D dan media DMEM (*Dulbecco's Modifies Eagle Medium*) untuk sel MCF-7. Kemudian disentrifugasi untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan media. Pelet yang terbentuk dimasukkan kedalam *culture dish* yang berisi 10 mL media dan diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 5% CO_2 , lalu diamati dibawah

mikroskop untuk melihat apakah sel melekat di dasar *culture dish* dan bila jumlah sel di dalam *culture dish* mencapai 70-85% (konfluen), dilakukan panen sel..

Tahapan panen sel yaitu dibuang media kultur terlebih dahulu, ditambah 5 mL PBS (*Phosphate Buffered Saline*) dengan 2 kali pengulangan kemudian dihomogenkan dan dibuang kembali, ditambahkan tripsin secara merata dan diinkubasi selama 3 menit. Media RPMI ditambahkan 5 mL untuk menginaktifkan sel serta dilakukan resuspensi, dilakukan pengamatan dibawah mikroskop *inverted* dan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C/ 5% CO₂ selama 24 jam.

4.4.7.1 Perhitungan sel kanker

Sebanyak 10 µL panen sel diambil dan dipipet ke hemositometer. Sel diamati dibawah mikroskop *inverted* dan dihitung dengan *counter*. Jumlah sel kanker dapat diketahui dengan perhitungan pada persamaan (1) sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel per mL} = \frac{n}{4} \times 10^4 \quad \text{.....(1)}$$

Keterangan:

n = jumlah sel dalam 4 bilik

4.4.7.2 Peletakan sel pada *plate*

Sel diletakkan dalam *plate* tiap sumuran dan ditambahkan media RPMI untuk sel T47D dan media DMEM untuk sel MCF-7. Kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C/ 5% CO₂. Tetapi 4 sumuran bagian bawah pada *plate* disisakan untuk kontrol media. Jumlah sel yang diletakkan pada *plate* setiap sumuran dapat diketahui dengan menggunakan persamaan (2) yaitu:

$$\sum \text{ panen mL panen sel yang ditransfer} = \frac{\sum \text{ total sel yang diperlukan}}{\sum \text{ sel terhitung/mL}} \quad \text{.....(2)}$$

4.4.7.3 Pembuatan larutan sampel

Sampel SNEDDS ekstrak fraksi n-heksana ditimbang sebanyak 10 mg dalam tabung *eppendorf*, dilarutkan ekstrak pekat dalam 100 μ L DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dan diaduk dengan vorteks selama 15 menit hingga larut. Digunakan vorteks karena lebih cepat dalam melarutkan sampel. Diambil sel dari inkubator, kemudian dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate* 180° diatas tempat buangan. Kemudian dimasukkan 200 μ L PBS kedalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu dimasukkan larutan sebanyak 100 μ L dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 μ g/mL dan dilakukan pengulangan sebanyak 4x , diinkubasi kembali selama 24 jam.

4.4.7.4 Penambahan larutan MTT (Reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltrazolium bromide)

Media sel dibuang dengan cara dibalik *plate* dan dicuci dengan PBS, ditambahkan larutan MTT (reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) berwarna kuning 100 μ L kesetiap sumuran. Inkubasi kembali selama 3-4 jam di dalam inkubator pada suhu 37 °C/ 5% CO₂. Kemudian diamati kondisi sel dengan mikroskop, lalu ditambahkan *stopper* SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% dalam 0,1 N HCl. Selanjutnya *plate* ditutup dan diinkubasi di tempat gelap dalam suhu ruangan selama semalam.

Langkah selanjutnya yaitu pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA *reader* untuk mengetahui nilai IC₅₀ setiap konsentrasi ekstrak. Tahapan awalnya ini dihidupkan ELISA *reader* dan ditunggu hingga *progeessing* selesai, dibuka pembungkus *plate* dan tutup *plate* kemudian dimasukkan ke ELISA *reader*, dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 550-600 nm. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 595 nm, dimatikan kembali ELISA *reader*. Lalu dihitung prosentase sel hidup dengan persamaan (3).

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{A-B}{C-B} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan :

A = absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel)

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi control negatif (sel + media kultur)

Data dari prosentase sel hidup kemudian dianalisis dengan *microsoft excel* untuk mengetahui nilai IC_{50} .

4.4.7.5 Analisis dengan LC-MS/MS

Fraksi n-heksana dianalisis menggunakan *LC-MS/MS UPLC-QToF-MS/MS System (waters)*. Olah data menggunakan *software* MassLynk versi 4.1. Kolom yang digunakan yaitu Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2.1x50 mm, injeksi 5 μ L, 40 °C, eluen A: campuran H₂O dan 0,1% *formic acid*, eluen B: campuran *Acetonitrile* dan 0,1% *formic acid*. Proses LC-MS/MS menggunakan XEVO – G2QTOF (Waters), ESI *positive (resolution mode)*, *capillary voltage*: 3 kV, *sample cone voltage*: 38 V, *Desolvation T*: 300 °C, *Source T*: 100 °C, *Desolvation gas*: 500 L/h, *Cone gas*: argon, *Colision energy*: 10-30 V.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Uji Determinasi

Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas botani dari tanaman jambu biji yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Berdasarkan hasil determinasi yang telah dilakukan, diketahui bahwa sampel tanaman daun jambu biji yang digunakan berasal dari kingdom *plantae*, genus *psidium*, spesies *Psidium guajava* L., familia *myrtaceae*, ordo *myrtales*, kelas *magnoliopsida*, divisi *tracheophyta*. Hasil uji determinasi disajikan pada Lampiran 1.

5.2 Persiapan Sampel

Daun jambu biji dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terpapar sinar matahari langsung untuk menghindari kerusakan komposisi kimia pada sampel daun yang digunakan. Proses pengeringan bertujuan agar dapat menghilangkan kandungan air yang terdapat pada sampel dan untuk mencegah tumbuhnya jamur sehingga sampel dapat tahan lama. Setelah itu proses penghancuran sampel menjadi serbuk karena ukuran sampel yang semakin kecil permukaan kontak sampel akan semakin besar. Permukaan kontak sampel yang lebih besar dapat meningkatkan interaksi antara pelarut dengan sampel semakin optimal sehingga rendemen ekstrak yang diperoleh semakin besar.

5.3 Ekstraksi Daun Jambu biji

Sampel serbuk daun jambu biji diekstraksi menggunakan metode maserasi dingin dengan pengulangan (remaserasi). Maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Proses maserasi dilakukan selama 24 jam. Pelarut etanol memiliki titik didih cukup rendah, dapat melarutkan senyawa yang sesuai serta memiliki harga yang terjangkau (Guenther, 2006). Alkohol merupakan pelarut yang baik untuk ekstraksi pendahuluan karena dianggap dapat mengikat semua komponen kimia yang terdapat dalam tumbuhan bahan alam (Harbone, 1987).

Remaserasi dilakukan untuk memperoleh hasil ekstraksi yang lebih optimal, karena dekstruksi dilakukan beberapa kali sehingga dapat memperoleh senyawa dalam sampel dengan maksimal. Proses maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam.

Metode maserasi yang digunakan yaitu maserasi dingin. Proses maserasi yang tidak menggunakan panas, sehingga dapat mencegah rusak atau hilangnya senyawa yang tidak tahan panas. Metode ini menggunakan peralatan yang sederhana dan mudah untuk dilakukan. Saat proses ekstraksi, rendaman disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya secara langsung untuk mencegah reaksi yang dikatalisis oleh cahaya. Hasil rendaman disaring kemudian ekstrak yang masih berupa cairan diuapkan menggunakan evaporator hingga diperoleh ekstrak kental berwarna hijau pekat. Hasil maserasi serbuk daun jambu biji ditunjukkan pada **Tabel 3** dengan perhitungan rendemen berat ekstrak pekat pada **Lampiran 4.1**.

Tabel 3. Hasil maserasi serbuk daun jambu biji (*Psidium guajava L.*)

Pelarut	Perubahan warna filtrat	Warna ekstrak	Serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%) (b/b)
Etanol 96%	Hijau	Hijau pekat	750	265,935	35,458

5.4 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan komponen-komponen atau senyawa dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Proses fraksinasi dilakukan menggunakan kolom fraksinasi. Pelarut yang digunakan yaitu n-heksana yang bersifat non polar. Fraksi n-heksana dipilih karena berdasarkan penelitian Nita (2019) yang melakukan uji aktivitas antikanker dari beberapa fraksi yaitu fraksi etanol, n-heksana, dan etil asetat diperoleh bahwa fraksi n-heksana yang paling selektif terhadap sel kanker payudara dibandingkan fraksi etanol dan etil asetat. Fraksi yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat fraksi n-heksana digunakan sebagai sampel uji penapisan fitokimia, untuk pembuatan sediaan nanopartikel, uji LCMS/MS dan uji aktivitas antikanker secara *in vitro* terhadap sel T47D dan MCF-7.

Rendemen yang diperoleh ditunjukkan pada **Tabel 4** dengan perhitungan rendemen terlampir pada **Lampiran 4.1**.

Tabel 4. Hasil fraksinasi daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Ekstrak	Perubahan warna larutan fraksi	Warna ekstrak pekat	Berat sampel (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/b)
Fraksi n-Heksana	Kuning jingga	Hijau kehitaman	175,092	14,203	8,11

5.5 Analisis Penapisan Fitokimia

Identifikasi kandungan kimia dilakukan dengan tujuan untuk memberikan gambaran mengenai golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu ekstrak (Kristianti dkk., 2008). Uji fitokimia merupakan uji secara kualitatif untuk mengidentifikasi kandungan senyawa dalam suatu sampel. Analisis penapisan fitokimia pada penelitian ini meliputi uji terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan tanin/polifenol. Hasil uji penapisan fitokimia fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) ditunjukkan pada **Tabel 5** dan terlampir pada **Lampiran II**.

Tabel 5. Hasil uji fitokimia ekstrak daun jambu biji fraksi n-heksana

Bahan Uji	Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil Pengamatan	Hasil Uji
Fraksi n-heksana	Alkaloid	<i>Dragendorf</i>	Tidak terbentuk larutan jingga	(-)
	Flavonoid	HCl + Mg	Larutan hijau	(+)
	Terpenoid	+ Asam asetat anhidrat + H ₂ SO ₄	Adanya cincin coklat pada perbatasan larutan	(+)
	Tanin/polifenol	FeCl ₃	Lapisan larutan hijau kehitaman	(+)

Keterangan : (+) = positif (terdapat senyawa)

(-) = negatif (tidak terdapat senyawa)

4.5.1 Analisis Hasil Penapisan Fitokimia

Hasil uji penapisan fitokimia terhadap fraksi n-heksana daun jambu biji menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, terpenoid dan tanin/polifenol, namun tidak mengandung senyawa alkaloid. Pada

penelitian yang dilakukan oleh Fajar dkk., (2011) menyatakan bahwa hasil uji fitokimia pada ekstrak etanol mengandung senyawa flavonoid, steroid, dan tanin/polifenol tetapi tidak mengandung senyawa alkaloid. Menurut Adeyemi dkk., (2009) bahwa ekstrak etanol daun jambu biji *Psidium guajava* L. tidak mengandung senyawa golongan alkaloid.

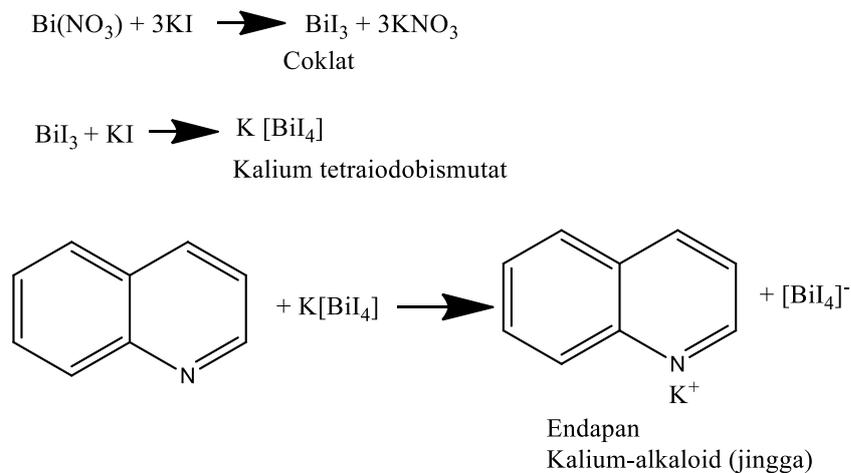
Tabel 6. Kandungan senyawa dalam ekstrak etanol daun *Psidium guajava* L. (Adeyemi dkk., 2009)

Senyawa	Hasil Uji
Alkaloid	-
Steroid	+
Tanin/Polifenol	++
Antrakuinon	-
Terpenoid	+
Flavonoid	+++
Saponin	+

- = tidak ada; + = ada rendah; ++ = ada sedang
; +++ = ada tinggi

4.5.2 Uji alkaloid

Uji alkaloid dengan pereaksi *Dragendorff* yang dibuat dari bismuth nitrat dan dilarutkan pada HCl. Penambahan asam bertujuan untuk mencegah reaksi hidrolisis bismut karena garam bismut mudah terhidrolisis membentuk ion bismut. Hasil positif uji alkaloid ditandai dengan terbentuknya warna coklat hingga jingga. Menurut Svehla (1990) warna tersebut adalah kalium-alkaloid yang berasal dari pembentukan ikatan kovalen koordinasi antara atom N pada alkaloid dengan ion K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi antara alkaloid dengan reagen *Dragendorff* ditunjukkan pada **Gambar 11**.



Gambar 11. Reaksi alkaloid dengan reagen *Dragendorff* (Miroslav, 1971)

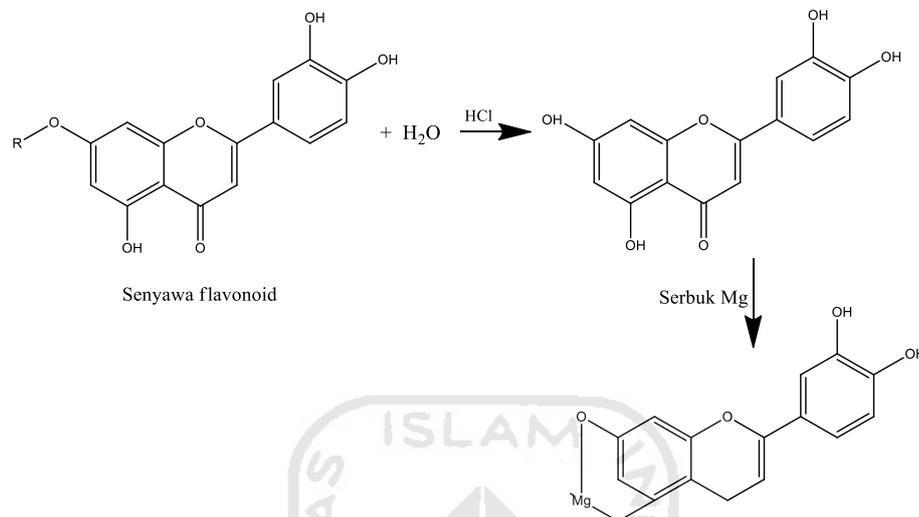
Berdasarkan uji alkaloid yang telah dilakukan diketahui bahwa ekstrak daun jambu biji fraksi n-heksana tidak menunjukkan adanya perubahan larutan menjadi jingga. Sehingga hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi n-heksana tidak mengandung senyawa alkaloid.

4.5.3 Uji flavonoid

Identifikasi senyawa golongan flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi *Wilstater* yaitu penambahan asam klorida (HCl) pekat dan serbuk magnesium (Mg) dalam tabung reaksi. Senyawa flavonoid merupakan senyawa polifenol dengan susunan C₆-C₃-C₆ sebagai kerangka dasar.

Penambahan HCl pekat bertujuan untuk menghidrolisis senyawa flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H⁺ dari asam karena sifatnya elektrofilik. Reduksi Mg dan HCl pekat menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavonon dan xanton (Marliana, 2006). Apabila terjadi perubahan warna menjadi merah tua sampai ungu pada uji flavonoid dengan metode *Wilstater* maka dalam ekstrak tersebut mengandung flavonoid. Warna merah sampai jingga diberikan oleh senyawa flavon, warna merah tua diberikan oleh senyawa flavonol atau flavonon dan warna hijau diberikan oleh senyawa glikon atau glikosida. Berdasarkan hasil uji fraksi n-heksana menunjukkan terjadinya perubahan warna

menjadi hijau yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid berupa glikon atau glikosida. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat ditunjukkan pada **Gambar 12**.



Gambar 12. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat

4.5.4 Uji terpenoid

Identifikasi senyawa golongan terpenoid menggunakan pereaksi *Lieberman-Buchard* yaitu campuran antara asam asetat anhidrida dan H_2SO_4 pekat. Hasil positif pada uji terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin coklat atau violet pada perbatasan larutan. Menurut Siadi (2012) warna tersebut timbul karena adanya oksidasi pada senyawa terpenoid dengan membentuk ikatan rangkap terkonjugasi. Prinsip dalam reaksi uji terpenoid adalah kondensasi atau pelepasan H_2O dan penggabungan karbokation. Reaksi pada uji terpenoid dimulai dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrat. Kemudian gugus asetil lepas dan terbentuk ikatan rangkap. Reaksi berlanjut dengan terjadinya pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya dan mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa kemudian mengalami resonansi dan bertindak sebagai karbokation. Karbokation menyebabkan terjadinya reaksi elektrofilik diikuti dengan pelepasan hidrogen beserta elektronnya, sehingga senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan perubahan warna coklat pada larutan (Siadi, 2012).

5.6 Karakterisasi *Particle Size Analyzer* (PSA)

Ukuran partikel

Ukuran partikel adalah hal yang sangat penting dalam menentukan laju dan jumlah obat yang dapat diserap pada sistem pencernaan dalam tubuh manusia. Obat akan menyebar lebih cepat ke dalam sistem pencernaan manusia dengan ukuran yang lebih kecil. Semakin kecil ukuran partikel maka semakin besar luas permukaan obat yang didapatkan. Hal ini akan meningkatkan penyerapan obat oleh nanopartikel ke dalam sistem pencernaan manusia, sehingga aktivitas obat lebih optimal dan efisien. Jika partikel obat dalam ukuran besar cenderung tidak dapat dicerna dengan baik. Nanopartikel dapat meningkatkan penyerapan obat dalam sistem pencernaan manusia lebih optimal. Sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji fraksi n-heksana menggunakan metode SNEDDS dilakukan dengan beberapa konsentrasi yaitu 40%; 60% dan 80% dengan perbandingan antara capryoll : tween : PEG (Poli Etilen Glikol) yaitu 10:70:20. Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji dengan menggunakan PSA ditunjukkan pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji

Formula	Konsentrasi Ekstrak	Ukuran Partikel (nm) \pm SD	<i>Polidispers Index</i> \pm SD	<i>Zeta Potensial</i> \pm SD
(10:70:20)	40%	391,6 \pm 4,887	0,66 \pm 0,03	-24,3 \pm 0,45
	60%	462,83 \pm 33,14	0,52 \pm 0,07	20,4 \pm 0,45
	80%	335,46 \pm 13,74	0,56 \pm 0,03	-60,9 \pm 0,78

Pada **Tabel 6** menunjukkan bahwa ukuran partikel pada konsentrasi 40%, 60% dan 80% dapat dikategorikan sebagai nanopartikel, karena menurut Rawat dkk., (2006) sebuah partikel dapat dikatakan nano apabila memiliki ukuran partikel antara 1-1000 nm sudah dapat dikatakan sebagai sistem nanopartikel.

