

**ISOLASI SENYAWA AKTIF FRAKSI N-HEKSANA DARI
EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava L.*)
DAN UJI AKTIVAS ANTIKANKER PAYUDARA DALAM
FORMULA SEDIAAN NANOPARTIKEL *self-Nano Emulsifying
Drug Delivery System* (SNEDDS) TERHADAP SEL T47D DAN
MCF-7**

SKRIPSI

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



Diajukan oleh:

ELFARA RAHMADHIKA SUWARNA
No. Mahasiswa : 16612054

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

**ISOLASI SENYAWA AKTIF FRAKSI N-HEKSANA DARI
EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava L.*)
DAN UJI AKTIVITAS ANTIKANKER PAYUDARA DALAM
FORMULA SEDIAAN NANOPARTIKEL *self-Nano Emulsifying
Drug Delivery System* (SNEDDS) TERHADAP SEL T47D DAN
MCF-7**

SKRIPSI

yang diajukan oleh :

ELFARA RAHMADHIKA SUWARNA

No. Mhs : 16612054

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

Tanggal : 10 Juni 2020

Dewan Penguji

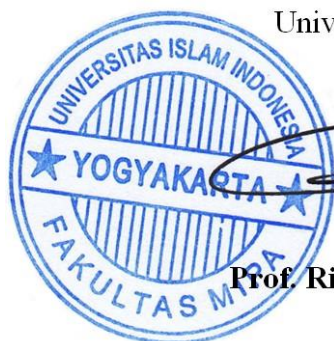
1. Nurcahyo Iman Prakoso, S.Si., M.Sc
2. Amri Setyawati, S.Si., M.Sc
3. Tatang Shabur Julianto, S.Si., M.Si
4. Ika Yanti, S.Si., M.Sc

Tanda Tangan



Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



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

PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Elfara Rahmadhika Suwarna
NIM : 16612054
Prodi/Fakultas : Kimia/FMIPA
Judul Skripsi : Isolasi senyawa aktif fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dan uji aktivitas antikanker payudara dalam formula sediaan nanopartikel *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) terhadap sel T47D dan MCF-7

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 Juni 2020

Penulis



Elfara Rahmadhika Suwarna

NIM. 16612054

HALAMAN PERSEMBAHAN

1. Kupersembahkan Skripsi ini untuk orang istimewa yaitu ibuku dan bapakku yang selalu memberi dukungan atas segala aktivitasku, lalu partner penelitianku sahabat-sahabat tercinta: Amalia, Eldiva, Reliska, dan Nanda serta seluruh keluarga kimia baik dosen, staff maupun teman-teman kimia 2016 yang selalu semangat untuk berjuang bersama.
2. Skripsi ini juga kupersembahkan untuk orang-orang spesial yang telah membimbing, memotivasi, dan juga menjadi ayah selama kehidupan saya di kampus yaitu Bapak Nur Cahyo Iman Prakoso, Bapak Tatang Shabur Julianto, Ibu Amry Setyawati dan Ibu Ika Yanti.
3. Dan barangsiapa yang menghendaki kehidupan akhirat dan berusaha (berikhtiar) ke arah itu dengan sungguh-sungguh sedang ia adalah mukmin, maka mereka itu adalah orang-orang yang usahanya (ikhtiarnya) dibalasi dengan baik (QS: Al- Israa':19).
4. Pendidikan adalah satu-satunya kunci untuk membuka dunia ini, serta paspor untuk menuju kebebasan (Oprah Winfrey).
5. Faedah sesungguhnya dalam hidup di Dunia itu hanyalah menunggu mati, tidak ada yang pantas untuk kita banggakan karena kita tidak lebih dari calon mayat. Lantas apakah pantas kita hingga saat ini selalu membanggakan kekayaan dunia kita, sedangkan kain kafan kita sudah ditenun? Ingat kita yang hidup di Dunia ini tidak lebih dari calon mayat (Wicaksana).
6. Bukan karena ada hal yang sulit kita jadi tidak berani. Justru karena kita tidak beranilah hal itu jadi sulit (Seneca).

KATA PENGANTAR

Asslamualaikum Wr.Wb

Alhamdulillahirobbilalamin, Puji Syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan ramat dan hidayahnya selama melaksanakan Tugas Akhir sehingga dapat terselesaikan. Tidak lupa shalawat serta salam tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para pengikutnya, sehingga dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Isolasi senyawa aktif fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dan uji aktivitas antikanker payudara dalam formula sediaan nanopartikel *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) terhadap sel T47D dan MCF-7” ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Program Studi Kimia di Universitas Islam Indonesia dengan baik.

Selama menulis Tugas Akhir, penulis telah banyak mendapat bimbingan serta bantuan dari berbagai pihak, baik itu berupa saran, kritik, motivasi, bimbingan serta bantuan lainnya. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis bermaksud menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Kedua Orang tua, ayahanda tercinta Suwarna dan Ibunda tersayang Sulistriningsih yang telah memberikan dukungan moril maupun materil kepada penulis dalam hal apapun untuk menjadi yang terbaik serta doa yang tiada henti-hentinya kepada penulis.
2. Bapak Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta beserta seluruh jajarannya.
3. Bapak Dr. Dwiwarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia beserta seluruh jajarannya.

4. Bapak Nurcahyo Iman Prakoso, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing 1 dan ibu Amri Setyawati, S.Si., M.Sc. selaku pembimbing 2 penulis yang sangat berjasa atas ilmu, saran, kritik, memberi motivasi dan bimbingan bagi penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini sehingga dapat selesai dengan baik.
5. Dosen-dosen Kimia Universitas Islam Indonesia yang telah mendidik dan memberikan ilmunya kepada penulis serta selalu menginspirasi.
6. Keluarga Bimbingan : Amalia, Eldiva, Andri, Ilham, Hermawan, dan Choerul yang selalu memberikan bantuan, kritik, saran, motivasi dan do'a dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini.
7. Teman-teman Kimia UII angkatan 2016 yang selalu saling mendo'akan dan memotivasi selama masa perkuliahan selama 4 tahun ini.
8. Sahabat-sahabatku : Reliska, Amalia, Eldiva, Kania, Farhan, Nanda, Novi dan Frida yang menjadi tempat beristirahat dikala lelah, bermain ketika malas, beribadah ketika waktunya tiba, jalan-jalan ketika gabut melanda dan masih banyak hal baik yang dilakukan bersama.
9. Gregy Addis Shafila, yang telah menemani dan membantu memberikan semangat setiap harinya dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu segala kritik dan saran yang bersifat membangun selalu penulis harapkan. Semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi semua yang membutuhkan. Akhir kata, semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat serta hidayahnya kepada kita semua, Aamiin ya rabbal'alamin.

Wassalamu'alaikum. Wr.Wb

Yogyakarta, 10 juni 2020

Elfara Rahmadhika Suwarna

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	ivv
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI	xivi
ABSTRAC	xvv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat	5
BAB II	6
2.1 Rangkaian penelitian terdahulu	6
2.1.1 Kanker dan pengobatannya.....	6
2.1.2 Pengembangan daun jambu biji (<i>Psidium guajava L.</i>) sebagai obat.....	7
2.1.3 Pengembangan SNEDDS sebagai penghantar obat.....	10
2.1.4 Uji Aktivitas Antikanker secara <i>In Vitro</i> terhadap sel T47D dan MCF-7	11
3.1 Tanaman Jambu Biji (<i>Psidium guajava. L.</i>).....	13
3.1.1 Kandungan Kimia	14
3.1.2 Kegunaan tanaman jambu biji	17
3.1.3 Kegunaan tanaman jambu biji	18
3.2 Maserasi dengan Etanol 96%	18

3.3	Fraksinasi.....	19
3.4	Penapisan Fitokimia	20
3.5	Kanker Payudara.....	21
3.6	Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS).....	21
3.7	Sel T47D.....	24
3.8	Sel MCF-7	25
3.9	Sel Normal Vero.....	25
3.10	Kultur Sel.....	26
3.11	Uji Sitotoksisitas.....	26
3.12	Metode MTT assay.....	27
3.13	Elisa Reader	28
3.14	PSA (Particle Size Analyzer)	29
3.15	Zeta Potensial	30
3.16	Transmission Electron Microscopy (TEM).....	32
3.17	Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LCMS/MS).....	34
3.18	Hipotesis	36
BAB IV	37
4.1	Waktu dan Tempat.....	37
4.2	Alat dan Bahan	37
4.2.1	Alat.....	37
4.2.2	Bahan kimia	37
4.3	Cara Kerja.....	38
4.3.1	Preparasi Sampel Daun Jambu Biji (<i>Psidium guajava</i> L.)	38
4.3.2	Ekstraksi dengan Metode Meserasi	38
4.3.3	Fraksinasi.....	38
4.3.4	Penapisan fitokimia.....	39
4.3.5	Pembuatan SNEDDS	40
4.3.6	Uji PSA	40
4.3.7	Uji aktivitas antikanker secara in vitro (CCRC, 2009).....	40
4.3.8	Karakterisasi TEM.....	44

BAB V	45
5.1 Determinasi Tanaman.....	45
5.2 Persiapan Sampel.....	45
5.3 Ekstraksi Daun Jambu Biji	45
5.4 Fraksinasi.....	47
5.5 Penapisan Fitokimia	48
5.5.1 Analisis hasil penapisan fitokimia.....	49
5.5.2 Uji Alkaloid	49
5.5.3 Uji Terpenoid.....	49
5.5.4 Uji Fenolik/Polifenol	51
5.5.5 Uji Flavonoid.....	51
5.6 Karakterisasi SNEDDS.....	52
5.7 Karakterisasi PSA.....	53
5.8 Karakterisasi TEM.....	57
5.9 Uji Aktivitas Antikanker secara In Vitro dengan Metode MTT	58
5.9.1 Hasil pengujian aktivitas antikanker fraksi <i>n</i> -heksana daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.) terhadap sel T47D dan MCF-7.....	65
5.10 Analisis Kandungan Senyawa Terbesar dalam Fraksi Aktif <i>n</i> -Heksana Menggunakan LC-MS/MS	69
BAB VI	82
6.1 Kesimpulan.....	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN	91

DAFTAR TABEL

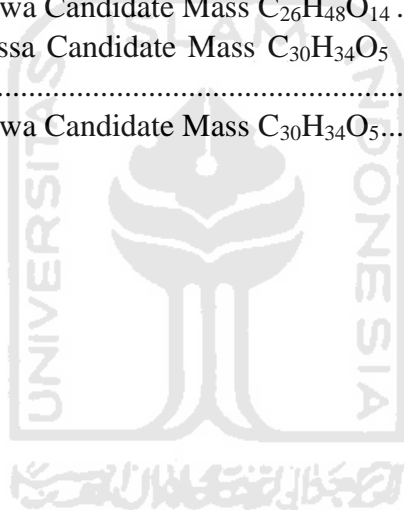
Tabel 1. Variabel pembuatan SNEDDS	40
Tabel 2. Hasil maserasi dari serbuk daun jambu biji.....	47
Tabel 3. Hasil fraksinasi N-heksana daun jambu biji (Psidium guajava L.)	47
Tabel 4. Hasil penapisan fitokimia fraksi daun jambu biji.....	48
Tabel 5. Formulasi SNEDDS	52
Tabel 6. Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji dengan PSA	57
Tabel 7. Nilai IC ₅₀ uji aktivitas antikanker	64
Tabel 8. Nilai SI (selectivity indeks) hasil uji sitotoksitas	66
Tabel 9. Tabel hubungan konsentrasi, ukuran partikel dan nilai IC ₅₀ terhadap sel T47D, MCF-7 dan Vero	73
Tabel 10. Hasil analisis LC-MS/MS dengan sumber pengionan positif	73



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur kimia kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi n-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Psidium guajava</i> L.).....	9
Gambar 2. Daun Jambu Biji	13
Gambar 3. Struktur kimia senyawa golongan tanin dari daun jambu biji	15
Gambar 4. Struktur kimia senyawa golongan flavonoid dari daun jambu biji.....	16
Gambar 5. Struktur kimia senyawa golongan terpenoid dari daun jambu biji	17
Gambar 6. Morfologi sel T47D	24
Gambar 7. Morfologi sel MCF-7	25
Gambar 8. Prinsip Dasar Elisa Reader 1	28
Gambar 9. Schematic Dynamic light scattering menggunakan metode dinamik	30
Gambar 10. Reaksi uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff.....	49
Gambar 11. Reaksi pada uji terpenoid dengan pereaksi Liebermann Burchard	50
Gambar 12. Reaksi uji fenolik.....	51
Gambar 13. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat	52
Gambar 14. Morfologi Nanoemulsi Ekstrak Daun Jambu Biji	57
Gambar 15. Morfologi sel T47D setelah ditreatment pada sampel konsentrasi 80% (a) sel T47D konsentrasi 1000 µg/mL (b) sel T47D konsentrasi 250 µg/mL (c) sel T47D konsentrasi 15,625 µg/mL.....	61
Gambar 16. Morfologi sel MCF-7 setelah ditreatment pada sampel konsentrasi 80% (a) sel T47D konsentrasi 1000 µg/mL (b) sel T47D konsentrasi 250 µg/mL (c) sel T47D konsentrasi 15,625 µg/mL.	61
Gambar 17. Morfologi sel T47D setelah pewarnaan pada sampel konsentrasi 80% (a) sel T47D konsentrasi 1000 µg/mL (b) sel T47D konsentrasi 250 µg/mL (c) sel T47D konsentrasi 15,625 µg/mL.	62
Gambar 18. Morfologi sel MCF-7 setelah pewarnaan pada sampel konsentrasi 80% (a) sel T47D konsentrasi 1000 µg/mL (b) sel T47D konsentrasi 250 µg/mL (c) sel T47D konsentrasi 15,625 µg/mL.	63
Gambar 19. Morfologi sel MCF-7 setelah ditreatment pada sampel konsentrasi 80% (a) sel Vero konsentrasi 1000 µg/mL (b) sel Vero konsentrasi 250 µg/mL (c) sel Vero konsentrasi 15,625 µg/mL.....	68
Gambar 20. Morfologi sel Vero setelah pewarnaan pada sampel konsentrasi 80% (a) sel Vero konsentrasi 1000 µg/mL (b) sel Vero konsentrasi 250 µg/mL (c) sel Vero konsentrasi 15,625 µg/mL.....	68
Gambar 21. Kromatogram senyawa yang teridentifikasi oleh LC-MS/MS, (A) waktu retensi 8,86 (B) 10,46 (C) 11,23 (D) 9,18(E) 10,72 (F) 9,38.....	72

Gambar 22. Spektrum massa 3-Tert-butyl-4-methoxyphenol (A) low energy, (B) high energy.....	74
Gambar 23. Struktur senyawa 3-Tert-butyl-4-methoxyphenol	75
Gambar 24. Spektrum massa hyptatic acid (A) low energy, (B) high energy.....	75
Gambar 25. Struktur senyawa hyptatic acid.....	76
Gambar 26. Spektrum massa Petasitolone (A) low energy, (B) high energy	76
Gambar 27. Struktur senyawa petasitolone	77
Gambar 28. Spektrum massa Stigmastan-3,6-dione (A) low energy, (B) high energy	77
Gambar 29. Struktur senyawa Stigmastan-3,6-dione	78
Gambar 30. Spektrum massa Candidate Mass C ₂₆ H ₄₈ O ₁₄ (A) low energy, (B) high energy.....	78
Gambar 31. Struktur senyawa Candidate Mass C ₂₆ H ₄₈ O ₁₄	79
Gambar 32. Spektrum massa Candidate Mass C ₃₀ H ₃₄ O ₅ (A) low energy, (B) high energy.....	80
Gambar 33. Struktur senyawa Candidate Mass C ₃₀ H ₃₄ O ₅	81



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman Jambu Biji	91
Lampiran 2. Hasil Uji Penapisan Fitokimia	92
Lampiran 3. Hasil Uji PSA (Particle size analyzer)	94
Lampiran 4. Perhitungan Data-Data Penelitian	110
Lampiran 5. Data Perhitungan rendemen ekstrak kasar dan fraksi daun jambu biji	123
Lampiran 6. Perhitungan nilai IC50 tiap fraksi terhadap sel kaker T47D	123
Lampiran 7. Alat dan bahan pada uji sitotoksitas fraksi daun jambu biji	129



**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER PAYUDARA MENGGUNAKAN
FRAKSI N-HEKSANA DARI EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU
BIJI (*Psidium guajava L.*) DALAM FORMULA SEDIAAN
NANOPARTIKEL *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System*
(SNEDDS) TERHADAP SEL T47D DAN MCF-7**

ELFARA RAHMADHIKA SUWARNA
NIM 16612054

INTISARI

Kanker payudara merupakan penyakit yang kompleks dan heterogen. Penyakit ini akan terus berkembang dan diperkirakan dalam 20 tahun ke depan insidensinya meningkat. Penelitian daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) terbukti memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan MCF-7 sebagai agen antikanker. Kemudian dipenelitian ini dikembangkan sebagai obat antikanker yang diubah dalam bentuk nanopartikel. Proses ekstraksi daun jambu biji dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Kemudian dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan pelarut *n*-heksana. Ekstrak yang didapat dari analisis LCMS/MS didapat senyawa dalam fraksi adalah senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{14}$, senyawa kandidat $C_{30}H_{34}O_5$, asam hiptatik, petasitolon, 3-Tert-butyl-4-metoksifenol, dan Stigmastan-3,6-dion. Nanopartikel dibuat dengan metode *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dibuat formulasi dengan perbandingan minyak:surfaktan:ko-surfaktan (30:50:20) yang digabungkan dengan fraksi *n*-heksana 40%, 60%, dan 80%. Ukuran partikel, indeks polidispers, dan zeta potensial didapat dengan analisis menggunakan PSA secara berturut-turut adalah 140 nm, 0,387, -69,3 mV; 136,06 nm, 0,394, -72,16 mV; 133,2 nm, 0,379, -84,86 mV. Formulasi konsentrasi 80% memiliki ukuran terkecil dan kestabilan yang baik. Dilanjutkan uji sitotoksik secara *in vitro* menggunakan metode MTT assay dan diperoleh nilai IC_{50} pada formulasi konsentrasi 40%, 60% dan 80% terhadap sel T47D secara berturut sebesar 109,647; 107,151 dan 95,499, terhadap sel MCF-7 82,794; 81,283 dan 75,85. Dan nilai SI (*Selectivity Index*) terhadap sel T47D secara berturut sebesar 2,39; 2,78 dan 3,36, terhadap sel MCF-7 3,176; 3,66 dan 4,23. Hasil tersebut menunjukkan semua formulasi memiliki sitotoksitas yang kuat dan lemah. *Selectivity index* (SI) yang disyaratkan adalah >3 menandakan bahwa sampel mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal.

Kata kunci : fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*), *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS), sitotoksitas, sel T47D, sel MCF-7 dan sel Vero

BREAST ANTICANKER ACTIVITY TEST USING N-HEKSANA FRACTION FROM ETHANOL EXTRACT ON SEED LEAVES (*Psidium guajava L.*) IN FORMULA OF NANOPARTICLE AVAILABILITY FOR *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) ON T47D AND MC-7 CELLULAR LEAVES.

ELFARA RAHMADHIKA SUWARNA
NIM 16612054

ABSTRAC

Breast cancer is a complex and heterogeneous disease. This disease will continue to grow and it is estimated that in the next 20 years the incidence is increasing. Research on guava leaves (*Psidium guajava L.*) has been shown to have cytotoxic activity against T47D and MCF-7 cells as anticancer agents. Then this research was developed as an anticancer drug that is converted in the form of nanoparticles. Guava leaf extraction process with maceration method using 96% ethanol solvent. Then fractionation was done by column chromatography using n-hexane solvent. Extracts obtained from LCMS/MS analysis obtained compounds in the fraction were candidate compounds $C_{26}H_{48}O_{14}$, candidate compounds $C_{30}H_{34}O_5$, hiptatic acid, petasitolon, 3-Tert-butyl-4-methoxyphenol, and Stigmastan-3,6-dione. Nanoparticles were made using the *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) formulation with an oil: surfactant: co-surfactant (30:50:20) ratio combined with 40%, 60%, and 80% n-hexane fractions. The particle size, polydispers index, and zeta potential obtained by analysis using PSA were 140 nm, 0.387, -69.3 mV, respectively; 136.06 nm, 0.394, -72.16 mV; 133.2 nm, 0.379, -84.86 mV. The 80% concentration formulation has the smallest size and good stability. In vitro cytotoxic testing was continued using the MTT assay method and IC50 values were obtained at 40%, 60% and 80% concentration formulations on T47D cells respectively 109,647; 107,151 and 95,499, against MCF-7 cells 82,794; 81,283 and 75.85. And SI (Selectivity Index) values for T47D cells were 2.39, 2.78 and 3.36, against MCF-7 cells were 3.176, 3.66 and 4.23. These results indicate that all formulations have strong and weak cytotoxicity. The required selectivity index (SI) is > 3 indicating that the sample has cytotoxic activity against cancer cells without affecting normal cells.

Keywords: n-hexane fraction of guava leaves (*Psidium guajava L.*) ethanol extract, *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS), cytotoxicity, T47D cells, MCF-7 cells and Vero cells

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang terjadi karena sel abnormal mengalami mutasi genetik dari DNA seluler. Sel abnormal membentuk klon dan berproliferasi secara abnormal yang mengatur pertumbuhan lingkungan sekitar sel tersebut (Brunner dan Suddarth, 2002). 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).

