

**FORMULASI SEDIAAN NANOPARTIKEL FRAKSI ETIL
ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI (*Psidium
guajava* L.) DALAM BENTUK *Self-Nano Emulsifying Drug
Delivery System* (SNEDDS) DAN UJI AKTIVITASNYA
TERHADAP SEL MCF-7 DAN T47D MENGGUNAKAN
METODE MTT Assay**

SKRIPSI

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

Universitas Islam Indonesia

Yogyakarta



Disusun oleh:

CHOERUL NOOR HIDAYAT

No. Mhs : 16612090

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

**FORMULASI SEDIAAN NANOPARTIKEL FRAKSI ETIL
ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI (*Psidium
guajava L.*) DALAM BENTUK *Self-Nano Emulsifying Drug
Delivery System* (SNEDDS) DAN UJI AKTIVITASNYA
TERHADAP SEL MCF-7 DAN T47D MENGGUNAKAN
METODE MTT Assay**

SKRIPSI

yang diajukan oleh :

CHOERUL NOOR HIDAYAT

No. Mahasiswa : 16612090

Telah dipertahankan dihadapan dewan penguji skripsi
Program studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 16 juni 2020

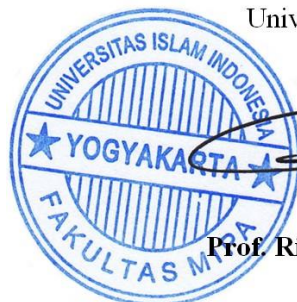
Dewan penguji

1. Nurcahyo Iman Prakoso, S.Si., M.Sc.
2. Dhina Fitriastuti, S.Si., M.Sc.
3. Dr. Habibi Hidayat, S.Pd., M.Si.
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 : Choerul Noor Hidayat
NIM : 16612090
Prodi/ Fakultas : Kimia/ MIPA
Judul Skripsi : Formulasi Sediaan Nanopartikel Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium Guajava* L.) dalam Bentuk *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dan Uji Aktivitasnya terhadap Sel Mcf-7 dan T47d menggunakan Metode MTT Assay

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini 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 tanggung jawab.

Yogyakarta, 10 juli 2020

Penulis,



Choerul Noor Hidayat

NIM. 16612090

HALAMAN PERSEMBAHAN

Sujud syukur kusembahkan kepada Allah, Tuhan pemberi nikmat kehidupan. Atas kehendakMu saya menjadi pribadi yang berpikir dan beriman. Suatu kesan tersendiri dapat menyelesaikan skripsi ini di tengah wabah COVID 19, kelak akan menjadi cerita bagi anak-anakku. Ku persembahkan karya ini untuk orang-orang yang mengenalku, dan secara khusus untuk orang-orang yang istimewa, yaitu:

1. Ayah dan ibuku yang telah banyak berkorban untuk hidupku, yang telah memberikan do`a dan dukungan dalam segala aktivitasku, adik-adikku tercinta yang tidak begitu membantu dan keluarga besar yang mencintaiku.
2. Seluruh guru-guruku di TK, SDN 002 Ranai, MTsN 02 Natuna, MAN 01 Natuna, segenap dosen Prodi Kimia FMIPA UII, dan khususnya bapak Nur Cahyo Iman Prakoso sebagai pembimbing I dan ibu Dhina Fitriastuti sebagai pembimbing II yang telah memberikan ilmu, bimbingan, dan dukungan.
3. Teman Kimia B 2016, anak-anak kontrakan, teman-teman KKN, dan teman-teman sepembimbingan yang sama-sama berjuang denganku.
4. Teman mabar yaitu, Rendi (kagura nyampah), Erdie (gesek dikit savage), Armyn (support baik hati), Lukman (suka ketiduran di tengah match), Ilham (gg by one sama turret), dan Arlin (gangguin orang lagi mabar aja) Ada hikmah dari lose streak yang kita dapat, yaitu kita dapat berhenti main dan mengerjakan laporan.
5. Dan kamu.

Semoga keberhasilan ini menjadi langkah awal untuk masa depanku dalam meraih cita-cita, aamiin....

KATA PENGANTAR

Segala puja dan puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat, hidayah, serta inayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“Formulasi Sediaan Nanopartikel Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Dalam Bentuk *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) Dan Uji Aktivitasnya Terhadap Sel MCF-7 Dan T47D Menggunakan Metode MTT Assay”**.

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat akademis yang harus ditempuh untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.

Atas bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Orang tua dan keluarga yang selalu memberikan doa, dukungan, dan semangat dalam penyusunan skripsi ini
2. Dr. Dwiarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia FMIPA UII.
3. Nurcahyo Iman Prakoso, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing I dan Dhina Fitriastuti, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, serta berbagai masukan dalam penyusunan skripsi.

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

Yogyakarta, 16 juni 2019

Penulis

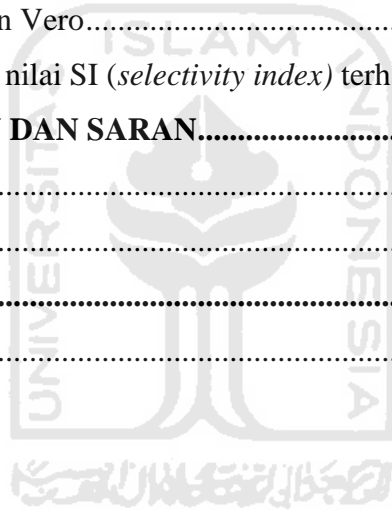
DAFTAR ISI

| | |
|--|-------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | ii |
| PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN | iii |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | iv |
| KATA PENGANTAR..... | v |
| DAFTAR ISI..... | vi |
| DAFTAR GAMBAR..... | x |
| DAFTAR TABEL | xii |
| INTISARI | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan masalah..... | 4 |
| 1.3 Tujuan penelitian..... | 4 |
| 1.4 Manfaat penelitian..... | 4 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 5 |
| 2.1 Kanker payudara | 5 |
| 2.2 Faktor resiko kemoterapi pada pasien kanker payudara | 5 |
| 2.3 Daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) sebagai antikanker..... | 6 |
| 2.4 Teknologi nanopartikel sebagai penghantaran obat..... | 8 |
| 2.5 <i>Self-nanoemulsifying drug delivery system</i> (SNEDDS)..... | 9 |
| 2.6 Uji aktivitas antikanker menggunakan metode MTT assay | 10 |
| BAB III DASAR TEORI | 12 |
| 3.1 Daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.)..... | 12 |
| 3.2 Maserasi dengan etanol 96% | 13 |
| 3.3 Fraksinasi dengan etil asetat..... | 14 |
| 3.4 <i>Self-nanoemulsifying drug delivery system</i> (SNEDDS)..... | 15 |
| 3.5 Kanker Payudara | 16 |
| 3.6 Sel MCF-7..... | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7 Sel T47D | 17 |
| 3.8 Sel vero..... | 18 |
| 3.9 Kemoterapi..... | 19 |
| 3.10 Pengujian sitotoksisitas secara <i>in vitro</i> | 19 |
| 3.11 Metode MTT assay | 20 |
| 3.12 ELISA reader..... | 22 |
| 3.13 <i>Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i> (LC-MS/MS) ..22 | |
| 3.13.1 <i>Liquid Chromatography</i> (LC) | 23 |
| 3.13.2 <i>Mass Spectrometry</i> (MS)..... | 24 |
| 3.14 <i>Transmission electron microscopy</i> (TEM) | 26 |
| 3.15 <i>Particle size analyzer</i> | 27 |
| 3.15.1 Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel..... | 27 |
| 3.15.2 Potensial zeta | 28 |
| 3.16 Hipotesis..... | 29 |
| BAB IV. METODE PENELITIAN | 30 |
| 4.1 Waktu dan tempat | 30 |
| 4.2 Alat dan bahan..... | 30 |
| 4.2.1 Alat | 30 |
| 4.2.2 Bahan | 30 |
| 4.3 Identifikasi variable | 31 |
| 4.4 Cara kerja | 31 |
| 4.4.1 Preparasi Sampel Daun Jambu Biji (<i>Psidium guajava</i> L.)..... | 31 |
| 4.4.2 Uji determinasi | 31 |
| 4.4.3 Ekstraksi dengan metode maserasi | 31 |
| 4.4.4 Fraksinasi..... | 32 |
| 4.4.5 Analisis dengan LC-MS/MS | 32 |
| 4.4.6 Penapisan fitokimia | 32 |
| 4.4.6.1 Uji alkaloid..... | 32 |
| 4.4.6.2 Uji flavonoid | 33 |
| 4.4.6.3 Uji tanin/polifenol | 33 |
| 4.4.6.4 Uji terpenoid..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.7 Pembuatan SNEDDS | 33 |
| 4.4.8 Uji PSA..... | 34 |
| 4.4.8.1 Ukuran partikel..... | 34 |
| 4.4.8.2 Potensial zeta..... | 34 |
| 4.4.9 Uji TEM..... | 34 |
| 4.4.10 Uji aktivitas antikanker secara <i>in vitro</i> (CCRC, 2009)..... | 34 |
| 4.4.10.1 Penyiapan sel..... | 34 |
| 4.4.10.2 Panel sel | 35 |
| 4.4.10.3 Penghitungan sel kanker | 35 |
| 4.4.10.4 Peletakan sel pada plate | 35 |
| 4.4.10.5 Pembuatan larutan sampel dan pemberian larutan sampel pada plate..... | 36 |
| 4.4.10.6 Penambahan larutan MTT dan pembacaan absorbansi.... | 36 |
| BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN | 38 |
| 5.1 Determinasi tanaman..... | 38 |
| 5.2 Preparasi sampel..... | 38 |
| 5.3 Ekstraksi daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.)..... | 38 |
| 5.4 Fraksinasi ekstraksi etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.)..... | 40 |
| 5.5 Skrining fitokimia Fitokimia..... | 41 |
| 5.5.1 Uji alkaloid | 42 |
| 5.5.2 Uji flavonoid..... | 42 |
| 5.5.3 Uji tanin/polifenol..... | 43 |
| 5.5.4 Uji Terpenoid..... | 44 |
| 5.6 Analisis kandungan senyawa dalam fraksi etil asetat ekstrak atanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) menggunakan LC-MS/MS..... | 46 |
| 5.7 Pembuatan SNEDDS fraksi etil asetat ekstrak atanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.)..... | 57 |
| 5.8 Karakterisasi SNEDDS fraksi etil asetat ekstrak atanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) | 60 |
| 5.8.1 Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel | 60 |
| 5.8.2 Potensial zeta | 61 |

| | |
|--|-----------|
| 5.8.3 Morfologi..... | 62 |
| 5.9 Pengujian sitotoksitas secara <i>in vitro</i> dengan metode MTT assay..... | 64 |
| 5.9.1 Penentuan nilai IC ₅₀ Formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel T47D | 69 |
| 5.9.2 Penentuan nilai IC ₅₀ Formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel MCF-7 | 71 |
| 5.9.3 Penentuan nilai IC ₅₀ Formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel vero..... | 72 |
| 5.9.4 Pengaruh konsentrasi fraksi dan ukuran partikel terhadap IC ₅₀ ... | 73 |
| 5.9.5 Kontrol negatif capryoll, tween 20 dan PEG terhadap sel T47D, MCF-7 dan Vero..... | 74 |
| 5.9.6 Penentuan nilai SI (<i>selectivity index</i>) terhadap sel vero | 75 |
| BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 77 |
| 6.1 Kesimpulan | 77 |
| 6.2 Saran | 77 |
| DAFTAR PUSTAKA | 78 |
| LAMPIRAN..... | 91 |



DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 1. Struktur senyawa yang terdapat pada daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) | 8 |
| Gambar 2. Daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.)..... | 13 |
| Gambar 3. Ilustrasi konsep sistem penghantaran obat auto nanoemulsikasi (Martien dkk., 2012) | 15 |
| Gambar 4. Morfologi sel MCF-7 (CCRC, 2009)..... | 17 |
| Gambar 5. Morfologi sel T47D (CCRC, 2009) | 18 |
| Gambar 6. Morfologi sel vero (Sons, 2008) | 19 |
| Gambar 7. Reaksi Reduksi MTT menjadi Formazan (Doyle dan Grifliths, 2000) | 21 |
| Gambar 8. Aplikasi dari berbagai teknik ionisasi LC-MS/MS (Agilent, 2001) | 25 |
| Gambar 9. Prinsip kerja TEM (Woodford, 2017)..... | 26 |
| Gambar 10. Reaksi alkaloid dengan pereaksi <i>Dragendorf</i> (Setyowati dkk., 2014) | 42 |
| Gambar 11. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat (Marliana, 2005) | 43 |
| Gambar 12. Reaksi tanin/polifenol dengan FeCl ₃ (Perronn dan Brumaghim, 2009) | 44 |
| Gambar 13. Reaksi terpenoid dengan pereaksi Liebermann Burchard (Setyowati dkk., 2014) | 45 |
| Gambar 14. Kromatogram fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.)..... | 47 |
| Gambar 15. Kromatogram senyawa yang teridentifikasi oleh LC-MS/MS, (A) waktu retensi 10.73 (B) 10.55 (C) 10.28 (D) 6.88 (E) 5.46.. | 48 |
| Gambar 16. Spektrum massa senyawa kandidat C ₃₅ H ₄₂ O ₉ ,(A) <i>Low energy</i> (B) <i>High energy</i> | 50 |
| Gambar 17. Struktur senyawa taxinine | 51 |

| | |
|--|----|
| Gambar18. Spektrum massa senyawa kandita $C_{26}H_{48}O_{15}$, (A) <i>low energy</i> (B) <i>high energy</i> | 52 |
| Gambar 19. Struktur senyawa oktil 4-O-[2-O-(α -L-fukopiranosil)- β -D-galaktopiranosil]- β -D-glukopiranosida | 53 |
| Gambar 20. Spektrum massa senyawa kandidat $C_{34}H_{40}O_9$, (A) <i>low energy</i> (B) <i>high energy</i> | 53 |
| Gambar 21. Struktur senyawa 17-hidroksiingenol | 54 |
| Gambar 22. Spektrum massa kuersetin, (A) <i>low energy</i> (B) <i>high energy</i> | 55 |
| Gambar 23. Struktur senyawa kuersetin | 55 |
| Gambar 24. Spektrum massa kuersetin-3-O- α -L-arabinopiranosida, (A) <i>low energy</i> (B) <i>high energy</i> | 56 |
| Gambar 25. Struktur senyawa kuersetin-3-O- α -L-arabinopiranosida | 57 |
| Gambar 27. Struktur capryoll, tween 20 dan PEG..... | 58 |
| Gambar 27. Ilustrasi terbentuknya nanoemulsi (Kumar dkk., 2013)..... | 59 |
| Gambar 28. Hasil analisis TEM dengan perbesaran hingga 150.000 kali, (A) Globul (B) Air | 63 |
| Gambar 29. Morfologi Sel sebelum dilakukan <i>treatment</i> , (A) T47D (B) MCF-7 dan (C) vero | 65 |
| Gambar 30. Morfologi Sel setelah dilakukan <i>treatment</i> dengan Formulasi 80% pada konsentrasi 1000 μ g/mL, (A) T47D (B) MCF-7 dan (C) vero..... | 66 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 1. Variabel penelitian | 31 |
| Tabel 2. Hasil rendemen ekstrak etanol daun jambu biji | 39 |
| Tabel 3. Hasil pemeriksaan organolepsi ekstrak etanol daun jambu biji | 39 |
| Tabel 4. Hasil rendemen fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji | 40 |
| Tabel 5. Hasil pemeriksaan organolepsi fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji | 40 |
| Tabel 6. Hasil skrining fitokimia | 41 |
| Tabel 7. Hasil analisis LC-MS/MS dengan sumber pengionan positif | 49 |
| Tabel 8. Hasil karakterisasi ukuran dan distribusi ukuran partikel formulasi SNEDDS dengan PSA | 60 |
| Tabel 9. Hasil karakterisasi zeta potensial formulasi SNEDDS dengan PSA. | 62 |
| Tabel 10. Hasil pengujian aktivitas antikanker formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel T47D | 69 |
| Tabel 11. Hasil pengujian aktivitas antikanker formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel MCF-7 | 71 |
| Tabel 12. Hasil pengujian aktivitas antikanker formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel vero | 72 |
| Tabel 13. Hubungan konsentrasi fraksi dan ukuran partikel dengan IC ₅₀ | 73 |
| Tabel 14. Kontrol negatif capryoll, tween 20 dan PEG terhadap sel T47D, MCF-7 dan Vero..... | 74 |
| Tabel 15. Nilai SI (<i>Selectivity Index</i>) formulasi 40%, 60% dan 80% | 75 |

**FORMULASI SEDIAAN NANOPARTIKEL FRAKSI ETIL
ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI (*Psidium
guajava* L.) DALAM BENTUK *Self-Nano Emulsifying Drug
Delivery System* (SNEDDS) DAN UJI AKTIVITASNYA
TERHADAP SEL MCF-7 DAN T47D MENGGUNAKAN
METODE MTT Assay**

INTISARI

Choerul Noor Hidayat
NIM 16612090

Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) telah terbukti memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan MCF-7. Namun dalam penerapannya sebagai obat antikanker masih kurang efisien dan efektif. Oleh karena itu pada penelitian ini obat tersebut diubah dalam bentuk nanopartikel. Proses ekstraksi daun jambu biji dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Dilanjutkan dengan fraksinasi dengan metode kromatografi kolom menggunakan pelarut etil asetat. Hasil analisis dengan LC-MS/MS menunjukkan senyawa yang terdapat dalam fraksi adalah senyawa kandidat C₃₅H₄₂O₉, senyawa kandidat C₂₆H₄₈O₁₅, senyawa kandidat C₃₄H₄₀O₉, kuersetin dan kuersetin-3-O- α -L-arabinopiranosida. Pembuatan nanopartikel menggunakan metode *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dengan perbandingan minyak:surfaktan:ko-surfaktan (10:70:20) serta penambahan fraksi sebanyak 40%, 60% dan 80%. Hasil Analisis dengan PSA secara berturut-turut menunjukkan ukuran partikel sebesar 170,8 nm; 671,0 nm dan 470,2 nm, indeks polidispers sebesar 0,516; 0,206 dan 0,381, potensial zeta sebesar -32,23; -7,86 dan -26,3, serta hasil analisis dengan TEM menunjukkan globul berbentuk sferis dengan distribusi cukup merata. Formulasi 40% dan 60% telah memenuhi ukuran nanoemulsi karena memiliki ukuran droplet 50-500 nm. Berdasarkan uji sitotoksitas secara *in vitro* menggunakan metode MTT assay nilai IC₅₀ yang diperoleh formulasi 40%, 60%, dan 80% terhadap sel T47D secara berturut-turut sebesar 366,43; 446,68 dan 380,189 μ g/mL, terhadap sel MCF-7 sebesar 743,019; 829,85 dan 776,24 μ g/mL dan terhadap sel vero sebesar 818,46; 912,01 dan 837,529 μ g/mL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa seluruh formulasi memiliki sitotoksitas moderat (100 μ g/mL < IC₅₀ < 1000 μ g/mL) terhadap seluruh sel, dan dapat disimpulkan bahwa formulasi tersebut berbahaya bagi sel vero karena memiliki indeks selektivitas di bawah 3.

Kata kunci: fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS), sitotoksitas, sel T47D, sel MCF-7 dan sel vero

**FORMULATION OF NANOPARTICLES FROM ETHYL
ACETATE FRACTION OF GUAVA LEAVES (*Psidium guajava*.
L) ETHANOL EXTRACT IN THE FORM OF Self-Nano
Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) AND ITS
ACTIVITIES TEST ON MCF-7 AND T47D CELLS USING THE
MTT Assay METHOD**

ABSTRACT

Choerul Noor Hidayat
NIM 16612090

guava leaves (*psidium guajava*. L) has been proven to have cytotoxic activity on mcf-7 and t47d cells. but in its application as anticancer drug are still less efficient and effective. therefore on research the drug changed in the form of nanoparticle. The extraction process of guava leaves is done by maceration method with ethanol 96% solvent. Followed by fractionation with column chromatography method using ethyl acetate solvent. Result of analysis with lc-ms/ms show the compounds contained in the fraction is Candidate Mass C₃₅H₄₂O₉, Candidate Mass C₂₆H₄₈O₁₅, Candidate Mass C₃₄H₄₀O₉, Quercetin and Quercetin-3-O- α -L- arabinopyranoside. Preparation of nanoparticle using the *Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) method with ratio of oil:surfactant:co-surfactant (10:70:20) and the addition of fractions as much as 40%, 60% and 80%. Result of analysis with PSA respectively showed particle size of 170.8 nm; 671.0 nm and 470.2 nm, polydispers index of 0.516; 0.206 and 0.381, zeta potential of -32.23; -7.86 and -26.3, and the results of the analysis with TEM showed spherical globules with fairly even distribution. Formulations 40% and 60% have met the nanoemulsion size because it has a droplet size of 50-500 nm. Based on in vitro cytotoxicity test using the MTT assay method IC₅₀ values obtained formulations of 40%, 60%, and 80% of T47D cells respectively 366.43; 446.68 and 380.189 μ g/mL, against MCF-7 cells of 743.019; 829.85 and 776.24 μ g/mL and against vero cells 818.46; 912.01 and 837.529 μ g/mL. These results indicate that all formulations have moderate cytotoxicity (100 μ g/mL <IC₅₀ <1000 μ g/mL) to all cells, and it can be concluded that the formulation is dangerous for vero cells because it has a selectivity index under 3.

Keywords: Ethyl acetate fraction of guava leaves (*Psidium guajava* L.) ethanol extract, Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS), cytotoxicity, T47D cells, MCF-7 cells and vero cell

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh tidak normal (tumbuh sangat cepat dan tidak terkendali), menginfiltrasi/ merembes, dan menekan jaringan tubuh sehingga mempengaruhi organ tubuh (Akmal dan Zely, 2010). Kanker hingga saat ini menjadi masalah kesehatan di dunia termasuk Indonesia. Jenis kanker yang banyak diderita dan ditakuti oleh perempuan adalah kanker payudara. Pada umumnya kanker payudara menyerang kaum wanita, kemungkinan menyerang kaum laki-laki sangat kecil yaitu 1 : 1000 (Mulyani, 2013).

Survei yang dilakukan WHO menyatakan 8-9 % wanita mengalami kanker payudara. Hal itu membuat kanker payudara sebagai jenis kanker yang paling banyak ditemui pada wanita setelah kanker leher rahim (Depkes RI, 2013) Berdasarkan estimasi *Globocan, International Agency for Research on Cancer* (IARC) tahun 2012, kanker payudara adalah kanker dengan persentase kasus baru tertinggi (43,3%) dan persentase kematian tertinggi (12,9%) pada perempuan di dunia. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar tahun 2013, prevalensi kanker payudara di Indonesia mencapai 0,5 per 1000 perempuan (Kemenkes RI, 2015). Berdasarkan data dari Sistem Informasi Rumah Sakit tahun 2010, kanker payudara adalah jenis kanker tertinggi pada pasien rawat jalan maupun rawat inap yakni mencapai 12.014 orang (28,7%) (Kemenkes RI, 2014).

Banyak usaha yang dilakukan oleh pasien kanker payudara untuk melakukan pengobatan mulai dari pengangkatan payudara, radiasi, kemoterapi sampai imunoterapi (Mardiana, 2007). Namun metode yang paling umum digunakan adalah kemoterapi. Kemoterapi adalah tindakan atau terapi pemberian senyawa kimia (obat kanker) dalam bentuk cair, kapsul atau melalui infus yang bertujuan membunuh sel kanker, namun tidak hanya sel kanker yang terbunuh, tetapi juga sel-sel normal yang ada di seluruh tubuh juga dapat terbunuh, Sehingga dapat menimbulkan efek samping seperti mual, rambut rontok dan kelelahan

(Kartikawati, 2013). Untuk mengatasi permasalahan ini diperlukan suatu pengembangan obat yang selektif terhadap sel kanker payudara namun tidak menimbulkan kerusakan pada sel normal.

Dalam pengembangan obat biasanya diperoleh dari isolasi bahan aktif dalam tanaman obat atau dengan sintesis senyawa analog dari bahan alamnya. Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) telah banyak digunakan sebagai agen terapi terhadap kanker payudara, diantaranya penelitian yang dilakukan oleh Widyasari (2019) yang menguji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji terhadap sel MCF-7 secara *in vitro* diperoleh nilai IC_{50} sebesar 320,44; 71,473; 202,163; dan 244,054 $\mu\text{g/mL}$. Dwitiyanti (2015) telah menguji aktivitas ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D secara *in vitro* diperoleh nilai IC_{50} sebesar 27,54 $\mu\text{g/mL}$. Nita (2019) telah menguji aktivitas fraksi etanol, etil asetat dan n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel T47D, MCF-7 dan HeLa secara *in vitro* diperoleh nilai IC_{50} untuk sel T47D secara berturut-turut sebesar 236,15; 21,68 dan 6,95 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan untuk sel MCF-7 sebesar 22,61; 31,02 dan 4,38 $\mu\text{g/mL}$, dan untuk sel HeLa sebesar 143,34; 217,59 dan 85,98 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) memiliki potensi sebagai antikanker payudara.

Melihat dari beberapa penelitian terdahulu maka pada penelitian ini akan memanfaatkan daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) sebagai agen antikanker terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan T47D. Selain itu, digunakan daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) karena keberadaannya yang sangat melimpah di Indonesia dan belum dimanfaatkan secara optimal. Kandungan senyawa bioaktif daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang diketahui aktif sebagai antikanker adalah katekin, galangin, asam homogentisat, asam galat, kaempferol dan sianidin 3-glukosida (Chen dkk., 2007). Polifenol yang terkandung dalam daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan karena sifat antikanker yang baik. Sebagian besar flavonoid dari daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terbukti menghambat proliferasi berbagai jenis sel kanker (Braga dkk., 2014).

Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang digunakan adalah fraksi semipolarnya, yaitu fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), sehingga diperlukan maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan fase gerak etil asetat. Tujuan fraksinasi untuk mengelompokkan kandungan senyawa pada ekstrak yang didasarkan pada kepolarannya. Sedangkan dipilih fraksi etil asetat karena senyawa pada fraksi semipolar lebih banyak dari pada fraksi polar dan non polar. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Maharani (2017) menunjukkan bahwa fraksi etanol-air (polar), etil asetat (semi polar) dan n-heksana (non polar) daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) memiliki rendemen sebesar 28,12%, 47% dan 11,38%. Nita (2019) memperoleh fraksi etanol, etil asetat dan n-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) sebesar 74,67%, 2,08% dan 0,91%.

Bahan aktif yang terdapat pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) diubah dalam sediaan nanopartikel, karena ukuran nano memiliki banyak kelebihan. Beberapa kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal (Buzea dkk., 2007), karena ukurannya yang nano dapat mengatasi kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, dan memodifikasi sistem penghantaran obat sehingga obat dapat langsung menuju daerah yang spesifik (Mohanraj dan Chen, 2006). Berdasarkan penelitian Fitria (2017) yang memformulasikan meloksikam menjadi bentuk sediaan SNEDDS dapat meningkatkan kelarutannya, dengan waktu emulsifikasi sebesar 20,6 detik, *drug loading* sebesar 26,52 ppm dan % transmisi sebesar 47,86%.

Untuk mengetahui besarnya potensi aktivitas bahan alam dapat dilakukan menggunakan metode kolorimetrik *Microtetrazolium* (MTT) assay dengan membaca absorbansi dari formazan yang dihasilkan dengan menggunakan ELISA reader, dan data yang dihasilkan digunakan untuk mengukur besarnya nilai IC₅₀. MTT assay adalah salah satu metode yang sensitif, kuantitatif dan secara kolorimetri digunakan untuk mengukur viabilitas, proliferasi dan aktivasi sel. Metode ini didasarkan pada kapasitas enzim dehidrogenase mitokondria dalam sel hidup untuk mereduksi garam MTT menjadi formazan berwarna biru atau ungu

yang tidak larut air (Avila dan Pugsley, 2011). Pada penelitian ini sel target yang digunakan dalam uji sitotoksik dengan metode MTT assay adalah sel kanker payudara MCF-7, T47D dan sel vero (sel normal).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana formulasi SNEDDS yang memberikan ukuran partikel paling kecil dan homogen?
2. Senyawa apakah yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)?
3. Bagaimana aktivitas sitotoksik dari sediaan SNEDDS fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan T47D sebagai antikanker?

1.3 Tujuan

1. Menentukan formulasi SNEDDS yang memberikan ukuran partikel paling kecil dan homogen.
2. Mengetahui senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.).
3. Mengetahui aktivitas sitotoksik dari sediaan SNEDDS fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan T47D sebagai antikanker.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini akan memberikan informasi mengenai formulasi yang paling optimal dalam menghambat pertumbuhan sel kanker MCF-7 dan T47D melalui uji *in vitro* yang diperoleh dari sediaan nanopartikel fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun jambu biji (*psidium guajava*. L) dalam bentuk *self-nano emulsifying drug delivery system* (SNEDDS) untuk mengatasi penyakit kanker payudara. Serta memanfaatkan potensi bahan alam daun jambu biji sebagai agrobisnis Indonesia yang melimpah untuk obat antikanker.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

Penyakit kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh tidak normal (tumbuh sangat cepat dan tidak terkendali), menginfiltrasi/merembes, dan menekan jaringan tubuh sehingga mempengaruhi organ tubuh (Akmal dan Zely, 2010). Kanker payudara adalah salah satu kanker yang termasuk ke dalam jenis karsinoma. Karsinoma adalah kanker yang awalnya terjadi di sel epitel (squamosal), Hal ini terjadi karena kanker payudara berawal dari termutasinya sel dan jaringan payudara yang merupakan golongan sel epitel, yakni sel epitel yang berbentuk silindris (Sholihin, 2002). Kanker payudara paling banyak berasal dari dalam lapisan duktus ataupun lobulus sebagai akibat mutasi dari gen yang bertanggung jawab dalam mengatur pertumbuhan sel dan menjaga mereka tetap sehat (Jemal dkk., 2008).

Gejala awal dari penyakit kanker payudara adalah munculnya benjolan asing di daerah payudara. Ukuran benjolan dapat dimulai dari ukuran kecil yang kemudian membesar jika diraba seperti melekat pada kulit. Sebagian gejala yang lain juga ditandai dengan adanya perubahan kulit payudara di sekitar benjolan atau perubahan pada putingnya. Benjolan ini pada awalnya tidak terasa sakit, akan tetapi lama kelamaan seiring membesarnya benjolan akan menjadi sakit. Tanda kanker payudara akan diperkuat dengan adanya puting susu yang mengkerut ke dalam, Perubahan warna yang menggelap, hingga adanya *oedema* (bengkak) di sekitar puting (Sholihin, 2002).

2.2 Faktor Resiko Kemoterapi pada Pasien Kanker Payudara

Masalah yang dihadapi pasien kanker payudara baik dalam menentukan diagnosis maupun pemilihan terapi bersifat multidimensi, dengan banyak pertimbangan seperti masalah fisik, sosial, psikologis, spiritual, dan tentunya finansial. Terlebih lagi, pasien dan keluarga sering kali tidak memahami pentingnya deteksi dini kanker payudara atau jika penyakit sudah berada pada

kondisi lanjut, mereka juga mengalami kesulitan untuk memutuskan cara menangani penyakit tersebut (Rahayuwati dkk., 2017) Banyak usaha yang dilakukan oleh pasien kanker payudara untuk melakukan pengobatan mulai dari pengangkatan payudara, radiasi, kemoterapi sampai imunoterapi. Namun, berbagai jenis pengobatan tersebut belum tentu dapat menyembuhkan secara total jika kanker yang diderita sudah stadium akhir (Mardiana, 2007).

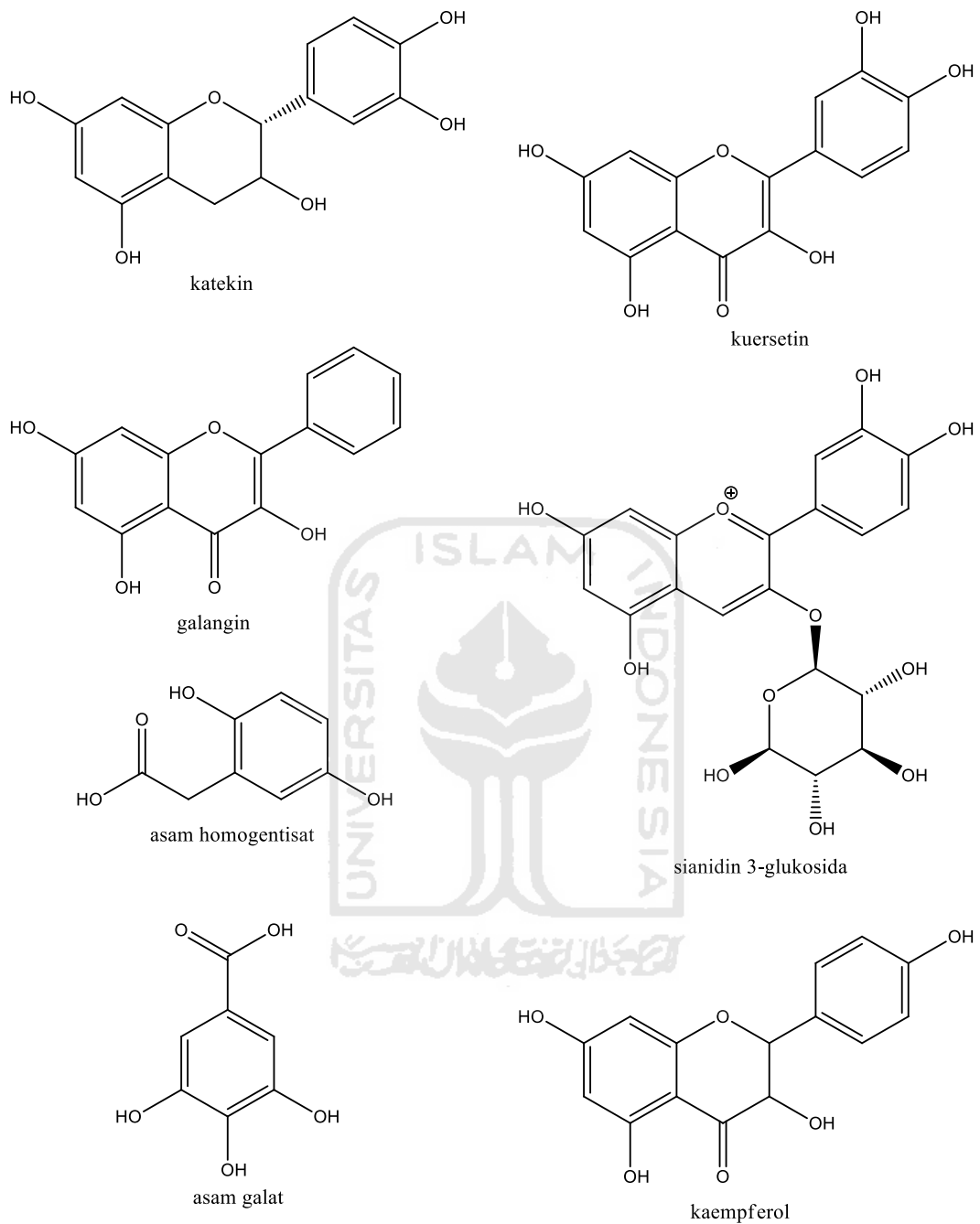
Menurut Wijayanti, (2007) bahwa pengobatan seperti operasi, dan kemoterapi dapat menimbulkan kondisi fisik yang sangat buruk yaitu mengalami kerontokan rambut dan kerja fisiologis dapat terganggu. Ini karena agen antikanker yang digunakan untuk membunuh sel kanker tidak selektif sehingga dapat membunuh sel normal yang ada di dalam seluruh tubuh. Kondisi tersebut dapat menimbulkan rasa malu, cemas, dan penurunan harga diri. Selain itu jika hasil pengobatan yang tidak maksimal juga dapat menjadi stimulasi timbulnya kecemasan pasien.