Ukuran partikel dari suatu ukuran nano yang ideal berada pada ukuran yang tidak lebih dari 200 nm atau berada disekitar 200 nm (Balakumar dkk., 2013). Dari tabel 5 dapat dijelaskan bahwa formula dengan konsentrasi ekstrak fraksi n-heksana 40%, 60% dan 80% dapat dikatakan sebagai ukuran nano yang

kurang ideal, karena berada di atas 200 nm. Selain itu formula-formula yang dihasilkan telah memenuhi syarat ukuran yang bisa menembus jaringan epitel pada usus, yaitu berukuran dibawah 500 nm.

Berdasarkan nilai indeks polidispersitas yang diperoleh dari pengukuran sediaan nanopartikel fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan berbagai konsentrasi ekstrak fraksi menggunakan metode SNEDDS tidak melebihi 0,7 sehingga mengindikasikan bahwa distribusi partikel bersifat cukup homogen. Dalam sistem penghantaran obat, semakin kecil ukuran partikel akan menyebabkan luas permukaan antar muka yang disediakan untuk penyerapan obat juga semakin besar (Balakumar dkk., 2013). Berdasarkan ketiga konsentrasi yang dibuat, formulasi yang memiliki ukuran partikel paling kecil terdapat pada konsentrasi ekstrak fraksi n-heksana 80% dengan ukuran 335,6 nm.

Zeta potensial

Pengukuran nilai zeta potensial sangat penting dilakukan untuk mengetahui kestabilan ukuran partikel dari sediaan yang telah dibuat. Zeta potensial biasanya digunakan untuk karakterisasi sifat muatan permukaan partikel, berkaitan dengan interaksi elektrostatis dari nanopartikel tersebut. Interaksi elektrostatis akan menentukan kecenderungan agregasi dan tolak menolak yang berdampak pada kestabilan ukuran partikel dari suatu sediaan obat. Meningkatnya muatan elektrostatis diantara gumpalan-gumpalan akan mencegah penggabungan partikel dalam emulsi. Sedangkan pengurangan muatan elektrostatis dapat menyebabkan pemisahan fasa. Muatan elektrostatis dapat dikendalikan dengan melihat nilai zeta potensial (Vaugh dan Williams, 2007).

Menurut Murdock dkk., (2008) nanopartikel dengan nilai zeta potensial lebih kecil dari -30 mV dan lebih besar dari +30 mV memiliki stabilitas lebih tinggi. Berdasarkan **Tabel 5** menunjukkan bahwa nilai zeta potensial dari konsentrasi fraksi n-heksana 40%, 60% dan 80% tidak mendekati 0, sehingga mengindikasikan bahwa kestabilan fasa pada sediaan nanopartikel cukup tinggi (Balakumar dkk., 2013).

Nilai zeta potensial dapat dikatakan memenuhi kebutuhan standar zeta potensial untuk stabilitas sistem dan semakin tinggi nilai zeta potensial SNEDDS dapat menghasilkan formulasi nanopartikel yang lebih stabil sehingga dapat bertahan untuk waktu yang lama. Nilai zeta potensial yang rendah, maka daya tarik akan meningkat dan akan menyebabkan agregasi yang dapat merusak sistem emulsi.

5.7 Uji Aktivitas Antikanker Secara *In Vitro* Dengan Metode MTT

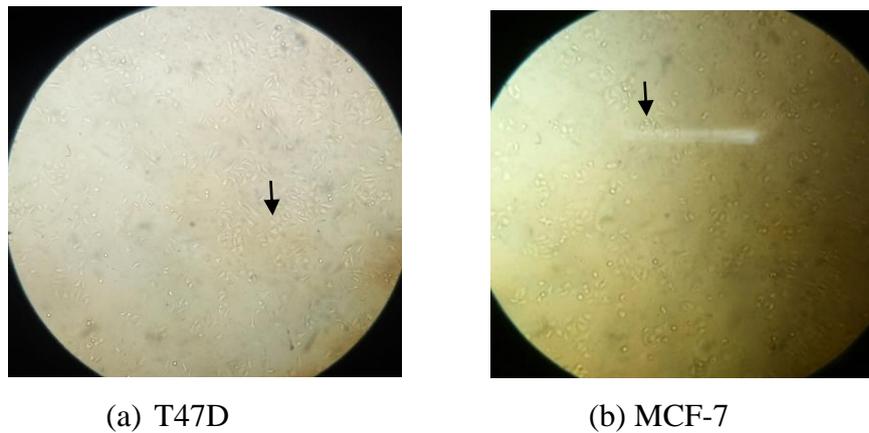
Pengujian antikanker dilakukan untuk mengetahui potensi fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dengan menggunakan beberapa konsentrasi yaitu 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Penggunaan sampel fraksi n-heksana daun jambu biji dalam bentuk SNEDDS bertujuan mengidentifikasi aktivitas terhadap sel kanker payudara dan melihat efektifitas tiap konsentrasi fraksi terhadap sel kanker payudara.

Uji aktivitas antikanker dilakukan secara *in vitro* menggunakan sel kanker payudara T47D dan MCF-7. Penelitian ini dilakukan berdasarkan literatur dari peneliti terdahulu yang menyebutkan bahwa ekstrak daun jambu biji memiliki aktivitas sebagai pencegah kanker (Dwitiyanti, 2015). Berdasarkan penelitian Dwitiyanti (2015) hanya dilakukan uji aktivitas ekstrak etanol dari daun jambu biji terhadap sel kanker T47D diperoleh nilai LC_{50} sebesar 27,54 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu juga penelitian yang dilakukan oleh Nita (2019) menggunakan fraksi n-heksana untuk uji antikanker payudara terhadap sel T47D dan MCF-7 diperoleh nilai IC_{50} sebesar 8,89 $\mu\text{g/mL}$ untuk sel T47D dan 5,04 $\mu\text{g/mL}$ untuk sel MCF-7. Sehingga pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antikanker pada ekstrak fraksi n-heksana dengan modifikasi dalam bentuk sediaan nanopartikel. Pengujian secara *in vitro* dengan menggunakan metode MTT (*Microculture tetrazolium*). Metode MTT merupakan metode pengujian aktivitas sel terhadap perubahan warna atau reaksi kolorimetri pada bioreduksi garam tetrazolium ke formazan (Goodwin dkk., 1995). Metode MTT umum digunakan dalam pengujian secara *in vitro*

karena merupakan metode yang cepat, sensitif dan hanya membutuhkan sedikit bahan uji (Freshney, 1992).

Tahapan uji aktivitas antikanker secara *in vitro* yaitu penyiapan sel kanker, panen sel, uji sitotoksitas, pemberian reagen MTT dan pembacaan absorbansi menggunakan *Elisa reader*. Penyiapan sel kanker dilakukan dengan mengaktifkan sel serta menumbuhkan kembali hingga kofluen. Kofluensi sel merupakan tumbuh homogenya atau meratanya sel sebagai *monolayer* yang menutupi *cover glass*. Pada tahap panen sel terjadi penumbuhan dan pembiakan sel dengan penambahan media kultur dengan prinsip melepaskan ikatan antara sel dengan matrik dan ikatan antar sel tanpa merusak sel. Media kultur yang digunakan untuk sel T47D adalah RPMI karena mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh sel seperti asam amino, glukosa, fungison (antijamur), vitamin dan serum. Serum yang digunakan yaitu FBS (Fetal Bovine Serum) berasal dari serum sapi yang mengandung hormon untuk memacu pertumbuhan sel (Freshney, 1998). Sel MCF-7 menggunakan media kultur DMEM.

Pada tahap panen sel dilakukan penambahan tripsin yang bertujuan untuk melepaskan interaksi antara sel dengan wadah. Perhitungan sel kanker digunakan metode perhitungan langsung menggunakan hemositometer dan pengamatan dibawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui jumlah sel yang akan digunakan bahan uji dengan *out put* berupa data. Hasil perhitungan sel yang diperoleh untuk sel kanker payudara T47D adalah $138,5 \times 10^4 / \text{mL}$ dan untuk sel MCF-7 adalah $46,25 \times 10^4 / \text{mL}$. Morfologi sel T47D dan MCF-7 sebelum dilakukan *treatment* ditunjukkan pada **Gambar 14**.



Gambar 14. Morfologi Sel T47D dan MCF-7 sebelum dilakukan *treatment*

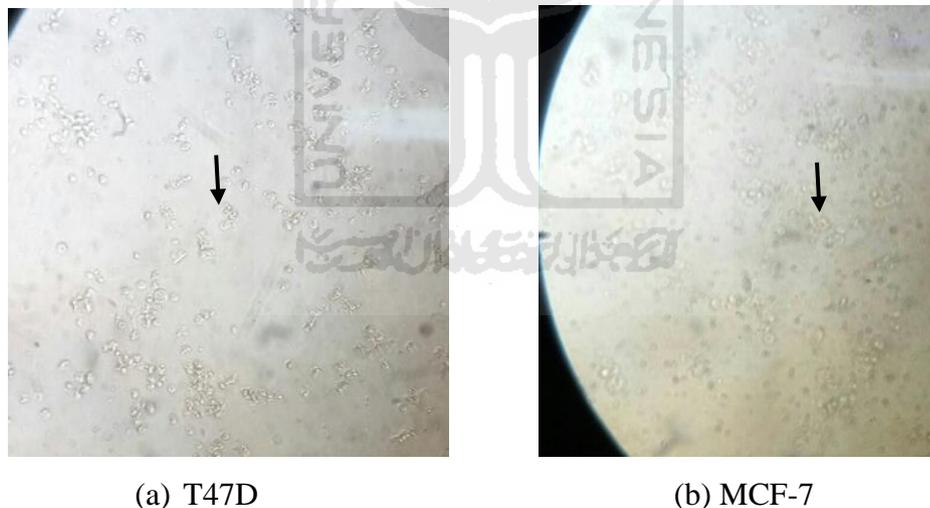
Tahap uji sitotoksik meliputi subkultur sel, preparasi sampel dan *treatment* sel. Pada tahapan subkultur sel dilakukan pemindahan sel dari kondisi konfluen ke tempat yang masih kosong. Tujuan subkultur adalah agar sel yang digunakan tumbuh secara maksimal pada medianya (CCRC, 2009). Sel yang diambil untuk dikultur kembali untuk sel T47D sejumlah 772 μL dan untuk sel MCF-7 sejumlah 2162 μL .

Pada tahap panen sel, sel dikultur kembali menjadi beberapa kelompok yaitu kontrol sel, kontrol media, kelompok uji. Kelompok uji terdiri dari formulasi nanopartikel fraksi n-heksana dengan konsentrasi 40%, 60% dan 80%. Capryoll, Tween, dan PEG yang merupakan campuran dalam pembuatan sediaan nanopartikel tersebut juga dilakukan uji sitotoksitasnya untuk mengetahui apakah komponen SNEDDS ini memiliki sifat toksik terhadap sel kanker atau tidak. Suspensi sel dipipet 100 μL kedalam plate 96 kecuali kelompok kontrol media. Selanjutnya plat diinkubasi di dalam inkubator CO_2 5%/ 37 °C selama 24 jam agar sel menempel pada dasar *plate*. Sel di inkubasi dengan tujuan agar sel mencapai fase logaritmik yaitu fase dimana sel berada pada pertumbuhan yang optimum. Fase logaritmik ditandai dengan sel konfluen 80% menutupi permukaan wadah medium (CCRC, 2008).

Tahap selanjutnya adalah preparasi sampel meliputi pelarutan sampel dan pembuatan larutan seri konsentrasi. Sampel yang digunakan pada penelitian ini

adalah SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). Pelarutan sampel dengan menggunakan pelarut dimetilsulfoksida (DMSO). DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar, selain itu DMSO dipilih karena tidak toksik terhadap sel. Larutan stock dibuat dengan menimbang 10 mg sampel kemudian dilarutkan dengan DMSO 100 μL dan kemudian di vortex hingga homogen. Kemudian dibuat pengenceran bertingkat dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ dengan pelarut media komplet RPMI untuk sel T47D dan media komplet DMEM untuk sel MCF-7. Selanjutnya dipipet 100 μL larutan uji kedalam sumuran masing-masing 4 replikasi untuk setiap konsentrasi kecuali pada sumuran kontrol sel hanya dipipet dengan media 100 μL . Kemudian *plate* diinkubasi kembali dalam inkubator CO_2 5%/ 37 °C selama kurang lebih 24 jam.

Pengamatan morfologi sel setelah di *treatment* di bawah mikroskop *inverted* pada sel T47D dan MCF-7 ditunjukkan pada **Gambar 15**.



Gambar 15. Morfologi sel T47D dan MCF-7 setelah dilakukan *treatment*

Gambar 15 menunjukkan adanya perbedaan morfologi hasil *treatment* pada masing-masing sel. Pada sel T47D struktur sel menjadi kecil-kecil dan terlihat adanya kerusakan inti sel. Sedangkan pada sel MCF-7 tampak adanya perbedaan morfologi sel hanya pada konsentrasi yang cukup tinggi. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan interaksi antara senyawa yang terkandung pada

setiap fraksi n-heksana dengan sel kanker payudara sehingga menyebabkan kematian sel yang berbeda pula.

Hasil *treatment* tidak dapat diamati secara kasat mata, namun dapat diamati dengan mikroskop *inverted* dan penambahan reagen MTT karena akan terjadi reaksi kolorimetri. Pengujian dengan menggunakan larutan MTT (*4,5-dimethylthiazol-2-yl*)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) dilakukan dengan membuat 1 mL MTT stock dan ditambah 9 mL media komplit. Selanjutnya dimasukkan larutan ke dalam tiap sumuran lalu diinkubasi selama 4 jam. Pada saat inkubasi, MTT yang berwarna kuning akan dimetabolisme oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel hidup menjadi kristal formazan berwarna ungu (Freshney, 1992). Setelah diinkubasi selama 4 jam, kemudian reaksi dihentikan menggunakan reagen *stopper* yaitu SDS 10%. Reagen *stopper* berfungsi melarutkan kristal formazan yang direduksi oleh sistem reduktase sel. Kemudian plat disimpan di tempat tertutup dan pada suhu ruang selama semalam. Selanjutnya absorbansi diukur menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Penggunaan panjang gelombang 595 nm dikarenakan warna yang tampak pada larutan adalah ungu kebiruan yang akan menyerap warna kuning dari spektrum sinar tampak (Effendy, 2007).

Perubahan warna yang terjadi pada penelitian ini dapat diamati setelah proses MTT. Pada sel kanker T47D dengan larutan uji SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji 80% dan 60% pada konsentrasi 1000, 500, 250 dan 125 µg/mL terjadi perubahan warna dari warna merah muda yang dihasilkan oleh media RPMI 1640 mengandung bikarbonat, vitamin, *phenol red*, asam amino, CaCl₂, NaCl, serum dan glukosa menjadi berwarna kuning setelah dilakukan penambahan reagen MTT dengan inkubasi selama 4 jam dan penambahan larutan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) yang berfungsi menghentikan reaksi MTT. Sedangkan untuk SNEDDS fraksi n-heksana 40% terjadi perubahan warna dari warna merah muda menjadi kuning pada konsentrasi 1000, dan 500 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut sel kanker telah mati yang artinya tidak ada enzim reduktase yang dihasilkan untuk mereduksi garam

tetrazolium menjadi kristal formazan yang berwarna ungu. Sedangkan pada konsentrasi 62,5; 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ untuk SNEDDS fraksi n-heksana 80% dan 60% menghasilkan warna ungu yang menunjukkan adanya enzim reduktase dari mitokondria sel yang masih hidup. Sedangkan pada SNEDDS fraksi n-heksana 40% dengan konsentrasi 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan warna ungu. Hasil tersebut menunjukkan bahwa masih terdapat aktivitas antikanker atau jumlah sel hidup masih cukup banyak pada konsentrasi yang rendah.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut dapat diketahui bahwa adanya hubungan antara aktivitas sel hidup dan warna yang dihasilkan (Mosman, 1983). Semakin ungu warna yang dihasilkan maka semakin banyak jumlah sel hidup karena sel tersebut melakukan reaksi metabolisme sehingga warna ungu semakin pekat dan jumlah kristal formazan semakin banyak. Sehingga adanya hubungan antara warna ungu yang dihasilkan dengan nilai absorbansi, dimana jika warna ungu semakin pekat maka nilai absorbansi akan semakin tinggi. Metode dalam uji sitotoksitas yang sering digunakan yaitu metode MTT karena dapat menunjukkan hubungan antara jumlah sel hidup dan absorbansi yang diperoleh untuk mendapatkan nilai IC_{50} .

Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi sel hidup. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik (Sitorus, 2013). Senyawa campuran dapat menunjukkan aktivitas antikanker yang dapat menghambat proliferasi sel serta sangat potensial sebagai agen kemoprevensi jika nilai $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, yaitu senyawa yang dapat mencegah proses karsinogenesis yang memicu kanker. Nilai IC_{50} yang diperoleh ditunjukkan pada **Tabel 8**.

Tabel 8. Nilai IC_{50} uji aktivitas antikanker

Sampel	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) \pm \text{SD}$	
	T47D	MCF-7
SNEDDS Fraksi n-heksana 40%	5,988 \pm 6,277	154,539 \pm 54,852
SNEDDS Fraksi n-heksana 60%	8,404 \pm 6,055	140,393 \pm 36,18
SNEDDS Fraksi n-heksana 80%	9,323 \pm 4,555	109,414 \pm 30,336

Suatu ekstrak dapat dikatakan memiliki potensi antikanker apabila memiliki nilai $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$, *moderate* aktif apabila memiliki nilai $30 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ dan kurang aktif apabila memiliki nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (Rahmawati dkk., 2013). Nilai IC_{50} yang kecil menunjukkan bahwa ekstrak dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dimana, jika dengan konsentrasi kecil memiliki daya penghambat yang besarsehingga dapat dikatakan ekstrak tersebut sangat efektif. Berdasarkan Tabel 6 menunjukkan bahwa SNEDDS fraksi n-heksana 40%, 80% dan 60% aktif terhadap T47D. Sedangkan untuk MCF 7 SNEDDS fraksi n-heksana 40%, 60% dan 80% kurang aktif terhadap sel MCF-7 karena memiliki nilai IC_{50} lebih dari $100 \mu\text{g/mL}$.