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). Menurut data WHO tahun 2013, insiden kanker meningkat dari 12,7 juta kasus tahun 2008 menjadi 14,1 juta kasus tahun 2012, dengan jumlah kematian meningkat dari 7,6 juta orang tahun 2008 menjadi 8,2 juta pada tahun 2012 (WHO, 2016).

Penyebab spesifik kanker payudara masih belum diketahui, tetapi banyak faktor yang diperkirakan. Salah satu faktornya yaitu mempunyai pengaruh terhadap terjadinya kanker payudara diantaranya faktor umur, usia saat menstruasi pertama, penyakit fibrokistik, riwayat kanker payudara, radiasi, penggunaan hormon estrogen dan progestin, gaya hidup tidak sehat (konsumsi rokok, narkoba, makan-makanan instan, dan alkohol) (Mulyani dan Rinawati, 2013).

Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker adalah daun jambu biji. Daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) sebagai bahan alam yang banyak tumbuh di wilayah tropis termasuk Indonesia. Ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) mengandung tanin, polifenolat, flavonoid, monoterpenoid, siskuitерpen, alkaloid, kuinon dan saponin. Komponen utama dari daun jambu biji adalah tanin yang besarnya mencapai 9-12% (Wahyuni, 2014).

Telah dilakukan uji aktivitas antikanker fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium Guajava l.*) secara *In Vitro* oleh Nita (2019). Pada penelitian tersebut, nilai IC₅₀ yang diperoleh untuk sel T47D yaitu 6,95 µg/mL dan MCF-7 4,38 µg/mL. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) memiliki potensi sebagai antikanker. Kemudian dipenelitian ini akan dikembangkan sebagai obat antikanker yang diubah dalam bentuk nanopartikel dalam formula sediaan *self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS). Bagian-bagian jambu biji seperti daun, buah, dan bahkan kulit memiliki potensi penggunaan sebagai agen terapi terhadap kanker (Sato dkk., 2016). Daun jambu biji juga memiliki khasiat seperti antibakteri, antioksidan, antikanker, antiulkus atau antimaag (Porwal dkk., 2012).

Dalam penelitian sebelumnya, fraksi-fraksi dari ekstrak daun jambu biji dievaluasi kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan sel kanker paru-paru manusia (A549), payudara (MCF-7), hati (HepG2) dan usus (HT-29) dengan metode MTT assay. Kandungan senyawa bioaktif daun jambu biji yang diketahui aktif sebagai antikanker adalah katekin, galangin, asam homogentisat, asam galat, kaempferol dan sianidin 3-glukosida (Chen dkk., 2015).

Pada penelitian ini dibuat formula sistem nanoemulsi fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) sebagai bahan aktif. Dibuat variasi untuk mendapatkan konsentrasi yang tepat dalam menghasilkan produk sistem nanoemulsi yang berkualitas baik. Nanoemulsi merupakan pembawa yang potensial untuk penghantaran obat, pangan maupun kosmetik, untuk mengoptimalkan dispersi bahan aktif dan cocok untuk penghantaran senyawa lipofilik serta meningkatkan

permeasi dari bahan aktif. Nanoemulsi terdiri atas fase air dan minyak yang distabilkan oleh kombinasi antara surfaktan dan kosurfaktan dengan rata-rata droplet berukuran < 100 nm (Fulekar, 2010). Nanoemulsi dapat digunakan sebagai pembawa obat melalui berbagai macam rute pemberian antara lain secara topikal. Nanoemulsi dapat meningkatkan penghantaran obat secara transdermal dibandingkan bentuk sediaan secara topikal seperti krim, lotion, dan gel. (Baskar dkk,2010).

Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas untuk mengetahui efektivitas dari fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) dalam sediaan nanoemulsi sebagai agen antikanker terhadap sel kanker payudara T47D serta pada sel MCF7. Penggunaan fraksi *n*-heksana didasarkan dari hasil penelitian Nita (2019) dimana fraksinasi yang paling baik menggunakan pelarut organik *n*-heksana karena didapat hasil IC_{50} yang paling kecil di antara pelarut organik lainnya seperti etil asetat dan etanol. IC_{50} yang diperoleh untuk sel T47D didapat $6,95 \mu\text{g/mL}$ dan sel MCF-7 $4,38 \mu\text{g/mL}$. Suatu ekstrak dikatakan aktif sebagai antikanker jika memiliki nilai $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ (Kamuhabwa, 2000). Namun bukan berarti ekstrak tumbuhan yang memiliki $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ tidak berpotensi sebagai antikanker karena jika nilai $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ yang kurang aktif diduga karena ekstrak yang menggunakan pelarut yang mampu menarik zat bersifat polar dan juga nonpolar kemungkinan menghasilkan efek antagonis atau sinergis.

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

Aktivitas dari nanoemulsi fraksi *n*-heksana ekstrak daun jambu biji terhadap sel T47D dan sel MCF-7, kemudian diketahui efektivitasnya dari masing-masing sel.

Selanjutnya pada tahap akhir dilakukan uji LC-MS/MS terhadap fraksi yang aktif untuk mengetahui kandungan senyawa utama yang berperan dalam penghambatan sel kanker tersebut dan dilakukan uji TEM (*Transmission Electron Microscope*) yang merupakan golongan mikroskop elektron yang menggunakan elektron sebagai pengganti cahaya. Teknik analisis ini digunakan untuk mempelajari morfologi, struktur, dan berbagai macam bentuk termasuk butiran, fasa, fasa terlekat, partikel terlekat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dari uraian diatas, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut:

7. Bagaimana aktivitas dari nanoemulsi fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang dinanoemulsi terhadap sel MCF-7 dan sel T47D (kanker payudara) sebagai antikanker?
8. Senyawa apakah yang terkandung dalam fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)?
9. Bagaimana karakteristik SNEDDS formula optimum fraksi *n*-heksana dari ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan fase minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan dimana meliputi ukuran partikel, waktu emulsifikasi, distribusi ukuran partikel, zeta potensial?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menguji aktivitas dari fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang dinanoemulsi terhadap sel MCF-7 dan sel T47D (kanker payudara).

2. Mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.).
3. Melakukan karakterisasi formula optimum SNEDDS fraksi *n*-heksana dari ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dengan fase minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan dimana meliputi ukuran partikel, waktu emulsifikasi, distribusi ukuran partikel, dan zeta potensial.

1.4 Manfaat

1. Memberikan informasi mengenai aktivitas dan efektivitas nanoemulsi fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel kanker.
2. Penelitian ini akan memberikan informasi mengenai proses uji aktivitas dan efektivitas senyawa antikanker melalui uji *in vitro* yang diperoleh dari fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) 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 Rangkaian penelitian terdahulu

2.1.1 Kanker dan pengobatannya

Kanker adalah pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal, berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan akan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan sekitar dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah, dan menyerang organ-organ penting serta syaraf tulang belakang. Sel-sel yang berkembang ini akan menumpuk, mendesak dan merusak jaringan dan organ yang ditempati. Penumpukan sel baru inilah yang disebut tumor ganas (Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, 2015).

Kanker payudara adalah suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan berlebihan atau perkembangan tidak terkontrol dari sel-sel (jaringan) payudara yang tumbuh dan berkembang tanpa terkendali sehingga dapat menyebar di antara jaringan atau organ di dekat payudara atau ke bagian tubuh lainnya (Kementerian Kesehatan RI, 2016). Kanker payudara/Breast Cancer (BC) merupakan kanker yang menyebabkan angka mortalitas tertinggi pada wanita di antara kanker yang lain. Pada tahun 2020 penderita kanker payudara diperkirakan akan meningkat empat kali lipat dibandingkan 2012 yang berjumlah 1,7 juta. Insidensi penderita kanker payudara adalah 20% dari seluruh keganasan (American Cancer Society, 2011). Sampai saat ini penyebab pasti kanker payudara belum diketahui namun data epidemiologi mengisyaratkan bahwa faktor genetik, endokrin dan lingkungan mungkin sangat berperan inisiasi dan promosi pertumbuhan kanker payudara (Brunner dan Suddarth, 2003).

Pengobatan kanker yang multimodalitas yaitu dengan operasi, radiasi dan kemoterapi, ataupun kombinasi dari ketiga hal tersebut. Pemilihan terapi dipengaruhi oleh berbagai faktor yang diharapkan tidak memperburuk penyakit dan kondisi pasien

(Sutrisno dkk, 2010). Strategi terapi yang tersedia untuk mengobati kanker payudara, termasuk agen sitotoksik (kemoterapi) telah cukup banyak, namun sampai saat ini belum ada pengobatan yang tepat untuk kanker payudara yang telah metastasis. Meskipun demikian ternyata penggunaan agen kemoterapi sistemik bukan saja tidak begitu efektif namun juga tidak selektif dan sangat toksik bagi jaringan lain yang normal (Wattanapitayakulm dkk., 2005).

2.1.2 Pengembangan daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) sebagai obat

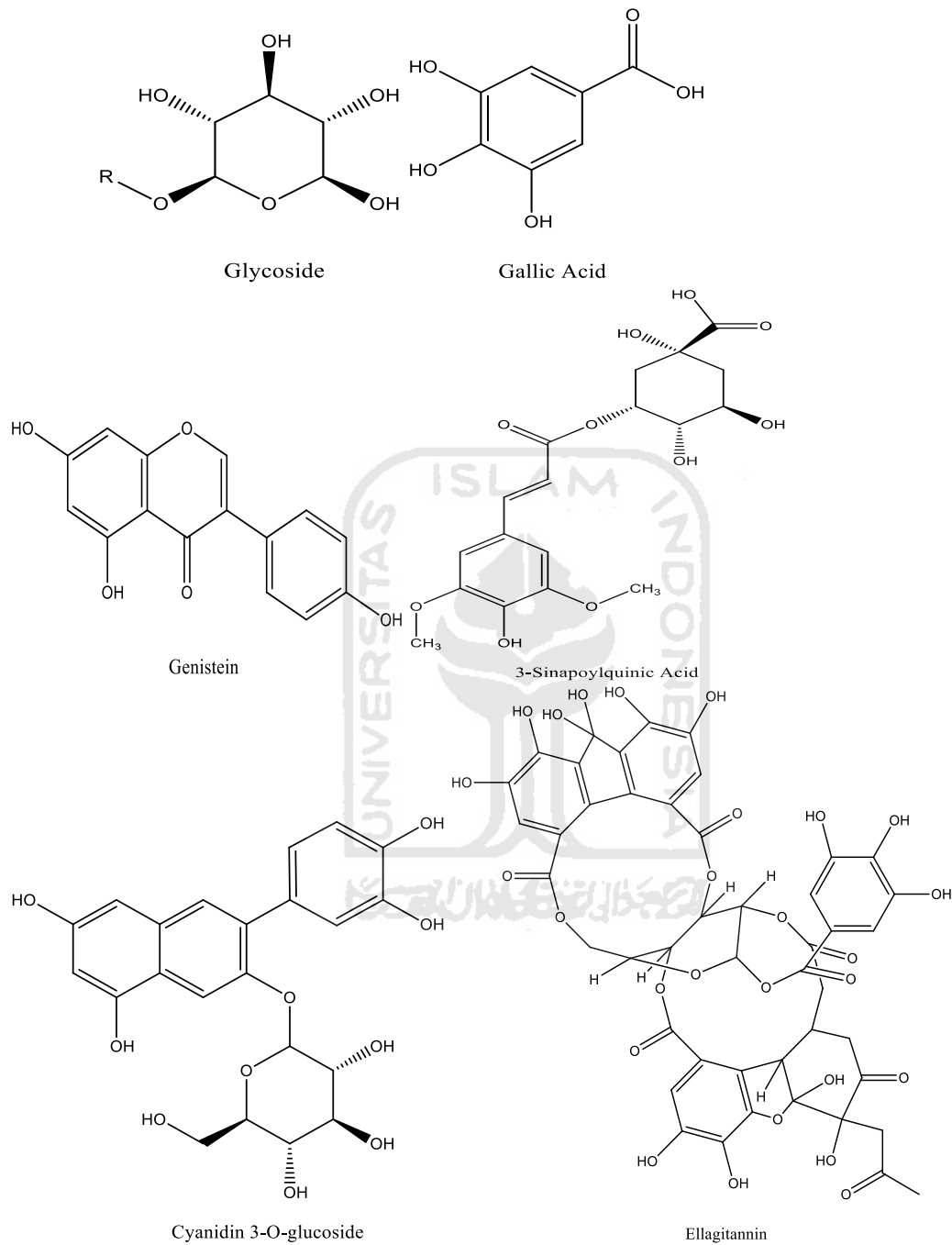
Tanaman jambu biji (*Psidium guajava L.*) merupakan tanaman asli dari Amerika tropis, menurut de Candolle diperkirakan berasal dari wilayah antara Meksiko (Amerika Tengah) dan Peru (Amerika Selatan) (Soetopo, 1992). Senyawa kimia yang terkandung di dalam buah jambu salah satunya adalah kuersetin yang merupakan senyawa golongan flavonoid jenis flavonol dan flavon, yang berkhasiat untuk mengobati kerapuhan pembuluh kapiler pada manusia (Yuliani dkk. 2003). Salah satu senyawa aktif yang terkandung pada jambu biji yaitu tanin. Departemen Kesehatan pada tahun 1989 menyatakan bahwa bagian tanaman yang sering digunakan sebagai obat adalah daunnya, karena daunnya diketahui mengandung senyawa tanin 9-12%, minyak atsiri, minyak lemak dan asam malat (Yuliani dkk. 2003).

Tumbuhan jambu biji (*Psidium guajava L.*) merupakan salah satu contoh tanaman yang banyak dimanfaatkan secara tradisional sebagai obat alternatif terhadap penyakit tertentu seperti diare, penyakit kulit dan luka (Kamanth dkk., 2008). Sampai saat ini sudah banyak penelitian yang dilakukan untuk menguji aktivitas daun jambu biji sebagai antioksidan (Kuber dkk.,2013), antidiabetes (Mukhtar dkk.,2006), antimikroba (Goncalveset dkk., 2008), antiradang (Ojowole, 2006) dan antikanker (Joseph dan Priya, 2010). Namun penelitian aktivitas daun jambu sebagai obat antikanker sendiri masih sangat terbatas. Berdasarkan Sato, dkk (2010), hanya ada tujuh penelitian yang berhubungan dengan pengujian aktivitas antikanker dari jambu biji menggunakan kultur sel. Adapun sel kanker yang digunakan untuk uji aktivitas

antikanker dari jambu biji ini antara lain adalah sel kanker prostat (Ryu dkk., 2012), kanker usus (Lee dan Park 2010), kanker serviks (Joseph dan Priya. 2010), kanker lambung (Manthey, dkk.,2001), kanker mulut dan kanker sel darah (Manosroii,dkk., 2006). Hasil dari pengujian aktivitas antikanker dari daun jambu biji ini menunjukkan bahwa daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) sangat berpotensi sebagai obat antikanker karena dapat mencegah ataupun menghambat pertumbuhan sel kanker (Rishika & Sharma 2012). Pengobatan penyakit kanker dengan menggunakan tanaman herbal seperti daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) lebih menjanjikan dan tidak memberikan efek samping dibandingkan dengan cara lain seperti kemoterapi atau radiasi (Itharat dan Ooraikul 2007).

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Nita (2019) yaitu aktivitas ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) untuk mengetahui fraksi yang aktif dan senyawa yang terkandung dalam daun jambu biji yang berperan sebagai agen antikanker. Fraksi yang paling baik menggunakan pelarut organik *n*-heksana karena didapat hasil IC₅₀ yang paling kecil di antara pelarut organik lainnya seperti etil asetat dan etanol. Hasil IC₅₀ yang diperoleh dari fraksi *n*-heksana untuk sel T47D adalah 6,95 µg/mL dan sel MCF-7 4,38 µg/mL. Telah dilakukan uji aktivitas terhadap sel T47D (*continuous cell line*) dari ekstrak etanol daun jambu biji secara *in vitro* oleh Dwitiyanti (2015), nilai LC₅₀ yang diperoleh dari ekstrak etanol 70% daun jambu biji tersebut adalah sebesar 27,54 µg/mL.

Didapat kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi *n*-heksana dalam penelitian Nita (2019) yang dianalisis menggunakan LCMS/MS diantaranya adalah *ellagitanins*, *genistein*, isomer dari asam *trihydroxycinnamoylquinic*, 3-asam *sinapoylquinici*, *galiic acid*, *glycoside*, dan *cyaniding-3-O-glucoside* dengan struktur kimia yang ditunjukkan pada Gambar 1. Informasi tersebut menjadi dasar penelitian untuk mengetahui aktivitas antikanker serta efektivitas nanoemulsi fraksi *n*-heksana dari ekstrak daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) terhadap dua jenis sel kanker yaitu sel kanker payudara MCF-7 serta sel T47D.



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

2.1.3 Pengembangan SNEDDS sebagai penghantar obat

Nanopartikel merupakan suatu teknik penyalutan bahan yang ukurannya sangat kecil, dengan diameter rata-rata 10-1000 nm (Mohanraj dan Chen 2006). Keuntungan penggunaan nanopartikel sebagai sistem pengantaran terkendali obat ialah ukuran dan karakteristik permukaan nanopartikel mudah dimanipulasi untuk mencapai target pengobatan. Nanopartikel juga mengatur dan memperpanjang pelepasan obat selama proses transpor ke sasaran, dan obat dapat dimasukkan ke dalam sistem peredaran darah dan dibawa oleh darah menuju target pengobatan (Mohanraj dan Chen 2006). Semakin kecil ukuran partikel, maka semakin besar luas permukaan obat yang didapatkan. Hal ini akan meningkatkan penyerapan obat oleh nanopartikel ke dalam sistem pencernaan manusia, sehingga aktivitas obat lebih optimal dan efisien. Selain itu, pengecilan ukuran partikel dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kelarutan dan peningkatan tersebut dapat meningkatkan bioavailabilitas dan efikasinya. (Rawat dkk., 2006).

Pengembangan terkini sistem nanoemulsi untuk aplikasi oral melalui saluran gastrointestinal adalah teknologi auto-emulsifikasi (*Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDs)*) (Wadhwa dkk., 2011). SNEDDS (*Self-nanoemulsifying drug delivery system*) telah muncul sebagai sistem penghantaran obat yang efektif karena terbukti memiliki kemampuan meningkatkan bioavailabilitas obat lipofilik (Singh dkk., 2014). Konsep dari teknologi ini adalah sistem penghantaran obat yang mengandung campuran isotropik minyak, surfaktan, ko-surfaktan, dan obat yang membentuk nanoemulsi secara spontan (*self-emulsifying*) saat dimasukkan ke dalam fase air dengan agitasi yang ringan dengan ukuran tetesan kurang dari 100 nm (Soni dkk., 2014). SNEDDS (*Self-nanoemulsifying drug delivery system*) menghasilkan nanoemulsi minyak dalam air (o/w) secara spontan ketika bertemu dengan cairan lambung dengan ukuran tetesan <300 nm (Shanmugam dkk., 2011). Ukuran nanoemulsi yang sangat kecil memungkinkan obat dapat melewati membran sepanjang GIT dengan cepat dan meminimalisir iritasi akibat adanya kontak antara kristal obat dengan dinding GIT (Makadia dkk., 2013)

SNEDDS (*Self-nanoemulsifying drug delivery system*) sebagai sistem penghantaran obat yang efektif memiliki kemampuan meningkatkan kelarutan obat yang tidak larut air sehingga dapat membantu absorpsi obat pada saluran cerna (Han dkk., 2011). Memberikan wilayah antarmuka yang lebih besar untuk penyerapan obat, stabilitas enzimatik, menghambat P-glikoprotein (p-gp) dimediasi oleh obat efluks, serta meningkatkan transportasi limfatik (Date dkk., 2010; Seo dkk., 2013). Selain meningkatkan kelarutan dan disolusi, sistem teknologi ini dapat meningkatkan ketersediaan hayati obat di dalam plasma darah (Gupta dkk., 2011).

Telah banyak peneliti yang melakukan penelitian menggunakan teknologi ini yaitu SNEDDS sebagai penghantaran obat, diantaranya pembuatan sediaan nanopartikel ekstrak kulit kopi (*Coffea arabica L.*) dalam bentuk *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) sebagai antibakteri *Klebsiella pneumonia* (Wicaksana, 2018), karakterisasi *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) minyak buah merah (*Pandanus conoideus Lam.*) (Huda dan Wahyuningsih, 2016) dan optimasi formula *Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) dari ekstrak kloroform daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) dengan *virgin coconut oil* sebagai minyak pembawa (Nazila, 2016).

2.1.4 Uji Aktivitas Antikanker secara *In Vitro* terhadap sel T47D dan MCF-7

Salah satu usaha menemukan antikanker baru adalah melalui penelitian terhadap tanaman obat yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk mengobati atau menghambat sel kanker (Raharjo dkk., 2014). Sampai saat ini uji antikanker yang banyak dilakukan adalah menggunakan mencit yang relatif lama dan keberhasilannya rendah. Sekarang ini telah ada teknik kultur *in vitro*, yaitu teknik untuk mengisolasi secara aseptik dalam tabung dan ditumbuhkan dalam media buatan. Sel kultur (*cell line*) adalah sel yang dapat berproliferasi pada media kultur secara *in vitro*. Sel kultur dapat diambil dari jaringan asal ataupun memperbanyak sel yang sudah ada.