2.3 Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) sebagai Antikanker

Peningkatan angka kejadian kanker payudara serta belum adanya terapi yang dianggap tepat untuk mengatasinya memicu peneliti untuk mengeksplorasi bahan-bahan alam yang dianggap potensial sebagai alternatif agen antikanker, salah satunya daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). Telah banyak dilakukan penelitian yang berhubungan dengan daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) sebagai antikanker menggunakan kultur sel, adapun sel kanker yang digunakan antara lain adalah sel kanker lambung (Manthey dkk., 2001), sel kanker mulut dan kanker darah (Manosroi dkk., 2006), sel kanker usus (Lee dan Park, 2010), sel kanker serviks (Joseph dan Priya., 2010), sel kanker prostat (Ryu dkk., 2012), sel kanker payudara (Dwitiyanti, 2015), sel kanker kolon (Maharani, 2017), sel kanker payudara dan servik (Nita, 2019). Dari penelitian tersebut menunjukkan daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) memiliki potensi sebagai antikanker karena dapat mencegah atau menghambat pertumbuhan berbagai jenis sel kanker.

Tumbuhan jambu biji (*Psidium guajava* L.) sangat mudah ditemukan di Indonesia dan merupakan tanaman yang adaptif, dapat hidup tanpa pemeliharaan. Kandungan senyawa bioaktif daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang

diketahui aktif sebagai antikanker adalah katekin, galangin, asam homogentisat, asam galat, kaempferol dan sianidin 3-glukosida (Chen dkk., 2007). Hasil penelitian Wu dkk. (2009) menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) mengandung beberapa senyawa fenolik, yaitu asam galat, katekin, dan kuersetin. Botempo dkk. (2012) meneliti aktivitas antikanker dari komponen bioflavonoid dalam buah jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang salah satunya adalah kuersetin. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa beberapa komponen bioflavonoid dalam buah jambu biji (*Psidium guajava* L.) berkhasiat sebagai antikanker. Kuersetin merupakan salah satu senyawa golongan flavonoid yang telah banyak diuji aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan sel kanker seperti yang dilaporkan oleh Harwood dkk. (2007), Borska dkk. (2012), dan Zhang dkk. (2012). Karyanti (2005) membuktikan bahwa daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) mengandung kuersetin dalam kadar yang tinggi yaitu sebesar 61,71%. Kuersetin (3,3',4,5,7-pentahydroxyflavone) dapat beraksi sebagai antikanker pada regulasi siklus sel, berinteraksi dengan reseptor estrogen (ER) tipe II dan menghambat enzim tirosin kinase (Lamson dkk., 2000).



Gambar 1. Struktur senyawa yang terdapat pada daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) (Chen dkk., 2007; Wu dkk., 2009; Botempo dkk., 2012)

2.4 Teknologi Nanopartikel sebagai Penghantaran Obat

Dalam sistem penghantaran obat secara oral secara umum diterapkan pada obat yang bersifat hidrofilik. Hal ini dikarenakan obat hidrofobik lebih mudah

larut dalam air sehingga dapat mudah terdisolusi dalam cairan gastrointestinal untuk kemudian diserap. Namun sebagian obat memiliki sifat lipofilik yang mengakibatkan masalah pada kelarutan sehingga dapat menurunkan bioavailabilitas obat. Oleh karena itu, perlu dilakukan teknik formulasi lebih lanjut untuk dapat meningkatkan kelarutan obat sehingga bioavailabilitasnya tinggi. Formulasi dengan pembuatan sediaan nanopartikel merupakan salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut (Nurfauziah dan Rusdiana, 2018).

Penghantaran nanopartikel dideskripsikan sebagai formulasi suatu partikel yang terdispersi pada ukuran nanometer atau skala per seribu mikron. Batasan ukuran partikel yang pasti untuk sistem ini masih terdapat perbedaan karena 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 (Tiyaboonchai, 2003; Buzea dkk., 2007).

2.5 Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS)

Nanopartikel pada sediaan farmasi dapat berupa sistem obat dalam matriks seperti nanosfer dan nanokapsul, nanoliposom, nanoemulsi, dan sebagai sistem yang dikombinasikan dalam perancah (*scaffold*) dan penghantaran transdermal (Martien dkk., 2012). Pengembangan terkini sistem nanoemulsi untuk aplikasi oral melalui saluran gastrointestinal adalah teknologi auto-emulsifikasi *Self-nanoemulsifying drug delivery systems* (SNEDDS) (Wadhwa dkk., 2011). SNEDDS merupakan sediaan yang terdiri dari campuran minyak, surfaktan, dan kosurfaktan dengan komposisi yang sesuai sehingga mampu menciptakan campuran isotropik stabil dan mampu membentuk emulsi spontan ketika berada di

dalam saluran cerna (Patel dkk., 2011). Penyebarannya terjadi secara langsung melalui saluran pencernaan gastrointestinal, cairan di dalam gastrointestinal dibantu oleh gerakan pada lambung dan usus akan mendispersikan nanoemulsi tersebut (Fatouros dkk., 2007). SNEDDS dapat menghasilkan ukuran tetesan berupa nanoemulsi. Ukuran tetesan yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh komposisi minyak, surfaktan dan kosurfaktan (Date dkk., 2010). Beberapa keuntungan formulasi SNEDDS antara lain mampu meningkatkan bioavailabilitas zat aktif obat melalui penggunaan secara oral, mengurangi frekuensi pemberian obat karena memiliki sistem yang stabil, membawa dan menyampaikan zat aktif obat hingga ke sel targetnya tanpa mempengaruhi atau dipengaruhi oleh kondisi sekitarnya dan juga meningkatkan luas permukaan di dalam saluran cerna (Makadia dkk., 2013).

Beberapa kelebihan SNEDDS telah dibuktikan melalui penelitian yang dilakukan oleh Beandrade (2018) yang melakukan formulasi terhadap ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa*). Berdasarkan hasil penelitian diperoleh SNEDDS optimal mengandung ekstrak jinten hitam 200 mg/g sistem, sistem SNEDDS terdiri dari 15% minyak ikan hiu cucut botol, 67,344% surfaktan (10,102% croduret 50 ss dan 57,242% tween 80), 17,656% PEG 400 sebagai ko-surfaktan dengan hasil ukuran nanoemulsi sebesar 16,3 nm, dengan indeks polidisper (PI) 0,202, dan zeta potensial -43,5 mV. Formula optimal SNEDDS ini memberikan hasil rasio sel makrofag dan indeks fagositosis lebih tinggi apabila dibandingkan dengan ekstrak jinten hitam tanpa formulasi ($p < 0,05$). Hasil *extract loading* sistem SNEDDS mencapai 600 mg ekstrak/g sistem dan stabil ketika disimpan selama 90 hari pada suhu ruang serta stabil ketika diuji stabilitas dengan teknik *freeze-thawing*.

2.6 Uji Aktivitas Antikanker Menggunakan Metode MTT Assay

Permasalahan yang timbul dalam pengujian aktivitas suatu obat antikanker menggunakan mencit atau hewan lainnya adalah membutuhkan waktu yang lama dan tingkat keberhasilan yang rendah. Kemajuan dalam bidang bioteknologi akhir-akhir ini telah memungkinkan untuk uji antikanker dapat dilakukan dengan

cepat dan tepat. Teknologi tersebut disebut juga teknik *in vitro*. Teknik *in vitro* ini menggunakan *cell line* yang dapat diuji dengan uji MTT (*Microculture Tetrazolium Technique*) (Pandiangan dkk., 2008). MTT assay adalah salah satu metode yang sensitif, kuantitatif dan secara kolorimetri digunakan untuk mengukur viabilitas, proliferasi dan aktivasi sel. Metode ini didasarkan pada kapasitas enzim dehidrogenase mitokondria dalam sel hidup untuk mereduksi garam MTT {3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida} menjadi formazan berwarna biru atau ungu (Avila dan Pugsley, 2011). Formazan yang dihasilkan kemudian dibaca absorbansinya menggunakan ELISA reader, dengan hasil digunakan untuk mengukur besarnya nilai IC₅₀. Dengan menggunakan parameter IC₅₀ maka dapat diketahui adanya potensi tumbuhan sebagai antikanker (Amir dan Murchitro, 2017).

Kelebihan metode MTT assay yaitu memiliki langkah kerja yang sederhana dan efektif dalam menilai aktivitas antiinflamasi dan antikanker dari setiap sampel pada tingkat awal penelitian (Bahuguna dkk., 2017). Beberapa peneliti yang menggunakan metode MTT assay untuk uji antikanker di antaranya Tussanti dkk. (2014) yang menguji sitotoksitas ekstrak etanolik buah parijoto (*Medinilla speciosa* L.) terhadap sel kanker payudara T47D, Sirait dkk. (2019) yang menguji ekstrak spirulina yang dikultur pada media *walne* dan media *organic* terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan sel normal payudara MCF-12a, dan Purwanto (2018) yang menguji senyawa hasil sintesis N-(2-Klorobenzoil)-N'-Fenilurea terhadap sel kanker serviks HeLa.

BAB III

DASAR TEORI

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

Tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.) bukan merupakan tanaman asli Indonesia, tanaman ini pertama kali ditemukan di Amerika Tengah. Seiring dengan berjalannya waktu, jambu biji (*Psidium guajava* L.) menyebar di beberapa negara seperti Thailand, Taiwan, Indonesia, Jepang, Malaysia dan Australia. Daun jambu biji berbentuk bulat panjang, bulat langsing, atau bulat oval dengan ujung tumpul atau lancip. Warna daunnya beragam seperti hijau tua, hijau muda, merah tua, dan hijau berbelang kuning. Permukaan daun ada yang halus mengkilap dan halus biasa. Tata letak daun saling berhadapan dan tumbuh tunggal. Panjang helai daun sekitar 5-15 cm dan lebar 3-6 cm. Sementara panjang tangkai daun berkisar 3-7 mm (Parimin, 2005).

Menurut Hapsoh dan Hasanah (2011) tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

| | |
|-----------|-----------------------------|
| Kingdom | : Plantae |
| Divisi | : Spermatophyta |
| Subdivisi | : Angiospermae |
| Kelas | : Dicotyledonae |
| Ordo | : Myrtales |
| Famili | : Myrtaceae |
| Genus | : <i>Psidium</i> |
| Spesies | : <i>Psidium guajava</i> L. |

Metabolit sekunder yang terdapat dalam daun jambu biji adalah tanin, polifenolat, flavonoid, monoterpenoid, siskulterpen, alkaloid, kuinon, saponin, minyak atsiri, ursolic, oleanolic, karoten, vitamin B1, B2, B3, B6, dan vitamin C serta resin, selain avicularin dan guaijaverin (Supandiman, 1997; Wahyuni, 2014).



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

3.2 Maserasi dengan Etanol 96%

Ekstraksi dalam ilmu farmasi merupakan pemisahan senyawa bioaktif tanaman menggunakan pelarut selektif melalui prosedur yang telah ditentukan. Selama proses ekstraksi, pelarut akan berdifusi ke dalam bagian tanaman dan akan melarutkan senyawa-senyawa bioaktif tanaman dengan tingkat kepolaran yang sama. Tujuan utama ekstraksi pada tanaman obat adalah untuk memperoleh senyawa-senyawa bioaktif tanaman yang memiliki peran farmakologi dan menghilangkan senyawa-senyawa yang tidak diinginkan melalui perlakuan dengan pelarut selektif yang dikenal dengan istilah menstrum (Tiwari dkk., 2011)

Salah satu metode ekstraksi adalah maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruangan. Saat perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani, 2014; Darwis, 2000).

Untuk mendapatkan ekstraksi yang menyeluruh dan mendapatkan senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas farmakologi maka pemilihan pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi merupakan faktor yang penting. Pelarut ideal yang sering digunakan adalah alkohol atau campurannya dengan air karena

merupakan pelarut pengestraksi yang terbaik untuk hampir semua senyawa dengan berat molekul rendah seperti saponin dan flavonoid serta sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar, dan non polar (Wijesekera, 1991; Harborne, 1987)

3.3 Fraksinasi dengan Etil Asetat

Fraksinasi adalah proses pemisahan komponen-komponen dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Fraksinasi dapat dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair atau dengan kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom (KK), *size-exclusion chromatography* (SEC), *solid-phase extraction* (SPE) (Sarker dkk., 2006).

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah kromatografi kolom gravitasi. Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dilakukan dalam suatu kolom yang diisi dengan fase diam dan dialiri fase gerak untuk memisahkan komponen dengan memanfaatkan kepolaran senyawa dan gaya gravitasi (Mutmainnah dkk., 2017).

Prinsip pemisahan kromatografi kolom adalah adsorpsi dan partisi, dimana terjadi kompetisi antara zat terlarut (sampel) dan fase gerak dengan permukaan fase diam. Kekuatan adsorpsi terutama tergantung sifat gugus fungsionalnya, dimana gugus-gugus fungsional ini menentukan tingkat kepolaran. Proses adsorpsi dipengaruhi oleh kekuatan ikatan antara solut dan adsorben serta kekuatan untuk memisahkan solut dari adsorben. (Wati, 2014).

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut diantaranya adalah selektivitas, toksisitas, kepolaran, kemudahan untuk diuapkan, dan harga pelarut (Akbar, 2010). Etil asetat merupakan pelarut yang mudah diuapkan, tidak higroskopis, memiliki toksisitas rendah dan bersifat semi polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar dari sampel (USP, 2007; Rowe dkk., 2009; Wardhani dan Sulistyani, 2012).

3.4 *Self Nano-emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS)*

Nanoemulsi adalah sistem emulsi yang transparan, tembus cahaya dan merupakan dispersi minyak air yang distabilkan oleh lapisan film dari surfaktan atau molekul surfaktan, yang memiliki ukuran droplet 50-500 nm (Shakeel dkk., 2008). Salah satu teknologi nanoemulsi sebagai penghantaran obat yang sedang dikembangkan adalah *self nano-emulsifying drug delivery system* (SNEDDS), SNEDDS merupakan sediaan yang terdiri dari minyak, surfaktan, dan kosurfaktan dengan komposisi yang sesuai sehingga mampu menciptakan campuran isotropik stabil dan mampu membentuk emulsi spontan ketika berada di dalam saluran cerna (Patel dkk., 2011).

Di dalam tubuh, SNEDDS akan membentuk nanoemulsi saat kontak dengan cairan dalam saluran cerna, gerakan pada lambung dan usus akan membantu proses agitasi membentuk *self-emulsifying* dalam gastrointestinal (Itoh dkk., 2002; Nazzal dkk., 2002). Ilustrasi konsep sistem penghantaran obat auto-nanoemulsifikasi SNEDDS ditunjukkan pada Gambar 3. Sediaan diberikan dalam kombinasi obat, minyak, surfaktan, dan kosurfaktan, kemudian akan mengalami proses emulsifikasi spontan di dalam cairan cerna saat mengalami pencampuran dengan cairan usus. Nanoemulsi selanjutnya mengalami proses absorpsi.



Gambar 3. Ilustrasi konsep sistem penghantaran obat auto nanoemulsifikasi (Martien dkk., 2012)

Beberapa keuntungan formulasi SNEDDS antara lain mampu meningkatkan bioavailabilitas zat aktif obat melalui penggunaan secara oral, mengurangi frekuensi pemberian obat karena memiliki sistem yang stabil, membawa dan menyampaikan zat aktif obat hingga ke sel targetnya tanpa mempengaruhi atau dipengaruhi oleh kondisi sekitarnya dan juga meningkatkan luas permukaan di dalam saluran cerna (Makadia dkk., 2013).

3.5 Kanker Payudara

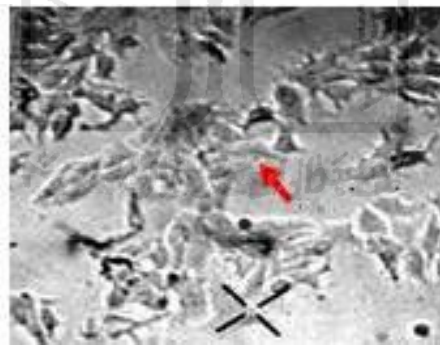
Kanker payudara adalah suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan berlebihan atau perkembangan tidak terkontrol dari sel-sel jaringan payudara. Kanker payudara merupakan suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga terjadi pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali yang terjadi pada jaringan payudara. Sel kanker payudara yang pertama dapat tumbuh menjadi tumor 1 cm dalam waktu 8-12 tahun, Sel kanker tersebut diam pada kelenjar payudara. Sel-sel kanker payudara dapat menyebar melalui aliran darah ke seluruh tubuh. Sel kanker payudara dapat bersembunyi di dalam tubuh selama bertahun-tahun tanpa diketahui dan tiba-tiba aktif menjadi tumor ganas atau kanker (Mulyani dan Rinawati, 2013).

Ada beberapa faktor yang berhubungan dengan peningkatan resiko atau kemungkinan terjadinya kanker payudara, yaitu faktor reproduksi seperti menarche atau haid pertama pada usia kurang dari 12 tahun, menopause di usia lebih dari 50 tahun, melahirkan anak pertama pada usia lebih dari 35 tahun, faktor endokrin seperti pemakaian kontrasepsi oral dalam waktu lama, diet seperti makanan berlemak, alkohol, genetik atau riwayat keluarga, terpapar radiasi pengion saat pertumbuhan payudara (Depkes RI, 2009).

Gejala yang umum ditemui pada penderita kanker payudara yaitu adanya pembengkakan di salah satu payudara, tarikan pada puting susu atau puting susu terasa gatal, serta nyeri. Pada kanker payudara stadium lanjut, dapat timbul nyeri tulang, pembengkakan lengan, ulserasi kulit, atau penurunan berat badan (Suryaningsih dan Sukaca, 2009).

3.6 Sel Kanker MCF-7

Sel *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel ini diisolasi pertama kali pada tahun 1970 diambil dari jaringan payudara *malignant adenocarcinoma* seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O dengan Rh positif (ATCC, 2008). Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten terhadap doxorubicin, tidak mengekspresikan *caspase-3*, sel MCF-7 dapat mengalami apoptosis melalui aktivitas berurutan *caspases-9*, *-7*, dan *-6*, mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), over ekspresi Bcl-2, sel MCF-7 ekspresi rendah terhadap P55 (TNFRI). Sel MCF-7 menginduksi apoptosis melalui TNF α , mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- α) (Simstein dkk., 2003). Karakteristik tersebut membedakannya dengan sel kanker payudara lain, seperti sel T47D. Media dasar penumbuh sel MCF-7 adalah DMEM atau RPMI yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS) 10% dan *antibiotic Penicilin-Streptomycin* 1 % (Meiyanto dkk., 2008).

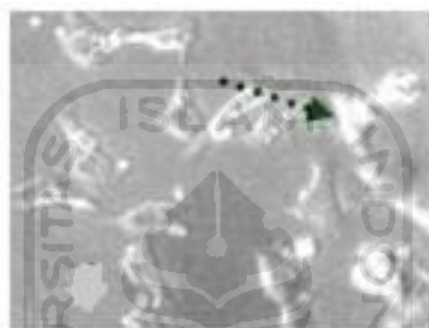


Gambar 4. Morfologi sel MCF-7 (CCRC, 2009)

3.7 Sel Kanker T47D

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

Memorial Institute) 1640. Untuk memperoleh media kompleks, maka ditambahkan 0,2 mg/mL *bovine insulin* dan *Foetal Bovine Serum* (FBS) hingga konsentrasi akhir FBS dalam media menjadi 10%. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5% (ATCC, 2008). Sel T47D adalah turunan sel kanker payudara yang mengekspresikan protein p53 yang termutasi dan merupakan sel kanker payudara dengan reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR) positif (Dogan dkk., 2015). Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doxorubicin (Zampieri dkk., 2002).

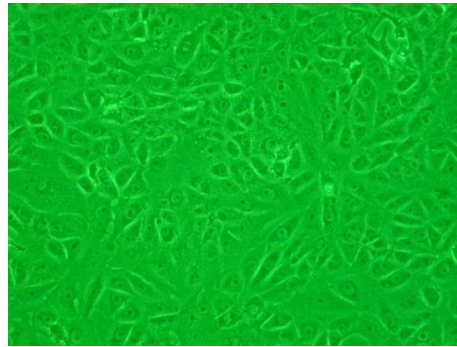


Gambar 5. Morfologi sel T47D (CCRC, 2009)

3.8 Sel Vero

Sel Vero ATCC CCL-81 merupakan sel epitel non kanker. Sel vero diperoleh dari ginjal kera Afrika hijau (*Cercopithecus*) oleh Y.Yasumura dan Y.Kawakita di Chiba University Jepang. Sel ini digunakan karena sensitif terhadap infeksi beberapa jenis virus seperti SV-40, SV-5, poliovirus, arbovirus, influenza virus. Sel ini tidak memproduksi interferon dan dapat mengalami *cytopathic effect* (CPE) yaitu perubahan morfologi di dalam sel ketika terinfeksi virus (Sheets, 2000). Sel Vero merupakan sel monolayer berbentuk poligonal dan pipih, sel ini immortal, *non tumorigenic 19 fibroblastic cell*. Sel ini melekat erat pada substrat yang berbahan polistirena dengan membentuk ikatan kovalen. Sel vero biasa digunakan untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksitas, dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia. Sel ini juga direkomendasikan untuk dijadikan sebagai sel model dalam mempelajari karsinogenesis secara *in vitro* (Goncalves dkk. 2006). Kultur sel vero umumnya

menggunakan media M199 dan diinkubasi pada suhu 37 °C pada inkubator CO₂ 5% (Ammerman dkk., 2008).



Gambar 6. Morfologi sel vero (Sons, 2008).

3.9 Kemoterapi

Kemoterapi adalah pemberian obat untuk membunuh sel kanker. Tidak seperti radiasi atau operasi yang bersifat lokal, kemoterapi merupakan terapi sistemik, yang berarti obat menyebar ke seluruh tubuh dan dapat mencapai sel kanker yang telah menyebar jauh atau metastase ke tempat lain (Rasjidi, 2007). Doxorubicin (Dox) merupakan salah satu agen kemoterapi yang banyak digunakan dalam terapi kanker. Meskipun demikian ternyata penggunaan agen kemoterapi sistemik bukan saja tidak begitu efektif namun juga tidak selektif dan sangat toksik bagi jaringan lain yang normal (Wattanapitayakul dkk., 2005)

Efek samping dari kemoterapi meliputi, anemia, trombositopenia, leucopenia, mual dan muntah, alopesia (rambut rontok), stomatitis, reaksi alergi, neurotoksik, dan ekstrasvasasi (keluarnya obat vesikan atau iritan ke jaringan subkutan yang berakibat timbulnya rasa nyeri, nekrosis jaringan, dan ulserasi jaringan) (Rasjidi, 2007).

3.10 Pengujian Sitotoksisitas Secara *In Vitro*

Sitotoksisitas merupakan kematian sel oleh komponen-komponen kimia atau mediator sel (sel T sitotoksik). Sitotoksisitas biasa digunakan sebagai pedoman di dalam laboratorium untuk mendeteksi kematian sel, tanpa melihat mekanismenya.

Aktivitas sitotoksik merupakan proses penting dalam membunuh sel-sel kanker (Wyllie, 2010).

National Cancer Institute (NCI) membedakan definisi sitotoksitas antitumor dan antikanker berdasarkan lingkup pengerjaannya. Sitotoksitas merupakan sifat toksik suatu agen kimia terhadap sel kanker yang diuji secara *in vitro*. Sifat toksik ini jika diujikan terhadap sel kanker secara *in vivo* maka agen kimia tersebut dikatakan memiliki aktivitas antitumor. Sementara itu, istilah antikanker digunakan untuk material yang memiliki sifat toksik terhadap sel kanker yang diuji secara klinis terhadap manusia (Itharat dan Ooraikul, 2007).

Uji sitotoksitas secara *in vitro* didasarkan pada “basal” sitotoksitas yang diartikan sebagai perubahan fungsi dasar sel pada semua sel yang diakibatkan oleh komponen kimia yang bersifat toksik terhadap sel. *In vitro* mengacu pada prosedur perlakuan yang diberikan dalam lingkungan terkendali di luar organisme hidup. Keterbatasan dalam mengakses organisme hidup menjadikan pendekatan *in vitro* sebagai solusi dalam pengujian khasiat suatu obat. Pengujian secara *in vitro* biasanya digunakan sebagai skrining awal pada pengujian sitotoksitas suatu agen kimia terhadap berbagai sel kanker. Teknik pengujian ini lebih sensitif dibandingkan pengujian secara *in vivo* yang membutuhkan konsentrasi agen kimia yang lebih tinggi dan terkadang tidak menunjukkan aktivitas walaupun agen kimia tersebut menunjukkan aktivitas pada pengujian secara *in vitro* (Itharat dan Ooraikul 2007; Doyle dan Grifliths, 2000).

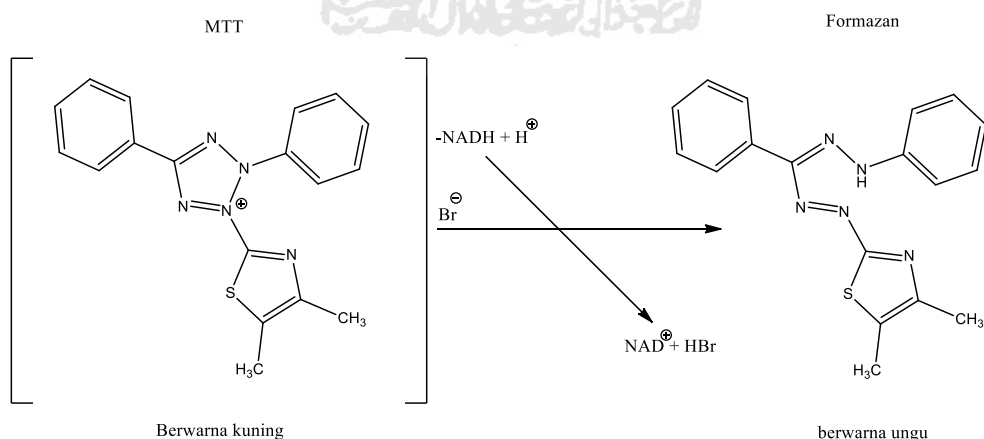
Uji sitotoksitas ini digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitostatik. (Padmi, 2008).

3.11 Metode MTT assay

Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode *microculture tetrazolium technique* (MTT). Metode MTT adalah salah

satu uji sitotoksitas yang bersifat kuantitatif. Uji sitotoksitas dilakukan secara *in vitro* yaitu untuk menentukan potensi sitotoksik suatu senyawa seperti obat antikanker (Kupcsik dan Stoddart, 2011). Metode ini didasarkan pada kapasitas enzim dehidrogenase mitokondria dalam sel hidup untuk mereduksi garam MTT (4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) menjadi formazan berwarna biru atau ungu yang tidak larut air (Avila dan Pugsley, 2011).

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 secara spektrofotometri menggunakan *Enzym-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Intensitas warna yang terbentuk berbanding langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme, yang mana semakin besar absorbansinya maka menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup (Meiyanto dkk. 1999; Zakaria, 2010). Reaksi reduksi MTT dapat ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Reaksi Reduksi MTT menjadi Formazan (Doyle dan Grifliths, 2000)

Hal-hal yang dapat mempengaruhi data hasil uji sitotoksik menggunakan metode MTT antara lain yaitu, waktu inkubasi, konsentrasi MTT, jumlah sel yang hidup (kemampuan metabolisme sel) (Basmal dkk., 2009). Sitotoksik suatu bahan

berdasarkan nilai IC_{50} dapat digolongkan menjadi 3, yaitu : sitotoksik potensial ($IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$), sitotoksik moderat ($100 \mu\text{g/mL} < IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$) dan tidak toksik ($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) (Prayong dkk., 2008).

3.12 ELISA Reader

ELISA merupakan salah satu uji serologi yang dapat digunakan untuk mendeteksi antibodi. Prinsip utama teknik ELISA adalah penggunaan indikator enzim untuk reaksi imunologi. (Akonor dkk., 2018). Alat ini menggunakan prinsip spektrofotometri absorpsi untuk mendeteksi kolorimetri. Deteksi absorbansi didasarkan pada hukum Lambert Beer yaitu:

$$A = -\text{Log}_{10} (I/I_0)$$

Dimana, A = absorbansi sampel

I = Intensitas cahaya yang ditransmisikan

I_0 = Intensitas cahaya asli

Semakin besar konsentrasi antigen/antibodi, semakin banyak cahaya yang akan diserap oleh sampel menghasilkan pembacaan absorbansi yang lebih besar pula. Nilai absorbansi ini kemudian dijadikan untuk menafsirkan hasil diagnosa ELISA. Rentang absorbansi yang dapat direkam adalah 350 nm sampai 700 nm (Thiha dkk., 2015).

3.13 Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC/MS-MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometer massa. Data LC-MS/MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu. Keuntungan dari LC-MS/MS yaitu dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa termolabil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi, bahkan juga protein (Mangurana dkk., 2019).

3.13.1 *Liquid Chromatographi* (LC)

Prinsipnya adalah pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya, Senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel-partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak). Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikkan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen campuran, campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolarannya dan kecepatannya keluar dari kolom untuk sampai ke detektor (waktu retensinya) akan berbeda, hal ini akan teramati oleh detektor dalam bentuk kromatogram (Hendrayana, 2006; Sastrohamidjojo, 2005). Komponen-komponen dari LC adalah : (Gandjar dan Rohman, 2007).

a. Wadah fase gerak

Dapat digunakan wadah pelarut kosong atau labu laboratorium dengan kondisi wadah yang bersih dan lembam (inert).

b. Pompa

Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara cepat, *reproducible*, konstan, dan bebas dari gangguan. Pompa yang digunakan harus inert terhadap fase gerak.

c. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan sampel ke dalam kolom.

d. Kolom

Kolom adalah bagian paling penting dalam kromatografi karena di sinilah proses pemisahan berlangsung. Kolom umumnya dibuat dari stainless steel dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, atau temperatur yang lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi. Oktadesil silika (ODS atau C18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran rendah, sedang, maupun tinggi.

e. Detektor

Detektor digunakan untuk mendeteksi analit yang telah dipisahkan. Karakteristik detektor yang ideal adalah mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan *reproducible*, mempunyai sensitifitas yang tinggi, stabil dalam

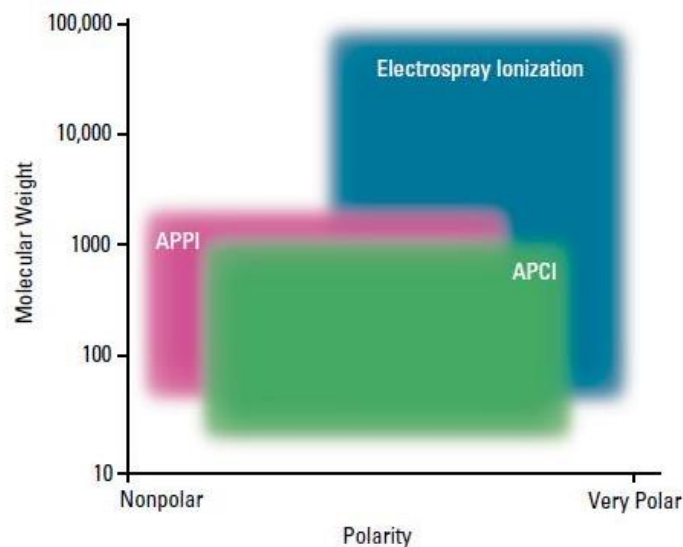
pengoperasian, mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita, sinyal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas, dan tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.

3.13.2 *Mass Spectroscopy* (MS)

Mass Spectroscopy (MS) bekerja dengan molekul pengan yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi mereka (m/z). Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ionsource*) yang akan menghasilkan ion, dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menyeleksi ion (Agilent, 2001). 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 dkk., 2005).

Selama sepuluh tahun terakhir banyak kemajuan pada LC-MS/MS dalam pengembangan sumber ion dan teknik untuk mengionisasi dan memisahkan ion molekul analit dari fase geraknya. Sebelumnya LC-MS/MS menggunakan sistem antarmuka yang kurang baik dalam memisahkan molekul fase gerak dari molekul analit. Pengenalan teknik ionisasi tekanan atmosfer (*atmospheric pressure ionization* / API) sangat memperluas jumlah senyawa yang dapat dianalisis dengan LC-MS/MS. Pada teknik ionisasi tekanan atmosfer, molekul analit terionisasi terlebih dahulu pada tekanan atmosfer. Ion-ion analit tersebut kemudian secara mekanis dan elektrostatis terpisah dari inti molekul. Teknik ionisasi tekanan atmosfer umumnya adalah: (Agilent, 2001)

- ionisasi elektropray (*electrospray ionization* / ESI)
- ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI)
- photoionisasi tekanan atmosfer (APPI)



Gambar 8. Aplikasi dari berbagai teknik ionisasi LC-MS/MS (Agilent, 2001)

Dalam setiap pengukuran, sifat analit dan kondisi pemisahan memiliki pengaruh kuat untuk memberikan hasil terbaik dalam teknik ionisasi pada elektropray, APCI, maupun APPI. Teknik yang paling efektif tidak selalu mudah untuk diprediksi (Agilent, 2001).