Perbedaan nilai IC_{50} antar sel terjadi karena adanya perbedaan karakteristik masing-masing sel yang digunakan. Sel kanker payudara MCF-7 memiliki karakteristik resisten agen kemoterapi, mengekspresikan reseptor estrogen (ER +) dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki dkk., 2003; Prunet dkk., 2005). Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Missence mutation* terjadi pada residu 194 (dalam zinc-binding domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan *response element* pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi *cell cycle*. Sel T47D merupakan sel kanker payudara ER/PR-positif (Schafer dkk., 2000).

Menurut Zakaria dkk., (2011) mekanisme kerja antara senyawa metabolit dengan senyawa lain memiliki perbedaan diantaranya, flavonoid sebagai antikanker dengan cara memodulasi penahanan siklus sel pada fase G1 menuju fase S. Saponin dan triterpenoid dengan cara merusak permeabilitas membran mitokondria pada sel atau menyebabkan sel mengalami nekrosis dan kematian. Perbedaan aktivitas fraksi diduga karena adanya interaksi yang berbeda pada sel yang berbeda pula.

Mekanisme penghambatan dari setiap senyawa berbeda-beda terhadap sel yang berbeda pula. Namun, secara umum dapat dijelaskan yaitu dalam suatu sel kanker terdapat DNA dimana terjadi suatu siklus sel yang nantinya terus

berkembang atau berproliferasi dengan cepat sehingga sulit untuk dihentikan. Dengan adanya suatu senyawa tersebut maka akan masuk ke dalam DNA dan berikatan sehingga akan menghambat proses replikasi dari DNA sel tersebut dan terjadilah penghambatan pada pertumbuhan sel kanker tersebut. Dimana menurut Harahap (2003) secara umum guanin biasanya terlibat dalam proses alkilasi pengobatan antikanker. Pembentukan alkil guanin yang disusul dengan pembentukan tautan silang (*crosslink*) menandakan sitotoksitas.

5.8 Hasil pengujian aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D

Pengujian aktivitas antikanker fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D berupa % viabilitas, dimana viabilitas sel merupakan nilai yang menunjukkan jumlah sel yang masih hidup. Hasil uji ditunjukkan pada **Tabel 9**.

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D

Fraksi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata absorbansi \pm SD	Viabilitas sel (%) \pm SD
SNEDDS N-heksana 80%	1000	0,156 \pm 0,027	-4 \pm 6,189
	500	0,133 \pm 0,001	-9,583 \pm 10,695
	250	0,113 \pm 0,022	-14,583 \pm 13,593
	125	0,127 \pm 0,014	-11,25 \pm 13,418
	62,5	0,193 \pm 0,011	5,25 \pm 9,29
	31,25	0,278 \pm 0,017	26,853 \pm 7,747
	15,625	0,307 \pm 0,01	33,75 \pm 13,502
SNEDDS N-heksana 60%	1000	0,345 \pm 0,182	43,25 \pm 44,888
	500	0,254 \pm 0,074	20,667 \pm 28,062
	250	0,155 \pm 0,02	-4,083 \pm 9,638
	125	0,155 \pm 0,031	-4,166 \pm 6,788
	62,5	0,228 \pm 0,091	14,083 \pm 12,145
	31,25	0,291 \pm 0,004	29,75 \pm 12,033
	15,625	0,308 \pm 0,001	34 \pm 11,076
SNEDDS N-heksana 40%	1000	0,157 \pm 0,037	-3,667 \pm 17,734
	500	0,132 \pm 0,005	-9,916 \pm 10,889
	250	0,29 \pm 0,22	29,5 \pm 54,997
	125	0,2694 \pm 0,02	24,334 \pm 16,606
	62,5	0,2867 \pm 0,005	28,667 \pm 11,511
	31,25	0,304 \pm 0,003	33 \pm 11,532

15,625 0,3173 ± 0,018 36,334 ± 14,571

*Perhitungan analisa viabilitas sel dan grafik uji sitotoksitas *Psidium guajava* L.

SNEDDS fraksi n-heksana disajikan pada **Lampiran IV**.

Berdasarkan **Tabel 9** menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama yaitu 500 µg/mL SNEDDS fraksi n-heksana 80% memiliki viabilitas sel kurang dari 50% yaitu -9,583%, pada SNEDDS fraksi n-heksana 60% memiliki viabilitas 20,667% dan SNEDDS fraksi n-heksana 40% memiliki viabilitas yang sangat rendah yaitu -9,916%. Hal ini menunjukkan pada konsentrasi tersebut yang memiliki daya hambat lebih besar adalah SNEDDS fraksi n-heksana 40% karena jumlah sel yang mati banyak. Viabilitas sel berbanding lurus dengan konsentrasi. Viabilitas sel atau jumlah sel hidup dari ketiga formulasi fraksi pada konsentrasi yang cukup tinggi menunjukkan efektivitas penghambatan yang berbeda dari tiap konsentrasi fraksi. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa SNEDDS fraksi n-heksana 40% memiliki efektivitas yang lebih baik dalam menghambat sel T47D dibandingkan dengan SNEDDS fraksi n-heksana 60% dan 80%.

5.9 Hasil pengujian aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel MCF-7

Pengujian aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel MCF-7 berupa % viabilitas, dimana viabilitas sel merupakan nilai yang menunjukkan jumlah sel yang masih hidup. Hasil uji ditunjukkan pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Hasil uji aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel MCF-7

Fraksi	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata absorbansi ± SD	Viabilitas sel (%) ± SD
SNEDDS N-heksana 40%	1000	0,0081 ± 0,003	-16,445 ± 7,812
	500	0,084 ± 0,001	-13,334 ± 13,856
	250	0,126 ± 0,002	44,445 ± 9,828
	125	0,155 ± 0,0043	84 ± 8,743
	62,5	0,1636 ± 0,0051	95,556 ± 10,694
	31,25	0,1663 ± 0,0073	99,111 ± 20,059
	15,625	0,1706 ± 0,0077	104,888 ± 20,497

SNEDDS N- heksana 60%	1000	$0,0736 \pm 0,0736$	$-24,45 \pm 11,182$
	500	$0,0853 \pm 0,0853$	$-8,89 \pm 8,036$
	250	$0,122 \pm 0,0026$	$40 \pm 6,928$
	125	$0,1496 \pm 0,0056$	$76,89 \pm 3,355$
	62,5	$0,168 \pm 0,0052$	$101,34 \pm 8,743$
	31,25	$0,169 \pm 0,004$	$101,34 \pm 15,376$
	15,625	$0,160 \pm 0,0052$	$90,667 \pm 7,423$
	SNEDDS N- heksana 80%	1000	$0,0713 \pm 0,0046$
500		$0,0746 \pm 0,0011$	$-23,111 \pm 11,182$
250		$0,1223 \pm 0,003$	$40,445 \pm 14,2569$
125		$0,1363 \pm 0,007$	$59,111 \pm 13,877$
62,5		$0,152 \pm 0,0045$	$80 \pm 15,376$
31,25		$0,159 \pm 0,008$	$93,778 \pm 11,649$
15,625		$0,1616 \pm 0,0068$	$92,889 \pm 11,102$

*Perhitungan analisa biabilitas sel dan grafik uji sitotoksitas *Psidium guajava*

L. SNEDDS fraksi n-heksana disajikan pada **Lampiran IV**.

Berdasarkan data pada **Tabel 10** menunjukkan bahwa pada konsentrasi 500 µg/mL SNEDDS fraksi n-heksana 40% memiliki viabilitas sel atau jumlah sel hidup kurang dari 50% yaitu -13,334%, SNEDDS fraksi n-heksana 60% memiliki viabilitas -8,89% sedangkan SNEDDS fraksi n-heksana 80% memiliki nilai viabilitas lebih rendah yaitu -23,1111%. Hal ini menunjukkan bahwa SNEDDS fraksi n-heksana 80% memiliki kemampuan menghambat lebih baik dibandingkan kedua formulasi lainnya pada konsentrasi yang cukup tinggi. Pada **Tabel 9** dan **Tabel 10** ditunjukkan bahwa pada konsentrasi tinggi viabilitas sel bernilai negatif, itu menandakan bahwa jumlah sel yang mati banyak. Menurut Rahmawati dkk., (2013) mengatakan bahwa suatu ekstrak dikatakan efektif jika dapat menghambat pada konsentrasi rendah. Jika dibandingkan tingkat efektivitas dari SNEDDS fraksi n-heksana 40%; 60% dan 80% terhadap sel T47D dan MCF-7 maka dapat diperoleh informasi bahwa formulasi fraksi n-heksana dalam bentuk SNEDDS lebih efektif pada sel T47D, hal ini dikarenakan pada konsentrasi yang cukup rendah yaitu 125 µg/mL nilai viabilitas sel SNEDDS fraksi n-heksana 40%; 60% dan 80% terhadap sel T47D lebih rendah dari sel MCF-7.

5.10 Hasil Uji Sitotoksitas Capryoll, Tween 20 dan PEG Terhadap Sel T47D, MCF-7 dan Sel Vero

Pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksitas dari komponen sediaan SNEDDS yang digunakan terhadap sel T47D, MCF-7 dan sel Vero. Hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah Capryoll, Tween 20 dan PEG memiliki aktivitas terhadap sel T47D, MCF-7 dan sel Vero dilihat dari nilai absorbansi yang diperoleh. Hasil nilai absorbansi Capryoll, Tween 20 dan PEG terhadap sel T47D, MCF-7 dan sel Vero ditunjukkan pada Tabel 11.

Tabel 11. Tabel sitotoksitas Capryoll, Tween dan PEG terhadap sel T47D, MCF-7 dan sel Vero

Sel	Nilai absorbansi		
	Capryoll	Tween 20	PEG
T47D	0,274	0,324	0,312
MCF-7	0,08	0,1	0,145
Vero	0,077	0,127	0,194

Berdasarkan Tabel 14, dilihat dari nilai absorbansi yang dihasilkan Capryoll memiliki sifat toksik terhadap masing-masing sel yaitu sel T47D, MCF-7 dan Vero. Nilai absorbansi yang rendah menunjukkan bahwa komponen tersebut dapat membunuh sel yang diujikan. Sedangkan untuk Tween 20 dan PEG masih tergolong aman atau tidak bersifat toksik dibandingkan dengan Capryoll karena nilai absorbansinya lebih tinggi.

5.11 Hasil Sitotoksitas Terhadap Sel Vero

Penelitian penemuan obat kanker perlu untuk dilakukan uji sitotoksik terhadap sel normal. Hal tersebut dengan tujuan untuk mengetahui apakah senyawa yang menghambat sel kanker selektif pada sel kanker atau menyerang sel tubuh yang normal juga. Suatu obat terbaru jika menyerang sel tubuh yang normal maka pengembangan obat tersebut akan sia-sia. Sehingga pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksitas terhadap sel normal (sel vero) untuk mengetahui nilai selektivitasnya. Nilai selektivitas menunjukkan tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal. Tahapan yang dilakukan sama seperti uji aktivitas terhadap sel kanker dengan 7 variasi konsentrasi fraksi yaitu 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ dengan metode MTT *assay*.

Tabel 12. Hasil uji aktivitas antikanker SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel Vero

Fraksi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata absorptansi \pm SD	Viabilitas sel (%) \pm SD
SNEDDS N- heksana 40%	1000	$0,0603 \pm 0,009$	$-8,312 \pm 3,77$
	500	$0,069 \pm 0,014$	$-1,259 \pm 7,644$
	250	$0,077 \pm 0,007$	$4,28211 \pm 8,493$
	125	$0,182 \pm 0,014$	$83,879 \pm 7,669$
	62,5	$0,193 \pm 0,019$	$91,9395 \pm 11,567$
	31,25	$0,197 \pm 0,018$	$94,9622 \pm 10,748$
	15,625	$0,2 \pm 0,11$	$97,2292 \pm 4,916$
SNEDDS N- heksana 60%	1000	$0,06 \pm 0,005$	$-8,564 \pm 7,182$
	500	$0,069 \pm 0,004$	$-1,763 \pm 6,337$
	250	$0,073 \pm 0,002$	$2,267 \pm 5,289$
	125	$0,165 \pm 0,009$	$71,0327 \pm 10,713$
	62,5	$0,207 \pm 0,03$	$102,77 \pm 24,567$
	31,25	$0,195 \pm 0,011$	$93,4508 \pm 11,443$
	15,625	$0,201 \pm 0,009$	$98,4886 \pm 10,615$
SNEDDS N- heksana 80%	1000	$0,070 \pm 0,013$	$-0,503 \pm 7,339$
	500	$0,067 \pm 0,004$	$-3,022 \pm 3,022$
	250	$0,079 \pm 0,019$	$6,0453 \pm 5,901$
	125	$0,169 \pm 0,012$	$74,811 \pm 8,582$
	62,5	$0,194 \pm 0,017$	$95,4659 \pm 6,107$
	31,25	$0,190 \pm 0,015$	$89,9244 \pm 8,714$
	15,625	$0,197 \pm 0,009$	$95,4659 \pm 6,772$

Berdasarkan **Tabel 12** menunjukkan bahwa SNEDDS fraksi n-heksana 20%, 60% dan 80% pada konsentrasi yang cukup tinggi yaitu 500 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan nilai viabilitas sel yang negatif, yang menandakan bahwa sel vero mengalami kematian, sedangkan pada konsentrasi yang rendah yaitu 15,625 $\mu\text{g/mL}$ viabilitas sel vero masih cukup tinggi. Berdasarkan data tersebut, mulai pada konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ viabilitas atau jumlah sel hidup pada sel vero kurang dari 50%. Nilai IC_{50} sel vero ditunjukkan pada **Tabel 13**.

Tabel 13. Nilai IC_{50} sel vero

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD
SNEDDS Fraksi n-heksana 40%	$147,9224 \pm 15,7551$
SNEDDS Fraksi n-heksana 60%	$137,4082 \pm 40,0272$
SNEDDS Fraksi n-heksana 80%	$141,3808 \pm 32,0688$

Berdasarkan **Tabel 13** nilai IC_{50} yang dihasilkan dari SNEDDS fraksi n-heksana 40%; 60% dan 80% menunjukkan bahwa SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji tidak toksik terhadap sel normal karena nilai IC_{50} yang diperoleh

> 100 µg/mL. Hasil penelitian dari SNEDDS fraksi n-heksana 40%; 60% dan 80% terhadap sel T47D, MCF-7 dan Vero dituliskan rata-rata absorbansi dan standar deviasi. Berdasarkan nilai standar deviasi yang diperoleh menunjukkan nilai standar deviasi yang kecil dibandingkan dengan nilai rata-rata absorbansi pada setiap konsentrasi. Menurut Walpole (1983) jika nilai standar deviasi besar maka keragaman atau penyimpangan data semakin tinggi dan sebaliknya. Berdasarkan hasil penelitian nilai standar deviasi yang kecil menunjukkan bahwa data memiliki keragaman atau penyimpangan yang rendah sehingga nilai rata-rata absorbansi yang diperoleh dapat digunakan sebagai representasi dari keseluruhan data dan setiap konsentrasi dari sampel memiliki pengaruh dalam proses penghambatan sel kanker.

Nilai IC₅₀ terhadap sel kanker T47D dan MCF7 yang telah diperoleh dapat digunakan untuk menghitung indeks selektivitasnya terhadap sel normal (vero). Menurut Prayong (2008) suatu ekstrak dikatakan memiliki selektivitas tinggi jika memiliki nilai SI > 3 dan dikatakan kurang selektif jika nilai SI < 3. Semakin tinggi angka selektivitasnya maka senyawa tersebut semakin baik. Nilai indeks selektivitas dari SNEDDS fraksi n-heksana 40%; 60% dan 80% dapat diketahui menggunakan rumus:

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ Sel Vero}}{IC_{50} \text{ Sel kanker}} \dots\dots\dots(4)$$

Nilai indeks selektivitas atau SI (*Selectivity indeks*) dari SNEDDS fraksi n-heksana 40%; 60% dan 80% ditunjukkan pada **Tabel 14**.

Tabel 14. Nilai SI (*Selectivity indeks*) hasil uji sitotoksitas

Sampel	Nilai SI (<i>Selectivity Indeks</i>)	
	T47D	MCF-7
SNEDDS Fraksi n-heksana 40%	24,699	0,957
SNEDDS Fraksi n-heksana 60%	16,349	0,978
SNEDDS Fraksi n-heksana 80%	15,163	1,292

Berdasarkan **Tabel 14**, menunjukkan bahwa ketiga formulasi SNEDDS fraksi n-heksana memiliki nilai selektivitas indeks atau SI (*Selectivity indeks*) yang berbeda-beda. Suatu ekstrak dikatakan memiliki selektivitas yang baik jika nilai SI >3, sehingga dari data tersebut dapat diketahui bahwa fraksi n-heksana

lebih selektif terhadap sel T47D. Jika dibandingkan dari ketiga formulasi tersebut SNEDDS fraksi n-heksana 40% memiliki selektivitas paling baik dari kedua formulasi yang lain. Sedangkan fraksi n-heksana pada sel MCF-7 kurang selektif karena nilai SI yang diperoleh < 3 .

Hasil pengamatan pada uji sitotoksik terhadap sel vero sebelum dan sesudah *treatment* diamati dibawah mikroskop *inverted* ditunjukkan pada **Gambar 16**.



Gambar 16. Morfologi sel vero (a) sebelum *treatment* dan (b) sesudah *treatment*

Berdasarkan **Gambar 16** menunjukkan morfologi dari sel vero setelah perlakuan dengan fraksi n-heksana. Dimana pada perlakuan menggunakan fraksi n-heksana tampak terjadi perubahan morfologi pada inti sel yaitu tampak mengecil dan mengkerut yang menunjukkan adanya kematian dari sel vero. Namun perubahan morfologi hanya terjadi pada konsentrasi yang tinggi. Perlakuan pada konsentrasi yang semakin rendah tidak tampak adanya perubahan morfologi sel vero yang menunjukkan kematian sel. Sehingga dapat disimpulkan fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) cukup aman bagi sel normal dengan nilai IC_{50} yang didapatkan $> 100 \mu\text{g/mL}$. Hubungan konsentrasi SNEDDS, ukuran partikel dan nilai IC_{50} terhadap masing-masing sel yaitu sel T47D, MCF-7 dan vero ditunjukkan pada **Tabel 15**.