Sel yang digunakan dalam uji aktivitas ini menggunakan sel MCF-7 dan sel T47D karena tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas nanoemulsi fraksi *n*-heksana dari ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) sebagai agen antikanker. Sel T47D yang digunakan merupakan *continuous cell line*, ini sering digunakan dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah pemeliharaannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas dan cepat. Hal ini terjadi karena adanya mutasi enzim telomerase yang mengakibatkan pembelahan tiada henti serta mudah disimpan dan diganti dengan *frozen stock* (CCRC, 2009). Sel MCF-7 diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik metastasis *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang wanita berusia 69 tahun dengan etnis kaukasian bergolongan darah O dengan Rh⁺ (CCRC, 2009).

Uji sitotoksik adalah kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik yang dilakukan secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antikanker suatu senyawa atau bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker. Informasi yang didapat secara *in vitro* dapat menggambarkan efek *in vivo* dari obat sitotoksik yang sama. Metode MTT assay merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk uji sitotoksik. Metode ini mengukur proliferasi sel secara kolorimetrik dan telah diadopsi sebagai alat tes kolorimetri cepat untuk kelangsungan hidup sel (MTT assay) dan dapat mengidentifikasi selektifitas senyawa uji berdasarkan respon sitotoksik dan resistensi pada berbagai jenis sel kanker (Chabner dan Jr, 2005).

Uji sitotoksik dapat menggunakan parameter perhitungan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC₅₀ dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin kecil harga IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin toksik terhadap sel kanker (Melannisa, 2004). Suatu ekstrak dikatakan aktif sebagai antikanker jika memiliki nilai IC₅₀ ≤ 100 µg/mL (Kamuhabwa, 2000).

BAB III

LANDASAN TEORI

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

Berikut ini adalah klasifikasi dari tanaman jambu biji:

Kingdom : plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Classis : Dicotyledoneae

Familia : Myrthaceae

Genus : Psidium

Species : *Psidium guajava* Linn (Parimin, 2005).



Gambar 2. Daun Jambu Biji

Tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.) dapat dilihat pada Gambar 2. Tanaman ini pertama kali ditemukan di Amerika Tengah oleh Nikolai Ivanovich Vavilov saat melakukan ekspedisi ke beberapa negara di Asia, Afrika, Eropa, Amerika Selatan, dan Uni Soviet antara tahun 1887-1942. Seiring dengan berjalannya waktu, jambu biji menyebar di beberapa negara seperti Thailand, Taiwan, Indonesia, Jepang, Malaysia, dan Australia. Di Thailand dan Taiwan, jambu biji menjadi tanaman yang dikomersialkan (Parimin, 2005). Jambu biji (*Psidium*

guajava L.) merupakan tumbuhan perdu dengan tinggi 5-10 m, batang berkayu, kulit batang licin, mengelupas, bercabang, dan berwarna coklat. Merupakan daun tunggal, berbentuk bulat telur, ujung tumpul, pangkal membulat, tepi rata berhadapan, petulangan daun menyirip berwarna hijau kekuningan. Bunganya termasuk bunga tunggal, terletak di ketiak daun, bertangkai, kelopak bunga berbentuk corong. Mahkota bunga berbentuk bulat telur dengan panjang 1,5 cm, benang sari pipih berwarna putih atau putih kekuningan. Berbuah buni, berbentuk bulat telur, dan bijinya kecil dan keras (Parimin, 2005).

3.1.1 Kandungan Kimia

Kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang dapat membantu penyembuhan luka adalah alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid (Ndukwe dkk, 2013).

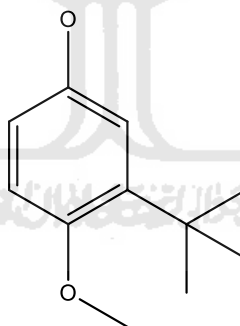
3.1.1.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa kimia bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, umumnya tidak berwarna, dan berwarna jika mempunyai struktur kompleks dan bercincin aromatik. Alkaloid merupakan golongan terbesar senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan. Telah diketahui sekitar 5.500 senyawa alkaloid terbesar di berbagai family. Alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian tumbuhan seperti biji, daun, ranting dan kulit kayu (Simbala, 2009). Salah satu kandungan daun jambu biji adalah alkaloid yang dapat meningkatkan trombosit. Trombosit akan mengeluarkan adenosin 6 difosfat (ADP) yang kemudian menyebabkan permukaan trombosit melekat pada lapisan trombosit yang pertama. Trombosit yang baru melekat mengeluarkan lebih banyak ADP sehingga bertambah jumlah trombosit yang melekat. Proses penumpukan trombosit didukung oleh tromboksan A₂ yang secara langsung mendorong agregasi trombosit sehingga dapat mempercepat pembekuan darah dengan cara mengeluarkan lebih banyak ADP (Damhoeri dkk, 2011).

3.1.1.2 Fenolik/Polifenol

Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yaitu memiliki banyak gugus phenol dalam molekulnya. Polifenol sering terdapat dalam bentuk glikosida polar dan mudah larut dalam pelarut polar (Hosttetman, dkk, 1985). Beberapa golongan bahan polimer penting dalam tumbuhan seperti lignin, melanin dan tanin adalah senyawa polifenol dan kadang-kadang satuan fenolitik dijumpai pada protein, alkaloid dan terpenoid (Harbone, 1987).

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan sebagai respons terhadap stres lingkungan. Senyawa fenolik berfungsi sebagai pelindung terhadap sinar UV-B dan kematian sel untuk melindungi DNA dari dimerisasi dan kerusakan (Lai & Lim, 2011). Komponen pada senyawa ini diketahui memiliki peranan penting sebagai agen pencegah dan pengobatan beberapa gangguan penyakit seperti arteriosklerosis, disfungsi otak, diabetes dan kanker (Garg et al, 2016).



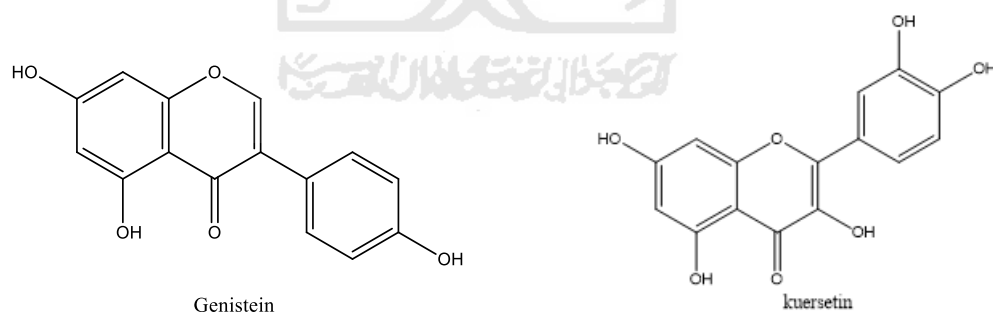
3-Tert-butyl-4-methoxyphenol

Gambar 3. Struktur kimia senyawa golongan fenolik dari daun jambu biji (*Psidium guajava L.*)

3.1.1.3 Flavonoid

Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam, yang terdiri dari 15 atom karbon, dengan dua cincin benzena (C6) terikat pada suatu rantai propana (C3) sehingga membentuk susunan C6-C3-C6. Sebagian besar senyawa flavonoid alam ditemukan dalam bentuk glukosida, dengan unit flavonoid terikat pada suatu gula. Glikosida adalah kombinasi antara suatu gula

dan suatu alkohol yang saling berikatan melalui ikatan glukosida (Lenny, 2010). Flavonoid bersifat polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil ataupun mengikat gula, oleh karena itu flavonoid umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol dan butanol. Flavonoid dapat digunakan sebagai antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang melindungi sel terhadap efek kerusakan oleh oksigen reaktif. Flavonoid juga dapat mempengaruhi kenaikan jumlah trombosit dan memiliki bioaktivitas sebagai anti kanker, anti virus, anti bakteri, anti peradangan dan alergi (Sudaryono, 2011). Kuersetin merupakan golongan flavonoid yang dapat menaikkan jumlah trombosit karena terkandung asam amino serin dan treonin yang mampu membentuk trombopoetin yang berfungsi dalam proses maturasi megakariosit menjadi trombosit (Sudaryono, 2011). Flavonoid kuersetin sebagai antiinflamasi yang mampu menghambat enzim siklooksigenase dan lipooksigenase, sehingga produksi prostaglandin dan leukotrien dapat berkurang. Penurunan jumlah prostaglandin dan leukotrien mengakibatkan migrasi sel radang ke area luka akan berkurang yang menandakan bahwa proses penyembuhan fase inflamasi dipersingkat, sehingga dapat segera memasuki faseproliferasi (Nijveldt dkk., 2011).



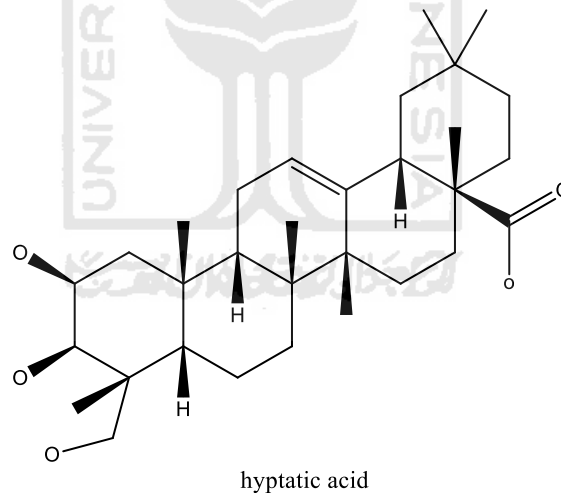
Gambar 4. Struktur kimia senyawa golongan flavonoid dari daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) (Nita, 2019).

3.1.1.4 Terpenoid

Terpenoid adalah senyawa yang hanya mengandung karbon dan hidrogen, atau karbon, hidrogen dan oksigen yang bersifat aromatis, sebagian terpenoid mengandung atom karbon yang jumlahnya merupakan kelipatan lima. Penyelidikan

kimia selanjutnya menunjukkan pula bahwa sebagian terpenoid mempunyai kerangka karbon yang di bangun oleh dua atom atau lebih unit C₅ yang disebut isoprene, unit unit isoprene biasanya saling berkaitan dengan teratur, dimana kepala dari unit satu berkaitan dengan ekor unit yang lain, kepala adalah merupakan ujung terdekat ke cabang metil dan ekor yang merupakan ujung yang lain.

Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Kebanyakan terpenoid alam mempunyai struktur siklik dan mempunyai satu gugus fungsi atau lebih (Harborne, 1987, hal. 124). Salah satu senyawa terpenoid adalah taksodon dan vernomenin yang merupakan jenis terpenoid yang mempunyai efek fisiologis terhadap manusia yaitu dapat menahan pembelahan sel sehingga dapat menghalangi pertumbuhan tumor.



Gambar 5. Struktur kimia senyawa golongan terpenoid dari daun jambu biji (*Psidium guajava L.*)

3.1.2 Kegunaan tanaman jambu biji

Menurut Killion (2000) daun jambu biji merupakan tanaman obat yang mempunyai khasiat sebagai antidiare, astrigen, menghentikan pendarahan dan antioksidan. Menurut Sudarsono dkk. (2002) daun jambu biji mengandung flavonoid,

tanin (17,4%), fenolat (575,3 mg/g) dan minyak atsiri. Daun jambu biji (*Psidium guajava*. L.) digunakan sebagai sumber antioksidan alami, karena di dalam daun jambu biji terkandung tanin dimana tanin merupakan senyawa polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan.

3.1.3 Kegunaan tanaman jambu biji

Menurut Killion (2000) daun jambu biji merupakan tanaman obat yang mempunyai khasiat sebagai antidiare, astrigen, menghentikan pendarahan dan antioksidan. Menurut Sudarsono dkk. (2002) daun jambu biji mengandung flavonoid, tanin (17,4%), fenolat (575,3 mg/g) dan minyak atsiri . Daun jambu biji digunakan sebagai sumber antioksidan alami, karena di dalam daun jambu biji terkandung tanin dimana tanin merupakan senyawa polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan.

3.2 Maserasi dengan Etanol 96%

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi bau yang telah ditetapkan (Dirjen POM, 1995: 10)

Ekstraksi pelarut dilakukan dengan cara dingin yaitu maserasi. Proses ekstraksi dengan teknik maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruang. Keuntungan cara ini mudah dan tidak perlu pemanasan sehingga kecil kemungkinan bahan alam menjadi rusak atau terurai. Pemilihan pelarut berdasarkan kelarutan dan polaritasnya memudahkan pemisahan bahan alam dalam sampel. Pengerjaan metode maserasi yang lama dan keadaan diam selama maserasi memungkinkan banyak senyawa yang akan terekstraksi (Istiqomah, 2013).

Proses maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena sebagian besar senyawa bahan alam tidak tahan terhadap panas dan dengan maserasi maka akan terjadi kontak antara sampel dan pelarut yang cukup lama sehingga akan menghasilkan ekstrak yang jauh lebih besar (Baraja, 2008). Kelebihan dari metode maserasi yaitu sederhana, relatif murah, tidak memerlukan peralatan

yang rumit, terjadi kontak antara sampel dengan pelarut yang cukup lama dan dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan terhadap panas. Kekurangannya adalah membutuhkan waktu yang lama dan pelarut yang digunakan relative banyak (Voight, 1995). Pemilihan pelarut organik yang akan digunakan dalam ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting sehingga tujuan dan sasaran ekstraksi dapat tercapai. Tingginya nilai konstanta dielektrik, titik didih serta kelarutan dalam air, maka suatu pelarut bersifat semakin (Sudarmadji dkk., 2007).

3.3 Fraksinasi

Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Pelarut yang umumnya dipakai untuk fraksinasi adalah *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Digunakan *n*-heksana untuk menarik lemak dan senyawa polar, etil asetat untuk menarik senyawa semi polar, sedangkan metanol untuk menarik senyawa-senyawa polar. Dari proses ini dapat diduga bahwa sifat kepolaran dari senyawa akan dipisahkan sesuai kepolarannya. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga (Mutiasari, 2012).

Kromatografi adalah proses yang tergantung pada distribusi yang berbeda-beda antara fase gerak dan fase diam. kromatografi kolom terdiri dari lapisan tipis di mana fase gerak dibiarkan untuk naik berdasarkan kapilaritas (kromatografi lapis tipis). Senyawa yang lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui sistem kromatografi. Senyawa dengan fase yang bergerak dengan fase diam akan bergerak sangat cepat (Christian, 1994; Skoog, 1998).

Solven murni atau sistem solven tunggal dapat digunakan untuk mengelusi semua komponen. Pada elusi gradien, sistem kepolaran solven didukung penuh dengan peningkatan solven ke yang lebih polar. Pilihan solven eluen tergantung pada jenis adsorben yang digunakan dan kemurnian campuran yang disusun. Solven harus mempunyai kemurnian yang tinggi, karena mengandung pengganggu seperti udara,

alkohol, atau asam pada solven yang kurang polar akan meningkatkan aktivitas adsorben (Braithwaite dan Smith, 1995). Urutan kepolaran eluen dalam mengelusi senyawa pada kromatografi menurut Noviyanti (2010) udara> metanol> etanol> aseton> etil asetat> dietil eter> kloroform> benzena> karbon tetraklorida> petroleum eter.

Silika gel adalah fase diam (adsorben) yang paling sering digunakan untuk penggunaan produk alam (Cannel, 1998). Banyaknya adsorben yang digunakan pada tingkat kerumitan dari suatu kompleksitas dan jumlah sampel yang akan dibahas. Secara umum, Setiap gram sampel yang diperlukan memerlukan adsorben 30 - 50 gram. Jika memungkinkan yang dilakukan cukup sulit, jumlah adsorben yang dibutuhkan dapat mencapai 200 gram. Jumlah adsorben yang dibutuhkan akan lebih sedikit untuk alokasi kompetensi yang cukup besar (Kristanti, dkk., 2008).

Permukaan silika gel mengandung gugus silanol. Gugus hidroksil ini merupakan pusat yang aktif dan dapat dibuat ikatannya dengan hidrogen yang kuat dengan komposisi yang diatur. Silika gel membentuk ikatan hidrogen Terutama dengan donor H seperti alkohol, fenol, amina, amida, dan asam karboksilat (Palleros, 2000). Semakin kuat ikatan ikatan, semakin kuat akan tertahan oleh silika gel. Seberapa kuat komposisi tertahan dalam silika gel tergantung pada fase gerak kepolaran. Semakin kuat ikatan hidrogen pada solven, semakin baik eluen untuk mengelusi komposisi polar yang teradsorbsi pada kolom silika gel (Cannel, 1998).

3.4 Penapisan Fitokimia

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

3.5 Kanker Payudara

Sampai saat ini penyebab pasti kanker payudara belum diketahui namun data epidemiologi mengisyaratkan bahwa faktor genetik, endokrin dan lingkungan mungkin sangat berperan menginisiasi dan/atau mendukung pertumbuhan kanker payudara (Brunner dan Suddarth, 2003). Fase awal kanker payudara adalah asimtomatik tanpa ada gejala dan tanda. Adanya benjolan atau penebalan pada payudara merupakan tanda dan gejala yang paling umum, sedangkan tanda dan gejala tingkat lanjut kanker payudara meliputi kulit cekung, retraksi atau deviasi puting susu dan nyeri, nyeri tekan atau rabas khususnya berdarah dari puting. Kulit tebal dengan pori-pori menonjol sama dengan kulit jeruk dan atau ulserasi pada payudara merupakan tanda lanjut dari penyakit. Jika ada keterlibatan nodul, mungkin menjadi keras, pembesaran nodul limfa aksilaris membesar dan atau nodus supraklavikula teraba pada daerah leher. Metastasis yang luas meliputi gejala dan tanda seperti anoreksia atau berat badan menurun, nyeri pada bahu, pinggang, punggung bagian bawah atau pelvis, batu menetap, gangguan pencernaan, pusing, penglihatan kabur dan sakit kepala (Gale dan Charette, 1999).

3.6 Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS)

SNEDDS (*Self-nanoemulsifying drug delivery system*) adalah suatu teknik penghantar obat yang terdiri atas campuran isotropik antara obat, minyak dan surfaktan, serta jika diperlukan dapat menambahkan kosurfaktan, sistem ini ketika bertemu dengan media air disertai agitasi yang ringan akan mampu membentuk suatu nanoemulsi (Rahul, dkk., 2012), dengan ukuran di bawah 100 nm (Parmar, dkk., 2011). Suasana lambung yang asam (asam lambung dan gerakan peristaltik) menyebabkan sistem ini teremulsifikasi secara spontan (Patel, 2008). SNEDDS mampu meningkatkan ketersediaan hayati obat dalam tubuh dengan meningkatkan solubilitas obat dan permeasi obat menembus membran intestinal akan lebih baik karena ukuran partikel yang kecil (Wang, dkk., 2010). Nanoemulsi yang terbentuk bagian minyak terlindungi oleh bagian hidrofob dari surfaktan dan bagian hidrofil

surfaktan berinteraksi dengan molekul air sehingga membentuk tetesan emulsi yang terdispersi dalam air.

Nanoemulsi merupakan sistem yang transparan dan stabil secara kinetik. Nanoemulsi memiliki ukuran <100 nm, dapat diaplikasikan pada sediaan farmasetika, kosmetika, dan industri kimia, yang dapat meningkatkan efek farmakologi dari obat serta menurunkan efek samping obat yang diberikan (Bernadi dkk., 2011). Seperti sistem emulsi pada umumnya, nanoemulsi memungkinkan membawa dan melarutkan senyawa hidrofobik dalam fase air. Nanoemulsi dibagi menjadi tipe nanoemulsi minyak dalam air (m/a), air dalam minyak (a/m), dan bicontinuous yang merupakan bentuk transisi dari tipe m/a dan a/m dengan mengubah volume minyak dan air, dan ketiga tipe tersebut bergantung pada konsentrasi dan sifat kimia surfaktan, minyak, dan bahan yang terlarut di dalamnya. Transisi antara berbagai tipe tersebut dapat terjadi karena modifikasi perbandingan surfaktan dan kosurfaktan (Wilhelmina, 2011).

Salah satu keuntungan nanoemulsi adalah film yang sangat oklusif yang dapat terbentuk saat aplikasi pada kulit, ukuran globul yang kecil dapat masuk ke permukaan kulit yang kasar dan globul dapat membentuk struktur yang rapat pada permukaan kulit. Kasus ini terutama saat globul memiliki viskositas tinggi atau *solid like*. Keuntungan lainnya dari nanoemulsi adalah kemampuannya untuk meningkatkan penetrasi dari bahan aktif seperti vitamin dan antioksidan ke dalam kulit. Hal ini disebabkan luas permukaan nanoemulsi yang besar (Tadros, 2005).

Nanoemulsi merupakan sistem yang stabil. Beberapa fenomena ketidakstabilan dapat saja terjadi. Beberapa diantaranya menyebabkan adhesi globul dan biasanya bersifat reversible, hal lainnya berhubungan dengan ukuran partikel yang besar, biasanya irreversible. Flokulasi yang reversible dapat menyebabkan sedimentasi ataupun creaming. Sementara, peningkatan ukuran globul dapat terjadi melalui dua mekanisme, Ostwald ripening dan koalesens. Ostwald ripening merupakan proses dimana tetesan kecil berubah menjadi besar dan membentuk tetesan yang baru. Hal ini disebabkan karena perbedaan kelarutan antara tetesan kecil

dan yang besar. Nanoemulsi memiliki kapasitas kelarutan lebih tinggi dari larutan miselar sederhana, lebih stabil dibandingkan emulsi dan dispersi. (Vior dkk., 2011). Ukuran partikel yang kecil, campuran yang jernih, dan stabil membuat nanoemulsi memiliki keuntungan bila dibandingkan dengan emulsi dengan suspensi. Menurut Jaiswal dkk (2014), beberapa keunggulan dari nanoemulsi antara lain meningkatkan bioavailabilitas obat, tidak toksik, tidak mengiritasi, meningkatkan stabilitas fisik, meningkatkan absorpsi dengan memperkecil ukuran partikel dan memperluas permukaan, mudah di formulasikan, dan meningkatkan kelarutan obat suka lemak.