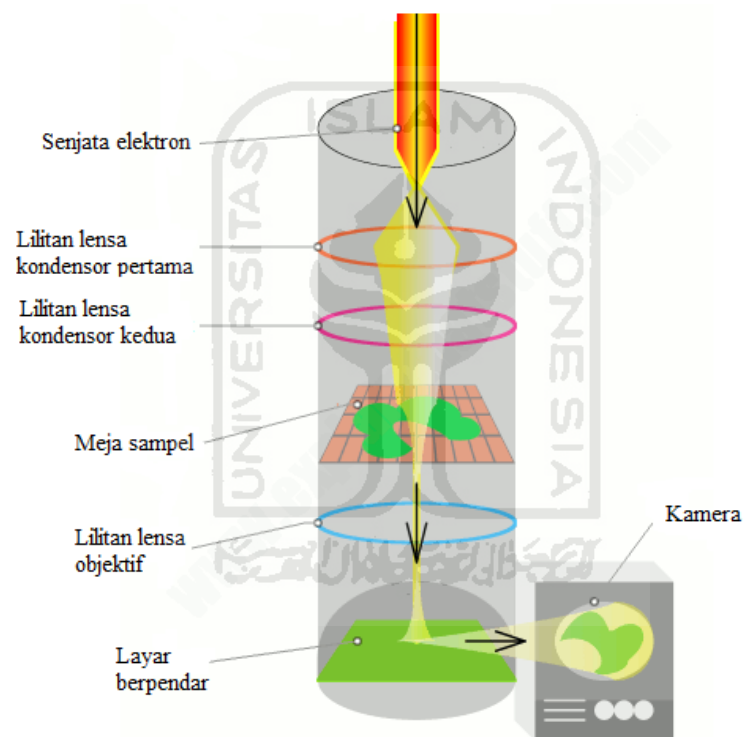
Teknik ionisasi tekanan atmosfer yang dibahas umumnya menghasilkan: (Agilent, 2001)

- Molekul ion M^+ atau M^-
- molekul terprotonasi $[M + H]^+$
- ionisasi molekul sederhana $[M + Na]^+$
- Ion yang mewakili kehilangan molekul sederhana seperti hilangnya air $[M + H - H_2O]^+$

Berat molekul yang dihasilkan memberikan informasi sangat berharga, tapi pelengkap informasi struktural sering dibutuhkan. Dalam memperoleh informasi struktural, ion analit terfragmentasi karena molekul bertabrakan dengan netral yang dikenal sebagai disosiasi tabrakan induksi (*collision induced disosiasi / CID*) atau disosiasi tabrakan diaktifkan (*collisionally activated dissociation / CAD*). Tegangan diberikan kepada ion-ion analit untuk menambah energi agar mampu melakukan tabrakan sehingga menciptakan fragmentasi lagi (Agilent, 2001).

3.14 *Transmission Electron Microscopy (TEM)*

Transmission Electron Microscopy (TEM) merupakan instrumentasi yang berfungsi untuk menentukan ukuran kuantitatif, distribusi ukuran sampel dan morfologi partikel. Prinsip kerja TEM secara fisis memiliki kesamaan dengan mikroskop cahaya, perbedaannya terletak pada sumber cahaya yang digunakan. TEM menggunakan elektron sebagai sumber cahaya yang memiliki resolusi sebesar 0,1 nm (Rosenauer, 2003). Prinsip kerja TEM dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Prinsip kerja TEM (Woodford, 2017).

Prinsip kerja TEM sama seperti *projector slide* dimana elektron ditransmisikan ke dalam objek pengamatan dan hasilnya diamati melalui layar. Mekanisme kerja TEM yaitu pistol elektron berupa lampu tungsten dihubungkan dengan sumber tegangan tinggi (100-300 kV) ditransmisikan pada sampel yang tipis, pistol akan memancarkan elektron secara termionik maupun emisis medan magnet ke sistem vakum. Ketika sebuah elektron melewati bagian sampel tipis suatu material, maka

elektron tersebar. Sebuah sistem lensa elektromagnetik canggih kemudian memfokuskan elektron yang tersebar menjadi sebuah gambar atau pola difraksi maupun spektrum nanoanalitis yang tergantung pada sistem atau mode pengoperasiannya. Masing-masing mode memberikan penyajian yang berbeda-beda tentang sampel. Mode pencitraan memberikan gambar yang mampu memperbesar ukuran baik mikro maupun nano sehingga struktur atom langsung bisa diperoleh. Mode difraksi memberikan informasi akurat mengenai struktur kristal pada bagian tertentu. Mode nanoanalitik menunjukkan elemen-elemen yang terdapat pada sampel. Ketiga mode tersebut berguna untuk mencari material yang lebih kuat, keping berukuran mikro yang bekerja lebih cepat atau nanokristal yang lebih kecil berdasarkan pada informasi yang diberikan pada alat (Hofer, 2014).

3.15 Particle Size Analyzer (PSA)

Particle Size Analyzer (PSA) menggunakan prinsip dari *Laser Diffraction*. *Laser Diffraction* adalah ketika partikel-partikel melewati berkas sinar laser dan cahaya dihamburkan oleh partikel-partikel tersebut. Distribusi dari intensitas yang dihamburkan ini yang akan dianalisis oleh komputer sebagai hasil distribusi ukuran partikel (Rawle, 2010). Karakteristik nanopartikel yang perlu diketahui antara lain ukuran, distribusi partikel dan zeta potensial dari nanopartikel yang telah dihasilkan.

3.15.1 Ukuran Partikel dan Distribusi Ukuran Partikel.

Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel adalah karakteristik yang terpenting dalam sistem nanopartikel. 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 akan 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). Persyaratan parameter ini adalah partikel mempunyai ukuran 50-1000 nm dan stabil pada periode waktu tertentu (Muller dkk. 2000).

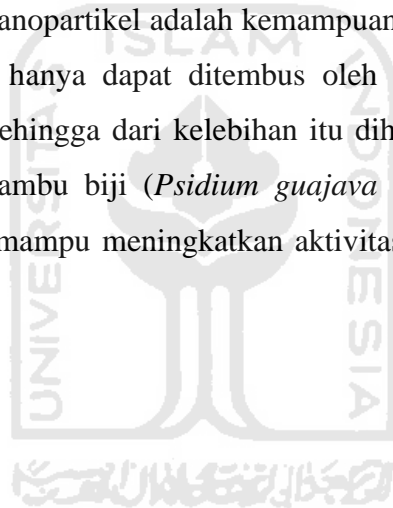
3.15.2 Zeta Potensial

Zeta potensial dari sebuah nanopartikel biasanya digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan yang berkaitan dengan interaksi elektrostatis nanopartikel. Partikel-partikel yang terdiri dari molekul heteroatomik biasanya memiliki muatan permukaan, yang mungkin menjadi positif atau negatif, tergantung pada orientasi dan ionisasi komponen partikel. Interaksi elektrostatis antara partikel akan menentukan kecenderungan agregasi dan fenomena tolak-menolak. Zeta potensial adalah ukuran permukaan muatan partikel yang tersebar dalam kaitannya dengan medium pendispersi. Partikel harus memiliki muatan atau zeta potensial yang tinggi dibanding dengan medium pendispersi untuk mencegah agregasi. Kekuatan tolak menolak yang dibawa oleh muatan ion serupa pada partikel permukaan akan mencegah gaya tarik-menarik yang ditentukan oleh ikatan hidrogen dan ikatan van der Waals. (Vaughn dan Williams., 2007).

Nilai potensial zeta dapat menunjukkan kestabilan dari suatu sistem yang mengandung globul-globul terdispersi melalui adanya gaya tolak-menolak antara partikel yang bermuatan sama ketika berdekatan. Nilai potensial zeta yang lebih besar dari +30 mV atau lebih kecil dari -30 mV akan stabil secara elektrostatis, sedangkan nilai potensial zeta yang lebih besar dari +20 mV atau lebih kecil dari -20 mV akan stabil secara sterik (Gao dkk., 2008).

3.16 Hipotesis

1. Formulasi SNEDDS dapat menghasilkan ukuran tetesan berupa nanoemulsi. Ukuran tetesan yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh komposisi minyak, surfaktan dan kosurfaktan (Date dkk., 2010).
2. Penelitian yang dilakukan oleh Nita (2019) yang melakukan uji aktivitas antikanker fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji terhadap sel T47D dan MCF-7 menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 21,68 dan 31,02 $\mu\text{g/mL}$. Dari penelitian tersebut dapat di simpulkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antikanker terhadap sel T47D dan MCF-7.
3. Salah satu kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal (Buzea dkk., 2007). Sehingga dari kelebihan itu diharapkan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang diformulasikan menjadi nanopartikel mampu meningkatkan aktivitas antikanker terhadap sel T47D dan MCF-7.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dimulai dari April 2019 sampai Februari 2020 di Laboratorium Riset dan Pengembangan Kimia, Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, D.I. Yogyakarta.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

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

4.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), etanol 96%, etil asetat teknis, silika, aseton, logam Mg, HCl pekat, reagen dragendroff, reagen mayer, FeCl, H₂SO₄ pekat, tween 20, capryol, PEG, PBS (*Phospat buffer saline*), media kultur RPMI, tripsin-EDTA, DMSO (dimetil sulfoksida), SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10 % dalam 0,1 N HCl, DMEM (*Dulbecco's Modified EagleMedium*), (4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida MTT 5 mg/mL (50 mg MTT dan 10 mL PBS), aluminium foil, tissue, sel T47D, MCF-7 dan vero.

4.3 Identifikasi Variabel

Pada percobaan kali ini variabel yang digunakan adalah perbandingan bahan-bahan seperti yang ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Variabel penelitian

| Capryoll | Tween 20 | PEG | Konsentrasi fraksi (%) |
|----------|----------|-----|------------------------|
| 10 | 70 | 20 | 40 |
| 10 | 70 | 20 | 60 |
| 10 | 70 | 20 | 80 |

4.4 Cara kerja

4.4.1 Preparasi Daun Jambu Biji (*Psidium Guajava L.*) Sebagai Bahan Baku

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun dari tanaman jambu biji (*Psidium guajava L.*) diasumsikan sebagai variabel bebas, dimana bahan baku tersebut didapatkan dari membeli kepada penyedia bahan baku. Bahan baku tersebut dikeringkan di bawah panas matahari kemudian diblender hingga menjadi serbuk. Serbuk disimpan dalam botol untuk digunakan pada langkah penelitian selanjutnya.

4.4.2 Uji Determinasi

Uji determinasi dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Universitas Gajah Mada D.I Yogyakarta. Dengan sampel berupa ranting tanaman jambu biji (*Psidium guajava L.*) beserta daun dan bunganya.

4.4.3 Ekstraksi Dengan Metode Maserasi

Maserasi dilakukan dengan memasukkan 200 g serbuk kering simplisia ke dalam botol kemudian ditambahkan etanol 96% ke dalam botol sampai seluruh simplisia terendam, botol ditutup rapat. Perendaman dilakukan selama 24 jam, setelah itu dipisahkan maserat dengan menggunakan corong buchner, diulangi proses maserasi sekurang-kurangnya tiga kali. Maserat yang diperoleh dipisahkan

menggunakan *vakum rotary evaporator* pada temperatur ± 50 °C untuk mendapatkan ekstrak kental. Hasil kemudian ditimbang dan dihitung untuk mengetahui % rendemen yang didapatkan menggunakan persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat akhir sampel (g)}}{\text{berat awal sampel (g)}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

4.4.4 Fraksinasi

Ekstrak kental etanol 96% sebanyak 100 gram diimpregnasi menggunakan silika dan dilakukan fraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom menggunakan pelarut etil asetat. Fraksi yang diperoleh dipisahkan menggunakan *vakum rotary evaporator* pada temperatur ± 50 °C untuk mendapatkan fraksi kental. Hasil kemudian ditimbang dan dihitung untuk mengetahui % rendemen yang didapatkan menggunakan persamaan (1).

4.4.5 Analisis dengan LC-MS/MS

Fraksi yang di peroleh dilakukan analisis 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 μm , 2,1x50 mm, injeksi 1 μL , 40 °C, eluennya A: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ *formic acid*, B: *Acetonitrile* + 0.1% *formic acid*. Proses MS - MS/MS menggunakan Xevo G2-XS QToF (*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.

4.4.6 Penapisan Fitokimia

4.4.6.1 Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan fraksi etil asetat dan 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*. Terbentuknya endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut

mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi *dragendorf* akan terbentuk bendapan merah jingga (Harborne, 1987).

4.4.6.2 Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan melarutkan fraksi etil asetat 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).

4.4.6.3 Uji Tanin/Polifenol

Uji tannin/polifenol dilakukan dengan melarutkan fraksi dilarutkan fraksi etil asetat dengan 5 mL pelarutnya, kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama sebagai kontrol, tabung kedua ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%. Uji positif ditandai dengan munculnya warna hitam atau biru tua (Harborne, 1987).

4.4.6.4 Uji Terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan melarutkan fraksi etil asetat dengan 5 mL pelarutnya, kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama sebagai kontrol, tabung kedua ditambahkan asam asetat anhidrat 0,5 mL dan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid, sedangkan adanya terpenoid ditunjukkan dengan cincin kecoklatan pada perbatasan larutan (Ciulei, 1984).

4.4.7 Pembuatan SNEDDS

Setiap formulasi dibuat sebanyak 1,25 ml dengan konsentrasi fraksi 40%, 60% dan 80%. Pembuatan SNEDDS dilakukan dengan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) sebanyak 0,5 g ; 0,75 g dan 1 g, masing-masing dimasukkan ke dalam vial, kemudian masing-masing vial ditambahkan 0,125 mL Capryoll, 0,875 mL tween 20, dan 0,25 mL PEG (*Poli Ethylen Glikol*) 400. Setiap penambahan bahan disonikasi selama 4x2 menit.

4.4.8 Uji PSA

4.4.8.1 Ukuran Partikel

Sebanyak 1 ml formulasi SNEDDS dilarutkan dalam 100 ml akuades, diaduk perlahan hingga membentuk dispersi. Selanjutnya diukur ukuran partikel masing-masing formulasi menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) (Rahayu, 2016).

4.4.8.2 Zeta Potensial

Formulasi SNEDDS 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).

4.4.9 Uji TEM

Terhadap formulasi SNEDDS yang paling optimal diambil sebanyak 1 ml dilarutkan dalam 100 ml akuades, kemudian diambil 1 tetes larutan tersebut dan ditetaskan pada *copper grid* yang telah dilapisi dengan alat *Auto Carbon Coated* (JOEL JEC-560, Japan). Kemudian dimasukkan ke dalam holder dan dianalisis pada percepatan 120 kV dengan magnifikasi 60000 (kristiani dkk., 2019).

4.4.10 Uji Aktivitas Antikanker secara *In Vitro* (CCRC, 2009)

4.4.10.1 Penyiapan Sel

Sel T47D dan MCF-7 diambil dari koleksi laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, 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 ke dalam *conical tube* yang telah berisi 10 mL media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), kemudian disentrifugasi untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan media. Pelet yang terbentuk dimasukkan ke dalam *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.

4.4.10.2 Panen Sel

Dibuang media kultur terlebih dahulu, lalu dicuci dengan 10 mL PBS (*Phosphate Buffered Saline*) hingga sisa-sisa media hilang. Ditambahkan trispsin 0,1 % sebanyak 2 ml secara merata dan diinkubasi selama 3 menit, ditambahkan media DMEM 5 mL untuk menginaktifkan sel serta dilakukan resuspensi, diamati dibawah mikroskop *inverted*.

4.4.10.3 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 (2) sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel per mL} = \frac{n}{4} \times 10^4 \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan :

n: jumlah sel pada seluruh kamar

4.4.10.4 Peletakan Sel pada Plate

Jumlah sel yang diletakkan pada *plate* setiap sumuran diketahui dengan menggunakan persamaan (3) sebagai berikut:

$$\sum \text{ panen mL panen sel yang ditransfer} = \frac{\sum \text{total sel yang diperlukan}}{\sum \text{sel terhitung/mL}} \dots\dots\dots(3)$$

Sel yang telah dihitung sesuai kebutuhan kemudian ditambahkan media DMEM hingga 10 mL, lalu diletakkan dalam setiap sumuran pada plate sebanyak 100 µL. Disisakan beberapa sumuran untuk kontrol sel dan kontrol media. Selanjutnya diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C/ 5% CO₂.

4.4.10.5 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada Plate

Ditimbang masing-masing formulasi SNEDDS sebanyak 10 mg dalam wadah yang berbeda, lalu dilarutkan masing-masing formulasi dalam 100 μ L DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dan dihomogenkan dengan vorteks. Dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan pelarut media DMEM dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 ppm. 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 media. Dimasukkan 100 μ L PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali. Lalu dimasukkan variasi konsentrasi larutan sampel masing-masing sebanyak 100 μ L ke dalam sumuran yang telah dikultur sel secara berurutan, setiap konsentrasi diulang sebanyak 3x (triplo). Diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C/ 5% CO₂.

4.4.10.6 Penambahan Larutan MTT dan pembacaan absorbansi

Media sel dibuang dengan cara dibalik *plate* 180° dan setiap sumuran dicuci dengan 200 μ L PBS, lalu ditambahkan larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) berwarna kuning 100 μ L ke setiap sumuran. Kemudian diinkubasi 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 sebanyak 100 μ L, 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 Formulasi. Tahapan awalnya ini dihidupkan ELISA *reader* dan ditunggu hingga *proccessing* selesai, dibuka pembungkus *plate* dan tutup *plate* kemudian dimasukkan ke ELISA *reader*, dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 595 nm. Dimatikan kembali ELISA *reader*. Lalu dihitung persentase sel hidup dengan persamaan (4).

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{A-B}{C-B} \times 100\% \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan :

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

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur)

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



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi tanaman

Determinasi tanaman pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas botani dari tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang digunakan sebagai sampel sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan digunakan sebagai bahan penelitian. Determinasi dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Bagian tanaman yang diuji meliputi ranting beserta daun dan bunganya. Berdasarkan hasil determinasi, diketahui bahwa sampel tanaman jambu biji yang digunakan berasal dari spesies *Psidium guajava* L., familia *myrtaceae*, Ordo *myrtales*, kelas *magnoliopsida*, divisi *tracheophyta*. Hasil determinasi disajikan pada Lampiran 1.

5.2 Preparasi sampel

Dalam melakukan preparasi sampel terdapat beberapa perlakuan yang harus dilakukan yaitu pencucian, pengeringan, dan penghancuran. Pencucian bertujuan untuk menghilangkan pengotor yang melekat pada daun. Kemudian dilakukan pengeringan dengan tujuan untuk menghilangkan kandungan air (pengotor) yang terdapat dalam sampel sehingga proses ekstraksi akan lebih optimal, pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terpapar sinar matahari secara langsung untuk menghindari kerusakan komposisi kimia pada sampel daun. Daun jambu biji yang telah kering kemudian dihancurkan hingga menjadi serbuk. Penghancuran sampel bertujuan untuk memperkecil ukuran sampel sehingga akan memperluas permukaan sampel. Permukaan sampel yang luas akan meningkatkan kontak antara sampel dengan pelarut sehingga proses ekstraksi semakin optimal.

5.3 Ekstraksi daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan

pelarut organik pada suhu ruangan sehingga dapat menghindari rusaknya metabolit sekunder yang bersifat termolabil. Saat perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik (Mukhriani, 2014; Darwis, 2000). Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dan dilakukan remaserasi agar seluruh senyawa yang terdapat pada sampel dapat terekstrak dan dapat memperbesar rendemen. Remaserasi merupakan metode ekstraksi yang terjadi pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyarian maserat pertama, dan seterusnya. Pelarut kedua ditambahkan sebanyak penambahan pelarut pertama (depkes, 2000).

Saat proses ekstraksi, rendaman disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya matahari secara langsung untuk mencegah reaksi yang dikatalisis oleh cahaya matahari, sehingga tidak terjadi kerusakan metabolit sekunder pada sampel. Maserat yang masih mengandung pelarut kemudian dipekatkan menggunakan *vakum rotary evaporator* pada temperatur ± 50 °C hingga tidak terdapat lagi pelarut yang tersisa. Rendemen yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2 dan perhitungan rendemen pada Lampiran 7.

Tabel 2. Hasil rendemen ekstrak etanol daun jambu biji

| Berat serbuk (g) | Berat ekstrak pekat (g) | Rendemen (%) (b/b) |
|------------------|-------------------------|--------------------|
| 750 | 263,935 | 35,19 |

Pada tahap ini juga dilakukan pemeriksaan secara organoleptis terhadap ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) untuk mengetahui bentuk fisik dari ekstrak. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan pancaindra. Hasil pemeriksaan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan organolepsi ekstrak etanol daun jambu biji

| Organolepsi | Hasil |
|-------------|-----------------|
| Bentuk | Cairan kental |
| Warna | Coklat tua |
| Bau | Khas jambu biji |

5.4 Fraksinasi ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Tujuan fraksinasi pada penelitian ini adalah untuk mengelompokkan kandungan senyawa pada ekstrak yang didasarkan pada kepolaranya. Metode yang digunakan untuk fraksinasi yaitu kromatografi kolom gravitasi. Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dilakukan dalam suatu kolom yang diisi dengan fase diam dan dialiri fase gerak untuk memisahkan komponen dengan memanfaatkan kepolaran senyawa dan gaya gravitasi (Mutmainnah dkk., 2017). Pelarut (fase gerak) yang digunakan adalah etil asetat, sehingga senyawa yang diperoleh adalah senyawa yang bersifat semipolar. Hasil tersebut sesuai dengan kepolaran pelarut (etil asetat) yang digunakan yaitu semipolar.

Fraksi yang masih mengandung pelarut kemudian dipekatkan menggunakan *vakum rotary evaporator* pada temperatur ± 50 °C hingga tidak terdapat lagi pelarut yang tersisa. Rendemen yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 4 dan perhitungan rendemen pada Lampiran 7.

Tabel 4. Hasil rendemen fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji

| Berat ekstrak (g) | Berat fraksi pekat (g) | Rendemen (%) (b/b) |
|-------------------|------------------------|--------------------|
| 263,935 | 46,06 | 17,451 |

Pada tahap ini juga dilakukan pemeriksaan secara organoleptis terhadap fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.). Hasil pemeriksaan disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan organolepsi fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji

| Organolepsi | Hasil |
|-------------|---------------|
| Bentuk | Cairan kental |
| Warna | Hijau tua |
| Bau | Tidak berbau |

5.5 Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia adalah metode untuk menentukan jenis metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan karena sifatnya yang dapat bereaksi secara khas dengan pereaksi tertentu. Tujuan penapisan fitokimia untuk memberikan gambaran mengenai golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu ekstrak secara kualitatif (Kristanti dkk., 2008). Identifikasi dilakukan dengan melihat adanya perubahan warna, terjadi buih atau endapan setelah diberikan pereaksi khusus dari masing-masing golongan senyawa. Uji yang dilakukan meliputi pengujian terhadap senyawa golongan tanin/polifenol, alkaloid, flavonoid, dan terpenoid. Hasil uji dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil penapisan fitokimia

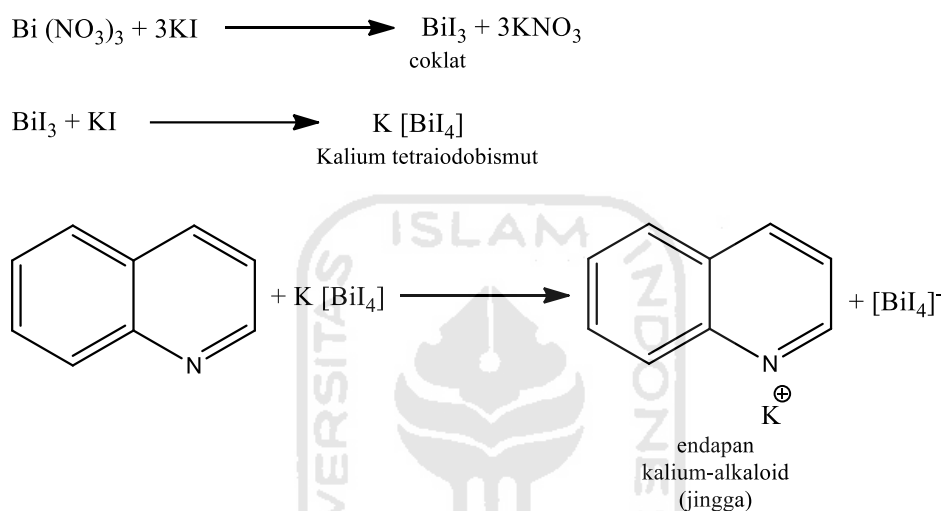
| Uji Fitokimia | Pereaksi | Hasil pengamatan | Hasil Uji |
|-----------------|---|--|-----------|
| Alkaloid | <i>Dragendorf</i> | Larutan kuning kecoklatan | - |
| Flavonoid | HCl + Mg | Ada Endapan (larutan hijau) | + |
| Tanin/polifenol | FeCl ₃ | Ada endapan (Larutan hujau kehitaman) | + |
| Terpenoid | Asam asetat anhidrat + H ₂ SO ₄ | Ada cincin kecoklatan (Larutan hijau terang) | + |

Ket.: + : Positif (terdapat senyawa); - : Negatif (tidak terdapat senyawa)

Dari uji penapisan fitokimia, secara kualitatif dapat diketahui bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) positif mengandung senyawa golongan flavonoid, tanin/polifenol, terpenoid, dan negatif terhadap adanya golongan senyawa alkaloid. Hasil reaksi matabolit sekunder dengan pereaksi ditunjukkan pada Lampiran 2.

5.5.1 Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan pereaksi *Dragendorf*. Hasil positif uji *Dragendorf* ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Endapan tersebut adalah kalium-alkaloid yang berasal dari pembentukan ikatan kovalen koordinasi antara atom N pada alkaloid dengan ion K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi pada uji *Dragendorf* ditunjukkan pada Gambar 10.



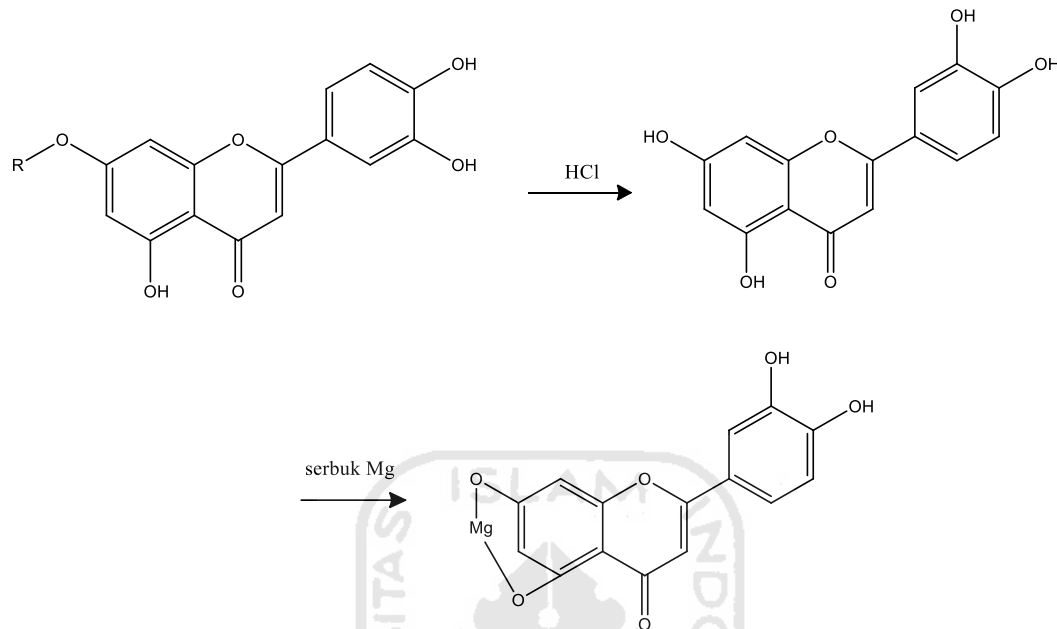
Gambar 10. Reaksi uji *Dragendorf* (Setyowati dkk., 2014)

Berdasarkan uji alkaloid yang telah dilakukan terhadap fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) menunjukkan hasil yang negatif, ditandai dengan tidak terbentuknya endapan berwarna jingga.

5.5.2 Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi *Wilstater* yaitu HCl dan serbuk Mg. Penambahan HCl pekat 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 (Marliana dkk., 2005). Reduksi dengan Mg dan HCl pekat ini menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah sampai jingga pada senyawa flavon, warna merah tua pada senyawa flavanol atau flavanon, dan warna hijau pada senyawa

glikon atau glikosida (Nita, 2019). Reaksi yang terjadi ditunjukkan seperti Gambar 11.

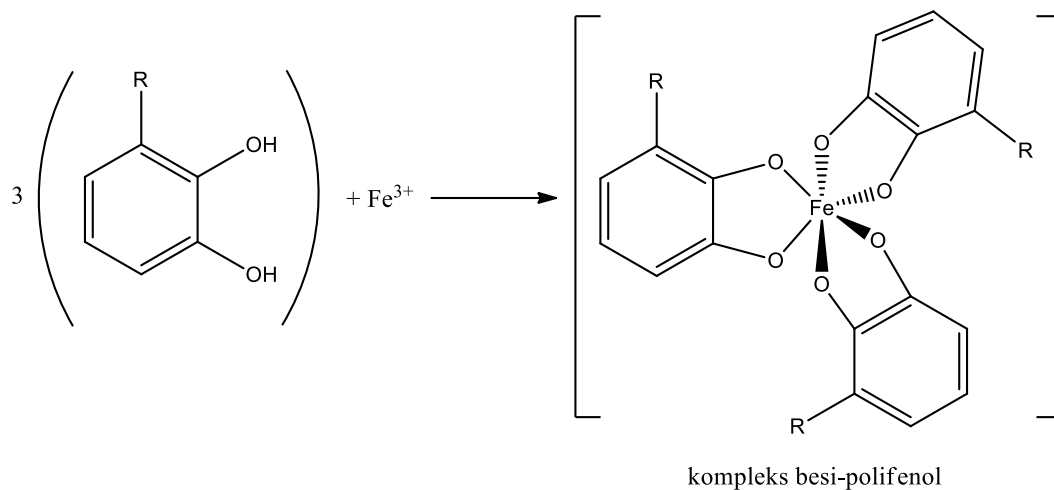


Gambar 11. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat (Marliana dkk., 2005).

Berdasarkan uji flavonoid yang telah dilakukan terhadap fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) menunjukkan hasil yang positif, ditandai dengan terjadi perubahan warna larutan menjadi hijau serta terbentuk endapan, hal ini menunjukkan adanya senyawa flavonoid berupa glikon atau glikosida yang bereaksi dengan pereaksi *Wilstater*.

5.5.3 Uji tanin/polifenol

Uji tanin dilakukan dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 . Uji ini akan memberikan hasil positif dengan terbentuknya warna hijau kehitaman pada sampel. Tanin apabila direaksikan dengan FeCl_3 akan membentuk warna hijau kehitaman. Terjadinya warna hijau kehitaman ini karena terbentuknya senyawa kompleks antara logam Fe dan gugus hidroksil pada senyawa tanin (Effendy, 2007). Reaksi yang terjadi ditunjukkan seperti Gambar 12.



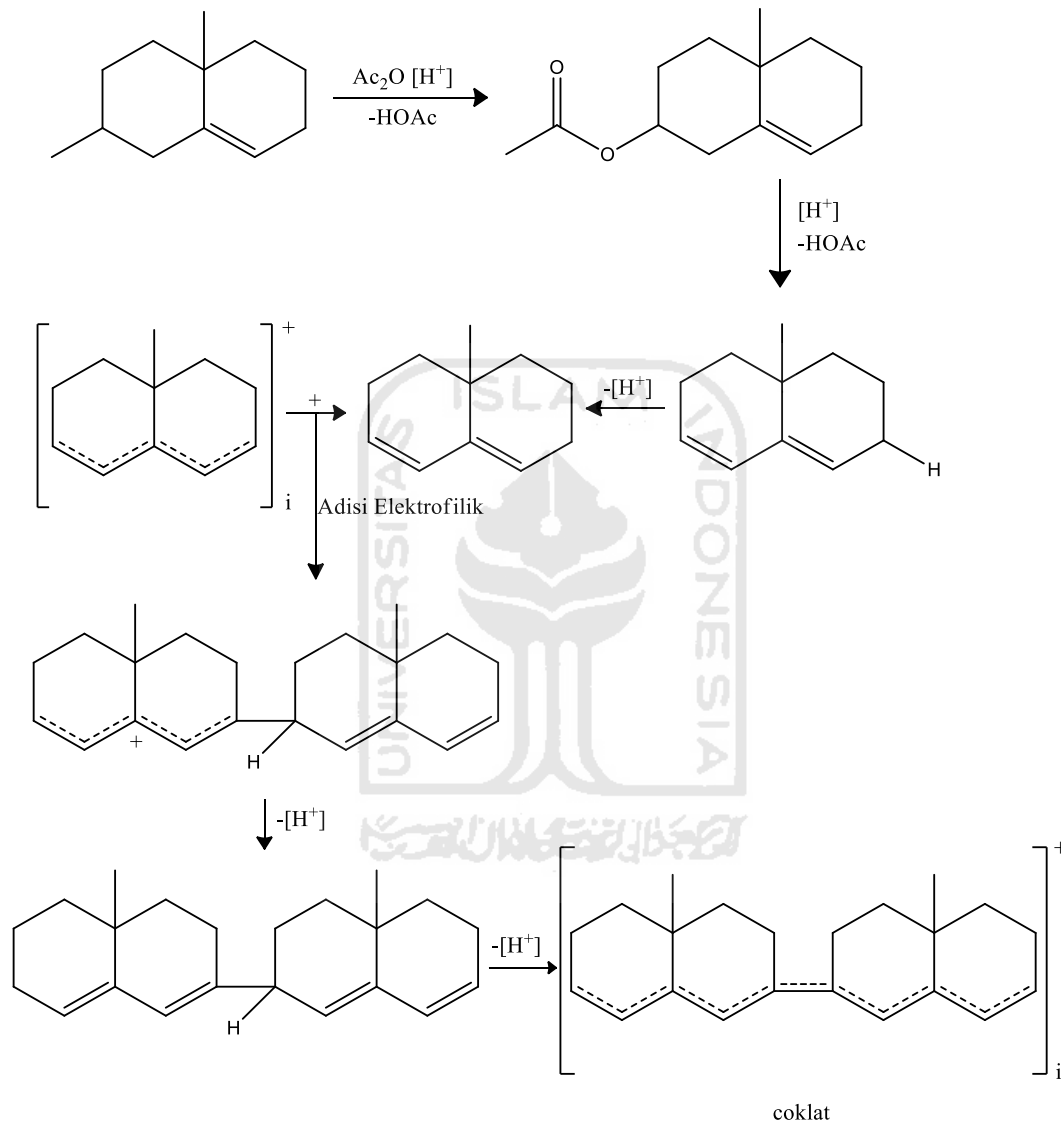
Gambar 12. Reaksi tanin/polifenol dengan FeCl_3 (Perronn dan Brumaghim, 2009).