Tabel 15. Hubungan konsentrasi, ukuran partikel dan nilai IC_{50} terhadap sel T47D, MCF-7 dan Vero

Sel	Konsentrasi			Ukuran	Nilai IC ₅₀ ± SD
				Partikel ± SD	
T47D	SNEDDS	fraksi	n-heksana	391,6 ± 4,887	5,988 ± 6,277
	40%				
	SNEDDS	fraksi	n-heksana	462,83 ± 33,14	8,404 ± 6,055
	60%				
	SNEDDS	fraksi	n-heksana	335,46 ± 13,74	9,323 ± 4,555
	80%				
MCF-7	SNEDDS	fraksi	n-heksana	391,6 ± 4,887	154,539 ± 54,852
	40%				
	SNEDDS	fraksi	n-heksana	462,83 ± 33,14	140,393 ± 36,18
	60%				
	SNEDDS	fraksi	n-heksana	335,46 ± 13,74	109,414 ± 30,336
	80%				
Vero	SNEDDS	fraksi	n-heksana	391,6 ± 4,887	147,922 ± 15,755
	40%				
	SNEDDS	fraksi	n-heksana	462,83 ± 33,14	137,408 ± 40,027
	60%				
	SNEDDS	fraksi	n-heksana	335,46 ± 13,74	141,380 ± 32,068
	80%				

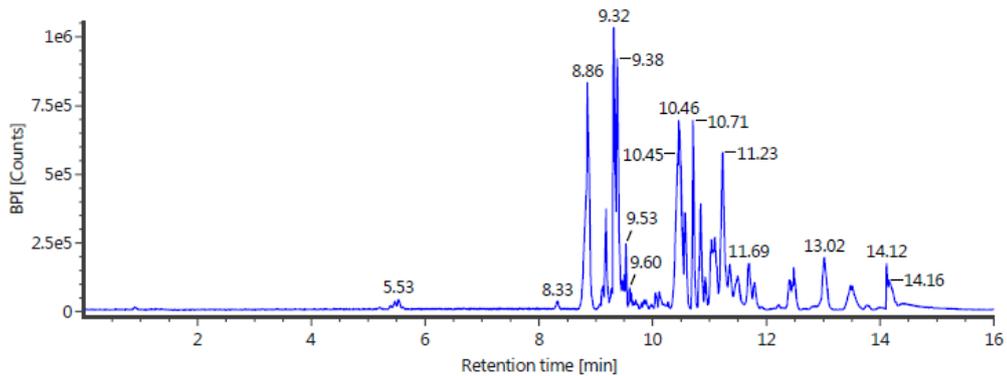
Berdasarkan hasil uji aktivitas antikanker yang telah dilakukan pada penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas yang lebih baik jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yaitu Dwitianti (2015) yang melakukan uji aktivitas antikanker dari ekstrak etanol daun jambu biji terhadap sel T47D yang menghasilkan IC₅₀ 27,54 µg/mL. Pada penelitian ini SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji dengan formulasi 40%, 60% dan 80% memiliki nilai IC₅₀ berturut-turut sebesar 5,9888; 8,4041; dan 9,3237 µg/mL. Nilai IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan ekstrak murni. Sedangkan jika dibandingkan dengan penelitian Nita (2019) yang

melakukan uji aktivitas antikanker terhadap sel T47D dengan fraksi n-heksana memperoleh nilai IC_{50} 8,89 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan nilai IC_{50} fraksi n-heksana terhadap sel MCF-7 sebesar 5,04 $\mu\text{g/mL}$. Pada penelitian ini nilai IC_{50} SNEDDS fraksi n-heksana dengan formulasi 40%, 60%, dan 80% terhadap sel MCF-7 secara berturut-turut sebesar 154,5395; 140,3935; dan 109,4146 $\mu\text{g/mL}$. Jika dibandingkan dengan penelitian Nita (2019) nilai IC_{50} sediaan nanopartikel fraksi n-heksan terhadap sel T47D tidak jauh berbeda, namun nilai IC_{50} terhadap sel MCF-7 jauh berbeda, dimana nilai IC_{50} sediaan nanopartikel fraksi n-heksana mempunyai nilai yang lebih besar. Pada penelitian ini juga telah dilakukan uji sitotoksitas dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel normal yang menghasilkan nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$.

Pada penelitian ini menunjukkan adanya selektivitas yang baik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan formulasi 40%, 60% dan 80% secara berturut-turut dengan nilai selektivitas sebesar 24,699; 16,349; dan 15,163 terhadap sel T47D. Sehingga dari hasil tersebut dapat menunjukkan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu sediaan nanopartikel fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) memiliki aktivitas yang lebih baik dari penelitian Dwitiyanti (2015) yang hanya menggunakan ekstrak kasar dari daun jambu biji. Oleh karena itu sediaan nanopartikel fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dapat dikembangkan sebagai agen kemoprevensi.

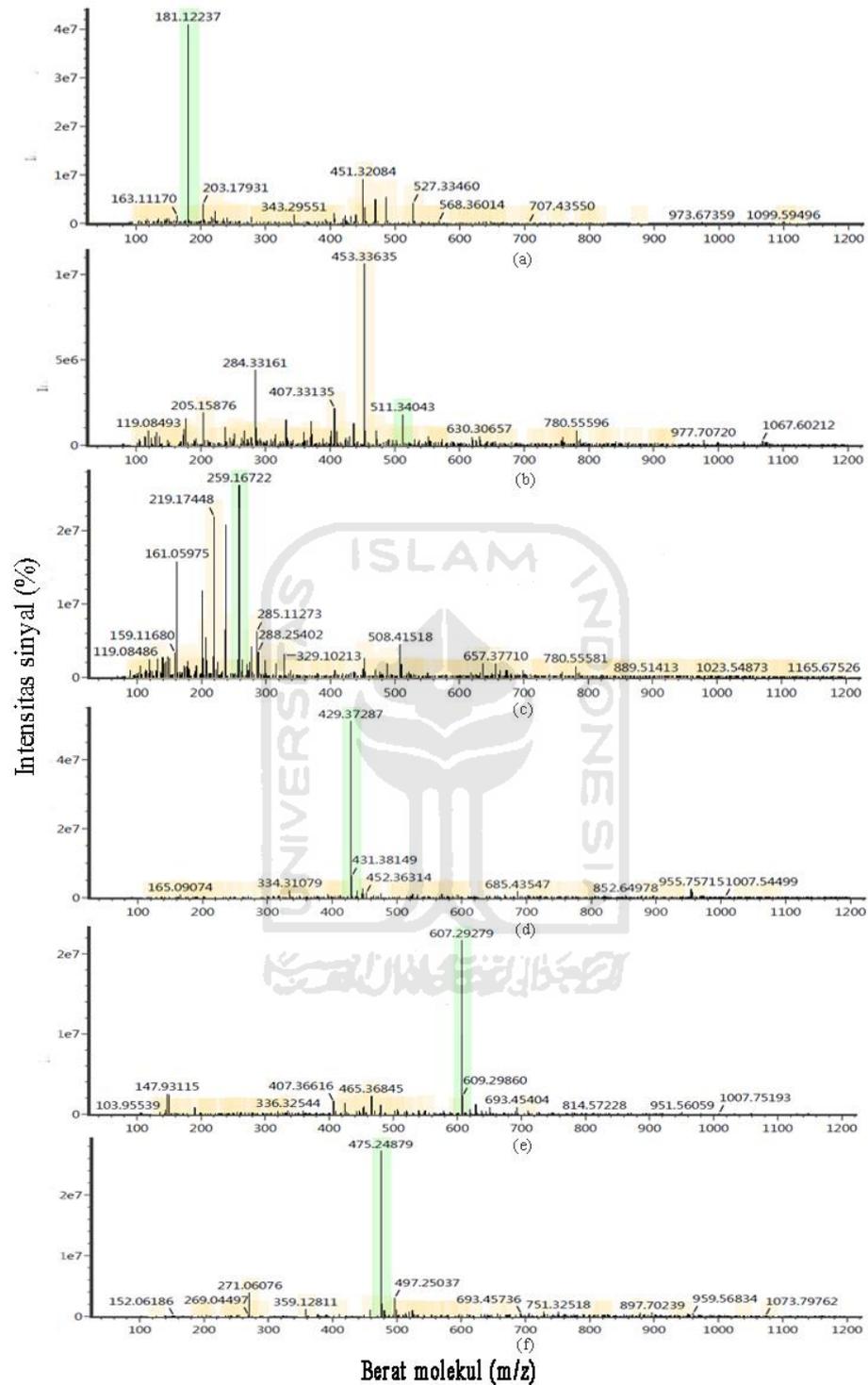
5.12 Analisis Kandungan Senyawa dalam Fraksi N-Heksana Menggunakan LC-MS/MS

Fraksi n-heksana dianalisis menggunakan LC-MS/MS diperoleh data berupa kromatogram dan spektrum massa. Hasil dari kromatogram dapat diketahui puncak-puncak senyawa yang menunjukkan bahwa fraksi mengandung beberapa senyawa. Kromatogram fraksi n-heksan ditunjukkan pada **Gambar 17**.



Gambar 17. Kromatogram fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan LC-MS/MS

Kromatogram diatas menunjukkan kandungan senyawa dalam fraksi n-heksana daun jambu biji. Hal tersebut ditunjukkan dari munculnya beberapa puncak yang cukup tajam diantaranya puncak dengan waktu retensi 8,86; 9,19; 9,37; 10,72; 10,46; dan 11,24. Puncak-puncak tersebut merupakan senyawa yang diduga berupa campuran atau belum tunggal karena dalam sebuah fraksi seharusnya masih terdiri dari berbagai macam senyawa. Puncak-puncak yang memiliki intensitas cukup tinggi dipisahkan kembali dan didapatkan spektrum massa dari puncak-puncak tersebut. Spektrum massa fraksi n-heksana ditunjukkan pada **Gambar 18**.

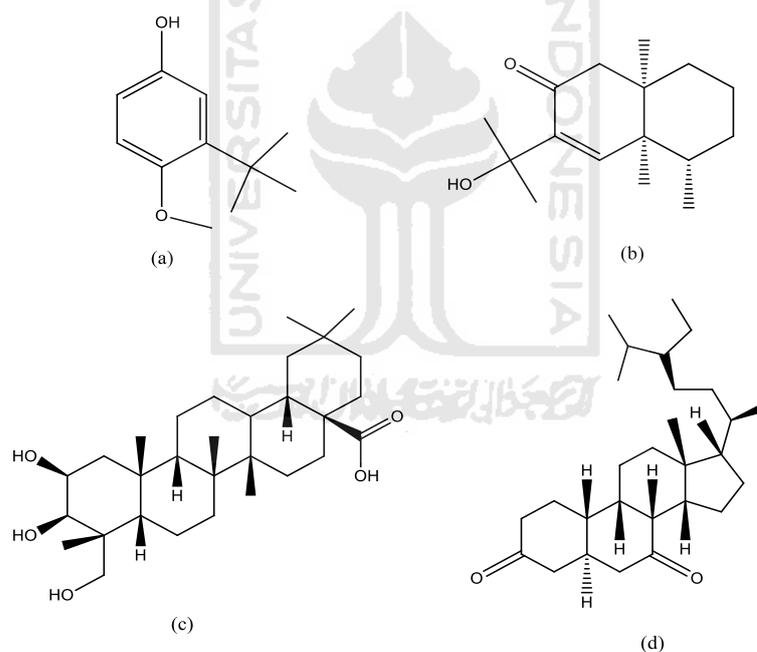


Gambar 18. Spektrum massa fraksi n-heksana daun jambu biji dengan waktu retensi (a) 8,86 (b) 9,19 (c) 9,37 (d) 10,46 (e) 10,72 (f) 11,24.

Tabel 16. Senyawa yang teridentifikasi dalam fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan LC-MS/MS

Nama senyawa	Rumus molekul	[M-H] ⁻ (m/z)	Waktu retensi (rt)
3-Tert-butyl-4-methoxyphenol	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	181,1224	8,86
Hyptatic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	511,3404	9,19
Petasilone	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	259,1672	9,37
Stigmastan-3,6-dione	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	429,3729	10,46
Candidate Mass C ₂₆ H ₄₈ O ₁₄	C ₂₆ H ₄₈ O ₁₄	607,2928	10,72
Candidate Mass C ₃₀ H ₃₄ O ₅	C ₃₀ H ₃₄ O ₅	475,2488	11,24

Gambar 18 menunjukkan spektrum massa fraksi n-heksana, dimana spektrum massa tersebut dapat diidentifikasi kandungan senyawa dan berat molekulnya dengan melihat kemiripiannya dengan literatur. Struktur senyawa fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) ditunjukkan pada **Gambar 19**.

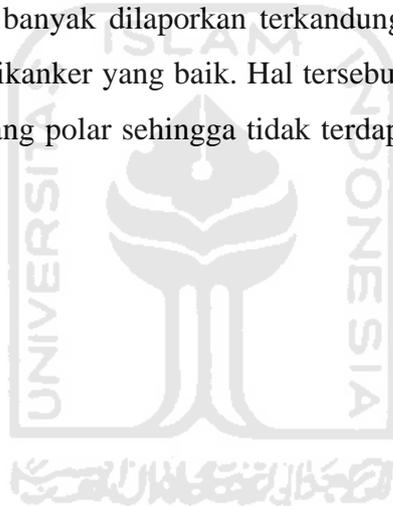


Gambar 19. Struktur senyawa fraksi n-heksana daun jambu biji (a) 3-Tert-butyl-4-methoxyphenol (b) petasilone (c) hyptatic acid (d) stigmastan-3,6-dione.

Berdasarkan spektrum massa tersebut didapatkan puncak dengan intensitas yang cukup tinggi dan teridentifikasi sebagai 3-Tert-butyl-4-methoxyphenol dengan berat molekul 181,1224 m/z, hyptatic acid dengan berat molekul 511,3404 m/z, petasilone dengan berat molekul 259,1672 m/z, candidate mass C₂₆H₄₈O₁₄

dengan berat molekul 607,2928 m/z, *stigmastan-3,6-dione* dengan berat molekul 429,3729 m/z, dan *candidate mass* $C_{30}H_{34}O_5$ dengan berat molekul 475,2488 m/z.

Berdasarkan uji LC-MS/MS senyawa yang mempunyai intensitas paling tinggi yaitu *stigmastan-3,6-dione*, sehingga diduga senyawa tersebut yang berperan dalam menghambat atau mencegah pertumbuhan sel kanker. Senyawa *stigmastan-3,6-dione* merupakan golongan steroid. Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa *stigmastan-3,6-dione* juga terdapat di jerami gandum *Triticum aestivum* bersifat antikanker dan daun *Cassytha filiformis* (Gaspar dkk., 1993; Kuljanabhagavad dkk., 2008; Jiang-Long dkk., 2012; Edowor dkk., 2016). Pada penelitian ini tidak teridentifikasi adanya senyawa kuersetin, dimana senyawa tersebut banyak dilaporkan terkandung dalam daun jambu biji dan memiliki aktivitas antikanker yang baik. Hal tersebut diduga disebabkan oleh sifat senyawa kuersetin yang polar sehingga tidak terdapat pada fraksi n-heksana yang bersifat non polar.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang diperoleh menggunakan perbandingan Capryoll : Tween 20 : PEG (10 : 70: 20) dengan konsentrasi 40% lebih optimal sebagai antikanker dibandingkan variasi konsentrasi lainnya.
2. Nilai IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 40%, 60% dan 80% berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 5,988; 8,404; dan 9,323 µg/mL. Nilai IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 40%, 60% dan 80% berturut-turut terhadap sel MCF-7 sebesar 154,539; 140,393; dan 109,414 µg/mL.
3. Kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana diantaranya senyawa *stigmastan-3,6-dione* dengan berat molekul 429,372 m/z, *3-Tert-butyl-4-methoxyphenol* 181,122 m/z, *petasilone* 259,167 m/z, *hyptatic acid* 511,340 m/z, *candidate mass C₂₆H₄₈O₁₄* 607,292 m/z, dan *candidate mass C₃₀H₃₄O₅* 475,248 m/z.

6.2 Saran

Untuk kedepannya perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut berkaitan dengan formulasi sediaan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan metode SNEDDS dengan variasi jenis minyak, surfaktan dan co-surfaktan. Disarankan untuk membandingkan dalam bentuk fraksi, ekstrak, dan dengan senyawa yang memang sudah terbukti antikanker sebagai kontrol positifnya. Perlu dilakukan penelitian uji sitotoksik terhadap sel jenis lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeyemi, Stephen, O., Akanji, M.A., and Ogntoye, S.A., 2009, Ethanolic Leaf Extract of *Psidium Guajava*: Phytochemical and Trypanocidal Activity In Rats Infected With *Trypanosoma Brucei*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5), 420-423.
- Agilent Technologies., 2001, *Agilent LC-MS Primer*, U.S.A 5988-2045EN.
- Amalia, A., Jufri, M., dan Anwar, E., 2015, Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticle (SLN) of Gliclazide, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 13, 108-114.
- Anindhita, A., Oktiviani, N., 2016, Formulasi Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan Virgin Coconut Oil (VCO) sebagai minyak pembawa, *Jurnal Kesehatan*, Pena Media, 6(2): 103-111.
- Ansel., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi, Edisi 4*, UI-Press, Jakarta.
- Ardrey, R.E., 2003, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry: An Introduction*, University of Huddersfield, England.
- Arima, H., and Danno, G., 2002, Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.), *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 66, 1727-1730.
- Balakumar, K., Raghavan, C. V., Selvan, N.T., and Rahman, S.H., 2013, Self Emulsifying Drug Delivery System: Optimization and its Prototype for Various Compositions of Oils, Surfactans and Co-surfactans, *Journal of Pharmacy Research*, 6,5, 510-514.
- Bathia, S., 2016. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications, *Springer Int.Publ. Switz*, 29, 32-91.
- Beniac, D., Belova, L., Burgess, R., Barnes, C., Cifuentes, L. T., Crassous, P., DiFiore, A., Gspan, C., Gunning, P., Holthuysen, F., Ito, J., Jane, W. N., Johnson, C., Keller, A. And Kisielowski, N. C., 2010, *An Introduction of Microscopy Electron*, FIF, New York.
- Bowers, LD., 1989, High-performance liquid chromatography/mass spectrometry: state of the art for the drug analysis laboratory, *Clin Chem*, 35, 1282-7.
- Burdall, E.S., Hanby M.A., Landsdown, R.J.M and Speirs, V., 2003, Breast Cancer Cell Line, *Breast Cancer Res*, 5(2): 89-95.