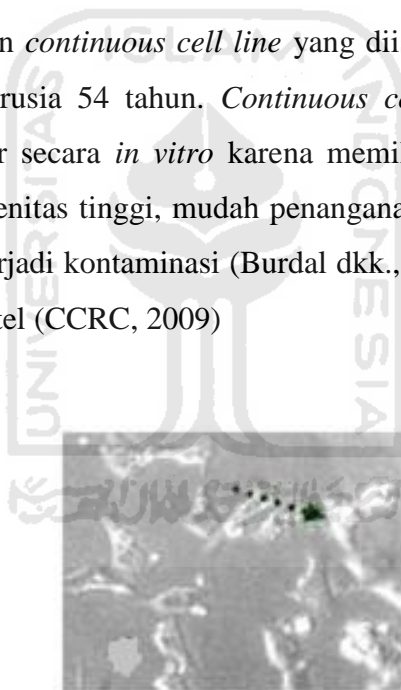
Kosurfaktan sebagai fasilitas proses dispers serta mempercepat terdispersinya emulsi ke dalam media. Kosurfaktan bertujuan meningkatkan *drug loading*, mempercepat emulsifikasi waktu dan mengatur emulsi. Kosurfaktan membantu surfaktan hidrofil beserta obat lipofil larut ke dalam basis minyak (Kumar dkk.,2010). Pemilihan kosurfaktan berdasarkan mudah atau tidaknya kosurfaktan menguap (derajat volatilitas). Kosurfaktan yang bersifat volatil akan memberi kerugian yaitu evaporasi dalam cangkang kapsul sehingga menyebabkan terjadinya endapan obat (Neslihan dkk.,2004). Kosurfaktan dengan struktur molekul berupa alkohol rantai pendek lebih sering digunakan karena kemampuannya mengurangi tegangan antar muka dan fluiditas antarmuka. Kosurfaktan yang digunakan dalam penelitian ini adalah polietilen glikol (PEG 400).

PEG 400 memiliki rumus kimia $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ (n merupakan angka gugus oxyethylene dengan nilai 8,7) memiliki BM berkisar 190 –210 (Rowe dkk., 2009). PEG 400 berupa cairan kental, tidak berwarna dan transparan, merupakan hasil kondensasi dari polimer etilen glikol. Keunggulan PEG 400 antara lain adalah tidak mahal, dapat didaur ulang, mudah terdegradasi dalam tubuh, tidak mudah terbakar, toksisitas rendah dan mudah larut bersama solven organik (Gadden, dkk., 2014). PEG dalam bentuk larutan merupakan zat yang sangat higroskopis, tetapi tingkat higroskopitas menurun seiring dengan peningkatan berat molekul. PEG larut dalam air dan dapat dicampur dengan berbagai bagian. PEG larut dalam

aseton, alkohol, benzena, gliserin dan glikol. PEG secara kimia stabil di udara dan tidak berbau tengik. PEG dalam bentuk larutan dapat disterilkan secara autoclave, filtrasi atau radiasi gamma. Sterilisasi dari bentuk serbuknya dapat dilakukan metode panas kering 150°C (Rowe dkk., 2009). Struktur PEG atas 2 gugus hidroksil yang mana secara mudah dapat mengalami esterifikasi. Aktivitas oksidasi dapat terjadi karena pengaruh peroksida dan selanjutnya terjadi autooksidasi. Bentuk larutan maupun serbuk PEG sangat inkompatibel dengan coloring agents (Rowe dkk., 2009)

3.7 Sel T47D

Sel T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor *ductal* payudara wanita berusia 54 tahun. *Continuous cell line* sering digunakan dalam penelitian antikanker secara *in vitro* karena memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas tinggi, mudah penanganannya serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdal dkk., 2003). Morfologi dari sel kanker T47D seperti sel epitel (CCRC, 2009)



Gambar 6. Morfologi sel T47D

(CCRC, 2009)

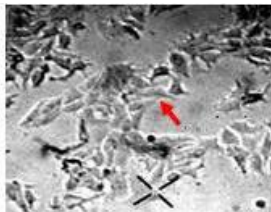
Beberapa karakteristik khusus dari sel T47D yaitu sensitifitasnya terhadap estrogen melalui estrogen reseptor alpha ($ER\alpha$) pada membrane sitosol, sehingga dapat disebut dengan ER-positif luminal A (Aka & Lin, 2012). Gen p53 yang termutasi akan menyebabkan berkurangnya kemampuan untuk mengikat respon

elemen pada DNA atau berkurangnya kemampuan dalam regulasi siklus sel dan memacu apoptosis (Ammerman et al., 2008).

3.8 Sel MCF-7

Sel MCF-7 biasa digunakan untuk berbagai penelitian kanker payudara in vitro karena sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan gen p53 wild type (belum bermutasi) sehingga sensitif terhadap agen kemoterapi. Selain itu, sel MCF-7 memiliki kemampuan untuk memproses estrogen dalam bentuk estradiol agar berikatan dengan reseptor estrogen dalam sitoplasma sehingga membentuk kompleks reseptor aktif dan mempengaruhi transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel.

Sel MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) adalah salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel MCF-7 merupakan sel kanker yang diperoleh dari pasien wanita Kaukasian dengan dasar penumbuh media DMEM terformulasi. Sel MCF-7 bersifat *adherent* sehingga metode kultur yang tepat adalah *monolayer*. Sel ini diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik metastasis *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang wanita berusia 69 tahun dengan etnis kaukasian bergolongan darah O dengan Rh⁺. (ATCC, 2012).



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

3.9 Sel Normal Vero

Sel Vero merupakan sel epitel non-kanker atau biasa dikenal dengan sel normal. Sel ini diperoleh dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*). Sel Vero merupakan monolayer dan termasuk dalam jenis epithelial-like (Ammerman

dkk., 2008). Sel Vero memiliki bentuk seperti polygon dan pipih, dapat bereplikasi tidak terbatas atau diperbanyak (*Continuous 8 cell line*) dari sel yang ada pada media kultur secara *in vitro*, *non tumorigenic fibroblastic cell* atau sel non kanker. Sel ini dapat melekat erat pada substrat yang memiliki bahan dasar polistiren dan membentuk ikatan kovalen. Pengujian sel Vero dilakukan untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksitas, dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia (Goncalves dkk., 2006).

3.10 Kultur Sel

Kultur sel merupakan suatu proses saat sel hidup ditempatkan ke dalam suatu media yang dapat membuat sel tersebut berkembang biak atau tumbuh secara *in vitro* (Ma'at, 2011). Media kultur buatan yang digunakan untuk menumbuhkan sel di luar tubuh organisme dibuat semirip mungkin dengan cairan biologis pada saat sel berada dalam tubuh organisme (Echalier, 1997). Kultur sel dapat berupa kultur sel primer maupun *cell line*. Kultur sel primer merupakan kultur yang dimulai dari sel, jaringan, organ yang diperoleh langsung dari organisme asalnya, sedangkan *cell line* ialah kultur yang diperoleh dari subkultur pertama dari kultur primer. Kultur sel primer memiliki beberapa kelemahan di antaranya kebutuhan hewan percobaan sebagai bahan baku kultur yang besar dan kemungkinan besar adanya kontaminasi virus atau mikroba yang dapat menginfeksi hewan percobaan yang akan digunakan sebagai stok kultur (Ma'at, 2011).

3.11 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel biasa digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetik, zat tambahan makanan, peptisida dan digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari senyawa (Freshney, 1992). Uji sitotoksitas merupakan pengembangan metode untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik dari bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker. Teknik *sulforhodamine B* (SRB) merupakan salah satu dari beberapa metode uji sitotoksik *in vitro* yang baik dan sensitif untuk memprediksi efek sitotoksik senyawa dari bahan alam (Perez dkk., 1993; Skehan dkk., 1990). Metode ini telah digunakan untuk uji

aktivitas pada obat-obat antikanker yang telah digunakan secara klinis (Keepers dkk., 1991).

Uji toksisitas merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa. Prinsip uji toksisitas adalah bahwa komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah. Zat atau senyawa asing yang ada di lingkungan akan terserap ke dalam tubuh secara difusi dan langsung memengaruhi kehidupannya. Uji toksisitas digunakan untuk mengetahui pengaruh racun yang dihasilkan oleh dosis tunggal dari suatu campuran zat kimia pada hewan coba sebagai uji pra skrining senyawa antikanker (Mc. Laughlin dan Rogers, 1998).

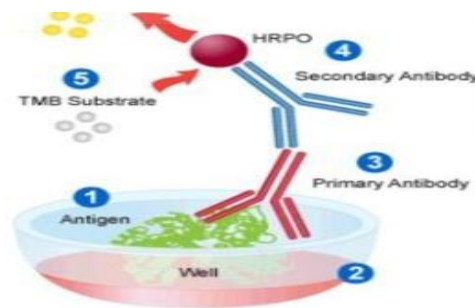
3.12 Metode MTT assay

MTT assay untuk menguji sifat toksisitas senyawa uji . MTT adalah garam tetrazolium yang direduksi menjadi produk formazan dengan mereduksi kehadiran enzim hanya pada sel yang aktif secara metabolik (Jabbar dkk., 1989). MTT assay yang memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Doyle dan Griffiths, 2000). Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromida] (MTT) menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup. MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam PBS (*Phosphate Buffer saline*) berwarna biru (Doyle dan Griffiths, 2000). Konsentrasi formazan yang berwarna biru dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosmann, 2000 dan Padmi 2008). Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup.

Reaksi MTT dengan enzim mitokondria reduktase yang terdapat pada sel dihentikan dengan penambahan SDS (*Sodium Dodesil Sulfat*). SDS berfungsi sebagai detergen yang dapat melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein (Maulana dkk., 2010), semakin sehat sebuah sel maka kristal formazan yang dihasilkan akan lebih banyak sehingga warna ungu yang dihasilkan akan lebih pekat, oleh karena itu tingkat sitotoksitas bisa diukur dengan mengukur absorbansi cahaya dengan menggunakan *microplate reader*.

3.13 Elisa Reader

ELISA Biotin Streptavidin dalam penggunaan sehari-hari ELISA bisa digunakan untuk melabel suatu antigen atau mengetahui antibody yang ada dalam tubuh. Apabila kita ingin mengetahui antigen apa yang ada di dalam tubuh, maka yang diendapkan adalah antibodynya, begitu pula sebaliknya. Kadar suatu protein dapat dideteksi menggunakan teknik ELISA *sandwich assay* dengan dengan mengedapkan antibody pada *well plate*. Fungsi dari test ELISA yaitu bukan hanya untuk mengetahui keberadaan suatu antigen dengan antibody tetapi juga untuk mengukur kadar antigen atau antibody tersebut dengan menggunakan alat spektrofotometer.



Gambar 8. Prinsip Dasar Elisa Reader 1

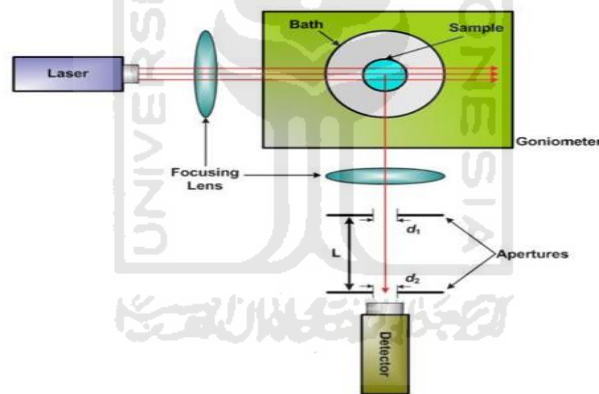
3.14 PSA (Particle Size Analyzer)

PSA (*Particle Size Analyzer*) adalah suatu alat yang bertujuan untuk mengetahui ukuran partikel dan distribusi. Kisaran pengukuran PSA dari 0,6 nm – 7 μ m. Pengujian PSA (*Particle Size Analyzer*) lebih akurat menggunakan metode basah daripada metode kering, terlebih untuk sampel nanometer yang dapat mengalami aglomerasi. Dengan penggunaan metode basah partikel tidak saling beraglomerasi, hal ini dipengaruhi oleh partikel yang didispersikan ke media. Sehingga akan dihasilkan ukuran partikel dari partikel tunggal. Selain dalam hal ukuran, pengukuran PSA menunjukkan distribusi partikel yang menggambarkan keseluruhan kondisi sampel (Faidah, 2019).

Ukuran partikel dapat dianalisis menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*), dimana menggunakan teknik hamburan cahaya dinamik. Teori dinamik hamburan cahaya teknik yang digunakan untuk mengukur ukuran partikel dengan rentang beberapa nanometer hingga beberapa mikron. Penggunaan ide konsepnya adalah partikel kecil dalam suspensi bergerak dengan pola acak. Ahli mikrobiologis dengan nama Brown yang pertama kali menemukan efek ini, dimana objek wisata melalui hidup melalui mikroskop cahaya pergerakan partikel kecil dalam fluida dinamakan gerak brown, dan dapat dengan mudah diakses untuk partikel dengan ukuran kira-kira 0,5-1 mikron dengan mikroskop pada perbesaran 200 - 400 kali. Pengamatan partikel besar daripada partikel kecil, menunjukkan partikel besar bergerak lebih besar dari partikel kecil pada temperatur yang sama. Mengacu pada pengembangan Einstein dalam teori molekular kinetiknya, molekul banyak yang kecil dari partikel dapat memberikan arah partikel dan kecepatan. Kombinasi efek ini menggunakan seperti partikel acak keseluruhan (Williams, 2006)

Ketika sumber sinar yang koheren seperti laser yang memiliki frekuensi yang diarahkan pada partikel yang bergerak, maka sinar yang menyebar, tetapi pada frekuensi yang berbeda. Perubahan itu dinamakan *Doppler shift* atau *broadening* (perluasan) dan konsepnya sama untuk sinar ketika berinteraksi dengan partikel kecil yang bergerak. Untuk tujuan pengukuran partikel, perubahan dalam frekuensi cahaya

dihubungkan terhadap ukuran partikel yang menyebabkan perubahan, pengarahaan pada kecepatan rata-rata partikel, partikel kecil menyebabkan perubahan yang besar pada frekuensi cahaya dari partikel besar. Perbedaan dalam frekuensi dari sebaran cahaya terhadap ukuran partikel yang berbeda digunakan untuk menentukan ukuran dari partikel yang diukur. Alat DLS yang digunakan dalam pembelajaran ini terdiri dari tiga komponen. Sebuah laser dari spektrum 514 nm dari argon. Sebuah goinometer dari Brookhaven mengandung sebaran yang ada antara sinar laser dan partikel dengan ukuran nano, dimana ditempatkan ditempatkan ke dalam *bath*. Akhirnya, *detector* dari Brookhaven mendeteksi sebaran sinar dalam 90 derajat dari insiden sinar kompilasi antara goinometer dan detektor tepat 90 derajat, seperti yang diharapkan pada gambar 9.



Gambar 9. Schematic Dynamic light scattering menggunakan metode dinamik (Williams, 2006)

3.15 Zeta Potensial

Partikel koloid (termasuk nanofluida) terlarut didalam pelarut memiliki muatan elektrik, hal ini karena memiliki karakteristik bipolar dan atribut ionik. Sebagai contoh permukaan koloid mungkin membentuk grup yang terionisasi. Hal ini menyebabkan muatan elektrik pada permukaan dapat menyebabkan akumulasi muatan yang berlawanan jenis berada disekitar permukaan tadi menghasilkan lapisan elektrik ganda. Difusi atau pergerakan dari double layer tergantung dari perbedaan

polaritas ion yang terjadi pada fasa liquid. Lapisan ganda memiliki dua bagian, daerah dalam yang memiliki ikatan ion relatif kuat terhadap permukaan, dan daerah difusi dimana distribusi ion ditentukan oleh keseimbangan gaya elektrostatis pada pergerakan di temperatur acak. Ketika diberikan muatan elektrik, partikel akan berinteraksi dengan elektroda, tergantung dari polaritas partikel. Potensial yang tercatat ketika bagian dari lapisan ganda melewati elektroda disebut zeta atau electrokinetic potential. Zeta potensial juga didefinisikan sebagai potensial pada bidang geser dari partikel ketika bergerak didalam media. (Das dkk., 2007).

Zeta potensial ditentukan oleh beberapa parameter seperti muatan permukaan, ion yang diserap pada permukaan, dan komposisi sekitar medianya. Muatan murni disekitar media tergantung dari muatan partikel dan penstabil. Zeta potensial adalah indeks interaksi antara partikel. Dideskripsikan dengan formula Smoluchowski :

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{\epsilon} \times U \times 300 \times 300 \times 1000$$

.....(1)

dimana Z adalah zeta potensial dalam mV, ϵ adalah dielektrik konstan dalam media, η adalah viskositas larutan, dan U adalah mobilitas electrophoretic (v/V/L) (Das dkk., 2007).

Perhitungan zeta potensial menembus stabilitas koloid dan larutan nanopartikel. Jika semua larutan dalam sebuah suspensi memiliki kuantitas besar baik positif maupun negatif nilai zeta, akan terjadi penolakan satu dengan lainnya dan tidak ada tendensi untuk berinteraksi. Tetapi jika partikel memiliki zeta potensial rendah maka tidak ada gaya untuk mencegah partikel dari penyatuan kembali. Hasil rerata stabilitas dari sebuah sistem koloid nanopartikel dalam zeta potensial adalah ± 30 mV. Lebih tinggi nilai zeta potensial, maka semakin stabil pula sistem koloid. Nilai

zeta potensial sangat dipengaruhi secara primer oleh tingkat keasaman (pH) (Das dkk., 2007).

Secara manual zeta potensial dihitung menggunakan micro electrophoresis method. Teknik ini menggunakan dasar penyebaran sinar oleh partikel. Dalam kasus larutan nanopartikel, sebenarnya *microelectrophoresis* kurang ideal karena efek Doppler menyebarkan sinar dari partikelnya. Metode terbaru untuk mengukur zeta potensial adalah metode *electroacoustic* yang mengukur berdasarkan sifat elektrokinetik partikel. Metode ini diaplikasikan dengan mengukur tingginya frekuensi muatan listrik partikel terhadap pergerakan *electrophoretic* partikel. Menghasilkan gelombang alternatif dengan perbedaan kepadatan antara partikel dan medianya. Kecepatan dari partikel diukur menggunakan laser Doppler electrophoresis. Kecepatan ini dikonversi menjadi nilai zeta potensial menggunakan perhitungan Henry's :

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f (\kappa a)}{3\eta}$$

.....(2)

3.16 Transmission Electron Microscopy (TEM)

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. Berdasarkan sumber cahaya yang digunakan tersebut, TEM memiliki kesamaan dengan SEM, namun perbedaannya terletak pada penembakkan sampel. Pada SEM, elektron hanya menumbuk sampel dan hasil pendaran tersebut yang ditangkap oleh detektor. Sedangkan pada TEM, sampel disiapkan dengan sangat tipis sehingga elektron dapat menembusnya dan diolah menjadi gambar (Rosenauer, 2003).

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 (Kothleitner., dkk 2014).

Kelebihan karakterisasi menggunakan TEM yaitu kedua pola difraksi dan perbesaran gambar dapat diperoleh dari daerah sampel yang sama, pola difraksi memberikan sel satuan dan ruang informasi kelompok menggunakan *High-Resolution Electron Microscope* (HREM) yang dapat digunakan untuk tujuan pencitraan kisi. Informasi mengenai morfologi, struktur kristal, cacat, fasa kristal, komposisi dan mikrostruktur secara magnetik dapat diperoleh dengan mengombinasikan antara electron-optical imaging, electron diffraction dan kemampuan dari *small probe* (pendeteksian ukuran kecil). Semua informasi tersebut sangat penting bergantung pada kemampuan sampel untuk ditembus electron gun (West, 2014).

3.17 Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LCMS/MS)

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran berdasarkan pada perbedaan migrasi masing-masing analit senyawa pada fase diam dibawah pengaruh fase gerak. Dasar pemisahan kromatografi adalah terjadinya perubahan dari sistem kesetimbangan distribusi statis molekul senyawa ke sistem kesetimbangan distribusi dinamik diantara fase diam dan fase gerak yang berkesinambungan. Karena molekul analit pada kondisi variabel kromatografi tertentu mempunyai tetapan kesetimbangan distribusi dinamik yang khas, maka akan terjadi pola pemisahan yang tetap (Yuwono, 2009)

Kromatografi cair merupakan dasar teknik pemisahan di bidang sains dan terkait dengan kimia. Kromatografi cair dapat dengan aman memisahkan senyawa organik dengan rentang yang sangat luas yaitu mulai dari metabolit obat dengan molekul kecil sampai peptida dan protein (Alfian, 2012). Detektor umum dari kromatografi cair termasuk indeks refraksi elektrokimia, fluoresensi, dan ultraviolet-visible (UV-Vis). Beberapa dari detektor tersebut memberikan data dua dimensi yaitu data yang menunjukkan kekuatan signal sebagai fungsi atas waktu. Detektor fluoresensi dan UV-Vis menghasilkan data tiga dimensi yaitu tidak hanya kekuatan signal namun data spektrum dari masing-masing poin waktu. Spektrometer massa juga menghasilkan data tiga dimensi. Selain kekuatan sinyal juga menghasilkan data massa spektral yang dapat memberikan informasi berharga tentang struktur, berat molekul, identifikasi, jumlah, dan kemurnian sampel. Data spektral massa menambahkan spesifisitas yang meningkatkan kepercayaan dalam hasil dari analisis baik kualitatif maupun kuantitatif. Untuk sebagian besar senyawa yang dianalisis dengan spektrometer massa jauh lebih sensitif dan lebih spesifik daripada semua detektor kromatografi cair lainnya. Hal ini dapat menganalisis senyawa yang tidak memiliki gugus kromofor yang cocok. Hal ini juga dapat mengidentifikasi komponen dalam kromatografi dengan puncak yang belum terselesaikan, mengurangi kebutuhan untuk kromatografi yang sempurna (Alfian, 2012).