Berdasarkan uji tanin/polifenol yang telah dilakukan terhadap fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) menunjukkan hasil yang positif, ditandai dengan terjadi perubahan warna larutan menjadi hijau serta terbentuk endapan hitam, hal ini menunjukkan adanya senyawa tanin/polifenol yang bereaksi dengan FeCl_3 .

5.5.4 Uji terpenoid

Uji terpenoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi *Liebermen-Burchard* yaitu berupa campuran antara asam asetat anhidrat dengan H_2SO_4 pekat. Terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan larutan menunjukkan adanya senyawa terpenoid (Ciulei, 1984). Prinsip reaksi dalam uji terpenoid adalah kondensasi atau pelepasan H_2O dan penggabungan karbokation. Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrat. Kemudian gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas, sehingga terbentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya dan mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti dengan pelepasan hidrogen

beserta elektronnya, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan munculnya warna coklat pada larutan (Siadi, 2012). Reaksi tersebut dapat ditunjukkan pada Gambar 13.



Gambar 13. Reaksi terpenoid dengan pereaksi *Liebermann Burchard* (Setyowati dkk., 2014)

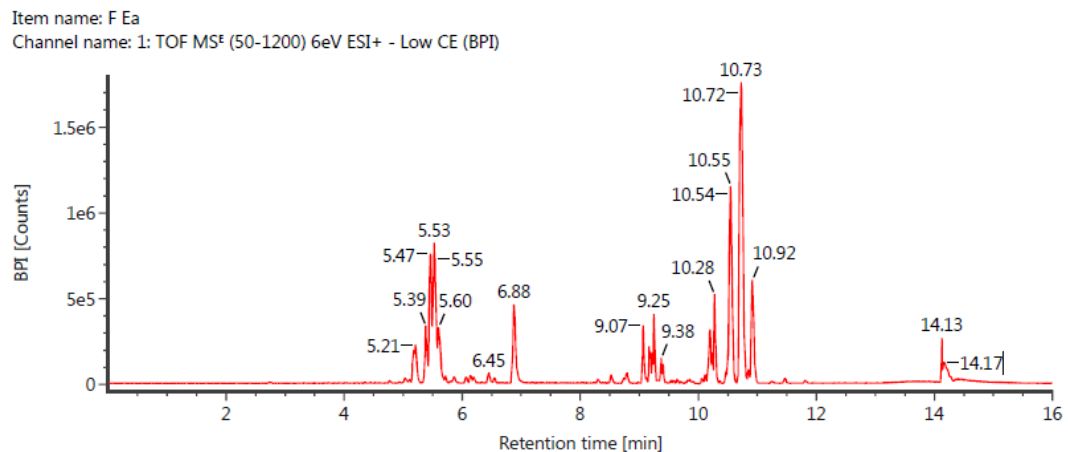
Berdasarkan uji terpenoid yang telah dilakukan terhadap fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) menunjukkan hasil yang positif, ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan larutan,

hal ini menunjukkan adanya senyawa terpenoid yang bereaksi dengan pereaksi *Liebermann Burchard* .

5.6 Analisis kandungan senyawa dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) menggunakan LC-MS/MS

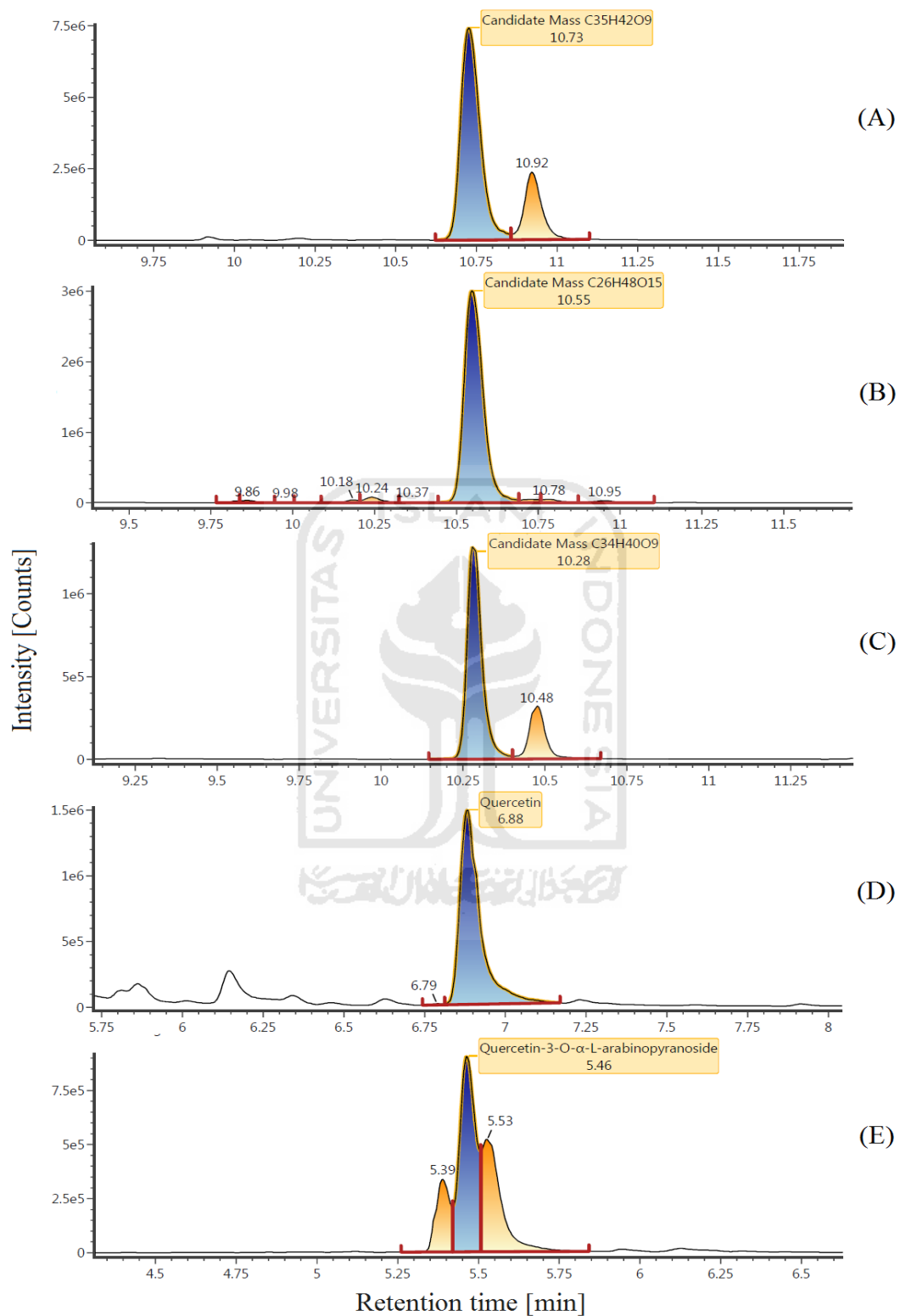
Analisis kandungan senyawa dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* l.) digunakan jenis instrumen UPLC-QTOF-MS/MS. Pada sistem LC, eluen yang digunakan yaitu campuran dari fase gerak A (air + 0,1% asam format) dan fase gerak B (asetonitril + 0,1% asam format) dengan sistem elusi gradien, dimana perubahan waktu dapat mempengaruhi perbandingan jumlah kedua pelarut. Campuran dari fase gerak asetonitril/asam format mempercepat pemisahan di dalam kolom secara efisien dalam kurun waktu 10-15 menit (Frag dkk., 2016). Sedangkan fase diam yang digunakan adalah C18 atau oktadesil silika. Oktadesil silika (C18) dapat memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi (Gupta dkk., 2013)

Pada sistem MS menggunakan sumber ion *Electrospray ionization* (ESI) pengionan positif dan analisator MS *Quadrupole time of flight* (Q-ToF). ESI merupakan metode ionisasi untuk mendapatkan berat molekul dari senyawa metabolit dengan teknik *spray*. Ion yang terdeteksi dapat berupa $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, analit dengan tambahan seperti Na^+ , K^+ , H_3O^+ , NH_4^+ dan molekul dari fase gerak, seperti asetonitril atau metanol. Kation-kation yang sering terbentuk dalam metode ESI adalah ion pseudomolekul hasil adisi antara analit dengan proton $(H)^+$. Oleh karena itu, nilai m/z dalam spektra akan sering bernilai $(M+H)^+$ atau $(2M+H)^+$, dengan M adalah bobot molekul analit. ESI Pengionan positif akan membuat analit menjadi terprotonasi atau menjadi kation (Kazakevich dan Lobrutto, 2007). Selanjutnya ion-ion yang diperoleh akan dipisahkan dengan analisator jenis Q-ToF-MS. Hasil pemisahan dari Q-ToF-MS akan dideteksi di detektor dan akan menampilkan kromatogram yang dapat diolah menggunakan aplikasi MassLynx versi 4.1 sehingga dapat ditampilkan spektra dari tiap-tiap kromatogram (Maharani dkk., 2016).



Gambar 14. Kromatogram fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Gambar 14 menunjukkan beberapa puncak dengan waktu retensi yang berbeda-beda, setiap puncak dalam kromatogram merepresentasikan komponen tertentu. Setidaknya terdapat 5 puncak dengan intensitas terbesar pada waktu retensi yang berbeda-beda, hal ini menunjukkan bahwa terdapat 5 senyawa yang paling dominan di dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 15.



Gambar 15. Kromatogram senyawa yang teridentifikasi oleh LC-MS/MS, (A) waktu retensi 10.73 (B) 10.55 (C) 10.28 (D) 6.88 (E) 5.46

Gambar 15 menunjukkan kromatogram dari senyawa yang teridentifikasi, kelima senyawa memiliki waktu retensi yang berbeda-beda yaitu kromatogram (A) 10.73 (B) 10.55 (C) 10.28 (D) 6.88 (E) 5.46. Waktu retensi adalah waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor. Waktu retensi berhubungan dengan kepolaran dari senyawa yang teridentifikasi karena adanya interaksi antara senyawa di dalam sampel dan fase diam (C18 atau oktadesil silika) yang terombang-ambing di dalam kolom. Fase diam yang digunakan bersifat non polar, sehingga senyawa yang memiliki waktu retensi terbesar adalah senyawa yang bersifat non polar. Hal ini karena senyawa yang bersifat non polar akan memiliki interaksi (adsorpsi) yang lebih kuat dengan fase diam sehingga akan membutuhkan waktu yang lama untuk melewati kolom. Sedangkan senyawa yang bersifat polar akan memiliki interaksi (adsorpsi) yang lemah dengan fase diam sehingga senyawa tersebut cenderung akan terelusi oleh fase gerak yang bersifat relatif polar dan akan membutuhkan waktu yang lebih cepat untuk melewati kolom. Dari waktu retensi tersebut maka dapat diketahui urutan kepolaran senyawa yang teridentifikasi yaitu, senyawa A < B < C < D < E.

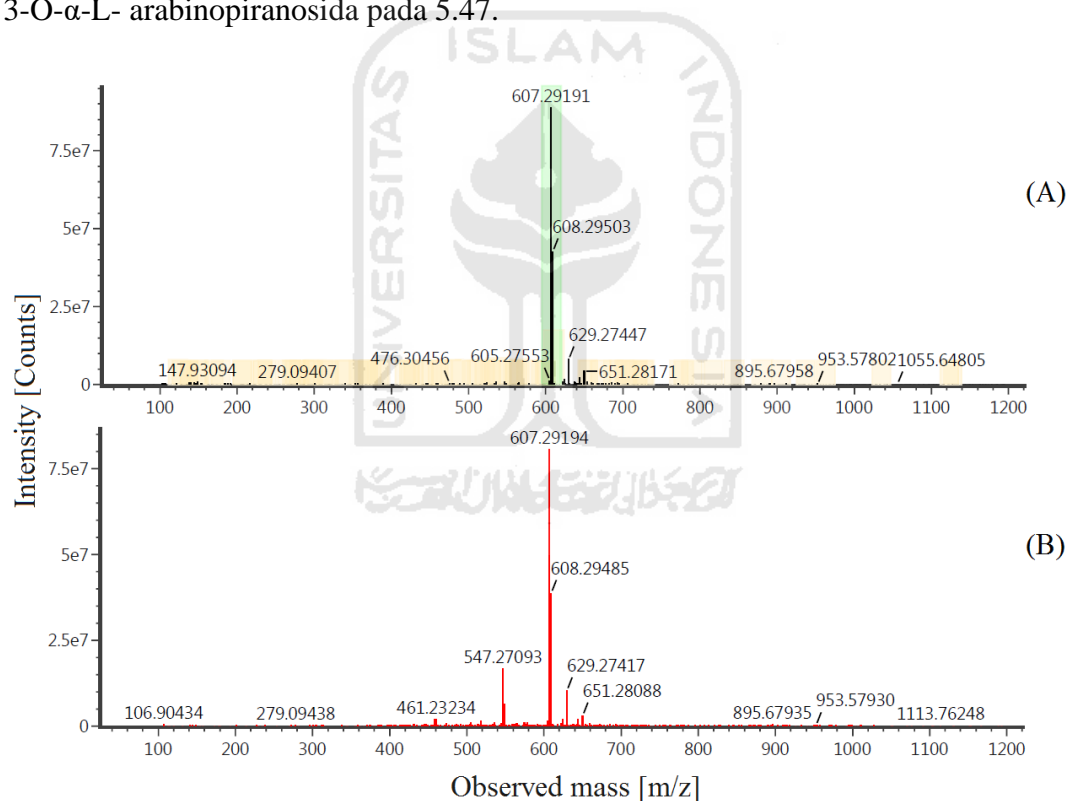
Senyawa yang telah dipisahkan oleh kromatografi akan diubah menjadi ion positif menggunakan sumber ion ESI (+). Selanjutnya ion-ion yang diperoleh akan dipisahkan dengan analisator jenis Q-ToF-MS. Hasil pemisahan dari Q-ToF-MS akan dideteksi oleh detektor sehingga akan diperoleh spektrum massa yang akan menunjukkan berat molekul (m/z) dan intensitas sinyal yang akan memprediksi formula dan struktur senyawa yang teridentifikasi.

Tabel 7. Hasil analisis LC-MS/MS dengan sumber pengionan positif

| Component name | Observed m/z | Neutral mass (Da) | Observed RT (min) | Detector counts | Formula |
|--|-------------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------|---|
| <i>Candidate Mass</i> C ₃₅ H ₄₂ O ₉ | 607,2919 | 606,28288 | 10.73 | 4891824 | C ₃₅ H ₄₂ O ₉ |
| <i>Candidate Mass</i> C ₂₆ H ₄₈ O ₁₅ | 623,2871 | 600,29932 | 10.55 | 1917874 | C ₂₆ H ₄₈ O ₁₅ |

| | | | | | |
|--|--|-----------|-------|--------|---|
| <i>Candidate Mass</i> | 593,2764 | 592,26723 | 10.29 | 543388 | C ₃₄ H ₄₀ O ₉ |
| | C ₃₄ H ₄₀ O ₉ | | | | |
| Quercetin | 303,0502 | 302,04265 | 6.88 | 663676 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ |
| Quercetin-3-O- α -L- arabinopyranoside | 435,0925 | 434,08491 | 5.47 | 469330 | C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁ |

Dilihat dari Tabel 7, terdapat lima senyawa dominan yang teridentifikasi oleh detektor MS berdasarkan spektrum massa pada Gambar 16-20, yaitu senyawa kandidat C₃₅H₄₂O₉ pada waktu retensi 10.75, senyawa kandidat C₂₆H₄₈O₁₅ pada 10.55, senyawa kandidat C₃₄H₄₀O₉ pada 10.29, kuersetin pada 6.89 dan kuersetin-3-O- α -L- arabinopiranosida pada 5.47.

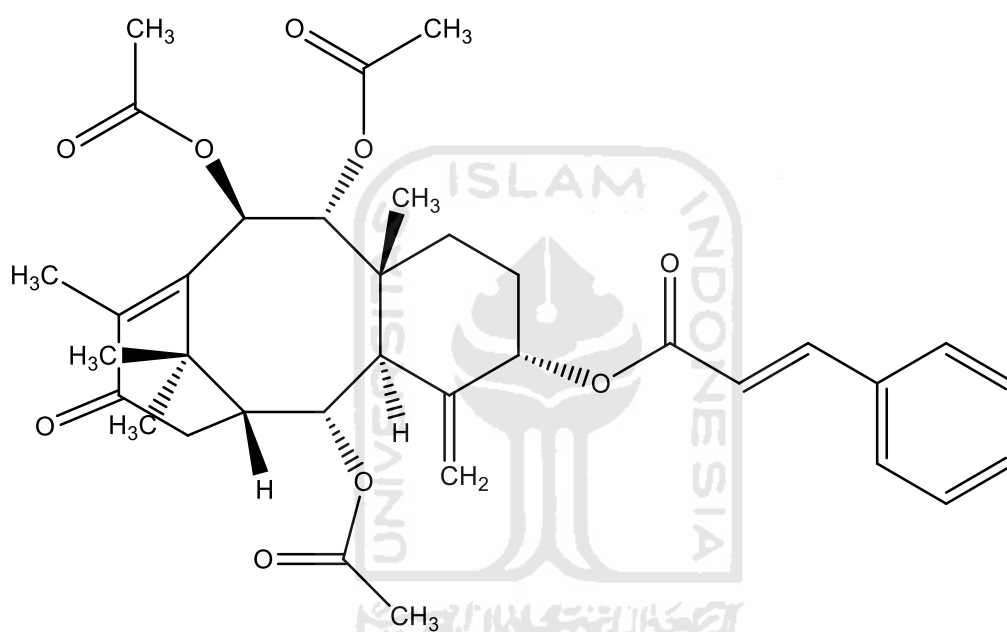


Gambar 16. Spektrum massa senyawa kandidat C₃₅H₄₂O₉, (A) *low energy* (B) *high energy*

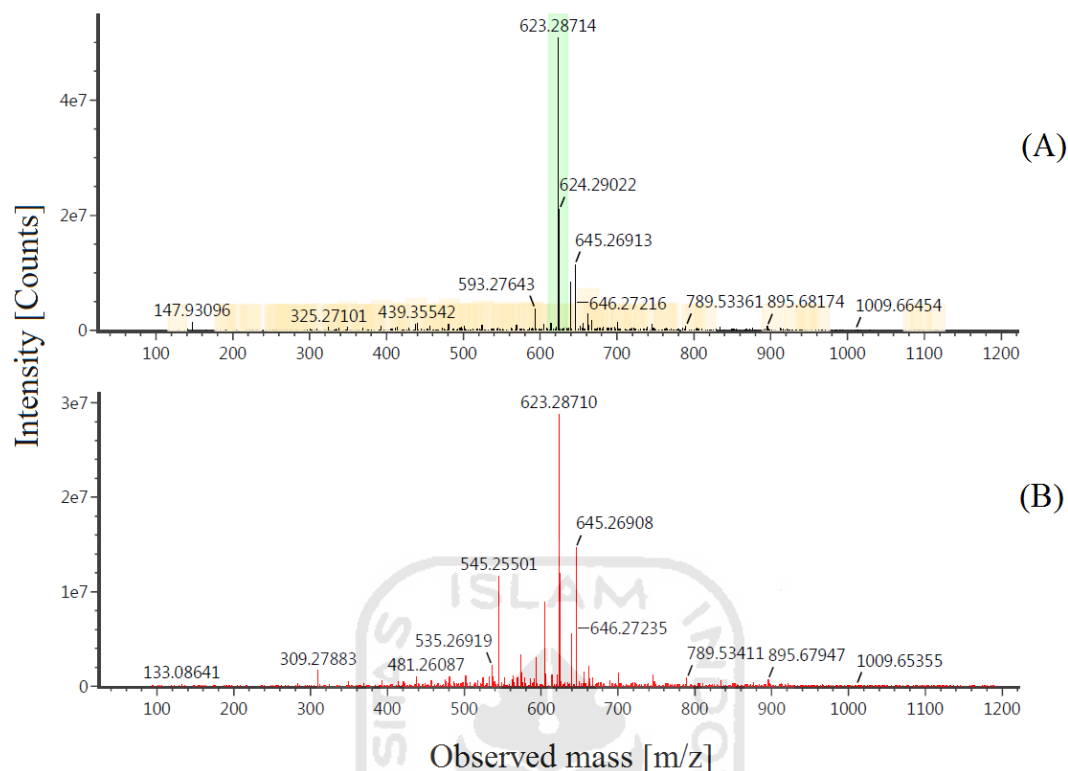
Gambar 16 menunjukkan spektrum massa senyawa kandidat C₃₅H₄₂O₉. Dilihat dari formulanya bahwa senyawa tersebut memiliki berat molekul sebesar 606,28288 (Da) , namun berat molekul yang teridentifikasi adalah 607,2919 m/z,

ini karena molekul yang teridentifikasi teradisi oleh 1 proton H^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom H yaitu 1.

Diperkirakan senyawa tersebut merupakan Taxinine, senyawa tersebut memiliki formula $C_{35}H_{42}O_9$ dengan berat molekul 606,71 g/mol. Taxinine merupakan senyawa golongan terpenoid yang secara kualitatif teridentifikasi pada uji fitokimia menggunakan pereaksi *Liebermen-Burchard*, senyawa tersebut larut dalam etil asetat.



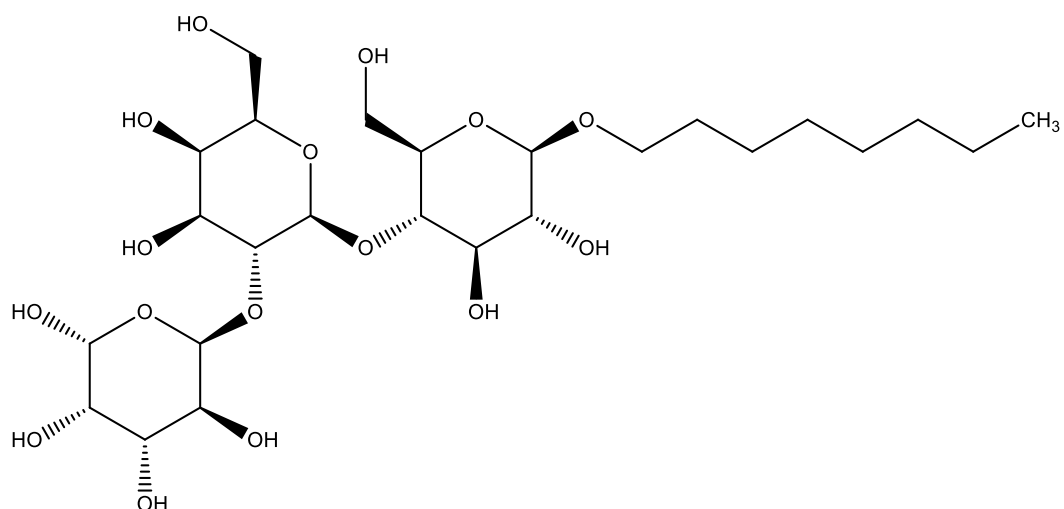
Gambar 17. Struktur senyawa taxinine



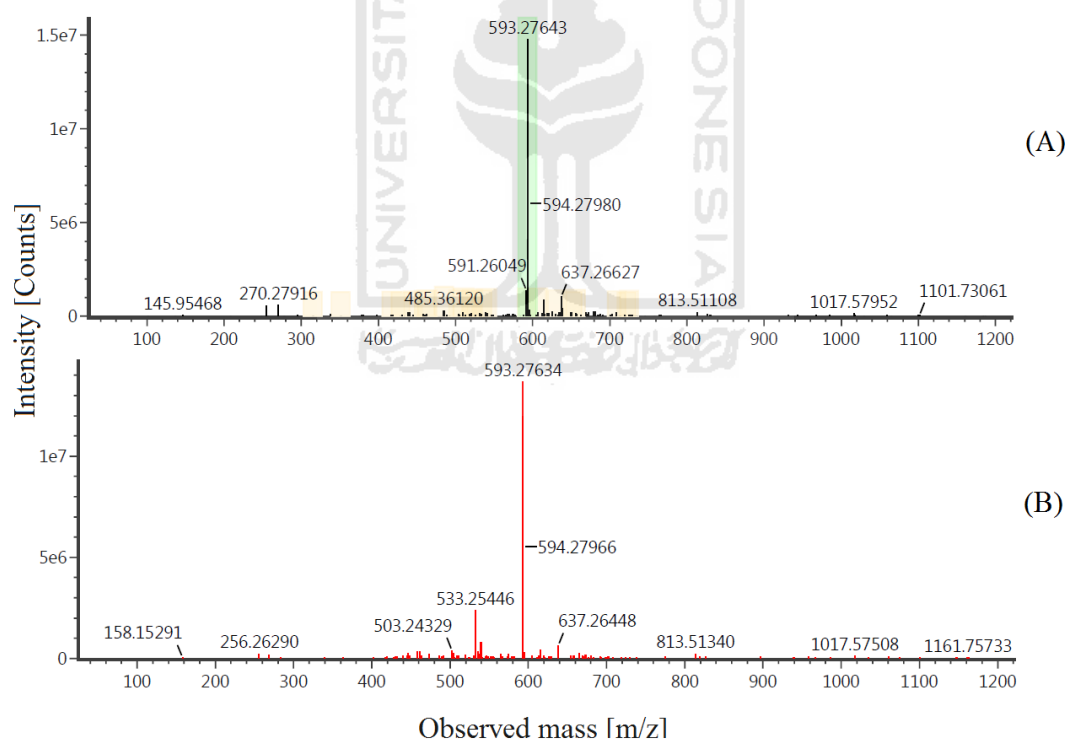
Gambar 18. Spektrum massa senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{15}$, (A) *low energy* (B) *high energy*

Gambar 18 menunjukkan spektrum massa senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{15}$. Dilihat dari formulanya bahwa senyawa tersebut memiliki berat molekul sebesar 600,29932 (Da) , namun berat molekul yang teridentifikasi adalah 623,2871m/z, ini karena molekul yang teridentifikasi teradisi oleh 1 proton Na^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom Na yaitu 23.

Diperkirakan senyawa tersebut merupakan oktil 4-O-[2-O-(α -L-fukopiranosil)- β -D-galaktopiranosil]- β -D-glukopiranosida, senyawa tersebut memiliki formula $C_{26}H_{48}O_{15}$ dengan berat molekul 600,299 g/mol.



Gambar 19. Struktur senyawa oktil 4-O-[2-O-(α -L-fukopiranosil)- β -D-galaktopiranosil]- β -D-glukopiranosida

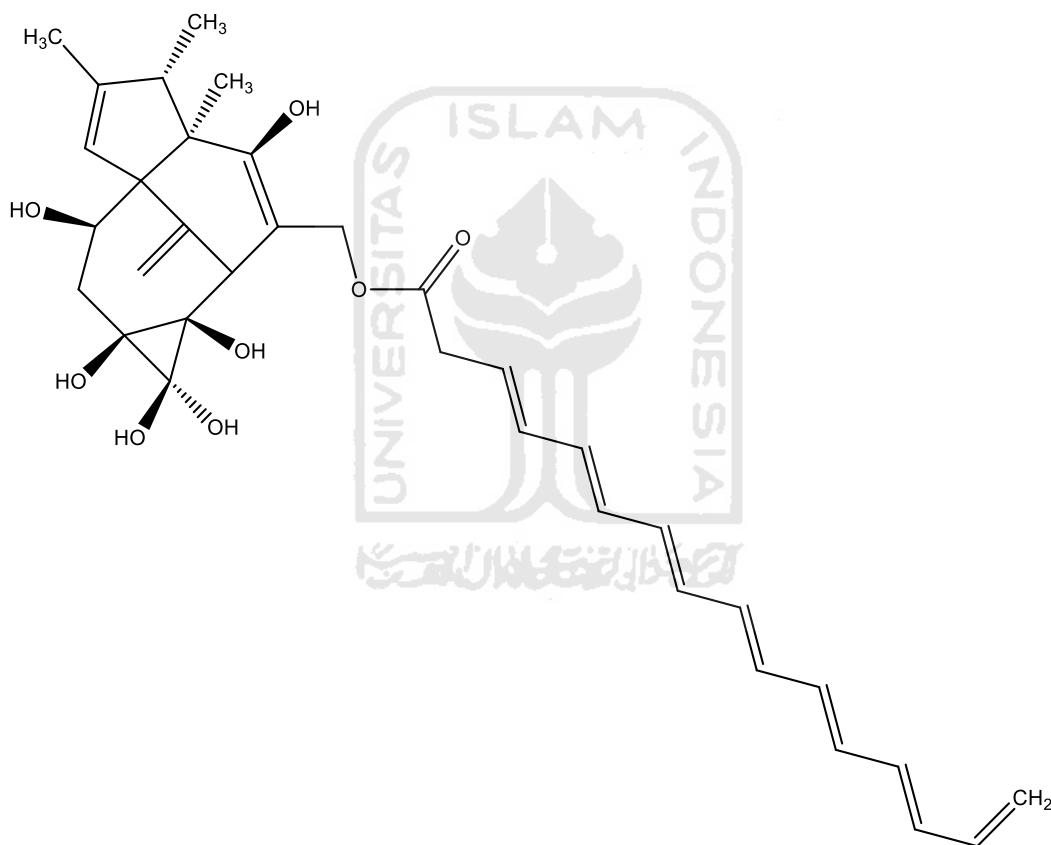


Gambar 20. Spektrum massa senyawa kandidat $C_{34}H_{40}O_9$, (A) *low energy* (B) *high energy*

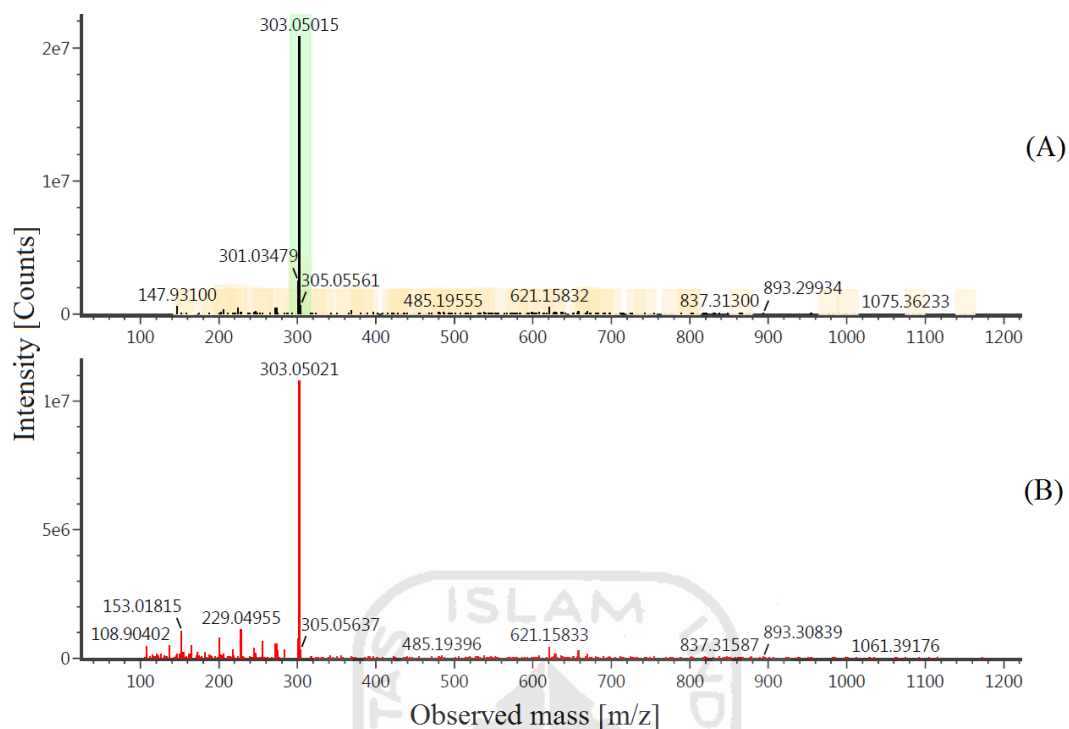
Gambar 20 menunjukkan spektrum massa senyawa kandidat $C_{34}H_{40}O_9$. Dilihat dari formulanya bahwa senyawa tersebut memiliki berat molekul sebesar

592,26723 (Da) , namun berat molekul yang teridentifikasi adalah 593,2764 m/z, ini karena molekul yang teridentifikasi teradisi oleh 1 proton H^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom H yaitu 1.

Diperkirakan senyawa tersebut merupakan 17-hidroksiingenol, senyawa tersebut memiliki formula $C_{34}H_{40}O_9$ dengan berat molekul 592,2690g/mol, $[M+1]^+$ 593,2763 (Bafor dkk., 2018). 17-hidroksiingenol merupakan senyawa golongan terpenoid yang secara kualitatif teridentifikasi pada uji fitokimia menggunakan pereaksi *Liebermen-Burchard*.

