

**FORMULASI SEDIAAN NANOPARTIKEL FRAKSI
N-HEKSANA DARI EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI (*Psidium
guajava* Linn.) DALAM BENTUK SNEDDS DAN UJI AKTIVITASNYA
SEBAGAI ANTIKANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
gelar sarjana (S.Si) Program Studi Kimia
pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia
Yogyakarta**



Diajukan oleh:

ANDRI RAMADHANI

No Mhs : 16612073

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

2020

**FORMULASI SEDIAAN NANOPARTIKEL FRAKSI
N-HEKSANA DARI EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI
(*Psidium guajava* Linn.) DALAM BENTUK SNEDDS DAN UJI AKTIVITASNYA
SEBAGAI ANTIKANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

yang diajukan oleh :

ANDRI RAMADHANI

No Mhs : 16612073

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Prodi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 10 Juni 2020

Dewan Penguji

1. Nurcahyo Iman Prakoso, S.Si., M.Sc
2. Amri Setyawati, S.Si., M.Sc
3. Dhina Fitriastuti, S.Si., M.Sc
4. Argo Khoirul Anas, S.Si., M.Sc

Tanda tangan



Mengetahui,
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Andri Ramadhani
NIM : 16612073
Program Studi : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya dengan judul Formulasi Sediaan Nanopartikel Fraksi N-Heksana dari Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn.) dalam Bentuk SNEDDS dan Uji Aktivitasnya sebagai Antikanker Payudara bersifat asli dan tidak berisi material yang telah diterbitkan sebelumnya kecuali referensi yang disebutkan di dalam skripsi ini. Apabila terdapat kontribusi dari penulis lain, maka penulis tersebut secara eksplisit telah disebutkan di dalam skripsi ini. Apabila kemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan penuh tanggungjawab.

Yogyakarta, 10 Juli 2020

Yang menyatakan,



Andri Ramadhani
NIM, 16612073

HALAMAN PERSEMBAHAN

Puji syukur kepada Allah SWT atas dukungan dari orang-orang tercinta, akhirnya skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik dan tepat pada waktunya. Dengan rasa bangga dan Bahagia saya haturkan rasa syukur dan terimakasih kepada Allah SWT karena telah menggerakkan kemauan saya, menggerakkan segenap jiwa dan raga ini serta telah memberi kemudahan dan kelancaran dalam menyelesaikan skripsi ini dengan tepat waktu.

Kupersembahkan Skripsi ini untuk orang istimewa yaitu kedua orang tuaku yang selalu memberi dukungan atas segala aktivitasku baik akademik maupun non-akademik, kedua adikku yang tersayang, seluruh keluargaku, sahabat-sahabatku tercinta, rekan-rekan fungsionaris HMK Periode 2017/2018 dan HMK Periode 2018/2019, teman-teman seangkatan, dan seluruh Keluarga Besar Kimia FMIPA UII.

Skripsi ini juga kupersembahkan untuk orang-orang special yang telah membimbing dan memotivasi saya di kampus yaitu Nurcahyo Iman Prakoso dan Ibu Amri Setyawati.

Sesungguhnya sholatku, ibadahku, hidupku, dan matiku semuanya bagi Allah Rabb semesta alam (QS. Al An'am: 162).

Dari Abu Hurairah ra. Bahwasanya Rasulullah SAW. Bersabda : “Barang siapa menempuh jalan untuk menuntut ilmu, maka Allah memudahkan bagi orang itu karena ilmu tersebut jalan menuju surga” (HR. Muslim).

Jadilah yang terbaik diantara yang baik (Andri Ramadhani).

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur saya ucapkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahnya sehingga penulisan skripsi yang berjudul “Formulasi Sediaan Nanopartikel Fraksi N-Heksana dari Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* Linn.) dalam Bentuk SNEDDS dan Uji Aktivitasnya sebagai Antikanker Payudara” dapat saya selesaikan dengan baik.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada program Strata-1 di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

Dalam penyusunan skripsi ini, banyak pihak yang memberikan bantuan, bimbingan, dukungan, dan kontribusi bagi penyempurnaan skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang telah menganugrahkan kesehatan jasmani dan rohani sehingga saya dapat menyusun skripsi dengan lancar serta Nabi Muhammad SAW dan para pengikutnya.
2. Orang tua yang telah mendukung baik secara moral maupun material, serta anggota keluarga yang telah memberikan dukungan, doa, dan nasihat untuk setiap kegiatan yang saya lakukan.
3. Bapak Prof. Riyanto., S.Pd., M.Si., Ph.D selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
4. Ibu Prof. Is Fatimah. selaku Ketua Jurusan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
5. Bapak Dr. Dwiwarso Rubiyanto, S.Si., M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesai.
6. Bapak Nurcahyo Iman Prakoso, S.Si, M.Sc sebagai pembimbing 1 skripsi yang telah banyak meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan saya selama penulisan skripsi.

7. Ibu Amri Setyawati, S.Si, M.Sc selaku pembimbing 2 skripsi saya yang telah banyak membantu dalam penyelesaian skripsi ini.
8. Semua pihak yang telah membantu seperti teman–teman dekat saya, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan lancar.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kelengkapan dan kesempurnaan skripsi ini. Semoga karya ilmiah ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.



Yogyakarta, 1 Mei 2020

Penulis

Andri Ramadhani

NIM.16612073

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
INTISARI	xv
ABSTRACT	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Kanker dan Pengobatannya	7
2.2. Pengembangan Daun Jambu Biji (<i>Psidium guajava</i> . L) Sebagai Obat .	8
2.3. Pengembangan SNEDDS sebagai sarana terapi obat	11
2.4. Gambaran Umum Penelitian	13
BAB III. DASAR TEORI	16
3.1. Tanaman Jambu Biji (<i>Psidium guajava</i> . L)	16
3.1.1. Klasifikasi tanaman jambu biji (<i>Psidium guajava</i> . L)	16
3.1.2. Penyebaran dan Tempat Tumbuh	16
3.1.3. Morfologi Tanaman	17

3.1.4.	Kandungan Tanaman.....	17
3.1.5.	Kegunaan Tanaman Jambu Biji.....	18
3.2.	Ekstraksi	19
3.3.	Fraksinasi.....	20
3.4.	Penapisan Fitokimia	20
3.5.	Nanoemulsi.....	20
3.6.	Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)	22
3.6.1.	Pengertian SNEDDS	22
3.6.2.	Keuntungan dan kerugian SNEDDS	26
3.6.3.	Mekanisme SNEDDS.....	27
3.7.	Particle Size Analyzer (PSA)	28
3.7.1.	Ukuran dan Distribusi Partikel	30
3.7.2.	Zeta Potensial	31
3.8.	Transmission Electron Microscope (TEM).....	31
3.9.	Kanker Payudara	34
3.9.1.	Sel T47D.....	35
3.9.2.	Sel MCF-7	36
3.9.3.	Sel Vero.....	37
3.10.	Kultur Sel (Malole, 1990).....	37
3.11.	Uji Sitotoksisitas.....	38
3.12.	Metode Pengujian Sitotoksik.....	38
3.13.	Elisa Reader.....	40
3.14.	Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)	41
3.15.	Mass Spectroscopy (MS).....	44
3.16.	Protokol Kurva Kalibrasi.....	45
3.16.1	Pembuatan Kurva Kalibrasi (JoVe, 2019).....	45
3.17.	Hipotesis Penelitian	47
BAB IV. METODE PENELITIAN		48

4.1.	Waktu dan Tempat	48
4.2.	Alat dan Bahan	48
4.2.1.	Alat	48
4.2.2.	Bahan	48
4.3.	Identifikasi Variabel	49
4.4.	Tahapan Penelitian	49
4.5.	Cara Kerja.....	50
4.5.1.	Uji Determinasi	50
4.5.2.	Persiapan Sampel.....	50
4.5.3.	Tahap Ekstraksi dengan Metode Maserasi.....	50
4.5.4.	Fraksinasi.....	50
4.5.5.	Penapisan Fitokimia	51
4.5.5.1.	Uji Alkaloid.....	51
4.5.5.2.	Uji Flavonoid.....	51
4.5.5.3.	Uji Fenolik.....	51
4.5.5.4.	Uji Terpenoid/Steroid.....	51
4.5.6.	Pembuatan Nanoemulsi	52
4.5.7.	Uji PSA.....	52
4.5.7.1.	Ukuran Partikel.....	52
4.5.7.2.	Zeta Potensial	52
4.5.8.	Uji TEM.....	52
4.5.9.	Uji Aktivitas Antikanker secara in-vitro (CCRC, 2009).....	53
4.5.9.1.	Penyiapan sel	53
4.5.9.2.	Penghitungan sel kanker.....	54
4.5.9.3.	Peletakan sel pada plate.....	54
4.5.9.4.	Pembuatan larutan sampel dan pemberian larutan sampel pada plate	54
4.5.9.5.	Penambahan larutan MTT (Reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide).....	55
4.5.10.	Analisis dengan LC-MS/MS	56

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	57
5.1. Determinasi Tumbuhan	57
5.2. Persiapan Sampel.....	57
5.3. Ekstraksi dengan Metode Maserasi	58
5.4. Fraksinasi.....	59
5.5. Uji Penapisan Fitokimia	59
5.5.1. Uji alkaloid	60
5.5.2. Uji flavonoid.....	61
5.5.3. Uji fenolik.....	62
5.5.4. Uji terpenoid/steroid.....	63
5.6. Karakterisasi dengan PSA	64
5.6.1. Ukuran dan distribusi nanopartikel	64
5.6.2. Zeta potensial.....	66
5.7. Karakterisasi dengan TEM.....	67
5.8. Uji <i>in – vitro</i> dengan SNEDDS	68
5.8.1. Hasil pengujian aktivitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel T47D	76
5.8.2. Hasil pengujian aktivitas antikanker sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel MCF-7	77
5.8.3. Hasil pengujian aktivitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel Vero	81
5.8.4. Uji kualitatif pengaruh sitotoksisitas Capryoll, Tween 20, dan PEG 400 terhadap sel T47D, MCF-7 dan sel Vero.....	82
5.9. Analisis Kandungan Senyawa Terbesar dalam Fraksi N-Heksana dari Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (<i>Psidium guajava</i> L.) Menggunakan LC-MS/MS	83
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	88

6.1.	Kesimpulan.....	88
6.2.	Saran.....	88
DAFTAR PUSTAKA		89
LAMPIRAN.....		109



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Struktur kimia kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> Linn.) (Nita, 2019).....	10
Gambar 2.	Daun jambu biji	16
Gambar 3	Ilustrasi terbentuknya nanoemulsi.....	21
Gambar 4.	Struktur Tween 80	24
Gambar 5.	Struktur Tween 20	24
Gambar 6.	Struktur Propilen glikol	25
Gambar 7.	Struktur kimia PEG 400.....	26
Gambar 8.	Mekanisme SNEDDS dalam tubuh.....	28
Gambar 9.	Alat <i>Particle Size Analyzer</i>	29
Gambar 10.	Alat TEM.....	32
Gambar 11.	Morfologi sel T47D	35
Gambar 12.	Morfologi sel MCF-7.....	36
Gambar 13.	Reaksi Reduksi MTT menjadi Formazan	39
Gambar 14.	Microplate reader atau ELISA.....	41
Gambar 15.	Desorpsi Ion dari Larutan	44
Gambar 16.	Mekanisme <i>electrospray ionization</i>	45
Gambar 17.	Tahapan Penelitian.....	49
Gambar 18.	Reaksi uji alkaloid dengan pereaksi <i>Dragendorff</i>	61
Gambar 19.	Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat	62
Gambar 20.	Reaksi Uji Fenolik	63
Gambar 21.	Reaksi Uji Steroid/Terpenoid	64
Gambar 22.	Hasil uji TEM pada 3 spot dengan perbesaran 100 nm	67
Gambar 23.	Morfologi Sel T47D dan MCF-7 sebelum dilakukan uji <i>treatment</i> ..	70
Gambar 24.	Morfologi sel T47D setelah dilakukan <i>treatment</i>	71

Gambar 25. Morfologi sel MCF-7 setelah dilakukan <i>treatment</i>	72
Gambar 26. Morfologi sel vero sebelum <i>treatment</i>	80
Gambar 27. Morfologi sel vero setelah dilakukan <i>treatment</i>	80
Gambar 28. Kromatogram TIC fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) dengan LC-MS/MS	83
Gambar 29. Spektrum massa fraksi n-heksana daun jambu biji dengan <i>low</i> <i>energy</i>	85
Gambar 30. Spektrum massa fraksi n-heksana daun jambu biji dengan <i>high</i> <i>energy</i>	87
Gambar 31. Struktur kimia kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> Linn.).....	87



DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Variabel Penelitian	49
Tabel 2.	Hasil maserasi dari serbuk daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.)	58
Tabel 3.	Hasil fraksinasi daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.).....	59
Tabel 4.	Hasil uji fitokimia.....	60
Tabel 5.	Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel dengan PSA	64
Tabel 6.	Nilai IC ₅₀ uji aktivitas antikanker.....	74
Tabel 7.	Ukuran partikel dan nilai IC ₅₀ uji aktivitas antikanker payudara.....	75
Tabel 8.	Hasil pengujian aktivitas antikanker sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel T47D	76
Tabel 9.	Hasil pengujian aktivitas antikanker sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel MCF-7	77
Tabel 10.	Nilai IC ₅₀ uji sitotoksitas terhadap sel vero	79
Tabel 11.	Nilai SI (<i>selectivity indeks</i>) hasil uji sitotoksitas	79
Tabel 12.	Hasil pengujian aktivitas antikanker sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel Vero.....	81
Tabel 13.	Hasil uji kualitatif pengaruh sitotoksitas Capryoll, Tween 20, dan PEG 400 terhadap sel T47D, MCF-7, dan Vero.....	82

**FORMULASI SEDIAAN NANOPARTIKEL FRAKSI
N-HEKSANA DARI EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI (*Psidium
guajava* Linn.) DALAM BENTUK SNEDDS DAN UJI AKTIVITASNYA
SEBAGAI ANTIKANKER PAYUDARA**

ANDRI RAMADHANI

(16612073)

INTISARI

Berbagai metode pengobatan kanker payudara telah dilakukan seperti kemoterapi, imunoterapi, radioterapi, dan pembedahan. Namun, pengobatan tersebut dapat menyebabkan dampak fisik pada beberapa organ tubuh. Oleh karena itu salah satu solusinya adalah pembuatan sediaan nanopartikel dengan bahan baku berupa tumbuhan asli Indonesia. Daun jambu biji adalah salah satu diantara tumbuhan lokal Indonesia yang memiliki kandungan senyawa polifenol, karoten, flavonoid dan tannin yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan sediaan obat untuk pengobatan antikanker payudara dengan bahan baku fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji. Metode ekstraksi yang dilakukan adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Selanjutnya dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak kasar menggunakan pelarut organik n-heksana. Fraksi yang telah diperoleh kemudian dilakukan analisis fitokimia dan dibuat dalam bentuk sediaan nanopartikel dengan menggunakan metode SNEDDS. Sediaan nanopartikel ini dikarakterisasi dengan menggunakan PSA dan TEM. Uji aktivitas antikanker dilakukan secara *in-vitro* menggunakan metode *Microtetrazolium* (MTT) *assay* dengan sel uji T47D dan MCF-7. Selanjutnya pada tahap akhir dilakukan analisis dengan LC-MS/MS terhadap fraksi n-hexana untuk mengetahui kandungan senyawa yang berperan dalam penghambatan sel kanker tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji pada konsentrasi 40% adalah yang paling optimal. Berdasarkan uji *in-vitro* diketahui bahwa sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji memiliki kemampuan rata-rata *moderate* aktif. Senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana diantaranya senyawa *3-Tert-butyl-4-methoxyphenol*, *Hyptatic acid*, *Petasitolone*, *Candidate Mass C₂₆H₄₈O₁₄*, *Stigmastan-3,6-dione*, dan *Candidate Mass C₃₀H₃₄O₅*.

Kata Kunci : SNEDDS, MTT *assay*, *in-vitro*, *Candidate Mass*.

**NANOPARTICLES SNEDDS FORMULATION OF N-HEXANE FRACTION
FROM ETHANOLIC EXTRACT OF GUAVA LEAVES (*Psidium guajava*
Linn.) AND IT'S ACTIVITY TO INHIBIT BREAST ANTICANCER**

ANDRI RAMADHANI

(16612073)

ABSTRACT

Various methods of cancer treatment have been carried out such as chemotherapy, immunotherapy, radiotherapy, and surgery. However, this treatment can cause physical reactions to several organs in the body. Therefore, one solution is to make nanoparticle drug from guava leaves extract. Guava leaf is one of Indonesia's local plants that contains polyphenols, carotenoids, flavonoids and tannins which have the ability to inhibit the growth of breast cancer. This study aims to develop a drug formulation for the treatment of breast anticancer with n-hexane fraction from guava leaves ethanolic extract. The extraction method used was maceration using 96% ethanol solvent. Then the fractionation of crude extracts was carried out using n-hexane. The fraction was then subjected to phytochemical analysis and made in the form of nanoparticle preparations using the SNEDDS method. These nanoparticle formulation were characterized by using PSA and TEM. Anticancer activity test was carried out in vitro using the Microtetrazolium (MTT) assay method at T47D and MCF-7 cells. Furthermore, at the final stage, an LC-MS / MS test was carried out on the n-hexane fraction to identify the component. The results showed that 40% extract in SVEDDS nanoformulation is the most optimal concentration to inhibit breast cancer. Based on in-vitro tests Associated with the provisions of the n-hexane fraction nanoparticles from the ethanol extract of guava leaves has the average ability of being active. The largest active complex in the n-hexane fraction required 3-Tert-butyl-4-methoxyphenol, hyptatic acid, Petasitolone, Candidate for Mass C26H48O14, Stigmastan-3,6-dione, and Candidate for Mass C30H34O5.

Keywords: SNEDDS, MTT assay, in-vitro, Mass Candidates.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah istilah yang digunakan pada tumor yang ganas, tumor yang tumbuh dengan pesat dan mengilfiltrasi jaringan sekitar serta bermetastasis dan bila tidak mendapat terapi efeknya akan membawa kematian (Desen, 2011). Sebagian besar tipe dari sel kanker dinamakan sesuai dengan bagian tubuh pertama kali sel kanker berasal (*American Cancer Society*, 2013). Satu di antara beberapa jenis kanker yang banyak diderita masyarakat Indonesia adalah kanker payudara.

Kanker payudara adalah masalah kesehatan utama pada wanita, yang menempati urutan teratas dalam hal perkiraan kasus kanker baru dan kematian di antara semua jenis kanker (Bray dkk., 2018; Siegel dkk., 2018). Kanker payudara merupakan tumor ganas yang berasal dari sel payudara. Kanker payudara dapat berasal dari sel kelenjar penghasil susu (lobular), saluran kelenjar dari lobular ke puting payudara (duktus), dan jaringan penunjang payudara yang mengelilingi lobular, duktus, pembuluh darah dan pembuluh limfe, tetapi tidak termasuk kulit payudara (*American Cancer Society*, 2014).

Kementerian Kesehatan (2018), menyebutkan prevalensi penyakit kanker mengalami peningkatan dalam lima tahun terakhir. Berdasarkan hasil *Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018*, prevalensi kanker di Indonesia mencapai 1,79 per 1000 penduduk, naik dari tahun 2013 sebanyak 1,4 per 1000 penduduk. Selain itu, data *Global Cancer Observatory 2018* dari *World Health Organization* (2019) 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. Kanker serviks (leher rahim) merupakan jenis kanker kedua yang paling banyak terjadi di Indonesia sebanyak 32.469 kasus atau 9,3% dari total kasus.

Faktor utama yang bertanggung jawab untuk terjadinya dan pengembangan kanker payudara adalah:

1. Faktor-faktor reproduksi: Wanita dengan *menarche* prematur, menopause terlambat, nulliparitas, dan wanita yang tidak menyusui lebih rentan terkena kanker payudara (Wielsoe dkk., 2016; Hanf dan Hanf, 2014; Namiranian dkk., 2014).

2. Faktor genetik: Penelitian telah menunjukkan bahwa peluang untuk terkena kanker payudara dua sampai tiga kali lebih besar pada wanita yang ibunya atau saudara kandungnya menderita kanker payudara (Romadhon, 2013).

3. Faktor-faktor yang berhubungan dengan diet dan gaya hidup: Obesitas, dan faktor-faktor seperti merokok dan minum terkait dengan perkembangan kanker payudara (Wang dkk., 2016; Shield dkk., 2016).

4. Faktor lingkungan: Paparan terhadap estrogen eksogen untuk jangka waktu lama meningkatkan risiko kanker payudara (Pastor-Barriuso dkk., 2016).

Upaya pengobatan kanker payudara telah dilakukan baik melalui dunia kedokteran seperti kemoterapi, imunoterapi, radioterapi, pembedahan, maupun dengan cara tradisional seperti pemanfaatan tumbuhan yang memiliki potensi antikanker (Arifianti, 2014). Namun, pengobatan kanker seperti kemoterapi, radiasi, kemoradioterapi, terapi hormon atau kombinasi dari beberapa terapi dapat menyebabkan dampak fisik pada beberapa organ tubuh (Pearce dkk., 2017; Wei dkk., 2017). Penelitian pada 90 pasien kanker yang menerima kemoterapi menunjukkan bahwa 83,3% mengalami mual, 78,9% mengalami muntah, yang lain mengalami alopesia, anoreksia, dan gangguan saraf tepi (Chan dan Ismail, 2014). Oleh karena itu, upaya untuk memperoleh cara pengobatan kanker payudara yang tepat harus terus dilakukan. Salah satunya adalah dengan menguji tumbuhan yang mengandung berbagai jenis senyawa aktif dengan kemampuan antikanker payudara.

Indonesia merupakan daerah beriklim tropis sehingga banyak tumbuhan yang tumbuh di Negara ini. Satu diantara tumbuhan lokal Indonesia yang diduga memiliki potensi antikanker payudara adalah daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.). Beberapa senyawa kimia yang terkandung dalam daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) adalah senyawa polifenol, karoten, flavonoid dan tannin (Matsuo dkk., 1993; Mulyono dkk., 1994; Santos dan Silveira, 1997), sehingga diperkirakan daun jambu

biji (*Psidium guajava* Linn.) juga mempunyai aktivitas antioksidan yang juga berkaitan erat dengan khasiatnya dalam mengobati berbagai penyakit. Berdasarkan penelitian sebelumnya juga telah dibuktikan bahwa ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) mengandung flavonoid yang memiliki aktivitas antikanker. Kandungan ini bisa menyebabkan apoptosis dan induksi dalam sel (Bontempo dkk., 2012) dan menurunkan sel Tr, sehingga dapat mengurangi kemungkinan tumor (Seo dkk., 2005).

Penelitian tentang aktivitas daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) sebagai obat telah banyak dilakukan, diantaranya yaitu antioksidan (Lee dkk., 2012), antibakteri (Rattanachaikunsopon dan Phumkhachorn, 2010), antiparasit (Lee dkk., 2013), antidiabetes (Subramanian dkk., 2009; Soman dkk., 2010), antidiare (Goncalves dkk., 2008), antitumor (Manosroi dkk., 2006; Chen dkk., 2007) dan antiinflamasi (Ojewole, 2006). Namun penelitian aktivitas daun jambu sebagai obat antikanker sendiri masih sangat terbatas. Berdasarkan Sato dkk., (2010), hanya ada tujuh penelitian yang berhubungan dengan pengujian aktivitas antikanker dari jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) 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). Penelitian aktivitas daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) sebagai obat antikanker payudara telah dilakukan oleh Dwitiyanti (2015), nilai LC_{50} yang diperoleh dari ekstrak etanol 70% daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) tersebut adalah sebesar 27,54 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) memiliki potensi sebagai antikanker payudara. 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 (*Psidium guajava* Linn.) yang dapat berperan sebagai antikanker. Adapun penelitian terbaru tentang

aktivitas daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) sebagai antikanker payudara dilakukan oleh Nita (2019), dari penelitian tersebut diperoleh nilai IC₅₀ fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 279,23; 21,53; dan 8,89 µg/mL. Nilai IC₅₀ fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut terhadap sel MCF-7 sebesar 16,15; 53,01; dan 5,04 µg/mL dan kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana diantaranya senyawa *ellagitanins*, *genistein*, isomer dari asam *trihydroxycinnamoylquinic*, 3-asam *sinapoylquinic*, *gallic acid*, *glycoside*, dan *cyanidin-3-O-glucoside*.

Saat ini, tengah dikembangkan suatu sistem penghantaran obat terbaru yang efektif dan efisien yaitu dengan penggunaan teknologi nano. SNEDDS adalah salah satu formulasi nanopartikel berbasis minyak atau lemak. SNEDDS merupakan campuran isotropik antara minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang dapat membentuk nanoemulsi secara spontan ketika kontak dengan cairan lambung (Sun dan Han, 2011; Makadia dkk., 2013). Nanoemulsi merupakan suatu sistem *disperse* minyak dengan air yang distabilkan dari molekul surfaktan pada lapisan antarmuka dan memiliki ukuran droplet kisaran 20-500 nm (Solons dkk., 2003; Gupta dkk., 2016).

Keuntungan nanoemulsi adalah dapat meningkatkan absorpsi, membantu melarutkan obat yang bersifat lipofilik, meningkatkan bioavailabilitas, dapat digunakan untuk pemberian obat rute oral, topikal, dan intravena, tidak menimbulkan masalah inheren, kriming, flokulasi, koalesen, dan sedimentasi, memiliki tegangan permukaan yang tinggi, dan energi bebas yang menjadikan nanoemulsi sebagai sistem *transport* yang efektif, membutuhkan jumlah energi yang relatif sedikit, dan stabil secara termodinamik (Kumar dan Soni, 2017).

Telah banyak dilakukan penelitian tentang formulasi nanoemulsi pada suatu obat, salah satunya adalah *review* jurnal yang dilakukan oleh Sari dan Herdiana (2018). Pada *review* jurnal ini terdapat 10 jurnal yang digunakan pada bagian pembahasan penelitian. Hasil *review* tersebut didapat kesimpulan bahwa nanoemulsi merupakan sistem penghantar obat yang baik. Nanoemulsi dapat meningkatkan absorpsi obat,

stabilitas, serta bioavailabilitas obat sehingga penggunaan formulasi nanoemulsi berpengaruh pada peningkatan kualitas suatu obat.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka pada penelitian ini dilakukan formulasi sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) dalam bentuk SNEDDS dan uji aktivitas antikanker payudara. Penelitian ini diawali dengan melakukan preparasi sampel terlebih dahulu. Kemudian dilakukan ekstraksi maserasi daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) menggunakan pelarut etanol. Selanjutnya dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak kasar menggunakan pelarut organik n-heksana. Fraksi yang telah diperoleh kemudian diformulasi dan dibuat dalam sediaan nanopartikel. Nanopartikel ini nantinya akan dikarakterisasi dengan menggunakan PSA dan TEM untuk melihat ukuran, homogenitas, stabilitas dan morfologinya.

Uji aktivitas antikanker dilakukan secara *in-vitro* menggunakan metode *Microtetrazolium* (MTT) *assay* untuk mengukur efek pencegahan pertumbuhan terhadap sel kanker payudara, sehingga dapat diketahui besarnya potensi antikanker dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana ekstrak etanol tersebut. Metode MTT dipilih pada penelitian ini karena relatif cepat, sensitive dan akurat yaitu melalui reaksi kolorimetri atau perubahan warna pada bioreduksi garam tetrazolium ke formazan (Goodwin dkk., 1995). Kelebihan uji *in vitro* dibandingkan *in vivo* adalah relatif murah, cepat, dan membutuhkan lebih sedikit zat uji (Harahap, 2007).

Sel uji yang dipakai pada penelitian ini yaitu T47D dan MCF-7. Sel kanker payudara 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 dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) terhadap sel T47D dan MCF-7, kemudian dibandingkan efektivitasnya. Selanjutnya pada tahap akhir dilakukan uji

LC-MS/MS terhadap fraksi n-hexana untuk mengetahui kandungan senyawa yang berperan dalam penghambatan sel kanker tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

1. Senyawa apakah yang terkandung dalam fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.)?
2. Bagaimana formulasi pembuatan sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) yang paling optimal ditinjau dari ukuran partikel, distribusi partikel, dan muatan partikel?
3. Bagaimana aktivitas dan efektifitas dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) dalam penghambatan pertumbuhan kanker payudara?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.).
2. Mengetahui formulasi pembuatan sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) yang paling optimal ditinjau dari ukuran partikel, distribusi partikel, dan muatan partikel.
3. Mengetahui aktivitas dan efektifitas dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) dalam penghambatan pertumbuhan kanker payudara.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi tentang penggunaan daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) sebagai bahan dasar dalam pembuatan produk antikanker payudara. Serta pembuatan sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) sebagai pengobatan penyakit kanker payudara yang ekonomis, efektif, dan efisien.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker dan Pengobatannya

Kanker adalah penyakit serius kedua di dunia (Siegel dkk., 2011). Sekitar 13% dari kematian di dunia disebabkan oleh kanker (Karimi dkk., 2014). Kanker adalah penyakit fatal dimana sel dalam tubuh tumbuh atau terbagi secara tidak terkendali dan membunuh sel normal. Faktor-faktor yang berkontribusi termasuk latar belakang genetik tertentu, paparan kronis terhadap berbagai tekanan lingkungan, dan diet yang tidak tepat. Merokok, konsumsi alkohol, kekurangan vitamin B12, dan obesitas juga bertanggung jawab untuk kanker (Torre dkk., 2012). Semua faktor risiko ini menyebabkan akumulasi perubahan molekul atau mutasi pada beberapa protein penting dalam sel yang berkontribusi terhadap inisiasi karsinogenesis (Viswanadha, 2015). Kanker dikategorikan ke dalam kelas yang berbeda seperti kanker kulit, kanker payudara, kanker serviks, kanker prostat, kanker paru-paru, kanker ovarium, kanker usus besar, dan lain-lainnya.

Kanker payudara termasuk salah satu penyakit tidak menular yang cenderung terus meningkat setiap tahunnya, sehingga dapat dikatakan bahwa beban yang harus ditanggung dunia akibat penyakit tersebut semakin meningkat (Depkes RI, 2009). Kanker payudara adalah penyakit yang terjadi dengan ditandai pertumbuhan sel secara berlebihan dan tidak terkendali. Gejala awal kanker payudara biasanya diketahui saat timbul benjolan disekitar jaringan payudara atau salah satu payudara terlihat membesar. Mulanya tidak timbul rasa sakit, namun setelah membesar akan terasa sakit jika ditekan, selain itu puting susu akan mengkerut ke dalam dan warnanya menjadi kecoklatan serta mengalami pembengkakan (Maharani, 2009). Penyakit ini terjadi hampir seluruhnya pada wanita, tetapi dapat juga terjadi pada pria (Tapan dan Erik, 2005). Sampai saat ini penyebab pasti kanker payudara belum diketahui namun data epidemiologi mengisyaratkan bahwa

faktor genetik, endokrin dan lingkungan mungkin sangat berperan inisiasi dan/atau promosi pertumbuhan kanker payudara (Brunner dan Suddarth, 2003).

Operasi, kemoterapi dan radioterapi merupakan metode yang digunakan dalam pengobatan kanker. Meskipun menunjukkan keberhasilan terapi, efek samping yang ditimbulkan dalam penggunaan obat masih tergolong berbahaya. Efek samping yang umum dengan obat antikanker adalah mual, rambut rontok, dan kelelahan. Adanya efek samping pada penggunaan obat tersebut perlu dilakukan pengembangan pengobatan dengan menggunakan pengobatan herbal yang berasal dari ekstrak tanaman seperti pada daun jambu biji. Pada bagian-bagian jambu biji seperti daun, buah, dan bahkan kulit memiliki potensi penggunaan sebagai agen terapi terhadap kanker (Sato dkk., 2016). Daun jambu biji juga memiliki khasiat seperti antibakteri, antioksidan, antikanker, anti ulkus (Porwal dkk., 2012).

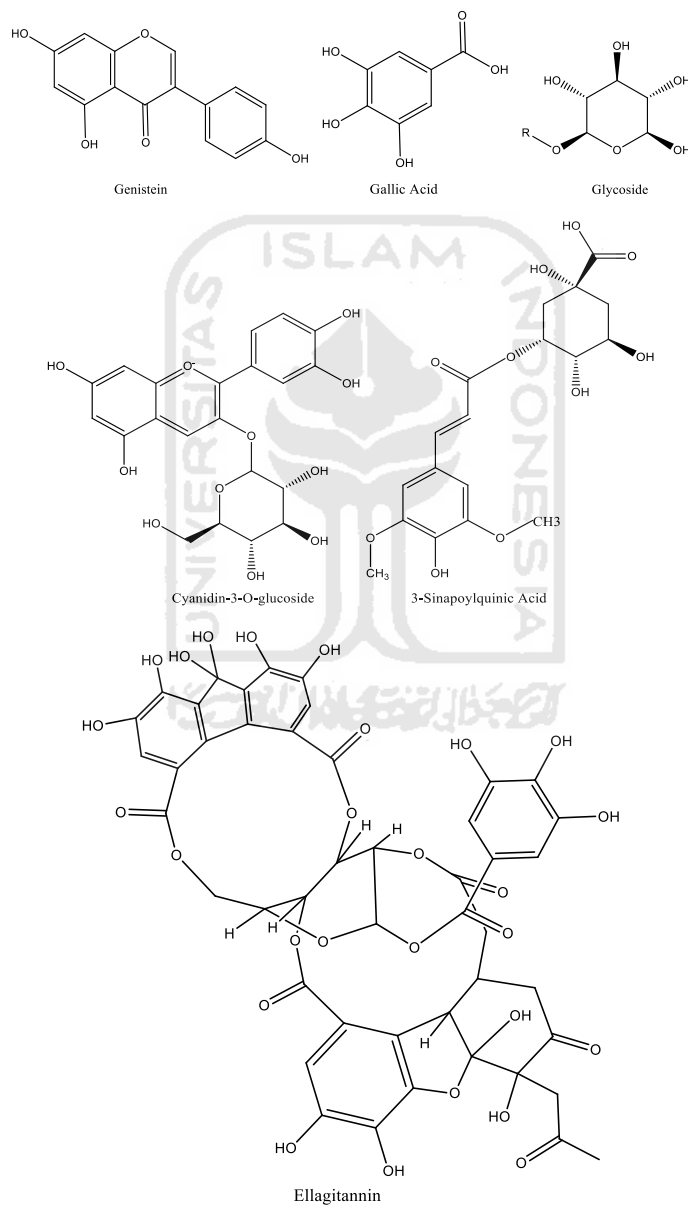
2.2 Pengembangan Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*. L) Sebagai Obat

Jambu biji (*Psidium guajava*. L) adalah tanaman tropis yang berasal dari Brasil, yang disebarkan ke Indonesia melalui Thailand. Jambu biji dengan daging buah berwarna putih atau merah kaya akan vitamin A dan C dan pada daunnya terkandung beberapa senyawa kimia antara lain, flavonoid, kuersetin, tanin, saponin, minyak atsiri dan alkaloid. Beberapa penelitian telah menjelaskan bahwa flavonoid, tanin, alkaloid, minyak atsiri dan beberapa komponen tersebut memiliki kemampuan farmakologi sebagai antidiare, antiinflamasi, hipoglikemi, antihipertensi, dan kemampuan farmakologi lainnya (Tanaz dkk., 2014). Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau dan merupakan metabolit sekunder yang termasuk golongan fenol alam terbesar. Flavonoid memiliki banyak khasiat dan aktivitas biologik antara lain sebagai, antioksidan, antikanker dan antiinflamasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas dan efektivitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) terhadap sel kanker payudara T47D dan MCF-7.

Penelitian tentang aktivitas daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) sebagai obat telah banyak dilakukan, diantaranya yaitu antioksidan (Lee dkk., 2012), antibakteri (Rattanachaikunsopon dan Phumkhachorn, 2010), antiparasit (Lee dkk., 2013), antidiabetes (Subramanian dkk., 2009; Soman dkk., 2010), antidiare (Goncalves dkk., 2008), antitumor (Manosroi dkk., 2006; Chen dkk., 2007) dan antiinflamasi (Ojewole, 2006). Namun penelitian aktivitas daun jambu sebagai obat antikanker sendiri masih sangat terbatas. Berdasarkan Sato dkk., (2010), hanya ada tujuh penelitian yang berhubungan dengan pengujian aktivitas antikanker dari jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) 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). Penelitian aktivitas daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) sebagai obat antikanker payudara telah dilakukan oleh Dwitiyanti (2015), nilai LC_{50} yang diperoleh dari ekstrak etanol 70% daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) tersebut adalah sebesar 27,54 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) memiliki potensi sebagai antikanker payudara. 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 (*Psidium guajava* Linn.) yang dapat berperan sebagai antikanker. Adapun penelitian terbaru tentang aktivitas daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) sebagai antikanker payudara dilakukan oleh Nita (2019). Pada penelitian tersebut dilakukan uji aktivitas antikanker dari daun jambu biji dalam bentuk fraksi dimana tujuannya adalah dapat mengetahui fraksi aktif dan senyawa yang terkandung dalam daun jambu biji yang berperan sebagai antikanker. Diperoleh 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 $\mu\text{g/mL}$ dan kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana diantaranya senyawa *ellagitanins*, *genistein*, isomer dari asam *trihydroxycinnamoylquinic*, 3-asam *sinapoylquinic*, *gallic acid*, *glycoside*, dan *cyanidin-3-O-glucoside* dengan struktur kimia yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur kimia kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.)