Data spektral massa melengkapi data dari detektor kromatografi cair lainnya. Beberapa spektrometer massa memiliki kemampuan untuk melakukan beberapa langkah spektrometri massa pada sampel tunggal. Hal tersebut bias menghasilkan spektrum massa, memilih secara selektif ion tertentu dari spektrum, fragmen ion, dan menghasilkan spectrum massa lainnya serta mengulang seluruh siklus beberapa kali. Spektrometer massa seperti secara harfiah dapat mendekonstruksi molekul kompleks sepotong demi sepotong sampai struktur dapat ditentukan (Alfian, 2012).

Spektroskopi massa adalah suatu teknik analisis yang mendasarkan pemisahan berkas ion-ion yang sesuai dengan perbandingan massa dengan muatan dan pengukuran intensitas dari berkas ion-ion tersebut. Dalam spektroskopi massa, molekul-molekul senyawa organik ditembak dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion-ion positif yang bertenaga tinggi (ion-ion molekuler atau ion-ion induk), yang dapat dipecah-pecah menjadi ion-ion yang lebih kecil (ion-ion pecahan). Lepasnya elektron dari molekul akan menghasilkan radikal kation, yang dapat dituliskan sebagai berikut (Sitorus, 2009). Ion-ion molekuler, ion-ion pecahan dan ion-ion radikal pecahan selanjutnya dipisahkan oleh pembelokan medan magnet yang dapat berubah sesuai dengan massa dan muatannya, dan akan menimbulkan arus pada kolektor yang sebanding dengan limpahan relatif mereka (Sitorus, 2009).

Spektrum massa akan menghasilkan puncak-puncak yang tercatat dalam rekorder, yang dipaparkan sebagai grafik batangan. Fragmen-fragmen disusun sedemikian sehingga puncak ditata menurut kenaikan muatan (m/z) dari kiri ke kanan dalam spektrum. Intensitas puncak sebanding dengan kelimpahan relatif fragmen-fragmen yang bergantung pada stabilitas relatif mereka. Puncak yang paling tinggi dinamakan base peak (puncak dasar) diberi nilai intensitas sebesar 100%; puncak yang lebih kecil dilaporkan misalnya 20%, 30%, menurut nilainya relatif terhadap puncak dasar (Sitorus, 2009).

3.18 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 tentang uji aktivitas antikanker fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) terhadap sel T47D dan MCF-7 yang dilakukan oleh Nita (2019) menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 6,95 $\mu\text{g/mL}$ dan 4,38 $\mu\text{g/mL}$. Dari penelitian tersebut dapat diketahui bahwa fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antikanker terhadap sel T47D dan MCF-7.
3. Salah satu keuntungan nanoemulsi adalah film yang sangat oklusif yang dapat terbentuk saat aplikasi pada kulit, ukuran globul yang kecil dapat masuk ke permukaan kulit yang kasar dan globul dapat membentuk struktur yang rapat pada permukaan kulit. Kasus ini terutama saat globul memiliki viskositas tinggi atau solid like. Keuntungan lainnya dari nanoemulsi adalah kemampuannya untuk meningkatkan penetrasi dari bahan aktif seperti vitamin dan antioksidan ke dalam kulit. Hal ini disebabkan luas permukaan nanoemulsi yang besar (Tadros, 2005). Sehingga dari kelenihan itu diharapkan fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang diformulasikan menjadi nanoemulsi berukuran nanopartikel mampu meningkatkan aktivitas antikanker terhadap sel T47D dan MCF-7.

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan mulai April 2019 sampai Februari 2020 di Laboratorium Penelitian Kimia, Program Studi Kimia, Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia dan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta. Penelitian ini adalah uji aktivitas antikanker terhadap beberapa sel kanker. Sel uji yang digunakan adalah sel T47D, MCF-7 yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan diantaranya seperangkat alat gelas, blender, neraca analitik, inkubator, kertas saring, klem dan statif, kolom fraksinasi, evaporator vakum Heidolph, sentrifugator Hettich, botol vial, oven, vorteks, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung, *plate 96-well*, *yellow tip*, *conical tube*, hemositometer, *blue tip*, *laminar air flow* (LAF) (Innotech V-800), ELISA *reader* (Bio Rad Benchmark), LC-MS/MS (UNIFI 1.8 or Masslynx 4.1 software Waters Corporation), *Particle Size Analyzer* (Horiba Scientific, Nano Particle Analyzer SZ-100), dan TEM (CM12 Philips, Eindhoven).

4.2.2 Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun (*Psidium guajava* L.), n-heksana p.a, etanol 96%, aseton, logam Mg, HCl pekat, reagen dragendroff, reagen mayer, FeCl, H₂SO₄ pekat, capryol, tween 20, PEG 400, PBS (*Phospat buffer saline*), media kultur RPMI, tripsin-EDTA, DMSO (*Dimetil Sulfoksida*), SDS 10 % dalam 0,1 N HCl, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle*

Medium), formaldehid, MTT 5 mg/mL (50 mg MTT dan 10 mL PBS), aluminium foil, tissue, plastic wrap sel T47D, MCF-7.

4.3 Cara Kerja

Proses penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu persiapan sampel, ekstraksi, fraksinasi, penapisan fitokimia, uji aktivitas antikanker secara *in vitro*, analisis dengan instrumen.

4.3.1 Preparasi Sampel Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.)

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

4.3.2 Ekstraksi dengan Metode Meserasi

Meserasi dilakukan dengan memasukkan 750 gram serbuk kering ke dalam botol kemudian ditambahkan etanol ke dalam botol sampai seluruh sampel terendam, botol ditutup rapat. Rendam selama kurang lebih 24 jam sambil sesekali diaduk agar zat aktif yang terdapat pada simplisia terlarut. Dipisahkan maserat dengan menggunakan kertas saring, diulangi proses penyaringan sekurang-kurangnya tiga kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan vakum *rotary evaporator* pada suhu ± 60 °C hingga kental. Ekstrak kental kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40 °C untuk menghilangkan sisa pelarut agar didapatkan ekstrak kental yang bebas etanol (DepKes, 2008).

4.3.3 Fraksinasi

Tahapan fraksinasi pada penelitian ini mengikuti petunjuk dari Aditya dkk., (2017). Ekstrak kental etanol sebanyak 139,1 gram kemudian diimpregnasi menggunakan silika dan dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut secara *n*-heksana. Sehingga didapatkan larutan masing-masing fraksi kemudian dilakukan evaporasi

untuk memisahkan pelarut menggunakan *rotary evaporator* dan didapatkan ekstrak dari fraksi tersebut.

4.3.4 Penapisan fitokimia

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

4.3.4.1 Uji alkaloid

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

4.3.4.2 Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak fraksi *n*-heksana ke dalam 5 mL pelarutnya, kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama dijadikan sebagai tabung kontrol. Tabung kedua 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).

4.3.4.3 Uji Fenolik/Polifenol

Ekstrak fraksi *n*-heksana dilarutkan dengan 5 mL pelarutnya, kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%. Uji positif ditandai dengan munculnya warna hitam atau biru tua (Harborne, 1987).

4.3.4.4 Uji terpenoid

Ekstrak fraksi *n*-heksana dilarutkan dengan 0,5 mL dengan pelarutnya, kemudian ditambahkan asam asetat anhidrat 0,5 mL dan asam sulfat pekat 2 mL melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin biru kehijauan menunjukkan adanya

steroid, sedangkan adanya terpenoid ditunjukkan dengan cincin kecoklatan pada perbatasan larutan (Ciulei, 1984).

4.3.5 Pembuatan SNEDDS

Pada percobaan kali ini menggunakan variabel – variabel untuk pembuatan SNEDDS yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Variabel pembuatan SNEDDS

Formula	Minyak Capryoll	Surfaktan Tween 20	Kosurfaktan PEG	Konsentrasi % fraksi
1	30	50	20	40
2	30	50	20	60
3	30	50	20	80

4.3.6 Uji PSA

Ukuran Partikel

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

Zeta Potensial

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

4.3.7 Uji aktivitas antikanker secara in vitro (CCRC, 2009)

Proses uji aktivitas ekstrak etanol 96% daun jambu biji terhadap sel kanker payudara T47D, MCF-7 akan dilakukan dengan petunjuk yang termuat dalam jurnal penelitian Dwitiyanti (2015) yaitu pada tahap awal akan dilakukan penyiapan media kultur RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute*), kemudian penyiapan kultur sel (Doyle dan Griffiths, 2000) yaitu dilakukan pengaktifan sel T47D, pemanenan dan perhitungan sel T47D. Pada tahap selanjutnya akan dilakukan uji sitotoksitas dengan metode perhitungan langsung dimana yang perlu diatur dalam penelitian ini

yaitu konsentrasi sampel uji ekstrak fraksi n-heksana, dalam 7 konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 µg/mL.

4.3.7.1 Penyiapan sel

Thawing sel

Sel kanker payudara T47D dan MCF-7 didapat dari Universitas Gajah Mada (UGM). Sel kanker dikeluarkan dari N₂ cair pada suhu -70 °C, lalu dihangatkan dengan suhu 37 °C selama 2-3 menit. Dipindahkan sel ke *conical tube* 15 mL dan ditambahkan dengan media stok sampai 10 mL. Media yang digunakan yaitu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* untuk sel T47D dan RPMI (Roswell Park Memorial Institute) untuk sel MCF-7, kemudian disentrifuse dengan rpm 1200 selama 5 menit. Supernatan yang berada di *culture dish* dibuang dan ditambahkan dengan media komplet 10 mL. Dipindahkan ke *petri dish* 10 cm³ dan diinkubasi di 37 °C selama 3-4 jam. Lalu diamati dibawah mikroskop dan bila jumlah sel mencapai 70-85% (konfluen), dilakukan panensel.

Tripsinasi atau panel sel

Sel T47D dan sel MCF-7 yang berada di *culture dish* dibuang media kompletnya lalu cuci *culture dish* dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 5 mL sebanyak dua kali, kemudian dicuci dengan tripsin 0,1% sebanyak 2 mL. Sel diinkubasi selama 3-5 menit dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Disuspensi sel untuk membantu terpisahnya sel agar tidak saling menggerombol. Dipindahkan sel ke dalam tabung 15 cc dan ditambahkan dengan media komplet 2 mL dan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) hingga 10 mL lalu di sentrifuse dengan 1200 rpm selama 5 menit. Dibuang supernatan didalam *culture dish* dan ditambahkan media komplet 1-3 mL. Jumlah sel dihitung dibawah mikroskop *inverted*, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C/ 5% CO₂ selama 24 jam.

4.3.7.2 Penghitungan sel kanker

Diambil 10 µL panen sel dan dipipetkan ke hemositometer. Diamati dan

dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel kanker dapat diketahui dengan perhitungan pada persamaan (3) sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel per mL} = \frac{n}{4} \times 10^4 \dots\dots\dots(3)$$

Keterangan :

n: jumlah sel tiap kamar

4.3.7.3 Peletakan sel pada plate

Jumlah sel yang diletakkan pada *plate* setiap sumuran, diketahui dengan menggunakan persamaan (4) sebagai berikut:

$$\frac{\sum \text{total sel yang diperlukan}}{\sum \text{sel terhitung/mL}} \dots\dots\dots(4)$$

Sel diletakkan dalam plate dan ditambahkan media yang sesuai RPMI untuk sel T47D, media DMEM untuk sel MCF-7. Selanjutnya diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C/ 5% CO₂, akan tetapi 6 sumuran bagian bawah disisakan untuk kontrol sel dan kontrol media.

4.3.7.4 Pembuatan larutan sampel dan pemberian larutan sampel pada plate

Ditimbang masing-masing sampel ekstrak pekat yakni fraksi *n*-heksana sebanyak 10 mg dalam wadah yang berbeda, dilarutkan ekstrak pekat dalam 100 µL DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dan diaduk dengan vorteks agar lebih cepat dalam melarutkan sampel, diambil sel dari inkubator, kemudian dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate* 180° diatas tempat buangan dan ditekan secara perlahan diatas tissue untuk meniriskan sisa cairan, dimasukkan 100 µL PBS kedalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu dimasukkan larutan sampel sebanyak 100 uL dengan konsentrasi 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 dan 3,125 µg/mL , diinkubasi kembali selama 24 jam.

4.3.7.5 Penambahan larutan MTT (Reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide)

Media sel dibuang dengan cara dibalik *plate* dan dicuci dengan PBS, ditambahkan larutan MTT (reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) berwarna kuning 100 uL kesetiap sumuran. Inkubasi kembali selama 3-4 jam di dalam inkubator pada suhu 37 °C/ 5%CO₂ (sampai terbentuk kristal formazan atau perubahan warna menjadi biru). Apabila kristal formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*, lalu ditambahkan stopper SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% dalam 0,1 N HCl, dibungkus *plate* dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.

Langkah selanjutnya yaitu pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA *reader* untuk mengetahui nilai IC₅₀ setiap ekstrak. Tahapan awalnya ini dihidupkan ELISA *reader* dan ditunggu hingga *prosessing* selesai, dibuka pembungkus *plate* dan tutup *plate* kemudian dimasukkan ke ELISA *reader*, dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 550-600 nm (595 nm), dimatikan kembali ELISA *reader*. Lalu dihitung prosentase sel hidup dengan persamaan (5).

Prosentase sel hidup =

$$\frac{A-B}{C-B} \times 100\% \dots \dots \dots (5)$$

Keterangan :

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

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi control negatif (sel + media kultur)

Data dari prosentase sel hidup kemudian dianalisis untuk mengetahui nilai IC₅₀ dengan *microsoft excel*.

4.3.8 Karakterisasi TEM

Karakterisasi TEM bertujuan untuk mengetahui distribusi ukuran kuantitatif struktur mikro dari suatu material. Resolusi TEM yang tinggi mampu menunjukkan ukuran material hingga skala nano. Sampel yang dikarakterisasi harus dibuat setipis mungkin agar mampu tertembus elektron. Material yang terlalu tebal menyebabkan elektron tidak mampu menembus sampel sehingga gambar yang diperoleh tidak ada. Proses karakterisasi TEM yaitu mencampurkan sampel dengan dispersan seperti aquabides, etanol dan aseton lalu sampel diletakkan pada *grid* atau substrat yang diketahui memiliki lubang-lubang tak kasat mata. Selanjutnya siap untuk dikarakterisasi dengan alat TEM. Sampel dimasukkan ke dalam alat TEM yang telah divakumkan sebelumnya dengan mengatur tegangan sehingga elektron mampu menembus daerah terang atau lubang-lubang tak kasat mata pada *grid*. Menentukan fokus dan daerah yang akan dilakukan pengujian sehingga diperoleh hasil foto dengan skala pengukuran tertentu. Hasil foto tersebut diolah untuk menentukan distribusi ukuran partikel menggunakan software ImageJ (Nuraini, 2019).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Determinasi Tanaman

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

5.2 Persiapan Sampel

Dilakukan persiapan sampel dengan cara daun jambu dikeringkan dengan tidak menggunakan sinar matahari langsung untuk menghindari rusaknya komponen-komponen yang ada didalam daun jambu biji. Kemudian daun jambu kering yang didapat dihaluskan hingga menjadi serbuk. Daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dihaluskan menjadi serbuk untuk memperbesar luas permukaan sampel sehingga terjadinya kontak langsung antara sampel dengan pelarut.

5.3 Ekstraksi Daun Jambu Biji

Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Metode maserasi dipilih karena mudah dan sederhana. Pelarut atau penyari yang digunakan untuk maserasi yaitu etanol 96%. Pelarut etanol 96% adalah senyawa polar yang mudah menguap sehingga baik digunakan sebagai pelarut ekstrak. Alkohol merupakan pelarut serba guna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan (Harborne, 1987). Kelarutan terhadap air dari pelarut tersebut juga semakin tinggi dengan semakin tingginya tingkat kepolaran (Adijuwana, 1989; Sudarmadji dkk., 2007).

Pada proses maserasi ini digunakan sampel daun jambu biji (*psidium guajava* L.) yang berbentuk serbuk sebanyak 250 gram dan dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 700 mL, kemudian direndam selama 24 jam. Setelah didiamkan selama 24 jam kemudian disaring menggunakan corong yang dilapisi dengan kertas saring sehingga didapat filtrat kemudian ampas yang didapat diremeserasi sebanyak empat kali sampai larutan mendekati tidak berwarna (tersari semua). Proses remaserasi ini tidak jauh berbeda dengan proses maserasi. Perbedaan metode remaserasi terletak pada digunakannya sebagian pelarut untuk maserasi, dimana setelah penyaringan akan dilakukan penggunaan kembali terhadap komponen residu untuk kedua kalinya dengan sisa pelarut yang ada untuk kemudian disaring kembali. Setelah itu kedua filtrat digabungkan pada tahap akhir. Proses remaserasi ini bertujuan untuk memaksimalkan hasil ekstraksi yang didapat dan mendapatkan hasil ekstraksi yang lebih optimal dikarenakan pengulangannya yang berkali - kali. Pada proses remaserasi lebih menguntungkan untuk isolasi bahan alam, karena terjadinya kontak antara sampel dengan pelarut jauh lebih lama. Menurut List (1989), perendaman suatu bahan dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel melalui masuknya pelarut kedalam dinding sel sehingga membuat sel membengkak. Pembengkakan sel dapat menyebabkan senyawa yang terdapat dalam dinding sel tanaman akan terlepas dan masuk ke dalam pelarut. Hal ini menyebabkan difusi senyawa yang terekstraksi oleh pelarut keluar dari dinding sel tanaman.

Proses maserasi pada penelitian ini tidak menggunakan panas untuk mencegah rusaknya komponen – komponen yang tidak tahan terhadap panas walaupun membutuhkan waktu perendaman yang lebih lama. Ekstrak yang berupa cairan kemudian dikentalkan dengan cara diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 73 °C dikarenakan titik didih etanol 78 °C, 73 °C supaya senyawa yang diinginkan tidak ikut menguap. Ekstraksi maserasi dilakukan sebanyak 3 kali dikarenakan ekstrak yang didapat dari hasil maserasi yang pertama kurang mencukupi, sehingga ekstraksi maserasi dilakukan tiga kali. Hasil maserasi dari

serbuk daun jambu biji ditunjukkan pada Tabel 2 dengan perhitungan rendemen berat ekstrak pekat pada Lampiran 4.1.

Tabel 2. Hasil maserasi dari serbuk daun jambu biji

Pelarut	Perubahan warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Serbuk (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/b)
Etanol 96%	Hijau	Hijau pekat	750	287,935	38,39%

5.4 Fraksinasi

Fraksinasi adalah teknik pemisahan dan pengelompokan kandungan kimia ekstrak berdasarkan kepolaran. Pada proses fraksinasi digunakan dua pelarut yang tidak tercampur dan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Senyawa – senyawa yang terdapat dalam ekstrak akan terpisah menurut kepolarannya (Hawkins, and Rahn, 1997). Fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Fraksinasi diawali dengan pelarut non polar *n*-heksana, proses dilakukan hingga hasil fraksinasi tidak berwarna, sehingga didapat fraksi *n*-heksana dengan air. Proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kolom fraksinasi. Fraksi *n*-heksana digabung kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 62 °C dikarenakan titik didih *n*-heksana 68 °C supaya senyawa yang tidak diinginkan tidak ikut menguap. Fraksi *n*-heksana diuapkan sehingga didapat fraksi kental. Didapat hasil rendemen pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil fraksinasi N-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Ekstrak	Perubahan warna larutan fraksi	Warna ekstrak pekat	Berat sampel (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/b)
Fraksi <i>n</i> -heksana	Kuning jingga bening	Hijau kekuningan	153,5	5,526	2,77

Hasil ekstrak pekat fraksi *n*-heksana diujikan untuk penapisan fitokimia dan digunakan untuk sediaan formulasi SNEDDS untuk menentukan formulasi manakah yang lebih baik untuk uji aktivitas sel MCF-7 dan T47D.

5.5 Penapisan Fitokimia

Dilakukan penapisan fitokimia pada penelitian ini sebagai tahap pendahuluan dalam suatu penelitian yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Metode penapisan fitokimia dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna.