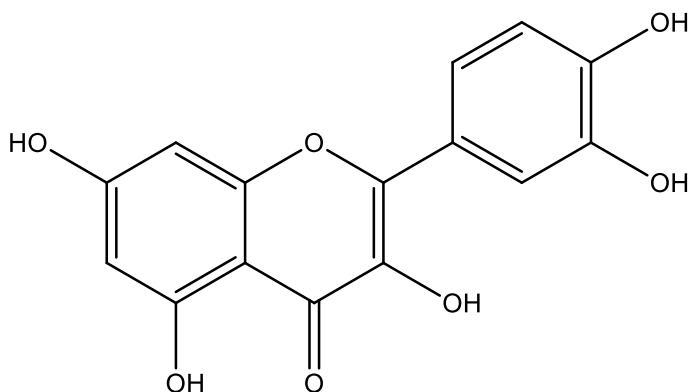


Gambar 21. Struktur senyawa 17-hidroksiingenol

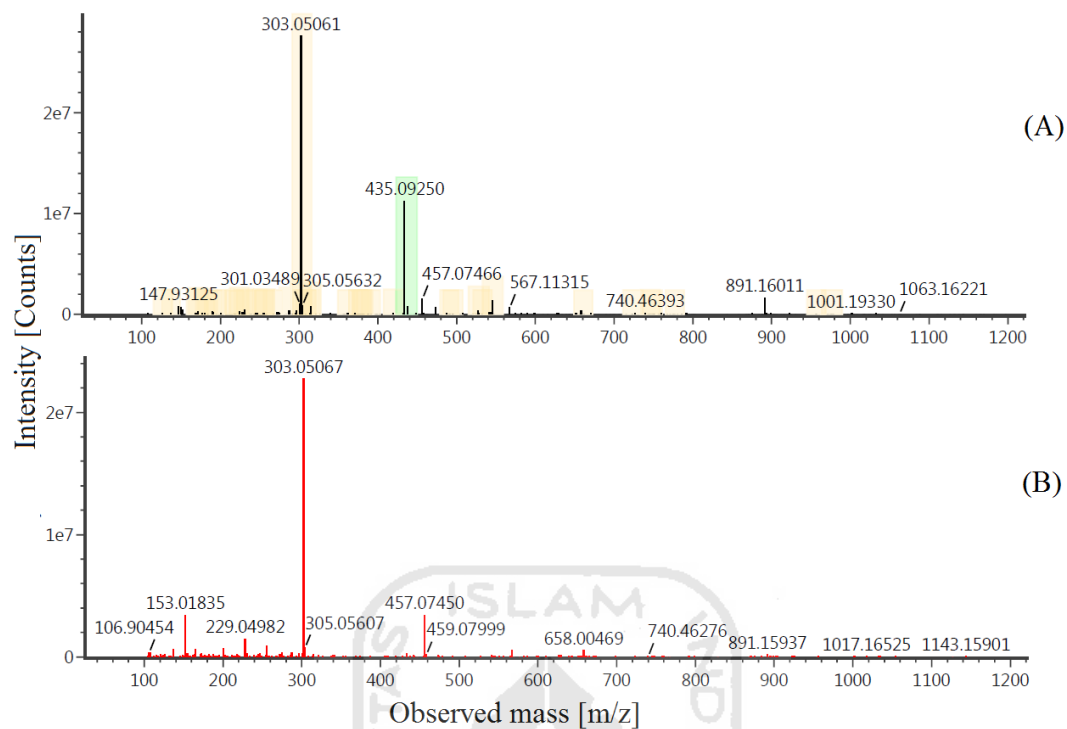


Gambar 22. Spektrum massa kuersetin, (A) *low energy* (B) *high energy*

Gambar 22 menunjukkan spektrum massa kuersetin dengan formula $C_{15}H_{10}O_7$. Dilihat dari formulanya bahwa senyawa tersebut memiliki berat molekul sebesar 302,04265 (Da), namun berat molekul yang teridentifikasi adalah 303,0502m/z, ini karena molekul yang teridentifikasi teradisi oleh 1 proton H^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom H yaitu 1.

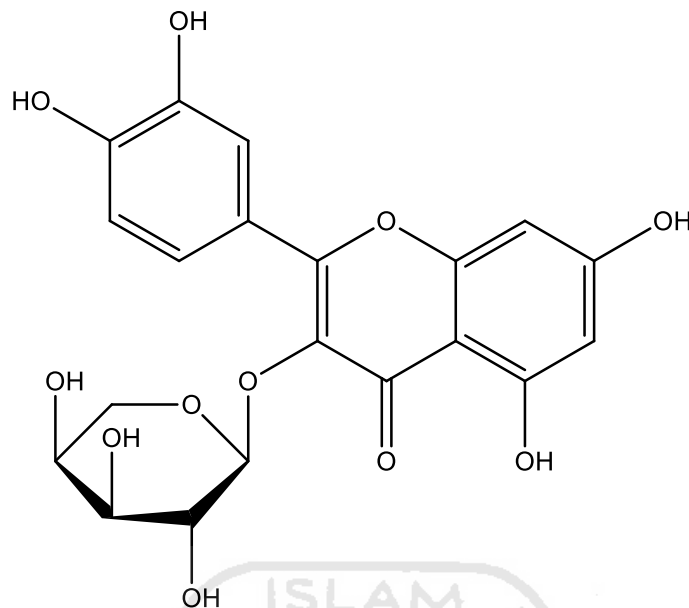


Gambar 23. Struktur senyawa kuersetin



Gambar 24. Spektrum massa kuersetin-3-O- α -L-arabinopiranosida, (A) *low energy* (B) *high energy*

Gambar 24 menunjukkan spektrum massa kuersetin-3-O- α -L-arabinopiranosida dengan formula $C_{20}H_{18}O_{11}$. Dilihat dari formulanya bahwa senyawa tersebut memiliki berat molekul sebesar 434,08491 (Da), namun berat molekul yang teridentifikasi adalah 435,0925 m/z, ini karena molekul yang teridentifikasi teradisi oleh 1 proton H^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom H yaitu 1.



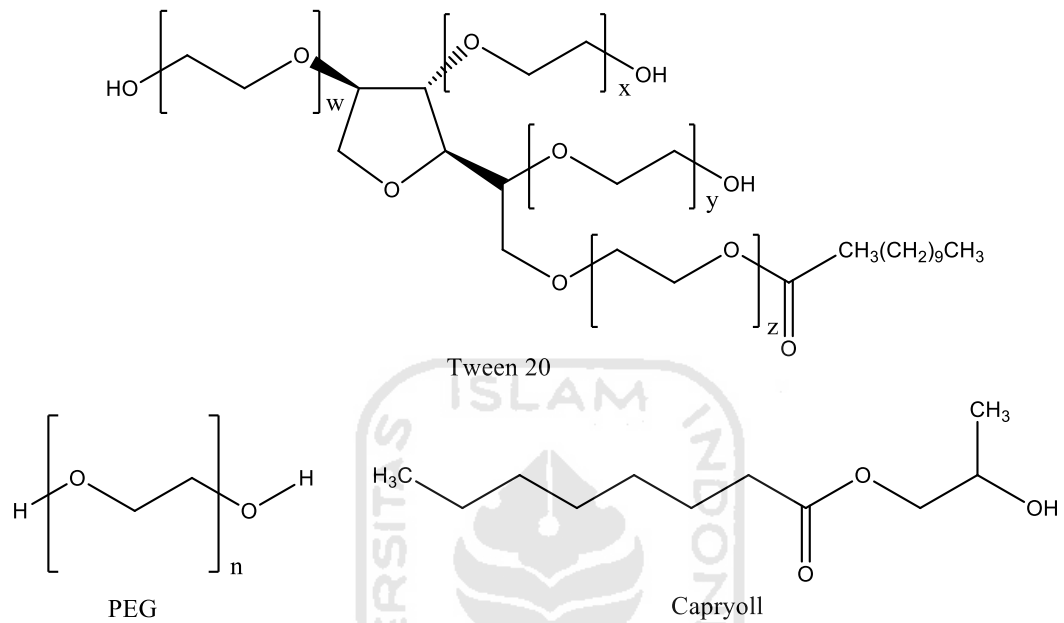
Gambar 25. Struktur senyawa kuersetin-3-O- α -L-arabinopiranosida

Untuk menentukan senyawa terbanyak yang terkandung di dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dapat dilihat dari data *detector counts* pada Tabel 7. Data tersebut merupakan intensitas sinyal yang dihitung oleh detektor, intensitas yang terbesar merupakan senyawa yang paling dominan dalam sampel. Dari intensitas tersebut maka dapat diketahui bahwa kandungan senyawa terbanyak adalah senyawa kandidat $C_{35}H_{42}O_9$ < senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{15}$ < kuersetin < senyawa kandidat $C_{34}H_{40}O_9$ < kuersetin-3-O- α -L-arabinopiranosida.

5.7 Pembuatan SNEDDS fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

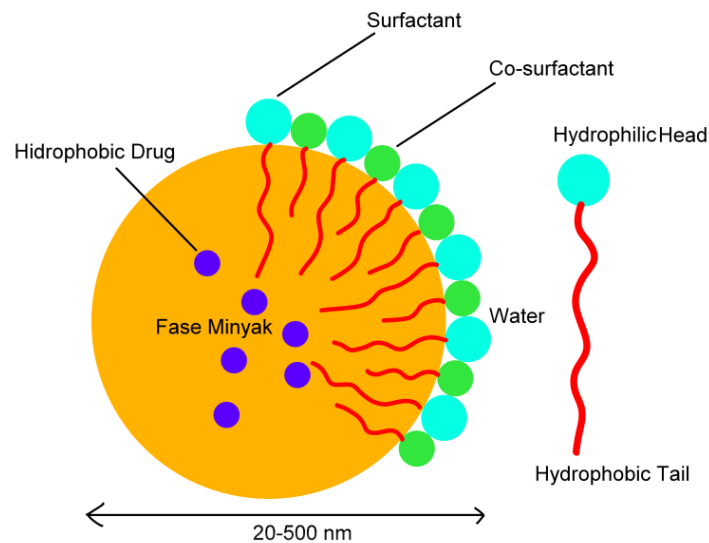
Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) merupakan sistem yang terdiri dari campuran minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang membentuk nanoemulsi secara spontan ketika bertemu fase air. Fungsi dari bahan-bahan tersebut yaitu, minyak untuk melarutkan atau sebagai pembawa bahan aktif yang bersifat lipofilik, surfaktan sebagai pengemulsi minyak ke dalam air yang melalui pembentukan dan penjagaan stabilitas lapisan film antarmuka, dan ko-surfaktan untuk membantu surfaktan menurunkan tegangan antarmuka antara minyak-air

(Kumar dkk., 2013; Gupta dkk., 2010). Pada penelitian ini bahan yang digunakan adalah capryoll sebagai minyak, tween 20 sebagai surfaktan dan PEG 400 sebagai ko-surfaktan.



Gambar 26. Struktur Capryoll, Tween 20 dan PEG

Nanoemulsi yang terbentuk berupa bagian minyak yang terlingkupi oleh bagian hidrofob dari surfaktan, dan pada bagian hidofil dari surfaktan akan berinteraksi dengan molekul air sehingga akan membentuk tetesan emulsi yang terdispersi dalam air.



Gambar 27. Ilustrasi terbentuknya nanoemulsi (Kumar dkk., 2013)

Metode pembuatan SNEDDS pada penelitian ini menggunakan teknik energi tinggi yaitu ultrasonikasi, teknik ini memanfaatkan gelombang ultrasonik yang dapat mengubah energi listrik menjadi getaran fisik yang dapat memperkecil ukuran partikel hingga $0,2 \mu\text{m}$ (Gupta dkk., 2010). Ultrasonikasi dilakukan selama 2 kali 4 menit setiap penambahan bahan-bahan, hal ini dilakukan untuk mengoptimalkan proses ultrasonikasi sehingga diperoleh hasil yang homogen dan pemecahan partikel dapat dilakukan secara maksimal.

Saat zat aktif fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) ditambahkan capryoll, zat aktif yang bersifat hidrofobik akan larut ke dalam capryoll. Kemudian saat ditambahkan Tween 20, maka bagian hidrofobik dari Tween 20 akan melindungi capryoll melalui interaksi yang terjadi, sedangkan bagian hidrofilik dari Tween 20 dapat berinteraksi dengan air sehingga akan membentuk tetesan emulsi yang terdispersi dalam air. Sama seperti Tween 20, penambahan PEG 400 akan terjadi interaksi yang sama. Fungsi PEG 400 adalah membantu Tween 20 untuk mengemulsi capryoll yang membawa zat aktif ke dalam air. Ilustrasi terbentuknya nanoemulsi ditunjukkan pada Gambar 27. Penampilan visual dari formulasi SNEDDS yang telah terdispersi di dalam air dapat dilihat pada Lampiran 3.

5.8 Karakterisasi SNEDDS fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Formulasi SNEDDS dibuat dengan variasi konsentrasi fraksi yang berbeda yaitu 40%, 60% dan 80% dengan perbandingan capryoll, Tween 20 dan PEG 400 sebesar 10:70:20 seperti pada Tabel 1. Hal ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi fraksi yang paling optimal untuk mencapai nanoemulsi dengan ukuran partikel terkecil. Karakterisasi formulasi SNEDDS meliputi ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, zeta potensial dan morfologi globul nanoemulsi terhadap formulasi SNEDDS yang paling optimal.

5.8.1 Ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel

Ukuran partikel merupakan faktor penting dalam *self-emulsification* yang dapat menentukan kecepatan dan kemudahan obat untuk terabsorpsi secara optimal serta terbentuknya emulsi yang stabil (Jeevana dan Sreelakshmi 2011). Ukuran droplet yang kecil akan memperluas permukaan kontak droplet dengan cairan lambung sehingga memudahkan enzim lipase untuk memecah sistem sehingga pelepasan obat lebih cepat dibandingkan ukuran droplet yang besar (Shahba dkk., 2012). Semakin kecil ukuran partikel obat akan lebih mudah dan cepat mencapai sel target. Hasil analisis ditunjukkan pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil karakterisasi ukuran dan distribusi ukuran partikel formulasi SNEDDS dengan PSA

| Formulasi | Ukuran Partikel (nm) | | | | Polidispers Index (PI) | | | |
|-----------|----------------------|-------|-------|-----------|------------------------|-------|-------|-----------|
| | I | II | III | \bar{X} | I | II | III | \bar{X} |
| 40 % | 175,7 | 170,5 | 166,2 | 170,8 | 0,552 | 0,365 | 0,640 | 0,516 |
| 60 % | 678,5 | 656,1 | 678,5 | 671,0 | 0,197 | 0,221 | 0,197 | 0,206 |
| 80 % | 471,2 | 470,2 | 469,4 | 470,2 | 0,199 | 0,426 | 0,519 | 0,381 |

Tabel 8 menunjukkan bahwa setelah dilakukan 3 kali replikasi analisis, maka diperoleh rata-rata ukuran partikel formulasi 40% yaitu 170,8 nm dengan PI 0,516, formulasi 60% yaitu 671,0 nm dengan PI 0,206 dan formulasi 80% yaitu

470,2 nm dengan PI 0,381. Hasil tersebut menunjukkan bahwa formulasi 40% dan 80% telah memenuhi ukuran nanoemulasi karena memiliki ukuran droplet 50-500 nm. Dari data tersebut diketahui bahwa semakin banyak jumlah fraksi yang diinkorporasikan ke dalam fasa minyak, maka ukuran globul yang terbentuk semakin meningkat. Hal ini menandakan adanya batasan jumlah fraksi yang dapat diinkorporasikan ke dalam fasa minyak untuk menghasilkan sediaan dengan ukuran globul yang diinginkan. Namun pada formulasi 60% terjadi kenaikan ukuran globul melebihi formulasi 80%, hal ini mungkin disebabkan karena telah terjadi agregasi sehingga dapat memperbesar ukuran globul, agregasi dapat dengan mudah terjadi apabila memiliki nilai zeta potensial lebih besar dari -30 mV dan lebih kecil dari +30 mV. Diketahui formulasi 60% memiliki nilai zeta potensial -7,76 mV, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 9.

Polidispers index (PI) adalah parameter yang menyatakan distribusi ukuran partikel dari sistem nanoemulsi yang nilainya 0,01 sampai 0,7 menyatakan sistem nanoemulsi dengan distribusi ukuran partikel yang sempit (homogen), sedangkan nilai PI diatas 0,7 menyatakan sistem nanoemulsi dengan distribusi ukuran partikel yang sangat luas (tidak homogen) (Wahyuningsih dan Putranti, 2015). Berdasarkan nilai PI yang diperoleh pada Tabel 8, dapat diketahui seluruh formulasi memiliki distribusi ukuran partikel yang homogen.

5.8.2 Zeta potensial

Zeta potensial dapat digunakan sebagai indikator parsial yang menunjukkan kestabilan dari suatu sistem yang mengandung partikel-partikel terdispersi melalui adanya gaya tolak-menolak antara partikel yang bermuatan sama ketika berdekatan. Nanoemulsi dengan nilai potensial zeta lebih kecil dari -30 mV dan lebih besar dari +30 mV memiliki stabilitas tinggi (Murdock dkk., 2008), Sedangkan sistem dispersi dengan nilai zeta potensial yang rendah lebih mudah membentuk agregat seiring dengan gaya Van der Waals dalam interaksi partikel (Stefeld dkk., 2012)

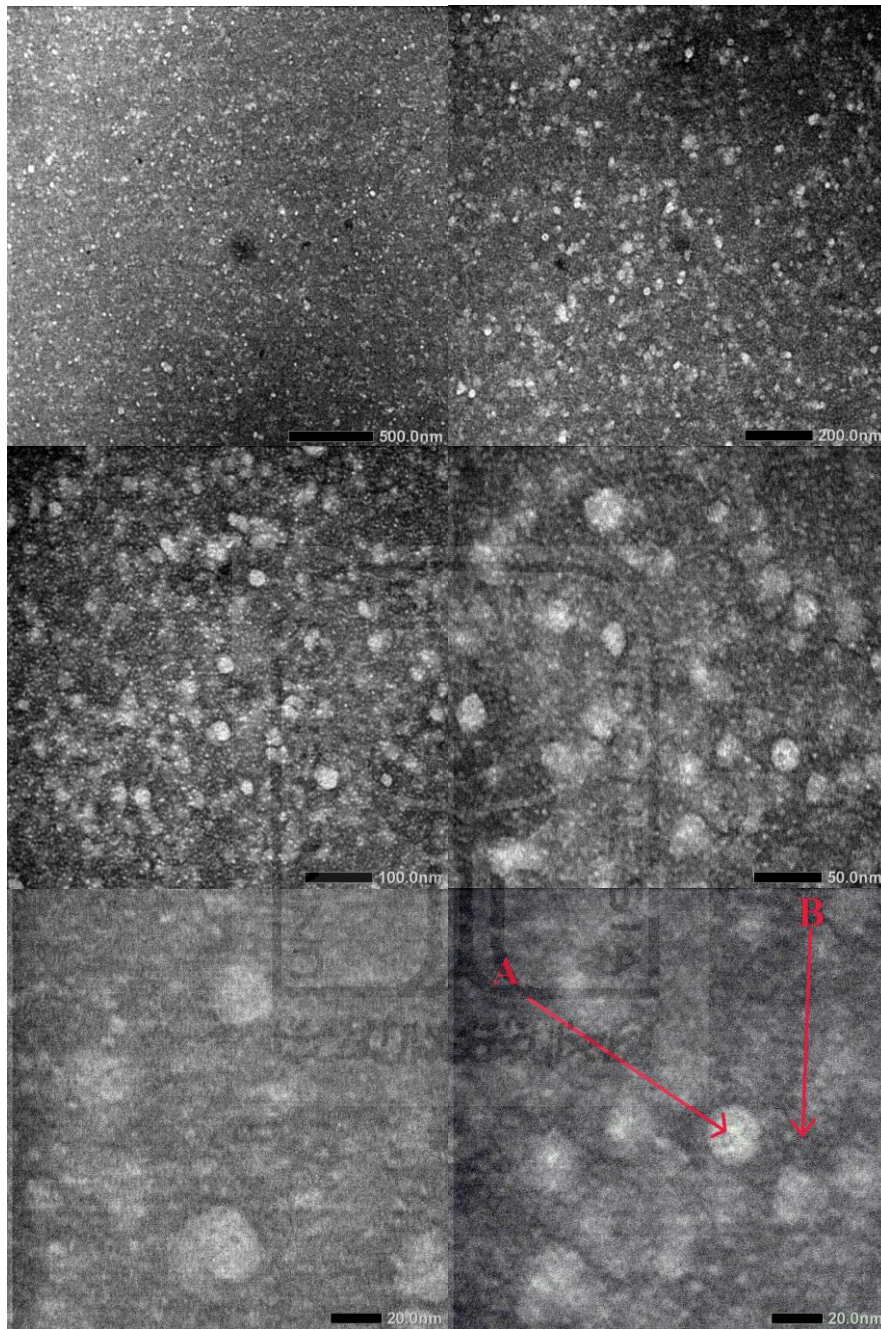
Tabel 9. Hasil karakterisasi zeta potensial formulasi SNEDDS dengan PSA

| Formulasi | Zeta Potensial (mV) | | | |
|-----------|---------------------|-------|-------|-----------|
| | I | II | III | \bar{X} |
| 40 % | -31,3 | -33,1 | -32,3 | -32,23 |
| 60 % | -7,3 | -8,7 | -7,6 | -7,86 |
| 80 % | -26,3 | -27,6 | -25,0 | -26,3 |

Tabel 9 Menunjukkan bahwa nilai zeta potensial yang dimiliki oleh ketiga formulasi tersebut bernilai negatif, nilai negatif menunjukkan muatan permukaan globul yang bermuatan negatif. Formulasi 40% memiliki nilai -32,23 mV, artinya memiliki stabilitas yang tinggi. Formulasi 60% memiliki nilai -7,86 mV, artinya memiliki stabilitas yang rendah sehingga mudah mengalami agregasi. Sedangkan formulasi 80% memiliki nilai -26,3 mV, artinya kurang stabil sehingga masih memungkinkan terjadinya agregasi.

5.8.3 Morfologi

Karakterisasi morfologi dilakukan dengan menggunakan TEM terhadap formulasi SNEDDS yang memiliki ukuran partikel/globul terkecil yaitu formulasi dengan konsentrasi fraksi 40%. Melalui karakterisasi morfologi menggunakan TEM dapat dikonfirmasi ukuran partikel yang dihasilkan dari pengukuran distribusi ukuran partikel dan bentuk globul nanoemulsi. Hasil analisis TEM dapat dilihat pada Gambar 27.



Gambar 28. Hasil analisis TEM dengan perbesaran hingga 150.000 kali, (A) Globul (B) Air

Gambar 28 memperlihatkan globul nanoemulsi yang telah terdispersi di dalam air. Dilihat dari gambar tersebut bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) telah berada dalam sistem nanoemulsi yang membentuk globul berukuran nanometer seperti ilustrasi pada Gambar 27. Dilihat dari gambar

tersebut pula bahwa globul memiliki bentuk speris dengan distribusi yang cukup merata.

5.9 Pengujian sitotoksitas secara *in vitro* dengan metode MTT assay

Formulasi SNEDDS yang telah dibuat kemudian dilakukan uji sitotoksitas terhadap kultur sel T47D dan MCF-7. Uji ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas formulasi dalam menghambat proliferasi sel T47D dan MCF-7 dan untuk mengetahui indeks selektivitasnya terdapat sel vero. Selain itu juga uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ukuran partikel terhadap aktivitas tersebut, maka dari itu pengujian dilakukan terhadap seluruh formulasi dengan konsentrasi fraksi 40%, 60% dan 80%, dimana setiap formulasi memiliki ukuran partikel yang berbeda-beda.

Uji sitotoksik dimulai dengan menumbuhkan kultur sel T47D, MCF-7 dan Vero dalam media penumbuh. Media penumbuh pengaktifan sel menggunakan medium berserum untuk mendapatkan jumlah sel yang cukup dengan tingkat kepadatan 70%-80% (konfluen). Medium penumbuh yang digunakan adalah media *Roswell park memorial institute 1640* (RPMI 1640) untuk sel T47D dan media *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) untuk sel MCF-7 dan vero. Media RPMI 1640 adalah media yang mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, glukosa, fungison (antijamur), dan serum (Freshney, 2008). Sedangkan media DMEM adalah media yang mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, glukosa dan fenol red. Media DMEM memiliki konsentrasi asam amino 2 kali lebih tinggi dari media RPMI 1640 (Mather & Roberts 1998). FBS (*Fetal bovine serum*) sebagai serum yang mengandung hormon perangsang pertumbuhan sel dan berfungsi sebagai nutrisi untuk kelangsungan hidup sel (Freshney, 2008).

Sel yang telah konfluen atau memiliki tingkat kepadatan 70%-80% dapat diamati di bawah mikroskop *inverted* seperti yang ditunjukkan pada Gambar 28. Proses pengambilan sel yang telah konfluen disebut panen sel. Poin utama dari panen sel adalah melepaskan ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matriks tanpa merusak sel itu sendiri. Pada proses ini media kultur sel dibuang untuk

mempermudah proses pemanenan sel, kemudian sel yang berada di dalam *petri dish* dicuci menggunakan *Phospat buffer saline* (PBS), setelah itu ditambahkan tripsin lalu diinkubasi selama 3 menit agar sel lepas dari dasar *petri dish*. Pencucian dengan PBS berfungsi untuk menghilangkan serum dalam media kultur yang tertinggal, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin (Freshney 2010). Pemberian tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara molekul glikoprotein dan proteoglikan dengan permukaan *petri dish*, akibatnya sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada permukaan *petri dish* dan akan mengapung (Doyle dan Grifliths, 2000).



Gambar 29. Morfologi Sel sebelum dilakukan *treatment*, (A) T47D (B) MCF-7 dan (C) vero

Sel yang telah dipanen kemudian dilakukan perhitungan sel menggunakan *heamocytometer* untuk mengetahui jumlah kepadatan sel. Sel yang dihitung adalah sel yang hidup, memiliki ciri berbentuk yang seragam, berwarna bening dan terdapat inti ditengahnya serta tidak bergerombol. Kepadatan sel yang diperoleh dari hasil perhitungan pada Lampiran 7 untuk sel T47D, MCF-7 dan vero adalah $138 \times 10^4/\text{mL}$, $61 \times 10^4/\text{mL}$ dan $225 \times 10^4/\text{mL}$. Jumlah kepadatan sel yang digunakan dalam tiap sumuran adalah 1×10^4 sel/ $100\mu\text{L}$, sehingga jumlah suspensi sel yang diambil untuk memenuhi sumuran 96 *microplate* adalah sebanyak $724 \mu\text{L}$ untuk sel T47D, $1.639 \mu\text{L}$ untuk sel MCF-7 dan $444 \mu\text{L}$ untuk sel vero yang masing-masing ditambahkan 10 mL media komplit. Media komplit yang telah berisi suspensi sel didistribusikan sebanyak $100 \mu\text{L}$ ke dalam sumuran

96 *microplate*. Setiap kultur sel dibagi menjadi 3 kelompok yaitu untuk pengujian formulasi 40%, 60% dan 80%. Setelah itu diinkubasi dalam inkubator dengan temperatur 37 °C/ 5% CO₂ selama 24 jam. 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).

Sampel yang akan digunakan untuk *treatment* dilarutkan ke dalam dimetil sulfoksida (DMSO), kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dengan variasi konsentrasi 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 µg/mL menggunakan pelarut media komplit. Variasi konsentrasi tersebut digunakan untuk melihat pengaruh konsentrasi sampel terhadap jumlah sel yang masih hidup (%). DMSO digunakan sebagai pelarut sampel karena merupakan pelarut bipolar yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik (Jamalzadeh dkk., 2016). Setiap sampel dengan berbagai variasi konsentrasi kemudian dimasukkan sebanyak 100 µL ke dalam setiap sumuran yang telah berisi sel. Setelah itu diinkubasi kembali dalam inkubator pada temperatur 37 °C/ 5% CO₂ selama 24 jam. Morfologi sel setelah *treatment* dapat dilihat pada Gambar 30.



(A) T47D

(B) MCF-7

(C) vero

Gambar 30. Morfologi Sel setelah dilakukan *treatment* dengan Formulasi 80% pada konsentrasi 1000 µg/ML, (A) T47D (B) MCF-7 dan (C) vero

Gambar 30 menunjukkan bahwa telah terjadi penurunan jumlah kepadatan sel jika dibandingkan dengan kondisi sel sebelum *treatment* pada Gambar 29. Ini

menandakan bahwa telah terjadi penghambatan proliferasi bahkan kerusakan sel pada hasil *treatment* dengan formulasi 80% pada konsentrasi 1000 µg/mL. Secara umum kemampuan penghambatan proliferasi sel dapat dikaitkan dengan mekanisme *cell cycle arrest* yaitu adanya kerusakan DNA atau RNA akan memicu aktivasi gen p53 sehingga siklus sel akan terhenti sementara untuk proses perbaikan DNA atau RNA tersebut. Apabila kerusakannya cukup parah dan tidak bisa diperbaiki maka sel akan mengalami apoptosis atau bunuh diri (Siu dkk., 1999).

Hasil *treatment* akan teramati secara visual setelah penambahan reagen MTT (4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida). MTT yang berwarna kuning akan direduksi menjadi garam formazan yang berwarna ungu oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat dalam mitokondria sel hidup. Setelah penambahan MTT diinkubasi kembali selama 4 jam untuk menjalankan reaksi tersebut, waktu inkubasi yang lebih lama akan mengakibatkan peningkatan intensitas warna dan peningkatan sensitivitas sampai titik tertentu. Namun, waktu inkubasi yang dilakukan dibatasi karena sifat reagen deteksi sitotoksik membutuhkan energi (ekivalen dengan reduksi NADH) dari sel untuk menghasilkan sinyal. Sel yang mati akan kehilangan kemampuan untuk mengkonversi MTT menjadi formazan, sehingga perubahan warna yang terjadi berfungsi sebagai penanda bahwa sel masih hidup (Riss dkk., 2013).

Formazan akan terakumulasi sebagai endapan yang tidak larut di dalam sel, sehingga harus dilarutkan sebelum pembacaan absorbansi. Untuk melarutkan formazan ditambahkan reagen stopper. Reagen stopper ini akan melisiskan membran sel sehingga garam formazan dapat keluar dari sel dan melarutkan garam formazan tersebut. Reagen stopper yang digunakan yaitu SDS 10% dalam HCl 0,01 N. SDS 10% dalam HCl 0,01 N merupakan reagen yang sangat baik untuk melarutkan garam formazan (Septisetyani dkk., 2014). Proses ini membutuhkan waktu selama 24 jam, sehingga setelah penambahan stopper SDS lalu didiamkan pada temperatur kamar selama 24 jam. Garam formazan yang telah larut akan berwarna ungu sehingga dapat dilakukan pembacaan absorbansi

pada panjang gelombang 595 nm menggunakan ELISA *reader*. Hasil pembacaan ELISA *reader* dapat dilihat pada Lampiran 4.

Pada penelitian ini dapat teramati secara visual gradasi warna yang terjadi sebagai akibat dari pengaruh konsentrasi sampel terhadap jumlah sel hidup yang mampu mereduksi MTT menjadi garam formazan dalam 96 *microplate*, dimana semakin kecil konsentrasi sampel maka warna ungu yang terbentuk akan semakin pekat, seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 5. Pada sel T47D, MCF-7 dan vero dapat dilihat bahwa baik pada formulasi 40%, 60% dan 80% menunjukkan perubahan gradasi warna yang mencolok pada konsentrasi antara 500 $\mu\text{g/mL}$ –1.000 $\mu\text{g/mL}$, dimana pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ berwarna ungu dan konsentrasi 1.000 $\mu\text{g/mL}$ berwarna kuning. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ jumlah kepadatan sel hidup yang mereduksi MTT menjadi garam formazan masih banyak sehingga akan berwarna ungu, sedangkan pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ jumlah kepadatan sel hidup yang mereduksi MTT menjadi garam formazan relatif sedikit sehingga akan tetap berwarna kuning.

Secara kualitatif hasil tersebut menunjukkan bahwa formulasi 80%, 60% dan 40% memiliki aktivitas antikanker yang mampu menghambat proliferasi sel T47D, MCF-7 dan vero pada konsentrasi yang cukup tinggi yaitu antara 500 $\mu\text{g/mL}$ –1.000 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini mungkin dikarenakan sampel yang digunakan bukan fraksi murni, tetapi fraksi yang telah diformulasi menjadi sediaan SNEDDS, sehingga zat aktif (fraksi) yang memiliki aktivitas antikanker memiliki jumlah yang sedikit. Maka dari itu diperlukan konsentrasi formulasi yang cukup besar untuk memberikan aktivitas antikanker.

Hasil pembacaan ELISA *reader* berupa nilai absorbansi sebagai pengaruh dari jumlah kepadatan sel hidup, dimana semakin banyak jumlah kepadatan sel hidup maka semakin banyak pula MTT yang tereduksi menjadi garam formazan yang berwarna ungu, apabila warna ungu tersebut semakin pekat maka nilai absorbansi yang terbaca akan semakin besar. Data absorbansi tersebut dapat dikonversi melalui perhitungan pada Lampiran 7 menjadi data % viabilitas sel, dimana % viabilitas sel merupakan nilai yang menunjukkan jumlah sel yang masih hidup. Dari data tersebut dapat ditentukan nilai IC_{50} dari setiap formulasi. IC_{50}

merupakan nilai yang menunjukkan konsentrasi sampel yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. IC_{50} dapat ditentukan dari rumus regresi linier antara Log konsentrasi sampel dengan % viabilitas sel melalui perhitungan pada Lampiran 7.