- Buzea, C., Blandino, I.I.P., and Robbie, K., 2007, Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases*, 2, 170-172.
- CCRC (Community College Research Center), 2009, *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.
- Chah, K.F., Eze, C.A., Emuelosi, C.E., and Esimone, C.O., 2006, Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol*, 140, 164-167
- Chiari, B.G. Trovatti, E., Mart, J., Almeida, M.G.J., Melero, A., Correa, M.A., Chiavacci, L.A., Ribeiro, H., Garrigues T., and Isaac, V.L.B., 2017, Guava: phytochemical composition of a potential source of antioxidants for cosmetic and/or dermatological applications, *Journal Pharm, Sci*, 53(2):e16141.
- Ciulei, J., 1984, *Methodology for Analysis of Vegetables and Drugs*, University of Bucharest, Bucharest.
- Covey, T.R., Lee, E.D., Henion, J.D., 1986, High-speed liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of drugs in biological samples, *Anal Chem*, 58, 2453-60.
- Dalimartha, S., 2006, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 5*, Jakarta, Pustaka Bunda.
- Damar, A.C., Revolva, M.J.R., Defny, S., 2014. Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Total Ekstrak Etanol Daun Kayu Kapur (*Melanolepsis Multiglandulosa Reinch f*). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3(4), 11-21.
- Date, A.A., and Nagarsenker, M.S., 2007, Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEEDs) for cefpodoxime proxetil, *Int. J. Pharmaceutics*, 329:166-172.
- Díaz-de-Cerio, E., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., and Segura-Carretero, A., 2016 Exploratory Characterization of Phenolic Compounds with Demonstrated Anti-Diabetic Activity in Guava Leaves at Different Oxidation States, *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 699.
- Ditjen POM., 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.

- Djarwis, D., 2004, *Teknik Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Workshop Peningkatan Sumber Daya Manusia Penelitian dan Pengelolaan Sumber Daya Hutan yang Berkelanjutan*. Pelaksana Kelompok Kimia Organik.
- Doyle, A., Griffiths, J.B., 2000, *Cell and tissue culture for medical research*, John Wiley & Sons, New York.
- Duval, Clarot, Dumarcay-Charbonnier, Fontanay, and Marsuara. 2012. Interest of designed cyclodextrin-tools in gene delivery, *Bioconjugate Chem*, 15(4): 831-840.
- Dwitiyanti., 2015. Daun Jambu Biji (*Psidium guajava L.*) Sebagai Antikanker Payudara. *Pharm Sci Res*, 2(2): 79-88.
- Edowor, TI., Owa, SO., Ologan, AO., Akinfemi, F., 2016, Quantitative determination of the saponin content and GC-MS study of the medicinal plant *Cassipourea filiformis* (linn.) leaves. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(2):154-156.
- Fajar, M.D., Sadiyah, E.R., dan Rismawati, E., 2011, Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava L.*) Berdaging Buah Putih, *Prosiding SNaPP2011 Sains, Teknologi, dan Kesehatan*, 2(1); 2089-3582.
- Famh, N., Yu, S., and Prior, R.L., 2002, LC-MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums, *J. Agric, Food Chem*, 50(12): 3579-3585.
- Flores, G., Wu, S., Negrin, A., Kennelly, E.J., 2015, Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guajava (*Psidium guajava*) fruits, *Food Chemistry*, 170, 327-335.
- Freshney, R.I., 1992, *Animal Cell Culture*, Oxford University Press, New York.
- Gaspar EMM., Higuinaldo JC., Neves, 1993, Steroid constituents from nature wheat straw. *Phytochemistry*, 34(2):523-527.
- Ginting, M.K., 2012, *Validasi Metode LC-MS/MS Untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat Dalam Urin Sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toulena Dan Xilena*, Skripsi, FMIPA UI, Jakarta.
- Guenther, E., 2006, *Minyak Atsiri Jilid I*, UI-Pres, Jakarta.
- Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S, and Marshall, N.J., 1995, Microculture Tetrazolium Assays: A Comparison Between To New Tetrazolium Salts, XTT and MTS, *Journal Immunol Methods*, 197(1), 95-103.

- Gunzler, H., and Williams, A., 2001, *Handbook of Analytical Techniques*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Harahap, Y., 2003, Rasio O 6-alkilguanin dan tautan sialng terhadap N 7-alkilguanin yang terbentuk pada reaksi zat pengalkil dengan DNA In vitro, *Disertasi Program S3*, Farmasi ITB, Bandung, 125-126.
- Harbone, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Bandung, ITB.
- Ho, C.S., 2003 Electropray Ionization Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications, *Clin Biochem Rev*, 24, 3-12.
- Hoffman, E., and Stroobant, V., 2007, *Mass Spectrometry Principle and Applications*, Johan and Wilwy & Sons, New York.
- Hu, M., and Li, X., 2011, *Oral bioavaibility : basic principles, advance concept, and application*, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Jiang-Long, Z., Hai-Yan, T., Li, J., Jun, L., Luo, C., Wen-Cai, Y., Ren-Wang, J., 2012, Steroids with inhibitory activity against the prostate cancer cells and chemical deversity of marine alga *Tydemania expeditionis*, *Fitoterapi*, 83(5):973-978.
- Jork, H., Funk, W., and Wimmer, H., 1990, *Thin Layer Chromatography*, VCH Publisher, USA.
- Joseph B., and Priya, M., 2011, Review Oon Nutritional, Medicinal and Pharmacological Properties of Guava (*Psidium guajava* L.), *Int J Pharm and Bio Sci*, 2(1), 53-69.
- JoVe, 2019, *Science Education Database Analytical Chemistry: Ca;ibration Curves*, JoVe, Cambridge, MA.
- Karyanti, D.E., 2005, Perbandingan Kadar Quercetin dan Pola Generic 35 Varietas Jmbu Biji (*Psidium guajava* L.), *Skripsi*, UHAMKA, Jakarta.
- Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., and Kuno, Y., 2000, Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolyme nanosphere coated with citosan to improve oral delivery of elcatonin, *Pharmetical Development and Technology*, 5(1): 77-85.
- Kristianti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B., 2008, *Buku Ajar Fitokimia*, p. 23 dan 47, Airlangga University Press, Surabaya.

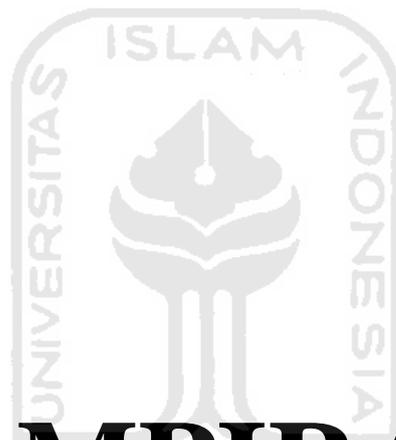
- Kuljanabhadra T., Thongphasuk P., Chamulitrat W., Wink M, 2008, Triterpene saponins from *Chebopodium quinoa* wild, *Phytochemistry*, 69(1):11919-1926.
- Kurniasari, D., dan Atun, S., 2017, Pembuatan dan Karakteristik Nanopartikel Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Pada Berbagai Variasi Komposisi Kitosan, *Jurnal Sains Dasar*, 6(1): 31-35.
- Lamson, DW., and Brignall, MS., 2000, *Antioxidants and cancer III: Quercetin, Alternative Medicine*, Review, 5(2): 196-208.
- Lee, SB., and Park, HR., 2010, Anticancer activity of guava (*Psidium guajava* L.) branch extract against HT-29 human colon cancer cells, *J Med Plant Res*, 4, 891-896.
- Lema, I.S., 2014, Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7, *Skripsi*, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Lusia, O., 2006, *Pemanaatann Obat Tradisional dengan Pertimbangan Mnafaat dan Keamanannya*. ISSN: 1693-9883, Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol.3, No.1.
- Maharani, S., 2009, *Kanker: Mengenal 13 Jenis Kanker dan Pengobatannya*, Katahati Press, Yogyakarta.
- Maharani, A.S., 2017, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol, Fraksi Polar, Semipolar, dan Nonpolar Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) terhadap Sel Kanker Kolon WiDR, *Skripsi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Manosroi, J., Dhumtanom, P., and Manosroi, A., 2006, Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines, *Cancer Lett*, 235, 114-120.
- Manthey, J.A., Grohmann, K., and Guthrie, N., 2001, Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation, *Curr Med Chem*, 8, 135-153.
- Marliana, S.D., Venty, dan S., Suyono., 2006, Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium Edule* Jacq. Swartz.) Dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3(1), 26-31.
- Martien, R., Adhyatmika, I.I.D.K., Farida, V., dan Sari, D.P., 2012, Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat, *Majalah Farmasetik*, 1,8.

- McMaster, M.C., 2005, *LC/MS a Practical User's Guide*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Menchetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia., Parker R.J., and Fruehauf, J.P., 1998, Levels of Multidrug Resistance (MDR1) P-Glycoprotein Expression by Human Breast Cancer Correlate with in Vitro Resistance to Taxol and Doxorubicin, *Clinical Cancer Research*, 4389-398.
- Miroslav, V., 1971, *Detection and Identification of Organic Compound*, Plenum Publishing Corporation and SNTC Publishers of Technical Literatur, New York.
- Mohanraj, V.J., and Chen., Y., 2006, Nanoparticles : A review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1): 561-573.
- Moon, J.Y., Mosaddik, A., Kim, H., Cho, M., Choi, H.K., Kim, Y.S., and Cho, S.K., 2011, The chloroform fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract inhibits human gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis, *Food Chemistry* 125, 369–375.
- Mosman, 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxic Assay, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Murdock, R.C., Braydich, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., and Hussain, S.M., 2008, Characterization of Nanoparticle Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure using Dynamic Light Scattering Technique, *Toxicol Science*, 101: 239-253.
- Nita, Mila T., 2019, Uji Aktivitas Antikanker Fraksi Etanol, Etil Asetat dan n-Heksana Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) secara *In Vitro* Terhadap sel T47D, MCF-7 (Kanker Payudara) dan Sel Hela (Kanker Serviks) dengan Metode MTT Assay, *Skripsi*, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Ojewole, J.A., 2005, Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract, *Methods Findings Exp. Clin. Pharmacol*, 27, 689-695.
- Onuki R, *et al*, 2003, Analysis of A Mitochondrial Apoptotic Pathway Using Bid-Targeted Ribozymes in Human MCF-7 Cells in the Absence of A Caspase-3-Dependent Pathway, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 13 (2): 75-82.

- Pandiangan, D., Esyanti, R., and Queljoe, E., 2008, Aktivitas Antikanker Katarantin pada Sel Mouse Mammary Cancer MmT06054, *Jurnal Ilmiah Sains*, 8(1), 107-113
- Parimin, S.P., 2005, *Jambu Budidaya dan Ragam Pemanfaatannya*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Petrucci, Ralph H., 1987, *Kimia Dasar Prinsip dan Terapan Modern Jilid 1*, Erlangga, Jakarta.
- Porwal V., Pallavi S. and Devendra G, 2012, A Comprehensive Study On Different Methods Of Extraction From Guajava Leaves For Curing Various Health Problem, *International Journal of Engineering Research and Applications*, 2 (6), 490-496.
- Prabu, G.R., Gnanamani, A., and Sadulla, S., 2006, Guaijaverin a plants flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*, *J. Appl. Microbiol*, 101, 487-495.
- Prayong, P., Barusrux, S., and Weerapreeyakul, N., 2008, Cytotoxic Activity Screening of some Indigenous Thai Plants. *Fitoterapi*, 79 (7-8), 598-601.
- Prunet C, *et al*, 2005, Activatio of Caspase-3-Dependent and Independent Pathways During 7-Ketocholesterol-Induced Cell Death: A Morphological and Biochemical Study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19 (5): 311-326.
- Rahayu, E., 2016, Preparasi Dan Karakterisasi Nanosuspensi Kitosan-Tripolisofat Sebagai Pembawa Deksametason Natrium Fosfat Menggunakan Metode Gelasi Ionik, *Skripsi*, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Rahmawati, E., Sukardiman dan Muti, A.F., 2013, Aktivitas Antikanker Ekstrak n-Heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D, *Media Farmasi*, 10 (2), 47-55.
- Rasaputri, D.H., 2010, Pengembangan Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Sistem (SNEDDS) Untuk Penghantaran Oral Interferon alfa:Formulasi, Karakterisasi dan Uji Stabilitas Fisik, *Thesis*, Sekolah Farmasi ITB, Bandung.
- Rawat, M., Singh, D., and Saraf, S., 2006, Nanocarries: Promising Vehicle for Bioactive Drugs, *Pharm. Soc. Jpn*, 29, 1790-1798.
- Razak, F.A., Othman, R.Y., and Rahim, Z.H., 2006, The effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque, *J. Oral Sci*, 48, 71-75.

- Richie, R. C and Swanson, J., 2003, Breast cancer: A Review of the Literature. *Journal of Insurance Medicine*, 35, 85-101.
- Rishika, D., and Sharma, R., 2012, An update of pharmacological activity of *Psidium guajava* in the management of various disorder, *Int J Pharm SRes*, 3(10), 3577-3584.
- Rojas-Garbanzo, C., Zimmermann, B.F., Schulze-Kaysers, N., and Schieber, A., 2017, Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') by ultra-high performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection, *Food Research International*, 100, 445–453.
- Rosenauer, A., 2003, *Transmission Electron Microscopy of Semiconductor Nanostructures: Analysis of Composition and Strain State*, Springer, p.1.
- Ryu, H.N., Park, R.K., Kim, M.S., Yun, M.H., Nam, D., Lee, G.S., Jang, J.H., Ahn, S.K., Kim, H.S., and Shim, S.B., 2012, A hexane fraction of guava leaves (*Psidium guajava* L.) induces anticancer activity by suppressing AKT/mammalian target of rapamycin/ribosomal p70 S6 kinase in human prostate cancer cells, *J Med Food*, 15(3), 231-241.
- Sastrohamidjojo, H., 1985, *Kromatografi Edisi I*, Yogyakarta, Liberty Press.
- Sato, R., Dang, K.M., McPherson, B.G., and Brown, A.C., 2010, Anticancer activity of guava (*Psidium guajava*) extracts, *J Compl Integ Med*, 7(1), 43.
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., dan Jordan, V.C., 2000, Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clinical Cancer Research*, 6, 4373-4380.
- Senja, R.Y., Elisa, I., Nugroho, A., and Setyowati, E., 2014, The Comparison of Extraction Method and Solvent Variation on Yield and Antioxidant Activity of *Brassica oleracea* L. var. capitata f. Rubra Extract, *Traditional Medicine Journal*, 19(1), 43-44.
- Setiawan, S.D., Ramadhani, A., Veronika, A., Ningrum, A.D.K., Nugroho, B.H., and Syukri, Y., 2018, Study of Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Loaded Red Fruit Oil (*Pandanus conoideus* Lamk) As an Eliminated Cancer Cell MCF-7, *International Journal of Drug Delivery Technology*, 8(4): 229-232.
- Siadi, K., 2012, Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan NaCl, *Jurnal MIPA Universitas Negeri Semarang*, 35(1), 77-83.

- Singh, B., Bandopadhyay S., Kapil R., Singh R dan Katare, O.P., 2009, *Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, 26(5); 427-521.
- Sitorus, S., 2013, Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol *Angiopteris angustifolia* C. Terhadap Kultur Sel Kanker Payudara (MCF-7 *Cell line*) secara *In Vitro*, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Trubus, 2013, *100 Plus Herbal Indonesia*, Vol.11, Trubus, Despok, Issn: 0975-8232.
- Vaughn, J.M., and Williams, R.O., 2007, *Nanoparticle Engineering*, Informa Healthcare USA, New York.
- Verma, S.P., Goldin, B.R., and Lin, P.S., 1998, The Inhibition of the Estrogenic Effects of Pesticides dan Enviromental Chemicals by Curcumin and Isoflavonoids, *Envir. Health Presp*, 106 (12), 807-812.
- Vogeser, M., and Seger, C., 2008, A decade of HPLC-MS/MS in theroutine clinical laboratory-goals for futher development, *Clinical Biochemistry Rev*, 41, 649-662.
- Wadhwa, J., Nair, A., and Kumria, R, 2011, Self-emulsifying therapeutic system: a potential approach for delivery of lipophilic drugs, *Journal Pharmacy*, 57, 447-465.
- Walpole, R.E., 1993, *Pengantar Statistika Edisi Ke-3*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Widyasari, E., 2019, Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Daun Jambu Biji (*Psidium guajava L.*) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7.
- Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., dan Arbuthnot, P., 2002, Differential modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells, *Anticancer Research.*, 22(4):2253-9.