2.3 Pengembangan SNEDDS sebagai sarana terapi obat

Saat ini, tengah dikembangkan suatu sistem penghantaran obat terbaru yaitu dengan penggunaan teknologi nano sebagai suatu sistem dalam penghantaran obat masa depan. Sediaan nanopartikel memiliki beberapa kelebihan seperti mampu menembus sel target dengan lebih cepat dan tepat sasaran. Sediaan nanopartikel sendiri dapat diartikan sebagai formulasi suatu partikel yang terdispersi pada ukuran nanometer atau skala per seribu mikron. Batasan ukuran partikel yang pasti untuk sistem penghantaran obat masih terdapat perbedaan diantara ahli. Hal ini dikarenakan ukuran nanopartikel pada sistem penghantaran obat berbeda dengan teknologi nanopartikel secara umum. Pada beberapa sumber disebutkan bahwa nanopartikel baru menunjukkan sifat khasnya pada ukuran diameter di bawah 100 nm, namun batasan ini sulit dicapai untuk sistem nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Nanopartikel obat secara umum harus terkandung obat dengan jumlah yang cukup di 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 di bawah 1 mikron (Buzea dkk., 2007).

Pengembangan terkini sistem nanoemulsi untuk aplikasi oral melalui saluran gastrointestinal adalah teknologi auto-emulsifikasi (*Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS)*) (Wadhwa dkk., 2011). Konsep dari teknologi ini adalah formulasi antara minyak, surfaktan, dan ko-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, di mana 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). Formulasi sediaan SNEDDS akan meningkatkan disolusi dari zat aktif dengan cara memfasilitasi pembentukan fase tersolubilisasi dan meningkatkan transpor melalui sistem limfatik usus, serta menghindari effluks P-gp, sehingga dapat meningkatkan absorpsi dan bioavailabilitas zat aktif dari saluran cerna (Singh dkk., 2009).

Sistem pengiriman obat nano telah berhasil diterapkan pada diagnosis dan perawatan medis karena keuntungan dari penargetan yang tepat, mengurangi toksisitas obat, dan secara signifikan meningkatkan ketersediaan obat (Nadimi dkk., 2018). Studi telah menunjukkan bahwa pengiriman obat kemoterapi ke situs tumor menggunakan sistem pengiriman obat nano secara efektif dapat menginduksi pembunuhan tumor, sehingga menjadikannya strategi yang efektif untuk pengobatan kanker payudara. Telah banyak dilakukan penelitian tentang formulasi nanoemulsi pada suatu obat, salah satunya adalah *review* jurnal yang dilakukan oleh Sari dan Herdiana (2018). Pada *review* jurnal ini terdapat 10 jurnal yang digunakan pada bagian pembahasan penelitian. Dari hasil *review* tersebut didapat kesimpulan bahwa nanoemulsi merupakan sistem penghantar obat yang baik. Dapat meningkatkan absorpsi obat, stabilitas, serta bioavailabilitas obat sehingga penggunaan formulasi nanoemulsi berpengaruh pada peningkatan kualitas suatu obat.

Beberapa tahun terakhir ini juga terjadi perkembangan yang pesat dalam teknologi auto-emulsifikasi atau SNEDDS. Banyak penelitian yang menggunakan teknologi ini sebagai suatu sistem penghantaran obat, diantaranya SNEDDS minyak jintan hitam sebagai antiinflamasi (Olii dkk., 2014), SNEDDS ekstrak kulit manggis terhadap bakteri *P. mirabilis* dan *S. epidermidis* yang terdapat pada ulkus diabetic (Sari dkk., 2016), SNEDDS turunan kurkumin gamavuton sebagai kandidat obat Rheumatoid Arthritis (Chabib dkk., 2016), SNEDDS ekstrak kloroform daun salam (*Syzygium Polyanthum (Wight) Walp.*) sebagai minyak pembawa (Wardhani, 2016), SNEDDS ekstrak daun pepaya (*Carica Papaya L.*) sebagai analgesik (Nugroho dkk., 2017), SNEDDS jintan hitam (*Nigella Sativa*) sebagai uji aktivitas imunostimulan

(Beandrade, 2018), dan SNEDDS ekstrak kulit kopi sebagai antibakteri *Klebsiella Pneumonia* (Wicaksana, 2019).

2.4 Gambaran Umum Penelitian

Penelitian ini diawali dengan melakukan preparasi sampel terlebih dahulu. Kemudian dilakukan ekstraksi daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.). 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 (C_2H_5OH) 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). Telah dibuktikan oleh Damar dkk., (2014) yang menyatakan terdapat perbedaan total flavonoid ekstrak etanol daun kayu kapur pada metode maserasi dibandingkan dengan metode soklet yaitu 11,97 (sampel segar), 7,85 (sampel kering) pada metode maserasi sedangkan pada soklet 9,71 (sampel segar), 6,91 (sampel kering). Metode maserasi pada ekstraksi daun jambu biji juga telah dilakukan salah satunya oleh Fajar dkk., (2011) yang menghasilkan rendemen sebesar 18,47%.

Selanjutnya dilakukan tahap fraksinasi untuk memisahkan senyawa menggunakan pelarut n-heksana. Proses fraksinasi pada penelitian ini mengacu pada

beberapa penelitian sebelumnya salah satunya yang dilakukan oleh Purwanto (2015) dimana fraksinasi dilakukan dengan kolom fraksinasi menggunakan pelarut non polar, semi polar dan diakhiri pelarut polar secara berkesinambungan terhadap daun senggani (*Melastoma malabathricum* L). Namun, pada penelitian ini lebih fokus dalam penggunaan n-heksana sebagai pelarutnya. Hal ini didasarkan pada penelitian Nita (2019) yang menunjukkan bahwa hasil IC50 fraksi n-heksana terhadap terhadap sel T47D dan sel MCF-7 menunjukkan aktivitas yang lebih baik daripada fraksi etanol dan etil asetat.

Fraksi yang telah diperoleh kemudian diformulasi dan dibuat dalam sediaan nanopartikel. Fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) dicampurkan capryoll 90 sebagai fase minyak, tween 20 sebagai fase surfaktan, dan PEG 400 sebagai fase ko-surfaktan dengan perlakuan ultrasonikasi selama 2x4 menit pada setiap penambahan. Menurut Nugroho dkk., (2018) dalam jurnalnya menjelaskan bahwa capryoll 90, tween 20, dan PEG 400 menunjukkan hasil rasio kelarutan yang paling kecil dibandingkan dengan bahan-bahan lainnya. Kemudian menghasilkan daerah pembentukan nanoemulsi lebih luas dengan perbandingan campuran minyak, surfaktan dan kosurfaktan dengan perbandingan 1:9, 2:8, dan 3:7, memenuhi syarat ukuran partikel ≤ 200 nm, indeks polidispersitas (IP) ≤ 0.7 , potensial zeta ≥ 30 mV dan % transmitan 70-100%.

Nanopartikel dari proses formulasi ini nantinya akan dikarakterisasi dengan menggunakan PSA dan TEM untuk melihat ukuran, homogenitas, stabilitas dan morfologinya. Berdasarkan studi literatur yang telah dilakukan didapatkan beberapa penelitian terkait penggunaan PSA dan TEM dalam proses karakterisasi SNEDDS, diantaranya yaitu oleh Adi dkk., (2019), Priyani dkk., (2017), dan Nurdiyanti dkk., (2017).

Pengujian antikanker banyak dilakukan dengan menggunakan mencit dengan keberhasilan yang rendah dan cukup lama. Dewasa ini ditemukan teknik kultur yang relatif cepat dan mudah yaitu *in-vitro*. Teknik kultur *in-vitro* merupakan teknik isolasi secara aseptik dimana sel ditumbuhkan dalam suatu media buatan dalam sebuah

tabung (Pandiangan, 2008). Sel yang digunakan dalam uji aktivitas ini menggunakan sel T47D dan MCF-7 karena tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas serta efektivitas fraksi daun jambu biji sebagai agen antikanker senyawa. 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+ (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, Fitriya dan Lenny (2009) menguji aktivitas antikanker dari senyawa flavonoid yang berasal pada akar tumbuhan tunjuk langit (*Helmynthostachis zeylanica* Linn.) terhadap sel murine P388, Abdillah (2006) menguji antiproliferasi ekstrak air daun sisik naga terhadap sel tumor 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).

BAB III

DASAR TEORI

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

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

Berikut ini adalah klasifikasi dari tanaman jambu biji:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub Divisi : Angiospermae
Classis : Dicotyledoneae
Familia : Myrthaceae
Genus : Psidium
Species : *Psidium guajava* Linn (Parimin, 2005).

Tanaman jambu biji ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Daun jambu biji (Joseph dan Priya, 2011)

3.1.2 Penyebaran dan Tempat Tumbuh

Tanaman *Psidium guajava* L. berasal dari Amerika Tropis. Di Amerika Tropis banyak ditanam sebagai pohon buah-buahan dan sering tumbuh liar dengan ketinggian 1-1200 m (Steenis, 1997). Di Jawa umumnya terdapat pada ketinggian 1200 m diatas permukaan laut dan sering tumbuh liar pada tanah yang gembur maupun liat, banyak air, dan tempat terbuka (Depkes RI, 1977).

3.1.3 Morfologi Tanaman

Tanaman *Psidium guajava* L. termasuk tanaman perdu atau pohon kecil dengan banyak percabangan, tinggi 3 m sampai 10 m dan kadang-kadang tingginya mencapai 12 m. Batang keras, kulit batang halus permukaannya, berwarna coklat, dan mudah mengelupas. Daunnya berhadapan, bertulang menyirip, berbentuk bulat telur agak menjorong atau agak bundar sampai meruncing. Panjang helai daun 6 cm sampai 14 cm, lebar 3 cm sampai 6 cm, panjang tangkai 3 mm sampai 7 mm. Daun yang muda berambut, sedangkan daun yang tua permukaan atasnya licin (Depkes RI, 1977). Tepi daun rata agak melekuk ke atas, warnanya hijau, letak berhadapan (Wijayakusuma, 1994). Bunga terletak di ketiak, terdiri dari satu sampai tiga bunga, panjang gagang perhubungan 2 cm sampai 4 cm. Tabung kelopak berbentuk lonceng atau corong, panjang kelopak 7 mm sampai 10 mm. Daun mahkota berbentuk bulat telur terbalik, panjang 1.5 cm sampai 2 cm, putih, segera rontok (Steenis, 1997). Buah berbentuk bulat atau bulat telur, kalau masak berwarna kuning, panjang 5 cm sampai 8.5 cm, berdaging dan menyelimuti biji-biji (Depkes RI, 1977). Daging buah putih kekuningan atau merah muda (Steenis, 1997).

3.1.4 Kandungan Tanaman

Daun jambu biji sebagian jumlah besar mengandung fenolik, termasuk asam galat, catechin, epicatechin, rutin, quercetin, dan rutin (Chen dkk., 2009). Minyak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) mengandung campuran hidrokarbon sesquiterpene dan sesquiterpene oksigen dengan β -caryophyllene sebagai hidrokarbon sesquiterpene utama dan selin-11-en-4 α -ol, α -cadinol, (E) -nerolido sebagai seskuiter oksigen utama (Adam dkk., 2011). Sebanyak 73 senyawa diidentifikasi, dimana 61 oleh hidrodistilasi dan 24 oleh SPMS headspace. Dalam ruang utama, konstituen utama adalah hexenal, γ -butyrolactone, (E) -2-hexenal, (E, E) -2,4-hexadienal, (Z) -3-hexenal, (Z) -2-hexenal, (Z) -3-hexenyl acetate dan fenol, sementara β -caryophyllene, nerolidol, 3-phenylpropyl acetate dan caryophyllene oxide adalah konstituen volatil utama yang ada dalam minyak hydrodistilled

(Paniandy dkk., 2000). Analisis fraksi heksan daun jambu biji dengan kromatografi gas dan kromatografi gas-spektrometri massa sementara diidentifikasi 60 senyawa, seperti β -eudesmol, α -copaene, phytol, α -patchoulene, β -caryophyllene oxide, caryophylla-3 (15), 7 (14) -dien-6-ol, (E) -methyl isoeugenol, α -terpineol, dan octadecane (Ryu dkk., 2012).

3.1.5 Kegunaan Tanaman Jambu Biji

Jambu biji (*Psidium guajava* L.) telah dikenal memiliki aktivitas diantaranya sebagai antimikroba (Arima dan Danno, 2002; Chah dkk., 2006; Prabu dkk., 2006), antiinflamasi (Ojewole, 2006), antimalaria (Tona dkk., 1998), antitumor (Manosroi dkk., 2006; Chen dkk., 2007), antialergi (Seo dkk., 2005), antidiabetes (Ojewole, 2005; Mukhtar dkk., 2006) dan antimutagen (Grover dan Bala, 1993) selain itu telah digunakan untuk mengobati luka (Chah dkk., 2006), jerawat lesi (Qadan dkk., 2005), batuk (Jairaj dkk., 1999) dan penyakit gigi (Razak dkk., 2006). Flavonoid diekstrak dari daun jambu biji termasuk morin-3-O-likosida, morin-3-O-arabinosida, kuersetin dan *kuersetin-3-O-arabinosida* dilaporkan memiliki aksi antibakteri yang kuat (Arima dan Danno, 2002), serta antikanker (Joseph dan Priya, 2010).

Namun penelitian aktivitas daun jambu sebagai obat antikanker sendiri 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 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).

Hasil dari pengujian aktivitas antikanker dari daun jambu biji ini menunjukkan bahwa daun jambu sangat berpotensi sebagai obat antikanker karena dapat mencegah ataupun menghambat pertumbuhan sel kanker (Rishika dan Sharma, 2012). Pengobatan penyakit kanker dengan menggunakan tanaman herbal seperti daun

jambu biji lebih menjanjikan dan tidak memberikan efek samping dibandingkan dengan cara lain seperti kemoterapi atau radiasi (Itharat dan Ooraikul, 2007).

3.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan metode pemisahan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan pelarut organik yang sesuai. Ekstraksi menggunakan pelarut dapat dilakukan dengan dua cara yaitu panas dan dingin. Pada penelitian ini menggunakan cara dingin dengan maserasi. Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

Metode ekstraksi yang sering digunakan dalam proses ekstraksi salah satunya adalah maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan merendam sampel ke dalam pelarut yang sesuai. Kontak antara pelarut dengan dinding sel yang lebih lama akan menghasilkan ekstrak yang lebih banyak sehingga senyawa aktif yang dihasilkan pun semakin banyak pula. Zat aktif dalam sampel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara zat atau senyawa di dalam sel dan di luar sel (Baraja, 2008).

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

ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting sehingga tujuan dan sasaran ekstraksi dapat tercapai. Tingginya nilai konstanta dielektrik, titik didih serta kelarutan dalam air, maka suatu pelarut bersifat semakin polar (Sudarmadji dkk., 2007).

3.3 Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Dimana pada penelitian ini menggunakan pelarut n-heksana yang sifatnya nonpolar. Fraksinasi dan isolasi lebih lanjut terhadap senyawa dalam ekstrak kasar dilakukan untuk memperoleh senyawa dengan tingkat kepolaran tertentu yang lebih murni sehingga dapat memperjelas pengaruhnya pada uji *bioessay* yang dilakukan. Fraksinasi ekstrak kasar dapat dilakukan menggunakan kromatografi kolom, yang merupakan suatu metode pemisahan terbaik untuk memisahkan campuran dalam jumlah banyak (Sastrohamidjojo, 1985).

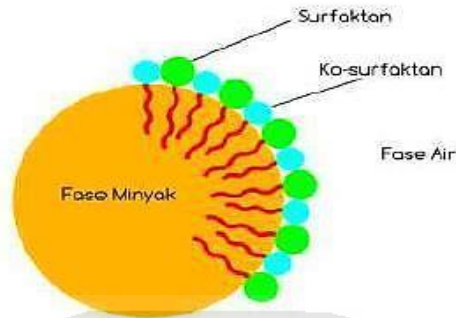
3.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan dalam penelitian merupakan suatu tahap awal yang bertujuan memperoleh gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam suatu sampel yang sedang diteliti. Metode penapisan fitokimia dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan peraksi warna. Penapisan kimia pada penelitian ini diantaranya uji kandungan senyawa tannin/polifenol alkaloid, flavonoid dan terpenoid menurut prosedur yang telah dilakukan oleh Harborne (1987) dan Ciulei (1984).

3.5 Nanoemulsi

Nanoemulsi adalah sistem emulsi transparan atau bening dengan ukuran partikel berkisar antara 50 nm-500 nm (Shakeel dkk., 2008). Ada empat komponen penting penyusun nanoemulsi yaitu fase minyak, fase air, surfaktan, dan ko-surfaktan. Daya tarik utama dari formulasi nanoemulsi minyak dalam air adalah kemampuan membawa obat yang hidrofobik dalam minyak sehingga dapat teremulsi

di dalam air dan akhirnya meningkatkan kelarutan obat ketika berada dalam tubuh (Shafiqunnabi dkk., 2007). Ilustrasi terbentuknya nanoemulsi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Ilustrasi terbentuknya nanoemulsi (Zhao, 2015).

Keunggulan partikel berukuran nanometer yakni kemudahan penetrasi melalui kapiler sehingga ketersediaan obat pada sel target lebih maksimal. Nanopartikel dapat menghantarkan obat dengan lebih baik ke unit yang lebih kecil dalam tubuh, mengatasi resistensi akibat barrier fisiologi tubuh, dapat ditargetkan sehingga mengurangi toksisitas dan meningkatkan efisiensi distribusi obat, peningkatan ketersediaan hayati obat yang absorpsinya rendah, mengurangi risiko efek samping akibat penggunaan obat yang mengiritasi saluran cerna, percepatan waktu disolusi obat dan meningkatkan *disperse* obat (Pinto dkk., 2006). Nanopartikel dibuat dengan cara mengembangkan formulasi dalam pembuatan nanopartikel dengan bantuan alat seperti *vortex* dan *stirrer* (Balakumar dkk., 2013). Metode pembuatan tersebut lebih mudah dilakukan untuk membuat SNEDDS dalam skala laboratorium.

Karakterisasi tetesan nanoemulsi umumnya dengan meninjau ukuran, distribusi ukuran dan potensial zeta tetesan nanoemulsi. Penentuan ukuran, distribusi ukuran dan potensial zeta biasanya menggunakan spektrofotometer korelasi foton atau *particle size analyzer* (PSA). Nanopartikel dengan nilai potensial zeta melebihi +30 mV atau kurang dari -30 mV menunjukkan kestabilan, karena muatan listrik dari droplet cukup kuat untuk menolak antara droplet yang dominan dalam sistem

nanoemulsi (Diba dkk., 2014). Pengamatan morfologi nanoemulsi menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM) (Mohanraj dan Chen, 2006).

Faktor-faktor yang harus dipertimbangkan selama persiapan nanoemulsi antara lain :

- a. Persyaratan utama dalam produksi nanoemulsi adalah tegangan antarmuka ultra rendah harus dicapai pada antarmuka air- minyak, sehingga surfaktan harus dipilih dengan hati-hati.
- b. Konsentrasi surfaktan harus cukup tinggi untuk menyediakan jumlah molekul surfaktan yang diperlukan untuk menstabilkan tetesan nano.
- c. Antarmuka harus fleksibel untuk mempromosikan pembentukan nanoemulsi (Haritha dkk., 2003).

3.6 *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS)

3.6.1 Pengertian SNEDDS

Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) adalah prekonsentrat nanoemulsi atau bentuk anhidrat nanoemulsi berupa campuran isotropik obat, minyak, dan surfaktan yang ketika digabungkan dengan fase air pada kondisi agitasi perlahan akan membentuk nanoemulsi fase minyak dalam air (M/A) secara spontan (Date dkk., 2010). SNEDDS memiliki komponen utama berupa minyak sebagai pembawa obat, surfaktan sebagai pengemulsi minyak ke dalam air melalui pembentukan lapisan film antarmuka dan menjaga stabilitas, dan kosurfaktan untuk meningkatkan penggabungan obat atau memfasilitasi nanoemulsifikasi dalam SNEDDS. Secara substansial SNEDDS terbukti meningkatkan bioavailabilitas obat lipofilik melalui pemberian oral. Perkembangan teknologi memungkinkan SNEDDS memecahkan masalah terkait penghantaran obat dengan kelarutan dalam air yang buruk (Makadia dkk., 2013). Formulasi SNEEDS yang optimal dipengaruhi oleh sifat fisikokimia dan konsentrasi minyak, surfaktan, ko-surfaktan, rasio masing-

masing komponen, pH dan suhu emulsifikasi terjadi, serta sifat fisikokimia obat (Date dkk., 2010).

a. Minyak

Minyak merupakan eksipien penting dalam pembuatan nanoemulsi karena dapat menentukan spontanitas emulsifikasi, kelarutan obat, dan ukuran tetesan emulsi. Selain itu mampu meningkatkan fraksi obat lipofilik yang ditranspor melalui system intestinal limpatik sehingga absorbs pada saluran gastrointestinal (Gursoy dan Benita, 2004).

Komponen minyak yang digunakan dalam formulasi SNEDDS adalah minyak yang dapat melarutkan obat dengan maksimal serta harus mampu menghasilkan ukuran tetesan yang kecil sehingga dapat terbentuk nanoemulsi (Date dkk., 2010). Komponen minyak/lemak umumnya adalah ester asam lemak atau hidrokarbon jenuh dengan rantai sedang hingga panjang, dalam bentuk cair, semipadat, maupun padat pada temperatur ruangan (Gershanik dan Benita, 2000).

b. Surfaktan

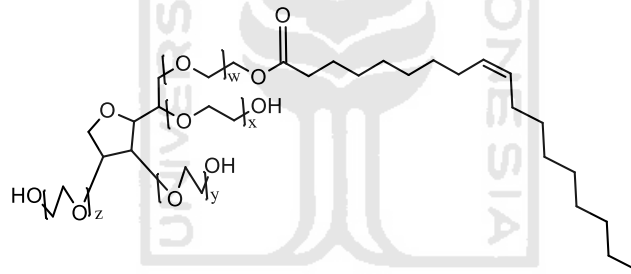
Surfaktan merupakan salah satu komponen penting dalam pembuatan SNEDDS. Surfaktan adalah zat yang dalam struktur molekulnya memiliki bagian lipofil dan hidrofil. Molekul surfaktan memiliki bagian polar yang suka akan air (hidrofilik) dan bagian non polar yang suka dengan minyak/lemak (lipofilik) (Fudholi, 2013).

Surfaktan berfungsi untuk menurunkan tegangan antar muka dan berpengaruh besar terhadap proses pembentukan nanoemulsi, serta ukuran tetesan nanoemulsi. Kemampuan SNEDDS terdispersi secara cepat dalam kondisi pengadukan ringan ditentukan oleh kemampuan emulsifikasi surfaktan (Patel dkk., 2011). Surfaktan dalam SNEDDS dapat berupa sebagai surfaktan tunggal atau kombinasi beberapa surfaktan (Date dkk., 2010). Surfaktan yang berbeda diskriming untuk melihat kemampuan emulsifikasi fase minyak yang dipilih. Surfaktan dipilih berdasarkan transparansi dan kemudahan emulsifikasi (Patel dkk., 2011).

Secara umum, surfaktan untuk SNEDDS harus sangat hidrofilik dengan HLB berkisar antara 15-21 (Rowe dkk., 2009). Penggunaan surfaktan nonionik dengan

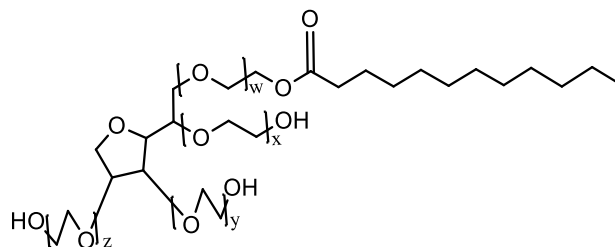
nilai HLB tinggi akan membantu dalam pembentukan nanoemulsi *o/w* dengan cepat dalam media berair. Surfaktan nonionik lebih sering digunakan mengingat sifatnya yang kurang terpengaruh oleh pH, aman, dan biokompatibel sehingga penggunaan surfaktan nonionik lebih sering daripada ionik dan umumnya surfaktan nonionik diizinkan untuk penggunaan melalui rute oral (Azeem dkk., 2009).

Surfaktan yang sering digunakan dalam pembuatan SNEDDS yakni tween 80 dan tween 20 yang termasuk dalam jenis surfaktan nonionik. Tween 80 memiliki nama kimia *polyoxyethylene 20 sorbitan monooleat* dan memiliki rumus molekul $C_{64}H_{124}O_{26}$. Tween 80 memiliki HLB sebesar 15 yang sesuai untuk sediaan SNEDDS. Tween 20 dan Tween 80 dikategorikan sebagai *generally regarded as nontoxic and nonirritant* (Rowe dkk., 2009). Struktur kimia senyawa Tween 80 dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur Tween 80

Tween 20 memiliki nama kimia *polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurat* dengan rumus kimia $C_{58}H_{114}O_{26}$. Tween 20 memiliki nilai HLB sebesar sekitar 16,7 (Bouchemal dkk., 2004; Singh dkk., 2009). Tween 20 juga terbukti dapat memperbaiki disolusi dan absorpsi molekul obat lipofilik (Bandivadekar dkk., 2013). Struktur kimia senyawa Tween 20 dapat dilihat pada Gambar 5.

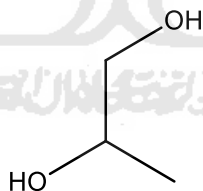


Gambar 5. Struktur Tween 20

c. Ko-surfaktan

Penggunaan kosurfaktan pada SNEDDS bertujuan untuk meningkatkan *drug loading*, mempercepat *self-emulsification*, dan mengatur ukuran *droplet* nanoemulsi (Date dkk., 2010). Senyawa amfifilik kosurfaktan memiliki afinitas terhadap air dan minyak. Secara umum, kosurfaktan yang dipilih berupa alkohol rantai pendek karena mampu mengurangi tegangan antarmuka, meningkatkan fluiditas antarmuka, dan mampu meningkatkan pencampuran air dan minyak karena partisipasinya diantara dua fase tersebut (Azeem dkk., 2009).

Ko-surfaktan yang umum digunakan dalam formulasi SNEDDS adalah PEG 400 dan propilen glikol, keduanya berupa cairan kental, tidak berwarna dan transparan. Propilen glikol memiliki nama kimia 1,2-propanediol dengan struktur kimia $C_3H_8O_2$ memiliki nilai HLB sebesar 3,4. Propilen glikol termasuk dalam kategori *generally regarded as a relatively nontoxic material* (Rowe dkk., 2009). Penggunaan propilen glikol bersama-sama dengan asam oleat diketahui dapat membantu dalam mempertinggi laju penetrasi bermacam-macam senyawa (Barry, 1987). Struktur kimia senyawa propilen glikol ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur Propilen glikol

PEG 400 memiliki nilai HLB sebesar 11,6 dan dikategorikan sebagai *generally regarded as nontoxic and nonirritant material* (Rowe dkk., 2009). Polietilena glikol merupakan senyawa yang memiliki sinonim *Carbowax*, *Carbowax Sentry*, *Lipoxol*, *Lutrol E*, *macrogola*, *PEG*, *Pluriol E*, *Polyoxyethylene glycol*. Rumus kimia dari PEG 400 adalah $HOCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OH$ dimana (n) merupakan angka gugus oxyethylene dengan nilai 8,7. PEG 400 memiliki berat molekul sebesar 190-210 (Rowe dkk., 2009). Struktur kimia senyawa PEG 400 ditunjukkan pada Gambar 7.

model secara *in-vitro* yang baik untuk formulasi karena profil disolusi yang masih tradisional menjadi tidak bekerja sebab formulasi tersebut berpotensi saat sebelum proses pelepasan obat dalam saluran pencernaan (Prajapati dkk., 2007; Vergote dkk., 2001).

SNEDDS dipengaruhi oleh beberapa pertimbangan diantaranya penggunaan obat dengan dosis yang sangat tinggi tidak sesuai untuk formulasi SNEDDS kecuali bila mereka menunjukkan kelarutannya yang baik pada salah satu komponen SNEDDS, tepatnya dalam fase lipofilik, obat yang menunjukkan kelarutan rendah dalam air dan lemak sangat sulit untuk dilepaskan oleh SNEDDS. Kemampuan SNEDDS mempertahankan obat dalam bentuk larutan sangat dipengaruhi oleh kelarutan obat dalam minyak. Kombinasi antara surfaktan dan ko-surfaktan dalam jumlah yang lebih besar untuk larutan obat akan menimbulkan resiko terjadinya presipitasi, seperti pengenceran SNEDDS menyebabkan penurunan kapasitas pelarut dalam surfaktan maupun kosurfaktan (Kim dkk., 2000).

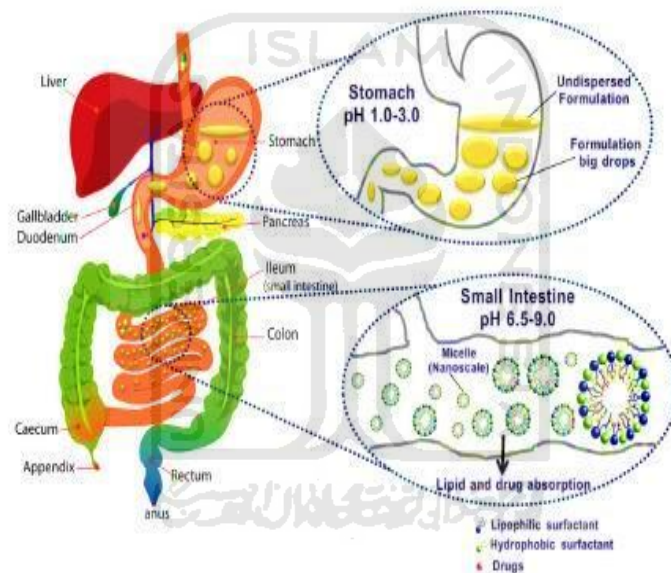
Keberhasilan formulasi SNEDDS dipengaruhi oleh tingkat pemahaman terhadap proses nanoemulsifikasi yang secara spontan dan juga sifat fisikokimia serta unsur biologis komponen yang digunakan untuk membuat SNEDDS. Faktor yang mendukung SNEDDS berupa sifat fisikokimia alami dan konsentrasi fase minyak, surfaktan, kosurfaktan; rasio komponen terutama rasio minyak-surfaktan; suhu dan pH fase air dimana proses nanoemulsifikasi terjadi; faktor fisikokimia obat seperti hidrofilik/lipofilisitas, pKa dan polaritas (Kim dkk., 2000).

3.6.3 Mekanisme SNEDDS

Menurut Reiss, *self-emulsification* terjadi saat energi entropi fase terdispersi lebih besar daripada energi yang diperlukan untuk meningkatkan luas permukaan fase terdispersi (Reiss, 1975). Energi bebas dalam emulsi konvensional nilainya sebanding dengan energi yang diperlukan untuk memperluas permukaan antara fase minyak sebagai fase terdispersi terhadap air sebagai fase *disperse*, sesuai dengan persamaan :

$$\Delta G = \Sigma N 4\pi r^2 \sigma \dots\dots\dots(1)$$

Keterangannya meliputi ΔG sebagai energi bebas, N sebagai jumlah *droplet*, r sebagai jari-jari *droplet*, dan σ sebagai energi antar muka. Dua fase emulsi cenderung memisah bukan disebabkan karena penurunan energi bebas dan energi antar muka tetapi emulsi distabilkan oleh agen pengemulsi dimana membentuk monolayer *droplet* emulsi, oleh sebab itu energi antar muka dapat untuk mencegah terjadinya *coalescence* (Makadia dkk., 2013). Mekanisme SNEDDS dalam tubuh dtunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Mekanisme SNEDDS dalam tubuh (Zhao, 2015)

3.7 Particle Size Analyzer (PSA)

Terdapat beberapa metode yang digunakan untuk mengetahui ukuran dari suatu partikel antara lain metode ayakan (*Sieve analyses*), *laser diffraction* (LAS), metode sedimentasi, analisis gambar (mikrografi), *electronical sensing zone*, dan *electron microscope*. *Sieve analysis* (analisis ayakan) dalam dunia farmasi sangat sering digunakan dalam bidang mikromeritik, yaitu ilmu yang mempelajari tentang ilmu dan teknologi partikel kecil. Metode yang paling umum digunakan adalah

analisa gambar (mikrografi). Metode ini meliputi metode mikroskopi dan metode holografi. Alat yang sering digunakan biasanya SEM, TEM, dan AFM (Rusli, 2011).

Para peneliti mulai menggunakan metode *laser diffraction* (LAS) seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan yang mengarah ke era nanoteknologi. Metode ini dinilai lebih akurat bila dibandingkan dengan metode analisis gambar maupun metode ayakan (*sieve analysis*), terutama untuk sampel-sampel dalam orde nanometer maupun submikron. Metode ini menjadi prinsip dasar dalam instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA). Prinsip dari *Laser Diffraction* sendiri ialah ketika partikel-partikel melewati berkas sinar laser dan cahaya dihamburkan oleh partikel-partikel tersebut dikumpulkan melebihi rentang sudut yang berhadapan langsung. Distribusi dari intensitas yang dihamburkan ini yang akan dianalisis oleh komputer sebagai hasil distribusi ukuran partikel (Lusi, 2011).

Terdapat dua buah metode dalam pengukuran antara lain menggunakan metode basah dan kering. Metode basah, metode ini menggunakan media pendispersi untuk mendispersikan material uji. Sedangkan metode kering, merupakan metode yang memanfaatkan udara atau aliran udara yang berfungsi untuk melarutkan partikel dan membawanya ke *sensing zone*. Metode ini baik digunakan untuk ukuran yang kasar, dimana hubungan antar partikel lemah dan kemungkinan untuk beraglomerasi kecil. Alat PSA dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Alat Particle Size Analyzer

Pengukuran partikel dengan menggunakan PSA biasanya menggunakan metode basah. Metode ini dinilai lebih akurat jika dibandingkan dengan metode kering

ataupun pengukuran partikel dengan metode ayakan dan analisa gambar. Terutama untuk sampel-sampel dalam orde nanometer yang cenderung memiliki aglomerasi yang tinggi. Hal ini dikarenakan partikel didispersikan ke dalam media sehingga partikel tidak saling aglomerasi. Dengan demikian, ukuran partikel yang terukur adalah ukuran dari *single particle*. Selain itu hasil pengukuran ditampilkan dalam bentuk distribusi, sehingga hasil pengukuran dapat diasumsikan sudah menggambarkan keseluruhan kondisi sampel. Melalui analisis *Particle Size Analyzer* (PSA) diharapkan distribusi ukuran nanopartikel yang dihasilkan berada pada rentang nanometer dengan keseragaman ukuran yang baik. Keunggulan penggunaan *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk mengetahui ukuran partikel adalah:

- a. Lebih akurat dan mudah digunakan, pengukuran partikel dengan menggunakan PSA lebih akurat jika dibandingkan dengan pengukuran partikel dengan alat lain seperti TEM ataupun SEM. Hal ini dikarenakan partikel dari sampel yang akan diuji didispersikan ke dalam sebuah media sehingga ukuran partikel yang terukur merupakan ukuran partikel tunggal.
- b. Hasil pengukuran dalam bentuk distribusi, sehingga dapat menggambarkan keseluruhan sampel.
- c. Keseluruhan kondisi sampel, dalam artian penyebaran ukuran rata-rata partikel dalam suatu sampel.
- d. Rentang pengukuran dari 0,6 nanometer hingga 7 mikrometer (Rusli, 2011).

3.7.1 Ukuran dan Distribusi Partikel

Karakteristik pertama yang perlu diamati dalam sistem nanopartikel adalah ukuran dan distribusi partikel. Karena kedua hal ini yang digunakan untuk memperkirakan distribusi secara *in vivo*, toksisitas, serta kemampuan *targeting* dari nanopartikel. Obat yang terjerap saat terkena area permukaan partikel menyebabkan pelepasan obat yang sangat signifikan. Ukuran nanopartikel yang kecil akan berakibat pada pelepasan obat yang cepat. Semakin kecil ukuran partikel maka luas permukaannya semakin besar. Akan tetapi, semakin dekat letak obat dengan

permukaan partikel karena ukuran kecil maka semakin cepat pula pelepasannya. Sedangkan pada partikel yang ukurannya lebih besar, lebih banyak menampung obat sehingga obat bisa lebih lambat dalam pelepasannya. Partikel yang terlalu kecil lebih cenderung mengalami agregasi selama penyimpanan dan pengangkutan dispersi nanopartikel. Sehingga diperlukan teknik untuk membentuk partikel dengan ukuran yang kecil namun dengan stabilitas yang baik (Bathia, 2016).