Grafik pada Lampiran 6 menunjukkan kurva regresi liniertias hubungan antara Log konsentrasi vs % viabilitas sel. Menurut Sugiyono (2008) $R = 1,00-0,8$ memiliki hubungan linearitas sangat kuat, $R = 0,60-0,79$ memiliki hubungan linearitas kuat, $R = 0,40-0,59$ memiliki hubungan linearitas sedang, $R = 0,2-0,39$ memiliki hubungan linearitas rendah, dan $R = 0,00-0,19$ memiliki hubungan linearitas sangat rendah. Pada penelitian ini terdapat beberapa kurva yang memiliki linieritas kuat dan sedang. Hal ini terjadi karena secara umum formulasi dengan konsentrasi di bawah 500 $\mu\text{g/mL}$ memiliki aktivitas sitotoksik yang kurang baik, sehingga konsisi tertentu akan lebih mudah mempengaruhi linieritas antara konsentrasi dengan viabilitas sel. Sebagai contoh, ketika sel-sel dalam keadaan konfluen maka pertumbuhan sel menjadi terhambat, dengan begitu metabolisme sel menjadi lambat dan reduksi MTT akan rendah. Situasi ini akan menyebabkan hilangnya linearitas antara absorbansi dengan jumlah sel hidup (Riss dkk., 2013).

5.9.1 Penentuan nilai IC_{50} formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel T47D

Tabel 10. Hasil pengujian aktivitas antikanker formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel T47D

| Formulasi | Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Rata-rata Viabilitas sel (%) \pm standar deviasi | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm standar deviasi |
|-----------|----------------------------------|--|--|
| 40% | 1000 | -1,2786 \pm 0,84051 | 365,05 \pm 70,31 |
| | 500 | 50,80754 \pm 13,5132 | |
| | 250 | 86,27187 \pm 16,5594 | |
| | 125 | 91,92463 \pm 1,06827 | |
| | 62,5 | 95,62584 \pm 10,9769 | |
| 60% | 1000 | -3,49933 \pm 0,23312 | 444,23 \pm 35,68 |
| | 500 | 63,59354 \pm 9,79572 | |

| | | | |
|-----|------|--------------------|----------------|
| | 250 | 93,40511 ± 3,43994 | |
| | 125 | 97,98116 ± 6,90845 | |
| | 62,5 | 102,1534 ± 17,9101 | |
| | 1000 | -2,28802 ± 0,81591 | |
| | 500 | 47,24092 ± 10,4168 | |
| 80% | 250 | 89,09825 ± 9,42175 | 339,25 ± 20,35 |
| | 125 | 89,40108 ± 2,99783 | |
| | 62,5 | 88,4253 ± 2,66559 | |

Tabel 10 merupakan data pengaruh konsentrasi dari setiap formulasi terhadap % viabilitas sel T47D. Dilihat dari data tersebut bahwa konsentrasi seluruh formulasi berbanding terbalik terhadap % viabilitas sel T47D, dimana semakin besar konsentrasi maka viabilitas sel semakin kecil yang artinya semakin sedikit sel yang masih hidup, hingga pada titik tertentu tidak terdapat lagi sel yang masih hidup, dan begitu pula sebaliknya.

Formulasi 40%, 60% dan 80% pada konsentrasi 1000 µg/mL memiliki nilai viabilitas di bawah 0%, artinya seluruh formulasi pada konsentrasi tersebut dapat membunuh seluruh sel T47D. Pada konsentrasi 500 µg/mL, formulasi 40% dan 60% memiliki viabilitas 50,80754% dan 63,59354%, artinya pada konsentrasi tersebut tidak mampu membunuh sel sebanyak 50%. Namun pada formulasi 80% memiliki viabilitas 47,24092%, artinya pada konsentrasi tersebut dapat membunuh sel T47D lebih dari 50%. Sedangkan pada konsentrasi di bawah 250 µg/mL, formulasi 40%, 60% dan 80% memiliki kemampuan membunuh sel T47D yang kurang baik, ditandai dengan viabilitas sel yang mendekati 100%. Dari Tabel 10 menunjukkan nilai IC₅₀ yang terkecil dimiliki oleh formulasi 80%, kemudian 40% dan yang terbesar adalah 60%. Artinya formulasi yang memiliki aktivitas sitotoksik terbesar bagi sel T47D adalah formulasi 80%.

5.9.2 Penentuan nilai IC₅₀ formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel MCF-7

Tabel 11. Hasil pengujian aktivitas antikanker formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel MCF-7

| Formulasi | Konsentrasi (µg/mL) | Rata-rata Viabilitas sel (%) ± standar deviasi | IC ₅₀ (µg/mL) ± standar deviasi |
|-----------|---------------------|--|--|
| 40% | 1000 | 2,389078 ± 7,16724 | 780,55 ± 101,51 |
| | 500 | 86,68942 ± 7,54722 | |
| | 250 | 116,7235 ± 6,25608 | |
| | 125 | 130,0341 ± 7,75278 | |
| | 31,25 | 140,273 ± 9,94457 | |
| 60% | 1000 | -4,43686 ± 3,29135 | 854,73 ± 196,65 |
| | 500 | 88,3959 ± 17,7343 | |
| | 250 | 130,3754 ± 2,70896 | |
| | 31,25 | 137,884 ± 15,906 | |
| | 15,625 | 151,1945 ± 41,1132 | |
| 80% | 1000 | -1,70648 ± 4,46304 | 677,15 ± 46,74 |
| | 500 | 104,0956 ± 11,8671 | |
| | 250 | 118,0887 ± 1,448 | |
| | 125 | 130,3754 ± 4,69206 | |
| | 62,5 | 134,9829 ± 18,1 | |

Dari data pada Tabel 11 dapat dilihat bahwa konsentrasi seluruh formulasi berbanding terbalik terhadap % viabilitas sel MCF-7. Formulasi 60% dan 80% pada konsentrasi 1000 µg/mL memiliki nilai viabilitas di bawah 0%, artinya formulasi 60% dan 80% pada konsentrasi tersebut mampu membunuh seluruh sel MCF-7. Sedangkan formulasi 40%, pada konsentrasi 1000 µg/mL memiliki viabilitas yang sangat rendah yaitu 2,389078%. Pada konsentrasi 500 µg/mL, formulasi 40% dan 60% memiliki viabilitas yang sangat besar yaitu 86,68942% dan 88,3959%, sedangkan pada formulasi 80% memiliki viabilitas di atas 100%, artinya pada konsentrasi tersebut telah terjadi proliferasi sel, sehingga formulasi

tidak memiliki aktivitas antikanker terhadap sel MCF-7. Kondisi tersebut juga terjadi pada formulasi 60% dan 80% pada konsentrasi di bawah 250 $\mu\text{g/mL}$. Dari Tabel 11 menunjukkan nilai IC_{50} yang terkecil dimiliki oleh formulasi 80%, kemudian 40% dan yang terbesar adalah 60%. Artinya formulasi yang memiliki aktivitas sitotoksik terbesar bagi sel T47D adalah formulasi 80%.

5.9.3 Penentuan nilai IC_{50} formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel vero

Tabel 12. Hasil pengujian aktivitas antikanker formulasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel vero

| Formulasi | Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Rata-rata Viabilitas sel (%) \pm standar deviasi | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm standar deviasi |
|-----------|----------------------------------|--|---|
| 40% | 1000 | -3,11419 \pm 1,58567 | 793,07 \pm 164,49 |
| | 500 | 112,4567 \pm 11,4814 | |
| | 62,5 | 128,7197 \pm 9,06944 | |
| | 31,25 | 129,7578 \pm 1,58567 | |
| | 15,625 | 132,526 \pm 1,03806 | |
| 60% | 1000 | -9,34256 \pm 0,59933 | 885,42 \pm 50,99 |
| | 500 | 120,4152 \pm 3,93004 | |
| | 125 | 125,2595 \pm 0 | |
| | 62,5 | 127,6817 \pm 0,59933 | |
| | 15,625 | 131,8339 \pm 4,19528 | |
| 80% | 1000 | -10,0346 \pm 5,12064 | 773,08 \pm 136,94 |
| | 500 | 111,0727 \pm 12,4712 | |
| | 125 | 123,7024 \pm 0,73402 | |
| | 62,5 | 125,6055 \pm 2,1609 | |
| | 15,625 | 128,7197 \pm 6,91176 | |

Dari data pada Tabel 12 dapat dilihat bahwa konsentrasi seluruh formulasi berbanding terbalik terhadap % viabilitas sel vero. Sel vero merupakan sel normal yang ada di dalam tubuh manusia, sehingga dari uji ini diharapkan pada

konsentrasi terbesar pun memiliki % viabilitas sel yang besar. Formulasi 40%, 60% dan 80 % pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai viabilitas di bawah 0%, artinya seluruh formulasi pada konsentrasi tersebut dapat membunuh seluruh sel vero. Pada konsentrasi di bawah 500 $\mu\text{g/mL}$, seluruh formulasi memiliki viabilitas di atas 100%, artinya pada konsentrasi tersebut telah terjadi proliferasi sel, sehingga formulasi tersebut aman terhadap sel vero. Dari Tabel 12 menunjukkan nilai IC_{50} yang terkecil dimiliki oleh formulasi 80%, kemudian 40% dan yang terbesar adalah 60%. Artinya formulasi yang memiliki aktivitas sitotoksik terbesar bagi sel T47D adalah formulasi 80%.

Seluruh nilai IC_{50} pada Tabel 10, 11 dan 12 menunjukkan bahwa formulasi 40%, 60% dan 80% tergolong dalam sitotoksik moderat karena nilai IC_{50} yang diperoleh dalam rentang 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ (Prayong dkk., 2008). Selain itu dapat dilihat bahwa seluruh formulasi memiliki tingkat sitotoksik tertinggi saat diuji pada sel T47D.

5.9.4 Pengaruh konsentasi fraksi dan ukuran partikel terhadap IC_{50}

Dari data pada Tabel 13 dapat dilihat bahwa adanya hubungan antara konsentrasi fraksi setiap formulasi dan ukuran partikel setiap formulasi terhadap nilai IC_{50} yang diperoleh pada sel T47D, MCF-7 dan vero, dimana formulasi yang memiliki IC_{50} terkecil adalah formulasi 80% diikuti dengan 40% dan 60% pada seluruh sel.

Tabel 13. Hubungan konsentrasi fraksi dan ukuran partikel dengan nilai IC_{50}

| Konsentrasi fraksi | Ukuran partikel (nm) | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | | |
|--------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | | T47D | MCF-7 | Vero |
| 40% | 170,8 | 365,05 \pm 70,31 | 780,55 \pm 101,51 | 793,07 \pm 164,49 |
| 60% | 671,0 | 444,23 \pm 35,68 | 854,73 \pm 196,65 | 885,42 \pm 50,99 |
| 80% | 470,2 | 339,25 \pm 20,35 | 677,15 \pm 46,74 | 773,08 \pm 136,94 |

Berdasarkan data tersebut dapat dilihat bahwa formulasi 80% memiliki nilai IC_{50} yang paling kecil, hal ini disebabkan karena pada formulasi 80% lebih

dipengaruhi oleh jumlah konsentrasi fraksi, dimana formulasi tersebut adalah formulasi dengan konsentrasi fraksi yang terbesar, artinya zat aktif yang berperan sebagai penghambat reaksi proliferasi sel semakin banyak. Pada formulasi 40% memiliki nilai IC_{50} lebih kecil dari formulasi 60%, hal ini disebabkan karena pada formulasi 40% lebih dipengaruhi oleh ukuran partikel, dimana formulasi tersebut adalah formulasi yang memiliki ukuran partikel yang paling kecil yaitu 170,8 nm, semakin kecil ukuran maka penetrasi partikel untuk menembus membran sel akan semakin mudah dan cepat sehingga reaksi penghambatan proliferasi yang terjadi di dalam sel akan semakin optimal. Ini menunjukkan bahwa nilai IC_{50} tidak hanya dipengaruhi oleh jumlah zat aktif (fraksi) di dalam formulasi, tetapi juga adanya pengaruh dari salah satu sifat nanopartikel yaitu mampu menembus membran sel.

5.9.5 Kontrol negatif capryoll, tween 20 dan PEG terhadap sel T47D, MCF-7 dan Vero

Pada penelitian ini pula telah dilakukan uji kontrol negatif secara kualitatif terhadap bahan-bahan penyusun SNEDDS yaitu Capryoll, Tween 20 dan PEG 400. Pengujian dilakukan dengan melihat perubahan warna pada kultur sel T47D, MCF-7 dan vero setelah dilakukan *treatment* dengan bahan-bahan tersebut pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 14. kontrol negatif Capryoll, Tween 20 dan PEG 400 terhadap sel T47D, MCF-7 dan vero

| Bahan-bahan | Perubahan warna | | |
|-------------|-----------------|--------|--------|
| | T47D | MCF-7 | Vero |
| Capryoll | kuning | kuning | kuning |
| Tween 20 | ungu | ungu | ungu |
| PEG 400 | ungu | ungu | ungu |

Dari Tabel 14 dapat dilihat bahwa Tween 20 dan PEG 400 memberikan hasil negatif pada seluruh sel, ditandai dengan perubahan warna pada sumuran menjadi ungu, warna ungu menandakan bahwa masih banyak sel hidup yang mereduksi garam MTT menjadi formazan berwarna ungu. Sedangkan pada capryoll

memberikan hasil positif pada seluruh sel, ditandai dengan warna yang masih sedikit kekuningan, warna kuning menandakan bahwa hanya sedikit atau bahkan tidak ada lagi sel hidup yang tersisa, artinya reaksi reduksi garam MTT menjadi formazan berwarna ungu tidak berjalan. Namun hasil ini tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas antikanker pada formulasi, karena pada uji kontrol negatif ini konsentrasi capryoll yang digunakan sangat besar, yaitu 1000 µg/mL. Selain itu juga, capryoll yang digunakan sebagai penyusun formulasi memiliki kadar yang cukup kecil, yaitu 10%.

5.9.6 Penentuan SI (*Selectivity Index*) terdapat sel vero

Indeks selektivitas atau *Selectivity Index* (SI) menunjukkan selektivitas sitotoksik dari formulasi terhadap sel kanker dibandingkan sel normal. SI diperoleh dari rasio IC₅₀ sel vero dibandingkan dengan sel T47D dan MCF-7. Nilai SI lebih dari 3 menunjukkan bahwa formulasi yang diuji memiliki selektivitas yang tinggi (Prayong dkk., 2008). Nilai SI dari formulasi 40%, 60% dan 80% disajikan pada Tabel 15.

Tabel 15. Nilai SI (*selectivity index*) formulasi 40%, 60% dan 80%

| Sampel | SI (<i>selectivity indeks</i>) | |
|---------------|----------------------------------|-------|
| | T47D | MCF-7 |
| Formulasi 40% | 2,172 | 1,016 |
| Formulasi 60% | 1,993 | 1,035 |
| Formulasi 80% | 2,27 | 1,141 |

Berdasarkan Tabel 15 dapat diperoleh informasi bahwa ketiga formulasi memiliki selektivitas yang rendah, ditandai dengan nilai SI di bawah 3. Rendahnya nilai SI diakibatkan oleh konsentrasi formulasi yang mampu membunuh sel kanker ternyata mampu membunuh sel normal pula, sehingga selektivitas formulasi tersebut dapat dikatakan rendah.

Selektivitas agen kemoterapi artinya hanya sel yang diidentifikasi sebagai sel kanker saja yang diserang, sementara sel normal tidak diserang. Cara agen

kemoterapi membedakan sel kanker dan sel normal adalah berdasarkan dari kebutuhan sel akan ATP (*Adenosine Trifosfate*). Karena sel kanker bergerak, tumbuh dan berduplikasi lebih cepat dan aktif dibandingkan sel normal, maka sel kanker membutuhkan energi ATP dalam jumlah yang lebih banyak. Hal ini akan dideteksi oleh agen kemoterapi, selanjutnya obat tersebut masuk ke dalam sel kanker dan menempel pada dinding dalam mitokondria untuk memblok produksi energi ATP. Akibatnya suplai energi untuk sel kanker terputus, sel kanker menjadi lemah dan akhirnya mati (Alali dkk., 1999).



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) adalah *Candidate Mass* C₃₅H₄₂O₉, *Candidate Mass* C₂₆H₄₈O₁₅, *Candidate Mass* C₃₄H₄₀O₉, kuersetin dan kuersetin-3-O- α -L-arabinopiranosida.
2. Formulasi yang memiliki ukuran partikel terkecil adalah formulasi 40% dengan ukuran 170,8 nm, sedangkan formulasi 60% dan 80% memiliki ukuran partikel 671,0 nm dan 470,2 nm.
3. Berdasarkan uji sitotoksitas secara *in vitro* diketahui nilai IC₅₀ formulasi 40%, 60%, dan 80% berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 365,05 \pm 70,31; 444,23 \pm 35,68 dan 339,25 \pm 20,35 μ g/mL, terhadap sel MCF-7 sebesar 780,55 \pm 101,51; 854,73 \pm 196,65 dan 677,15 \pm 46,74 μ g/mL dan terhadap sel vero sebesar 793,07 \pm 164,49; 885,42 \pm 50,99 dan 773,08 \pm 136,94 μ g/mL.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut berkaitan dengan formulasi SNEDDS fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan jenis dan perbandingan minyak, surfaktan dan ko-surfaktan yang digunakan.
2. Perlu dilakukan penelitian dalam tahap yang lebih tinggi seperti subfraksi dan isolasi untuk mengetahui senyawa spesifik yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang paling berperan dalam menghambat proliferasi sel kanker.
3. Perlu dilakukan uji sitotoksik terhadap sel kanker lainnya dan penelitian untuk mengungkapkan mekanisme penghambatan proliferasi sel kanker oleh senyawa antikanker yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.).

DAFTAR PUSTAKA

- Agilent Technologies., 2001, *Basics of LC-MS Agilent*, USA, 5988-2045EN.
- Akbar, H.R., 2010, Isolasi dan Identifikasi Golongan Flavonoid Daun Dandang Gendis (*Clinacanthus Nutans*) Berpotensi Sebagai Antioksidan, *Skripsi*, Bogor, IPB.
- Akmal, M., dan Zely, I., 2010, *Ensiklopedi Kesehatan Umum*, Ar-Ruzz Media, Yogyakarta.
- Akonor, M., Kwasi, O., Paa, T., dan Holly S., 2018, Widespread exposure to infectious bronchitis virus and Mycoplasma gallisepticum in chickens in the Ga-East district of Accra, *Coagent Foof & Agriculture*, (4) 1439260, 1-11.
- Alali, F.Q., Liu, X.X., dan Mclaughin, J.L., 1999, Annonaceous acetogenins: recent progress, *Journal of Natural Product*, Vol 62 (3), pp. 504-40
- Amir, H., dan Murcitra, B.G., 2017, Uji Microtetrazolium (MTT) Ekstrak Metanol Daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Terhadap Sel Kanker Payudara MCF7. *Alotrop*, 1(1): 27-32.
- Ammerman, N.C., Beier-Sexton, M., dan Azad, A.F., 2008, Growth and maintenance of Vero Cell Lines, *Curr Protoc Microbial*, APPENDIX: Appendix-4E.
- ATCC (American Type Culture Collection)., 2008, *Cell Biology*. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/cellBiology>, Diakses pada tanggal 13 Maret 2020.
- Avila, E.V., dan Pugsley, M.K., 2011, An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells, *Proc. West. Pharmacol. Soc*, 54: 10-14
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V.K., dan Kang, S.C., 2017, MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug, *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12 (2): 115–8.
- Basmal, J., Amini, S., Sugiyono., dan Murniyati., 2009, *Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, Seminar, Nasional Jakarta.

- 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 Immunostimulan, *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 01: 50-61
- Borska. S., Chmielewska. M., Wysocka. T., Drag. Z.M., Zabel. M., dan Dziegiel, P., 2012, In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: targeting cancer cells death and MDR. *Food Chem Toxicol.* 50: 3375-3383.
- Botempo. P., Boto. A., Miceli. M., Mita. L., Benedetti. R., Nebbioso. A., Vegliione. M., Rigano. D., Cioffi. M., dan Sica. V., 2012. *Psidium guajava* L. anti-neoplastic effects: induction of apoptosis and cell differentiation. *Cell Prolif.* 45: 22-31.
- Braga, T.V., Dores, R.G.R.D., dan Ramos, C.S., 2014, Antioxidant, antibacterial and antitumor activity of ethanolic extract of the *Psidium guajava* leaves, *Am J Plant Sci*, (5): 3492–3500
- Burdall, E.S., Hanby, M.A., Landsdown, R.J.M., and Speirs, V., 2003, Breast cancer cell line, *Breast Cancer Research*, 5(2): 89-95.
- Buzea, C., Blandino, I.I.P., and Robbie, K., 2007, Nanomaterial and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases*, 2, 170–172.
- CCRC (*Cancer Chemoprevention Research Center*)., 2008, *Protokol in vitro CCRC*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- CCRC (*Community College Research Center*)., 2009, *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.
- 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.
- Ciulei, J., 1984, *Methodology for Analysis of Vegetables and Drug*, Faculty of Pharmacy, Bucharest.

- Darwis, D., 2000, *Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati*, FMIPA UNAND, Padang.
- Date, A., Desai, N., Dixit, R., dan Nagarsenker, M., 2010, Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances, *Nanomedicine*, 5: 1595-1616.
- Departemen Kesehatan RI., 2000, *Parameter Standard Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Dirjen POM, Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI., 2009, *Pedoman Pelayanan Antenatal di Tingkat Pelayanan Dasar*, Depkes RI, Jakarta.
- Departemen kesehatan RI., 2013, *Riset Kesehatan Dasar*, Badan Penelitian dan pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Dogan, S.M., Ercetin, A.P., Altun, Z., Dursun, D., Aktas, S., 2015., Gene expression characteristics of breast cancer stem cells, *JBUON*, 20: 1304–1313.
- 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, *Perspektif Baru Kimia Koordinasi Jilid I*, Banyu Media Publishing, Malang.
- Farag., Mohamed, A., Dalia, M., Rasheed, M.K., dan Adreas, G.H., 2016, Metabolite Profiling in Trigonella Seeds via UPLC-MS and GC-MS Analyzed Using Multivariate Data Analyses, *Journal Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 8065-78.
- Fatouros, D.G., Deen, R., Arleth, L., dan Bergenstahl, B., 2007, Structural development of self nano emulsifying drug delivery system (SNEDDS) during in vitro lipid digestion monitored by small-angle X-ray scattering, *Pharm Res*, 24: 1844-1853.
- Fitria, K.G., 2017, Formulasi dan karakterisasi SNEDDS (*solid self nano-emulsifying drug delivery system*) meloksikam menggunakan variasi

- kosurfaktan (PEG 400 dan propilenglikol), *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta.
- Freshney, R.I., 2008, *Culture of Animal Cells, A Manual Of Basic Technique And Specialized Applications, 6th ed*, Wiley-Blackwell, New York.
- Freshney, R.I., 2010, *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th ed*, John Wiley, New Jersey.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Jakarta.
- Gao, L., Zhang, D., and Chen, M., 2008, Drug nanocrystals for formulation of poorly soluble drugs and its application as potential drug delivery system. *J Nanopart Res*, 10(5), 851–852.
- Goncalves, E.M., Ventura, C.A., Yano, T., Macedo, M.L.D., dan Ganeri, S.C., 2006, Morphological and growth alterations in vero cells transformed by cisplatin. *Cell biol*, 30: 485-494.
- Gupta, D.K.M.K., Anand, V.R., dan Khajuria, R.K., 2013, Development of a Validated UPLC-qTOF-MS/MS Method for Determination of Bioactive Constituent from Glycyrrhiza Glabra, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(3).
- Gupta, P.K., Pandit, J.K., Kumar, A., Swaroop, P. and Gupta, S., 2010, Pharmaceutical Nanotechnology Novel Mikroemulsion-High Energy Emulsification Preparation Evaluation and Application, *The Pharma Research*, 3 117-139.
- Hapsoh., dan Hasanah, Y., 2011, *Budidaya Tanaman Obat dan Rempah*, USU Press, Medan.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia, Edisi ke dua*, ITB, Bandung.
- Harwood, M., Danielewska, N. B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M., dan Lines, T. C., 2007, A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol*. 45:2179-2205.
- Hendrayana, S., 2006, *Kimia Pemisahan*, Rosdakarya, Bandung.

- Hernández, F., Sancho, J. V., dan Pozo, O. J., 2005, Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples, *Anal Bioanal Chem*, 382(4): 934-946.
- Hofer, F., 2014, *Transmission Electron Microscopy and Nanoanalysis. FELMIZFE: Electron Microscopy And Nanoanalysis*. portal.tugraz.at/portal/page/portal/felmi/research/TEMandNanoanalysis. Diakses pada tanggal 17 Maret 2019.
- Itharat, A., and Ooraikul, B., 2007, Research on Thai medicinal plants for cancer treatment, *Med Plant Res*, 1(2), 287-317.
- Itoh, K., Oguchi, T., dan Yamamoto, k., 2002, Improvement of physicochemical properties of N-4472 part I: formulation design by using self-microemulsifying system, *Int J Pharm*, 238: 153–160.
- Jamalzadeh. L., Ghafoori. H., Sariri. R., Rabuti. H., Nasirzade. J., Hasani. H., dan Aghamaali. M.R, 2016, Cytotoxic Effect of Some Common Organic Solvent on MCF-7, RAW-264, and Human Umbilical Vein Endothelial Cells, *Med biochem*, 4 (1).
- Jeevana, J.B., dan Sreelakshmi, K., 2011, Design and Evaluation of Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Flutamide, *Journal of Young Pharmacists: JYP*, 3: 4-8.
- Jemal, A., Rebecca, S., Elizabeth, W., Yongping, H., Jiaquan, X., Taylor, M., Michael, J., and Thun., 2008, Cancer Statistics 2008, *CA Cancer J Clin* 2. 58:71–96.
- Joseph B., and Priya, M., 2011, Review Oon Nutritional, Medicinal and Pharmacological Properties of Guava (*Psidium guajava* Linn.), *Int J Pharm and Bio Sci*, 2(1), 53-69.
- Kartikawati, E., 2013, *Awas!!! Bahaya Kanker Payudara dan Kanker Serviks*, Buku Baru, Bandung.
- Karyanti, D.E., 2005, Perbandingan kadar quercetin dan pola generik 35 varietas jambu biji (*Psidium guajava* L.), *Skripsi*, UHAMKA, Jakarta.

- Kazakevich, Y., and Lobrutto., 2007, *Introduction HPLC for Pharmaceutical Scientist*, John Willley & Sons. Inc, New Jersey.
- Kementerian kesehatan RI., 2014, *Pusat Data dan Informasi (stop kanker)*. Jakarta selatan.
- Kementerian kesehatan RI., 2015, *Pusat Data dan Informasi (Stop Kanker)*. Jakarta selatan.
- Kristiani, M., Ramayani, S.L., Yunita, K., dan Saputra, M., 2019, Formulasi dan Uji Aktivitas Nanoemulsi Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) Terhadap *Salmonella typhii*. *Jurnal Farmasi Indonesia*, Vol. 16 No. 1.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B., 2008, *Buku Ajar Fitokimia*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Kumar, R.S., Syamala, U.S., Revathi, P., Devaki, S., Raghuver, P., Gowthamarjan, K., 2013, Self nano-emulsifying drug delivery system of olanzapine for enhanced oral bioavailability: in vitro, in vivo characterization and in vitro-in vivo correlation, *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, 5: 201-208.
- Kupcsik, L., dan Stoddart, M.J., 2011, *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, Humman Press, New York.
- Lamson., Davies., dan Matthew., 2000, Antioxidants and cancer III: Quercetin, *Alternative Medicine, Review Journal*, 5 (3): 196-208
- Lee, SB., and Park, HR., 2010, Anticancer activity of guava (*Psidium guajava L.*) branch extract against HT-29 human colon cancer cells, *J Med Plant Res*, 4, 891-896.
- Maharani, S.A., 2017, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol, Fraksi Polar, Semipolar, Dan Nonpolar Daun Jambu Biji (*Psidium Guajava L.*) Terhadap Sel Kanker Kolon Widr, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Maharani, T., Sukandar, D., dan Hermanto, S., 2016, Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi dari Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (*Cynometra Cauliflora L.*) yang Memiliki Aktivitas Antibakteri, *Jurnal Kimia*, 2(1): 55–62

- Makadia, H.A., Bhatt, A.Y., Parmar, R.B., Paun, J.S., dan Tank, H.M., 2013, Self – nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) : future aspects, *Asian journal of pharmacy Res*, 3: 21-27.
- Mangurana, W.O.I., Yusnaini., dan Sahidin., 2019, Analisis LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) dan Metabolit Sekunder serta Potensi Antibakteri Ekstrak *n*-Heksana Spons *Callyspongia aerizusa* yang diambil pada kondisi tutupan Terumbu Karang yang berbeda di Perairan Teluk Staring, *Jurnal Biologi Tropis*, 19(2): 131–141.
- 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.
- Mardiana, L., 2007, *Kanker pada wanita ; pencegahan dan pengobatan dengan tanaman obat. Cetakan V*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Marliana, S.D., Suryanti, V., dan Suyono, 2005, Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi*, 3(1): 26-31.
- Martien, R., Adhyatmika, I.I.D.K., Farida, V., dan Sari, D.P., 2012, Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat, *Majalah Farmasetik*, 1, 8.
- Meiyanto, E., Susidarti, R.A., Handayani, S., dan Rahmi, F., 2008, Ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7, *MFI*, 19(1): 12-19.
- Meiyanto, M., Kudo, G., Lee, Y., Yang, T.J., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J., 1999, Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene, *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 274: 23963-23968.
- Mohanraj, V.J., and Chen, Y., 2006, Nanoparticles : A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 1.

- Mukhriani., 2014, Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif, *Jurnal Kesehatan*, Volume VII No.2.
- Muller, R.H., Mader, K., and Gohla, S., 2000, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 161-177.
- Mulyani, N.S., dan Rinawati, M., 2013, *Kanker Payudara Dan PMS Pada Kehamilan*, Nuha medika, Yogyakarta.
- Mulyani, S., 2013, *Menopause Akhir Siklus Menstruasi Pada Wanita di Usia Pertengahan*, Nuha Medika, Yogyakarta.
- 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.
- Mutmainnah, P.A., Hakim, A., dan Savalas, L.R.T., 2017, Identifikasi Senyawa Turunan Hasil Fraksinasi Kayu Akar Artocarpus Odoratissimus, *JPPIPA*, 3(2).
- Nazzal, S., Nutan, M., Palamakula, A., Shah, R., Zaghoul, A.A., dan Khan, M.A, 2002, Optimization of a self-nanoemulsified tablet dosage form of Ubiquinone using response surface methodology: effect of formulation ingredients, *Int J Pharm*, 240: 103-14.
- Nita, M.T., 2019, Uji Aktivitas Antikanker Fraksi Etanol, Etil Asetat dan n-Heksana Daun Jambu Biji (*Psidium Guajava* L.) secara *In Vitro* Terhadap Sel T47D, MCF-7 (Kanker Payudara) dan Sel HeLa (Kanker Serviks) dengan Metode MTT Assay, *Skripsi*, FMPA Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Nurfauziah, R., dan Rusdiana, T., 2018, Review: Formulasi Nanoemulsi untuk Meningkatkan Kelarutan Obat Lipofilik, *Farmaka*, Volume 16 Nomor 1.
- Padmi, A., 2008, Uji Sitotoksik Ekastrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) Terhadap Sel HeLa, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.

- Pandiangan, D., Esyanti, R.E., and de Queljoe, E., 2008, Aktivitas Antikanker Katarantin pada Sel Mouse Mammary Cancer MmT06054, *Jurnal Ilmiah Sains*, 8(1): 107-113.
- Parimin., 2005, *Jambu Biji. Budi Daya dan Ragam Pemanfaatannya*, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Patel, J., Kevin, G., Patel, A., Raval, M., dan Sheth N., 2011, Design and development of a self nanoemulsifying drug delivery system for telmisartan for oral drug delivery, *Int J Pharm Investig*, 1:112-118.
- Perron, R.N. dan Brumaghim, L.J., 2009, A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem. Biophys*, Vol.2, No.53.
- Prayong, P., Barusrux, S., and Weerapreeyakul, N., 2008, Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*. 79(7): 598-601.
- Purwanto, B.T., 2018, Sintesis Senyawa N-(2-Klorobenzoil)-N'-Fenilurea dan Uji Aktivitas Anti Kanker terhadap Sel HeLa, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, vol 16, no 2.
- Rahayu, E., 2016, Preparasi Dan Karakterisasi Nanosuspensi Kitosan-Tripolifosfat Sebagai Pembawa Deksametason Natrium Fosfat Menggunakan Metode Gelasi Ionik, *Skripsi*, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Rahayuwati, L., Ibrahim, K., dan Komariah, M., 2017, Pilihan Pengobatan Pasien Kanker Payudara Masa Kemoterapi: Studi Kasus. *Jurnal Keperawatan Indonesia*, Volume 20 No.2, 118-127.
- Rasjidi, I., 2007, *Panduan Penatalaksanaan Kanker Ginekologi Berdasarkan Evidence Base*, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Rawle, A., 2010, *Basic Principles of Particle Size Analysis – Technical Paper of Malvern Instruments*, Worcesstershire, United Kingdom.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., and Minor, L., 2013, *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*, Eli & Company and the National Center for Advancing Translation Sciences, Bethesda, USA.

- Rosenauer, A., 2003, *Transmission Electron Microscopy of Semiconductor Nanostructures: An Analysis of Composition and Strain State*, Springer, Berlin.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., dan Quinn, M.E., 2009, *Handbook of Pharmaceutical Excipient*, 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(3), 231-241.
- Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray, A.I., *Natural Products Isolation*, Humana Press Inc, New Jersey.
- Sastrohamidjojo, H., 2005, *Kromatografi*, Liberty, Yogyakarta.
- Septisetyani, E.P., Ningrum, R.A., Romadhani, Y., Wisnuwardhani, P.H., dan Santoso, A., 2014, Optimization of sodium dodecyl sulphate as a formazan solvent and comparison of 3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay with wst-1 assay in MCF-7 cells, *Indonesian j. Pharm*, Vol. 25 No. 4: 245-254.
- Setyowati, W.A.E., Retno, S., dan Mulyani, C.P., 2014, Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibenthinus* Murr.) Varietas Petruk, Seminar, *Seminar nasional kimia dan pendidikan kimia VI 274*, ISBN: 979363174-0.
- Shahba, A.A.W., Mohsin, K., dan Alanazi, F.K., 2012, Novel self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of cinnarizine: design, optimization, and in-vitro assessment, *AAPS*, 13(3): 967-977.
- Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., dan Shafiq, S., 2008, Stability evaluation of celecoxib nanoemulsion containing tween 80, *Thai Journal Pharm Sci*, 32(49).