LAMPIRAN

Lampiran I. Hasil Dterminasi Tanaman Jambu Biji



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN

Jalan Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telpun (0274) 6492262/6492272; Fax: (0274)580839

SURAT KETERANGAN

Nomor : 014796/S.Tb./I/2020

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,

Nama : Eldiva Ilkarizkia Ayustra
NIDN : 16612057
Asal instansi : Fakultas MIPA - UII Yogyakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut,

Kingdom : Plantae
Divisio : Tracheophyta
Classis : Magnoliopsida
Ordo : Myrtales
Familia : Myrtaceae
Genus : Psidium
Species : *Psidium guajava* L.
Sinonim : *Guajava pumila* (Vahl.) Kuntze, *Myrtus guajava* (L.) Kuntze,
Psidium cujavus L., *Syzygium ellipticum* K. Schum & Lauterb
Nama Lokal : Jambu batu, Jambu biji, Jambu klutuk, Giawas

identifikasi tersebut dibantu oleh Abdul Razaq Chasani, Ph.D
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada


Prof. Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc.
NIP. 197003261995121001

Yogyakarta, 14 Januari 2020
Kepala Laboratorium
Sistematika Tumbuhan
Fakultas Biologi UGM


Prof. Dr. Purnomo, M.S.
NIP. 195504211982031005

Lampiran II. Hasil Uji Penapisan Fitokimia

Sampel	Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil Pengamatan	Hasil Uji	Gambar	
Fraksi N-heksana	Alkaloid	<i>Dragendorff</i>	Tidak terbentuk larutan jingga	-		
					Sebelum ditambah pereaksi <i>Dragendorff</i>	Sebelum ditambah pereaksi <i>Dragendorff</i>
	Flavonoid	HCl + Mg	Larutan hijau (ada endapan)	+		
					Sebelum ditambahkan pereaksi	Setelah ditambahkan pereaksi
	Tanin/polifenol	FeCl ₃ 1%	Terbentuk lapisan hijau kehitaman (endapan hitam)	+		
					Sebelum ditambahkan FeCl ₃	Sesudah ditambahkan FeCl ₃
	Terpenoid	+ Asam + H ₂ SO ₄	Terbentuk cincin coklat pada perbatasan larutan	+		
					Sebelum ditambahkan pereaksi	Sesudah ditambahkan pereaksi

Lampiran III. Perhitungan

Lampiran 3.1 Data-Data Penelitian

Tabel 17. Absorbansi sel kanker payudara T47D SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 40%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,654	0,589	0,473	0,572	0,091689
Kontrol media	0,125	0,212	0,179	0,172	0,043920
125	0,284	0,239	0,285	0,26933	0,0026274
62,5	0,291	0,289	0,28	0,28667	0,0058594
31,25	0,305	0,3	0,307	0,304	0,0036055
15,625	0,325	0,296	0,331	0,31733	0,0187171

Abs sampel 1- abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
0,159	0,027	0,106	0,4
0,166	0,077	0,101	0,4
0,18	0,088	0,128	0,4
0,2	0,084	0,152	0,4

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
39,75	6,75	26,5	24,334	16,60635
41,5	19,25	25,25	28,667	11,51177
45	22	32	33	11,53256
50	21	38	36,334	14,57166

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
13,1825	3,1622	1,6218	5,9888	6,2773

Tabel 18. Absorbansi sel kanker payudara T47D SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) konsentrasi 60%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,654	0,589	0,473	0,52925	0,113644
Kontrol media	0,125	0,212	0,179	0,1495	0,057541
125	0,137	0,192	0,137	0,15275	0,02643703
62,5	0,126	0,304	0,255	0,235	0,07624959
31,25	0,296	0,288	0,289	0,29425	0,00741058
15,625	0,308	0,307	0,309	0,3075	0,00129099

Abs sampel 1- abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
0,012	-0,02	-0,042	0,4
0,001	0,092	0,076	0,4
0,171	0,076	0,11	0,4
0,183	0,095	0,13	0,4

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
3	-5	-10,5	-4,1667	6,7884
0,25	23	19	14,0833	12,1458
42,75	19	27,5	29,75	12,03
45,75	23,75	32,5	34	11,076

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
14,4544	2,3442	8,4139	8,4041	6,055

Tabel 19. Absorbansi sel kanker payudara T47D SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) konsentrasi 80%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,654	0,589	0,473	0,52925	0,113644
Kontrol media	0,125	0,212	0,179	0,1495	0,057541
125	0,141	0,127	0,113	0,12225	0,01486
62,5	0,181	0,194	0,204	0,1945	0,00988
31,25	0,267	0,298	0,27	0,27225	0,01852
15,625	0,319	0,3	0,302	0,314	0,01639

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
0,016	-0,085	-0,066	0,4
0,056	-0,018	0,025	0,4
0,142	0,086	0,091	0,4
0,194	0,088	0,123	0,4

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
4	-21,25	-16,5	-11,25	12,3159
14	-4,5	6,25	5,25	8,0269
35,5	21,5	22,75	26,5833	14,7201
48,5	22	30,75	33,75	20,157

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
14,4544	5,7543	7,7624	9,3237	4,5552

Tabel 20. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) konsentrasi 40 %

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata- Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,171	0,164	0,166	0,167	0,0036
Kontrol media	0,087	0,088	0,101	0,092	0,0078
1000	0,078	0,082	0,082	0,08134	0,003055
500	0,083	0,084	0,079	0,084	0,001
250	0,126	0,124	0,126	0,126	0,002
125	0,157	0,15	0,158	0,155	0,004359
62,5	0,158	0,168	0,165	0,163667	0,005136
31,25	0,169	0,172	0,158	0,166333	0,007371
15,625	0,173	0,177	0,162	0,1706	0,007767

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
-0,008	-0,01	-0,019	0,075
-0,004	-0,004	-0,022	0,075
0,039	0,036	0,025	0,075
0,07	0,062	0,057	0,075
0,071	0,08	0,064	0,075
0,082	0,084	0,057	0,075
0,086	0,089	0,061	0,075

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
-10,6667	-13,3333	-25,3333	-16,4444	7,81262
-5,33333	-5,33333	-29,3333	-13,3333	13,85641
52	48	33,33333	44,44444	9,828153
93,33333	82,66667	76	84	8,743251
94,66667	106,6667	85,33333	95,55556	10,69441
109,3333	112	76	99,11111	20,05917
114,6667	118,6667	81,33333	104,8889	20,49752

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
186,2087	186,2087	91,2010	154,5395	54,8526

Tabel 21. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) konsentrasi 60 %

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata- Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,171	0,164	0,166	0,167	0,0036
Kontrol media	0,101	0,087	0,088	0,092	0,0078
1000	0,073	0,075	0,073	0,073667	0,001155
500	0,081	0,087	0,088	0,085333	0,003786
250	0,12	0,121	0,125	0,122	0,002646
125	0,145	0,148	0,156	0,1496	0,00569
62,5	0,162	0,171	0,171	0,168	0,0052
31,25	0,172	0,168	0,164	0,168	0,004
15,625	0,154	0,162	0,164	0,16	0,005292

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
-0,014	-0,013	-0,028	0,075
-0,006	-0,001	-0,013	0,075
0,033	0,033	0,024	0,075
0,058	0,06	0,055	0,075
0,075	0,083	0,07	0,075
0,085	0,08	0,063	0,075
0,067	0,074	0,063	0,075

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
-18,6667	-17,3333	-37,3333	-24,4444	11,182
-8	-1,33333	-17,3333	-8,88889	8,036952
44	44	32	40	6,928203
77,33333	80	73,33333	76,88889	3,355482
100	110,6667	93,33333	101,3333	8,743251
113,3333	106,6667	84	101,3333	15,37675
89,33333	98,66667	84	90,66667	7,423686

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
151,3561	169,8244	100	140,3935	36,18

Tabel 22. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) konsentrasi 80 %

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata- Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,171	0,164	0,166	0,167	0,0036
Kontrol media	0,087	0,088	0,101	0,092	0,0078
1000	0,074	0,066	0,074	0,071333	0,004619
500	0,074	0,076	0,074	0,074667	0,001155
250	0,123	0,125	0,119	0,122333	0,003055
125	0,143	0,129	0,137	0,136333	0,007024
62,5	0,151	0,157	0,148	0,152	0,004583
31,25	0,167	0,151	0,159	0,159	0,008
15,625	0,154	0,167	0,164	0,16166	0,006807

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
-0,013	-0,022	-0,027	0,075
-0,013	-0,012	-0,027	0,075
0,036	0,037	0,018	0,075
0,056	0,041	0,036	0,075
0,064	0,069	0,047	0,075
0,08	0,063	0,068	0,075
0,067	0,079	0,063	0,075

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
-17,3333	-29,3333	-36	-27,5556	9,459465
-17,3333	-16	-36	-23,1111	11,182
48	49,33333	24	40,44444	14,2569
74,66667	54,66667	48	59,11111	13,87777
85,33333	92	62,66667	80	15,37675
106,6667	84	90,66667	93,77778	11,64919
89,33333	105,3333	84	92,88889	11,10222

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
134,8963	117,4898	75,8577	109,4146	30,3363

Tabel 23. Absorbansi sel vero dengan SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) konsentrasi 40 %

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,207	0,205	0,199	0,20367	0,004163
Kontrol media	0,067	0,071	0,076	0,07133	0,004509
250	0,085	0,074	0,072	0,077	0,007
125	0,169	0,18	0,198	0,1824	0,01464
62,5	0,183	0,181	0,215	0,193	0,01907
31,25	0,183	0,19	0,218	0,197	0,01852
15,625	0,189	0,2	0,211	0,2	0,11

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
0,018	0,003	-0,004	0,132333
0,102	0,109	0,122	0,132333
0,116	0,11	0,139	0,132333
0,116	0,119	0,142	0,132333
0,122	0,129	0,135	0,132333

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
13,60202	2,267003	-3,02267	4,282116	8,493559
77,07809	82,36776	92,19144	83,87909	7,669188
87,65743	83,12343	105,0378	91,93955	11,56772
87,65743	89,92443	107,3048	94,96222	10,74891
92,19144	97,48111	102,0151	97,22922	4,91668

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
152,7566	130,3167	160,6941	147,9224	15,7551

Tabel 24. Absorbansi sel vero dengan SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji
(*Psidium guajava* L.) konsentrasi 60 %

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,207	0,205	0,199	0,20367	0,004163
Kontrol media	0,067	0,071	0,076	0,07133	0,004509
250	0,077	0,074	0,072	0,0743	0,00251
125	0,172	0,17	0,154	0,1653	0,00986
62,5	0,204	0,239	0,179	0,2073	0,03013
31,25	0,208	0,188	0,189	0,195	0,01126
15,625	0,212	0,2	0,193	0,20167	0,0096

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
0,01	0,003	-0,004	0,132333
0,105	0,099	0,078	0,132333
0,137	0,168	0,103	0,132333
0,141	0,117	0,113	0,132333
0,145	0,129	0,117	0,132333

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
7,556675	2,267003	-3,02267	2,267003	5,289673
79,34509	74,81108	58,94207	71,03275	10,71344
103,5264	126,9521	77,83375	102,7708	24,56791
106,5491	88,4131	85,39043	93,45088	11,44364
109,5718	97,48111	88,4131	98,48866	10,61527

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
159,5879	161,4359	91,201	137,4082	40,0272

Tabel 25. Absorbansi sel vero dengan SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji
(*Psidium guajava* L.) konsentrasi 80 %

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol sel	0,207	0,205	0,199	0,20125	0,005909
Kontrol media	0,067	0,071	0,076	0,07275	0,004646
250	0,084	0,074	0,08	0,07934	0,00503
125	0,179	0,162	0,17	0,17033	0,0085
62,5	0,198	0,202	0,193	0,19767	0,0045
31,25	0,182	0,203	0,186	0,19034	0,01115
15,625	0,199	0,202	0,192	0,19767	0,00513

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3-abs media	Abs sel-abs media
0,017	0,003	0,004	0,132333
0,112	0,091	0,094	0,132333
0,131	0,131	0,117	0,132333
0,115	0,132	0,11	0,132333
0,132	0,131	0,116	0,132333

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata viabilitas sel	Standar Deviasi (SD)
12,84635	2,267003	3,02267	6,04534	5,901952
84,63476	68,76574	71,03275	74,81108	8,582733
98,99244	98,99244	88,4131	95,46599	6,107988
86,90176	99,74811	83,12343	89,92443	8,714783
99,74811	98,99244	87,65743	95,46599	6,772962

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
177,8279	128,825	117,4898	141,3808	32,0688

Lampiran IV. Data perhitungan rendemen dan viabilitas sel fraksi n-heksana**1. Perhitungan rendemen ekstrak kasar dan fraksi daun jambu biji****1.1 Rendemen ekstrak kasar**

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{berat hasil}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{Rendemen} = \frac{265,935}{750} \times 100\% = 35,458\%$$

1.2 Rendemen fraksi n-heksana

$$\% \text{Rendemen fraksi n-heksana} = \frac{14,203}{175,092} \times 100\%$$

$$\% \text{Rendemen} = 8,11\%$$

2. Perhitungan % viabilitas sel

$$\% \text{Viabilitas sel} = \frac{\text{rata-rata absorban sel uji} - \text{rata-rata absorban kontrol media}}{\text{rata-rata absorban kontrol} - \text{rata-rata absorban kontrol media}} \times 100\%$$



Lampiran V. Perhitungan nilai IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana terhadap sel kanker T47D dan MCF-7

Fraksi n-Heksana	T47D	MCF-7	Vero
40%	$y = -11,378x + 62,783$	$y = -76,879x + 225,21$	$y = -55,728x + 171,72$
	$y = 15,115x + 42,119$	$y = -81,783x + 235,68$	$y = -65,796x + 189,15$
	$y = 13,703x + 52,984$	$y = -75,93x + 216,11$	$y = -74,806x + 215,05$
60%	$y = -56,722x + 116,27$	$y = -73,873x + 211,67$	$y = -76,814 + 219,26$
	$y = -27,323x + 60,144$	$y = -74,822x + 217,09$	$y = -67,777x + 199,7$
	$y = -45,677x + 92,28$	$y = -74,506x + 200,8$	$y = -69,535x + 186,39$
80%	$y = -51,49x + 110,22$	$y = -71,817x + 203,36$	$y = -58,489x + 181,66$
	$y = -51,739x + 89,567$	$y = -76,721x + 209,45$	$y = -74,555x + 207,65$
	$y = -52,57x + 97,309$	$y = -77,353x + 196,11$	$y = -60,247x + 174,85$

1. Perhitungan nilai IC₅₀ fraksi n-heksana terhadap sel T47D

SNEDDS fraksi n-heksana 40%

$$y = -11,378x + 62,783$$

$$x = \frac{50 - 62,783}{-11,378}$$

$$x = 1,12$$

$$IC_{50} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} = 13,18257$$

$$y = -15,115x + 42,119$$

$$x = \frac{50 + 42,119}{-15,115}$$

$$x = 0,5$$

$$IC_{50\ 2} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 2} = 3,162278$$

$$y = -13,703x + 52,984$$

$$x = \frac{50 + 52,984}{-13,703}$$

$$x = 1,956$$

$$IC_{50\ 3} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 3} = 1,62181$$

IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 40% pada sel T47D yaitu:

$$(IC_{50\ 1} + IC_{50\ 2} + IC_{50\ 3})/3 = 5,9888$$

SNEDDS fraksi n-heksana 60%

$$y = -56,722x + 116,27$$

$$x = \frac{50 - 116,27}{-56,722}$$

$$x = 1,16$$

$$IC_{50\ 1} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 1} = 14,4544$$

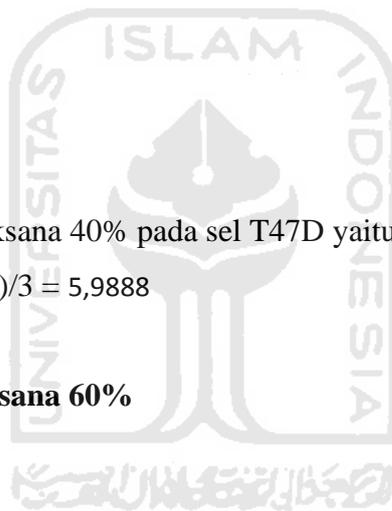
$$y = -27,323x + 60,144$$

$$x = \frac{50 - 60,144}{-27,323}$$

$$x = 0,37$$

$$IC_{50\ 2} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 2} = 2,34423$$



$$y = -45,677x + 92,28$$

$$x = \frac{50-92,28}{-45,677}$$

$$x = 0,92$$

$$IC_{50} 3 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 3 = 8,317638$$

IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 60% pada sel T47D yaitu:

$$(IC_{50} 1 + IC_{50} 2 + IC_{50} 3)/3 = 8,4041926$$

SNEDDS fraksi n-heksana 80%

$$y = -51,49x + 110,22$$

$$x = \frac{50-110,22}{-51,49}$$

$$x = 1,16$$

$$IC_{50} 1 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 1 = 14,4544$$

$$y = -51,739x + 89,567$$

$$x = \frac{50-89,567}{-51,739}$$

$$x = 0,76$$

$$IC_{50} 2 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 2 = 5,754399$$

$$y = -52,57x + 97,309$$

$$x = \frac{50-97,309}{-52,57}$$

$$x = 0,89$$

$$IC_{50} 3 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 3 = 7,7624$$



IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 60% pada sel T47D yaitu:

$$(IC_{50\ 1} + IC_{50\ 2} + IC_{50\ 3})/3 = 9,323756$$

2. Perhitungan nilai IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana terhadap sel MCF-7

SNEDDS fraksi n-heksana 40%

$$y = -76,879x + 225,21$$

$$x = \frac{50 - 225,21}{-76,879}$$

$$x = 2,27$$

$$IC_{50\ 1} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 1} = 186,2087$$

$$y = -81,783x + 235,68$$

$$x = \frac{50 - 235,68}{-81,783}$$

$$x = 2,27$$

$$IC_{50\ 2} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 2} = 186,2087$$

$$y = -75,93x + 216,11$$

$$x = \frac{50 - 216,11}{-75,93}$$

$$x = 1,96$$

$$IC_{50\ 3} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 3} = 91,20108$$

IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 40% pada sel MCF-7 yaitu:

$$(IC_{50\ 1} + IC_{50\ 2} + IC_{50\ 3})/3 = 154,5395$$



SNEDDS fraksi n-heksana 60%

$$y = -73,873x + 211,67$$

$$x = \frac{50-211,67}{-73,873}$$

$$x = 2,18$$

$$IC_{50} 1 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 1 = 151,3561$$

$$y = -74,822x + 217,09$$

$$x = \frac{50-217,09}{-74,822}$$

$$x = 2,23$$

$$IC_{50} 2 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 2 = 169,8244$$

$$y = -74,506x + 200,8$$

$$x = \frac{50-200,8}{-74,506}$$

$$x = 2$$

$$IC_{50} 3 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 3 = 100$$



IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 40% pada sel MCF-7 yaitu:

$$(IC_{50} 1 + IC_{50} 2 + IC_{50} 3)/3 = 140,3935$$

SNEDDS fraksi n-heksana 80%

$$y = -71,817x + 203,36$$

$$x = \frac{50-203,36}{-71,817}$$

$$x = 2,13$$

$$IC_{50} 1 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 1 = 134,8963$$

$$y = -76,721x + 209,45$$

$$x = \frac{50-209,45}{-76,721}$$

$$x = 2,07$$

$$IC_{50} 2 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 2 = 117,4898$$

$$y = -77,353x + 196,11$$

$$x = \frac{50-196,11}{-77,353}$$

$$x = 1,8$$

$$IC_{50} 3 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 3 = 75,85776$$

IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 40% pada sel MCF-7 yaitu:

$$(IC_{50} 1 + IC_{50} 2 + IC_{50} 3)/3 = 109,4146$$

3. Perhitungan nilai EC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana terhadap sel Vero SNEDDS fraksi n-heksana 80%

$$y = -58,489x + 181,66$$

$$x = \frac{50-181,66}{-58,4894}$$

$$x = 2,25$$

$$IC_{50} 1 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 1 = 177,8279$$

$$y = -74,555x + 207,65$$

$$x = \frac{50-207,65}{-74,555}$$

$$x = 2,11$$

$$IC_{50} 2 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 2 = 128,825$$

$$y = -60,247x + 174,85$$

$$x = \frac{50-174,85}{-60,247}$$

$$x = 2,07$$

$$IC_{50} 3 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 3 = 117,4898$$

IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 80% pada sel Vero yaitu:

$$(IC_{50} 1 + IC_{50} 2 + IC_{50} 3)/3 = 141,3808$$

SNEDDS fraksi n-heksan 60%

$$y = -76,814x + 219,26$$

$$x = \frac{50-219,26}{-76,814}$$

$$x = 2,203$$

$$IC_{50} 1 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 1 = 159,5879$$

$$y = -67,777x + 199,7$$

$$x = \frac{50-199,7}{-67,777}$$

$$x = 2,208$$

$$IC_{50} 2 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 2 = 161,4359$$

$$y = -69,535x + 186,39$$

$$x = \frac{50-186,39}{-69,535}$$

$$x = 1,96$$

$$IC_{50} 3 = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50} 3 = 91,20108$$