3.7.2 Zeta Potensial

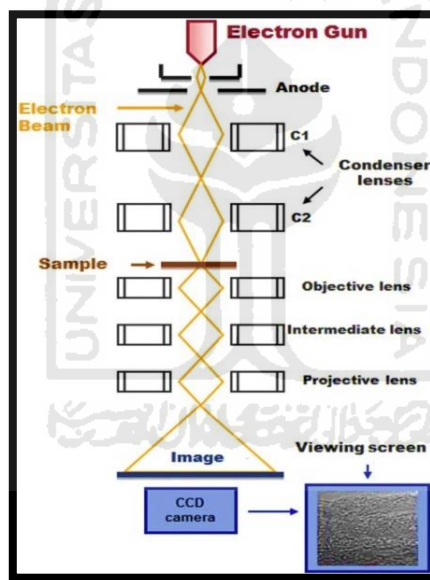
Zeta potensial adalah muatan partikel dalam medium spesifik ataupun medium pendispersinya. *Zeta potensial* akan memperlihatkan besarnya gaya tolak menolak antara muatan partikel yang sama dan berdekatan. Nilai *zeta potensial* yang tinggi baik positif maupun negatif mampu memberikan stabilitas yang baik karena dapat mencegah terjadinya agregasi dari partikel, yaitu minimal cukup ± 30 mV atau mendekati 30 mV. Dengan adanya *zeta potensial* yang tinggi menimbulkan gaya tolak menolak dan stabilisasi secara elektrik dari dispersi nanopartikel. Ketika nilai *zeta potensial* yang dimiliki nanopartikel kecil maka akan terjadi gaya tarik menarik yang lebih besar dibandingkan gaya tolak menolaknya, sehingga dapat memicu terjadinya koagulasi dan flokulasi (Amalia dkk., 2015).

3.8 Transmission Electron Microscope (TEM)

Jenis pertama dari mikroskop elektron adalah TEM yang dibangun oleh Max Knoll dan Ernst Ruska pada tahun 1931. Saat ini, TEM 400 kV dapat memberikan resolusi di bawah 0,2 nm dan memungkinkan untuk pengamatan sampel yang relatif tebal, sekitar 500 nm. Instrumen STEM canggih dapat mencapai resolusi 0,05 nm (Williams dan Carter, 2009).

Setiap TEM terdiri dari unsur-unsur dasar berikut (Gambar. 10): pistol elektron (filamen tungsten, LaB6 atau emisi medan) menghasilkan aliran elektron, yang difokuskan menjadi berkas elektron paralel kecil, tipis, paralel menggunakan lensa kondensor (C1 dan C2) dan bukaan kondensor. Sinar menyerang spesimen yang

disiapkan (ketebalan yang dibutuhkan dari sekitar 500 sampai kurang dari 100 nm) dan bagian dari berkas elektron ditransmisikan. Bagian yang ditransmisikan difokuskan oleh lensa objektif yang menciptakan gambar. Gambar diturunkan kolom melalui lensa perantara dan proyektor, yang diperbesar melalui masing-masing lensa. Kekuatan lensa dapat disesuaikan, dan sebagai konsekuensinya, modifikasi dapat bervariasi dengan lancar. Lensa magnetik, mirip dengan lensa kaca, memiliki berbagai jenis penyimpangan: penyimpangan bola; aberasi kronis; dan astigmatisme, yang harus diperbaiki untuk mendapatkan citra yang baik. Jika spesimennya adalah kristal, akan ada pola difraksi pada titik berbeda di lensa, yang dikenal sebagai bidang fokus belakang (Goodhew dkk., 2001). Alat TEM dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Alat TEM

Gambar TEM kemudian diproyeksikan ke layar fluoresens di mana mereka dapat direkam pada film negatif, piring gambar atau paling sering pada kamera CCD pemindaian lambat TEM modern. Pemrosesan lebih lanjut dan analisis gambar kemudian dapat diselesaikan. Mikroskop elektron modern menggunakan komputer yang cepat dan kuat untuk mengontrol dan merekam kondisi pengoperasian mikroskop dan untuk mendukung akuisisi data yang diperluas untuk aplikasi analitis.

Perkembangan teknologi baru memungkinkan TEM modern untuk memasukkan berbagai teknik berbeda yang menggunakan berbagai sinyal yang timbul dari interaksi berkas elektron dengan sampel (Gambar. 10) yang paling umum adalah:

- a. Gambar Bright Field (BF)/Dark Field (DF)-mode dasar pengamatan TEM,
- b. Gambar Resolusi Tinggi Transmisi Elektron Mikroskopi (HRTEM) yang diperoleh dari gangguan pada bidang gambar dari gelombang elektron dengan itu sendiri memungkinkan pencitraan langsung dari struktur atom sampel
- c. Difraksi Elektron (ED)/Area Terpilih Difraksi Elektron (SAED)-metode untuk memperoleh informasi tentang struktur kristal dari pola fraksi, yang diperoleh oleh penerangan berkas elektron pada spesimen,
- d. Memindai Transmisi Elektron Mikroskopi (STEM)-suatu teknik, di mana berkas elektron konvergen kecil yang diperoleh dalam lensa kondensor memindai area sampel yang ditentukan,
- e. Spektroskopi sinar-X Energi-dispersif (EDS)-metode untuk mendapatkan komposisi unsur (analisis titik, pemetaan unsur) sampel dengan mengumpulkan dan menganalisis spektrum sinar-X yang dihasilkan dari interaksi berkas elektron dan permukaan sampel,
- f. Mikroskopi Transmisi Elektron Penyaring Energi (EFTEM)-suatu teknik, di mana hanya elektron dari energi kinetik tertentu yang digunakan untuk membentuk gambar atau pola difraksi, berguna dalam analisis kimia sampel,
- g. Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS)-sebuah metode untuk melakukan analisis kualitatif dan kuantitatif elemen-elemen dari area mikro atau nano sampel berdasarkan pada spektrum energi dari elektron yang tersebar secara tidak elastis. Ini memiliki resolusi spasial dan energi yang jauh lebih baik dibandingkan dengan EDS.

Penerapan kombinasi teknik-teknik di atas memungkinkan peneliti untuk mendapatkan informasi yang sangat rinci tentang struktur, tekstur, morfologi dan komposisi bahan yang dipelajari. Latar belakang yang luas, teoritis dan praktis teknik TEM diterbitkan oleh Goodhew dkk., (2001) dan Williams dan Carter (2009).

TEM adalah teknik yang tepat untuk memeriksa unit struktural dalam semua jenis bahan berkarbon, termasuk grafit. Pemeriksaan dapat menghasilkan informasi tentang topografi, morfologi, komposisi dan fitur kristalografi (Oberlin, 1989; Rouzaud, 1990). TEM dapat menjadi alat pelengkap metode kristalografi konvensional seperti difraksi sinar-X (XRD). Difraksi elektron memiliki keunggulan unik dibandingkan XRD karena sifat-sifat seperti informasi morfologis, kristalografi, dan kimia dapat dikumpulkan secara bersamaan menggunakan instrumen tunggal. Pola difraksi elektron dapat diperoleh dari volume material yang relatif kecil dibandingkan dengan sinar-X dan neutron. Difraksi elektron bahan amorf memiliki sejumlah keunggulan dibandingkan sinar-X karena bahan amorf tidak bersifat kristal, tetapi memiliki beberapa orde jangka pendek (Hammond, 1997; Jurkiewicz dkk., 2018).

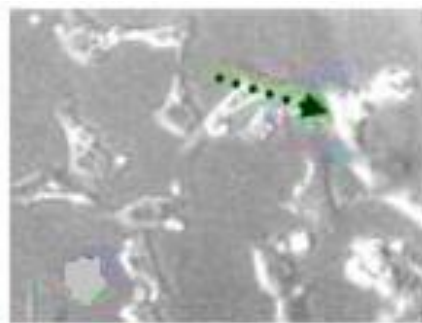
3.9 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang mempunyai prevalensi cukup tinggi. Kanker payudara dapat terjadi pada pria maupun wanita, hanya saja prevalensi pada wanita jauh lebih tinggi. Di Indonesia, kanker payudara menempati urutan ke dua setelah kanker leher rahim (Tjindarbumi, 1995). Kejadian kanker payudara di Indonesia sebesar 11% dari seluruh kejadian kanker (Siswono, 2003). Pada umumnya tumor pada payudara bermula dari sel epitelial, sehingga kebanyakan kanker payudara dikelompokkan sebagai karsinoma (keganasan tumor epitelial). Sedangkan sarkoma, yaitu keganasan yang berangkat dari jaringan penghubung, jarang dijumpai pada payudara. Berdasarkan asal dan karakter histologinya kanker payudara dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu in-situ karsinoma dan invasive karsinoma. Karsinoma in situ dikarakterisasi oleh lokalisasi sel tumor baik di duktus maupun di lobular, tanpa adanya invasi melalui membran basal menuju stroma di sekelilingnya. Sebaliknya pada invasive karsinoma, membran basal akan rusak sebagian atau secara keseluruhan dan sel kanker akan mampu menginvasi jaringan di sekitarnya menjadi sel metastatik (Hondermarck, 2003).

Kanker payudara pada umumnya berupa ductal breast cancer yang invasif dengan pertumbuhan tidak terlalu cepat (Tambunan, 2003). Kanker payudara sebagian besar (sekitar 70%) ditandai dengan adanya gumpalan yang biasanya terasa sakit pada payudara, juga adanya tanda lain yang lebih jarang yang berupa sakit pada bagian payudara, erosi, retraksi, pembesaran dan rasa gatal pada bagian puting, juga secara keseluruhan timbul kemerahan, pembesaran dan kemungkinan penyusutan payudara. Sedangkan pada masa metastasis dapat timbul gejala nyeri tulang, penyakit kuning atau bahkan pengurangan berat badan (Bosman, 1999). Sel kanker payudara dapat tumbuh menjadi benjolan sebesar 1 cm² dalam waktu 8-12 tahun (Tambunan, 2003). Pada tumor yang ganas, benjolan ini bersifat solid, keras, tidak beraturan, dan nonmobile. Pada kasus yang lebih berat dapat terjadi edema kulit, kemerahan, dan rasa panas pada jaringan payudara (Lindley dan Michaud, 2005). Pada percobaan ini akan digunakan tiga jenis sel yaitu : Sel T47D, Sel MCF7, dan Sel Vero.

3.9.1 Sel T47D

Sel kanker payudara T47D adalah sel yang diperoleh dari jaringan payudara wanita remaja maupun dewasa yang terkenal *ductal carcinoma* yang ditumbuhkan dalam media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (ATCC, 2008). Bentuk morfologi sel T47D dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Morfologi sel T47D (CCRC, 2009)

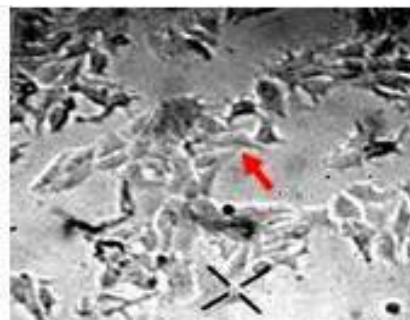
Sel T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor *ductal* payudara wanita berusia 54 tahun. *Continuous cell line* sering digunakan dalam penelitian antikanker secara *in vitro* karena memiliki kemampuan replikasi

yang tidak terbatas, homogenitas tinggi, mudah penanganannya serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall dkk., 2003). Morfologi dari sel kanker T47D seperti sel epitel (CCRC, 2009)

Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. Mutase missense 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).

3.9.2 Sel MCF-7

Sel MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) adalah salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel MCF-7 merupakan sel kanker yang yang diperoleh dari pasien wanita Kaukasian dengan dasar penumbuh media DMEM terformulasi. Sel MCF-7 bersifat *adherent* sehingga metode kultur yang tepat adalah *monolayer*. Sel ini 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+. (ATCC, 2012). Bentuk morfologi sel MCF-7 dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Morfologi sel MCF-7 (CCRC, 2009)

3.9.3 Sel Vero

Sel Vero merupakan sel *line* yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (*Africangreen monkey*). Sel Vero berbentuk poligonal dan pipih, merupakan sel monolayer dan termasuk jenis *epithelial-like*. Sel ini menempel dengan kuat pada lapisan substrat yang berbahan polistiren dan membentuk ikatan kovalen (Sons, 2008).

3.10 Kultur Sel (Malole, 1990)

Kultur sel berasal dari organ atau jaringan yang telah diuraikan secara mekanis dan atau enzimatis menjadi suspensi sel. Suspensi sel kemudian dibiakkan menjadi lapisan atau *monolayer* diatas permukaan seperti botol, tabung dan cawan, atau menjadi suspensi sel dalam media penumbuh. Setiap *monolayer* kemudian diperbanyak dengan media penumbuh. Teknik ini disebut subkultur atau pasase. Apabila dipasase terus menerus maka dihasilkan sel lestari (*cell line*)

Sel lestari merupakan sel yang memiliki sifat diantaranya daya tumbuh dari sel cukup tinggi, dan seragam serta sel tersebut biasanya mengalami perubahan fenotipe dan transformasi. Pemanasan medium yang digunakan pada temperatur 37 °C dilakukan sebelum penambahan sel dan pHnya distabilkan. Proses produksi sel tersebut hendaknya sel berada dalam fase akhir pertumbuhan logaritmik agar mencapai tingkat produktivitas yang cukup tinggi, karena sel tersebut masih aktif membelah.

Jumlah sel yang digunakan bervariasi antara jenis sel dan keadaan media yang digunakan. Jumlah sel umumnya berkisar 50.000 sampai 200.000 sel/mL atau 5.000 sampai 20.000 sel/cm². Pengadukan suspensi sel dilakukan pada kecepatan yang optimum, walaupun kecepatan tersebut bervariasi pada setiap jenis sel dan bentuk bejana, akan tetapi secara umum dapat digunakan 100-500 rpm, untuk kultur yang memakai *microcarrier* antara 20-100 rpm.

3.11 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel biasa digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetik, zat tambahan makanan, peptisida dan digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari senyawa (Freshney, 1992). 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. Jumlah sel yang masih hidup ditentukan dengan berbagai cara yang didasarkan pada kerusakan membran, gangguan sintesis dan degradasi makromolekul, modifikasi kapasitas metabolisme serta perubahan morfologi sel. Metode lain yang dapat digunakan adalah metode kolorimetrik dengan menggunakan reagen atau substrat yang akan dimetabolisme sel menjadi produk berwarna misalnya MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida). 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).

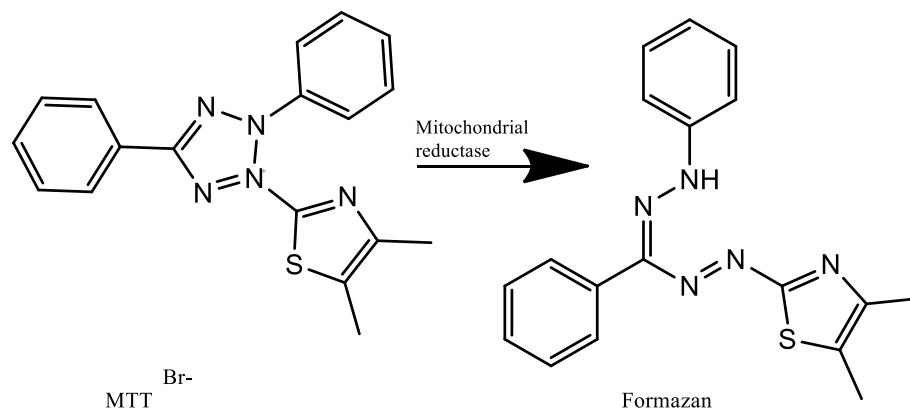
3.12 Metode Pengujian Sitotoksik

a. MTT assay

Metode MTT merupakan metode yang umum digunakan dalam uji aktivitas antikanker yaitu menggunakan garam tetrazolium atau MTT {3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida} yang berwarna kuning dimana akan dimetabolisme oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel menjadi kristal formazan berwarna ungu (Freshney, 1992). MTT dilarutkan dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 5 mg/mL dan disaring untuk menghilangkan residu yang tidak larut. MTT ditambahkan secara langsung pada plate yang telah berisi medium kultur 10-100 μ L dan diinkubasi selama kurang lebih 4 jam pada 37°C.

Terbentuknya Kristal formazan yang berwarna ungu akan terlarut dengan penambahan SDS 10% dalam HCl 0,01 N atau isopropanol asam (100 μ l 0,04 N HCl dalam isopropanol). Selanjutnya pembacaan absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Intensitas warna yang terbentuk berbanding langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme (Zakaria, 2010).

MTT merupakan metode yang telah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang. Metode MTT merupakan metode yang relatif sensitif, akurat, cepat, mampu mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya dapat digunakan untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Doyle dan Griffiths, 200). Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromida) (MTT) menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup. MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam SDS 10% berwarna ungu (Doyle dan Griffiths, 2000). Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif. Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Reaksi reduksi MTT dapat ditunjukkan pada Gambar 13.



Gambar 13. Reaksi Reduksi MTT menjadi Formazan (Mosmann, 1983)

b. Metode perhitungan langsung

Metode perhitungan langsung dilakukan dengan menggunakan larutan biru tripan. Sel yang mati akan menyerap warna biru tripan, sedangkan yang hidup tidak. Hal ini disebabkan karena sel yang mati akan mengalami kerusakan pada membran selnya, mengakibatkan protein di dalam sel keluar dan berikatan dengan biru tripan. Pemberian larutan biru tripan dilakukan bertahap untuk menghindari kemungkinan kematian sel oleh biru tripan dan hasilnya sel yang mati akan tampak keruh tidak bercahaya (Agoes, 1994).

c. Metode integritas membran

Metode ini terutama digunakan untuk senyawa toksik yang memberikan efek dengan merusak membran sel yang tidak terjadi dalam keadaan normal (seperti biru tripan dan eritrosin) dan pengeluaran isotop atau pewarna dalam keadaan normal tidak dikeluarkan oleh sel, seperti ¹⁵Kromium dan diasetil fluoresin (Freshney, 1992).

d. Metode radioisotop

Pemasukan radioisotop seperti [³H]-timidin ke dalam DNA dan [³H]-uridin ke dalam RNA (Freshney, 1992).

3.13 Elisa Reader

ELISA merupakan salah satu metode yang selama ini banyak digunakan untuk deteksi antibodi berdasarkan prinsip ikatan antigen-antibodi spesifik. Aplikasi metode ini digunakan untuk skrining maupun konfirmasi diagnosa suatu penyakit, akan tetapi pada kondisi tertentu uji ELISA terkadang tidak bisa dilakukan, hal tersebut dapat terjadi misalnya pada keperluan deteksi segera di lokasi kejadian penyakit, keterbatasan peralatan laboratorium, ketidaktersediaan bahan kimia, maupun tidak adanya tenaga laboratorium yang memiliki keahlian menjalankan tes dan perlunya hasil tes untuk segera diketahui (Mufidah dkk., 2015). Alat ELISA dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Microplate reader atau ELISA (CCRC, 2007)

3.14 *Liquid Chromatograph-tandem 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 analisis ion lainnya yang lebih unggul membuat sebagian besar ilmuwan sepakat untuk menggunakan spektrometri massa yang lebih spesifik (Vogesser dan Seger, 2008).

Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan LC-MS/MS untuk penelitian bioanalisis dimulai pada akhir 1980-an (Bowers, 1989; Covey dkk., 1986). Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS meliputi (Vogesser and Seger, 2008).

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor.
2. Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GCMS sebagai spektrometer masa “klasik”, penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu 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 yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi mereka (m/z). Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion, dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menseleksi ion. Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Masing-masing sumber ion dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan (Agilent-Technologies, 2001).

Prinsip-prinsip yang berbeda dapat digunakan dalam pemisahan dan pengukuran ion (partikel bermuatan) dengan rasio massa terhadap muatan yang berbeda di bawah kondisi vakum tinggi. Pada prinsipnya, fungsi dari semua spektrometer massa dalam menghasilkan spektra massa melibatkan empat langkah yaitu: (1) pengenalan sampel, (2) ionisasi sampel molekul untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam fase gas (metode ionisasi), (3) pemilahan yang dihasilkan ion fase gas dengan rasio massa terhadap muatan (penganalisis massa), dan (4) deteksi ion yang terpisah (Gunzler dan Williams, 2001).

Komponen-komponen dari instrumen LC-MS adalah sebagai berikut:

a. Pompa

Pompa bertanggung jawab dalam pemberian aliran fase gerak yang konstan selama analisis. Pompa HPLC yang baik harus mampu menghasilkan laju alir antara 0,5-10 mL/menit, dengan tekanan maksimum 40-50 MPa, laju alir yang konstan dengan variasi kurang dari 0,5%. 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 pengemasan kolom HPLC (Gunzler dan Williams, 2001).

b. Kolom

HPLC fase 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. Kolom RP-HPLC jika dikombinasikan dengan elusi gradien dapat memisahkan analit dengan rentang yang luas (Gunzler dan Williams, 2001).

c. Fase Gerak

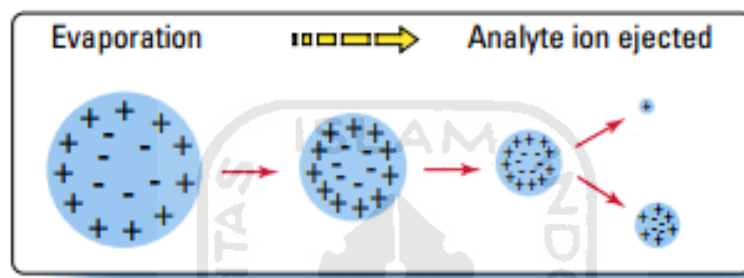
Fase gerak yang umum digunakan dalam RP-HPLC, diantaranya adalah air, asetonitril, dan methanol yang ideal untuk LC-MS. Semua solven harus dihilangkan gasnya sebelum dianalisis dengan LC-MS untuk menjaga stabilitas sinyal ion. Penghilangan gas dapat dilakukan dengan sonifikasi, helium sparging, atau membran vakum (Gunzler dan Williams, 2001).

d. Sumber Ion

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

ESI bergantung pada pelarut yang digunakan untuk memungkinkan analit mampu terionkan dengan baik sebelum mencapai spektrofotometer 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 yang 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, pengambilan sampel yang selanjutnya akan diteruskan ke dalam *mass analyzer* (Ginting, 2012). Berikut adalah proses desorpsi ion dari larutan yang terdapat pada Gambar 15.



Gambar 15. Desorpsi Ion dari Larutan (Ginting, 2012)

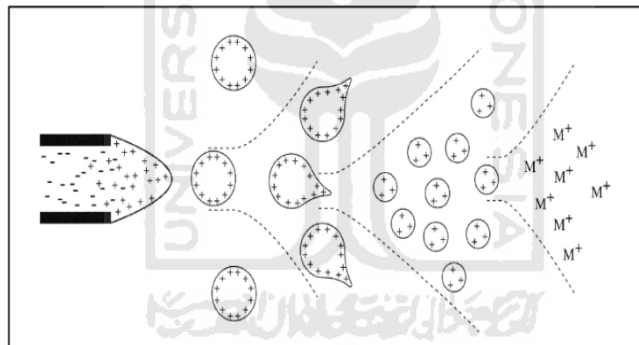
3.15 *Mass Spectroscopy* (MS)

Spektroskopi massa merupakan metode yang menganalisa senyawa berdasarkan dari berat molekulnya, ini adalah salah satu keunggulan dari MS dibandingkan dengan detektor lain misalnya detektor UV. Detektor UV menganalisa suatu analit berdasarkan karakteristik dari retensi analit tersebut, namun banyak senyawa yang memiliki karakteristik retensi yang mirip. Sehingga dengan detektor UV tidak dapat mengatakan bahwa dua senyawa yang dianalisis tersebut sama secara absolut. Berbeda dengan UV, MS menganalisa suatu data berdasarkan berat molekul dan masing-masing senyawa memiliki berat molekul yang berbeda-beda. Sehingga MS dapat mengidentifikasi suatu analit secara absolut (Ardrey, 2003). Komponen yang dimiliki oleh MS yaitu sumber ion, pompa vakum, penganalisis dan komputer.

Sistem LC-MS modern dilengkapi dengan sumber ion dimana pelarut yang dipisahkan dari sampel terionisasi menuju vakum dalam spektrometer massa. Dua tipe sumber ion yang umum digunakan dalam spektrometer massa adalah

electrospray (ES) dan ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI) atau ion spray (IS) (McMaster, 2005).

Mass spectroscopy (MS) dirancang untuk mengukur rasio massa permuatan (m/z) ion pada fase gas. Spektrometri massa terdiri dari tiga elemen: *ion source*, *mass analyzer*, dan detektor. *Ion source* merupakan komponen yang membuat analit dapat masuk ke dalam spektrometer dan terionisasi. *Mass analyzer* memisahkan ion dengan massa permuatan dan detektor mencatat jumlah ion yang dihasilkan (Hernandez, 2005). *Electrospray ionization* (ESI) merupakan salah satu metode ionisasi sebelum analisis dengan MS. Transfer bentuk ionik dari larutan menuju fase gas melalui metode ESI terdiri tiga tahap, yaitu penyebaran semprotan halus dari droplet bermuatan, penguapan pelarut, dan pengeluaran ion dari droplet bermuatan tinggi (Hodgk., 2003). Mekanisme *electrospray ionization* dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Mekanisme *electrospray ionization* (Hodgk., 2003)

Teknik LC-ESI-MS merupakan metode analisis yang sering dikembangkan. Metode LC digunakan untuk memisahkan campuran senyawa menjadi komponen-komponennya. Kemudian MS berfungsi untuk identifikasi senyawa berdasarkan berat molekulnya dan fragmentasi ion yang terbentuk. Sebelum dapat diidentifikasi dengan MS, analit harus mengalami ionisasi melalui proses ESI (McMaster, 2005).

3.16 Protokol Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi digunakan untuk memahami respon instrumental terhadap analit dan memprediksi konsentrasi dalam 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. Data tersebut kemudian cocok dengan fungsi sehingga konsentrasi yang tidak diketahui dapat diprediksi. Biasanya responsnya linier, namun, kurva dapat dibuat dengan fungsi lain selama fungsi tersebut diketahui. Kurva kalibrasi dapat digunakan untuk menghitung batas deteksi dan batas kuantitasi (JoVe, 2019).

3.16.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi (JoVe, 2019)

1. Data dalam catatan spreadsheet dan gunakan 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 ini terlihat linier? Apakah ada bagian yang terlihat non-linear (misalnya mencapai batas respons instrumental)? Untuk memeriksa, pastikan semua data dengan 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 untuk menghapus titik di tengah hanya karena mereka memiliki bar kesalahan besar. Dari analisis ini, tentukan bagian kurva apa yang linier.
3. Output dari linier harus berupa persamaan format $y = mx + b$, di mana 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 Penelitian

1. Fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) memiliki senyawa yang bisa berperan sebagai antikanker payudara.
2. Formulasi pembuatan sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang paling optimal adalah yang memiliki ukuran partikel yang paling kecil dan memiliki aktivitas sitotoksik yang tinggi.
3. Sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) mampu meningkatkan aktivitas dan efektivitas antikanker payudara.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan selama 8 bulan dan bertempat di Laboratorium Riset dan Pengembangan Kimia Fakultas MIPA UII, Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas MIPA UII, Laboratorium Sistematika Tumbuhan UGM, LIPI Tangerang Selatan, Laboratorium Pengujian Obat dan Makanan UII, Departemen Kimia FMIPA UGM, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan diantaranya seperangkat alat gelas (Pyrex), blender, neraca analitik, inkubator, kertas saring, klem dan statif, kolom kromatografi, evaporator vakum Heidolph, *rotary vacuum evaporator*, sentrifugator Hettich, botol vial, oven, vorteks, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung, *plate 96-well, yellow tip, conical tube*, hemositometer, *blue tip, laminar air flow* (LAF), Ultrasonikator, *Particle Size Analyzer* (Horiba Scientific, Nano Particle Analyzer SZ-100), *Transmission Electron Microscope* (TEM), *ELISA reader*, dan LC-MS/MS.

4.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), etanol 96%, n-heksana p.a, aseton, *aquadest*, logam Mg, HCl pekat, reagen dragendroff, reagen mayer, FeCl₃, H₂SO₄ pekat PBS (*Phospat buffer saline*), media kultur RPMI, tripsin-EDTA, DMSO (Dimetil Sulfoksida), SDS 10 % dalam 0,1 N HCl, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), formaldehid, MTT 5 mg/mL (50 mg MTT dan 10 mL PBS), alumunium foil, tissue, sel T47D, sel MCF-7, sel vero, tween 20, capryol, dan PEG.

4.3 Identifikasi Variabel

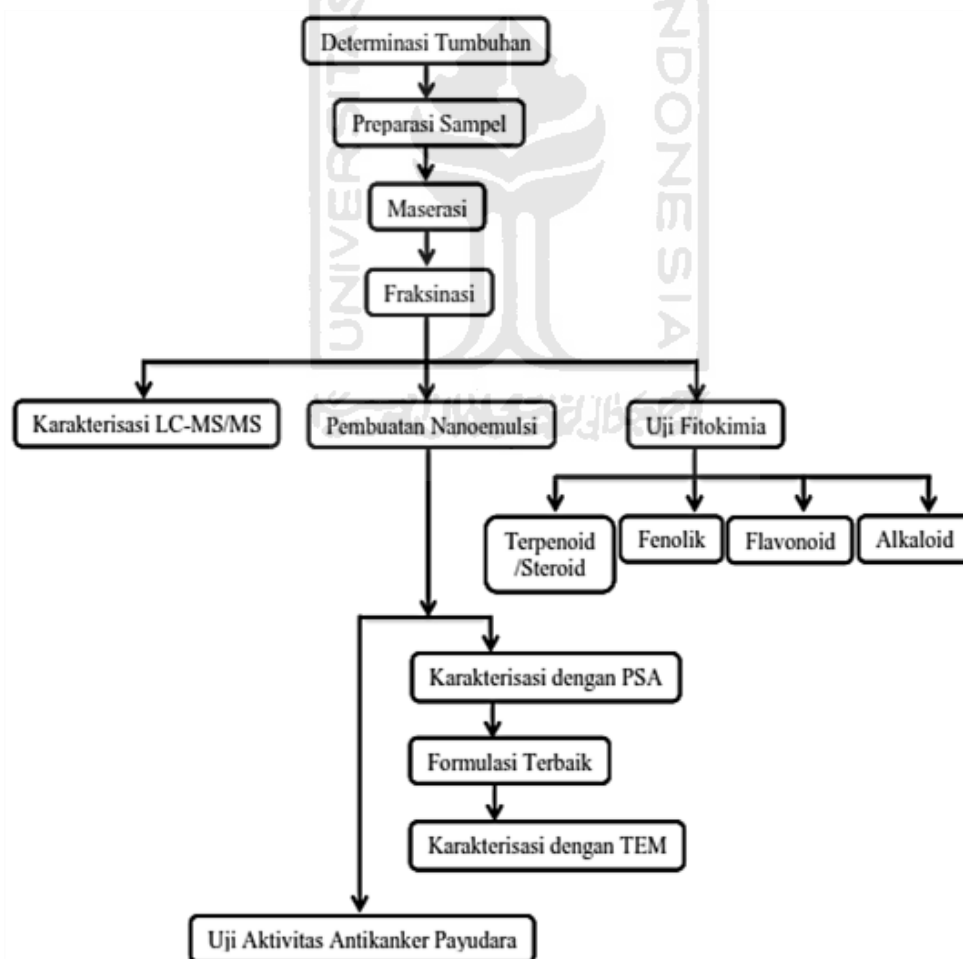
Pada percobaan kali ini variabel-variabel yang digunakan ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Variabel Penelitian

Minyak Capryol	Surfaktan Tween	Ko-surfaktan PEG	Konsentrasi Ekstrak
20	60	20	40
20	60	20	60
20	60	20	80

4.4 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan dalam penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 17.



Gambar 17. Tahapan Penelitian

4.5 Cara Kerja

4.5.1 Uji Determinasi

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Dengan sampel berupa tanaman jambu biji yang meliputi ranting, daun, pucuk, dan bunga.

4.5.2 Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun dari jambu biji (*Psidium guajava* L.) diasumsikan sebagai variabel bebas dimana bahan baku tersebut dipetik dari pohon jambu biji yang bertempat di Yogyakarta, kemudian diangin-anginkan sampai kering. Sebanyak 750 gram sampel kering selanjutnya diblender hingga menjadi serbuk. Serbuk disimpan dalam botol untuk digunakan pada langkah penelitian selanjutnya.

4.5.3 Tahap Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi yaitu dengan memasukkan 750 gram serbuk kering simplisia ke dalam botol kemudian ditambahkan etanol 96% ke dalam botol sampai seluruh simplisia terendam, botol ditutup rapat. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk agar zat aktif yang terdapat pada simplisia terlarut, kemudian didiamkan selama 18 jam. Dipisahkan maserat dengan menggunakan penyaring *Buchner*, diulangi proses penyaringan sekurang- kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ hingga kental (Departemen Kesehatan, 2008).

4.5.4 Fraksinasi

Ekstrak kental etanol sebanyak 263,935 gram kemudian diimpregnasi menggunakan silika dan dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana. Setelah

didapatkan larutan fraksi n-heksana kemudian dievaporasi untuk memisahkan pelarut menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan didapatkan ekstrak dari fraksi tersebut.

4.5.5 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap n-heksana daun jambu biji yang diperoleh.

4.5.5.1 Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak fraksi n-heksana ke dalam 5 ml pelarutnya, kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama dijadikan sebagai tabung kontrol. Tabung kedua tiap fraksi ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendorff dan wagner. Terbentuknya endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi dragendorff akan terbentuk bendapan merah jingga dan dengan pereaksi Wagner terbentuk bendapan coklat (Harborne, 1987).

4.5.5.2 Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak tiap fraksi ke dalam 5 mL pelarutnya, kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama dijadikan sebagai tabung kontrol. Tabung kedua ditambahkan 0,05 g serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Harborne, 1987).

4.5.5.3 Uji Fenolik

Ekstrak tiap fraksi dilarutkan dengan 5 mL pelarutnya, kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%. Uji positif ditandai dengan munculnya warna hitam atau biru tua (Harborne, 1987).

4.5.5.4 Uji Terpenoid/Steroid

Ekstrak tiap fraksi dilarutkan dengan 0,5 mL dengan pelarutnya, kemudian ditambahkan asam asetat anhidrat 0,5 mL dan asam sulfat pekat 2 mL melalui

dinding tabung. Terbentuknya cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid, sedangkan adanya terpenoid ditunjukkan dengan cincin kecoklatan pada perbatasan larutan (Ciulei, 1984).

4.5.6 Pembuatan Nanoemulsi

Frakasi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji diambil sebanyak 0.5 gram ; 0.75 gram ; 1 gram dimasukkan ke dalam vial dengan konsentrasi 40%, 60%, dan 80%, kemudian ditambahkan Capryol, tween 20, dan PEG (*Poli Ethylen Glikol*) dengan variasi formula yang telah dibuat lalu disonikasi selama 4x2 menit setiap masing masing penambahan.

4.5.7 Uji PSA

4.5.7.1 Ukuran Partikel

Sebanyak 1 ml sediaan nanopartikel ekstrak kulit kopi dilarutkan dalam 100 ml akuades, diaduk perlahan hingga membentuk dispersi. Selanjutnya diukur ukuran partikel masing-masing formulasi menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) (Bathia, 2016; Rahayu, 2016).

4.5.7.2 Zeta Potensial

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

4.5.8 Uji TEM

Morfologi sediaan nanopartikel formulasi fraksi n-heksan ekstrak etanol daun jambu biji yang paling optimal dapat dilihat dengan menggunakan TEM (JEM 400). Pengamatan ini dilakukan di laboratorium FMIPA UGM. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Rasaputri, 2010) Sampel dicampurkan dengan air deion kemudian ditetaskan sebanyak 10 μ L di atas spesimen. Alat grid mesh 400 diletakkan

di atas spesimen yang sudah terdapat tetesan sediaan nanoemulsi dan dibiarkan selama 1 menit. Sisa tetesan sediaan pada grid dibersihkan menggunakan kertas saring. Kemudian ditetaskan sebanyak 10 μ L uranyl asetat di atas grid dan sisa tetesan dibersihkan kembali menggunakan kertas saring. Grid dibiarkan selama 30 menit hingga kering dan dimasukkan ke alat TEM untuk dianalisa. Sampel dianalisis dengan percepatan voltage 120 kV dengan perbesaran 200X, 100X, 50X, dan 20X.

4.5.9 Uji Aktivitas Antikanker secara *in-vitro* (CCRC, 2009)

Proses uji aktivitas ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap sel kanker payudara T47D, MCF-7 dan sel vero akan dilakukan dengan petunjuk yang termuat dalam jurnal penelitian Dwitiyanti (2015) yaitu pada tahap awal akan dilakukan penyiapan media kultur RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute*), kemudian penyiapan kultur sel (Doyle dan Griffiths, 2000) yaitu dilakukan pengaktifan sel T47D, pemanenan dan perhitungan sel T47D. Pada tahap selanjutnya akan dilakukan uji sitotoksitas dengan metode perhitungan langsung dimana yang perlu diatur dalam penelitian ini yaitu konsentrasi sampel uji ekstrak fraksi n-heksana, dalam 7 konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 μ g/mL.