- Sheets, R., 2000, *History and Characterization of the Vero Cell Line*, Technical Report: The Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee.
- Sholihin, R., 2002, *Kanker*, Pustaka Widyamara, Semarang.
- Siadi, K., 2012, Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan NaCl, *Jurnal MIPA Universitas Negeri Semarang*, 35(1), 77-83.
- Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., and Beckman, B., 2003, Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer; Insight From The MCF-7 Cell Model System, *Exp Biol Med*, 228(9): 995-1003.
- Sirait, I.S., Setyaningsih, I., dan Kustiariyah, T., 2019, Aktivitas Antikanker Ekstrak Spirulina yang Dikultur pada Mediawalne dan Media Organik, *JPHPI*, Vo. 22 No. 1.
- Siu, W.Y., Yam, C.H., dan Poon, R.Y.C., 1999, G1 versus G2 cell cycle arrest after adriamycin-induced damage in mouse swiss3T3 cells, *FEBS Letters*, 461: 299-305.
- Sons, W.J., 2008, Vero Cell, *Curr Protoc, Microbiol*, 11.
- Stefeld, J., Sean, A., McKenna, A., and Patel, T., 2012, *Nanocomposix's Guide To Dynamic Light Scattering Measurement And Analysis*, NanoComposix, San Diego.
- Sugiyono., 2008, *Statistika untuk Penelitian*, Alfabeta, Bandung.
- Supandiman, I., 1997, Uji Klinik Sediaan Fitofarmaka yang Mengandung Psidii folium extractum, Curcuma domestica rhizoma extractum dan Attapulgite pada Penderita Diare Akut Non-spesifik, *Maj.Kedokt.Indon*, 47: 157-161.
- Suryaningsih, E.K., dan Sukaca, B.E., 2009, *Kanker Payudara*, Paradigma Indonesia, Yogyakarta.
- Thiha, A., and Fatimah, I., 2015, A Colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Detection Platform for a Point of Care Dengue Detection System on Lab-on-Compact-Disc, *Sensors*, Volume 15: 11432-11440.

- Tiwari, P., Bimleshk., Mandeep, K., GurpreetK., dan Harleen, K., 2011, Skinning Fitokimia dan Ekstraksi, *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1: 113-116.
- Tiyaboonchai, W., 2003, Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery, *Naresuan Univ. J.*, 11(3): 51-66
- Tussanti, I., Johan, A., dan Kisdjamiatun., 2014, Sitotoksisitas in vitro ekstrak etanolik buah parioto (*Medinilla speciosa*, reinw.ex bl.) terhadap sel kanker payudara T47D, *Jurnal Gizi Indonesia*, (ISSN : 1858-4942) Vol. 2, No. 2
- USP Convention, 2007, *United States of Pharmacopeia National Formulary, USP 30/NF 25*, United States Pharmacopeial Convention, Twinbrook Parkway.
- Vaughn, J.M., and Williams, R.O., 2007, *Nanoparticle Engineering*, Informa Healthcare USA, New York.
- 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.
- Wahyuni, T., dan Syamsudin., 2014, Pemanfaatan Tanin Ekstrak Daun Jambu Biji terhadap Laju Korosi Besi dalam Larutan NaCl 3 %, *Konversi*, 3(1).
- 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*, Vol.12 No. 02.
- Wardhani, L.K., dan Sulistyani, N., 2012, UjiAktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera Scandens* (L.) Moq.) Terhadap *Shigella Flexneri* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis, *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, Vol. 2(1): 1-16.
- Wati, N.F.N., 2014, Peningkatan Kualitas Minyak Nilam Melalui Proses Adsorpsi Menggunakan Adsorben γ -Alumina dengan Sistem Flow, *Indonesian Journal of Chemical Research*, Volume. 2 No. 1.
- Wattanapitayakul, S.K., Chularojmontri, L., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S., Niumsukul, S., Bauer, J.A., 2005, Screening of Antioxidants from Medicinal Plants for Cardioprotective Effect against

- Doxorubicin Toxicity, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, vol. 96 No. 80.
- Wijayanti, T., 2007, Dampak psikologis pada perempuan penderita kanker payudara, *Skripsi*, Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang.
- Wijesekera, R.O.B., 1991, *The Medicinal Plant Industry*, CRC Press, Washington DC.
- Wu, J.W., Hsieh, C.L., Wang, H.Y., dan Chen, H.Y., 2009, Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein, *Food Chem*, 113:78-84.
- Wyllie, A.H., 2010, *Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation 3rd*, Roche Applied Science, German.
- Zakaria., 2011, In vitro cytotoxic and antioxidant properties of the aqueous, chloroform and methanol extracts of *Dicranopteris linearis* leaves, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10 (2), 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.
- Zhang, H., Zhang, M., Yu, L., Zhao, Y., He, N., dan Yang, X., 2012, Antitumor activities of quercetin and quercetin-5,8-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines, *Food Chem Toxicol*, 50: 1589-1599.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman jambu biji



UNIVERSITAS GADJAH MADA
 FAKULTAS BIOLOGI
 LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN
 Jalan Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telpun (0274) 6492262/6492272; Fax: (0274) 580839

SURAT KETERANGAN

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

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

Nama : 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

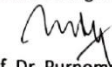
identifikasi tersebut dibantu oleh Abdul Razaq Chasani, Ph.D
 Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Biologi
 Universitas Gadjah Mada







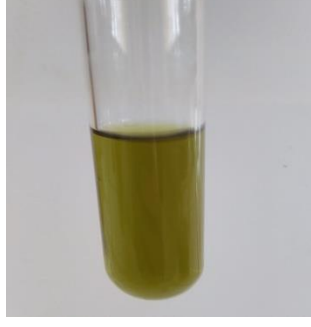
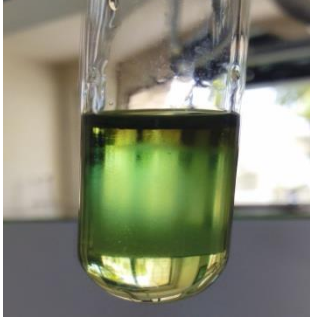


 Prof. Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc.
 NIP. 197003261995121001

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


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

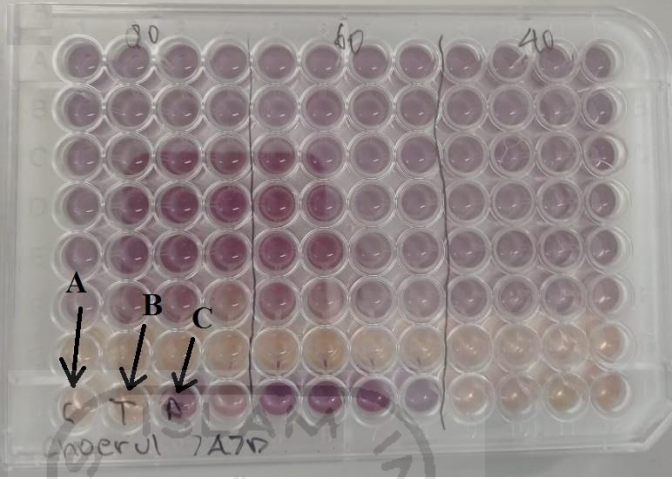
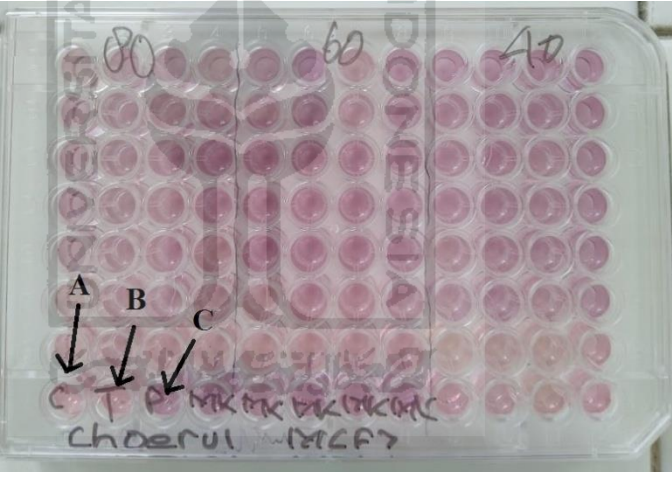
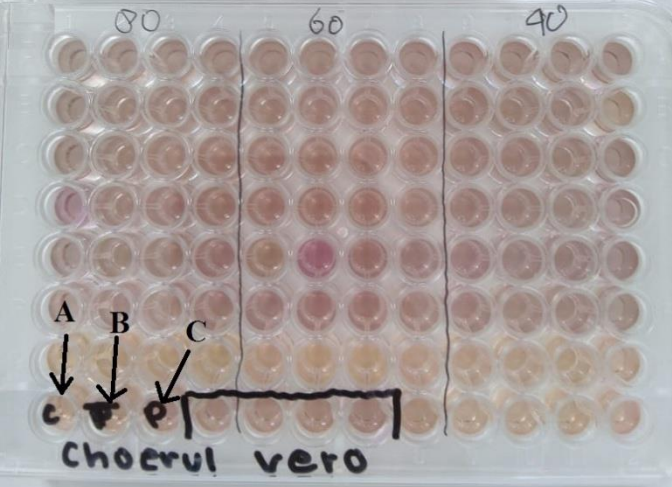
Lampiran 2. Hasil uji penapisan fitokimia

| Uji Fitokimia | Gambar | |
|---------------------|---|--|
| | sebelum | sesudah |
| Alkaloid |  |  |
| Flavonoid |  |  |
| Tanin/ polifenol |  |  |
| Terpenoid |  |  |

Lampiran 3. Nanoemulsi fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji

| Formulasi | Gambar |
|-----------|--|
| 40% |  |
| 60% |  |
| 80% |  |

Lampiran 4. Hasil treatment pada plate 96-well

| Sel | Gambar |
|-------|--|
| T47D |  |
| MCF-7 |  |
| Vero |  |

Keterangan: (A) Cappryoll, (B) Tween 20, (C) PEG 400

Lampiran 5. Hasil absorbansi pembacaan ELISA reader

| | Sel T47D | Sel MCF-7 | Sel vero | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|-----------|----------|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|----|----|----|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|--|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|----|----|----|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|--|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|--|----|----|----|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|
| (B) | <p>Raw Data Report Single Wavelength Mes= F3, 595nm Incubation= OFF</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.492</td><td>0.506</td><td>0.530</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.515</td><td>0.499</td><td>0.577</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.533</td><td>0.542</td><td>0.559</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.560</td><td>0.539</td><td>0.604</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.515</td><td>0.542</td><td>0.581</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.337</td><td>0.442</td><td>0.394</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.099</td><td>0.089</td><td>0.091</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.102</td><td>0.104</td><td>0.469</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.498</td><td>0.568</td><td>0.538</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.526</td><td>0.473</td><td>0.575</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.528</td><td>0.549</td><td>0.714</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.562</td><td>0.578</td><td>0.561</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.635</td><td>0.568</td><td>0.587</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.291</td><td>0.471</td><td>0.420</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.096</td><td>0.090</td><td>0.105</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.274</td><td>0.593</td><td>0.617</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.562</td><td>0.536</td><td>0.524</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.573</td><td>0.569</td><td>0.548</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.575</td><td>0.616</td><td>0.638</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.567</td><td>0.631</td><td>0.566</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.605</td><td>0.553</td><td>0.617</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.485</td><td>0.374</td><td>0.541</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.088</td><td>0.090</td><td>0.094</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.596</td><td>0.572</td><td>0.102</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.551</td><td>0.568</td><td>0.564</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.552</td><td>0.551</td><td>0.545</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.516</td><td>0.573</td><td>0.530</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.556</td><td>0.548</td><td>0.564</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.592</td><td>0.645</td><td>0.476</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.336</td><td>0.407</td><td>0.282</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.097</td><td>0.105</td><td>0.099</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.117</td><td>0.101</td><td>0.115</td></tr> </tbody> </table> | | 1 | 2 | 3 | A | 0.492 | 0.506 | 0.530 | B | 0.515 | 0.499 | 0.577 | C | 0.533 | 0.542 | 0.559 | D | 0.560 | 0.539 | 0.604 | E | 0.515 | 0.542 | 0.581 | F | 0.337 | 0.442 | 0.394 | G | 0.099 | 0.089 | 0.091 | H | 0.102 | 0.104 | 0.469 | | 4 | 5 | 6 | A | 0.498 | 0.568 | 0.538 | B | 0.526 | 0.473 | 0.575 | C | 0.528 | 0.549 | 0.714 | D | 0.562 | 0.578 | 0.561 | E | 0.635 | 0.568 | 0.587 | F | 0.291 | 0.471 | 0.420 | G | 0.096 | 0.090 | 0.105 | H | 0.274 | 0.593 | 0.617 | | 7 | 8 | 9 | A | 0.562 | 0.536 | 0.524 | B | 0.573 | 0.569 | 0.548 | C | 0.575 | 0.616 | 0.638 | D | 0.567 | 0.631 | 0.566 | E | 0.605 | 0.553 | 0.617 | F | 0.485 | 0.374 | 0.541 | G | 0.088 | 0.090 | 0.094 | H | 0.596 | 0.572 | 0.102 | | 10 | 11 | 12 | A | 0.551 | 0.568 | 0.564 | B | 0.552 | 0.551 | 0.545 | C | 0.516 | 0.573 | 0.530 | D | 0.556 | 0.548 | 0.564 | E | 0.592 | 0.645 | 0.476 | F | 0.336 | 0.407 | 0.282 | G | 0.097 | 0.105 | 0.099 | H | 0.117 | 0.101 | 0.115 | <p>choerul</p> <p>Raw Data Report Single Wavelength Mes= F3, 595nm Incubation= OFF</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.204</td><td>0.211</td><td>0.205</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.206</td><td>0.245</td><td>0.195</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.212</td><td>0.244</td><td>0.219</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.228</td><td>0.248</td><td>0.231</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.245</td><td>0.236</td><td>0.216</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.189</td><td>0.189</td><td>0.212</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.093</td><td>0.129</td><td>0.101</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.093</td><td>0.091</td><td>0.212</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.207</td><td>0.202</td><td>0.291</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.199</td><td>0.195</td><td>0.239</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.212</td><td>0.221</td><td>0.229</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.222</td><td>0.214</td><td>0.215</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.214</td><td>0.229</td><td>0.230</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.203</td><td>0.374</td><td>0.196</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.100</td><td>0.103</td><td>0.099</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.211</td><td>0.213</td><td>0.214</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.212</td><td>0.239</td><td>0.239</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.217</td><td>0.247</td><td>0.226</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.226</td><td>0.234</td><td>0.239</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.221</td><td>0.223</td><td>0.232</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.224</td><td>0.228</td><td>0.237</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.166</td><td>0.196</td><td>0.176</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.093</td><td>0.094</td><td>0.115</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.190</td><td>0.189</td><td>0.090</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.214</td><td>0.200</td><td>0.204</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.245</td><td>0.239</td><td>0.194</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.211</td><td>0.200</td><td>0.219</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.230</td><td>0.218</td><td>0.217</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.207</td><td>0.219</td><td>0.215</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.187</td><td>0.176</td><td>0.190</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.097</td><td>0.099</td><td>0.110</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.100</td><td>0.114</td><td>0.102</td></tr> </tbody> </table> | | 1 | 2 | 3 | A | 0.204 | 0.211 | 0.205 | B | 0.206 | 0.245 | 0.195 | C | 0.212 | 0.244 | 0.219 | D | 0.228 | 0.248 | 0.231 | E | 0.245 | 0.236 | 0.216 | F | 0.189 | 0.189 | 0.212 | G | 0.093 | 0.129 | 0.101 | H | 0.093 | 0.091 | 0.212 | | 4 | 5 | 6 | A | 0.207 | 0.202 | 0.291 | B | 0.199 | 0.195 | 0.239 | C | 0.212 | 0.221 | 0.229 | D | 0.222 | 0.214 | 0.215 | E | 0.214 | 0.229 | 0.230 | F | 0.203 | 0.374 | 0.196 | G | 0.100 | 0.103 | 0.099 | H | 0.211 | 0.213 | 0.214 | | 7 | 8 | 9 | A | 0.212 | 0.239 | 0.239 | B | 0.217 | 0.247 | 0.226 | C | 0.226 | 0.234 | 0.239 | D | 0.221 | 0.223 | 0.232 | E | 0.224 | 0.228 | 0.237 | F | 0.166 | 0.196 | 0.176 | G | 0.093 | 0.094 | 0.115 | H | 0.190 | 0.189 | 0.090 | | 10 | 11 | 12 | A | 0.214 | 0.200 | 0.204 | B | 0.245 | 0.239 | 0.194 | C | 0.211 | 0.200 | 0.219 | D | 0.230 | 0.218 | 0.217 | E | 0.207 | 0.219 | 0.215 | F | 0.187 | 0.176 | 0.190 | G | 0.097 | 0.099 | 0.110 | H | 0.100 | 0.114 | 0.102 | <p>Raw Data Report Single Wavelength Mes= F3, 595nm Incubation= OFF</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.209</td><td>0.191</td><td>0.198</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.205</td><td>0.200</td><td>0.195</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.219</td><td>0.200</td><td>0.196</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.227</td><td>0.197</td><td>0.196</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.231</td><td>0.219</td><td>0.240</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.171</td><td>0.185</td><td>0.172</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.071</td><td>0.061</td><td>0.062</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.070</td><td>0.109</td><td>0.168</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.197</td><td>0.200</td><td>0.200</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.197</td><td>0.192</td><td>0.189</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.199</td><td>0.200</td><td>0.200</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.206</td><td>0.198</td><td>0.198</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.229</td><td>0.196</td><td>0.236</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.196</td><td>0.196</td><td>0.204</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.070</td><td>0.068</td><td>0.068</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.169</td><td>0.176</td><td>0.172</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.199</td><td>0.205</td><td>0.198</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.195</td><td>0.192</td><td>0.204</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.196</td><td>0.201</td><td>0.194</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.189</td><td>0.203</td><td>0.214</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.230</td><td>0.224</td><td>0.223</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.195</td><td>0.189</td><td>0.198</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.062</td><td>0.060</td><td>0.073</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.173</td><td>0.114</td><td>0.069</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>0.205</td><td>0.204</td><td>0.206</td></tr> <tr><td>B</td><td>0.201</td><td>0.202</td><td>0.130</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.200</td><td>0.199</td><td>0.211</td></tr> <tr><td>D</td><td>0.212</td><td>0.195</td><td>0.196</td></tr> <tr><td>E</td><td>0.208</td><td>0.230</td><td>0.202</td></tr> <tr><td>F</td><td>0.107</td><td>0.196</td><td>0.174</td></tr> <tr><td>G</td><td>0.076</td><td>0.074</td><td>0.069</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.075</td><td>0.078</td><td>0.079</td></tr> </tbody> </table> | | 1 | 2 | 3 | A | 0.209 | 0.191 | 0.198 | B | 0.205 | 0.200 | 0.195 | C | 0.219 | 0.200 | 0.196 | D | 0.227 | 0.197 | 0.196 | E | 0.231 | 0.219 | 0.240 | F | 0.171 | 0.185 | 0.172 | G | 0.071 | 0.061 | 0.062 | H | 0.070 | 0.109 | 0.168 | | 4 | 5 | 6 | A | 0.197 | 0.200 | 0.200 | B | 0.197 | 0.192 | 0.189 | C | 0.199 | 0.200 | 0.200 | D | 0.206 | 0.198 | 0.198 | E | 0.229 | 0.196 | 0.236 | F | 0.196 | 0.196 | 0.204 | G | 0.070 | 0.068 | 0.068 | H | 0.169 | 0.176 | 0.172 | | 7 | 8 | 9 | A | 0.199 | 0.205 | 0.198 | B | 0.195 | 0.192 | 0.204 | C | 0.196 | 0.201 | 0.194 | D | 0.189 | 0.203 | 0.214 | E | 0.230 | 0.224 | 0.223 | F | 0.195 | 0.189 | 0.198 | G | 0.062 | 0.060 | 0.073 | H | 0.173 | 0.114 | 0.069 | | 10 | 11 | 12 | A | 0.205 | 0.204 | 0.206 | B | 0.201 | 0.202 | 0.130 | C | 0.200 | 0.199 | 0.211 | D | 0.212 | 0.195 | 0.196 | E | 0.208 | 0.230 | 0.202 | F | 0.107 | 0.196 | 0.174 | G | 0.076 | 0.074 | 0.069 | H | 0.075 | 0.078 | 0.079 |
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.492 | 0.506 | 0.530 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.515 | 0.499 | 0.577 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.533 | 0.542 | 0.559 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.560 | 0.539 | 0.604 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.515 | 0.542 | 0.581 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.337 | 0.442 | 0.394 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.099 | 0.089 | 0.091 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.102 | 0.104 | 0.469 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | 5 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.498 | 0.568 | 0.538 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.526 | 0.473 | 0.575 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.528 | 0.549 | 0.714 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.562 | 0.578 | 0.561 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.635 | 0.568 | 0.587 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.291 | 0.471 | 0.420 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.096 | 0.090 | 0.105 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.274 | 0.593 | 0.617 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 7 | 8 | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.562 | 0.536 | 0.524 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.573 | 0.569 | 0.548 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.575 | 0.616 | 0.638 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.567 | 0.631 | 0.566 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.605 | 0.553 | 0.617 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.485 | 0.374 | 0.541 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.088 | 0.090 | 0.094 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.596 | 0.572 | 0.102 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 11 | 12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.551 | 0.568 | 0.564 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.552 | 0.551 | 0.545 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.516 | 0.573 | 0.530 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.556 | 0.548 | 0.564 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.592 | 0.645 | 0.476 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.336 | 0.407 | 0.282 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.097 | 0.105 | 0.099 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.117 | 0.101 | 0.115 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.204 | 0.211 | 0.205 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.206 | 0.245 | 0.195 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.212 | 0.244 | 0.219 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.228 | 0.248 | 0.231 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.245 | 0.236 | 0.216 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.189 | 0.189 | 0.212 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.093 | 0.129 | 0.101 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.093 | 0.091 | 0.212 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | 5 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.207 | 0.202 | 0.291 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.199 | 0.195 | 0.239 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.212 | 0.221 | 0.229 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.222 | 0.214 | 0.215 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.214 | 0.229 | 0.230 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.203 | 0.374 | 0.196 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.100 | 0.103 | 0.099 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.211 | 0.213 | 0.214 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 7 | 8 | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.212 | 0.239 | 0.239 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.217 | 0.247 | 0.226 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.226 | 0.234 | 0.239 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.221 | 0.223 | 0.232 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.224 | 0.228 | 0.237 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.166 | 0.196 | 0.176 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.093 | 0.094 | 0.115 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.190 | 0.189 | 0.090 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 11 | 12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.214 | 0.200 | 0.204 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.245 | 0.239 | 0.194 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.211 | 0.200 | 0.219 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.230 | 0.218 | 0.217 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.207 | 0.219 | 0.215 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.187 | 0.176 | 0.190 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.097 | 0.099 | 0.110 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.100 | 0.114 | 0.102 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.209 | 0.191 | 0.198 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.205 | 0.200 | 0.195 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.219 | 0.200 | 0.196 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.227 | 0.197 | 0.196 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.231 | 0.219 | 0.240 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.171 | 0.185 | 0.172 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.071 | 0.061 | 0.062 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.070 | 0.109 | 0.168 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | 5 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.197 | 0.200 | 0.200 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.197 | 0.192 | 0.189 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.199 | 0.200 | 0.200 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.206 | 0.198 | 0.198 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.229 | 0.196 | 0.236 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.196 | 0.196 | 0.204 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.070 | 0.068 | 0.068 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.169 | 0.176 | 0.172 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 7 | 8 | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.199 | 0.205 | 0.198 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.195 | 0.192 | 0.204 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.196 | 0.201 | 0.194 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.189 | 0.203 | 0.214 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.230 | 0.224 | 0.223 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.195 | 0.189 | 0.198 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.062 | 0.060 | 0.073 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.173 | 0.114 | 0.069 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10 | 11 | 12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.205 | 0.204 | 0.206 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0.201 | 0.202 | 0.130 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0.200 | 0.199 | 0.211 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0.212 | 0.195 | 0.196 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | 0.208 | 0.230 | 0.202 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| F | 0.107 | 0.196 | 0.174 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0.076 | 0.074 | 0.069 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | 0.075 | 0.078 | 0.079 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Lampiran 6. Data hasil uji antikanker

6.1 Data absorbansi pada setiap konsentrasi formulasi

Tabel 1. Absorbansi sel T47D setelah ditreatment dengan formulasi 40%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | 0,097 | 0,105 | 0,099 | 0,1003333 | 0,0041633 |
| 500 | 0,386 | 0,407 | 0,282 | 0,3583333 | 0,0669353 |
| 250 | 0,592 | 0,476 | | 0,534 | 0,0820244 |
| 125 | 0,566 | 0,556 | 0,564 | 0,562 | 0,0052915 |
| 62,5 | 0,638 | 0,573 | 0,53 | 0,5803333 | 0,0543722 |
| kontrol sel | 0,593 | 0,617 | 0,596 | 0,602 | 0,0130767 |
| Blank | 0,102 | 0,117 | 0,101 | 0,1066667 | 0,0089629 |

Tabel 2. Absorbansi sel T47D setelah ditreatment dengan formulasi 60%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | 0,09 | 0,088 | 0,09 | 0,0893333 | 0,0011547 |
| 500 | 0,471 | 0,42 | 0,374 | 0,4216667 | 0,0485215 |
| 250 | 0,568 | 0,587 | 0,553 | 0,5693333 | 0,0170392 |
| 125 | 0,578 | 0,567 | 0,631 | 0,592 | 0,0342199 |
| 62,5 | 0,549 | 0,714 | 0,575 | 0,6126667 | 0,0887149 |
| kontrol sel | 0,593 | 0,617 | 0,596 | 0,602 | 0,0130767 |
| blanko | 0,102 | 0,117 | 0,101 | 0,1066667 | 0,0089629 |

Tabel 3. Absorbansi sel T47D setelah ditreatment dengan formulasi 80%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | 0,099 | 0,091 | 0,096 | 0,0953333 | 0,0040415 |
| 500 | 0,337 | 0,394 | 0,291 | 0,3406667 | 0,0515978 |

| | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-----------|-----------|
| 250 | 0,515 | | 0,581 | 0,548 | 0,046669 |
| 125 | 0,56 | 0,539 | | 0,5495 | 0,0148492 |
| 62,5 | 0,542 | 0,533 | 0,559 | 0,5446667 | 0,0132035 |
| kontrol sel | 0,593 | 0,617 | 0,596 | 0,602 | 0,0130767 |
| Blanko | 0,102 | 0,117 | 0,101 | 0,1066667 | 0,0089629 |

Tabel 4. Absorbansi sel MCF-7 setelah ditreatment dengan formulasi 40%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |
| 1000 | 0,097 | 0,099 | 0,11 | 0,102 | 0,007 |
| 500 | 0,187 | 0,176 | 0,19 | 0,1843333 | 0,0073711 |
| 250 | 0,207 | 0,219 | 0,215 | 0,2136667 | 0,0061101 |
| 125 | 0,232 | 0,23 | 0,218 | 0,2266667 | 0,0075719 |
| 31,25 | 0,226 | 0,245 | 0,239 | 0,2366667 | 0,0097125 |
| kontrol sel | 0,213 | 0,19 | 0,189 | 0,1973333 | 0,0135769 |
| Blanko | 0,09 | 0,1 | 0,109 | 0,0996667 | 0,0095044 |

Tabel 5. Absorbansi sel MCF-7 setelah ditreatment dengan formulasi 60%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |
| 1000 | 0,099 | 0,093 | 0,094 | 0,0953333 | 0,0032146 |
| 500 | 0,196 | 0,166 | 0,196 | 0,186 | 0,0173205 |
| 250 | 0,229 | 0,224 | 0,228 | 0,227 | 0,0026458 |
| 31,25 | 0,239 | 0,217 | 0,247 | 0,2343333 | 0,0155349 |
| 15,625 | 0,291 | 0,212 | 0,239 | 0,2473333 | 0,0401539 |
| kontrol sel | 0,213 | 0,19 | 0,189 | 0,1973333 | 0,0135769 |
| blanko | 0,09 | 0,1 | 0,109 | 0,0996667 | 0,0095044 |

Tabel 6. Absorbansi sel MCF-7 setelah ditreatment dengan formulasi 80%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | 0,093 | 0,101 | 0,1 | 0,098 | 0,0043589 |
| 500 | 0,189 | 0,212 | 0,203 | 0,2013333 | 0,0115902 |
| 250 | 0,216 | 0,214 | | 0,215 | 0,0014142 |
| 125 | 0,228 | 0,231 | 0,222 | 0,227 | 0,0045826 |
| 62,5 | 0,244 | | 0,219 | 0,2315 | 0,0176777 |
| kontrol sel | 0,213 | 0,19 | 0,189 | 0,1973333 | 0,0135769 |
| blanko | 0,09 | 0,1 | 0,109 | 0,0996667 | 0,0095044 |

Tabel 7. Absorbansi sel vero setelah ditreatment dengan formulasi 40%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | 0,073 | 0,076 | 0,074 | 0,0743333 | 0,0015275 |
| 500 | 0,187 | 0,196 | 0,174 | 0,1856667 | 0,0110604 |
| 62,5 | 0,194 | 0,199 | 0,211 | 0,2013333 | 0,0087369 |
| 31,25 | 0,204 | 0,201 | 0,202 | 0,2023333 | 0,0015275 |
| 15,625 | 0,205 | 0,204 | 0,206 | 0,205 | 0,001 |
| kontrol sel | 0,176 | 0,172 | 0,173 | 0,1736667 | 0,0020817 |
| blanko | 0,075 | 0,078 | 0,079 | 0,0773333 | 0,0020817 |

Tabel 8. Absorbansi sel vero setelah ditreatment dengan formulasi 60%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | 0,068 | 0,068 | 0,069 | 0,0683333 | 0,0005774 |
| 500 | 0,195 | 0,189 | 0,196 | 0,1933333 | 0,0037859 |
| 125 | 0,198 | 0,198 | 0,203 | 0,1996667 | 0,0028868 |
| 62,5 | 0,2 | 0,2 | 0,201 | 0,2003333 | 0,0005774 |
| 15,625 | 0,208 | 0,2 | 0,205 | 0,2043333 | 0,0040415 |

| | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-----------|-----------|
| kontrol sel | 0,176 | 0,172 | 0,173 | 0,1736667 | 0,0020817 |
| Blanko | 0,075 | 0,078 | 0,079 | 0,0773333 | 0,0020817 |

Tabel 9. Absorbansi sel vero setelah ditreatment dengan formulasi 80%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbansi | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | 0,071 | 0,062 | 0,07 | 0,0676667 | 0,0049329 |
| 500 | 0,185 | 0,172 | 0,196 | 0,1843333 | 0,0120139 |
| 125 | 0,197 | 0,196 | | 0,1965 | 0,0007071 |
| 62,5 | 0,2 | 0,196 | 0,199 | 0,1983333 | 0,0020817 |
| 15,625 | 0,209 | 0,198 | 0,197 | 0,2013333 | 0,0066583 |
| kontrol sel | 0,176 | 0,172 | 0,173 | 0,1736667 | 0,0020817 |
| Blanko | 0,075 | 0,078 | 0,079 | 0,0773333 | 0,0020817 |

6.2 Data viabilitas sel pada setiap konsentrasi formulasi

Tabel 10. Viabilitas sel T47D setelah ditreatment dengan formulasi 40%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----------|-----------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | -1,95155 | -0,33647 | -1,547779 | -1,2786 | 0,84051 |
| 500 | 56,393 | 60,63257 | 35,39704 | 50,80754 | 13,5132 |
| 125 | 97,98116 | 74,56258 | | 86,27187 | 16,5594 |
| 62,5 | 92,73217 | 90,71332 | 92,3284 | 91,92463 | 1,06827 |
| 15,625 | 107,2678 | 94,14536 | 85,46433 | 95,62584 | 10,9769 |

Tabel 11. Viabilitas sel T47D setelah ditreatment dengan formulasi 60%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----------|-----------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | | |
| 1000 | -3,36474 | -3,76851 | -3,364738 | -3,49933 | 0,23312 |
| 500 | 73,55316 | 63,25707 | 53,97039 | 63,59354 | 9,79572 |
| 125 | 93,13594 | 96,97174 | 90,10767 | 93,40511 | 3,43994 |

| | | | | | |
|--------|----------|----------|----------|----------|---------|
| 62,5 | 95,15478 | 92,93405 | 105,8546 | 97,98116 | 6,90845 |
| 15,625 | 89,30013 | 122,611 | 94,54913 | 102,1534 | 17,9101 |

Tabel 12. Viabilitas sel T47D setelah ditreatment dengan formulasi 80%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----------|-----------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |
| 1000 | -1,54778 | -3,16285 | -2,153432 | -2,28802 | 0,81591 |
| 500 | 46,50067 | 58,00808 | 37,214 | 47,24092 | 10,4168 |
| 125 | 82,43607 | | 95,76043 | 89,09825 | 9,42175 |
| 62,5 | 91,52086 | 87,28129 | | 89,40108 | 2,99783 |
| 15,625 | 87,88694 | 86,06999 | 91,31898 | 88,4253 | 2,66559 |

Tabel 13. Viabilitas sel MCF-7 setelah ditreatment dengan formulasi 40%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----------|----------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |
| 1000 | -2,73038 | -0,68259 | 10,5802 | 2,389078 | 7,16724 |
| 500 | 89,4198 | 78,157 | 92,49147 | 86,68942 | 7,54722 |
| 125 | 109,8976 | 122,1843 | 118,0887 | 116,7235 | 6,25608 |
| 62,5 | 135,4949 | 133,4471 | 121,1604 | 130,0341 | 7,75278 |
| 15,625 | 129,3515 | 148,8055 | 142,6621 | 140,273 | 9,94457 |

Tabel 14. Viabilitas sel MCF-7 setelah ditreatment dengan formulasi 60%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----------|-----------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |
| 1000 | -0,68259 | -6,82594 | -5,802048 | -4,43686 | 3,29135 |
| 500 | 98,63481 | 67,91809 | 98,63481 | 88,3959 | 17,7343 |
| 125 | 132,4232 | 127,3038 | 131,3993 | 130,3754 | 2,70896 |
| 62,5 | 142,6621 | 120,1365 | 150,8532 | 137,884 | 15,906 |
| 15,625 | 195,9044 | 115,0171 | 142,6621 | 151,1945 | 41,1132 |