Pendekatan fitokimia meliputi analisis kuantitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, bunga, buah, dll). Terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif yaitu alkaloid, flavonoid, tanin (polifenol), saponin (steroid dan hiterpernoid), terpenoid (minyak atsiri) dan sebagainya. Dengan tujuan pendekatan penapisan fitokimia untuk mensurvei tumbuhan yang memiliki kandungan bioaktif atau kandungan yang berguna untuk pengobatan. Hasil penapisan fitokimia ini akan dicocokkan kandungan senyawa yang berada dalam daun jambu biji dengan hasil analisis LCMS/MS pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil penapisan fitokimia fraksi daun jambu biji

Bahan Uji	Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil pengamatan	Hasil Uji
Fraksi <i>n</i> -heksana	Alkaloid	<i>Dragendorf</i>	Larutan hijau	-
	Flavonoid	HCl+Mg	Lapisan alkohol (larutan jingga)	+
	Tanin/polifenol	FeCl ₃	Larutan hitam kehijauan	+
	Terpenoid	+Asam asetat anhidrat	Larutan merah keunguan	+
	Steroid	+H ₂ SO ₄ +Asam asetat anhidrat +H ₂ SO ₄	Larutan biru kehijauan	+

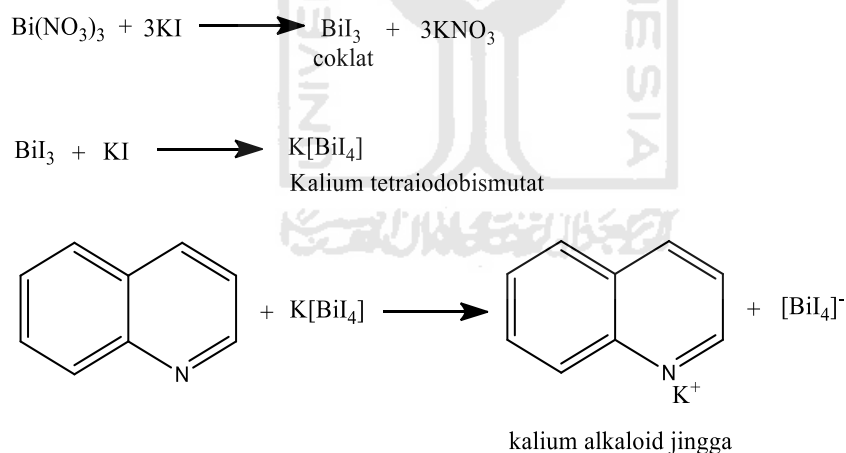
Ket.: + : Positif (terdapat senyawa)

- : Negatif (tidak terdapat senyawa)

5.5.1 Analisis hasil penapisan fitokimia

5.5.2 Uji Alkaloid

Uji alkaloid menunjukkan hasil negatif dengan tidak terbentuknya endapan jingga setelah direaksikan dengan pereaksi Dragendorff. Senyawa alkaloid bereaksi dengan pereaksi Dragendorff (kalium tetraiodobismutat) menghasilkan endapan jingga hingga merah kecokelatan. Pada reaksi ini terjadi penggantian ligan dimana nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat menghasilkan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Haryati dkk, 2015).



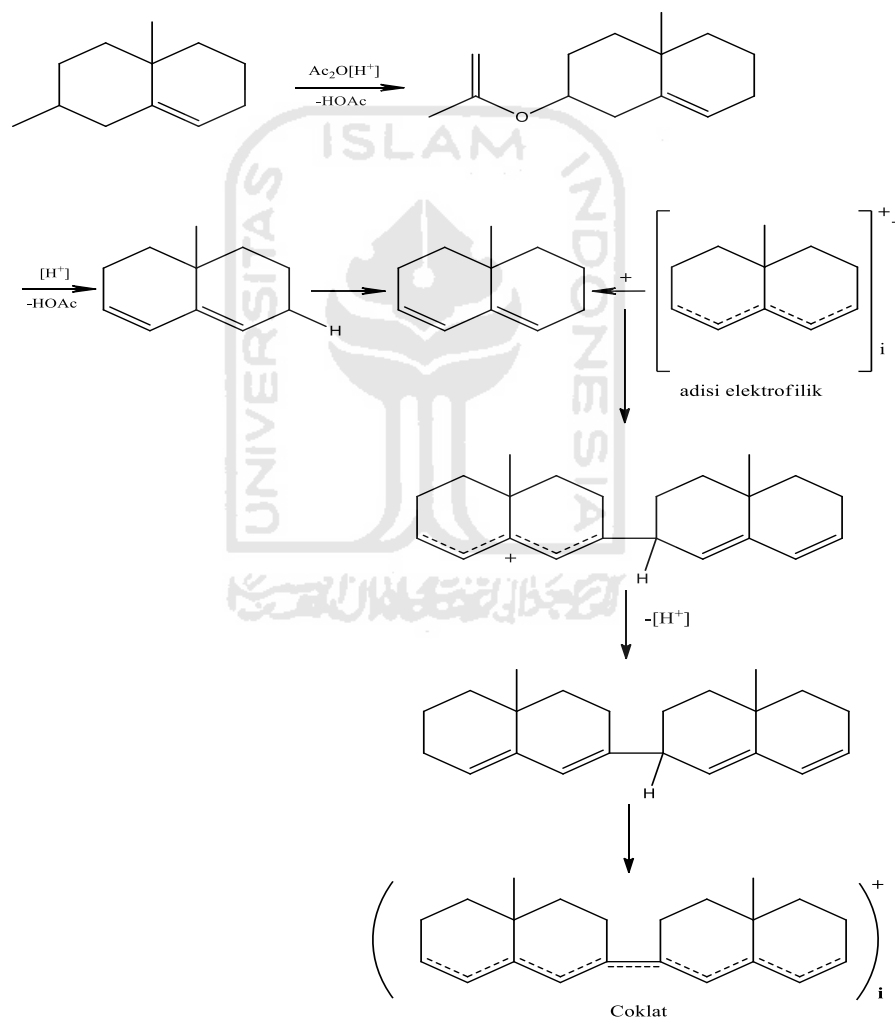
Gambar 10. Reaksi uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff

(Miroslav, 1971)

5.5.3 Uji Terpenoid

Identifikasi terpenoid dan steroid pada ekstrak daun jambu biji memberikan hasil positif dengan terbentuknya cincin coklat keunguan pada batas antara kloroform dan H_2SO_4 , selain itu ketika ditambahkan 2 mL asam sulfat terlihat warna hijau

menjadi warna hijau pekat. Perubahan warna ini disebabkan adanya oksidasi pada golongan senyawa terpenoid/steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Prinsip reaksi dalam uji terpenoid adalah kondensasi atau pelepasan H_2O dan penggabungan karbokation dan menyebabkan adisi elektrofilik diikuti dengan pelepasan hidrogen. Gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas sehingga mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan adanya cincin coklat (Siadi K, 2012).

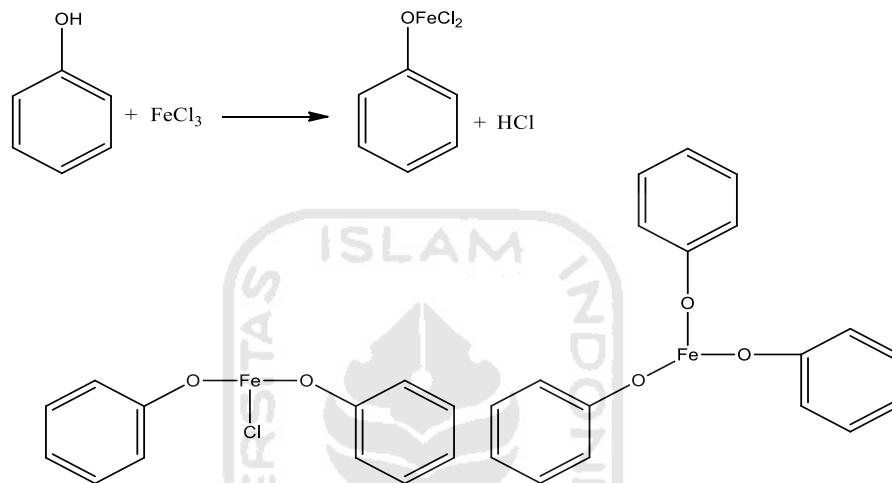


Gambar 11. Reaksi pada uji terpenoid dengan pereaksi Liebermann Burchard

(Setyowati dkk., 2014)

5.5.4 Uji Fenolik/Polifenol

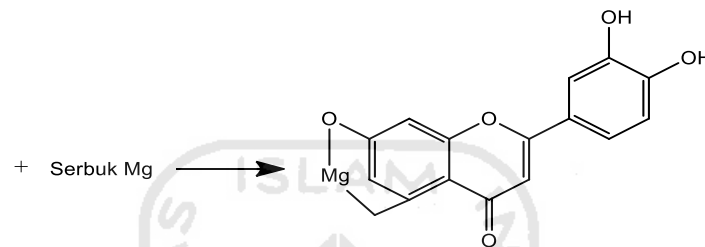
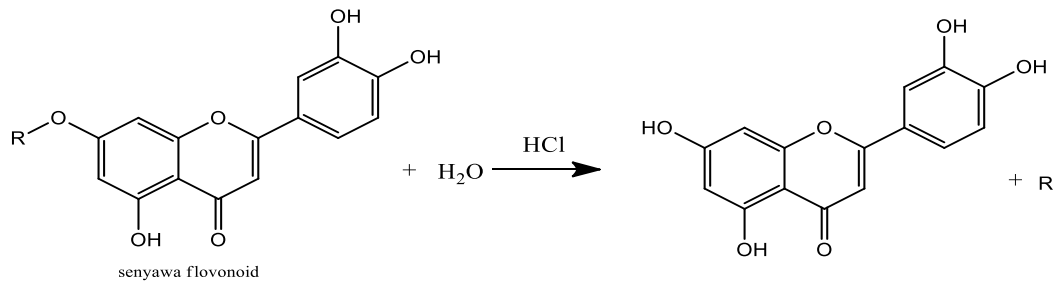
Pada uji fenolik digunakan pereaksi berupa FeCl_3 . Apabila terjadi perubahan warna menjadi merah, hijau, ungu atau biru menunjukkan adanya senyawa golongan fenolik (Marliana dkk., 2005). Reaksi pada uji fenolik ditunjukkan pada Gambar 12 .



Gambar 12. Reaksi uji fenolik
(Wicaksana, 2018).

5.5.5 Uji Flavonoid

Identifikasi golongan flavonoid dilakukan dengan menambahkan HCl dan serbuk Mg pada ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) dalam tabung reaksi. Indikator positif uji flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi merah atau coklat. Dari hasil uji pada ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*), warna yang muncul adalah , hal ini menandakan bahwa flavonoid bereaksi dengan pereaksi HCl dan Mg.



Gambar 13. Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat
(Marliana, 2005)

5.6 Karakterisasi SNEDDS

SNEDDS adalah salah satu formulasi nanopartikel berbasis minyak atau lemak. SNEDDS merupakan campuran isotropik antara minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang dapat membentuk nanoemulsi secara spontan ketika kontak dengan cairan lambung (Sun dan Han, 2011; Makadia dkk., 2013). Formulasi sediaan SNEDDS akan meningkatkan disolusi dari zat aktif dengan cara memfasilitasi pembentukan fase tersolubilisasi dan meningkatkan transpor melalui sistem limfatik usus, serta menghindari effluks P-gp, sehingga dapat meningkatkan absorpsi dan bioavailabilitas zat aktif dari saluran cerna (Singh dkk., 2009). Berikut adalah formulasi untuk sediaan SNEDDS pada Tabel 5.

Tabel 5. Formulasi SNEDDS

Formula	Minyak	Surfaktan	Co-surfaktan	Konsentrasi % fraksi
	Capryoll	Tween 20	PEG	
1	30	50	20	40
2	30	50	20	60
3	30	50	20	80

Pada Tabel 5 dibuat formulasi dengan dilakukannya sonikasi disetiap penambahan capryoll, Tween 20, dan PEG selama 2 x 4 menit. Dilakukannya ekstraksi sonikasi dapat menyebabkan gangguan fisik baik pada dinding maupun membran sel biologis serta penurunan ukuran partikel. Efek tersebut berdampak pada penetrasi pelarut yang lebih baik terhadap material sel yang pada akhirnya akan meningkatkan laju perpindahan massa pada jaringan serta memfasilitasi perpindahan senyawa aktif dari sel ke pelarut (Novak dkk,2008). Proses sonikasi ini menggunakan gelombang ultrasonik dan gelombang ultrasonic pada sekeliling bahan yang akan diekstraksi akan melakukan pemanasan pada bahan tersebut dan melepaskan senyawa ekstrak. Terjadi juga pengacauan dinding sel sehingga membebaskan senyawa yang ada didalamnya, mendukung pelepasan komponen sel, dan meningkatkan transfer massa. Dan pemanasan local pada cairan akan meningkatkan difusi ekstrak.

5.7 Karakterisasi PSA

Ukuran Partikel

Nanopartikel merupakan suatu teknik penyalutan bahan yang ukurannya sangat kecil, dengan diameter rata-rata 10-1000 nm (Mohanraj dan Chen, 2006). Keuntungan penggunaan nanopartikel sebagai sistem pengantaran terkendali obat ialah ukuran dan karakteristik permukaan nanopartikel mudah dimanipulasi untuk mencapai target pengobatan. Nanopartikel juga mengatur dan memperpanjang pelepasan obat selama proses transpor ke sasaran, dan obat dapat dimasukkan ke dalam sistem peredaran darah dan dibawa oleh darah menuju target pengobatan (Mohanraj dan Chen 2006). Semakin kecil ukuran partikel, maka semakin besar luas permukaan obat yang didapatkan. Hal ini akan meningkatkan penyerapan obat oleh nanopartikel ke dalam sistem pencernaan manusia, sehingga aktivitas obat lebih optimal dan efisien. Selain itu, pengecilan ukuran partikel dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kelarutan dan peningkatan tersebut dapat meningkatkan bioavailabilitas dan efekasinya. (Rawat dkk., 2006).

Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji (*Psidium Guajava L*) pelarut n-heksana dengan variasi pada Tabel 5 yaitu 40%, 60%, dan 80%

dengan perbandingan 30:50:20. Dimana 30 untuk capryoll sebagai minyak, 50 untuk Tween 20 sebagai surfaktan dan 20 untuk PEG sebagai ko-surfaktan. Menunjukkan bahwa formulasi varian tersebut dapat dikategorikan sebagai nanopartikel, hal ini karena sebuah partikel dapat dikatakan nano apabila memiliki ukuran partikel diantara 1-1000 nm sudah dapat dikatakan sebagai sistem nanopartikel (Rawat dkk., 2006). Hasil karakterisasi PSA pada Tabel 6 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 40% didapatkan rata-rata replikasi sebanyak 3 kali yaitu 140 nm, dan konsentrasi 60% didapatkan rata-rata 136,06 nm dan pada konsentrasi 80% didapatkan rata-rata 133,2nm. Maka daun jambu biji yang diformulasi dengan perbandingan 30:50:20 maka termasuk nanopartikel karena ukurannya yang tidak lebih dari 1000 nm. Hasil dari ketiga konsentrasi tergolong bagus dikarenakan pada penelitian terdahulu melaporkan partikel obat yang ukurannya kurang dari 100 nm untuk uji aktivitas antikanker akan menyebabkan ekstrak yang berukuran nanopartikel tersebut masuk hingga keotak.

Peningkatan konsentrasi fraksi *n*-heksana ekstrak daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) pada penelitian ini tidak meningkatkan ukuran partikel seperti penelitian sebelumnya yaitu penambahan konsentrasi ekstrak dan minyak akan mengakibatkan semakin besar ukuran partikel (Aditya,2018). Peningkatan konsentrasi ekstrak dengan penambahan minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan yang sama seharusnya meingkatkan ukuran partikel, karena terjadinya lebih banyak aglomerasi antara ikatan partikel dalam ekstrak dengan minyak akan semakin padat sehingga partikel cenderung bergerombol dan beraglomerasi membentuk agregat menjadi partikel yang lebih besar berukuran mikro. Namun ukuran partikel yang didapat tergolong bagus dikarenakan perbedaan antara ukuran partikel yang satu dengan yang lainnya tidak lebih dari 10 nm atau tidak terpantau jauh. Dalam penelitian ini formula F3 memiliki ukuran partikel terbaik dikarenakan ukurannya paling kecil. Formula dengan ukuran yang paling kecil ini akan dilanjutkan untuk analisis TEM yang akan dilihat morfologinya.

Berdasarkan nilai indeks polidispersitas yang didapatkan dari pengukuran ukuran partikel dengan PSA fraksi *n*-heksana dari ekstrak daun jambu biji (*Psidium*

Guajava L.) dengan berbagai variasi konsentrasi menunjukkan bahwa F1, F2 dan F3 memiliki ukuran yang seragam. Nilai indeks polidispersitas yang didapat tidak lebih dari 0,7 yang dapat diindikasikan bahwa keseragaman partikelnya seragam. Menurut Yuan dkk (2008), semakin kecil nilai indeks polidispersitas maka ukuran partikel semakin homogen. Selain itu, hasil polidispersitas dari ketiga formula menunjukkan homogenitas yang tinggi karena menurut Avadi dkk (2010) nilai indeks polidispersitas lebih besar dari 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi, dan sebaliknya jika mendekati nilai 0 menunjukkan ukuran partikel yang seragam. Nilai indeks polidispersitas yang didapat pada konsentrasi 40%, 60%, dan 80% secara berturut-turut yaitu 0,387; 0,394 dan 0,379. Dapat diketahui bahwa nilai yang didapat menunjukkan ukuran partikel yang seragam karena tidak lebih besar dari 0,5. Dalam sistem penghantaran obat, semakin kecil ukuran partikel maka akan menyebabkan semakin besar luas permukaan antarmuka yang disediakan untuk penyerapan obat (Balakumar dkk., 2013). Hal ini menunjukkan bahwa metode pembuatan SNEDDS yang digunakan untuk preparasi nanoemulsi memiliki reliabilitas yang baik. Hasil pengujian ukuran partikel menggunakan beberapa formula adalah semakin besar konsentrasi surfaktan yang digunakan dapat menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil. Tween 20 sebagai surfaktan dapat digunakan dalam pembuatan makanan, obat-obatan, kosmetik dan produk farmasi lainnya.

Pada pengembangan formulasi nanoemulsi, dilaporkan bahwa surfaktan yang sangat terlokalisasi ke permukaan tetesan emulsi mengurangi energi bebas interfacial dan memberikan penghalang mekanis untuk koalesensi yang menghasilkan dispersi spontan secara termomekanik (Pouton dan Porter, 2008). Selanjutnya, ko-surfaktan meningkatkan fluiditas antar muka dengan menembus ke dalam film surfaktan yang menciptakan ruang hampa di antara molekul surfaktan (Contantinides dan Scarlet, 1997). Capryol 90 memiliki sifat nonpolar yang artinya tidak larut dalam air (Sadurni dkk., 2005). Berdasarkan penelitian sebelumnya penggunaan Capryol 90 sering digunakan sebagai fase minyak dalam formulasi SNEDDS karena memiliki

kemampuan melarutkan obat secara maksimal dan juga mampu menghasilkan nanoemulsi dengan ukuran tetesan yang diharapkan serta menjaga stabilitas dari SNEDDS itu sendiri (Makadia dkk., 2013).

Zeta Potensial

Nilai zeta potensial secara umum digunakan untuk mengetahui sifat umum partikel dan kestabilan nanopartikel. Nanopartikel dengan nilai zeta potensial lebih besar dari +30 mV atau kurang dari -30 mV biasanya memiliki derajat stabilitas tinggi. Partikel dengan nilai zeta potensial rendah akan menghasilkan agregat karena ikatan Van Der Waal antar partikel (Ronson,2012). Potensial zeta 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. Ketika terdisosiasi dalam medium pendispersi, ion berlawanan akan mendekat kepermukaan partikel dan bertindak sebagai penahan yang mengurangi gaya tarik-menarik elektrostatis antar partikel yang dapat menyebabkan partikel-partikel bergabung (Ujhelyi dkk.,2018).

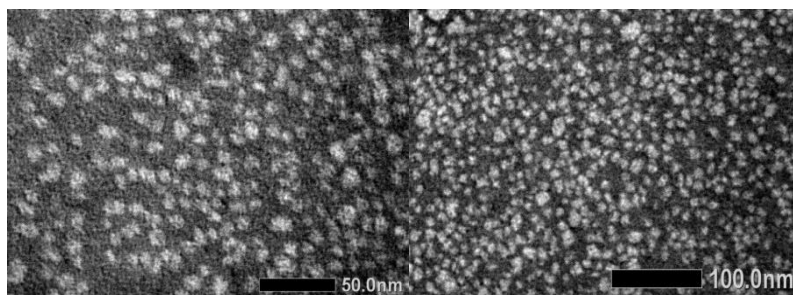
Potensial zeta yang rendah mengakibatkan daya tarik menarik muatan antar partikel dispersi melebihi daya tolak menolaknya sehingga kemungkinan terjadinya flokulasi lebih besar. Namun karena sediaan dibuat dalam bentuk SNEDDS maka sediaan tersebut dirasa sudah tepat karena sediaan lebih stabil dibandingkan dalam bentuk nanoemulsi dimana sediaan dalam bentuk SNEDDS hanya akan teremulsi ketika sudah dikonsumsi dan kontak dengan cairan gastrointestinal. Didapat nilai zeta potensial yang merupakan hasil karakterisasi dengan menggunakan PSA dalam bentuk sediaan nanopartikel yang diketahui pada konsentrasi 80%, 60% dan 40% memiliki kestabilan nano partikel baik karena kurang dari -30 mV. Namun pada konsentrasi 80% memiliki kestabilan terbaik karena yang paling jauh nilainya dari -30 mV.