4.5.9.1 Penyiapan sel

Sel kanker payudara T47D, MCF-7 dan vero diambil dari koleksi Universitas Gajah Mada (UGM). Sel kanker dikeluarkan dari *freezer* (-80 °C), dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37 °C selama 2-3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan kedalam *conical tube* yang telah berisi 10 mL media RPMI (Roswell Park Memorial Institute) untuk T47D sedangkan sel MCF-7 menggunakan media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), kemudian disentrifugasi untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan media. Pelet yang terbentuk dimasukkan kedalam *culture dish* yang telah berisi 10 mL media dan diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37 °C/ 5% CO₂, 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*) serta dihomogenkan kemudian dibuang kembali, ditambahkan trispsin secara merata dan diinkubasi selama 3 menit, ditambahkan media RPMI 5 mL untuk menginaktifkan sel serta dilakukan resuspensi, diamati dibawah mikroskop *inverted*, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C/ 5% CO₂ selama 24 jam.

4.5.9.2 Penghitungan sel kanker

Diambil 10 µL panen sel dan dipipetkan ke hemositometer. Diamati dan dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel kanker dapat diketahui dengan perhitungan pada persamaan (1) sebagai berikut:

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

Keterangan :

n: jumlah sel tiap kamar

4.5.9.3 Peletakan sel pada plate

Jumlah sel yang diletakkan pada *plate* setiap sumuran, diketahui dengan menggunakan persamaan (2) sebagai berikut:

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

Sel diletakkan dalam plate dan ditambahkan media yang sesuai RPMI untuk sel T47D, media DMEM untuk sel MCF-7. Selanjutnya diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C/ 5% CO₂, akan tetapi 8 sumuran bagian bawah disisakan untuk kontrol sel dan kontrol media.

4.5.9.4 Pembuatan larutan sampel dan pemberian larutan sampel pada plate

Ditimbang masing-masing sampel ekstrak pekat yakni fraksi n-heksana, etil asetat, dan etanol sebanyak 10 mg dalam wadah yang berbeda, dilarutkan masing-masing ekstrak pekat dalam 100 µL DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dan diaduk dengan

vorteks agar lebih cepat dalam melarutkan sampel, diambil sel dari inkubator, kemudian dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate* 180° diatas tempat buangan dan ditekan secara perlahan diatas tissue untuk meniriskan sisa cairan, dimasukkan 100 µL PBS kedalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu dimasukkan larutan sampel sebanyak 100 uL dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 µg/mL dan diulang sebanyak 3x (triplo), diinkubasi kembali selama 24 jam.

4.5.9.5 Penambahan larutan MTT (Reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium 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 uL kesetiap sumuran. Inkubasi kembali selama 3-4 jam di dalam inkubator pada suhu 37 °C/5% CO₂ (sampai terbentuk kristal formazan atau perubahan warna menjadi biru). Apabila kristal formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*, lalu ditambahkan stopper SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% dalam 0,1 N HCl, dibungkus *plate* dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.

Langkah selanjutnya yaitu pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA reader untuk mengetahui nilai IC₅₀ setiap 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 (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)

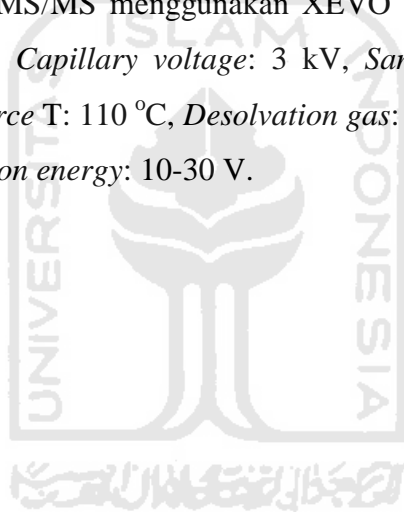
B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi control negatif (sel + media kultur)

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

4.5.10 Analisis dengan LC-MS/MS

Fraksi daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang aktif terhadap sel kanker dilakukan uji untuk mengetahui kandungan senyawanya dengan LC-MS/MS UPLC-QToF-MS/MS System (*Waters*). Pengolahan data menggunakan *software* MassLynk versi 4.1. Kolom yang digunakan Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1x50 mm, injeksi 5 μ L, 40 °C, eluennya A: H₂O+0.1% *formic acid*, B: *Acetonitrile* + 0.1% *formic acid*. Proses MS - 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*: 110 °C, *Desolvation gas*: 500 L/h, *Cone gas*:16 L/h, *Collision gas*: argon, *collision energy*: 10-30 V.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi Tumbuhan

Determinasi merupakan pengklasifikasian makhluk hidup berdasarkan ciri-ciri baik morfologi maupun anatominya (Steenis, 2008). Determinasi tumbuhan pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui spesies dari tanaman jambu biji yang digunakan sebagai sampel. Uji determinasi tumbuhan ini dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM. Berdasarkan hasil determinasi, diketahui bahwa sampel tanaman jambu biji ini berasal dari kingdom : *plantae*, divisi : *tracheophyta*, kelas : *magnoliopsida*, ordo : *myrtales*, familia : *myrtaceae*, genus : *psidium*, species : *psidium guajava* L., dengan nama lokal : jambu batu, jambu biji, jambu klutuk, dan giawas. Hasil uji determinasi disajikan pada Lampiran 1.

5.2 Persiapan Sampel

Dalam melakukan preparasi sampel daun jambu biji ada tiga langkah yang telah dilakukan, yaitu : pencucian, pengeringan, dan penghalusan. Pencucian ini dilakukan agar sampel terbebas dari kotoran yang dapat mengganggu aktivitas dan kandungan senyawanya. Pengeringan dilakukan bertujuan untuk menghilangkan kadar air yang terdapat pada sampel setelah dilakukan pencucian sehingga proses ekstraksi dapat menjadi lebih optimal dan juga menghindari tumbuhnya jamur pada sampel agar sampel yang digunakan dapat bertahan lama. Daun jambu biji dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terpapar sinar matahari langsung untuk menghindari kerusakan komposisi kimia pada sampel daun. Terakhir adalah penghalusan sampel menjadi serbuk, bertujuan untuk membuat permukaan sampel menjadi lebih besar. Permukaan yang besar akan mempermudah kontak langsung antara sampel dan pelarutnya sehingga dapat memperbesar rendemen.

5.3 Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Sampel diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi dengan pengulangan (remaserasi). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu etanol didasarkan pada pemilihan variasi pelarut yang sesuai. Pelarut tersebut memiliki titik didih yang cukup rendah, dapat melarutkan senyawa yang sesuai dengan cukup cepat serta memiliki harga yang terjangkau (Guenther, 2006).

Alkohol merupakan pelarut serba guna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan (Harborne, 1987). Kelarutan terhadap air dari pelarut tersebut juga semakin tinggi dengan semakin tingginya tingkat kepolaran (Adijuwana, 1989; Sudarmadji dkk., 2007). Pada penelitian ini digunakan pelarut etanol 96%. Penggunaan etanol 96% ini bertujuan supaya mendapatkan rendemen dan kadar dari senyawa metabolit sekunder yang besar, sesuai dengan penelitian (Agustin dan Ismiyanti, 2005)

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi, karena metode tersebut merupakan salah satu metode umum dalam proses ekstraksi bahan alam, selain itu metode maserasi lebih sederhana dan mudah. Menurut Harmita (2008), maserasi merupakan cara sederhana yang dapat dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat-zat aktif sehingga zat aktif akan larut. Maserasi dilakukan selama 24 jam, kemudian larutan disaring menggunakan penyaring *Buchner* dan diperoleh filtrat dengan warna hijau kehitaman. Kemudian filtrat dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Hasil maserasi dari serbuk daun jambu biji ditunjukkan pada Tabel 2 dengan perhitungan rendemen berat ekstrak pekat pada Lampiran 4.1.

Tabel 2. Hasil maserasi dari serbuk daun jambu biji

Pelarut	Perubahan warna filtrate	Warna ekstrak pekat	Serbuk (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/b)
Etanol 96%	Hijau	Hijau pekat	750	263,935	35,19%

5.4 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu proses pemisahan senyawa atau komponen dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolaran. Pada penelitian ini fraksinasi dilakukan menggunakan pelarut non polar yaitu n-heksana. Proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom adsorpsi. Menurut Underwood (2002), Pemisahan kromatografi kolom adsorpsi didasarkan pada adsorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas berbeda-beda terhadap permukaan fase diam. Kromatografi kolom teradsorpsi termasuk pada cara pemisahan cair padat, substrat padat bertindak sebagai fase diam yang sifatnya tidak larut dalam fase cair, fase Bergeraknya adalah cairan atau pelarut yang mengalir membawa komponen campuran sepanjang kolom. Fraksi yang diperoleh dipekatkan kembali dengan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat. Selanjutnya didapat rendemennya ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. 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	Hijau Kekuningan	263,935	14	5,32

Ekstrak pekat fraksi n-heksana digunakan sebagai sampel uji penapisan fitokimia dengan penambahan reagen dan kemudian dilakukan formulasi untuk pembuatan SNEDDS.

5.5 Uji Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia pada penelitian ini meliputi pengujian terhadap golongan senyawa golongan alkaloid, flavonoid, fenolik, dan terpenoid/steroid. Uji fitokimia merupakan salah satu pengujian secara kualitatif yang bertujuan mengidentifikasi

kandungan senyawa aktif dalam sampel. Hasil penapisan fitokimia terhadap fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji fitokimia fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji

Uji Fitokimia	Pereaksi	Perubahan yang Terjadi	Hasil Uji
Alkaloid	Dragendorff	Tidak terbentuk warna jingga	-
Flavonoid	HCl dan Mg	Terbentuk warna hijau kehitaman	+
Fenolik	FeCl ₃	Terbentuk warna hitam	+
Terpenoid	Liebermann-Burchard	Terbentuk cincin kecoklatan	+
Steroid	Liebermann-Burchard	Terbentuk cincin biru kehijauan	+

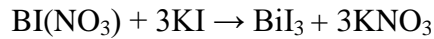
Keterangan : (+) = ada; (-) = tidak ada

5.5.1 Uji alkaloid

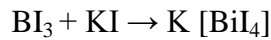
Uji adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan warna jingga pada pereaksi *Dragendorff*. Perubahan warna tersebut terjadi karena menurut Svehla (1990) nitrogen pada senyawa alkaloid membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan K^+ sehingga menghasilkan warna kuning yang merupakan kalium-alkaloid. Dimana, pada pembuatan pereaksi *Dragendorff* bismut nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis. Selanjutnya ion Bi^{3+} dari bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam Bismut (III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat yang akan bereaksi dengan nitrogen pada senyawa alkaloid.

Pada fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) tidak menunjukkan adanya perubahan warna setelah penambahan pereaksi *Dragendorff* sehingga menunjukkan bahwa dalam fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) tidak terdapat gugus N pada alkaloid

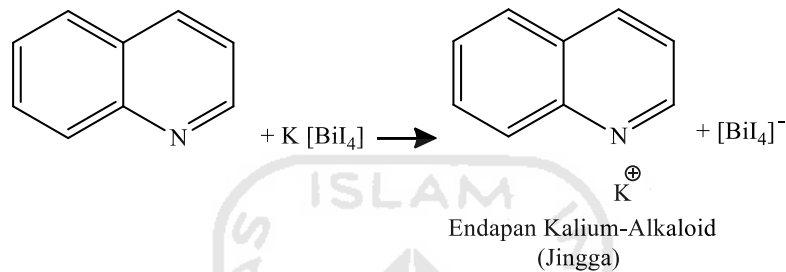
yang berikatan kovalen dengan ion K^+ sehingga membentuk garam kalium alkaloid yang berwarna jingga. Reaksi pada uji *Dragendorff* ditunjukkan pada Gambar 18.



Coklat



Kalium tetraiodobismutat



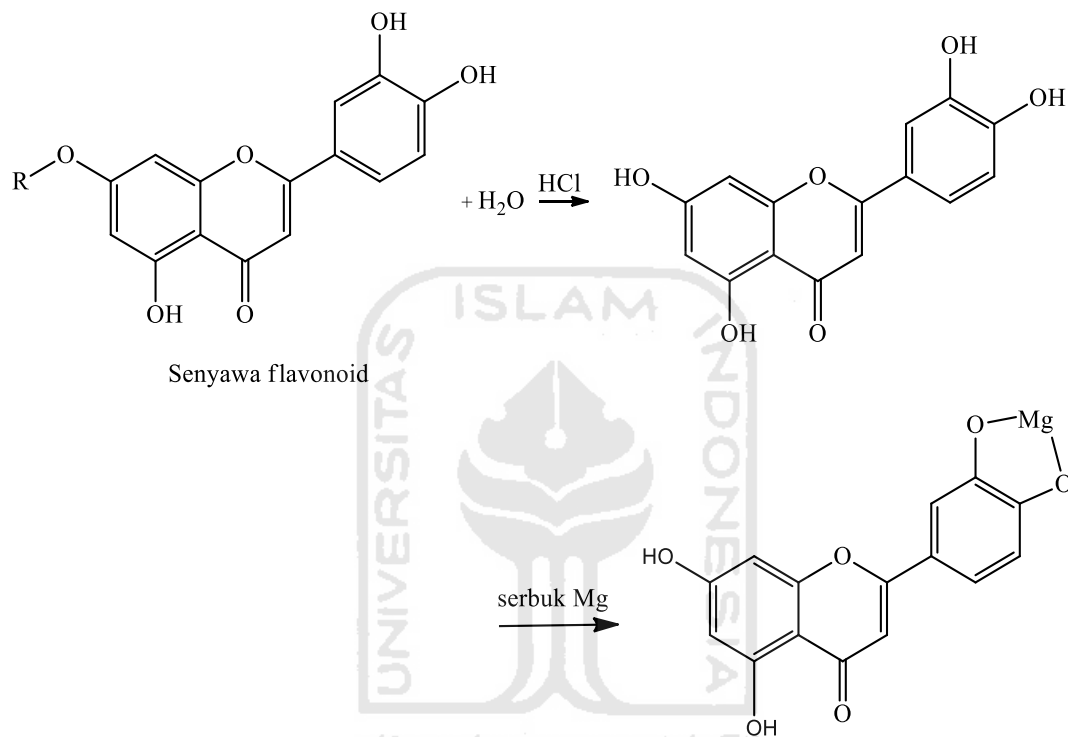
Gambar 18. Reaksi uji alkaloid dengan pereaksi *Dragendorff* (Miroslav, 1971)

5.5.2 Uji flavonoid

Uji senyawa flavonoid pada penelitian ini dilakukan dengan pereaksi *Wilstater* yaitu dengan penambahan asam klorida (HCl) pekat dan serbuk magnesium (Mg). Karena menurut Geissman (1962) senyawa flavonoid memberikan warna khas ketika bereaksi dengan pereaksi flavonoid, seperti NaOH, HCl atau H_2SO_4 pekat sehingga keberadaannya dalam tumbuhan dapat diketahui. Namun warna yang muncul setelah penambahan pereaksi flavonoid hanya memberikan gambaran umum tentang turunan flavonoid (Geissman, 1962).

Penambahan HCl pekat dalam uji flavonoid pada pereaksi *Wilstater* dimaksudkan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang elektrofilik. Glikosida berupa gula yang biasa dijumpai yaitu glukosa, galaktosa dan ramnosa. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat ini menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol dan xanton (Marliana, 2005). 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 flavanol atau flavanon, warna hijau diberikan oleh senyawa glikon atau glikosida. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat ditunjukkan pada Gambar 19.



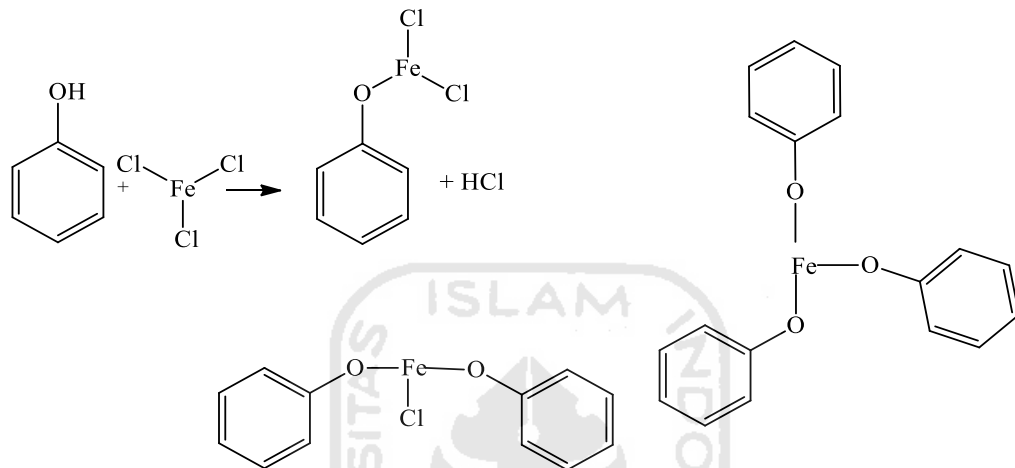
Gambar 19. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat (Marliana, 2005)

Berdasarkan uji flavonoid yang telah dilakukan diketahui bahwa fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) memberikan hasil berupa larutan berwarna hijau kehitaman yang menandakan bahwa adanya senyawa flavonoid berupa glikon atau glikosida.

5.5.3 Uji fenolik

Uji adanya fenolik ditandai dengan warna hitam pada larutan setelah ditetesi FeCl_3 . Menurut Jork dkk., (1990) fenolik dengan larutan FeCl_3 akan membentuk kompleks yang berwarna biru sampai hitam.

Dari hasil uji fenolik yang telah dilakukan menunjukkan terbentuk warna hitam pada larutan sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) mengandung senyawa metabolit sekunder berupa fenolik. Reaksi pada uji fenolik ditunjukkan pada Gambar 20.



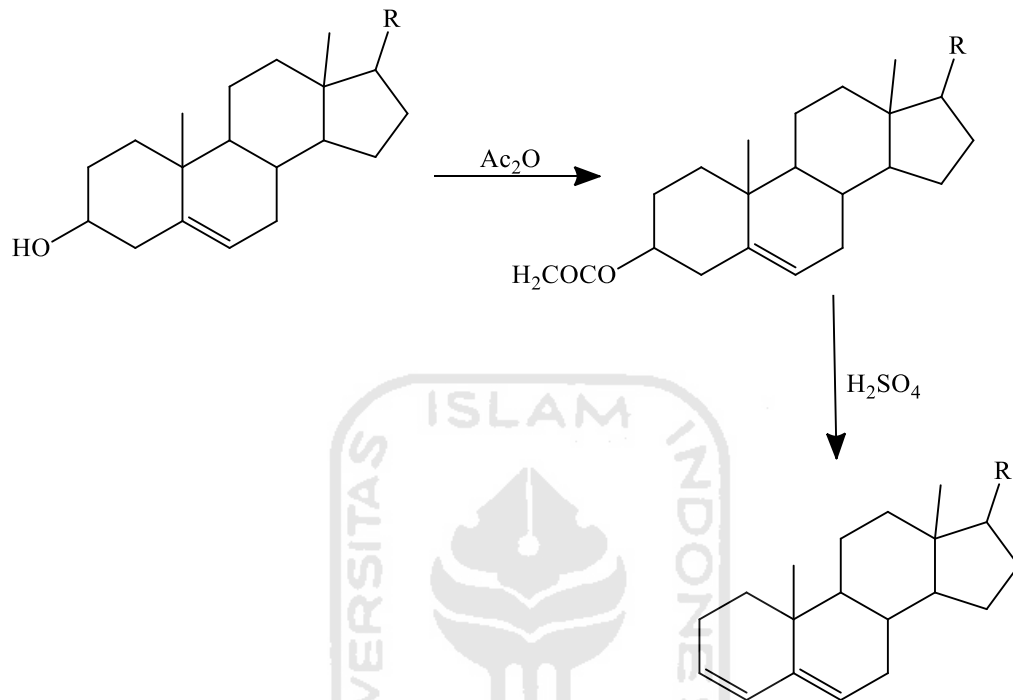
Gambar 20. Reaksi Uji Fenolik

5.5.4 Uji terpenoid/steroid

Untuk identifikasi senyawa golongan terpenoid dan steroid menggunakan pereaksi yang sama yaitu Liebermen-Burchard yaitu berupa campuran antara asetat anhidrida dengan H₂SO₄ pekat. Reaksi yang terjadi pada uji terpenoid/steroid ditunjukkan pada Gambar 21.

Hasil positif terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin coklat atau violet pada perbatasan larutan, sedangkan apabila mengandung steroid maka terbentuk cincin biru kehijauan pada batas larutan ketika ditambahkan H₂SO₄. Pada pengujian Terpenoid dan steroid, analisis senyawa didasarkan pada kemampuan senyawa tersebut membentuk warna dengan H₂SO₄ pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat (Ciulei, 1984). Perubahan warna terjadi dikarenakan adanya oksidasi golongan senyawa terpenoid/steroid dengan membentuk ikatan rangkap terkonjugasi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) positif mengandung terpenoid dengan

terbentuknya cincin berwarna kecoklatan dan steroid dengan terbentuknya cincin berwarna biru kehijauan.



Gambar 21. Reaksi Uji Steroid/Terpenoid

5.6 Karakterisasi dengan PSA

Tabel 5. Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel dengan PSA

Formulasi	Konsentrasi (%)	Ukuran Partikel (nm)	<i>Polidispers Index</i>	<i>Zeta Potensial</i> (mV)
20:60:20	40%	114,5	0.381	-71,2
20:60:20	60%	181,3	0,545	-64,3
20:60:20	80%	161,9	0.522	-78,1

5.6.1 Ukuran dan distribusi nanopartikel

Teknologi nanopartikel saat ini telah menjadi tren baru dalam pengembangan sistem penghantaran obat. Partikel atau globul pada skala nanometer memiliki sifat fisik yang khas dibandingkan dengan partikel pada ukuran yang lebih besar terutama

dalam meningkatkan kualitas penghantaran senyawa obat. Beberapa kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal (Buzea dkk., 2007), 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. Kelebihan lain dari nanopartikel adalah adanya peningkatan afinitas dari sistem karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama (Kawashima, 2000).

Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) dengan metode SNEDDS pada konsentrasi 40%, 60%, dan 80% menunjukkan bahwa ukuran partikel dari tiga sediaan tersebut termasuk ke dalam kategori nanopartikel, hal ini dikarenakan sebuah partikel dapat dikatakan nano apabila memiliki ukuran partikel diantara 0,1 hingga 200 nm dan partikel umumnya tidak menyatu (Shet dkk., 2015). Selain termasuk kedalam kategori nanopartikel, dapat dijelaskan juga bahwa ukuran partikel pada konsentrasi 40%, 60%, dan 80% dapat dikatakan sebagai ukuran nano yang ideal. Hal ini dikarenakan ukuran partikel dari suatu ukuran nano yang ideal berada pada tidak lebih dari 200 nm atau berada disekitar 200 nm (Balakumar dkk., 2013).

Berdasarkan penelitian Sewanggara (2019) menjelaskan bahwa adanya pengaruh ukuran partikel disebabkan oleh peningkatan konsentrasi ekstrak dan minyak (capryoll). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak kulit kopi dan minyak yang digunakan mengakibatkan semakin besar ukuran partikel yang didapatkan. Selain itu, semakin tingginya konsentrasi emulsifier juga dapat menurunkan ukuran butiran. Hasil penelitian Mc-Clements (2011) pada pembuatan nanoemulsi minyak jagung dengan metode homogenisasi tekanan tinggi menunjukkan ukuran diameter butiran menurun dari 131 nm menjadi 110 nm dengan peningkatan konsentrasi Tween 20 dari 1 % menjadi 10%. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi emulsifier, maka permukaan butiran yang terbentuk akan

semakin dilindungi selama proses homogenisasi dan permukaan butiran akan lebih cepat diselimuti oleh lapisan molekul emulsifier selama proses homogenisasi. Jika dibandingkan dengan ukuran partikel pada konsentrasi 40%, 60%, dan 80% yang didapat menunjukkan hasil yang fluktuatif. Hal ini dapat disebabkan karena proses *pipetting* yang kurang presisi sehingga bisa mempengaruhi volume dari ekstrak, minyak, dan emulsifier yang digunakan.

Nilai Indeks Polidispersitas (PI) dalam nanoemulsi menunjukkan kualitas kehomogenan atau kestabilan suatu ukuran partikel. Semakin kecil nilai PI yaitu mendekati 0, maka menunjukkan ukuran droplet yang semakin seragam dan homogen (Haque, 2015). Nilai PI akan berlaku ketika distribusi diameter droplet nanoemulsi berkisar antara 0,01-0,7 (Wahyuningsih dan Putranti, 2015). Kisaran ukuran Nilai PI dalam sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) dengan metode SNEDDS pada masing-masing formula menunjukkan hasil dibawah 0,7 yang masih dapat diterima karena distribusi ukuran *droplet* yang seragam dan homogen. Selain itu, dalam sistem penghantaran obat, semakin kecil ukuran partikel maka akan menyebabkan semakin besar luas permukaan antarmuka yang disediakan untuk penyerapan obat (Balakumar dkk., 2013).

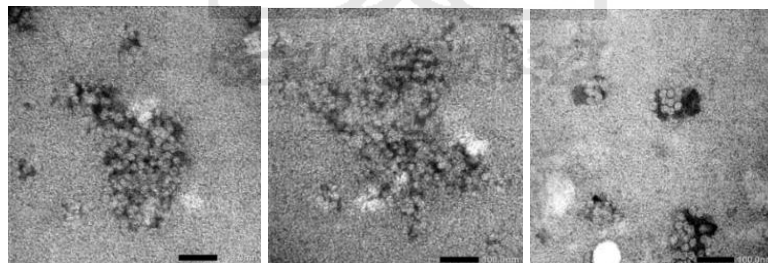
5.6.2 Zeta potensial

Zeta potensial biasanya digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan nanopartikel, berkaitan dengan interaksi elektrostatik dari material nanopartikel tersebut. Interaksi elektrostatik akan menentukan kecenderungan agregasi dan tolak menolak yang berdampak pada kestabilan ukuran partikel dari sediaan obat yang telah dibuat. Meningkatnya muatan elektrostatik di antara gumpalan-gumpalan akan mencegah penggabungan partikel dalam emulsi. Sebaliknya, pengurangan muatan elektrostatik dapat menyebabkan pemisahan fasa. Muatan elektrostatik harus dapat dikendalikan dengan melihat nilai *zeta potensial* (Vaughn dan Williams, 2007).

Pengukuran *zeta potensial* sangat penting dilakukan untuk mengetahui kestabilan ukuran partikel sediaan obat yang telah dibuat dalam ukuran nanopartikel tersebut.. Nanopartikel dengan nilai *zeta potensial* lebih kecil dari -30 mV dan lebih besar dari +30mV memiliki stabilitas lebih tinggi (Murdock dkk., 2008). Sistem dispersi dengan nilai *zeta potensial* yang rendah lebih mudah membentuk agregat seiring dengan gaya Van der Waals dalam interaksi partikel (Stefeld dkk., 2012). Tabel 4. Menunjukkan bahwa nilai *zeta potensial* dari berbagai variasi konsentrasi ekstrak tidak mendekati 0, sehingga mengindikasikan bahwa kestabilan fasa pada sediaan nanopartikel cukup tinggi (Balakumar,2013).

5.7 Karakterisasi dengan TEM

Pengamatan menggunakan TEM dilakukan untuk mengkonfirmasi morfologi partikel dari nanoemulsi yang dibuat. Morfologi partikel dari nanoemulsi perlu diketahui karena jika bentuk partikel nanoemulsi yang kurang sferis akan mempermudah kontak antar partikel menjadi berujung pada agregasi (Couvreur dkk., 2002). Melalui karakterisasi menggunakan TEM, diperoleh bentuk globul sediaan nanoemulsi sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 22.



Gambar 22. Hasil uji TEM pada 3 spot dengan perbesaran 100 nm

Gambar 22 dapat terlihat bahwa globul yang berada di dalam sistem nanoemulsi memiliki bentuk yang relatif sferis. Globul yang berbentuk sferis ini dapat dilihat pada citra yang berwarna putih. Sedangkan citra yang berwarna hitam juga merupakan globul nanoemulsi, namun globul-globul tersebut menumpuk atau tumpang tindih antara satu dengan yang lainnya sehingga memberikan warna hitam ketika diamati dengan TEM. Penumpukan globul-globul nanoemulsi ini bisa

disebabkan karena konsentrasi sediaan SNEDDS yang masih tinggi ketika diamati dengan TEM atau karena ekstrak yang masih belum masuk kedalam sistem globul nanoemulsinya. Bentuk globul yang sferis ini akan menghalangi terjadinya kontak antar partikel sehingga akan sulit terjadi agregasi.

Selain bentuk globul, dari Gambar 21 juga dapat dilihat bahwa distribusi ukuran globul cukup merata. Hal ini sesuai dengan nilai indeks polidispersitas yang rendah dan mendekati 0. Semakin kecil nilai indeks polidispersitas yaitu mendekati 0, maka menunjukkan ukuran droplet yang semakin seragam dan homogen (Haque, 2015).

5.8 Uji *in-vitro* dengan SNEDDS

Pengujian antikanker ini dilakukan untuk mengetahui potensi lebih lanjut dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dalam beberapa variasi konsentrasi yaitu 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Penggunaan beberapa formulasi tersebut bertujuan untuk mengidentifikasi formulasi mana yang memiliki aktivitas dan efektifitas yang paling baik terhadap sel kanker payudara.

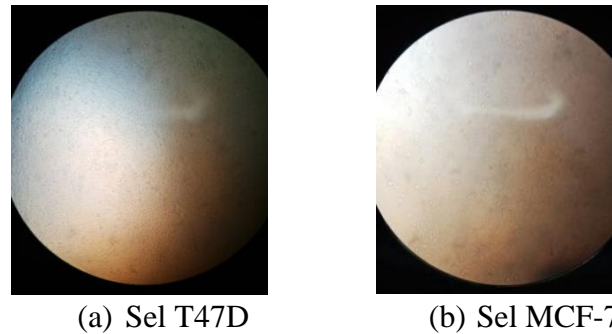
Uji aktivitas antikanker ini dilakukan secara *in-vitro* menggunakan sel kanker payudara T47D dan MCF-7. Penelitian ini dilakukan berdasarkan uji bioaktivitas peneliti terdahulu yang menyebutkan bahwa ekstrak daun jambu biji memiliki aktivitas sebagai agen pencegahan kanker (Nita, 2019). Dimana pada penelitian sebelumnya hanya dilakukan uji aktivitas berupa antikanker yang diujikan pada ekstrak pekat fraksi etanol, etil asetat dan n-heksana dengan modifikasi konsentrasi larutan uji, dari penelitian tersebut diperoleh 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 $\mu\text{g/mL}$. Sehingga pada penelitian ini aktivitas antikanker diujikan pada sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang telah dibuat dalam tiga formulasi yaitu 40 %; 60%; dan 80% dengan modifikasi konsentrasi larutan uji. Pengujian dilakukan

secara *in-vitro* menggunakan metode MTT (*Microculture tetrazolium*). Metode MTT merupakan metode dalam pengujian aktivitas sel terhadap perubahan warna atau reaksi kolorimetri pada bioreduksi garam tetrazolium ke formazan (Goodwin dkk., 1995). Metode MTT merupakan metode yang cepat, sensitif, membutuhkan sedikit bahan uji serta paling umum digunakan dalam pengujian secara *in vitro* (Freshney, 1992).

Tahapan pengujian aktivitas antikanker secara *in-vitro* yaitu penyiapan sel kanker, panen sel, uji sitotoksitas, pemberian reagen MTT, dan pembacaan absorbansi. Penyiapan sel dilakukan melalui beberapa tahap yaitu mengaktifkan sel serta menumbuhkan kembali hingga konfluen. Konfluensi sel adalah tumbuh homogenya atau meratanya sel sebagai sel *monolayer* yang menutupi *cover glass*.

Pada tahap panen sel yaitu terjadi penumbuhan dan pembiakan sel dengan penambahan media kultur. Prinsipnya adalah 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 sel seperti asam amino, vitamin, glukosa, fungison (antijamur), dan serum. Serum yang digunakan adalah FBS (Fetal Bovine Serum) berasal dari serum sapi mengandung hormon yang memacu pertumbuhan sel (Freshney, 1998) sedangkan untuk sel MCF-7 menggunakan medium DMEM.

Pada tahap panen sel ditambahkan tripsin tujuannya adalah untuk melepaskan interaksi antara sel dengan wadah. Penghitungan Sel Kanker dilakukan 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 dan MCF-7 adalah 142×10^4 /mL, $60,5 \times 10^4$ /mL. Morfologi Sel T47D dan MCF-7 sebelum dilakukan *treatment* (a) T47D dan (b) MCF-7 ditunjukkan pada Gambar 23.



Gambar 23. Morfologi Sel T47D dan MCF-7 sebelum dilakukan uji *treatment* (a) T47D dan (b) MCF-7

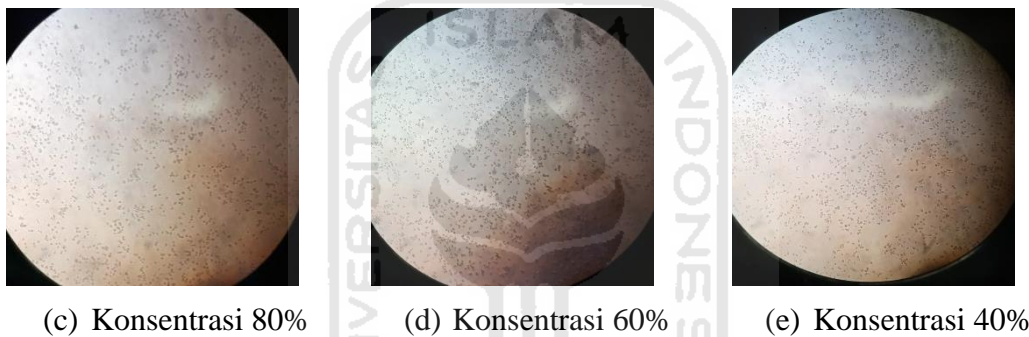
Tahap uji sitotoksitas meliputi subkultur sel, preparasi sampel dan *treatment* sel. Pada tahapan subkultur sel akan dilakukan pemindahan sel dari kondisi konfluen ke tempat yang masih kosong. Tujuan subkultur adalah agar sel yang digunakan tumbuh secara maksimal pada medianya (CCRC, 2009).

Pada tahap panen sel, sel dikultur kembali dan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kontrol sel, kontrol media dan kelompok uji. Kelompok uji terdiri formulasi dengan konsentrasi 80%; 60%; 40% dan uji terhadap senyawa Capryol, tween 20, dan PEG (*Poli Ethylen Glikol*). Suspensi sel kemudian dipipet 100 μL kedalam plat 96 kecuali kelompok kontrol media. Selanjutnya plat diinkubasi di dalam inkubator CO_2 5%/37 $^\circ\text{C}$ selama 24 jam agar sel menempel pada dasar plat. Inkubasi digunakan agar sel mencapai fase logaritmik yaitu fase dimana sel berada pada pertumbuhan yang optimum, fase logaritmik ditandai dengan keadaan sel yang konfluen 80% menutupi permukaan wadah medium (CCRC, 2008).

Tahap selanjutnya adalah preparasi sampel meliputi pelarutan sampel dan pembuatan larutan seri konsentrasi. Pelarutan sampel dilakukan dengan pelarut dimetilsulfoksida (DMSO) yang merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah fraksi n-heksanadari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). Hal pertama yang dilakukan yaitu membuat larutan stok dengan menimbang 10 mg sampel kemudian dilarutkan dengan DMSO 100 μL . 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 serta media DMEM untuk sel MCF-7. Selanjutnya dipipet 100 μL larutan uji kedalam sumuran masing-masing 4 kali replikasi untuk setiap konsentrasi kecuali untuk kontrol sel hanya dipipet dengan media 100 μL . Kemudian plat diinkubasi kembali dalam inkubator CO_2 5%/37 $^\circ\text{C}$ selama kurang lebih 24 jam.

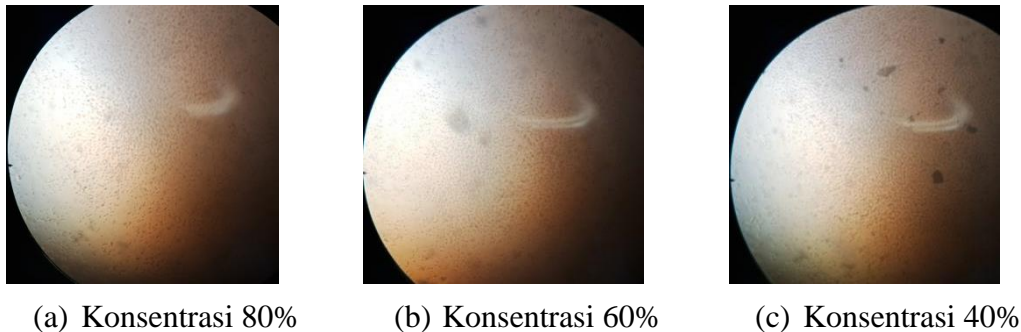
Pengamatan morfologi sel setelah *treatment* dilakukan di bawah mikroskop *inverted* pada setiap sampel untuk sel T47D. Hal ini dapat ditunjukkan pada Gambar 24.