IC₅₀ Fraksi n-heksana 60% pada sel Vero yaitu:

$$(IC_{50\ 1} + IC_{50\ 2} + IC_{50\ 3})/3 = 137,4082$$

SNEDDS fraksi n-heksana 40%

$$y = -55,728x + 171,72$$

$$x = \frac{50-171,72}{-55,728}$$

$$x = 2,184$$

$$IC_{50\ 1} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 1} = 152,7566$$

$$y = -65,769x + 189,15$$

$$x = \frac{50-189,15}{-65,769}$$

$$x = 2,115$$

$$IC_{50\ 2} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 2} = 130,3167$$

$$y = -74,806x + 215,05$$

$$x = \frac{50-215,05}{-74,806}$$

$$x = 2,206$$

$$IC_{50\ 3} = \text{Antilog}(x)$$

$$IC_{50\ 3} = 160,6941$$

IC₅₀ SNEDDS fraksi n-heksana 40% pada sel Vero yaitu:

$$(IC_{50\ 1} + IC_{50\ 2} + IC_{50\ 3})/3 = 147,9224$$



4. Perhitungan Nilai SI (*Selectivity Indeks*)

$$\text{Nilai SI} = \frac{\text{nilai IC50 vero}}{\text{nilai IC50 Sel kanker}}$$

a. SI terhadap sel T47D

$$\text{SNEDDS fraksi n-heksana 40\%} = \frac{147,9224}{5,988885} = 24,699$$

$$\text{SNEDDS fraksi n-heksana 60\%} = \frac{137,4082}{8,4041926} = 16,349$$

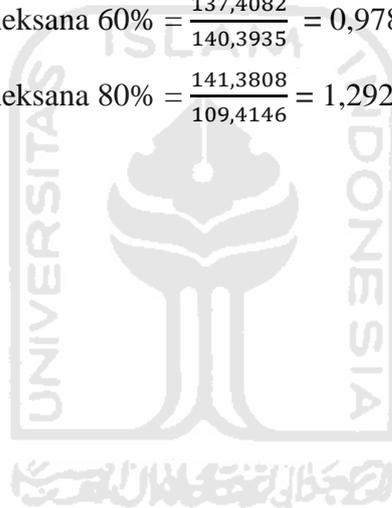
$$\text{SNEDDS fraksi n-heksana 80\%} = \frac{141,3808}{9,323756} = 15,163$$

b. SI terhadap sel MCF-7

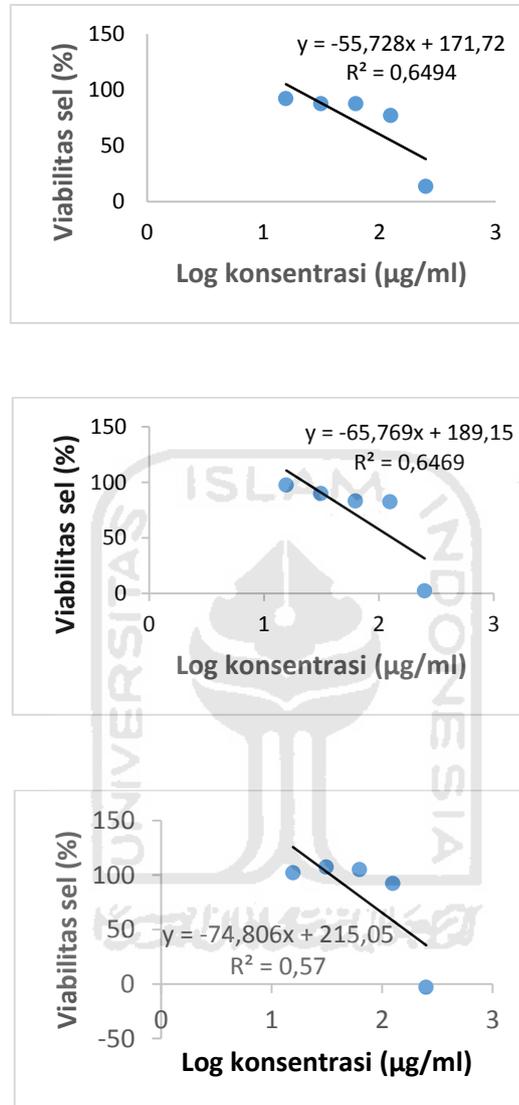
$$\text{SNEDDS fraksi n-heksana 40\%} = \frac{147,9224}{154,5395} = 0,957$$

$$\text{SNEDDS fraksi n-heksana 60\%} = \frac{137,4082}{140,3935} = 0,978$$

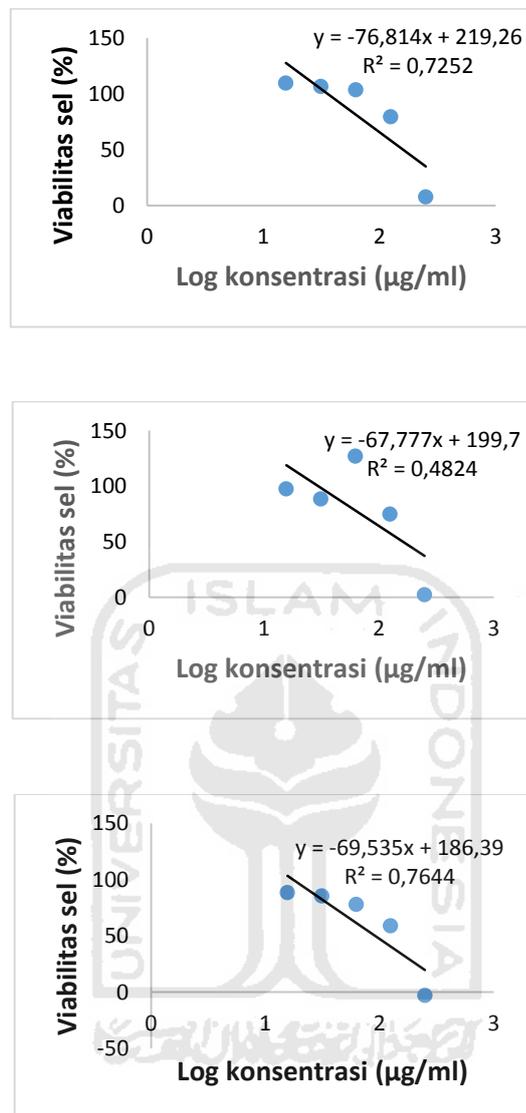
$$\text{SNEDDS fraksi n-heksana 80\%} = \frac{141,3808}{109,4146} = 1,292$$



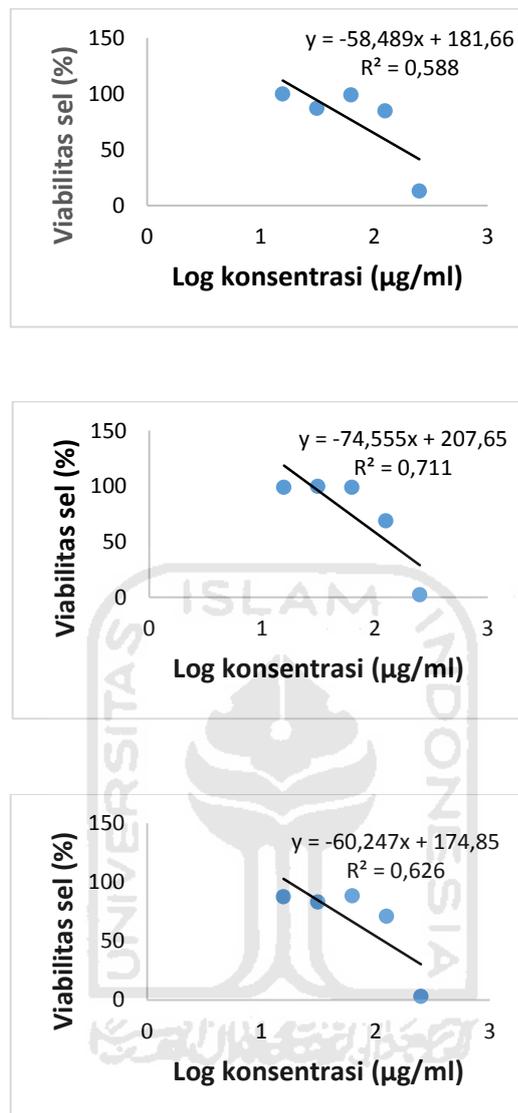
Lampiran VI. Grafik Hubungan Konsentrasi Sampel SNEDDS Fraksi N-heksana Daun Jambu Biji Terhadap Viabilitas Sel Vero



Gambar 6.1. Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana 40% dengan viabilitas kanker payudara Vero

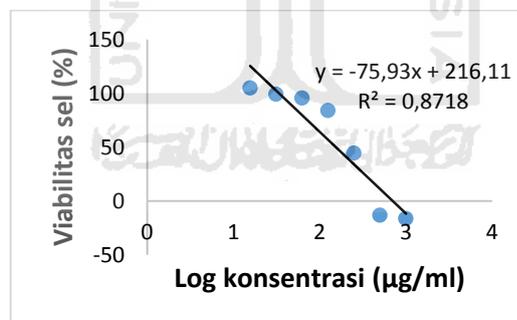
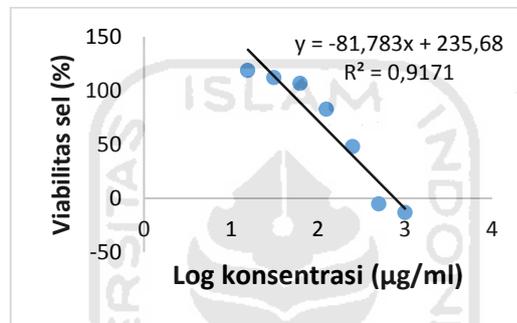
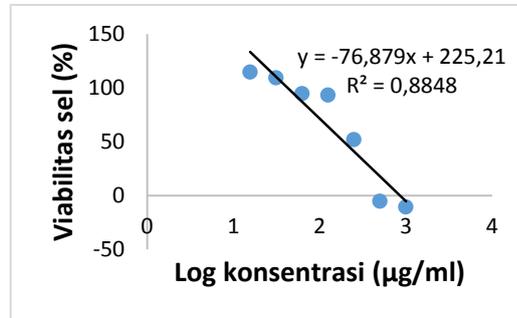


Gambar 6.2. Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana 60% dengan viabilitas kanker payudara Vero

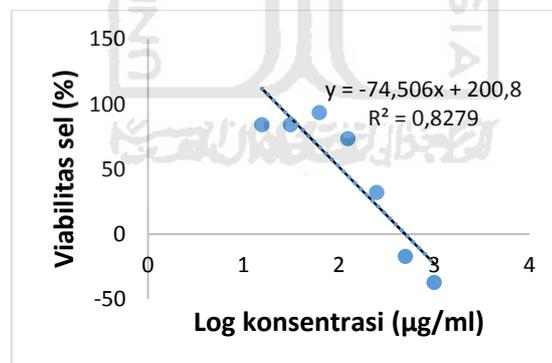
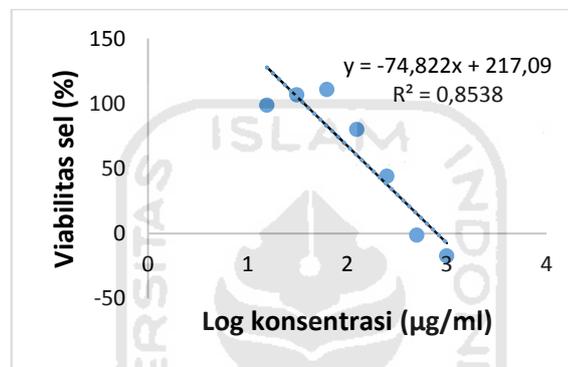
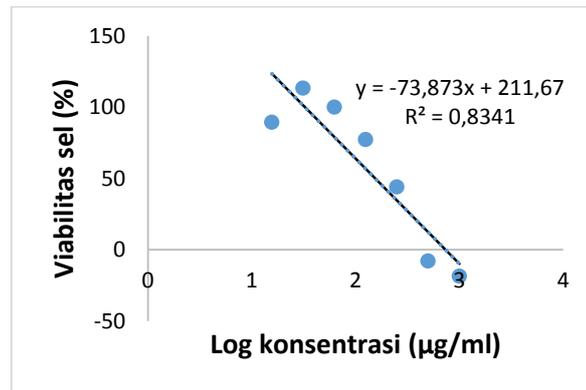


Gambar 6.3. Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana 80% dengan viabilitas sel Vero

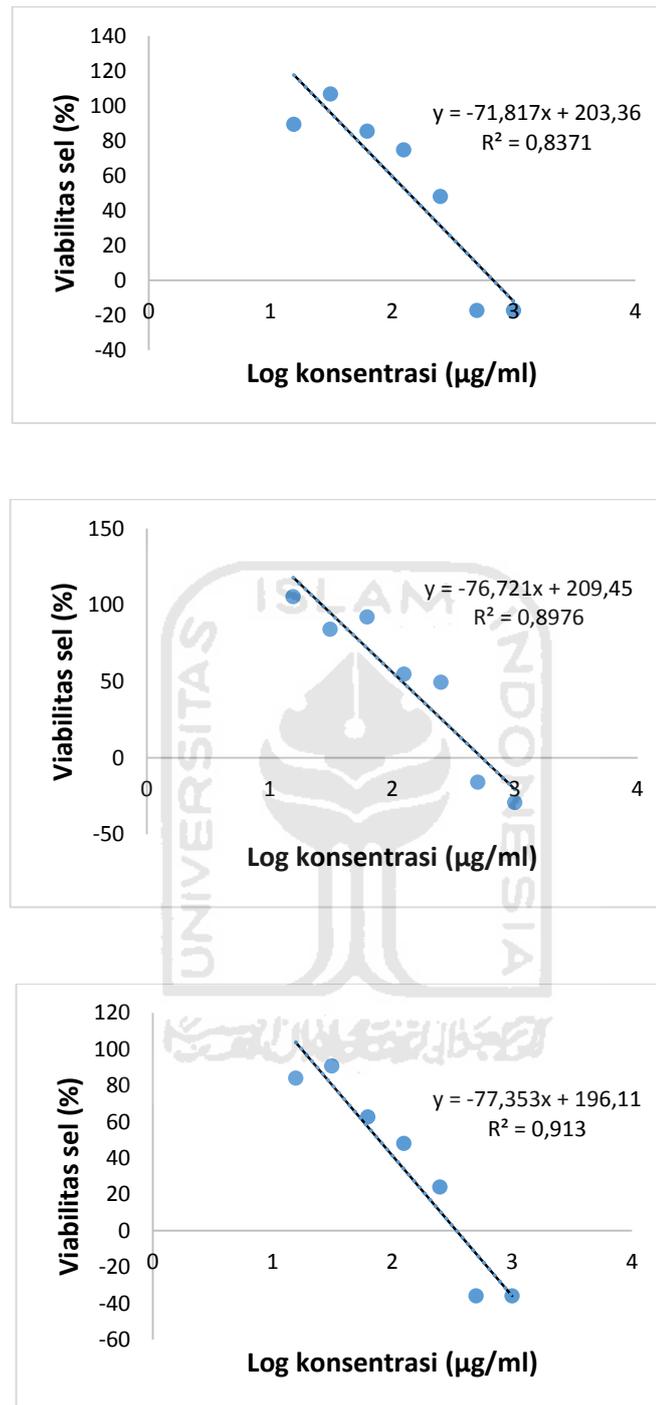
Lampiran VII. Grafik Hubungan Konsentrasi Sampel SNEDDS Fraksi n-heksana Daun Jambu Biji Terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara MCF-7



Gambar 7.1. Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana 40% dengan viabilitas sel MCF-7

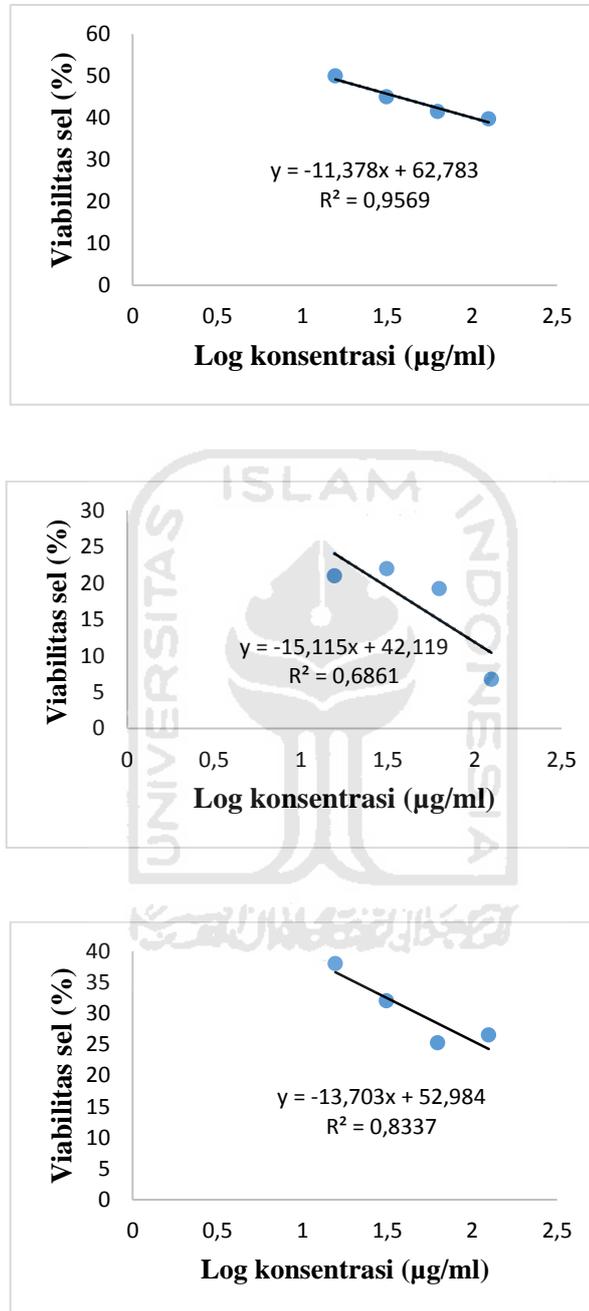


Gambar 7.2. Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana 60% dengan viabilitas sel MCF-7