Tabel 6. Hasil karakterisasi sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji dengan PSA

Formula	Konsentrasi Ekstrak	Ukuran Partikel (nm)	<i>Polidispers Index</i>	<i>Zeta Potensial</i>
F1	40 %	135,1	0,320	-70,3
(30:50:20)	40 %	144,8	0,390	-69,3
	40 %	140,1	0,453	-67,5
	Rata-rata :	140	0,387	-69,03
F2	60 %	137,8	0,311	-72,4
(30:50:20)	60 %	136,0	0,466	-71,4
	60 %	134,4	0,405	-72,7
	Rata-rata :	136,06	0,394	-72,16
F3	80 %	134,3	0,429	-85,3
(30:50:20)	80 %	134,2	0,399	-84,0
	80 %	131,1	0,309	-84,86
	Rata-rata :	133,2	0,379	-84,86

5.8 Karakterisasi TEM

Morfologi partikel nanoemulsi perlu diketahui karena jika bentuk partikel nanoemulsi yang kurang sferis akan mempermudah kontak antar partikel menjadi berujung pada agregasi (Couvreur dkk., 2002)



Gambar 14. Morfologi Nanoemulsi Ekstrak Daun Jambu Biji

Hasil uji TEM menunjukkan bahwa ukuran partikel relatif seragam dan tidak bertumpuk yang menunjukkan bahwa dispersi minyak, surfaktan, kosurfaktan, dan air terdispersi merata dalam sediaan nanoemulsi dengan ukuran yang seragam.

Nanoemulsi memiliki bentuk tetesan (*droplet*) bulat yang relatif seragam dan tidak mudah mengalami koalesens pada rentang suhu yang ekstrim karena nanoemulsi bersifat stabil secara termodinamik. Selain itu tetesan nanoemulsi juga dilindungi oleh surfaktan dan kosurfaktan, sehingga meminimalkan penggabungan antar fase dispers (Tsakalakos, 2003).

Sampel yang dipilih untuk dilakukan analisis dengan TEM yaitu ekstrak daun jambu biji dengan formulasi terbaik yaitu dengan konsentrasi 80% (30:50:20). Sampel dapat dikatakan terbaik dari hasil analisis menggunakan PSA (*particle size analyzer*) yang menunjukkan ukuran partikelnya yang paling terkecil, zeta potensial dan nilai PI (*polydispersitas index*).

5.9 Uji Aktivitas Antikanker secara In Vitro dengan Metode MTT

Uji aktivitas antikanker dilakukan untuk mengetahui potensi nanoemulsi fraksi *n*-heksana dari ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Pada pengujian ini akan diketahui toksisitasnya yang mempunyai korelasi dengan aktivitas obat antikanker dan diapatkan nilai IC₅₀. Digunakan variasi konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 µg/mL. Sampel yang digunakan memiliki perbedaan konsentrasi yaitu 40%, 60% dan 80%, perbedaan tersebut dirancang untuk membandingkan konsentrasi pada formulasi yang menunjukkan nilai IC₅₀ yang terendah maupun terbaik dan tingkat efektifitasnya. Uji aktivitas antikanker ini dilakukan secara *In Vitro* menggunakan sel T47D dan MCF-7 dengan metode MTT (*Microculture tetrazolium*). Metode MTT merupakan pengujian aktivitas sel terhadap warna atau reaksi kalorimetri pada bioreduksi garam tetrazolium ke formazan (Goodwin, dkk, 1995). Pengujian secara *In Vitro* menggunakan biakan sel (*cell line*) yang memberikan kelebihan dibandingkan pengujian secara *In Vivo* yakni bahan uji yang digunakan lebih sedikit dan waktu pengujian relative singkat (Widowati, dkk, 2009).

Pengujian aktivitas antikanker secara *In Vitro* dilakukan dengan beberapa tahap, tahap pertama dilakukan dengan menyiapkan sel kanker. Sel kanker yang sudah ditanam dipanen, kemudian dilakukan uji sitotoksik dan dilakukan pemberian

reagen MTT atau pewarnaan. Dan tahap terakhir pembacaan absorbansi. Penyiapan sel dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu menghidupkan kembali sel yang ditidurkan (*cell inactivity*) dan ditumbuhkan kembali hingga mencapai konfluen. Konfluensi sel adalah tumbuh homogenya atau meratanya sel sebagai *monolayer cell* yang menutupi *cover glass*.

Panen sel adalah tahapan penumbuhan dan pengembangbiakan sel dengan penambahan media kultur. Panen sel dilakukan ketika sel yang dikultur telah membentuk monolayer konfluen 80%. Prinsip dari panen sel adalah melepaskan ikatan antar sel dan ikatan antar sel dengan matrik tanpa merusak sel (CCRC, 2009). Media kultur untuk sel kanker payudara T47D adalah RPMI karena mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, glukosa, vitamin, fungisida (anti jamur), dan serum. Serum yang digunakan FBS (*Fetal Bovine Serum*) yang berasal dari serum sapi mengandung hormon yang memacu pertumbuhan sel (Fresney, 2009). Sedangkan untuk sel MCF-7 menggunakan media DMEM.

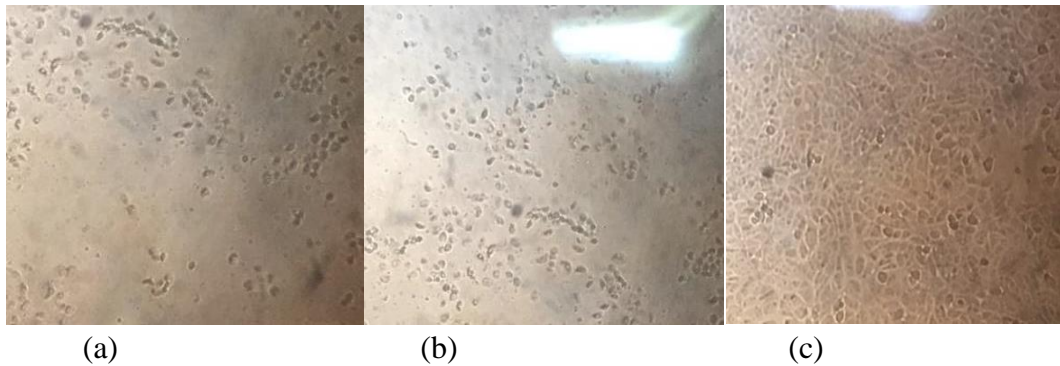
Panen sel ini menunjukkan bahwa sel akan menempel pada dasar wadah kultur (*culture dish*) karena memiliki sifat adesif yang mampu melekat pada substrat (Aillah, 2015). Ditambahkan tripsin untuk melepaskan sel yang menempel. Tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara glikoprotein dan proteoglikan dengan dasar wadah kultur, akibatnya sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada dasar wadah dan mengapung dipermukaan (Doyle dan Griffith, 2000). Selanjutnya dilakukan perhitungan sel dengan menggunakan *hemocytometer* dibawah mikroskop *Inverted* yang berfungsi untuk mengetahui jumlah sel yang berada pada setiap kotak, dimana sebelumnya sel dimasukkan kedalam bilik dan dihitung 4 kali pada 16 kotak. Hasil perhitungan jumlah sel yang diperoleh yaitu untuk sel T47D adalah 142×10^4 dan untuk sel MCF-7 adalah 122×10^4 .

Tahapan uji sitotoksik meliputi subkultur sel, preparasi sampel, treatment sel dan pewarnaan. Pada tahapan subkultur akan dilakukan pemindahan sel dari kondisi konfluen ketempat yang masih kosong. Tahapan ini bertujuan agar sel yang

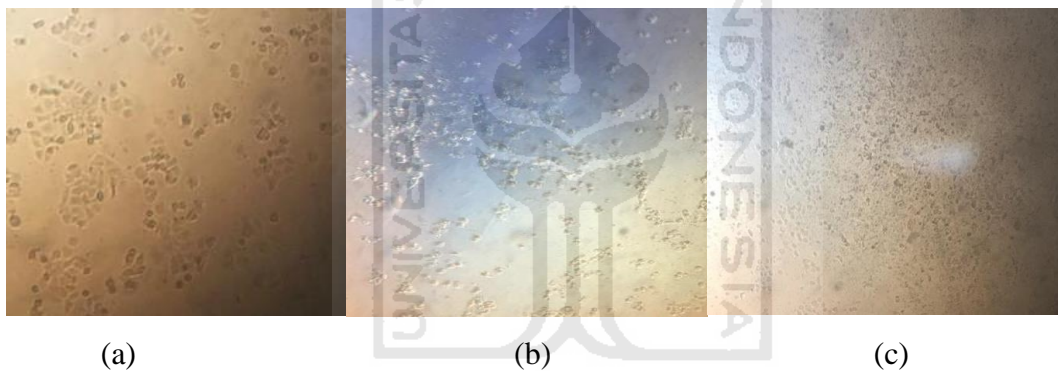
digunakan dalam pengujian dapat tumbuh secara maksimal pada medianya (CCRC, 2009). Sel yang diambil untuk dimasukkan kedalam *Plate 96* yaitu untuk sel T47D 0,704 mL sel dan sel MCF-7 0,990 mL sel.

Tahap selanjutnya adalah preparasi sampel lalu melarutkan sampel yang sudah ditimbang pada setiap konsentrasi. Syarat sampel yang digunakan untuk bahan uji dalam kultur sel harus larut dalam media kultur sehingga dibantu dengan menggunakan *cosolvent* DMSO. Dimetilsulfoksida (DMSO) merupakan cairan tak berwarna yang memiliki rumurs $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$ pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar (Morshed, dkk., 2012). Selain itu, penentuan seri konsentrasi harus merupakan kelipatan dari konsentrasi tersebut sehingga diperoleh hasil regresi yang sesuai standart (CCRC, 2009). Dalam penelitian ini menggunakan 7 variasi konsentrasi yaitu 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Setelah sel dilakukan *treatment*, sel dilihat morfologinya di mikroskop *Inverted* pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Dapat dilihat bahwa pada sampel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) 80% di konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ memiliki jumlah sel mati lebih banyak dibandingkan dengan konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$ dan pada konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ jumlah sel yang hidup sudah mulai lebih banyak lagi dan semakin kecil konsentrasi sel yang hidup semakin banyak. Pada sampel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang sudah ternanoemulsi di 60% dan 40% memiliki kesamaan seperti pada sampel konsentrasi 80% bahwa sel pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ jumlah sel yang mati yang paling banyak dan semakin kecil konsentrasi jumlah sel yang hidup semakin banyak. Morfologi tersebut dapat dilihat pada Gambar 15 dan 16.



Gambar 15. Morfologi sel T47D setelah ditreatment pada sampel konsentrasi 80% (a) sel T47D konsentrasi 1000 µg/mL (b) sel T47D konsentrasi 250 µg/mL (c) sel T47D konsentrasi 15,625 µg/mL

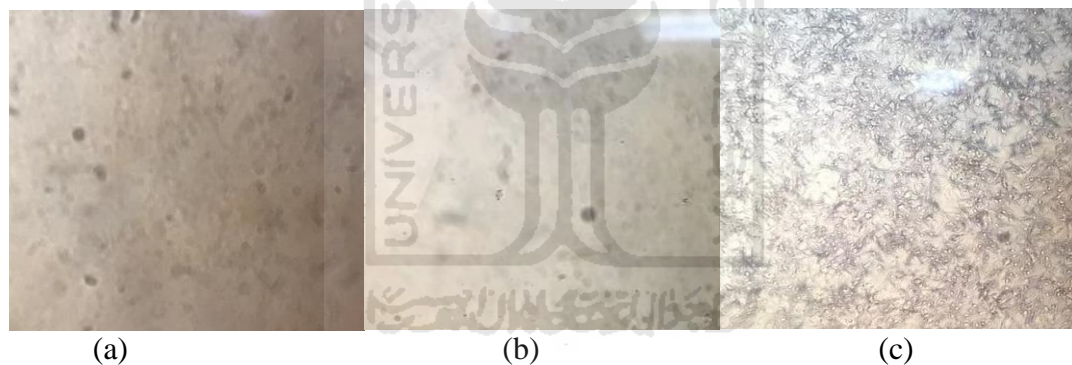


Gambar 16. Morfologi sel MCF-7 setelah ditreatment pada sampel konsentrasi 80% (a) sel T47D konsentrasi 1000 µg/mL (b) sel T47D konsentrasi 250 µg/mL (c) sel T47D konsentrasi 15,625 µg/mL.

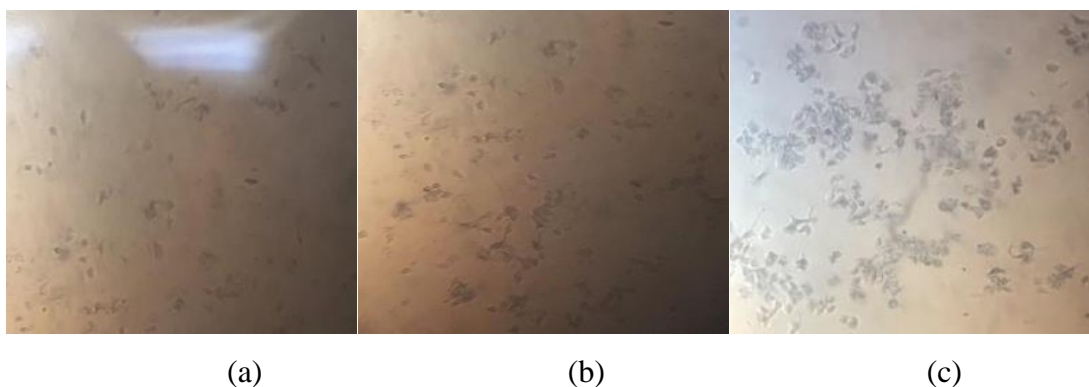
Berdasarkan gambar dapat diketahui bahwa sel yang mati berbentuk bulat, mengapung dan tersebar. Sel hidup berbentuk lonjong dan saling berdempet dengan sel lainnya yang ada disekitarnya dan menempel pada dasar wadah kultur. Hasil treatment tidak dapat dilihat secara kasat mata tetapi setelah penambahan reagen MTT dapat diamati karena terjadi reaksi kalorimetri dengan mikroskop *inverted*.

Dalam penelitian ini menggunakan metode MTT yang merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menguji aktivitas sel dengan indikasi sel yang hidup akan mengabsorpsi reagen MTT dan akan membentuk kristal formazan yang berwarna ungu. Formazan merupakan zat yang berwarna ungu yang tidak larut dalam

air sehingga ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl sebagai pe penghambatan pembentukan Kristal sebelum dianalisis (A'illah, 2015). Intensitas warna ungu tersebut dapat digunakan dengan menggunakan ELISA *reader* (*microplate reader*) untuk menghitung absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm. Penggunaan panjang gelombang pada 595 nm karena warna yang tampak pada larutan adalah ungu kebiruan yang akan menyerap warna kuning dari spectrum sinar tampak (Effendy, 2007). Data yang dihasilkan dari uji tersebut berhubungan dengan jumlah sel yang melakukan metabolisme, sehingga berhubungan dengan jumlah sel yang hidup (*viabilitas sel*). Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dapat diketahui potensi sel dalam menghambat kanker, karena semakin besar nilai absorbansi semakin besar pula *viabilitas* selnya (semakin banyak sel hidup) (Meiyanto, dkk., 1999).



Gambar 17. Morfologi sel T47D setelah pewarnaan pada sampel konsentrasi 80% (a) sel T47D konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ (b) sel T47D konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ (c) sel T47D konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 18. Morfologi sel MCF-7 setelah pewarnaan pada sampel konsentrasi 80% (a) sel T47D konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ (b) sel T47D konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ (c) sel T47D konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan gambar dapat dilihat bahwa setelah pewarnaan dengan menggunakan metode MTT sel T47D dan sel MCF-7 sel yang masih hidup atau masih cukup banyak sel yang hidup pada konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Sel yang sebelumnya berbentuk lonjong untuk sel T47D dan bulat untuk sel MCF-7 menjadi terpecah, dan pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan 250 $\mu\text{g/mL}$ sel yang hidup sudah tidak ada lagi dan tidak ada didasar wadah, sehingga sel yang mati ikut terbuang saat pencucian dengan menggunakan PBS. Setelah pewarnaan sel terjadi perubahan warna sel menjadi ada yang berwarna ungu pekat dan ungu muda. Perubahan warna yang terjadi dalam *plate 96 well* dapat diamati secara jelas dan secara kualitatif dengan melihat perbedaan warna yang dilihat dari konsentrasinya. Ekstrak daun jambu biji yang sudah dinanoemulsi pada konsentrasi 100, 500, 250 $\mu\text{g/mL}$ di sel T47D berwarna kuning. Hal ini menunjukkan bahwa sel kanker telah mati artinya tidak ada enzim reduktase yang dihasilkan dalam mitokondria sel yang mereduksi garam tetrazolium menjadi kristal formazan yang berwarna ungu. Sedangkan pada konsentrasi 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan warna ungu, sehingga ekstrak daun jambu biji yang sudah dinanoemulsi ini baik sebagai penghambat sel kanker pada konsentrasi tinggi. Sel MCF-7 setelah pewarnaan dengan menggunakan metode MTT sel yang masih hidup atau masih cukup banyak sel yang hidup pada konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$ sel yang sebelumnya berbentuk bulat menjadi terpecah, dan pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan 250 $\mu\text{g/mL}$ sel yang hidup sudah tidak ada lagi dan tidak ada didasar wadah, sehingga sel yang mati ikut terbuang saat pencucian dengan menggunakan PBS. Sel yang masih hidup dimulai dari konsentrasi 125 $\mu\text{g/mL}$ hingga konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Perubahan warna yang terjadi dalam *plate 96 well* dapat diamati secara kualitatif dengan melihat perbedaan warna yang dilihat dari masing-masing konsentrasi. Ekstrak daun jambu biji yang sudah dinanoemulsi pada konsentrasi 100, 500, 250 $\mu\text{g/mL}$ di sel MCF-7 memiliki warna ungu muda dan di konsentrasi 125;

62,5; 31,25; dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan warna ungu yang lebih tua, sehingga ekstrak daun jambu biji yang sudah dinanoemulsi ini baik sebagai penghambat sel kanker pada konsentrasi tinggi. Pada konsentrasi tinggi tidak menghasilkan warna ungu yang terlalu tua. Hal ini menunjukkan bahwa sel kanker telah mati artinya tidak ada enzim reduktase yang dihasilkan dalam mitokondria sel yang mereduksi garam tetrazolium menjadi kristal formazan yang berwarna ungu.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut dapat diketahui bahwa ada hubungan antara aktivitas sel hidup dan warna yang dihasilkan (Mosmann dkk., 1983). Semakin ungu maka semakin banyak sel hidup karena sel tersebut yang melakukan reaksi metabolisme sehingga warna ungu semakin pekat dan jumlah kristal formazan semakin banyak. Terdapat hubungan antara absorbansi dengan warna ungu yang dihasilkan dimana jika semakin pekat warna ungu maka absorbansinya tinggi. Metode *MTT Assay* merupakan metode dalam uji sitotoksitas yang sering digunakan karena dapat menunjukkan hubungan antara jumlah sel hidup dan absorbansi yang diperoleh untuk mendapatkan nilai IC_{50} (Nita, 2019).

Berdasarkan absorbansi yang diperoleh ekstrak daun jambu biji (*Psidium Guajava L.*) memiliki nilai absorbansi dibawah nilai absorbansi dari kontrol sel sehingga mempengaruhi pertumbuhan sel. Ketiga sampel yang berbeda memiliki nilai absorbansi dibawah absorbansi dari kontrol sel pada sel T47D maupun sel MCF7. Dan jika memiliki nilai absorbansi yang mendekati dari nilai absorbansi blank maka sel yang mati semakin banyak dan sel yang hidup semakin sedikit.

Tabel 7. Nilai IC_{50} uji aktivitas antikanker

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	T47D	MCF-7	Vero
Fraksi <i>n</i> -heksana 40%	115,747	83,410	269,513
Fraksi <i>n</i> -heksana 60%	104,786	82,603	295,329
Fraksi <i>n</i> -heksana 80%	96,981	81,706	321,195

Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi sel hidup. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan

potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik (Sitorus, 2013). Uji toksisitas mempunyai korelasi dengan aktivitas obat antikanker. Berdasarkan pada nilai-nilai IC_{50} , sitotoksitas yang tingkat ekstrak dapat dibagi menjadi kuat ($<100\mu\text{g/ml}$), sedang ($101-200\mu\text{g/ml}$), dan lemah ($>200\mu\text{g/ml}$). Semakin rendah nilai IC_{50} semakin tinggi toksisitas terhadap kematian hewan percobaan, maka senyawa tersebut aktif terhadap sel tumor atau sel kanker (Depkes RI, 2000). Nilai IC_{50} yang kecil menunjukkan bahwa ekstrak dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dimana, jika dengan konsentrasi yang kecil memiliki daya penghambatan yang besar sehingga dapat dikatakan ekstrak tersebut sangat efektif. Berdasarkan Tabel 7 diperoleh informasi bahwa diantara fraksi *n*-heksana 80% tersebut dapat diketahui masuk kategori aktif terhadap sel T47D, aktif terhadap MCF-7. Dan semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi juga toksisitasnya dikarenakan semakin cepatnya terjadi kematian karena tingginya konsentrasi. Dengan kata lain, semakin besar pula keracunan yang ditimbulkan. Dapat dilihat dari nilai SI apakah pada konsentrasi 80% mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal.