Gambar 24. Morfologi sel T47D setelah dilakukan *treatment*
(a) konsentrasi 80%, (b) konsentrasi 60%, (c) konsentrasi 40%

Gambar 24 menunjukkan morfologi dari hasil *treatment* setiap konsentrasi hampir sama. Dimana pada konsentrasi 80%, 60%, dan 40% terlihat struktur sel menjadi mengkerut kecil-kecil terlihat adanya kerusakan inti sel. Kesamaan morfologi ini dikarenakan kandungan senyawa yang sama dari masing-masing konsentrasi, sehingga tidak ada perbedaan interaksi antara konsentrasi yang satu dengan yang lainnya.

Pengamatan morfologi sel setelah *treatment* dilakukan di bawah mikroskop *inverted* pada setiap sampel juga dilakukan untuk sel MCF-7. Hal ini dapat ditunjukkan pada Gambar 25.



Gambar 25. Morfologi sel MCF-7 setelah dilakukan *treatment*

(a) konsentrasi 80%, (b) konsentrasi 60%, (c) konsentrasi 40%

Gambar 25 menunjukkan morfologi dari hasil *treatment* setiap konsentrasi hampir sama. Dimana pada konsentrasi 80%, 60%, dan 40% terlihat struktur sel menjadi mengkerut kecil-kecil terlihat adanya kerusakan inti sel. Kesamaan morfologi ini dikarenakan kandungan senyawa yang sama dari masing-masing konsentrasi, sehingga tidak ada perbedaan interaksi antara konsentrasi yang satu dengan yang lainnya.

Hasil *treatment* tidak dapat diamati secara kasat mata, namun setelah penambahan reagen MTT dapat diamati karena terjadi reaksi kolorimetri dengan mikroskop *inverted*. Pengujian menggunakan larutan MTT (*4,5-dimethylthiazol-2-yl*)-*2,5-diphenyltetrazolium bromide*) dilakukan dengan memasukkan larutan ini ke dalam setiap 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). Kemudian reaksi dihentikan menggunakan reagen *stopper* yaitu SDS 10%. Reagen *stopper* bersifat detergenik berfungsi melarutkan kristal formazan yang direduksi oleh sistem reduktase sel. Kemudian plat diinkubasi dalam suhu kamar dalam waktu 24 jam. Selanjutnya absorbansi diukur menggunakan ELISA *Reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Penggunaan panjang gelombang 595 nm karena warna yang tampak pada larutan adalah ungu kebiruan yang akan menyerap warna kuning dari spektrum sinar tampak (Effendy, 2007).

Pada penelitian ini dapat teramati perubahan warna yang terjadi dalam *plate* setelah proses MTT secara langsung dan jelas. Pada sel kanker T47D dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 80%; 60%; dan 40% dengan konsentrasi 1000; 500; 250 $\mu\text{g/mL}$ memiliki warna kuning. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada ketiga konsentrasi tersebut, sel kanker telah mati yang artinya tidak ada enzim reduktase yang dihasilkan dalam mitokondria sel yang mereduksi garam tetrazolium menjadi kristal formazan yang berwarna ungu. Sedangkan pada konsentrasi 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan warna ungu, hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat aktivitas antikanker dari masing-masing konsentrasi dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) pada konsentrasi tinggi.

Namun pada sel kanker MCF-7 dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 80%; 60%; dan 40% dengan konsentrasi 1000 dan 500 $\mu\text{g/mL}$ memiliki warna kuning. Sedangkan pada konsentrasi 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan warna ungu, hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat aktivitas antikanker dari masing-masing konsentrasi dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) pada konsentrasi tinggi.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut dapat diketahui bahwa ada hubungan antara aktivitas sel hidup dan warna yang dihasilkan (Mosmann dkk., 1983). Semakin ungu maka semakin banyak sel hidup karena sel tersebut yang melakukan reaksi metabolisme sehingga warna ungu semakin pekat dan jumlah kristal formazan semakin banyak. Sehingga terdapat hubungan antara absorbansi dengan warna ungu yang dihasilkan dimana jika semakin pekat warna ungu maka absorbansinya tinggi. Metode MTT *Assay* merupakan metode dalam uji sitotoksitas yang sering digunakan 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). Menurut Meiyanto (2008)

pada senyawa campuran dapat menunjukkan aktivitas antikanker yang dapat menghambat proliferasi sel serta sangat potensial sebagai agen kemoprevensi jika nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, yaitu senyawa yang dapat mencegah proses karsinogenesis yang memicu kanker. Berdasarkan hasil pengolahan data, diperoleh nilai IC_{50} tiap sampel disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Nilai IC_{50} uji aktivitas antikanker

Sampel	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	
	T47D	MCF-7
Konsentrasi 80%	129	214
Konsentrasi 60%	115	191
Konsentrasi 40%	113	90

Menurut Rahmawati dkk (2013) suatu ekstrak dapat dikatakan memiliki potensi antikanker jika 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 jika memiliki nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} yang kecil menunjukkan bahwa ekstrak dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dimana, jika dengan konsentrasi yang kecil memiliki daya penghambatan yang besar sehingga dapat dikatakan ekstrak tersebut sangat efektif. Sehingga berdasarkan Tabel 5 diperoleh informasi bahwa sediaan nanopartikel fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan konsentrasi 80%; 60%; dan 40% memiliki aktivitas yang kurang aktif terhadap sel T47D, sedangkan sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan konsentrasi 80% dan 60% memiliki aktivitas yang kurang aktif terhadap sel MCF-7, dan pada konsentrasi 40% memiliki aktivitas yang *moderate* aktif terhadap sel MCF-7.

Hasil IC_{50} menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dari sediaan maka nilai IC_{50} -nya juga semakin besar. Perbedaan aktivitas dari setiap sediaan konsentrasi tersebut dapat diduga dari ukuran partikel masing-masing sediaan dan bukan dari kandungan senyawa yang terdapat didalamnya, karena pada penelitian ini sampel yang digunakan untuk membuat sediaan tersebut berasal dari fraksi yang sama,

sehingga dapat diduga bahwa antara sediaan satu dengan sediaan lainnya memiliki kandungan senyawa yang sama. Berikut adalah data ukuran partikel dan IC₅₀ uji aktivitas antikanker payudara dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Ukuran partikel dan nilai IC₅₀ uji aktivitas antikanker payudara

Sampel	Ukuran Partikel	Nilai IC₅₀ Sel T47D	Nilai IC₅₀ Sel MCF-7
Konsentrasi 80%	161,9 nm	129 µg/mL	214 µg/mL
Konsentrasi 60%	181,3 nm	115 µg/mL	191 µg/mL
Konsentrasi 40%	114,5 nm	113 µg/mL	90 µg/mL

Berdasarkan Tabel 7, konsentrasi sampel tidak berbanding lurus dengan ukuran partikel. Hasil dari ukuran partikel yang fluktuatif ini disebabkan karena proses *pipetting* yang kurang presisi sehingga bisa mempengaruhi volume dari ekstrak, minyak, dan emulsifier yang digunakan. Sesuai dengan penelitian Sewanggara (2019) menjelaskan bahwa adanya pengaruh ukuran partikel disebabkan oleh peningkatan konsentrasi ekstrak dan minyak (capryoll). Semakin besar konsentrasi ekstrak kulit kopi dan minyak yang digunakan mengakibatkan semakin besar ukuran partikel yang didapatkan. Selain itu, semakin tingginya konsentrasi emulsifier juga dapat menurunkan ukuran butiran. Hasil penelitian Mc-Clements (2011) pada pembuatan nanoemulsi minyak jagung dengan metode homogenisasi tekanan tinggi menunjukkan ukuran diameter butiran menurun dari 131 nm menjadi 110 nm dengan peningkatan konsentrasi Tween 20 dari 1 % menjadi 10%. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi emulsifier, maka permukaan butiran yang terbentuk akan semakin dilindungi selama proses homogenisasi dan permukaan butiran akan lebih cepat diselimuti oleh lapisan molekul emulsifier selama proses homogenisasi.

Jika diasumsikan bahwa ukuran partikel berbanding lurus dengan konsentrasi sampel, maka secara keseluruhan dapat diambil kesimpulan bahwa ukuran partikel berpengaruh terhadap aktivitas antikanker payudara. Semakin kecil ukuran partikel

dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) maka aktivitas antikanker payudara terhadap sel T47D dan MCF-7 semakin baik.

5.8.1 Hasil pengujian aktivitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D

Setelah dilakukan uji maka didapatkan hasil pengujian aktivitas antikanker sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel kanker T47D berupa % viabilitas sel, dimana viabilitas sel merupakan nilai yang menunjukkan jumlah sel yang masih hidup. Hasil pengujian disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil pengujian aktivitas antikanker sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D

Fraksi	Konsentrasi($\mu\text{g/mL}$)	Viabilitas sel (%)
80%	1000	-1,11
	500	-0,56
	250	0
	125	60,51
	62,5	81,80
60%	1000	-1,67
	500	-0,68
	250	0,43
	125	44,61
	62,5	85,33
40%	1000	-0,74
	500	0,49
	250	0,56
	125	50,43
	62,5	79,08

*Perhitungan analisa viabilitas sel dan grafik uji sitotoksitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) disajikan pada Lampiran 2.4.

Berdasarkan data pada Tabel 8 menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama yaitu 62,5 $\mu\text{g/mL}$, sediaan dengan konsentrasi 80% memiliki viabilitas sel sebesar 81,80% yang artinya sel yang hidup masih lebih dari 50%. Sedangkan pada sediaan

dengan konsentrasi 60% memiliki viabilitas sel sebesar 85,33% dan sediaan dengan konsentrasi 40% memiliki viabilitas sel yang sangat rendah yaitu 79,088%. Hal ini menunjukkan pada konsentrasi tersebut yang memiliki daya hambat lebih besar adalah sediaan dengan konsentrasi 40%. Viabilitas sel berbanding lurus dengan konsentrasi. Viabilitas sel atau jumlah sel yang hidup dari ketiga sediaan pada konsentrasi yang cukup rendah tersebut menunjukkan efektivitas penghambatan yang berbeda dari tiap sediaan, sehingga dapat disimpulkan sediaan dengan konsentrasi 40% memiliki efektivitas yang lebih baik dalam menghambat sel kanker T47D dibanding sediaan lainnya. Hal ini dikarenakan menurut Rahmawati dkk., (2013) suatu ekstrak dikatakan efektif jika dapat menghambat pada konsentrasi yang rendah.

5.8.2 Hasil pengujian aktivitas antikanker sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel MCF-7

Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antikanker sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel MCF-7

Fraksi	Konsentrasi($\mu\text{g/mL}$)	Viabilitas sel (%)
80%	1000	20,09
	500	23,66
	250	53,57
	125	60,94
	62,5	68,30
60%	1000	23,88
	500	21,65
	250	37,50
	125	61,60
	62,5	71,20
40%	1000	-3,79
	500	2,68
	250	21,20
	125	39,95
	62,5	63,39

*Perhitungan analisa viabilitas sel dan grafik uji sitotoksitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) disajikan pada Lampiran 2.4.

Berdasarkan data pada Tabel 9 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 62,5 µg/mL sediaan dengan konsentrasi 80% memiliki viabilitas sel sebesar 68,30% yang artinya sel yang hidup masih lebih dari 50%. sediaan dengan konsentrasi 60% memiliki viabilitas sel sebesar 71,20% dan pada sediaan dengan konsentrasi 40% memiliki viabilitas sel paling rendah sebesar 63,39%. Hal ini menunjukkan bahwa sediaan dengan konsentrasi 40% memiliki kemampuan menghambat lebih baik dibandingkan kedua sediaan lainnya pada konsentrasi yang cukup rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa sediaan dengan konsentrasi 40% dapat menghambat pertumbuhan sel kanker MCF-7 pada konsentrasi yang cukup rendah sehingga dapat dikatakan sediaan dengan konsentrasi 40% lebih efektif dibandingkan kedua fraksi lainnya. Jika dibandingkan tingkat efektivitas dari sediaan dengan konsentrasi 40% terhadap sel T47D dan MCF-7 maka diperoleh informasi bahwa sediaan dengan konsentrasi 40% lebih efektif pada sel MCF-7, hal ini dikarenakan pada konsentrasi yang sama yaitu 62,5 µg/mL nilai viabilitas sel fraksi n-heksana pada sel MCF-7 lebih rendah dari sel T47D. Efektivitas dari ketiga sediaan terhadap sel yang sama dan yang berbeda diduga terjadi karena ukuran partikel dari masing-masing sediaan dan kedua sel yang berbeda.

Penelitian terkait penemuan obat kanker perlu dilakukan uji sitotoksik terhadap sel normal untuk mengetahui apakah senyawa yang menghambat sel kanker tersebut selektif pada sel kanker atau menyerang sel tubuh yang normal juga. Karena jika suatu obat terbaru tersebut juga menyerang sel normal maka pengembangan obat tersebut akan sia-sia. Sehingga pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksitas terhadap sel normal yaitu sel vero untuk mengetahui nilai selektivitasnya. Nilai selektivitas tersebut tujuannya untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen kemopreventif. Tahapan yang dilakukan sama seperti uji aktivitas terhadap sel kanker setiap fraksi dengan 7 variasi konsentrasi yaitu 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 µg/mL. Metode yang digunakan adalah metode MTT.

Setelah dihitung nilai IC_{50} terhadap sel kanker T47D dan MCF-7 maka dapat dihitung pula indeks selektivitasnya terhadap sel normal (vero) yaitu IC_{50} sel normal dibagi dengan IC_{50} sel kanker tersebut. Semakin tinggi angka selektivitasnya maka senyawa tersebut semakin baik. Suatu ekstrak dikatakan bersifat selektif apabila suatu senyawa mempunyai indeks selektivitas ≥ 3 , dan dikatakan bersifat tidak selektif apabila suatu senyawa mempunyai indeks selektivitas < 3 (Prayong, 2008). Berdasarkan uji yang telah dilakukan didapatkan nilai IC_{50} disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Nilai IC_{50} uji sitotoksitas terhadap sel vero

Sampel	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Konsentrasi 80%	373
Konsentrasi 60%	368
Konsentrasi 40%	351

Berdasarkan nilai IC_{50} yang dihasilkan, sediaan nanopartikel fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) tidak berbahaya bagi sel normal. Hal tersebut dapat ditunjukkan dari nilai IC_{50} yang $>100 \mu\text{g/mL}$. Jika dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Lee dkk., (2015) terhadap sel vero dari ekstrak *Psidium guajava* L. yang memiliki nilai EC_{50} sebesar $37,54 \mu\text{g/mL}$, menunjukkan bahwa nilai IC_{50} setiap fraksi pada penelitian ini lebih besar.

Nilai indeks selektivitas atau SI (*selectivity indeks*) dari sediaan nanopartikel fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Nilai SI (*selectivity indeks*) hasil uji sitotoksitas

Sampel	Nilai SI (<i>selectivity Indeks</i>)	
	T47D	MCF-7
Konsentrasi 80%	2,9	1,7
Konsentrasi 60%	3,2	1,9
Konsentrasi 40%	3,1	3,9

Berdasarkan Tabel 11 dapat diperoleh informasi bahwa ketiga fraksi memiliki nilai selektivitas atau SI (*selectivity indeks*) yang berbeda-beda. Suatu ekstrak dikatakan memiliki selektivitas yang baik jika lebih besar dari 3, sehingga dari data tersebut diketahui bahwa konsentrasi 40% memiliki selektivitas paling baik dari kedua konsentrasi lainnya terhadap sel T47D dan MCF-7. Pada konsentrasi 60% memiliki selektivitas yang baik terhadap sel T47D, akan tetapi pada sel MCF-7 menunjukkan hasil yang tidak selektif. Sedangkan konsentrasi 80% memiliki selektivitas yang kurang baik terhadap sel T47D dan MCF-7.

Hasil pengamatan pada uji sitotoksitas terhadap sel vero sebelum dan sesudah dilakukan *treatment* dilakukan dibawah mikroskop *inverted* dapat ditunjukkan pada Gambar 26 dan Gambar 27.



Gambar 26. Morfologi sel vero sebelum *treatment*



(a) Konsentrasi 80%



(b) Konsentrasi 60%



(c) Konsentrasi 40%

Gambar 27. Morfologi sel vero setelah dilakukan *treatment* (a) konsentrasi 80%, (b) konsentrasi 60%, (c) konsentrasi 40%

Gambar 26 menunjukkan morfologi dari sel vero setelah *treatment* dengan menggunakan sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu

biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 80%; 60%; dan 40%. Pada ketiga sediaan ini menunjukkan morfologi yang hampir sama antara satu dengan yang lainnya. Terjadi perubahan morfologi pada inti sel yaitu sel tampak mengkerut, mengecil sehingga menunjukkan adanya kematian dari sel vero. Namun hal tersebut hanya terjadi pada konsentrasi yang tinggi. Sedangkan, pada perlakuan dengan konsentrasi yang semakin rendah tidak tampak adanya perubahan morfologi sel vero yang menunjukkan kematian sel. Sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi dari daun jambu biji tersebut cukup aman bagi sel normal. Hal tersebut didukung dengan data IC_{50} yang didapatkan $>100 \mu\text{g/mL}$.

5.8.3 Hasil pengujian aktivitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel Vero

Tabel 12. Hasil pengujian aktivitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel Vero

Fraksi	Konsentrasi($\mu\text{g/mL}$)	Viabilitas sel (%)
80%	1000	-2,78
	500	2,22
	250	106,12
	125	123,95
	62,5	137,88
60%	1000	-7,24
	500	0,27
	250	111,97
	125	125,62
	62,5	132,87
40%	1000	-7,52
	500	5,85
	250	101,11
	125	114,48
	62,5	131,47

*Perhitungan analisa viabilitas sel dan grafik uji sitotoksitas sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) disajikan pada Lampiran 2.4.

Berdasarkan data pada Tabel 12 menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama yaitu $62,5 \mu\text{g/mL}$, sediaan dengan konsentrasi 80% memiliki viabilitas sel

sebesar 137,88% yang artinya sel yang hidup lebih dari 100% atau dengan kata lain tidak ada sel yang mati. Sedangkan pada sediaan dengan konsentrasi 60% memiliki viabilitas sel sebesar 132,87% dan sediaan dengan konsentrasi 40% memiliki viabilitas sel yang sangat rendah yaitu 131,47%. Hal ini menunjukkan pada konsentrasi tersebut yang memiliki daya hambat lebih besar adalah sediaan dengan konsentrasi 40%. Viabilitas sel berbanding lurus dengan konsentrasi. Viabilitas sel atau jumlah sel yang hidup dari ketiga sediaan pada konsentrasi yang cukup rendah tersebut menunjukkan efektivitas penghambatan yang berbeda dari tiap sediaan, sehingga dapat disimpulkan sediaan dengan konsentrasi 40% memiliki efektivitas yang lebih baik dalam menghambat sel kanker Vero dibanding sediaan lainnya.

5.8.4 Uji kualitatif pengaruh sitotoksitas Capryoll, Tween 20, dan PEG 400 terhadap sel T47D, MCF-7 dan sel Vero

Pada penelitian ini, juga dilakukan uji kualitatif pengaruh sitotoksik dari senyawa Capryoll, Tween 20, dan PEG 400 terhadap masing-masing sel yang digunakan. Tujuan dari uji ini adalah untuk melihat pengaruh dari masing-masing senyawa dalam membunuh sel yang diuji. Berdasarkan uji yang telah dilakukan, didapat hasil yang disajikan pada Tabel 13

Tabel 13. Hasil uji kualitatif pengaruh sitotoksitas Capryoll, Tween 20, dan PEG 400 terhadap sel T47D, MCF-7, dan Vero.

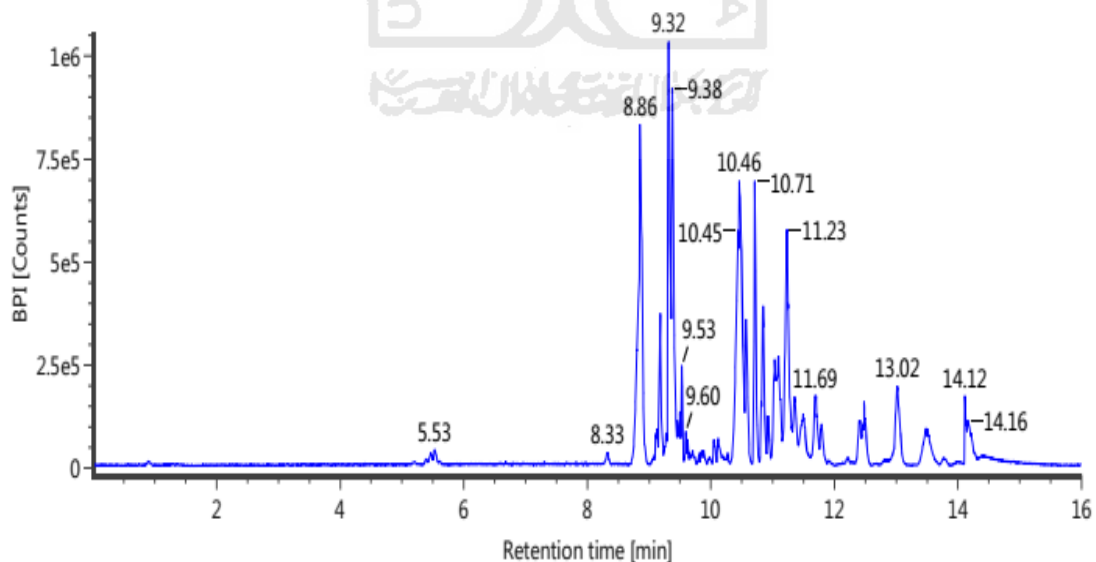
Senyawa	Absorbansi T47D	Absorbansi MCF-7	Absorbansi Vero
Capryoll	0,1	0,171	0,082
Tween 20	0,12	0,387	0,155
PWG 400	0,578	0,389	0,187

Tabel 13 menunjukkan bahwa pada senyawa Capryoll memiliki aktivitas yang baik terhadap ketiga jenis sel. Nilai absorbansi yang didapat menunjukkan bahwa Capryoll berpotensi untuk membunuh semua sel yang telah diujikan pada penelitian ini. Hal ini didukung dengan warna kuning yang dihasilkan pada ketiga sel setelah proses MTT. Tween 20 memiliki aktivitas yang baik terhadap sel T47D sesuai

dengan warna ungu yang dihasilkan, namun terhadap sel Vero dan MCF-7 aktivitasnya tidak baik sesuai dengan warna ungu yang dihasilkan setelah proses MTT. Sedangkan senyawa PEG 400 memiliki aktivitas yang tidak baik terhadap ketiga jenis sel yang telah diujikan. Hal ini sesuai dengan warna ungu yang dihasilkan pada ketiga sel setelah proses MTT. Dari nilai absorbansi yang didapat menunjukkan PEG 400 tidak berpotensi untuk membunuh ketiga sel yang diujikan.

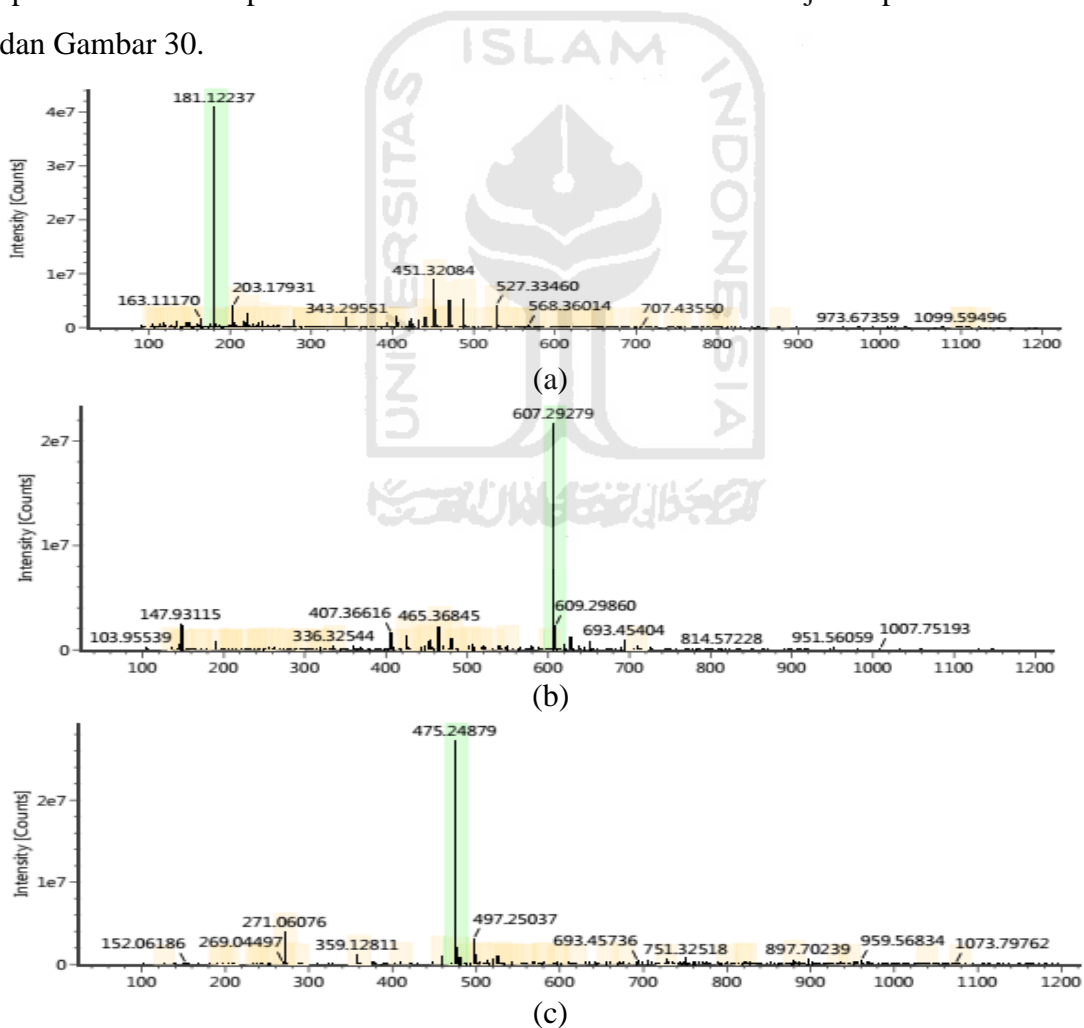
5.9 Analisis Kandungan Senyawa Terbesar dalam Fraksi N-Heksana dari Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Menggunakan LC-MS/MS

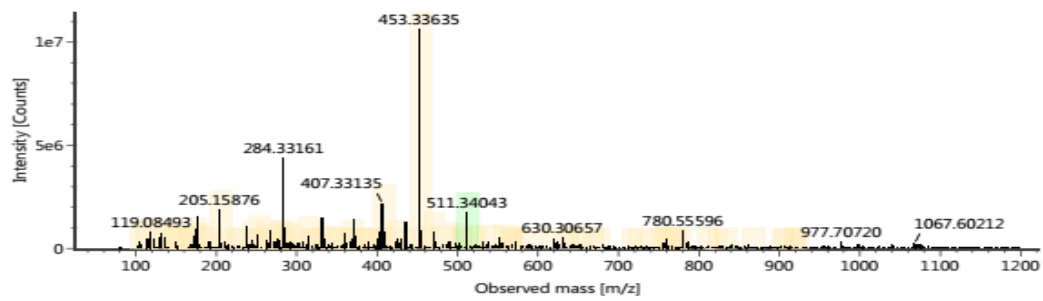
Fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang diperoleh kemudian dilakukan uji untuk mengetahui kandungan senyawanya dengan LC-MS/MS sehingga diperoleh data kromatogram dan spektrum massa. Berdasarkan hasil kromatogram, diketahui terdapat puncak senyawa dengan kromatogram tersebut menunjukkan bahwa fraksi mengandung beberapa senyawa. Kromatogram fraksi aktif n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dapat dilihat pada Gambar 28.



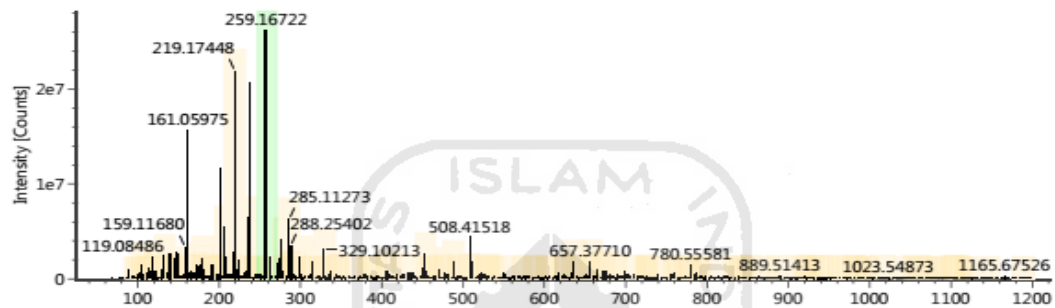
Gambar 28. Kromatogram TIC fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan LC-MS/MS

Gambar 28 menunjukkan kandungan senyawa dalam fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). Hal tersebut ditunjukkan dari munculnya beberapa puncak yang cukup tajam dan sesuai dengan yang telah teridentifikasi dari hasil LC-MS/MS di antaranya puncak dengan waktu retensi 8,86; 9,19; 9,37; 10,72; 10,46; dan 11,24. Puncak-puncak tersebut merupakan suatu senyawa yang diduga masih berupa campuran atau belum tunggal karena dalam sebuah fraksi seharusnya masih terdiri dari berbagai macam senyawa. Sehingga pada beberapa puncak yang intensitasnya cukup tinggi dipisahkan kembali dan didapatkan spektrum massa. Spektrum massa fraksi aktif n-heksana disajikan pada Gambar 29 dan Gambar 30.

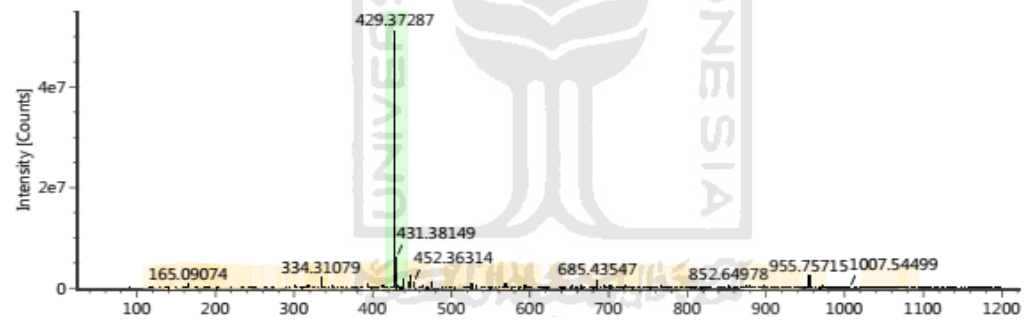




(d)



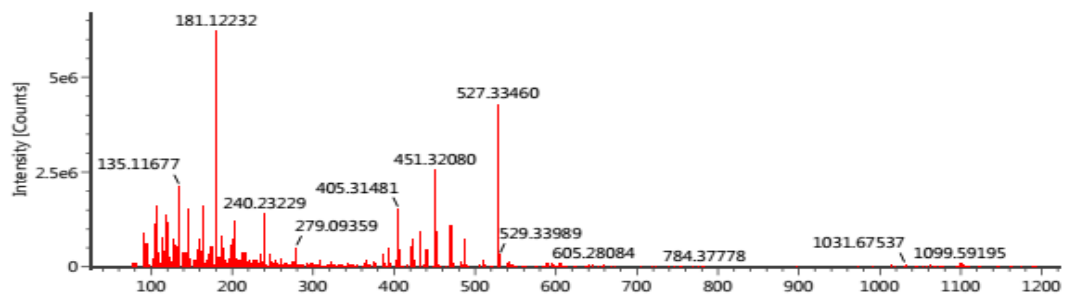
(e)



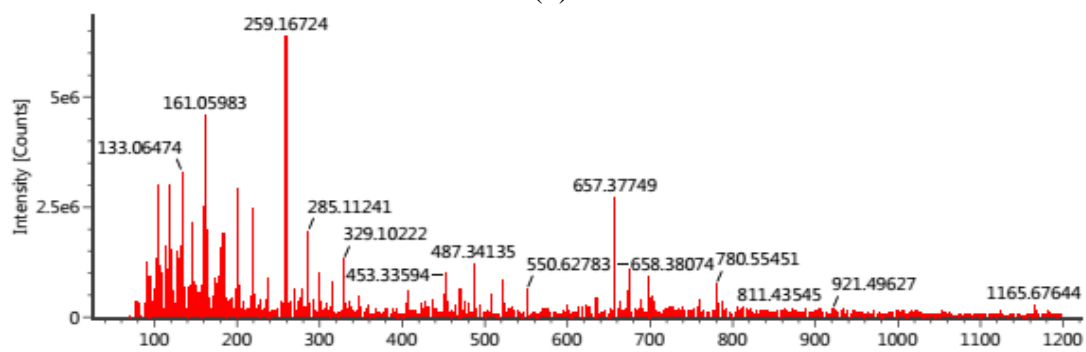
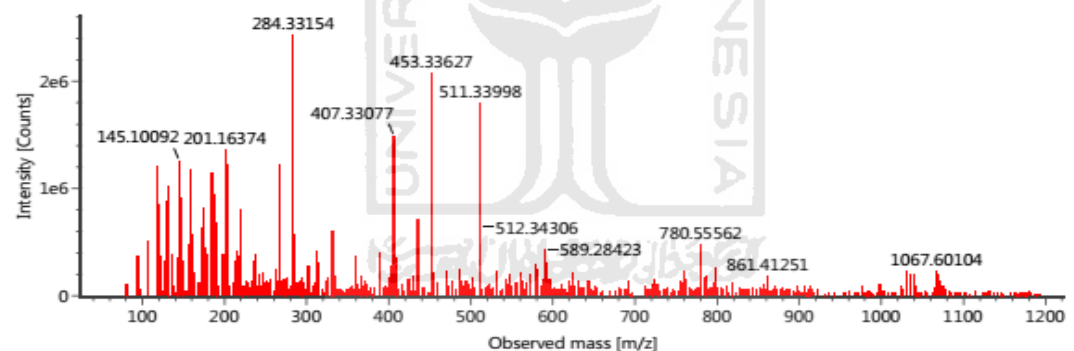
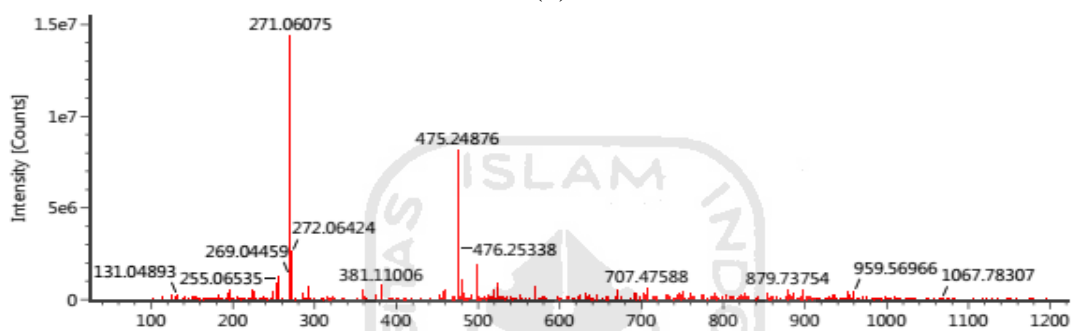
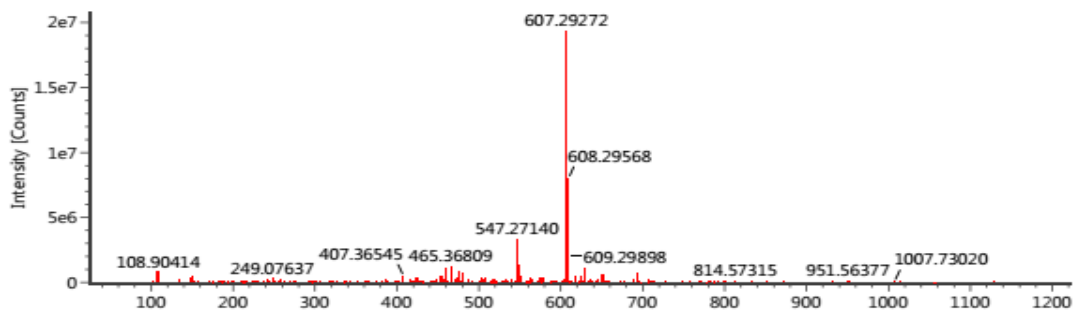
(f)

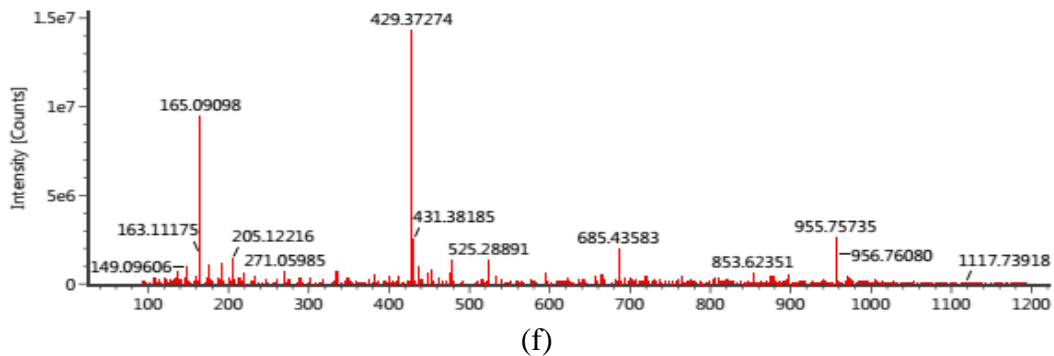
Gambar 29. Spektrum massa fraksi n-heksana daun jambu biji dengan *low energy*

(a) waktu retensi 8,86 (b) 9,19 (c) 9,37 (d) 10,72 (e) 10,46 (f) 11,24.