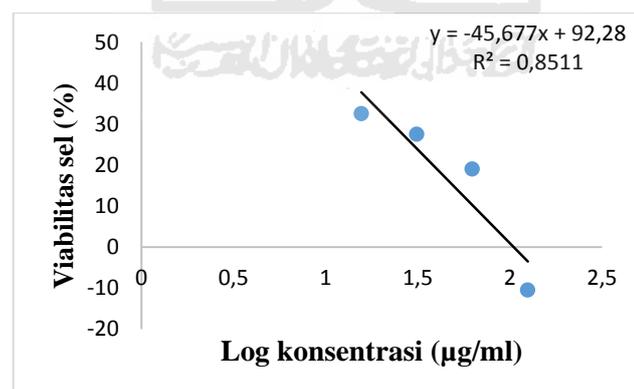
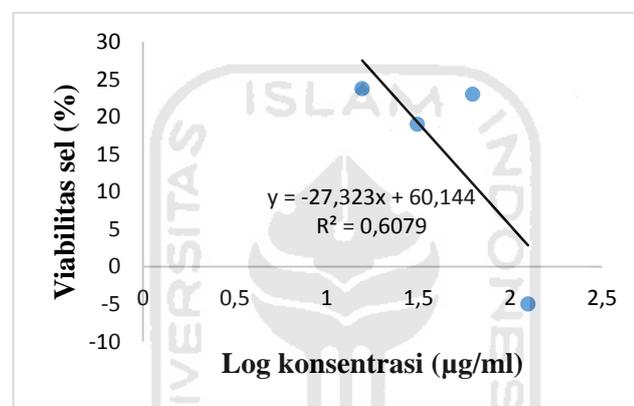
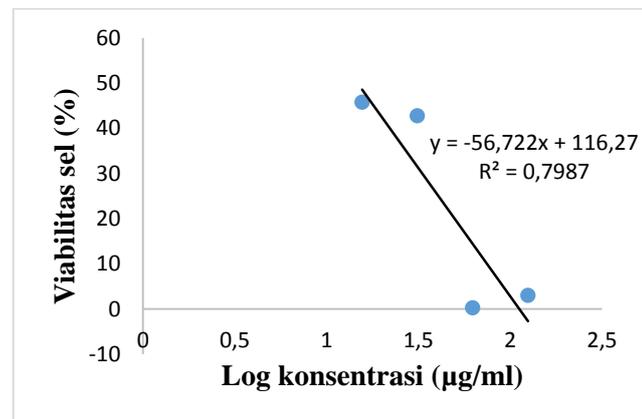


Gambar 7.3. Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana 80% dengan viabilitas sel MCF-7

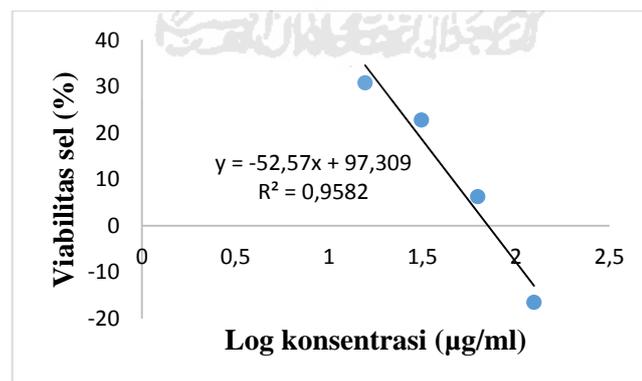
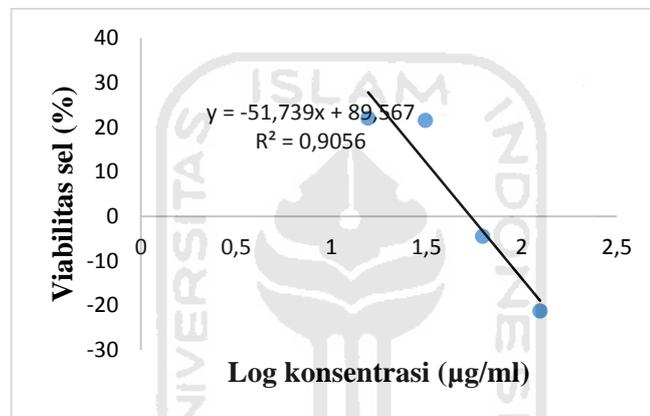
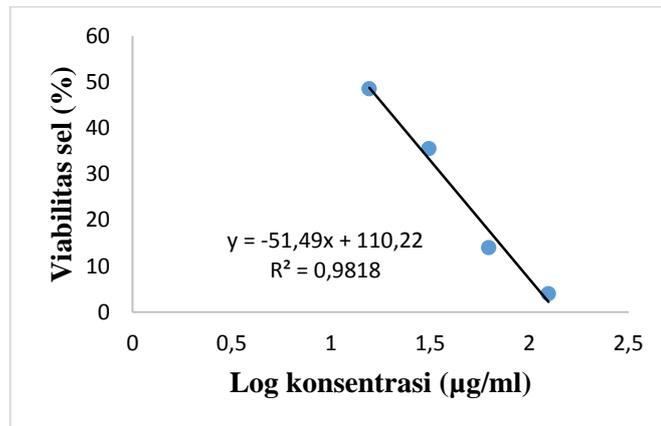
Lampiran VIII. Grafik Hubungan Konsentrasi Sampel SNEDDS Fraksi n-heksana Daun Jambu Biji Terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara T47D



Gambar 8.1 Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji 40% dengan viabilitas sel T47D

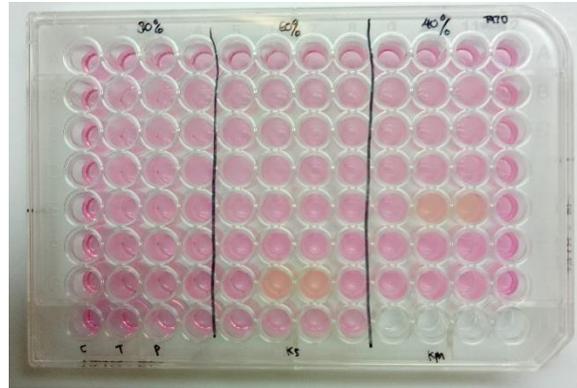


Gambar 8.2 Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji 60% dengan viabilitas sel T47D

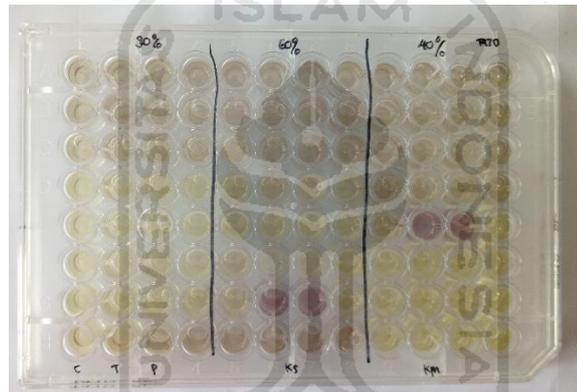


Gambar 8.3. Grafik hubungan konsentrasi SNEDDS fraksi n-heksana daun jambu biji 80% dengan viabilitas T47D

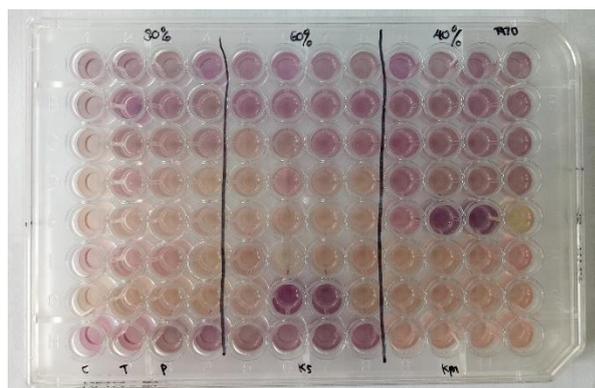
Lampiran IX. Alat dan bahan pada uji sitotoksitas fraksi n-heksana daun jambu biji



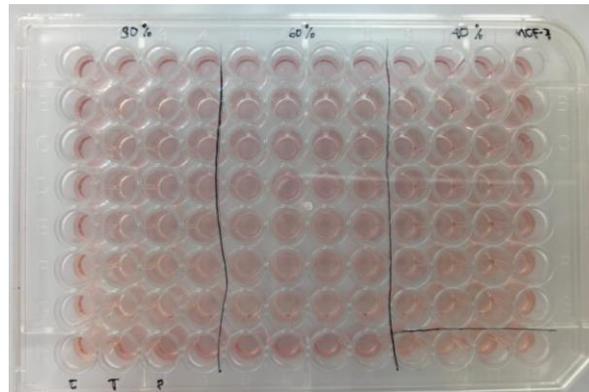
Gambar 9.1. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel T47D setelah *treatment* zat uji (sebelum MTT)



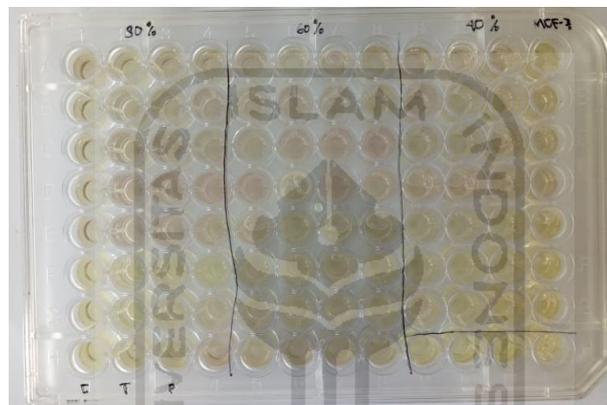
Gambar 9.2. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel T47D setelah penambahan larutan SDS *stopper*.



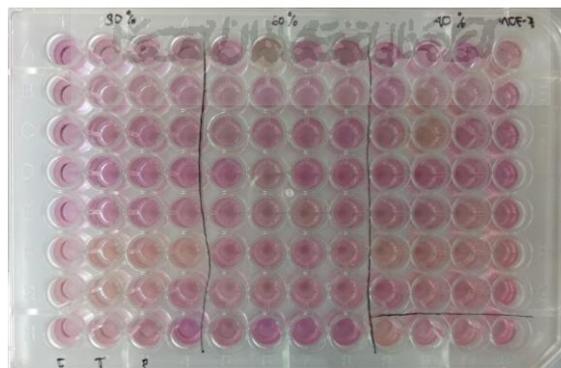
Gambar 9.3. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel T47D setelah MTT dan penambahan larutan *stopper* dan didiamkan semalam.



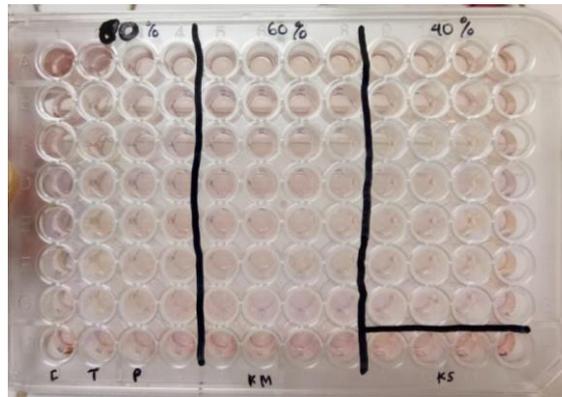
Gambar 9.4. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel MCF-7 setelah MTT dan inkubasi 4 jam.



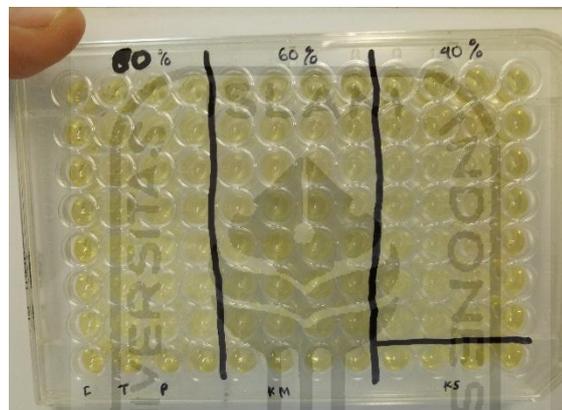
Gambar 9.5. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel Vero setelah penambahan larutan SDS *stopper*.



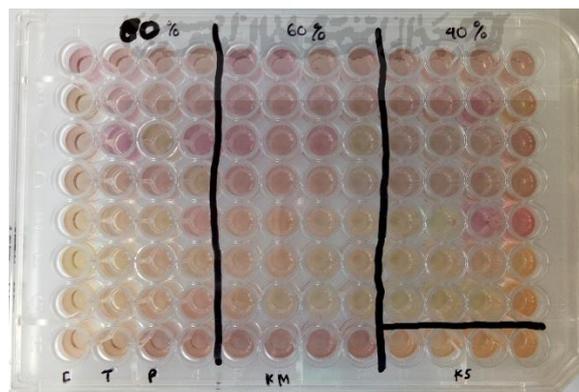
Gambar 9.6. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel MCF-7 setelah MTT dan penambahan larutan *stopper* dan didiamkan semalam.



Gambar 9.7. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel Vero setelah MTT dan inkubasi 4 jam.



Gambar 9.8. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel Vero setelah penambahan larutan SDS stopper.



Gambar 9.9. Plat 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel Vero setelah MTT dan penambahan larutan stopper dan didiamkan semalam.

Keterangan:

A1-A4 = Fraksi n-heksana 80% (konsentrasi 15,625 µg/ml)

B1-B4 = Fraksi n-heksana 80% (konsentrasi 31,25 µg/ml)

C1-C4 = Fraksi n-heksana 80% (konsentrasi 62,5 µg/ml)

D1-D4 = Fraksi n-heksana 80% (konsentrasi 125 µg/ml)

E1-E4 = Fraksi n-heksana 80% (konsentrasi 250 µg/ml)

F1-F4 = Fraksi n-heksana 80% (konsentrasi 500 µg/ml)

G1-G4 = Fraksi n-heksana 80% (konsentrasi 1000 µg/ml)

A5-A8 = Fraksi n-heksana 60% (konsentrasi 15,625 µg/ml)

B5-B8 = Fraksi n-heksana 60% (konsentrasi 31,25 µg/ml)

C5-C8 = Fraksi n-heksana 60% (konsentrasi 62,5 µg/ml)

D5-D8 = Fraksi n-heksana 60% (konsentrasi 125 µg/ml)

E5-E8 = Fraksi n-heksana 60% (konsentrasi 250 µg/ml)

F5-F8 = Fraksi n-heksana 60% (konsentrasi 500 µg/ml)

G5-G8 = Fraksi n-heksana 60% (konsentrasi 1000 µg/ml)

A9-A12 = Fraksi n-heksana 40% (konsentrasi 15,625 µg/ml)

B9-B12 = Fraksi n-heksana 40% (konsentrasi 31,25 µg/ml)

C9-C12 = Fraksi n-heksana 40% (konsentrasi 62,5 µg/ml)

D9-D12 = Fraksi n-heksana 40% (konsentrasi 125 µg/ml)

E9-E12 = Fraksi n-heksana 40% (konsentrasi 250 µg/ml)

F9-F12 = Fraksi n-heksana 40% (konsentrasi 500 µg/ml)

G9-G12 = Fraksi n-heksana 40% (konsentrasi 1000 µg/ml)

H1-H3 = Capryoll, Tween 20, dan PEG

H5-H8 = Kontrol sel

H9-H12 = Kontrol media

Lampiran X. Data Hasil ELISA reader

Raw Data Report Single Wavelength Mes= F3, 595nm Incubation= OFF				Raw Data Report Single Wavelength Mes= F3, 595nm Incubation= OFF				Raw Data Report Single Wavelength Mes= F3, 595nm Incubation= OFF			
	1	2	3		1	2	3		1	2	3
A	0.319	0.300	0.302	A	0.174	0.154	0.164	A	0.199	0.202	0.196
B	0.267	0.293	0.270	B	0.151	0.171	0.159	B	0.182	0.203	0.189
C	0.181	0.194	0.204	C	0.148	0.157	0.163	C	0.198	0.202	0.184
D	0.141	0.127	0.113	D	0.129	0.149	0.137	D	0.179	0.177	0.153
E	0.111	0.093	0.137	E	0.123	0.125	0.131	E	0.164	0.174	0.098
F	0.132	0.134	0.254	F	0.084	0.076	0.074	F	0.167	0.205	0.067
G	0.137	0.135	0.144	G	0.074	0.066	0.074	G	0.164	0.083	0.052
H	0.274	0.324	0.312	H	0.080	0.100	0.145	H	0.077	0.127	0.194
	4	5	6		4	5	6		4	5	6
A	0.335	0.308	0.307	A	0.167	0.173	0.154	A	0.192	0.212	0.200
B	0.254	0.296	0.288	B	0.167	0.172	0.177	B	0.186	0.203	0.198
C	0.199	0.126	0.304	C	0.151	0.162	0.171	C	0.193	0.204	0.239
D	0.100	0.137	0.192	D	0.143	0.164	0.145	D	0.178	0.172	0.170
E	0.134	0.153	0.177	E	0.119	0.129	0.121	E	0.160	0.077	0.174
F	0.135	0.298	0.169	F	0.074	0.090	0.067	F	0.072	0.170	0.073
G	0.107	0.233	0.607	G	0.083	0.079	0.075	G	0.066	0.165	0.068
H	0.566	0.654	0.589	H	0.125	0.128	0.151	H	0.148	0.207	0.205
	7	8	9		7	8	9		7	8	9
A	0.309	0.306	0.352	A	0.164	0.162	0.165	A	0.198	0.193	0.199
B	0.289	0.304	0.305	B	0.167	0.168	0.174	B	0.185	0.199	0.183
C	0.255	0.255	0.291	C	0.171	0.174	0.170	C	0.193	0.179	0.183
D	0.137	0.145	0.204	D	0.156	0.148	0.157	D	0.164	0.154	0.160
E	0.137	0.170	0.157	E	0.125	0.120	0.126	E	0.073	0.072	0.085
F	0.297	0.165	0.134	F	0.088	0.091	0.079	F	0.062	0.064	0.059
G	0.555	0.247	0.192	G	0.073	0.073	0.079	G	0.052	0.053	0.051
H	0.473	0.401	0.125	H	0.164	0.166	0.070	H	0.194	0.199	0.067
	10	11	12		10	11	12		10	11	12
A	0.296	0.331	0.329	A	0.173	0.177	0.162	A	0.200	0.204	0.211
B	0.300	0.307	0.303	B	0.169	0.172	0.158	B	0.190	0.204	0.210
C	0.239	0.280	0.325	C	0.158	0.160	0.165	C	0.181	0.176	0.215
D	0.239	0.285	0.319	D	0.157	0.158	0.150	D	0.180	0.180	0.198
E	0.636	0.547	0.166	E	0.129	0.124	0.126	E	0.074	0.109	0.116
F	0.137	0.126	0.151	F	0.087	0.084	0.085	F	0.064	0.074	0.080
G	0.162	0.110	0.116	G	0.078	0.082	0.084	G	0.060	0.060	0.073
H	0.212	0.179	0.082	H	0.087	0.080	0.101	H	0.071	0.077	0.075

(a)

(b)

(c)

Gambar 10.1. Hasil ELISA reader (a) Sel T47D (b) Sel MCF-7 (c) Sel Vero