Tabel 15. Viabilitas sel MCF-7 setelah ditreatment dengan formulasi 80%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----------|----------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |
| 1000 | -6,82594 | 1,365188 | 0,341297 | -1,70648 | 4,46304 |
| 500 | 91,46758 | 115,0171 | 105,802 | 104,0956 | 11,8671 |
| 125 | 119,1126 | 117,0648 | | 118,0887 | 1,448 |
| 62,5 | 131,3993 | 134,471 | 125,256 | 130,3754 | 4,69206 |
| 15,625 | 147,7816 | | 122,1843 | 134,9829 | 18,1 |

Tabel 16. Viabilitas sel Vero setelah ditreatment dengan formulasi 40%

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----------|-----------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |
| 1000 | -4,49827 | -1,38408 | -3,460208 | -3,11419 | 1,58567 |
| 500 | 113,8408 | 123,1834 | 100,346 | 112,4567 | 11,4814 |
| 125 | 121,1073 | 126,2976 | 138,7543 | 128,7197 | 9,06944 |
| 62,5 | 131,4879 | 128,3737 | 129,4118 | 129,7578 | 1,58567 |
| 15,625 | 132,526 | 131,4879 | 133,564 | 132,526 | 1,03806 |

Tabel 17. Viabilitas sel Vero setelah ditreatment dengan formulasi 60%

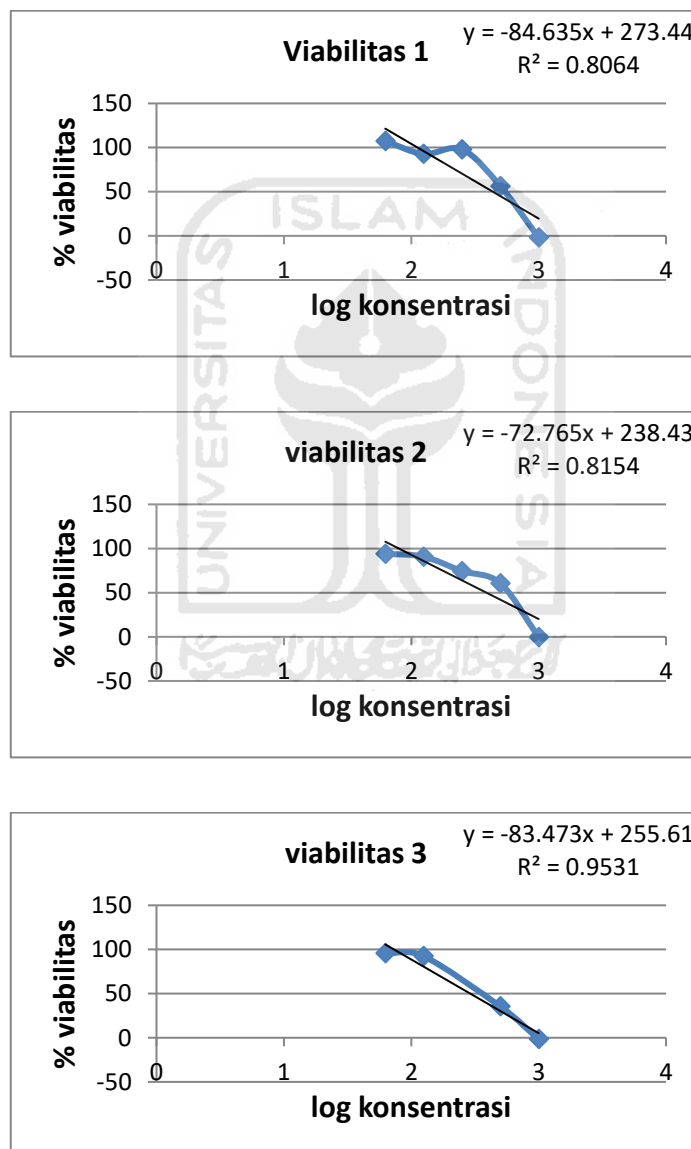
| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----------|-----------|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |
| 1000 | -9,68858 | -9,68858 | -8,650519 | -9,34256 | 0,59933 |
| 500 | 122,1453 | 115,917 | 123,1834 | 120,4152 | 3,93004 |
| 125 | 125,2595 | 125,2595 | | 125,2595 | 0 |
| 62,5 | 127,3356 | 127,3356 | 128,3737 | 127,6817 | 0,59933 |
| 15,625 | 135,6401 | 127,3356 | 132,526 | 131,8339 | 4,19528 |

Tabel 18. Viabilitas sel Vero setelah ditreatment dengan formulasi 80%

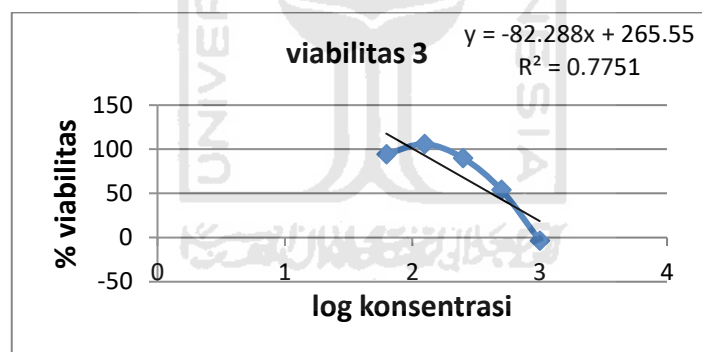
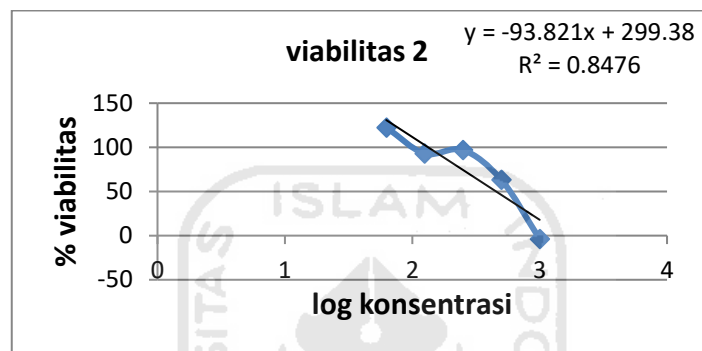
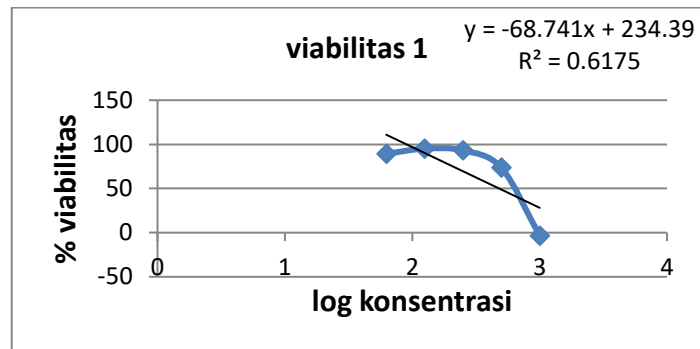
| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilitas sel (%) | | | | Standar deviasi |
|-------------------------------------|--------------------|----|-----|-----------|--------------------|
| | I | II | III | Rata-rata | |

| | | | | | |
|--------|----------|----------|-----------|----------|---------|
| 1000 | -6,57439 | -15,917 | -7,612457 | -10,0346 | 5,12064 |
| 500 | 111,7647 | 98,2699 | 123,1834 | 111,0727 | 12,4712 |
| 125 | 124,2215 | 123,1834 | | 123,7024 | 0,73402 |
| 62,5 | 127,3356 | 123,1834 | 126,2976 | 125,6055 | 2,1609 |
| 15,625 | 136,6782 | 125,2595 | 124,2215 | 128,7197 | 6,91176 |

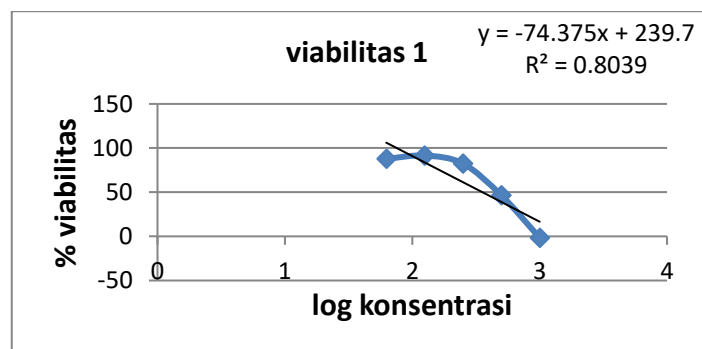
6.3 Grafik hubungan log konsentrasi formulasi terhadap % viabilitas sel

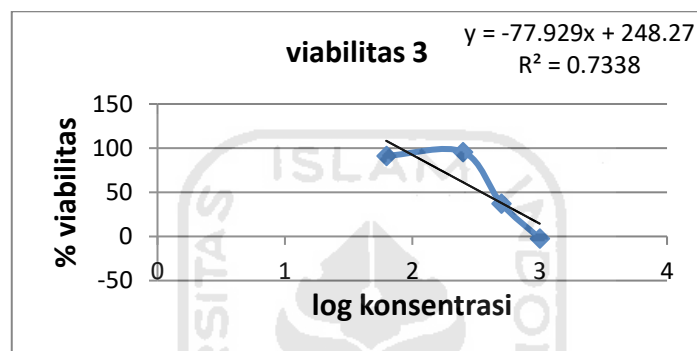
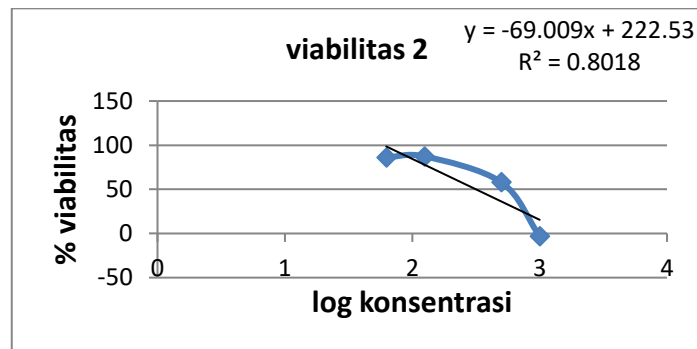


Gambar 1. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 40% terhadap % viabilitas sel T47D

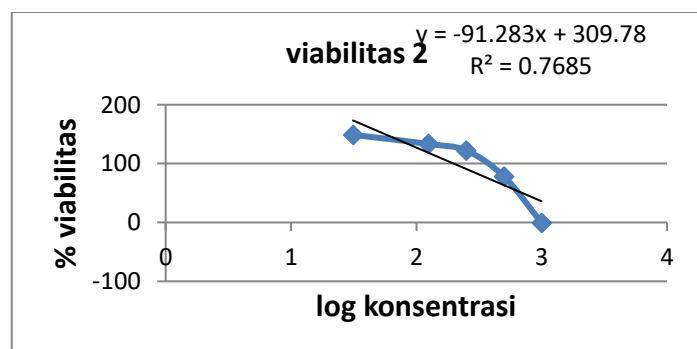
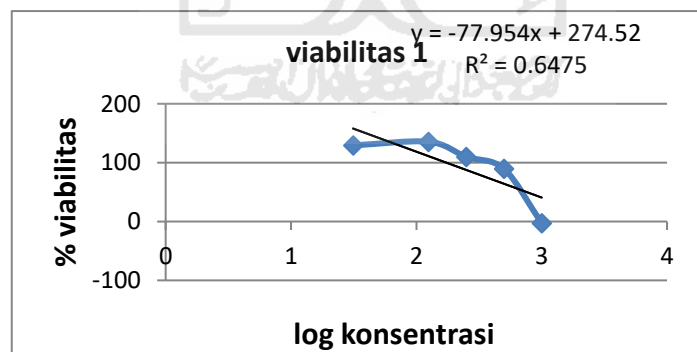


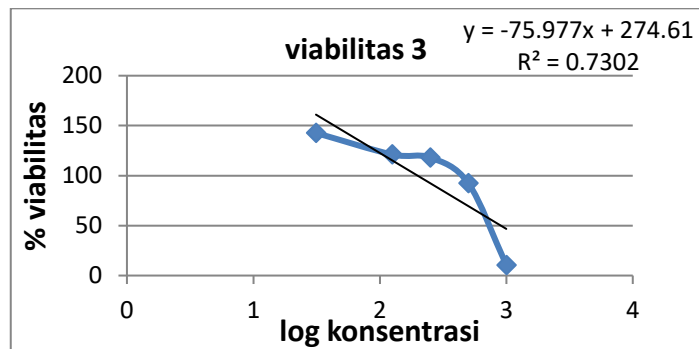
Gambar 2. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 60% terhadap % viabilitas sel T47D



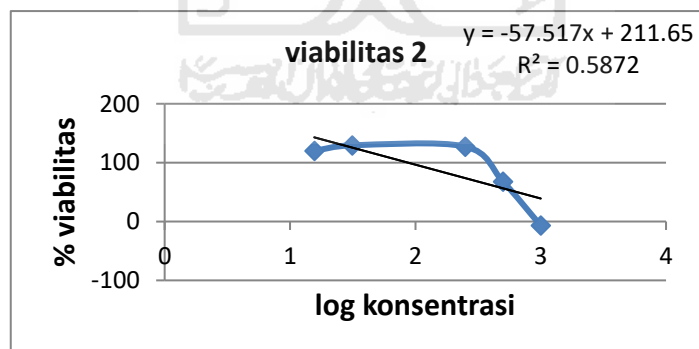
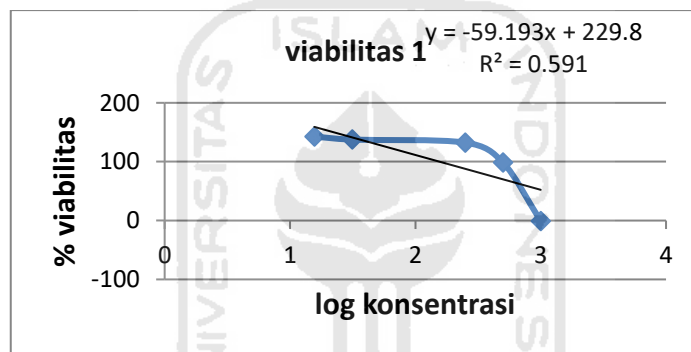


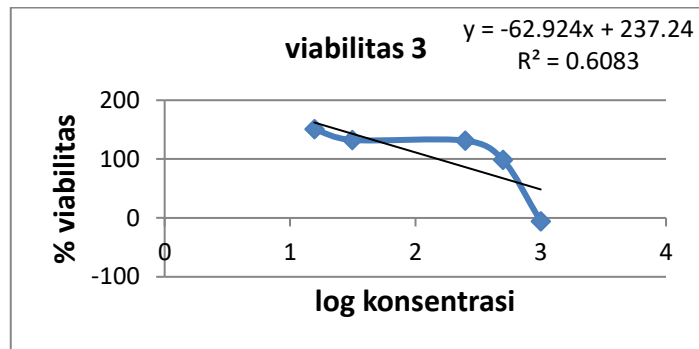
Gambar 3. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 80% terhadap % viabilitas sel T47D



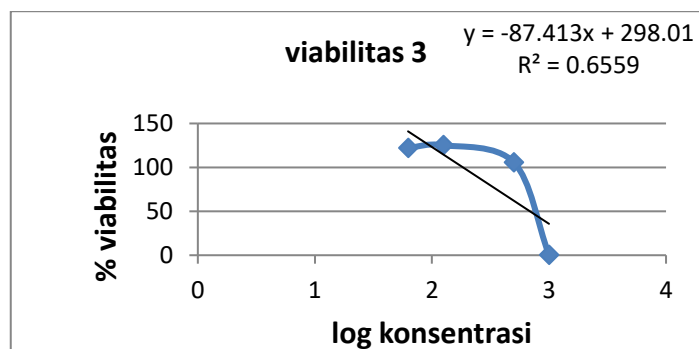
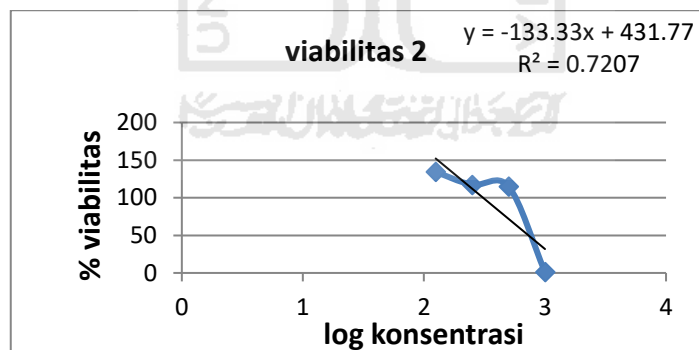
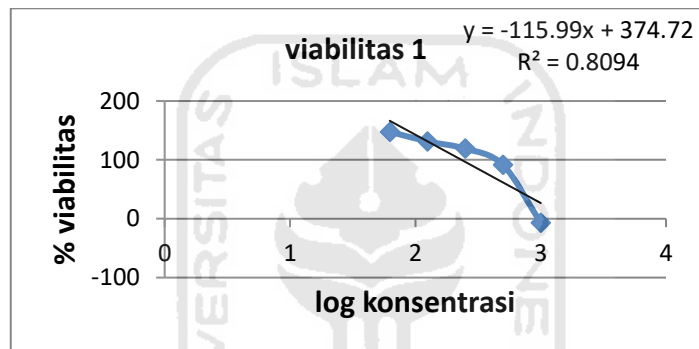


Gambar 4. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 40% terhadap % viabilitas sel MCF-7

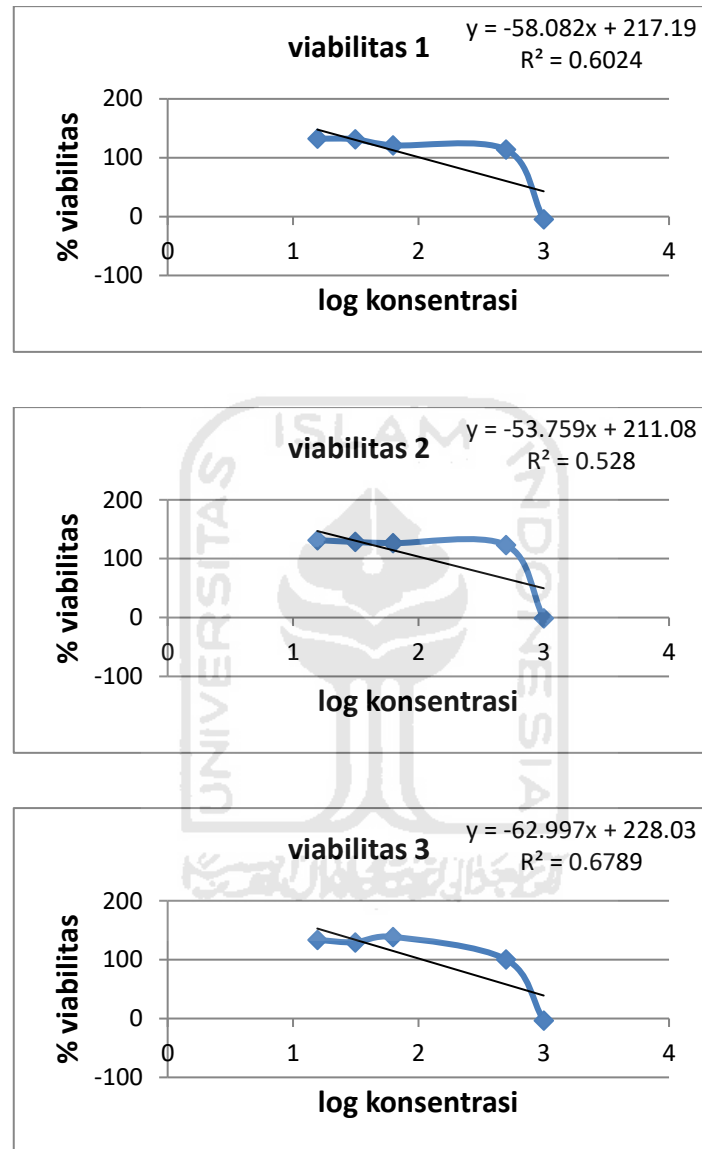




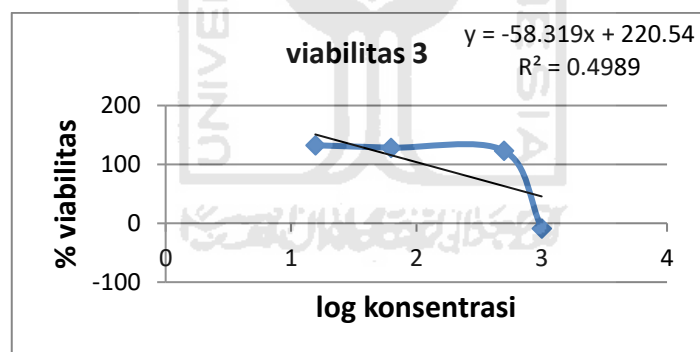
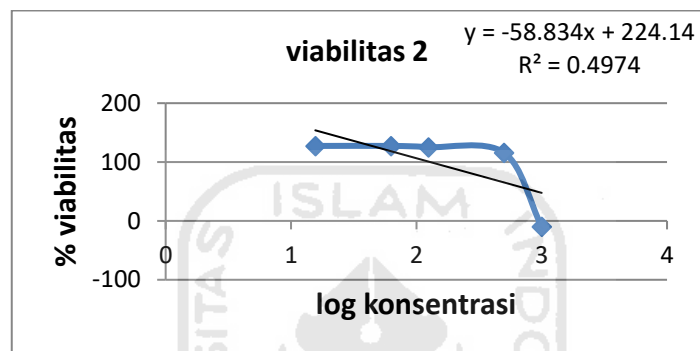
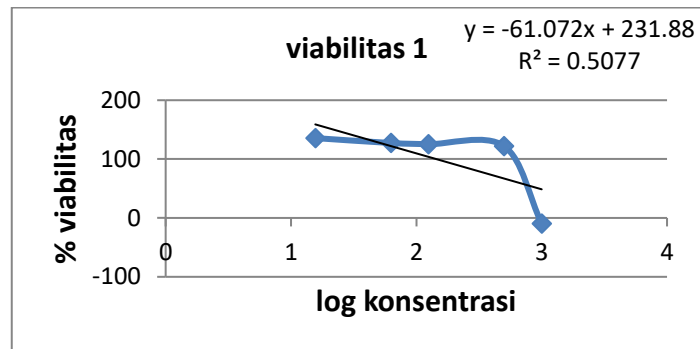
Gambar 5. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 60% terhadap % viabilitas sel MCF-7



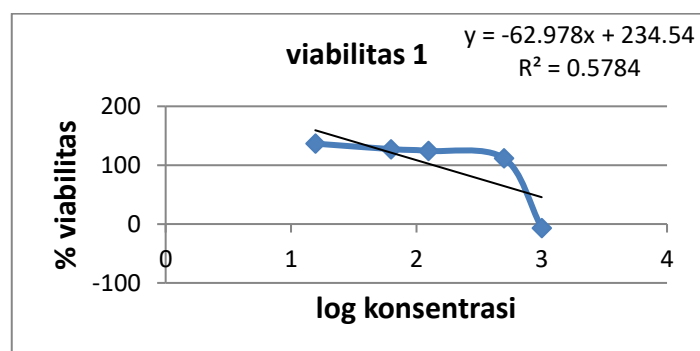
Gambar 6. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 80% terhadap % viabilitas sel MCF-7

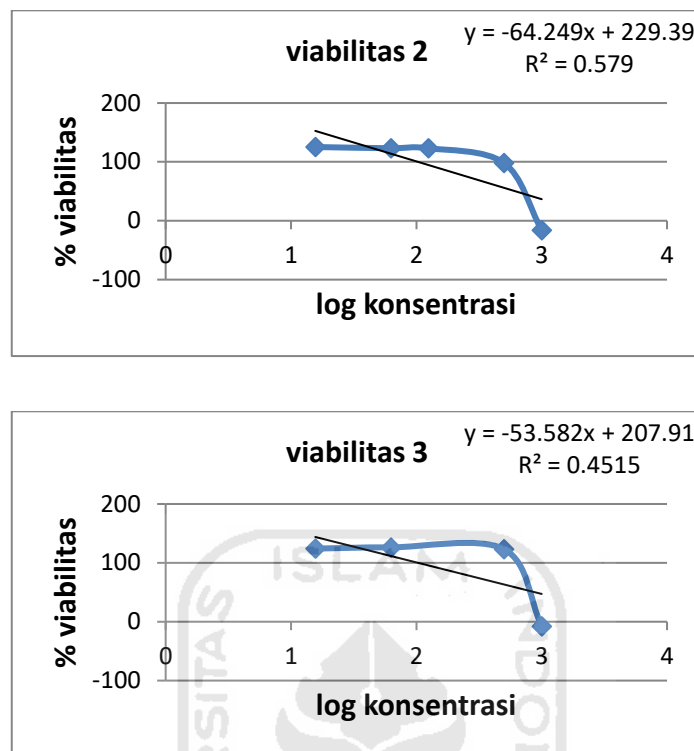


Gambar 7. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 40% terhadap % viabilitas sel vero



Gambar 8. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 60% terhadap % viabilitas sel vero





Gambar 9. Grafik hubungan log konsentrasi formulasi 80% terhadap % viabilitas sel vero

6.4 Hasil IC₅₀ formulasi setiap formulasi

Tabel 19. Hasil IC₅₀ setiap formulasi terhadap sel T47D

| Formulasi | IC ₅₀ | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|---------------|------------------|--------|--------|-----------|-----------------|
| | I | II | III | | |
| Formulasi 40% | 426,57 | 380,18 | 288,4 | 365,05 | 70,3166 |
| Formulasi 60% | 478,63 | 446,68 | 407,38 | 444,23 | 35,6881 |
| Formulasi 80% | 354,81 | 316,22 | 346,73 | 339,2533 | 20,3525 |

Tabel 20. Hasil IC₅₀ setiap formulasi terhadap sel MCF-7

| Formulasi | IC ₅₀ | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|---------------|------------------|--------|--------|-----------|-----------------|
| | I | II | III | | |
| Formulasi 40% | 758,577 | 691,83 | 891,25 | 780,5523 | 101,51 |
| Formulasi 60% | 1000 | 630,95 | 933,25 | 854,7333 | 196,655 |

| | | | | | |
|---------------|--------|--------|--------|----------|---------|
| Formulasi 80% | 630,95 | 724,43 | 676,08 | 677,1533 | 46,7492 |
|---------------|--------|--------|--------|----------|---------|

Tabel 21. Hasil IC₅₀ setiap formulasi terhadap sel Vero

| Formulasi | IC ₅₀ | | | Rata-rata | Standar deviasi |
|---------------|------------------|--------|--------|-----------|-----------------|
| | I | II | III | | |
| Formulasi 40% | 741,31 | 977,23 | 660,69 | 793,0767 | 164,497 |
| Formulasi 60% | 933,25 | 891,25 | 831,76 | 885,42 | 50,9956 |
| Formulasi 80% | 831,7 | 616,59 | 870,96 | 773,0833 | 136,941 |

Lampiran 7. Perhitungan

7.1 Perhitungan rendemen ekstrak kasar dan fraksi

- **Rendemen ekstrak kasar**

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

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

- **Rendemen fraksi**

$$\% \text{Rendemen fraksi etanol} = \frac{103,87}{139,1} \times 100\%$$

$$\% \text{Rendemen} = \frac{46,06 \text{ g}}{263,935 \text{ g}} \times 100\% = 17,451\%$$

7.2 Perhitungan panen sel

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

1. Sel T47D

- Bilik 1 = 122
- Bilik 2 = 136
- Bilik 3 = 113
- Bilik 4 = 180

$$\text{Jumlah sel/mL} = \frac{122+136+113+180}{4} \times 10^4$$

$$= 138 \times 10^4/\text{mL}$$

2. Sel MCF-7

- Bilik 1 = 72
- Bilik 2 = 59
- Bilik 3 = 63
- Bilik 4 = 50

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel/mL} &= \frac{72+59+63+50}{4} \times 10^4 \\ &= 61 \times 10^4/\text{mL} \end{aligned}$$

3. Sel vero

- Bilik 1 = 244
- Bilik 2 = 209
- Bilik 3 = 233
- Bilik 4 = 214

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel/mL} &= \frac{244+209+233+214}{4} \times 10^4 \\ &= 225 \times 10^4/\text{mL} \end{aligned}$$

7.3 Perhitungan membuat sel dengan kepadatan $1 \times 10^6/\text{mL}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

- **Sel T47D**

$$138 \times 10^4/\text{mL} \cdot V_1 = 10 \times 10^4 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,724 \text{ mL}$$

$$= 724 \mu\text{L}$$

- **Sel MCF-7**

$$61 \times 10^4/\text{mL} \cdot V_1 = 10 \times 10^4 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,639 \text{ mL}$$

$$= 1.639 \mu\text{L}$$

- **Sel vero**

$$225 \times 10^4/\text{mL} \cdot V_1 = 10 \times 10^4 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,444 \text{ L}$$

$$= 444 \mu\text{L}$$

7.4 Perhitungan membuat sampel 1000 µg/mL

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

- **Formulasi 40%**

$$= 0,0116 \text{ g}/100 \text{ µL}$$

$$= 11,6 \text{ mg}/100 \text{ µL}$$

$$= 116 \text{ mg}/1000 \text{ µL}$$

$$= 116.000 \text{ µg}/1000 \text{ µL} = 116.000 \text{ µg/mL}$$

$$116.000 \text{ µg/mL} \cdot V_1 = 1000 \text{ µg/mL} \cdot 1 \text{ mL}$$

$$= 0,00862 \text{ mL} = 8,6 \text{ µL}$$

- **Formulasi 60%**

$$= 0,0115 \text{ g}/100 \text{ µL}$$

$$= 11,5 \text{ mg}/100 \text{ µL}$$

$$= 115 \text{ mg}/1000 \text{ µL}$$

$$= 115.000 \text{ µg}/1000 \text{ µL} = 115.000 \text{ µg/mL}$$

$$115.000 \text{ µg/mL} \cdot V_1 = 1000 \text{ µg/mL} \cdot 1 \text{ mL}$$

$$= 0,00869 \text{ mL} = 8,7 \text{ µL}$$

- **Formulasi 80%**

$$= 0,0114 \text{ g}/100 \text{ µL}$$

$$= 11,4 \text{ mg}/100 \text{ µL}$$

$$= 114 \text{ mg}/1000 \text{ µL}$$

$$= 114.000 \text{ µg}/1000 \text{ µL} = 114.000 \text{ µg/mL}$$

$$114.000 \text{ µg/mL} \cdot V_1 = 1000 \text{ µg/mL} \cdot 1 \text{ mL}$$

$$= 0,00877 \text{ mL} = 8,8 \text{ µL}$$

7.5 Perhitungan % viabilitas sel

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

- **formulasi 40% terhadap sel T47D**

- Viabilitas I**

1. Konsentrasi 1000 µg/ml

$$\begin{aligned} \% \text{viabilitas sel} &= \frac{0,097 - 0,106667}{0,602 - 0,106667} \times 100\% \\ &= -1,95155\% \end{aligned}$$

2. Konsentrasi 500 µg/ml

$$\begin{aligned} \% \text{viabilitas sel} &= \frac{0,386 - 0,106667}{0,602 - 0,106667} \times 100\% \\ &= 56,393\% \end{aligned}$$

3. Konsentrasi 250 µg/ml

$$\begin{aligned} \% \text{viabilitas sel} &= \frac{0,592 - 0,106667}{0,602 - 0,106667} \times 100\% \\ &= 97,98116\% \end{aligned}$$

4. Konsentrasi 125 µg/ml

$$\begin{aligned} \% \text{viabilitas sel} &= \frac{0,566 - 0,106667}{0,602 - 0,106667} \times 100\% \\ &= 92,73217\% \end{aligned}$$

5. Konsentrasi 62.5 µg/ml

$$\begin{aligned} \% \text{viabilitas sel} &= \frac{0,638 - 0,106667}{0,602 - 0,106667} \times 100\% \\ &= 107,2678\% \end{aligned}$$

7.6 Perhitungan nilai IC₅₀• **Sel T47D**

$$\begin{aligned} \text{I. } y &= -84,63x + 273,4 \\ 50 &= -84,63x + 273,4 \\ x &= (50 - 273,4) / -84,63 \\ &= 2,68 \\ \text{IC}_{50} &= 10^{2,68} = 426,57 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{II. } y &= -72,76x + 238,4 \\ 50 &= -72,76x + 238,4 \\ x &= (50 - 238,4) / -72,76 \\ &= 2,58 \\ \text{IC}_{50} &= 10^{2,58} = 380,18 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{III. } y &= -83,47x + 255,6 \\
 y &= -83,47x + 255,6 \\
 x &= (50 - 255,6) / -83,47 \\
 &= 2,46 \\
 \text{IC}_{50} &= 10^{2,46} = 365,05
 \end{aligned}$$

$$\text{IC}_{50} \text{ Formulasi 40\% pada T47D} = (\text{IC}_{50} 1 + \text{IC}_{50} 2 + \text{IC}_{50} 3) / 3 = 365,05$$

7.7 Perhitungan Nilai SI (selectivity Indeks)

$$\text{Nilai SI} = \frac{\text{nilai IC}_{50} \text{ vero}}{\text{nilai IC}_{50} \text{ Sel kanker}}$$

- **SI Terhadap Sel T47D**

- a. **Formulasi 40%**

$$\text{SI} = \frac{793,0767}{365,05} = 2,172$$

- b. **Formulasi 60%**

$$\text{SI} = \frac{885,42}{444,23} = 1,993$$

- c. **Formulasi 80%**

$$\text{SI} = \frac{773,0833}{339,2533} = 2,27$$

- **SI Terhadap Sel MCF-7**

- a. **Formulasi 40%**

$$\text{SI} = \frac{793,0767}{780,5523} = 1,016$$

- b. **Formulasi 60%**

$$\text{SI} = \frac{885,42}{854,7333} = 1,035$$

- c. **Formulasi 80%**

$$\text{SI} = \frac{773,0833}{677,1533} = 1,141$$