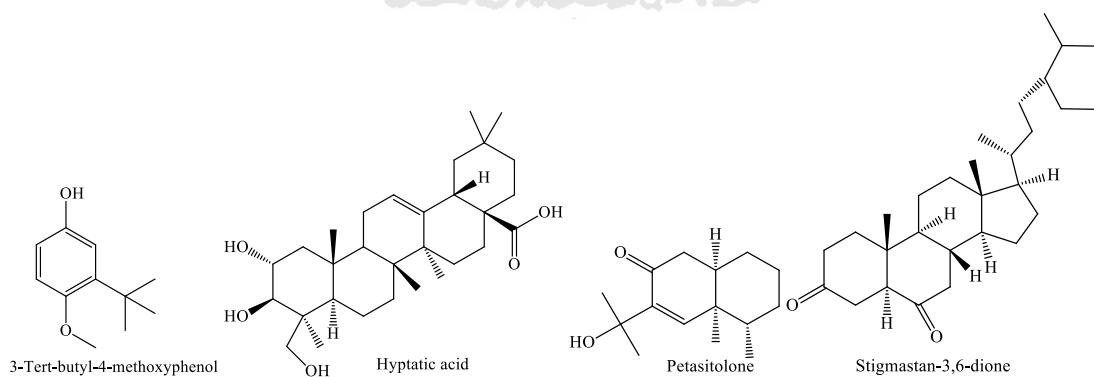
(a)





Gambar 30. Spektrum massa fraksi n-heksana daun jambu biji dengan *high energy* (a) waktu retensi 8,86 (b) 9,19 (c) 9,37 (d) 10,72 (e) 10,46 (f) 11,24.

Gambar 29 dan 30 menunjukkan spektrum massa fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan mode *low energy* dan *high energy*. Berdasarkan spektrum tersebut dapat diidentifikasi kandungan senyawa dan berat molekulnya dengan melihat kemiripannya dengan literatur. Puncak dengan intensitas yang cukup tinggi didapatkan dari spektrum massa tersebut diantaranya teridentifikasi sebagai senyawa *3-Tert-butyl-4-methoxyphenol* 181,1224 m/z, *Hyptatic acid* 511,3404 m/z, *Petasitolone* 259,1672 m/z, *Candidate Mass* $C_{26}H_{48}O_{14}$ 607,2928 m/z, *Stigmastan-3,6-dione* 429,3729 m/z, dan *Candidate Mass* $C_{30}H_{34}O_5$ 475,2488 m/z dengan struktur kimia sebagaimana yang terdapat pada Gambar 31.



Gambar 31. Struktur senyawa kimia yang terdapat dalam fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa:

1. Kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana diantaranya senyawa *3-Tert-butyl-4-methoxyphenol* dengan berat molekul 181,1224 m/z, *Hyptatic acid* 511,3404 m/z, *Petasitolone* 259,1672 m/z, *Candidate Mass* $C_{26}H_{48}O_{14}$ 607,2928 m/z, *Stigmastan-3,6-dione* 429,3729 m/z, dan *Candidate Mass* $C_{30}H_{34}O_5$ 475,2488 m/z.
2. Sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) dengan metode SNEDDS pada konsentrasi 40% adalah yang paling optimal ditinjau dari ukuran partikel, distribusi partikel, muatan partikel serta aktivitas sitotoksiknya.
3. Nilai IC_{50} sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) konsentrasi 40%, 60%, dan 80% berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 113; 115; dan 129 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} sediaan nanopartikel fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.) konsentrasi 40%, 60%, dan 80% berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 90; 191; dan 214 $\mu\text{g/mL}$.

6.2 Saran

1. Dilakukan uji aktivitas antikanker payudara pada fraksi n-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* Linn.).
2. Ditambahkan kontrol positif dan kontrol negatif pada saat uji aktivitas antikanker payudara.
3. Capryoll 90 digantikan dengan jenis minyak lainnya yang lebih aman terhadap sel normal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah, A., 2006, *Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Air Daun Sisik Naga (Pyrrosia nummularifolia (Sw.) Ching) terhadap Sel Lestari Tumor HeLa secara In Vitro*, Skripsi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- ACS (American Cancer Society), 2013, *Breast cancer: facts and figures 2013-2014*, American Cancer Society, Atlanta.
- Adam, F., Vahirua, I., and Deslandes, E., 2011, Aromatic plants of French Polynesia. V. Chemical composition of essential oils of leaves of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine, *J. Essent. Oil Res.*, 23, 98-101.
- Adi, A.C., Setyawaty, N., Anindya, A.L., dan Rachmawati, H., 2019, Formulasi dan Karakterisasi Sediaan Nanoemulsi Vitamin A, *Media Gizi Indonesia.*, 14, 1-13.
- Adjuwana, N., 1989, *Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologi*, Pusat Antar Universitas IPB, Bogor.
- Agilent Technologies, 2001, *Agilent LC-MS Primer*, U.S.A 5988-2045EN.
- Agoes, A., 1994, *Catatan Kuliah Farmakologi I*, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya EGC, Jakarta.
- Agustin, D., dan Ismiyanti, 2005, Pengaruh Konsentrasi Pelarut Pada Proses Ekstraksi Antosianin Dari Bunga Kembang Sepatu, *KONVERSI*, 4, 2-3.
- Amalia, A., Jufri, M., dan Anwar, E., 2015, Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticle (SLN) of Gliclazide, *J. Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 13, 108–114.
- American Cancer Society, 2014, *A Guide to Chemoteraphy*, Diunduh tanggal 10 Januari 2016.
- Ardrey, R.E., 2003, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, University of Huddersfield, England.
- Arifianti, L. S., 2014, *Uji Aktivitas Ekstrak Biji Sirsak (Annona Murcata L) Terhadap Sel Kanker Mamalia secara In-Vitro*, Universitas Airlangga, Surabaya.

- Arima, H., and Danno, G., 2002, Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.), *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 66, 1727-1730.
- ATCC (American Type Culture Collection), 2008, *Cell Biology*. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/cellBiology>, Diakses pada tanggal 13 oktober 2018.
- ATCC (American Type Culture Collection), 2012, *Cell Biology*, <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/cellBiology>, Diakses pada tanggal 15 Februari 2020.
- Azeem, A., Rizwan, M., Ahmad, F.J., Iqbal, Z., Khar, R.K., and Aqil, M., 2009, Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, 10, 69–76.
- 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, Surfactants and Co-surfactants, *Journal of Pharmacy Research*, 6, 510-514.
- Bandivadekar, M., Pancholi, S., Kaul-Ghanekar, R., Choudhari, A., Koppikar, S., 2013, Single Non-ionic Surfactant Based Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems: Formulation, Characterization, Cytotoxicity and Permeability Enhancement Study, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39, 696-703.
- Baraja, M., 2008, *Uji Toksisitas Ekstrak Daun Ficus elastic nois ex lume Terhadap Artemiasalina Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis*, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Barry, B. W., 1987, Mode of action of penetration enhancers in human skin *cit* Anderson, James M, & Sung Wan Kim., 1987, Advances in drug delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101 – 114
- Bathia, S., 2016, Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications, *Springer Int. Publ. Switz*, 29, 32–91.
- Beandrade, M.U., 2018, Formulasi dan Karakterisasi SNEDDS Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella Sativa*) dengan Fase Minyak Ikan Hiu Cucut Botol (*Centrophorus*

- Sp) serta Uji Aktivitas Imunostimulan, *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research.*, 01, 50-61.
- Bontempo, P., Doto, A., Miceli, M., Mita, L., Benedetti, R., Nebbioso, A., Vegliione, M., Rigano, D., Cioffi, M., Sica, V., 2012, Psidium guajava L. anti-neoplastic effects: induction of apoptosis and cell differentiation. *Cell Proliferation* 45, 22-31.
- Bosman, F.T., 1999, Aspek-Aspek Fundamental Kanker (terj) dalam: Arjono, editor: *Onkologi*, Edisi 5, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Bouchemal, K., Briancon, S., Fessi, H., Perrier, E., 2004, Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil, and surfactant optimization, *Int. J. Pharm*, 280, 241-251.
- Bowers, L.D., 1989, High-performance liquid chromatography/mass spectrometry: state of the art for the drug analysis laboratory, *Clin Chem* , 35, 1282-1287.
- Bray, J., Ferlay, I., Soerjomataram, R.L., Siegel, L.A., Torre, A., Jemal, 2018, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- Brunner, dan Suddarth, 2003, *Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah*, EGC, Jakarta.
- Burdall, E.S., Handby, M.A., Landsdown, R.J.M., dan Speirs, V., 2003, Brest Cancer Cell Line, *Breast Cancer Res.*, 5, 89-95.
- Buzea, C., Blandino, I.I.P., and Robbie, K., 2007, Nanomaterial and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases*, 2, 170–172.
- CCRC (*Community College Research Center*), 2007, *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.
- CCRC (*Community College Research Center*), 2009, *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.
- Chabib, L., Ikawati, Z., Martien, R., Ismail, H., 2016, Formulasi Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System Kandidat Obat Rheumatoid Arthritis: Karakterisasi Surfaktan, *SEMNAS-OHI-2016*.

- 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.
- Chan, H.K., and Ismail, S., 2014, Side Effects of Chemotherapy among Cancer Patients in a Malaysian General Hospital: Experiences, Perceptions and Informational Need from Clinical Pharmacists, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 5-7.
- Chen, K.C., Hsieh, C.L., Huang, K.D., Ker, Y.B., Chyau, C.C., and Peng, R.Y., 2009, Anticancer activity of rhamnoallosan against DU-145 cells is kinetically complementary to coexisting polyphenolics in *Psidium guajava* budding leaves, *J. Agric. Food Chem*, 57, 6114-6122.
- Chen, K.C., Hsieh, C.L., Peng, C.C., Hsieh-Li, H.M., Chiang, K.D., and Peng, R.Y., 2007, Brain derived prostate cancer DU-145 cells are effectively inhibited *in vitro* by guava leaf extracts, *Nutr. Cancer*, 58, 93-106.
- Chiari, B.G., Trovatti, E., Marto, J., Almeida, M.G.J., Melero, A., Corrêa, 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, *Braz. J. Pharm. Sci*, 53, 2.
- Ciulei, J., 1984, *Methodology for Analysis of Vegetables and Drugs*, University of Bucharest, Bucharest.
- Couvreur, P., Barrat, G., Fattal, E., Legrand, P., dan Vauthier, C., 2002, Nanocapsule Technology: a Review, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys*, 19, 99-134
- 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, 2453-2460.
- Damar, A.C., Max, R.J.R., dan Defny, S., 2014, Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Total Ekstrak Etanol Daun Kayu Kapur (*Melanolepsis Multiglanduloso Reinch f*), *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3, 11-21.

- Date, A.A., and Nagarsenker, M.S., 2007, Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil, *Int. J. Pharmaceutics*, 329, 166-172.
- Date, A.A., Desai, N., Dixit, R., dan Nagarsenker, M., 2010, Self- Nanoemulsifying Drug Delivery System: Formulation Insights, Applications and Advances, *Nanomedicine*, 5, 1595–1616.
- Day, R.A., dan A.L. Underwood., 2002, *Analisis Kimia Kuantitatif*, Erlangga, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI., 1977, *Materia Medika Indonesia Jilid I*, Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI., 2000, *Parameter Standard Umum Ekstarak Tumbuhan Obat*, Dirjen POM, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI., 2008, *Instalasi Deteksi Dini Dan Promosi Kesehatan, RS Kanker Dharmais*, Jakarta
- Departemen Kesehatan RI., 2009, *Pedoman Pelayanan Antenatal di Tingkat Pelayanan Dasar*, Depkes RI, Jakarta.
- Desen, 2011, *Patologi tumor, Buku ajar onkologi klinis ed 2*, Balai penerbit FK UI, Jakarta.
- 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.
- Diba, Rovie F., Sedarnawati Y., Sri Y., 2014, Nanoemulsifikasi Spontan Ekstrak Jinten Hitam dan Karakteristik Produk Enkapsulasinya, *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 25, 134–139.
- 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., and Griffiths, J.B., 2000, *Cell and tissue culture for medical research*. John Wiley & Sons, New York.
- Dwitiyanti., 2015, Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) sebagai Antikanker Payudara, *Pharm Sci Res*, 2, 2.
- Effendy, 2007, *Kimia Koordinasi Jilid 1*, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang, Malang.
- 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.
- Fang, N., Yu, S., and Prior, R.L., 2002, LC-MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 12.
- Fitrya dan Lenny, A., 2009, Uji Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro* dengan Sel Murine P-388 Senyawa Flavonoid dari Fraksi Etil asetat Akar Tumbuhan Tunjuk Langit (*Helminthostachis Zeylanica* (Linn) Hook), *Jurnal Penelitian Sains*, 12, 1-4.
- Flores, G., Wu, S., Negrin, A., Kennelly, E.J., 2015, Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits, *Food Chemistry*, 170, 327–335.
- Freshney, R.I., 1992, *Animal Cell Culture*, Oxford University Press, New York.
- Fudholi, A., 2013, *Disolusi dan Pelepasan Obat In-vitro*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Geissman, T.A., 1962, *The Chemistry of Flavonoid Compound*, Pergamon Press, Oxford.
- Gershanik, T., and Benita, S., 2000, Self-dispersing Lipid Formulations for Improving Oral Absorption of Lipophilic Drugs, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 179-188.
- 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.

- Gonçalves, F.A., Andrade-Neto, M., Bezerra, J.N., Macrae, A., Sousa, O.V.D., Fonteles-Filho, A.A., Vieira, R.H., 2008. Antibacterial activity of GUAVA, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller), *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50, 11-15
- Goodhew, P.J., Humphreys, J., Beanland, R., 2001, *Electron Microscopy and Analysis, Third edition*, Taylor & Francais, London and New York.
- Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S, and Marshall, N.J., 1995, Microculture Tetrazolium Assays: A comparison Between Two New Tetrazolium Salts, XTT and MTS, *Journal Immunol Methods*, 197, 95-103.
- Grover, I.S., and Bala, S., 1993, Studies on antimutagenic effect of Guava (*Psidium guajava*) in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 300, 1-3
- Guenther, E., 2006, *Minyak Atsiri*, Jilid I, Diterjemahkan oleh S. Ketaren, UI-Press, Jakarta.
- Gunzler, H., and Williams, A., 2001, *Handbook of Analytical Techniques*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S., 2016, Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications, *Royal Society Of Chemistry*, 1, 1-16.
- Gursoy, R.N., and Benita, S., 2004, Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) for Improved Oral Delivery of Lipophilic Drugs, *Biomed and Pharmacother*, 58, 173-182
- Hammond, C., 1997, *The Basics of Crystallography and Diffraction*, Oxford Science Publication, Oxford.
- Hanf, V., Hanf, D., 2014, Reproduction and breast cancer risk, *Breast care (Basel, Switzerland)*, 9, 398-405.
- Haque, F.A.K., 2015, *Karakteristik Nanoemulsi Ekstrak Jahe (Zingiber officinale var Amarum)*, Skripsi, Teknologi Industri Pertanian, Fakultas teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Harahap, Y., 2007, Uji sitotoksisitas sediaan jadi daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) terhadap sel MCF-7 secara *in vitro*, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6, 2.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Diterjemahkan oleh K. Padmawinata dan I. Soediro, ITB, Bandung.
- Haritha, Basha, S.P., Rao P.K., dan Vedantham, C., 2003, A Brief Introduction to Methods of Preparation, Applications and Characterization of Nanoemulsion on Drug Delivery Systems, *Ind J Res Pham Biotech*, 1, 25–28.
- Hernandez, F., Pozo, O.J., Sancho, J.V., Lopez, F.J., Marin, J.M., Ibanez M., 2005, A Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS2 using triple quadrupole and hybrid quadrupole time of flight analyzers, *Trends Anal Chem*, 24, 596-612.
- Heti, D., 2008, *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Herba Sisik Naga (Drymoglossum piloselloides Presl.) terhadap Sel T47D*, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Ho, C.S., 2003, Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications, *Clin Biochem Rev*, 24, 3-12.
- Hoffmann, E., and Stroobant, V., 2007, *Mass Spectrometry Principle and Applications*, Third edition, Johan and Wiley & Sons, New York.
- Hondermarck, H., 2003, Breast Cancer, Molecular and Cellular Proteomics, *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, Inc, pp, 281-291.
- Itharat, A., and Oraikul, B., 2007, Research on Thai medicinal plants for cancer treatment, *Med Plant Res*, 1, 287-317.
- Jairaj, P., Khoohaswan, P., Wongkrajang, Y., Peungvicha, P., Suriyawong, P., Saraya, ML., and Ruangsomboon, O., 1999, Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn, leaf extract, *J. Ethnopharmacol*, 67, 203-212.
- Jork, H., Funk, W., and Wimmer, H., 1990, *Thin Layer Chromatography*, VCH Publisher, USA.

- Joseph B., and Priya, M., 2011, Review On Nutritional, Medicinal and Pharmacological Properties of Guava (*Psidium guajava* Linn.), *Int J Pharm and Bio Sci*, 2, 53-69.
- JoVe, 2019, *Science Education Database. Analytical Chemistry. Calibration Curves*. JoVe, Cambridge, MA.
- Jurkiewicz, K., Pawlyta, M., Burian, A., 2018, Structure of carbon materials explored by local transmission electron microscopy and global power diffraction probes, *J. Carbon Res*, 4, 68.
- Karimi, P., Shahrokni, A., Ranjbar, M.R., 2014, Implementation of proteomics for cancer research: past, present and future, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 2433–2438.
- Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., and Kuno, Y., 2000, Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin, *Pharmaceutical Development and Technology*, 5, 77-85.
- Kementerian Kesehatan RI, 2018, *Riset Kesehatan Dasar*, Kemenkes RI, Jakarta, http://www.depkes.go.id/resource/download/infoterkini/materi_rakorpop_2018/Hasil%20Risesdas%202018.pdf, Diakses pada tanggal 24 Februari 2020.
- Kim, H.J., Yoon, K.A., Hahn, M., Park, E.S., Chi, S.C., 2000, Preparation and in vitro evaluation of Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems containing idebenone, *Drug Dev and In Pharm*, 26, 523-529.
- Kumar, R., and Soni, G.C., 2017, Formulation development and evaluation of Telmisartan Nanoemulsion, *Prajapati International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Science*, 4, 2711-2719
- 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.
- Lee, W.C., Mahmud, R., Noordin, R., Pillai Piaru, S., Perumal, S., Ismail, S., 2013, Free radicals scavenging activity, cytotoxicity and antiparasitic activity of essential oil of *Psidium guajava* L, Leaves against *Toxoplasma gondii*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16, 32-38.

- Lee, W.C., Mahmud, R., Pillai, S., Perumal, S., Ismail, S., 2012, Antioxidant activities of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves, *APCBEE Procedia* 2, 86-91.
- Lee, Y., Lim, Y., and Kwon, O., 2015, Selected phytochemicals and culinary plant extracts inhibit fructose uptake in caco-2 cells, *Molecules*, 20, 17393–17404.
- Lindley, C., Michaud, L.B., 2005, *Breast Cancer*, In: Dipiro, J., Talbert, R.L., Yee, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G., Posey, L.M., *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 6th Ed: McGraw Hill Companies, Inc, New York.
- Maharani, S., 2009, *Kanker: Mengenal 13 Jenis Kanker dan Pengobatannya*, Katahati Press, Yogyakarta.
- Makadia, H.A., Bhatt, A.Y., Ramesh, Parmar, R.B., Paun, J.S., Tank, H.M., 2013, *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS): Future Aspects*, Asian Pharma Press, India.
- Malole, M.B.M., 1990, *Kultur Sel dan Jaringan Hewan*, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- 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., dan Suryanti, V., 2005, Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) Dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi*, 3, 26-31.
- Matsuo, T., Hanarnure, N., Shimol, K., Nakamura, Y., and Tomita, I., 1993, Identification of (+) galloocatechin as a bio antimutagenic compound in *Psidium guajava* leaves, *Phytochemistry*, 36, 1027-1029.
- McClements, D.J., 2011, Formation of nanoemulsions stabilized by model foodgrade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size, *Food Hydrocoll*, 25, 1000-1008.

- McMaster, M.C., 2005, *LC/MS a Practical User's Guide*, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Meiyanto, E., Ratna, A., Sri, H., & Fitri, R., 2008, Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu*) mampu menghambat poliferasi dan Pemacu Apoptosis sel MCF-7, *Majalah Farmasi Indonesia*, 19, 12-19.
- Miroslav, V., 1971, *Detection and Identification of Organic Compound*, Planum 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.
- 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, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay, *Journal of Immunological Method*, 16, 55-63.
- Mufidah, T., Wibowo, H., dan Subekti, D.T., 2015, Pengembangan Metode Elisa dan Teknik Deteksi Cepat Dengan Imunostik Terhadap Antibodi Anti *Aeromonas Hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinid Carpio*), *Jurnal Riset Akuakultur*, 10, 4.
- Mukhtar, H.M., Ansari, S.H., Bhat, Z.A., Naved, T., Singh, P., 2006, Antidiabetic activity of an ethanol extract obtained from the stem bark of *Psidium guajava* (Myrtaceae). *Pharmazie*, 61, 725–727.
- Mulyono, M.W., Supriyatna, Wiraharja, T., dan Surniwi, S.A., 1994, *Studi Fitokimia Fraksi Antidiare Daun Jambu Biji (Psidium guajava L)*, Laporan Penelitian Lembaga Penelitian UNPAD, Bandung.
- 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 Tehnique, *Toxicol, Sci*, 101, 239-253.

- Nadimi, A.E., Ebrahimipour, S.Y., and Afshar, E.G., 2018, Nano-scale drug delivery systems for antiarrhythmic agents, *European journal of medicinal chemistry*, 157, 1153-1163.
- Namiranian, N., Moradi-Lakeh, M., and Razavi-Ratki, S.K., 2014, Risk factors of breast cancer in the Eastern Mediterranean Region: a systematic review and meta-analysis, *Asian Pacific journal of cancer prevention*: 15, 9535-9541.
- Nita, M.T., 2019, *Uji In-Vitro Fraksi Etanol, Etil Asetat dan N-Heksana Daun Jambu biji (Psidium guajava L.) Terhadap Sel T47D, MCF-7, dan Hela Sebagai Antikanker*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Nugroho, B.H., Citrarianai, S., Sari, I.N., Oktari, R.N., dan Munawwarah, 2017, Formulasi dan evaluasi SNEDDS (Self Nanoemulsifying Drug Delivery System) ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) sebagai analgesik, *Jurnal Ilmiah Farmasi.*, 13, 77-85.
- Nugroho, B.H., dan Sari, N.P., 2018, Formulasi Self Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Ekstrak Daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa (Ait.) Hassk.*), *Jurnal Ilmiah Farmasi.*, 14, 1-8.
- Nurdiyanti, L., Aryani, R., dan Indra., 2017, Formulasi dan Karakterisasi SNE (Self Nanoemulsion) Astaxanthin dari *Haematococcus pluvialis* sebagai Super Antioksidan Alami, *Jurnal Sains Farmasi & Klinis.*, p-ISSN: 2407-7062.
- Oberlin, A., 1989, High resolution TEM studies of carbonization and graphitization In: Throver, P.A. (Ed.), *Chemistry and Physics in Carbon*, 22, 1–143.
- Ojewole, J.A., 2005, Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract, *Methods Findings Exp. Clin. Pharmacol*, 27, 689-695.
- Ojewole, J.A., 2006, Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rat and mice, *Methods Findings Ex. Clin. Pharmacol*, 28, 441-446.

- Olii, A.T., Pamudji, J.S., Mudhakhir, D., dan Iwo, M.I., 2014, Pengembang, Evaluasi, dan Uji Aktivitas Antiinflamasi Akut Sediaan Nanoemulsi Spontan Minyak Jintan Hitam, *Jurnal Farmasi Indonesia.*, 7, 2.
- Pandiangan, D., Esyanti, R., and Queljoe, E., 2008, Aktivitas Antikanker Katarantin pada Sel Mouse Mammary Cancer MmT06054, *Jurnal Ilmiah Sains*, 8, 107-113
- Paniandy, J.C., Chane-Ming, J., and Pieribattesti, J.C., 2000, Chemical composition of the essential oil and headspace solid-phase microextraction of the guava fruit (*Psidium guajava* L.), *J. Essent. Oil Res*, 12, 153-158.
- Parimin., 2005, *Jambu Biji. Budi Daya dan Ragam Pemanfaatannya*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Pastor-Barriuso, R., Fernandez, M.F., and Castano-Vinyals, G., 2016, Total Effective Xenoestrogen Burden in Serum Samples and Risk for Breast Cancer in a Population-Based Multicase Control Study in Spain, *Environmental health perspectives*, 124, 1575-1582.
- Patel, J., Kevin, G., Patel, A., Raval, M., Sheth, N., 2011^a, Design and development of a Self-nanoemulsifying Drug Delivery System for Telmisartan of Oral Drug Delivery, *Int J Pharm Investig*, 1, 112-118.
- Patel, J., Patel, A., Raval, M., Sheth, N., 2011^b, Formulation and development of a Self-nanoemulsifying Drug Delivery System of Irbesartan, *J Adv Pharm Technol Res*, 2, 9-16.
- Patel, J., Shah, A., 2008, Self emulsifying delivery systems for poorly absorbed drugs, *Int J Pharm Sci and Nano Tech*, 1, 123-128.
- Pearce, A., Haas, M., Viney, R., Pearson, S.A., Haywood, P., and Brown, C., 2017, Incidence and severity of selfreported chemotherapy side effects in routine care: *A prospective cohort study*, 12, 184-360.
- Pinto, Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.N.J., dan Veiga, F., 2006, Nanoencapsulation I, Methods for preparation of drug loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2, 8-21.

- Prabu, G.R., Gnanamani, A., and Sadulla, S., 2006, Guaijaverin a plants flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcusmutans*, *J. Appl. Microbiol*, 101, 487-495.
- Prajapati, B.G., Patel, M.M., 2007, Conventional and alternative pharmaceutical methods to improve oral bioavailability of lipophilic drugs, *Asian journal of pharmaceutics*, 1, 1-8.
- Prayong, P., Barusux, S., and Weerapreeyakul, N., 2008, Cytotoxic Activity Screening of some Indigenous Thai Plants. *Fitoterapi*, 79, 598-601.
- Priyani, S.E., Nurrayan, Darusman, F., 2017, Formulasi self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) glimepiride dengan fasa minyak asam oleat, *Pharmaciana*, 7, 267-276.
- Purwanto, S., 2015, Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Daun Senggani (*Melastoma Malabathricum* L.) Terhadap *Escherichia Coli*, *Jurnal Keperawatan Sriwijaya*, 2, 2.
- Qadan, F., Thewaini, A.J., Ali, D.A., Afifi, R., Elkhawad, A., and Matalka, K.Z., 2005, The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Junglans regia* leaf extracts to acne developing organisms, *Am. Chin. Med*, 33, 197-204.
- Rahayu, E., 2016, *Preparasi Dan Karakterisasi Nanosuspensi Kitosan-Tripolifosfat 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, 47-55
- Rasaputri, D.H., 2010, *Pengembangan Self Nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) untuk penghantaran oral interferon alfa 2b: Formulasi, karakterisasi dan uji stabilitas fisik*, Thesis, Sekolah Farmasi ITB, Bandung.
- Rattanachaiakunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010, Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 393-396.

- Razak, F.A., Othman, R.Y., 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 Sc*, 48, 71–75.
- Reiss, H., 1975, Entropy induced dispersion of bulk liquids, *J Colloids Interface Sci*, 53, 61-70.
- 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, 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.
- Romadhon, A., Yusuf, 2013, *Gangguan Siklus sel dan Mutasi Gen Pada Kanker Payudara*, Bagian Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta, Indonesia.
- Rouzaud, J.N., 1990, Contribution of transmission electron microscopy to the study of the coal carbonization processes, *Fuel Process. Technol*, 24, 55–69.
- Rowe, R.C., Paul J, Sheskey, P.J. & Quinn, M., 2009, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed, Pharmaceutical Press, London.
- 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, 231-241.
- Santos, F.A., Rao, V.S.N., and Silveira, E.R., 1997, Antiinflammatory and analgesic activities of the essential oil of *Psidium guajava*, *Chemical Abstract*, 127, 51.
- Sari, A.I., dan Herdiana, Y., 2018, REVIEW: Formulasi Nanoemulsi Terhadap Peningkatan Kualitas Obat, *Farmaka.*, 16, 248-252.

- Sari, R., Pratiwi, L., dan Apridamayanti, P., 2016, Efektivitas SNEDDS Ekstrak Kulit Manggis Terhadap Bakteri *P. mirabilis* dan *S. epidermidis* yang Terdapat pada Ulkus Diabetik, *Pharm Sci Res* ISSN 2407-2354.
- Sastrohamidjojo, H., 1985, *Kromatografi*, Liberty, Yogyakarta.
- 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, 43.
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., and 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, 43-44.
- Seo, N., Ito, T., Wang, N., Yao, X., Tokura, Y., Furukawa, F., Takigawa, M., Kitanaka, S., 2005, Anti-allergic *Psidium guajava* extracts exert an antitumor effect by inhibition of T regulatory cells and resultant augmentation of Th1 cells, *Anticancer Research*, 25, 3763-3770.
- Shafiqunnabi, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ali, J., Baboota, S., Ahuja, A., 2007, Formulation Development and Optimization using Nanoemulsion Technique: A technical note, *AAPS Pharm SciTech*, 8: E12-E17.
- Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Faisal, M.S., Shafiq, S., 2008, Stability evaluation of celecoxib nanoemulsion containing tween 80, *Thai Journal Pharm Sci*, 32-49.
- Shield, K.D., Soerjomataram, I., Rehm, J., 2016, Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review Alcoholism, *Clinical and Experimental Research*, 40, 1166-1181.
- Siegel, K.D., Miller, A., Jemal, 2018, Cancer Statistics, *CA Cancer J Clin*, 68, 7-30.
- Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., Jemal, A., 2011, The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths, *CA Cancer J Clin*, 61, 212-236.

- Singh, B., Bandopadhyay, S., Kapil, R., Singh, R., and Katare, O.P., 2009, *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*; 26, 427-521.
- Solons, C., 2003, *Nanoemulsions Formulation, properties, and Application*, In mittal, K.I & shah, D.O., *Adsorption and Agregation of surfactans in solution*, Marcell Dekker, New York.
- Soman, S., Rauf, A.A., Indira, M., Rajamanickam, C., 2010, Antioxidant and antiglycative potential of ethyl acetate fraction of Psidium guajava leaf extract in streptozotocin induced diabetic rats, *Plant Food for Human Nutrition*, 65, 386-391
- Sons, W.J., 2008, Vero Cell, *Curr Protoc. Microbiol*, 11.
- Steenis, C.G.G.J.V., 1977, *Flora, untuk Sekolah di Indonesia*, Pradnya Paramita, Jakarta.
- Stefeld, J., Sean, A., McKenna, A., and Patel, T., 2012, *Nanocomposix's Guide To Dynamic Light Scattering Measurement And Analysis*, NanoComposix, San Diego.
- Subramanian, S., Banu, H.H., Ramya, Bai, R.M., Shanmugavalli, R., 2009, Biochemical evaluation of antihyperglycemic and antioxidant nature of Psidium guajava leaves extract in streptozotocin induced experimental diabetes in rats, *Pharmaceutical Biology*, 47, 298-303.
- Sudarmadji, S.B., Haryono., dan Suhardi., 2003, *Analisa Bahan Makanandan Pertanian*, Liberty, Yogyakarta.
- Sun, M., & Han, J., 2011, Design, Preparation and In Vitro Evaluation of Paclitaxel-Loaded Self Nanoemulsifying Drug Delivery System, *Asian Journal of Pharmaceutical Science*, 6, 18-25.
- Svehla, G., 1990, *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*, Edisi kelima, Penerjemah: Setiono, L., dan Pudjaatmaka, A.H., PT Kalman Media Pustaka, Jakarta.
- Tambunan, 2003, *Diagnosis dan Tatalaksana Sepuluh Jenis Kanker di Indonesia*, EGC, Jakarta.

- Tannaz, J., Brijesh S., and Poonam, G.D., 2014, Bactericidal Effect of Selected Antidiarrhoeal Medicinal Plants on Intracellular Heat Stable Eterotoxin-Producing Escherichia Coli, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76, 229-235.
- Tapan, E., 2005, *Kanker, Antioksidan & Terapi Komplementer*, PT. Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Tjindarbuni, 1995, *Diagnosis dan Pencegahan Kanker Payudara, Kursus Singkat Deteksi Dini dan Pencegahan Kanker*, FKCI-POI, Jakarta.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2012, Global cancer statistics, *CA Cancer J. Clin*, 65, 87-108.
- Vaughn, J.M., and Williams, R.O., 2007, *Nanoparticle Engineering*, Informa Healthcare USA, New York.
- Vergote, G.J., Vervaet, C., Van, D.I., Hoste, S., Smedt, D.S., Demesteer, J., Jain, R.A., Ruddy, S., Remon, J.P., 2001, An oral controlled release matrix pellet formulation containing nanocrystalline ketoprofen, *Int J Pharm* 291, 81-87.
- Verma, S.P., Goldin, B.R., and Lin, P.S., 1998, The Inhibition of the Estrogenic Effects of Pesticides and Environmental Chemical by Curcumin and Isoflavonoids, *Envir.Health Presep*, 106, 807-812.
- Viswanadha, V.P., 2015, An overview of targeted cancer therapy, *Biomedicine*, 1, 1-6.
- Vogesser, 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.
- Voight, R., 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandi*, Universitas Gajah Mada press, Yogyakarta.
- Wadhwa, J., Nair, A., and Kumria, R., 2011, Self-emulsifying therapeutic system: a potential approach for delivery of lipophilic drugs, *Braz. J. Pharm. Sci*, 47, 447-465.

- Wahyuningsih, I., dan Putranti, W., 2015, Optimasi Perbandingan Tween 80 Dan Polietilenglikol 400 Pada Formula Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Minyak Biji Jinten Hitam, *Pharmacy*, 2, 223-241.
- Wang, X., Li, L., Gao, J., 2016, The Association Between Body Size and Breast Cancer in Han Women in Northern and Eastern China, *The oncologist*, 1362-1368.
- Wardhani, M.I., 2016, *Optimasi Formula Sediaan SNEEDS (Self Nanoemulsifying Drug Delivery System) dari Ekstrak Kloroform Daun Salam (Syzygium polyanthum (Wight) Walp.) dengan Oleic Acid Sebagai Minyak Pembawa*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Wei, Q., Li, L., Zhu, X.D., Qin, L., Mo, Y.L., Liang, Z.Y., 2017, Effects of intensity-modulated radiotherapy and chemoradiotherapy on attention in patients with nasopharyngeal cancer, *Oncotarget*, 8, 390–400.
- Wicaksana, A.S., 2019, *Pembuatan Sediaan Nanopartikel Ekstrak Kulit Kopi (Coffea arabica L.) dalam Bentuk Self NanoEmulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Sebagai Antibakteri Klasifikasi pneumonia*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Wielsoe, M., Gudmundsdottir, S., Bonefeld-jorgensen, E.C., 2016, Reproductive history and dietary habits and breast cancer risk in Greenlandic Inuit: a case control study, *Public health*, 137, 50-58.
- Wijayakusuma, H., 1994, *Tanaman Obat Berkhasiat di Indonesia*, jilid kedua, Pustaka Kartini, Jakarta.
- Williams, D.B., Carter, C.B., 2009, *Transmission Electron Microscopy: A textbook for Materials Sciences*, Springer.
- World Health Organization, 2019, *The Global Cancer Observatory 2018*, 360-indonesia-fact-sheets-pdf, Diakses pada tanggal 24 Februari 2020.
- Zakaria., 2011, *In-vitro* cytotoxic and antioxidant properties of the aqueous, chloroform and methanol extracts of Dicranopteris linearis leaves African, *Journal of Biotechnology*, 10, 273-282.

- Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., and Arbuthnot, P., 2002, Differential modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells, *Anticancer Res*, 22, 2253-2259.
- Zhao, T., 2015, *Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for the oral delivery of lipophilic drugs*, Departement of Industrial Engineering University of Trento, Italy.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Penelitian

1.1 Hasil uji determinasi



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 : Andri Ramadhani
NIDN : 16612073
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.






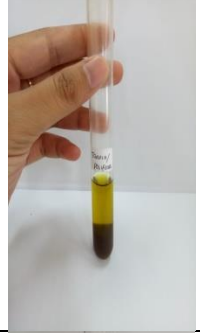


Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada


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

1.2 Hasil Uji Fitokimia

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil Pengamatan	Sebelum Uji	Sesudah Uji
Alkaloid	<i>dragendorf</i>	-		
Flavonoid	Mg + HCl	+		
Fenolik	FeCl ₃	+		
Terpenoid/Steroid	Liebermann-Burchard	+		

1.3 Hasil uji LC-MS/MS

Item name: F N-Hexan, Sample position: 1:E,8, Replicate number: 1

.	Component name	Identification status	Observed m/z	Neutral mass (Da)	Observed RT (min)
1	3-Tert-butyl-4-methoxyphenol	Identified	181.1224	180.11503	8.86
2	Hyptatic acid	Identified	511.3404	488.35017	9.19
3	Petasilolone	Identified	259.1672	236.17763	9.37
4	Candidate Mass C26H48O14	Identified	607.2928	584.30441	10.72
5	Stigmastan-3,6-dione	Identified	429.3729	428.36543	10.46
6	Candidate Mass C30H34O5	Identified	475.2488	474.24062	11.24

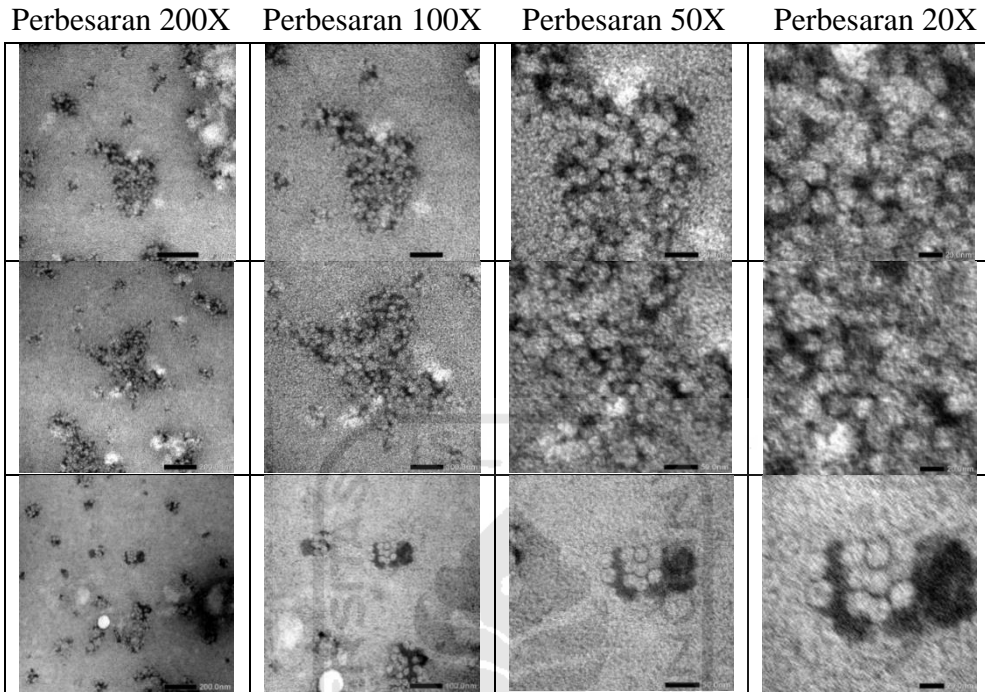
.	Component name	Identification status	Detector counts	Response	Adducts	Formula
1	3-Tert-butyl-4-methoxyphenol	Identified	956922	832664	+H	C11H16O2
2	Hyptatic acid	Identified	93361	60667	+Na	C30H48O5
3	Petasilolone	Identified	635628	635628	+Na	C15H24O2
4	Candidate Mass C26H48O14	Identified	1222517		+Na	C26H48O14
5	Stigmastan-3,6-dione	Identified	2635299	1596482	+H	C29H48O2
6	Candidate Mass C30H34O5	Identified	1275630		+H	C30H34O5

.	Component name	Identification status	Mass error (mDa)
1	3-Tert-butyl-4-methoxyphenol	Identified	0.1
2	Hyptatic acid	Identified	1.0
3	Petasilolone	Identified	0.4
4	Candidate Mass C26H48O14	Identified	-0.8
5	Stigmastan-3,6-dione	Identified	0.2
6	Candidate Mass C30H34O5	Identified	0.9

1.4 Hasil Uji PSA

No	Nama Sampel	Kode	Label	Parameter	Satuan	Hasil Uji*	Metode Uji
1	Fraksi n-Heksan (20:60:20) 60%	107/C/PSA/XI/19	L5R1	Nano	nm	172,4	Static light scattering menggunakan alat PSA
			L5R2	Partikel		188,1	
			L5R3			183,6	
			L5R1	Zeta	mV	-63,9	
			L5R2	Potensial		-64,8	
			L5R3			-64,2	
2	Fraksi n-Heksan (20:60:20) 40%	108/C/PSA/XI/19	L6R1			118,4	
			L6R2			111,1	
			L6R3			114,1	
			L6R1			-72,1	
			L6R2			-70,8	
			L6R3			-70,8	
3	Fraksi n-Heksan (20:60:20) 80%	110/C/PSA/XI/19	L8R1			155,9	
			L8R2			162,4	
			L8R3			167,6	
			L8R1			-78,7	
			L8R2			-77,5	
			L8R3			-78,1	

1.5 Hasil uji TEM



1.6 Hasil ELISA Reader

Sel Vero				Sel T47D				Sel MCF-7			
Raw Data Report Single Wavelength Mess: F3, 595nm Incubation= OFF				Raw Data Report Single Wavelength Mess: F3, 595nm Incubation= OFF				Raw Data Report Single Wavelength Mess: F3, 595nm Incubation= OFF			
	1	2	3		4	5	6		1	2	3
B	0.2239	0.2220	0.2223	A	0.605	0.512	0.593	A	0.164	0.166	0.171
C	0.2242	0.2220	0.2227	B	0.559	0.565	0.547	B	0.213	0.178	0.218
D	0.2234	0.2220	0.2226	C	0.562	0.554	0.524	C	0.187	0.193	0.209
E	0.196	0.183	0.204	D	0.406	0.451	0.439	D	0.188	0.209	0.198
F	0.072	0.062	0.065	E	0.100	0.107	0.100	E	0.188	0.181	0.203
G	0.068	0.058	0.061	F	0.105	0.107	0.096	F	0.118	0.113	0.133
H	0.082	0.155	0.107	G	0.098	0.092	0.111	G	0.105	0.144	0.150
				H	0.100	0.120	0.578	H	0.171	0.307	0.309
	4	5	6		4	5	6		4	5	6
B	0.2119	0.222	0.217	A	0.612	0.630	0.616	A	0.107	0.222	0.221
C	0.2213	0.204	0.217	B	0.587	0.530	0.508	B	0.210	0.233	0.200
D	0.2224	0.232	0.224	C	0.580	0.559	0.567	C	0.213	0.227	0.219
E	0.202	0.227	0.227	D	0.431	0.352	0.351	D	0.195	0.191	0.193
F	0.204	0.203	0.220	E	0.103	0.095	0.102	E	0.180	0.158	0.166
G	0.073	0.066	0.074	F	0.096	0.107	0.105	F	0.164	0.156	0.140
H	0.063	0.063	0.064	G	0.110	0.099	0.095	G	0.194	0.194	0.168
	0.160	0.190	0.185	H	0.173	0.637	0.648	H	0.209	0.313	0.204
	7	8	9		7	8	9		7	8	9
B	0.219	0.216	0.221	A	0.5613	0.5499	0.577	A	0.170	0.189	0.190
C	0.219	0.221	0.220	B	0.587	0.549	0.561	B	0.209	0.211	0.183
D	0.223	0.237	0.248	C	0.591	0.571	0.557	C	0.199	0.210	0.211
E	0.216	0.210	0.200	D	0.389	0.336	0.417	D	0.201	0.212	0.168
F	0.194	0.207	0.199	E	0.097	0.126	0.097	E	0.173	0.153	0.135
G	0.063	0.063	0.063	F	0.086	0.093	0.094	F	0.110	0.107	0.097
H	0.150	0.050	0.061	G	0.097	0.090	0.092	G	0.129	0.119	0.089
	0.181	0.065	0.065	H	0.649	0.606	0.101	H	0.195	0.240	0.097
	10	11	12		10	11	12		10	11	12
B	0.205	0.216	0.209	A	0.564	0.563	0.532	A	0.199	0.193	0.173
C	0.214	0.219	0.210	B	0.557	0.518	0.523	B	0.189	0.173	0.157
D	0.239	0.233	0.202	C	0.523	0.532	0.541	C	0.228	0.200	0.182
E	0.222	0.219	0.194	D	0.377	0.403	0.353	D	0.188	0.160	0.160
F	0.182	0.184	0.166	E	0.117	0.103	0.107	E	0.124	0.142	0.127
G	0.079	0.074	0.079	F	0.097	0.122	0.107	F	0.109	0.101	0.111
H	0.057	0.057	0.057	G	0.096	0.102	0.108	G	0.090	0.095	0.099
	0.071	0.075	0.066	H	0.108	0.111	0.109	H	0.103	0.109	0.116

Lampiran 2. Data-Data Penelitian

2.1 Sel MCF-7

a. Konsentrasi 80%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata- Rata	Standar Deviasi (SD)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,313	0,204	0,24	0,25233	0,05553
kontrol media	0,097	0,103	0,109	0,103	0,006
1000	0,105	0,144	0,15	0,13	0,02443
500	0,118	0,133	0,164	0,13833	0,02345
250	0,188	0,181	0,18	0,183	0,00435
125	0,188	0,198	0,196	0,194	0,00529
62,5	0,193	0,209	0,213	0,205	0,01058

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3- abs media	abs sel-abs media
0,002	0,041	0,047	0,1493333
0,015	0,03	0,061	0,1493333
0,085	0,078	0,077	0,1493333
0,085	0,095	0,093	0,1493333
0,09	0,106	0,11	0,1493333

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
1,339286	27,45536	31,47321429	16,3618	20,08929
10,04464	20,08929	40,84821429	15,7093	23,66071
56,91964	52,23214	51,5625	2,91891	53,57143
56,91964	63,61607	62,27678571	3,54342	60,9375
60,26786	70,98214	73,66071429	7,08683	68,30357

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
145	212	284	214	69,6281

b. Konsentrasi 60%

Konsentrasi	Absorbansi	Rata-	Standar
-------------	------------	-------	---------

($\mu\text{g/ml}$)	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Rata	Deviasi (SD)
Kontrol sel	0,313	0,204	0,24	0,25233	0,05553
kontrol media	0,097	0,103	0,109	0,103	0,006
1000	0,168	0,129	0,119	0,13866	0,02589
500	0,156	0,14	0,11	0,13533	0,02335
250	0,158	0,166	0,153	0,159	0,00655
125	0,191	0,193	0,201	0,195	0,00529
62,5	0,219	0,199	0,21	0,20933	0,01001

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3- abs media	abs sel-abs media
0,065	0,026	0,016	0,1493333
0,053	0,037	0,007	0,1493333
0,055	0,063	0,05	0,1493333
0,088	0,09	0,098	0,1493333
0,116	0,096	0,107	0,1493333

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
43,52679	17,41071	10,7148571	17,3376	23,88393
35,49107	24,77679	4,65179	15,6377	21,65179
36,83036	42,1875	33,48214286	4,39114	37,5
58,92857	60,26786	65,625	3,54342	61,60714
77,67857	64,28571	71,65178571	6,70758	71,20536

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
259	161	154	191	58,9302

c. Konsentrasi 40%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata- Rata	Standar Deviasi (SD)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,313	0,204	0,24	0,25233	0,05553
kontrol media	0,097	0,103	0,109	0,103	0,006

1000	0,098	0,095	0,099	0,09733	0,00208
500	0,109	0,101	0,111	0,107	0,00529
250	0,135	0,142	0,127	0,13466	0,00750
125	0,168	0,16	0,16	0,16266	0,00461
62,5	0,211	0,2	0,182	0,19766	0,01464

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3-abs media	abs sel-abs media
-0,005	-0,008	-0,004	0,1493333
0,006	-0,002	0,008	0,1493333
0,032	0,039	0,024	0,1493333
0,065	0,057	0,057	0,1493333
0,108	0,097	0,079	0,1493333

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
-3,34821	-5,35714	-2,67857142	1,39397	-3,79464
4,017857	-1,33929	5,357142857	3,54342	2,678571
21,42857	26,11607	16,07142857	5,02604	21,20536
43,52679	38,16964	38,16964286	3,09295	39,95536
72,32143	64,95536	52,90178571	9,80366	63,39286

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
111	94	65	90	23,1335

2.2 Sel T47D

a. Konsentrasi 80%

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,637	0,648	0,649	0,64467	0,00665
kontrol media	0,101	0,108	0,109	0,106	0,00435
1000	0,098	0,092	0,11	0,1	0,00916
500	0,106	0,107	0,096	0,103	0,00608
250	0,107	0,108	0,103	0,106	0,00265

125	0,406	0,451	0,439	0,432	0,02330
62,5	0,562	0,554	0,524	0,54667	0,02003

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3-abs media	abs sel-abs media
-0,008	-0,014	0,004	0,53866667
0	0,001	-0,01	0,53866667
0,001	0,002	-0,003	0,53866667
0,3	0,345	0,333	0,53866667
0,456	0,448	0,418	0,53866667

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
-1,4851485	-2,5990099	0,742574257	1,701451	-1,1138614
0	0,18564356	-1,85643564	1,129226	-0,5569307
0,18564356	0,37128713	-0,55693069	0,491167	0
55,6930693	64,0470297	61,81930693	4,325933	60,519802
84,6534653	83,1683168	77,5990099	3,719054	81,8069307

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
131	135	122	129	69,6281

b. Konsentrasi 60%

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,637	0,648	0,649	0,64467	0,00665
kontrol media	0,101	0,108	0,109	0,106	0,00435
1000	0,099	0,095	0,097	0,097	0,002
500	0,107	0,105	0,095	0,10233	0,00642
250	0,102	0,126	0,097	0,10833	0,01550
125	0,352	0,351	0,336	0,34633	0,00896
62,5	0,559	0,567	0,571	0,56567	0,00611

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3-abs media	abs sel-abs media
------------------------	------------------------	------------------------	-------------------

-0,007	-0,011	-0,009	0,53866667
0,001	-0,001	-0,011	0,53866667
-0,004	0,02	-0,009	0,53866667
0,246	0,245	0,23	0,53866667
0,453	0,461	0,465	0,53866667

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
-1,299505	-2,0420792	-1,67079207	0,371287	-1,670792079
0,18564356	-0,1856436	-2,04207920	1,193521	-0,6806931
-0,7425743	3,71287129	-1,67079208	2,877974	0,43316832
45,6683168	45,4826733	42,6980198	1,663902	44,6163366
84,0965347	85,5816832	86,32425743	1,134301	85,3341584

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
114	119	113	115	3,392261

c. Konsentrasi 40%

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,637	0,648	0,649	0,64467	0,00665
kontrol media	0,101	0,108	0,109	0,106	0,00435
1000	0,096	0,102	0,108	0,102	0,006
500	0,097	0,122	0,107	0,10867	0,01258
250	0,117	0,103	0,107	0,109	0,00721
125	0,377	0,403	0,353	0,37766	0,02501
62,5	0,523	0,532	0,541	0,532	0,009

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3-abs media	abs sel-abs media
-0,01	-0,004	0,002	0,53866667
-0,009	0,016	0,001	0,53866667
0,011	-0,003	0,001	0,53866667
0,271	0,297	0,247	0,53866667

0,417	0,426	0,435	0,53866667
-------	-------	-------	------------

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
-1,8564356	-0,7425743	0,371287129	1,113861	-0,7425743
-1,6707921	2,97029703	0,185643564	2,335964	0,4950495
2,04207921	-0,5569307	0,185643564	1,338695	0,55693069
50,3094059	55,1361386	45,8539604	4,642327	50,4331683
77,4133663	79,0841584	80,7549505	1,670792	79,0841584

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
111	119	110	113	4,932883

2.3 Sel Vero

a. Konsentrasi 80%

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,19	0,185	0,186	0,187	0,00264
kontrol media	0,065	0,071	0,066	0,0673	0,00321
1000	0,068	0,061	0,063	0,064	0,00361
500	0,072	0,065	0,073	0,07	0,00435
250	0,196	0,183	0,204	0,19433	0,01059
125	0,209	0,204	0,234	0,21566	0,01607
62,5	0,229	0,226	0,242	0,23233	0,00850

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3-abs media	abs sel-abs media
0,000666667	-0,0063333	-0,0043333333	0,11966667
0,004666667	-0,0023333	0,005666667	0,11966667
0,128666667	0,11566667	0,136666667	0,11966667
0,141666667	0,13666667	0,166666667	0,11966667
0,161666667	0,15866667	0,174666667	0,11966667

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
--------------	--------------	--------------	----------------------	-------------------------

0,55710306	-5,2924791	-3,62116991	3,012995	-2,7855153
3,89972145	-1,9498607	4,735376045	3,642534	2,22841226
107,520891	96,6573816	114,2061281	8,856888	106,128134
118,384401	114,206128	139,275766	13,43127	123,955432
135,097493	132,590529	145,9610028	7,107159	137,883008

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
380	331	407	373	38,64325

b. Konsentrasi 60%

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi			Rata- Rata	Standar Deviasi (SD)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,19	0,185	0,186	0,187	0,00264
kontrol media	0,065	0,071	0,066	0,0673	0,00321
1000	0,058	0,06	0,058	0,05867	0,00115
500	0,066	0,074	0,063	0,06767	0,00568
250	0,203	0,194	0,207	0,20133	0,00665
125	0,227	0,216	0,21	0,21766	0,00862
62,5	0,232	0,224	0,223	0,22633	0,00493

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3- abs media	abs sel-abs media
-0,009333333	-0,0073333	-0,009333333	0,11966667
-0,001333333	0,00666667	-0,004333333	0,11966667
0,135666667	0,12666667	0,139666667	0,11966667
0,159666667	0,14866667	0,142666667	0,11966667
0,164666667	0,15666667	0,155666667	0,11966667

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
-7,7994429	-6,1281337	-7,79944289	0,964931	-7,2423398
-1,1142061	5,57103064	-3,62169916	4,751733	0,27855153
113,370474	105,849582	116,7130919	5,564062	111,977716
133,426184	124,233983	119,2200557	7,204745	125,626741

137.604457	130,91922	130,0835655	4,122186	132,869081
------------	-----------	-------------	----------	------------

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
376	367	360	368	8,077335

c. Konsentrasi 40%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar Deviasi (SD)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,19	0,185	0,186	0,187	0,00264
kontrol media	0,065	0,071	0,066	0,0673	0,00321
1000	0,061	0,057	0,057	0,05833	0,00231
500	0,07	0,074	0,079	0,07433	0,00450
250	0,199	0,182	0,184	0,18833	0,00929
125	0,2	0,219	0,194	0,20433	0,01305
62,5	0,239	0,233	0,202	0,22466	0,01985

Abs sampel 1-abs media	Abs sampel 2-abs media	Abs sampel 3- abs media	abs sel-abs media
-0,006333333	-0,0103333	-0,0103333333	0,11966667
0,002666667	0,00666667	0,011666667	0,11966667
0,131666667	0,11466667	0,116666667	0,11966667
0,132666667	0,15166667	0,126666667	0,11966667
0,171666667	0,16566667	0,134666667	0,11966667

viabilitas 1	viabilitas 2	viabilitas 3	standar deviasi (SD)	rat-rata viabilitas sel
-5,2924791	-8,6350975	-8,63509746	1,929862	-7,5208914
2,22841226	5,57103064	9,749303621	3,768175	5,84958217
110,027855	95,821727	97,49303621	7,764546	101,114206
110,86351	126,740947	105,8495822	10,90628	114,48468
143,454039	138,440111	112,5348189	16,59429	131,476323

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD
366	358	329	351	19,44642

Lampiran 3. Perhitungan Data

3.1 Rendemen ekstrak kasar

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{berathasil}}{\text{beratsampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{Rendemen} = \frac{263,935}{750} \times 100\% = 35,19\%$$

3.2 Rendemen fraksi

$$\% \text{Rendemen fraksi heksana} = \frac{263,935}{14} \times 100\%$$

$$\% \text{Rendemen} = 5,32\%$$

3.3 Jumlah sel

3.3.1 Sel T47D

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

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel per mL} &= \frac{568}{4} \times 10^4 \\ &= 142 \times 10^4 / \text{mL} \end{aligned}$$

3.3.2 Sel MCF-7

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

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel per mL} &= \frac{242}{4} \times 10^4 \\ &= 60,5 \times 10^4 / \text{mL} \end{aligned}$$

3.4 Viabilitas sel

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

3.5 Perhitungan nilai IC₅₀ tiap konsentrasi terhadap sel kaker T47D, MCF-7 dan sel vero.

3.5.1 Perhitungan nilai IC₅₀

a. Sel T47D

1. Konsentrasi 80%

$$-IC_{50} \ 1$$

$$y = -75,7301x + 209,4056$$

$$50 = -75,7301x + 209,4056$$

$$x = 2,117$$

$$IC_{50} = 131 \mu\text{g/ml}$$

$$-IC_{50} 2$$

$$y = -78,1969x + 216,5461$$

$$50 = -78,1969x + 216,5461$$

$$x = 2,129$$

$$IC_{50} = 135 \mu\text{g/ml}$$

$$-IC_{50} 3$$

$$y = -72,2149x + 200,7166$$

$$50 = -72,2149x + 200,7166$$

$$x = 2,087$$

$$IC_{50} = 122 \mu\text{g/ml}$$

2. Konsentrasi 60%

$$-IC_{50} 1$$

$$y = -71,8449x + 197,8615$$

$$50 = -71,8449x + 197,8615$$

$$x = 2,058$$

$$IC_{50} = 114 \mu\text{g/ml}$$

$$-IC_{50} 2$$

$$y = -73,3867x + 202,4867$$

$$50 = -73,3867x + 202,4867$$

$$x = 2,077$$

$$IC_{50} = 119 \mu\text{g/ml}$$

$$-IC_{50} 3$$

$$y = -73,325x + 200,5566$$

$$50 = -73,325x + 200,5566$$

$$x = 2,053$$

$$IC_{50} = 113 \mu\text{g/ml}$$

3. Konsentrasi 40%

-IC₅₀ 1

$$y = -67,1492x + 187,9434$$

$$50 = -67,1492x + 187,9434$$

$$x = 2,044$$

$$IC_{50} = 111 \mu\text{g/ml}$$

-IC₅₀ 2

$$y = -68,9288x + 193,33$$

$$50 = -68,9288x + 193,33$$

$$x = 2,074$$

$$IC_{50} = 119 \mu\text{g/ml}$$

-IC₅₀ 3

$$y = -66,374x + 185,9571$$

$$50 = -66,374x + 185,9571$$

$$x = 2,04$$

$$IC_{50} = 110 \mu\text{g/ml}$$

b. Sel MCF-7

1. Konsentrasi 80%

-IC₅₀ 1

$$y = -54,7228x + 168,3203$$

$$50 = -54,7228x + 168,3203$$

$$x = 2,1621$$

$$IC_{50} = 145 \mu\text{g/ml}$$

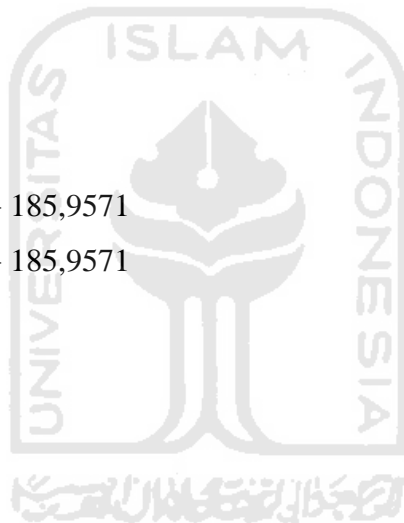
-IC₅₀ 2

$$y = -43,3779x + 150,8925$$

$$50 = -43,3779x + 150,8925$$

$$x = 2,3258$$

$$IC_{50} = 212 \mu\text{g/ml}$$



-IC₅₀ 3

$$y = -35,1472x + 136,2451$$

$$50 = -35,1472x + 136,2451$$

$$x = 2,454$$

$$IC_{50} = 284 \mu\text{g/ml}$$

2. Konsentrasi 60%

-IC₅₀ 1

$$y = -30,4757x + 123,57$$

$$50 = -30,4757x + 123,57$$

$$x = 2,414$$

$$IC_{50} = 259 \mu\text{g/ml}$$

-IC₅₀ 2

$$y = -42,933x + 144,7364$$

$$50 = -42,933x + 144,7364$$

$$x = 2,2066$$

$$IC_{50} = 161 \mu\text{g/ml}$$

-IC₅₀ 3

$$y = -60,729x + 182,8566$$

$$50 = -60,729x + 182,8566$$

$$x = 2,1877$$

$$IC_{50} = 154 \mu\text{g/ml}$$

3. Konsentrasi 40%

-IC₅₀ 1

$$y = -63,3984x + 179,6149$$

$$50 = -63,3984x + 179,6149$$

$$x = 2,044$$

$$IC_{50} = 111 \mu\text{g/ml}$$

-IC₅₀ 2

$$y = -59,8392x + 167,9997$$



$$50 = -59,8392x + 167,9997$$

$$x = 1,972$$

$$IC_{50} = 94 \mu\text{g/ml}$$

-IC₅₀ 3

$$y = -47,8269x + 136,6502$$

$$50 = -47,8269x + 136,6502$$

$$x = 1,812$$

$$IC_{50} = 65 \mu\text{g/ml}$$

c. Sel Vero

1. Konsentrasi 80%

-IC₅₀ 1

$$y = -127,4177x + 378,6319$$

$$50 = -127,4177x + 378,6319$$

$$x = 2,58$$

$$IC_{50} = 380 \mu\text{g/ml}$$

-IC₅₀ 2

$$y = -130,1937x + 379,439$$

$$50 = -130,1937x + 379,439$$

$$x = 2,52$$

$$IC_{50} = 331 \mu\text{g/ml}$$

-IC₅₀ 3

$$y = -144,0736x + 425,5913$$

$$50 = -144,0736x + 425,5913$$

$$x = 2,61$$

$$IC_{50} = 407 \mu\text{g/ml}$$

2. Konsentrasi 60%

-IC₅₀ 1

$$y = -141,2976x + 413,9207$$

$$50 = -141,2976x + 413,9207$$

$$x = 2,575$$

$$IC_{50} = 376 \mu\text{g/ml}$$

$$-IC_{50} 2$$

$$y = -130,4713x + 384,9514$$

$$50 = -130,4713x + 384,9514$$

$$x = 2,567$$

$$IC_{50} = 369 \mu\text{g/ml}$$

$$-IC_{50} 3$$

$$y = -132,4145x + 388,4412$$

$$50 = -132,4145x + 388,4412$$

$$x = 2,556$$

$$IC_{50} = 360 \mu\text{g/ml}$$

3. Konsentrasi 40%

$$-IC_{50} 1$$

$$y = -134,9128x + 395,7692$$

$$50 = -134,9128x + 395,7692$$

$$x = 2,563$$

$$IC_{50} = 367 \mu\text{g/ml}$$

$$-IC_{50} 2$$

$$y = -137,9664x + 402,423$$

$$50 = -137,9664x + 402,423$$

$$x = 2,554$$

$$IC_{50} = 358 \mu\text{g/ml}$$

$$-IC_{50} 3$$

$$y = -112,4274x + 332,9924$$

$$50 = -112,4274x + 332,9924$$

$$x = 2,517$$

$$IC_{50} = 329 \mu\text{g/ml}$$

3.6 Perhitungan Nilai SI (selectivity Indeks)

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

a. SI Terhadap Sel T47D

$$\text{Konsentrasi 80\%} = 373/129 = 2,9$$

$$\text{Konsentrasi 60\%} = 368/115 = 3,2$$

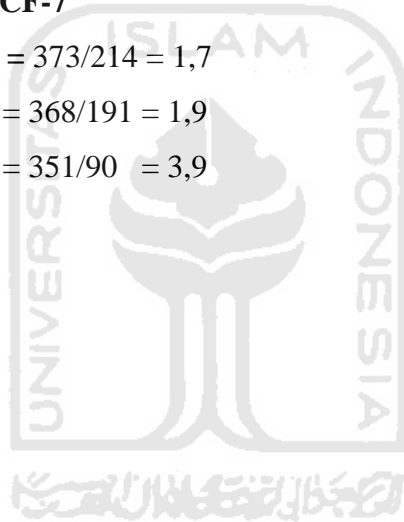
$$\text{Konsentrasi 40\%} = 351/113 = 3,1$$

b. SI Terhadap Sel MCF-7

$$\text{Konsentrasi 80\%} = 373/214 = 1,7$$

$$\text{Konsentrasi 60\%} = 368/191 = 1,9$$

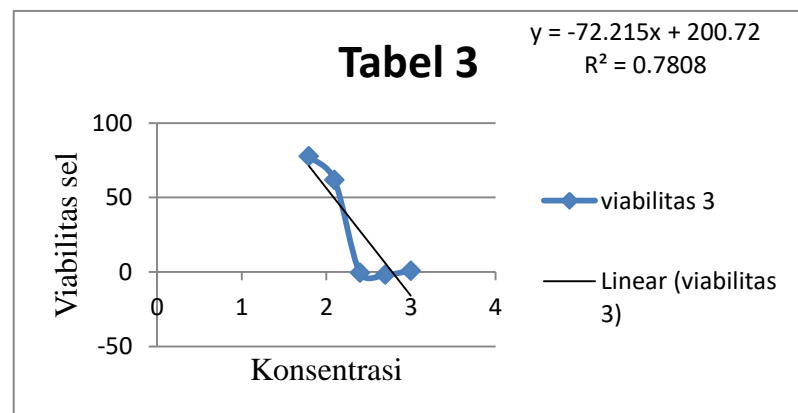
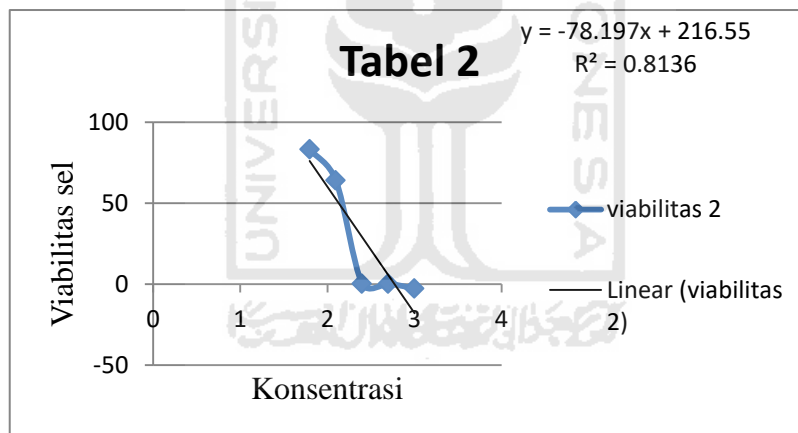
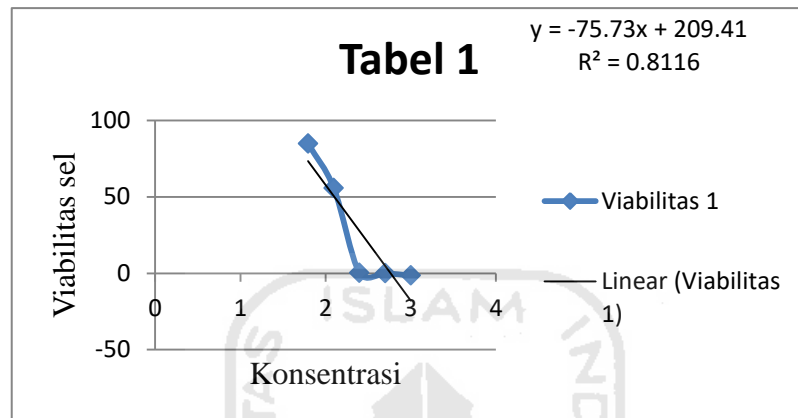
$$\text{Konsentrasi 40\%} = 351/90 = 3,9$$



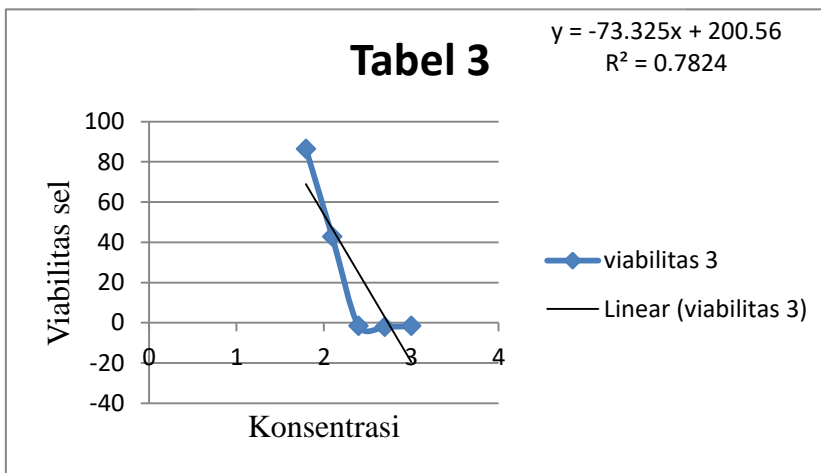
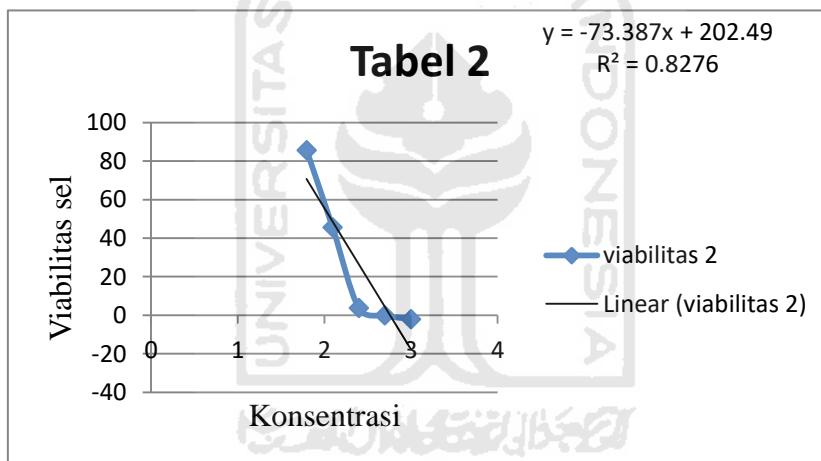
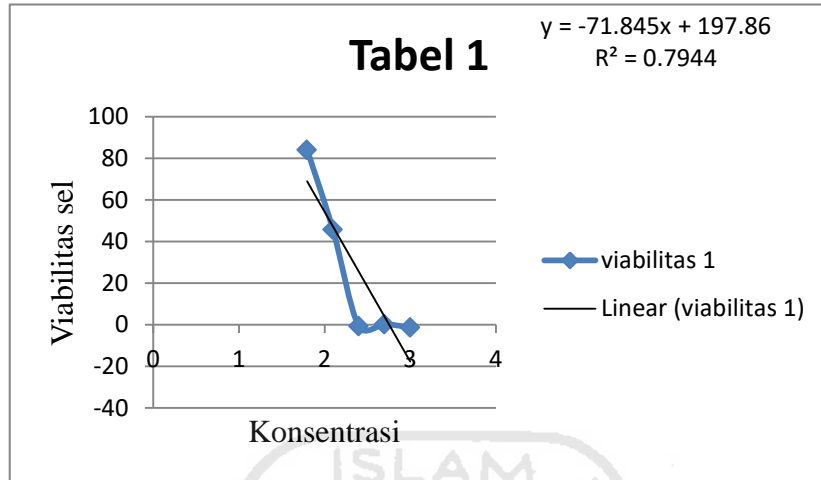
Lampiran 4. Grafik

4.1 Grafik hubungan konsentrasi sampel tiap formulasi terhadap Viabilitas sel kanker payudara T47D

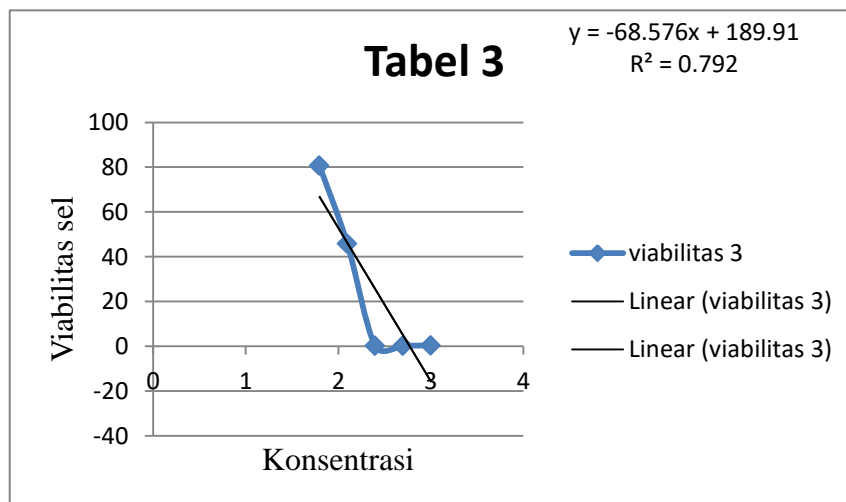
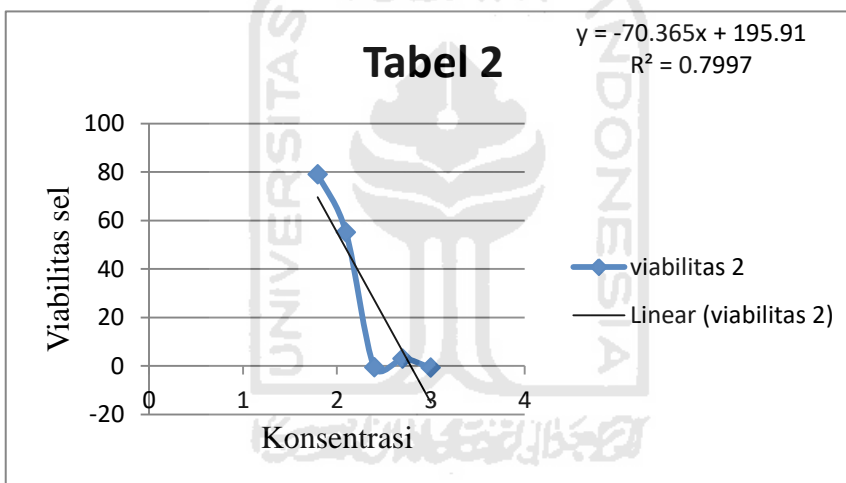
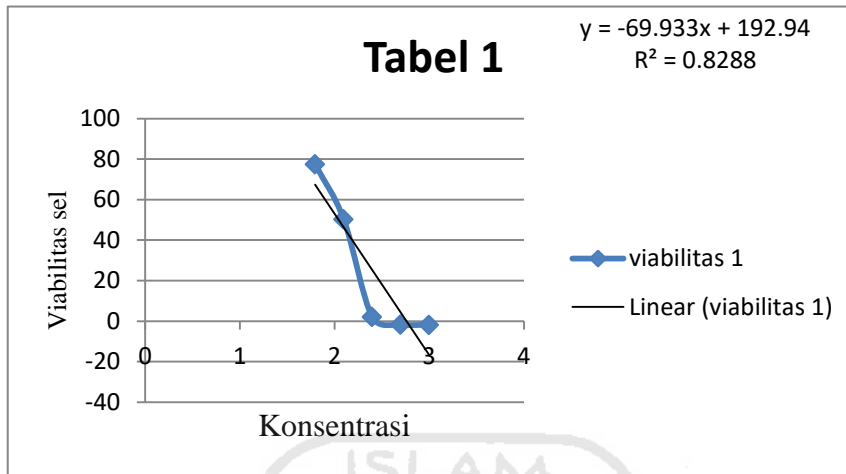
a. Konsentrasi 80%



b.Konsentrasi 60%

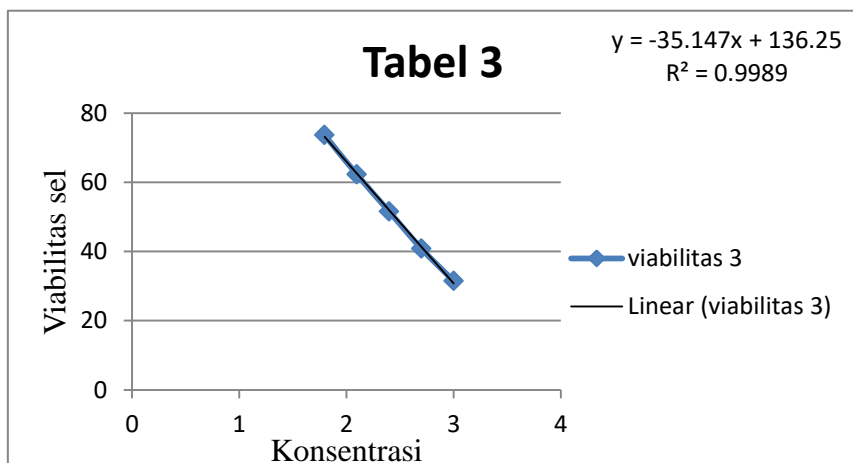
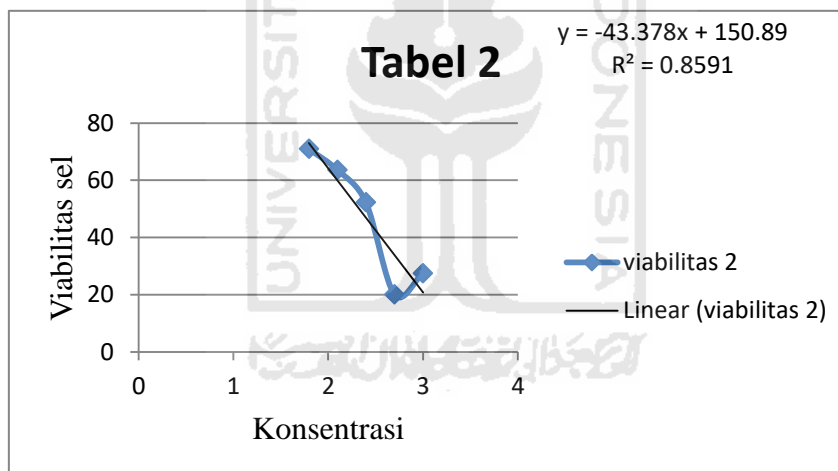
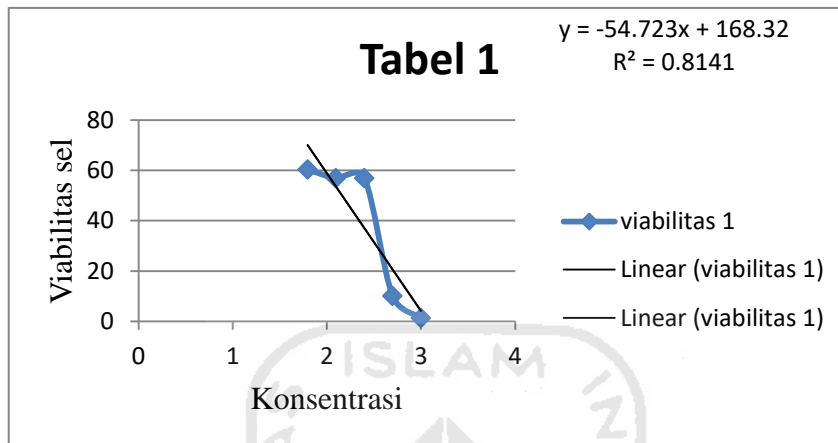


c.Konsentrasi 40%

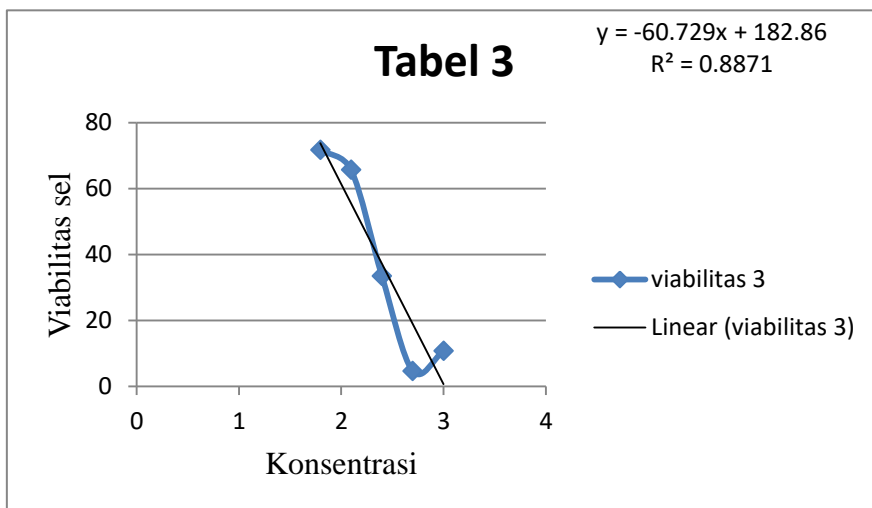
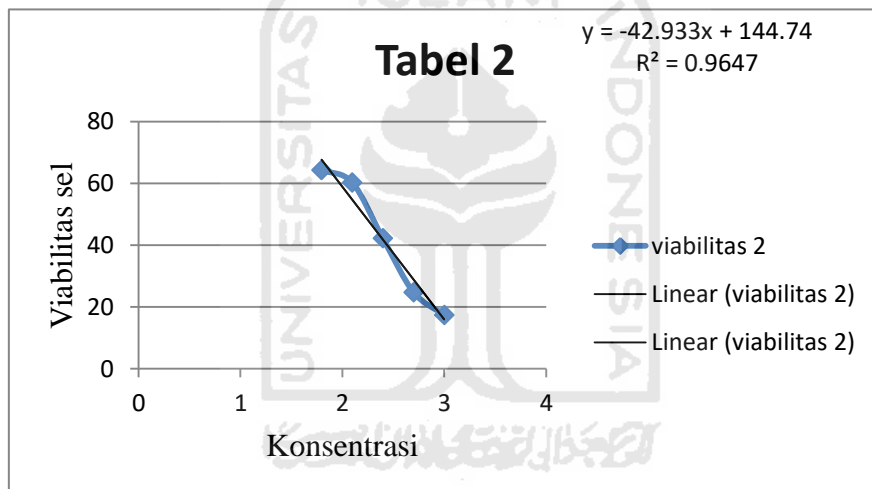
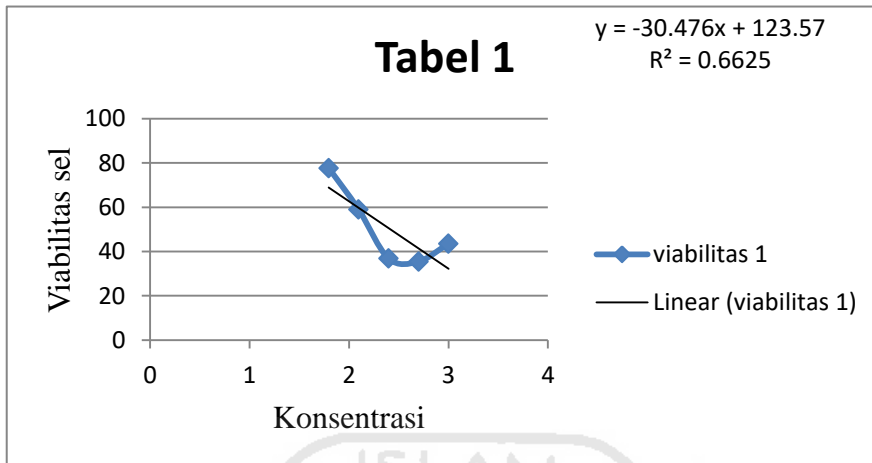


4.2 Grafik hubungan konsentrasi sampel tiap formulasi terhadap Viabilitas sel kanker payudara MCF-7

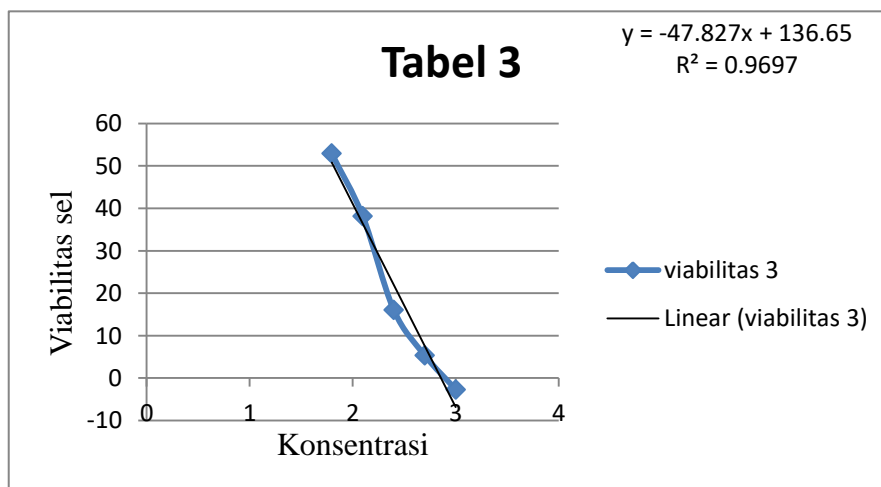
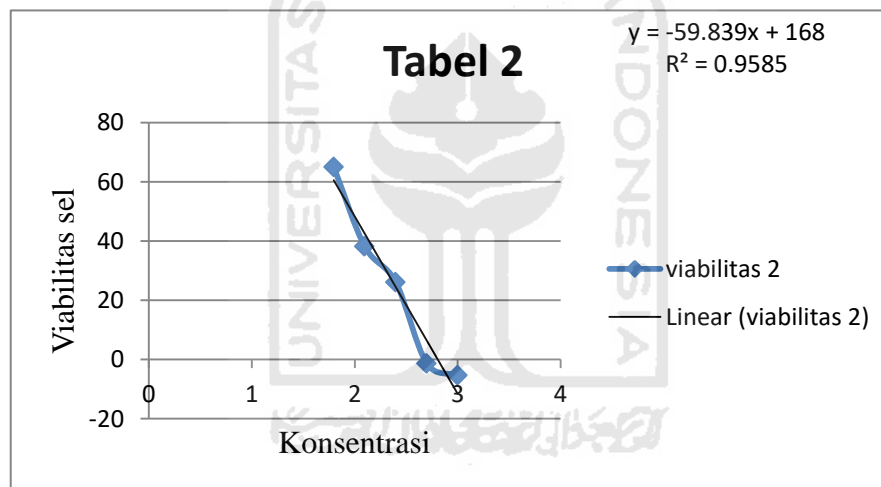
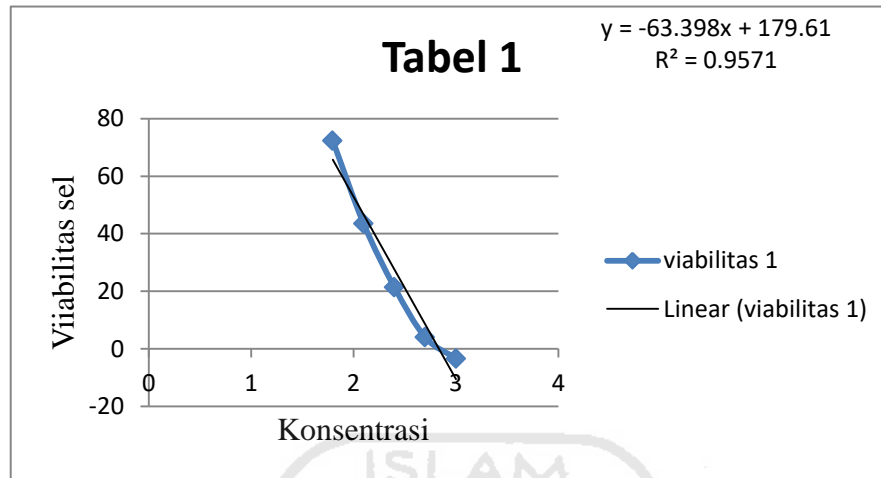
a. Konsentrasi 80%



b.Konsentrasi 60%

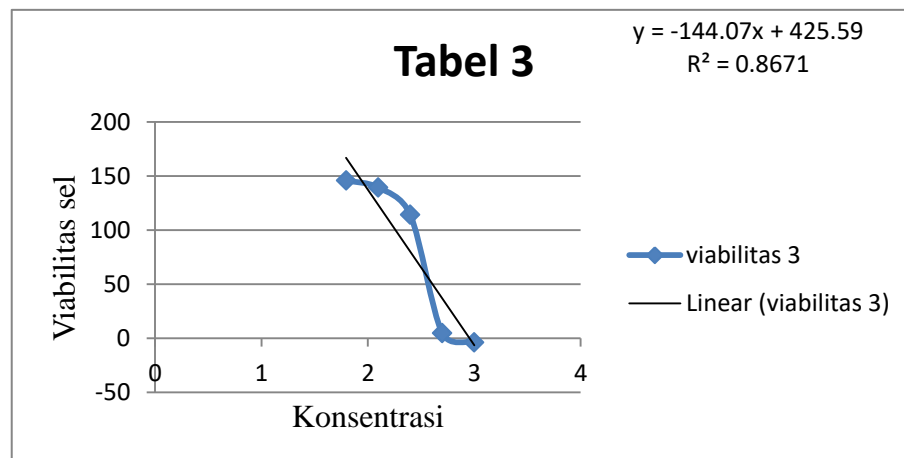
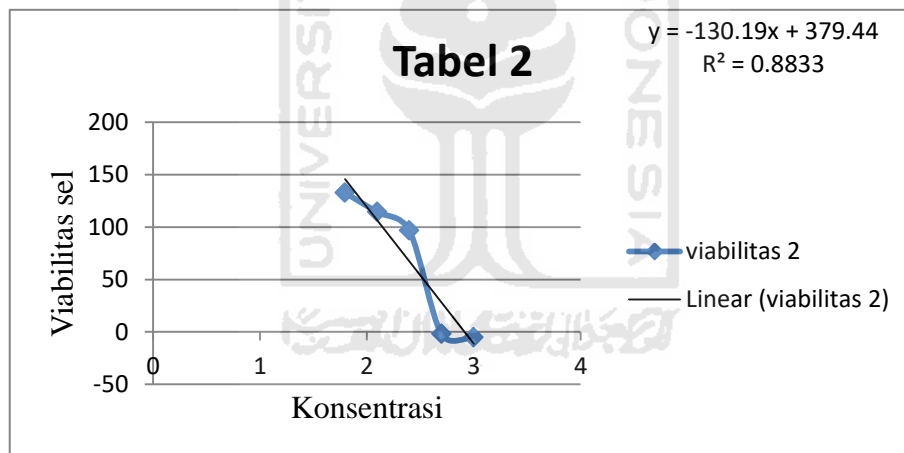
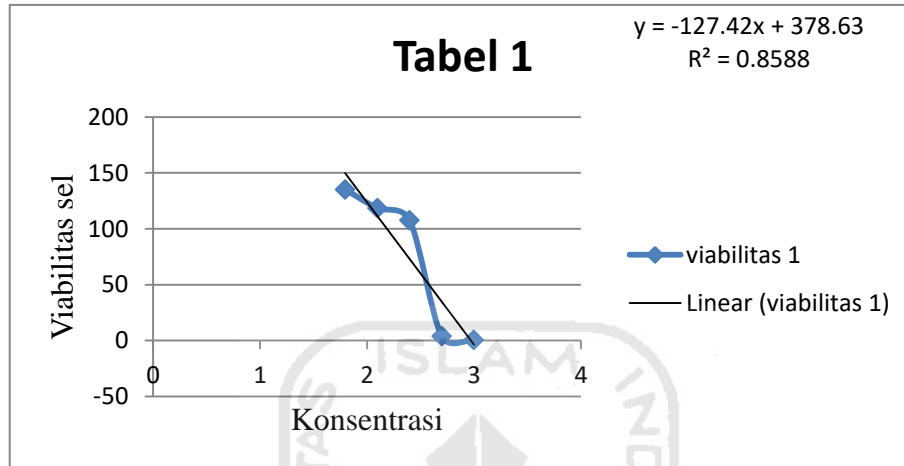


c.Konsentrasi 40%

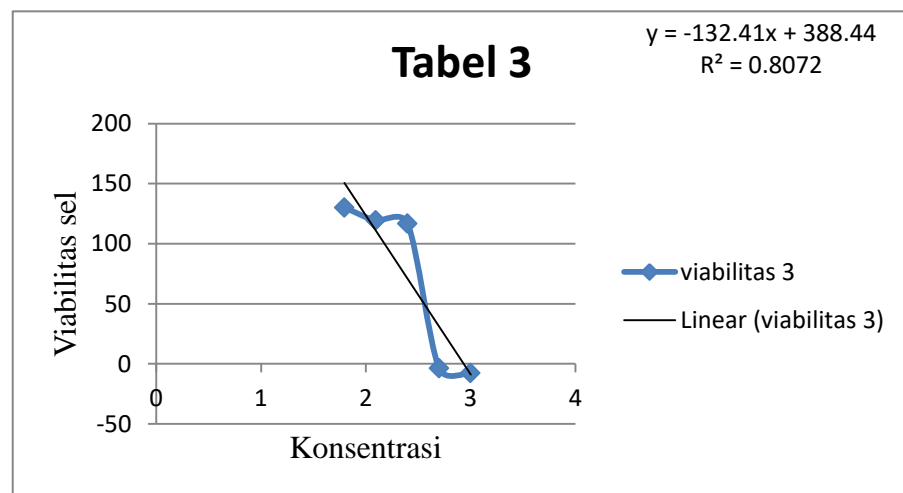
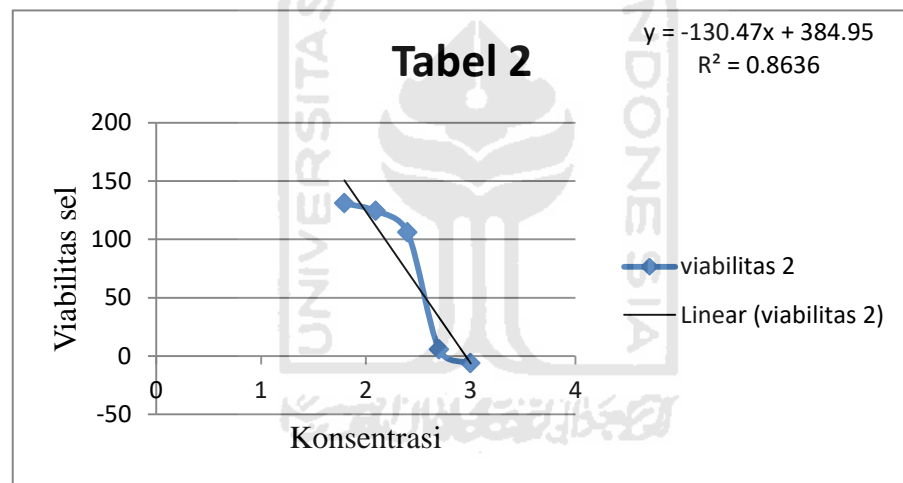
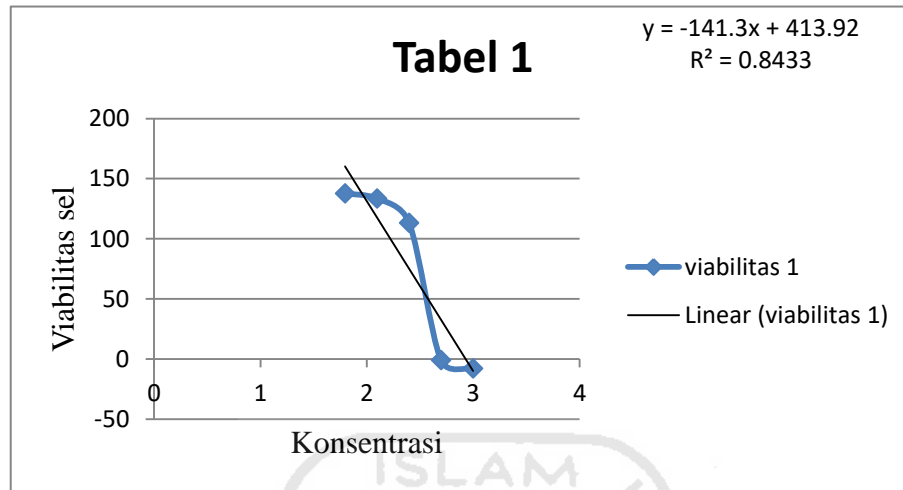


4.3 Grafik hubungan konsentrasi sampel tiap formulasi terhadap Viabilitas sel kanker payudara Vero

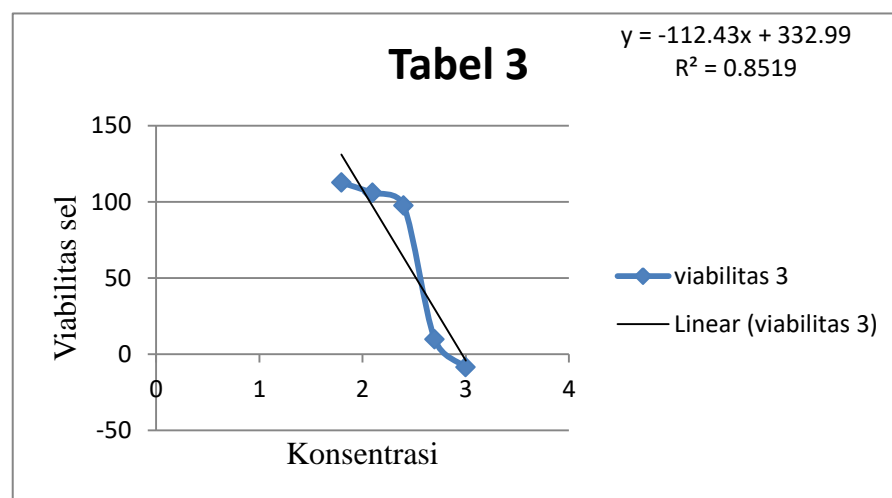
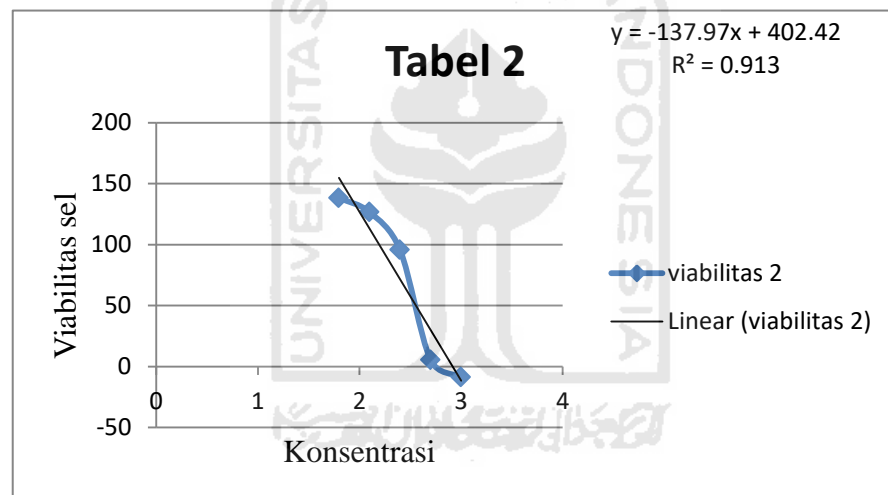
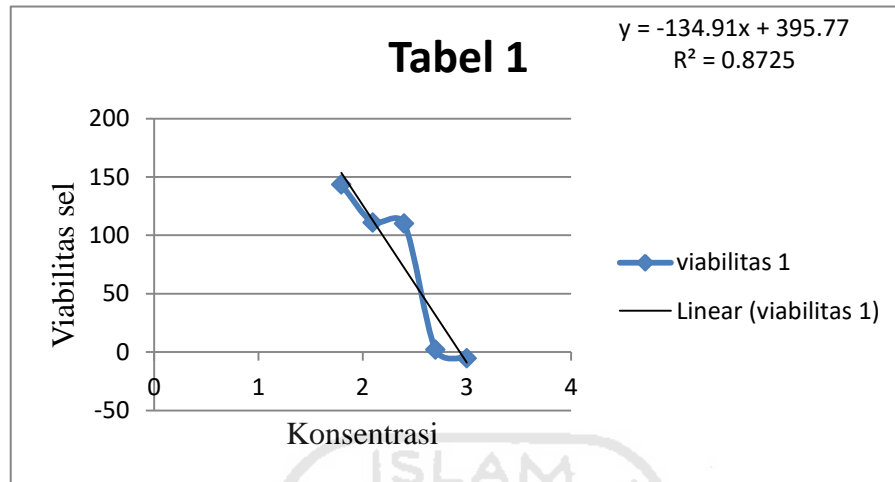
a. Konsentrasi 80%



b.Konsentrasi 60%



















c.Konsentrasi 40%

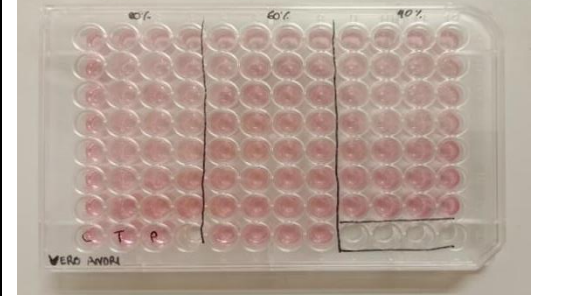
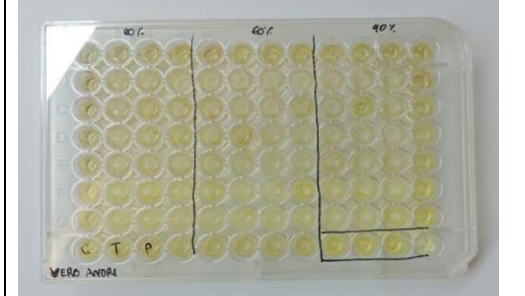
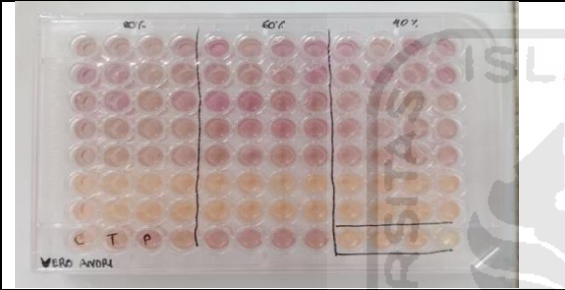
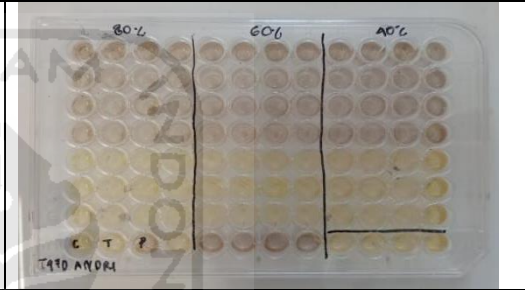
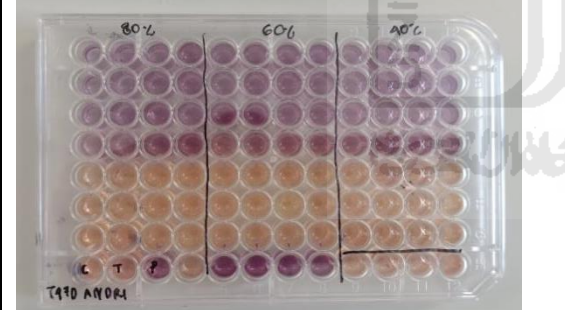
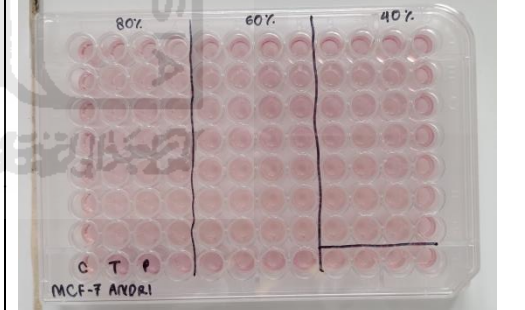
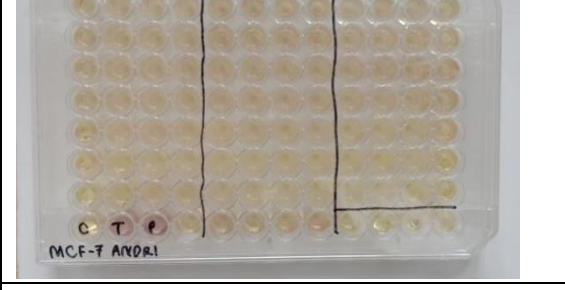
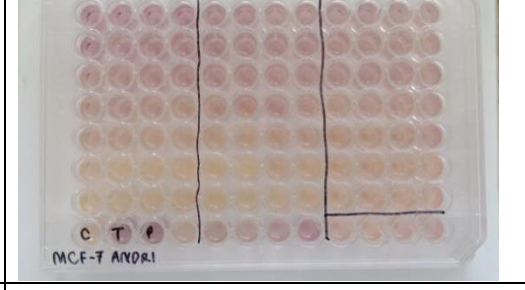


Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

5.1 Dokumentasi dari preparasi sampel-uji *in-vitro*

			
Daun Jambu Biji	Maserasi	Penyaringan	Hasil Maserasi
			
Evaporasi	Ekstrak	Silica Gel	Hasil Impregnasi
			
Fraksinasi	Hasil Fraksinasi	Ultrasonikator	Proses Sonikasi
			
Hasil Fraksinasi	Sediaan SNEDDS	Bahan SNEDDS	Sampel uji <i>in-vitro</i>

5.2 Plat 96 pada uji sitotoksitas

	
Tahap penumbuhan sel Vero	Sel Vero setelah MTT dan penambahan SDS
	
Sel Vero sebelum ELISA reader	Sel T47D setelah MTT dan penambahan SDS
	
Sel T47D sebelum ELISA reader	Tahap penumbuhan sel MCF-7
	
Sel MCF-7 setelah MTT dan penambahan SDS	Sel MCF-7 sebelum ELISA reader

Keterangan:

A1-A4 = 80% (konsentrasi: 15,625 μ g/ml)

B1-B4 = 80% (konsentrasi: 31,25 μ g/ml)

C1-C4 = 80% (konsentrasi : 62,5 μ g/ml)

D1-D4 = 80% (konsentrasi : 125 μ g/ml)

E1-E4 = 80% (konsentrasi: 250 μ g/ml)

F1-F4 = 80% (konsentrasi: 500 μ g/ml)

G1-G4 = 80% (konsentrasi:1000 μ g/ml)

A5-A8 = 60% (konsentrasi: 15,625 μ g/ml)

B5-B8 = 60% (konsentrasi: 31,25 μ g/ml)

C5-C8 = 60% (konsentrasi : 62,5 μ g/ml)

D5-D8 = 60% (konsentrasi : 125 μ g/ml)

E5-E8 = 60% (konsentrasi: 250 μ g/ml)

F5-F8 = 60% (konsentrasi: 500 μ g/ml)

G5-G8 = 60% (konsentrasi:1000 μ g/ml)

A9-A12 = 40% (konsentrasi: 15,625 μ g/ml)

B9-B12 = 40% (konsentrasi: 31,25 μ g/ml)

C9-C12 = 40% (konsentrasi : 62,5 μ g/ml)

D9-D12 = 40% (konsentrasi : 125 μ g/ml)

E9-E12 = 40% (konsentrasi: 250 μ g/ml)

F9-F12 = 40% (konsentrasi: 500 μ g/ml)

G9-G12 = 40% (konsentrasi:1000 μ g/ml)

H1 = Capryoll 90

H2 = Tween 20

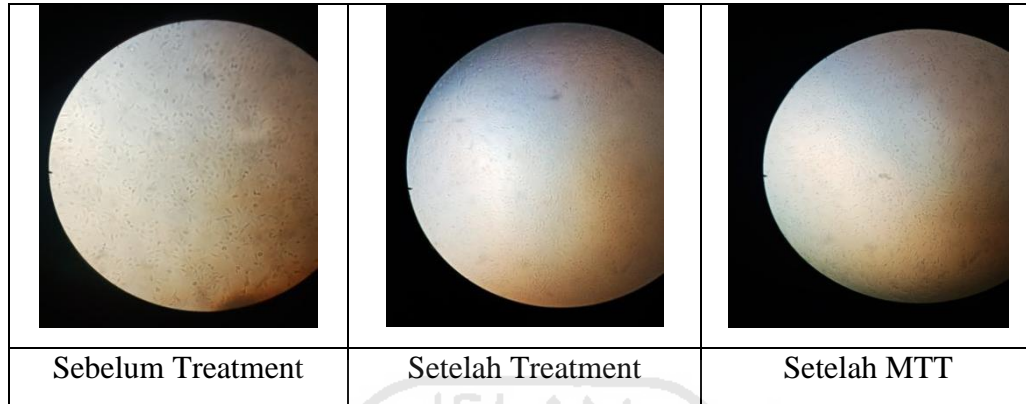
H3 = PEG 400

H5-H8 = Kontrol sel

H9-H12 = Kontrol media

5.3 Morfologi Sel

5.3.1 Sel Vero



5.3.2 Sel T47D



5.3.3 Sel MCF-7