Penelitian tentang uji aktivitas antikanker fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) terhadap sel T47D dan MCF-7 yang dilakukan oleh Nita (2019) menghasilkan nilai LC_{50} sebesar $6,95\mu\text{g/mL}$ dan $4,38\mu\text{g/mL}$. Dari penelitian tersebut dapat diketahui bahwa fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antikanker terhadap sel T47D dan MCF-7.

5.9.1 Hasil pengujian aktivitas antikanker fraksi *n*-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) terhadap sel T47D dan MCF-7

Setelah dilakukan uji maka didapatkan hasil pengujian aktivitas antikanker fraksi daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) terhadap sel kanker T47D, MCF-7 dan berupa selektivitas dari fraksi *n*-heksana pada pada 3 konsentrasi berbeda yaitu 40%, 60% dan 80% terhadap ketiga kanker berdasarkan indeks selektivitas menggunakan rumus:

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

Nilai indeks selektivitas atau SI (*selectivity indeks*) *n*-heksana disajikan pada

Tabel 8.

Tabel 8. Nilai SI (selectivity indeks) hasil uji sitotoksitas

Sampel	Nilai SI (<i>selectivity Indeks</i>)	
	T47D	MCF-7
Fraksi <i>n</i> -heksana 40%	2,32	3,231
Fraksi <i>n</i> -heksana 60%	2,818	3,575
Fraksi <i>n</i> -heksana 80%	3,311	3, 937

Selektivitas obat antikanker dapat diukur dengan menghitung indeks selektivitas yaitu menghitung IC_{50} sel normal dibagi dengan IC_{50} sel kanker (Badisa dkk., 2009). Machana dkk. (2011) menyatakan nilai selectivity index (SI) >3 menunjukkan selektivitas tinggi. Selectivity index yang disyaratkan adalah >3 menandakan bahwa sampel mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen kemopreventif.

Agen kemopreventif adalah suatu senyawa yang dapat mencegah dan menghambat perkembangan sel kanker. Selektivitas agen kemopreventif yaitu hanya sel yang diidentifikasi sebagai sel kanker saja yang diserang, sementara sel normal tidak diserang. Mekanisme ini sangat berbeda dengan cara kerja obat kemoterapi yang menyerang sel kanker dan juga sel normal. Akibatnya sel normal ikut rusak dan mati yang berakibat pada timbulnya berbagai macam efek samping (Sutejo dkk., 2016).

Mekanisme penghambatan dari setiap senyawa berbeda-beda terhadap sel yang berbeda pula. Namun, secara umum dapat dijelaskan yaitu dalam suatu sel kanker terdapat DNA dimana terjadi suatu siklus sel yang nantinya terus berkembang atau berproliferasi dengan cepat sehingga sulit untuk dihentikan. Dengan adanya suatu senyawa tersebut maka akan masuk ke dalam DNA dan berikatan sehingga akan menghambat proses replikasi dari DNA sel tersebut dan terjadilah

penghambatan pada pertumbuhan sel kanker tersebut. Dimana menurut Harahap (2003) secara umum guanin biasanya terlibat dalam proses alkilasi pengobatan antikanker. Pembentukan alkil guanin yang disusul dengan pembentukan tautan silang (*crosslink*) menandakan sitotoksitas,

Sel Vero merupakan sel line yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (African green monkey). Sel Vero berbentuk poligonal dan pipih, merupakan sel monolayer dan termasuk jenis epithelial-like. Sel ini menempel dengan kuat pada lapisan substrat yang berbahan polistiren dan membentuk ikatan kovalen (Sons, 2008). Selektifitas agen kemopreventif artinya hanya sel kanker saja yang diserang, sementara sel normal tidak diserang. Mekanisme ini berbeda dengan cara kerja kemoterapi yang menyerang baik sel kanker maupun sel normal. Akibatnya sel normal ikut mati sehingga timbul berbagai macam efek samping. Cara agen kemopreventif membedakan sel kanker dan sel normal adalah berdasar kebutuhan sel akan ATP (*Adenosine Triphosphate*). Karena sel kanker bergerak, tumbuh dan berduplikasi lebih cepat dan aktif dibanding sel normal, maka sel kanker membutuhkan energi ATP dalam jumlah yang lebih banyak. Hal ini dideteksi oleh agen kemopreventif, selanjutnya bahan tersebut masuk ke dalam sel kanker dan menempel pada dinding dalam mitokondria untuk memblokir produksi ATP. Akibatnya suplai energi untuk sel kanker terhenti, sel kanker menjadi lemah dan mati (Alali dkk., 1999).

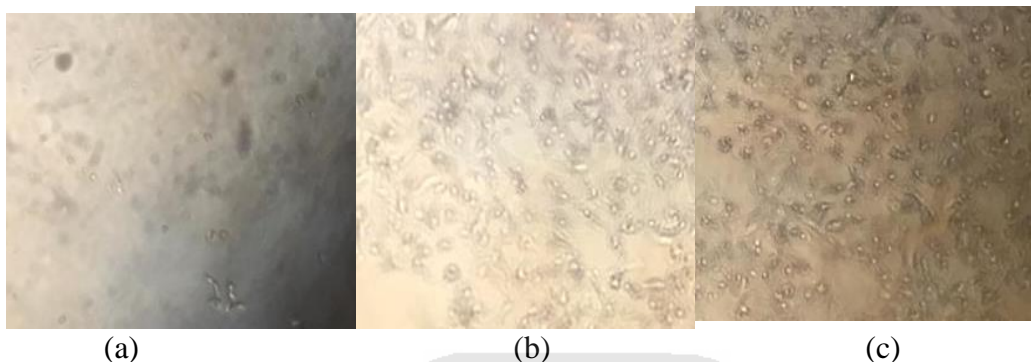


(a)

(b)

(c)

Gambar 19. Morfologi sel MCF-7 setelah ditreatment pada sampel konsentrasi 80% (a) sel Vero konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ (b) sel Vero konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ (c) sel Vero konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 20. Morfologi sel Vero setelah pewarnaan pada sampel konsentrasi 80% (a) sel Vero konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ (b) sel Vero konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ (c) sel Vero konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Gambar 19 dan 20 menunjukkan morfologi sel Vero saat setelah ditreatment dan sesudah dilakukan pewarnaan dengan MTT. Perlakuan dengan fraksi *n*-heksana tampak terjadi perubahan morfologi pada inti sel yaitu sel tampak mengkerut, mengecil sehingga menunjukkan adanya kematian dari sel Vero. Namun hal tersebut hanya terjadi pada konsentrasi yang tinggi. Sedangkan, pada perlakuan dengan konsentrasi yang semakin rendah tidak tampak adanya perubahan morfologi sel vero yang menunjukkan kematian sel. Pada konsentrasi ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang tinggi menunjukkan kematian sel yang banyak dibandingkan pada konsentrasi kecil pada sel Vero. Dapat disimpulkan bahwa fraksi dari daun jambu biji tersebut cukup aman bagi sel normal. Hal tersebut didukung dengan data IC_{50} yang didapatkan $> 100 \mu\text{g/mL}$.

Sediaan nanopartikel fraksi *n*-heksana dari ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan sel meningkat seiring bertambahnya konsentrasi sampel. Pertambahan jumlah konsentrasi akan meningkatkan jumlah senyawa sehingga tingkat toksisitas semakin meningkat. Pada perlakuan sampel konsentrasi 40%, 60% dan 80% dapat diketahui

bahawa semakin tinggi konsentrasi semakin kecil juga nilai IC_{50} dan ukuran partikelnya.

Tabel 9. Tabel hubungan konsentrasi, ukuran partikel dan nilai IC_{50} terhadap sel T47D, MCF-7 dan Vero

Sampel	Ukuran partikel (nm)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
		T47D	MCF-7	Vero
Fraksi <i>n</i> -heksana 40%	140	115,747	83,410	269,513
Fraksi <i>n</i> -heksana 60%	136,06	104,786	82,603	295,329
Fraksi <i>n</i> -heksana 80%	133,2	96,981	81,706	321,195

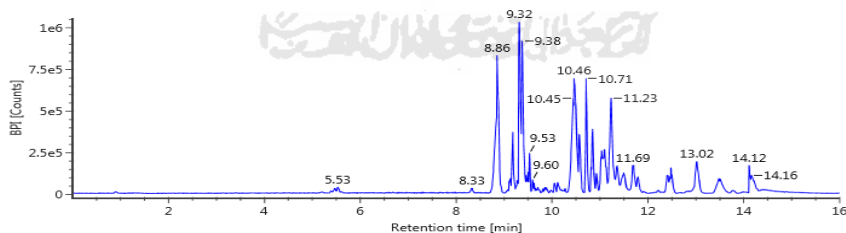
5.10 Analisis Kandungan Senyawa Terbesar dalam Fraksi Aktif *n*-Heksana Menggunakan LC-MS/MS

Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spectrometer massa. Data LC-MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu (Agilent,1998).

Sistem LC-MS / MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Masing-masing *ion source* dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan. Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan mengurutkan dan mengidentifikasi ion sesuai dengan massa, sesuai dengan rasio fragmentasi mereka. Dua komponen utama dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion, dan penganalisa massa (*mass analyzer*) yang menseleksi ion.

Didalam *ion source* pengenalan teknik ionisasi tekanan atmosfer (ionisasi tekanan atmosfer / API) sangat banyak jumlahnya yang dianalisis dengan LC-MS / MS. Pada teknik ionisasi tekanan atmosfer, molekul analit terionisasi terlebih dahulu pada tekanan atmosfer. Ion-ion analit tersebut kemudian dianalisis secara elektrik dan elektrostatis terpisah dari molekul inti. Teknik ionisasi tekanan atmosfer umumnya adalah ionisasi elektropray (*electrospray ionization/ ESI*), ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI) dan photoionisasi tekanan atmosfer (APPI).

Pada sistem MS menggunakan sumber ion *Electrospray ionization* (ESI) yang menghasilkan molekul gas terionisasi langsung dari larutan cair yang menghasilkan semprotan tetesan droplet dalam medan listrik. Ionisasi electropray kondusif untuk pembentukan molekul kecil bermuatan tunggal, tetapi dapat juga untuk molekul bermuatan banyak dari molekul yang lebih besar, hal ini karena spektrofotometer massa mengukur rasio terhadap muatan (m/z) sehingga memungkinkan untuk mengamati molekul yang sangat besar dengan rentang massa yang relatif kecil. Buffer seperti Na^+ , K^+ , fosfat dan garam dapat menurunkan tekanan uap droplet sehingga mengurangi sinyal melalui peningkatan tetesan tungan permukaan yang mengakibatkan penurunan vitalitas. Berdasarkan hasil kromatogram, diketahui



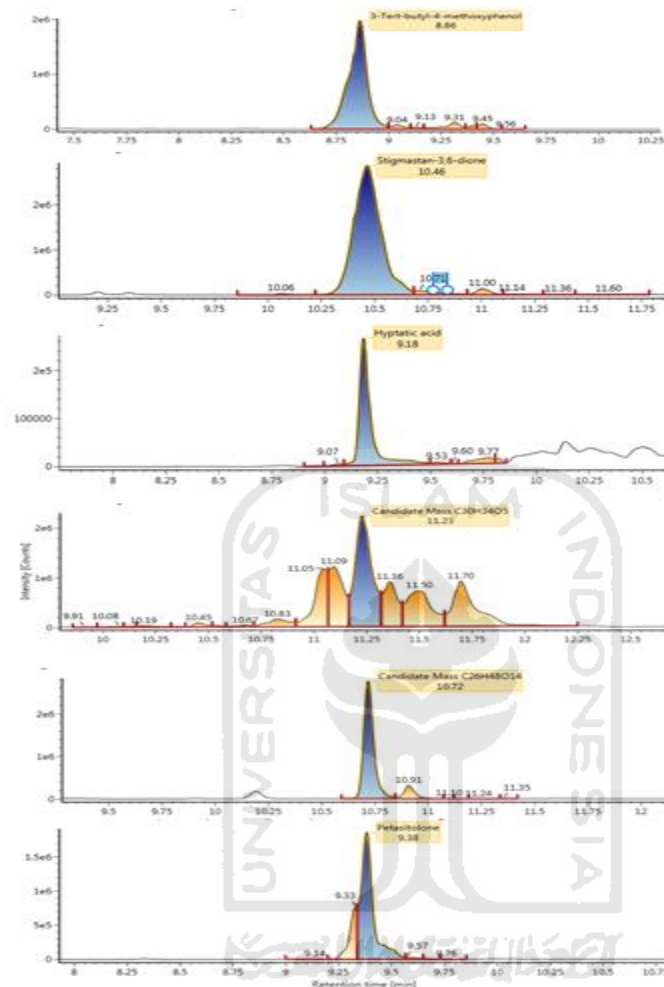
terdapat puncak senyawa dengan kromatogram tersebut menunjukkan bahwa fraksi mengandung beberapa senyawa. Kromatogram fraksi aktif *n*-heksana dapat dilihat pada Gambar 21 .

Gambar 21. Kromatogram fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.)

Gambar 21 merupakan kromatogram dari fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang menunjukkan beberapa puncak yang

menunjukkan waktu retensi yang berbeda-beda dan menunjukkan senyawa yang berbeda-beda. Dapat diketahui 5 puncak yang memiliki intensitas terbesar pada waktu retensi yang berbeda-beda, dan dapat diidentifikasi kandungan senyawa dan berat molekulnya. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat 5 senyawa yang paling dominan di dalam fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 23.





Gambar 22. Kromatogram senyawa yang teridentifikasi oleh LC-MS/MS, (A) waktu retensi 8,86 (B) 10,46 (C) 11,23 (D) 9,18(E) 10,72 (F) 9,38.

Gambar 22 menunjukkan kandungan senyawa dalam fraksi *n*-heksana daun jambu biji . Hal tersebut ditunjukkan dari munculnya beberapa puncak yang cukup tajam di antaranya puncak dengan waktu retensi 8,86; 9,18; 9,38; 6,80; 10,72; dan 11,23 pada kromatogram. Puncak-puncak tersebut merupakan suatu senyawa yang diduga masih berupa campuran atau belum tunggal karena dalam sebuah fraksi seharusnya masih terdiri dari berbagai macam senyawa. Pada beberapa puncak yang intensitasnya cukup tinggi dipisahkan kembali dan didapatkan spektrum massa.

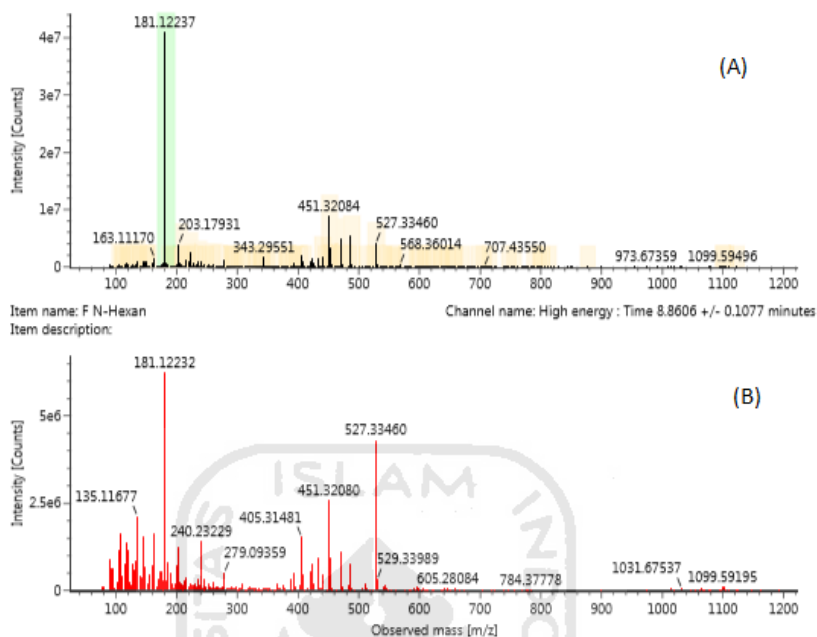
Waktu retensi adalah waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor disebut sebagai waktu retensi. Waktu retensi diukur berdasarkan waktu dimana sampel diinjeksikan sampai sampel menunjukkan ketinggian puncak maksimum pada grafik dari senyawa itu.

Didapatkan pola fragmentasi sederhana pada sampel hasil hidrolisis ketika sampel diinjeksikan ke dalam radas LC-MS (Gambar 21). Munculnya pola fragmentasi yang sederhana tersebut dapat disebabkan oleh molekul dalam sampel yang relatif stabil atau proses ionisasi sampel yang menggunakan energi yang rendah. Tsimogiannis dkk. (2007) menyatakan, spektrum $[M^+H]^+$ tidak dapat terfragmentasi secara menyeluruh ketika energi tumbukan yang digunakan pada proses ionisasi sampel rendah.

Tabel 10. Hasil analisis LC-MS/MS dengan sumber pengionan positif

Component name	Observed m/z	Neutral mass (Da)	Observed RT (min)	Detectr counts	Formula
3-Tert-butyl-4-metoksifenol	181.1224	180.11503	8,86	956922	C ₁₁ H ₁₆ O ₂
Asam hiptatik	511.3404	488.35017	9,19	93361	C ₃₀ H ₄₈ O ₅
Petasitolon	259.1672	236.17763	9,37	635628	C ₁₅ H ₂₄ O ₂
Stigmastan-3,6-dion	429.3729	428.36543	10,46	2635299	C ₂₉ H ₄₈ O ₂
Senyawa kandidat	607.2928	584.30441	10,72	1222517	C ₂₆ H ₄₈ O ₁₄
C ₂₆ H ₄₈ O ₁₄					
Senyawa kandidat	475.2488	474.24062	11,24	1275630	C ₃₀ H ₃₄ O ₅
C ₃₀ H ₃₄ O ₅					

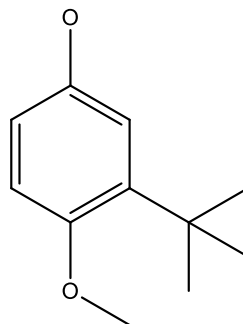
Pada Tabel 9, dapat dilihat bahwa menunjukkan kandungan senyawa dalam fraksi *n*-heksana daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang teridentifikasi oleh MS berdasarkan spektrum bahwa Candidate Mass C₂₆H₄₈O₁₄ memiliki berat molekul terbesar yaitu 607,2928 m/z pada waktu retensi 10,46.



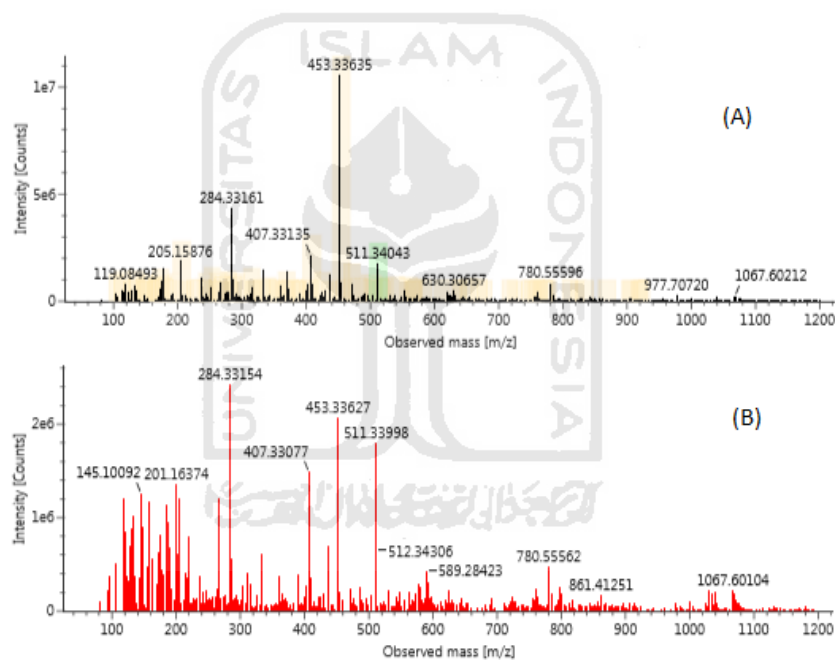
Gambar 23. Spektrum massa 3-Tert-butyl-4-metoksifenol (A) low energy, (B) high energy

Pada Gambar 23 memberikan informasi tentang spektrum massa 3-Tert-butyl-4-metoksifenol yang memiliki berat molekul sebesar 181,1224 m/z dan pada waktu retensi 8,86. 3-Tert-butyl-4-metoksifenol memiliki formula $C_{11}H_{16}O_2$ dan memiliki berat molekul 180.11503 (Da) dimana berat molekul yang teridentifikasi oleh sampel yang dianalisis terdiksi oleh 1 proton H^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom H yaitu 1.

Senyawa massa 3-Tert-butyl-4-metoksifenol dapat diketahui dari formula dan strukturnya termasuk senyawa metabolit sekunder golongan fenolik yang teridentifikasi juga saat di uji fitokimia menggunakan pereaksi $FeCl_3$ 1%.

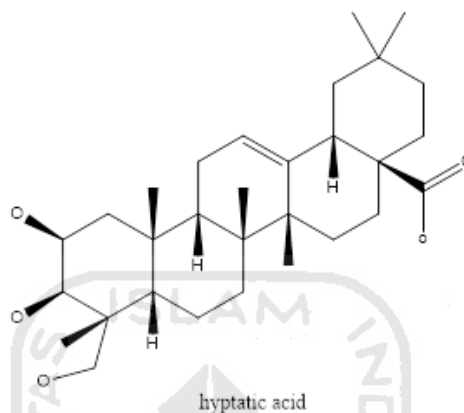


3-Tert-butyl-4-methoxyphenol

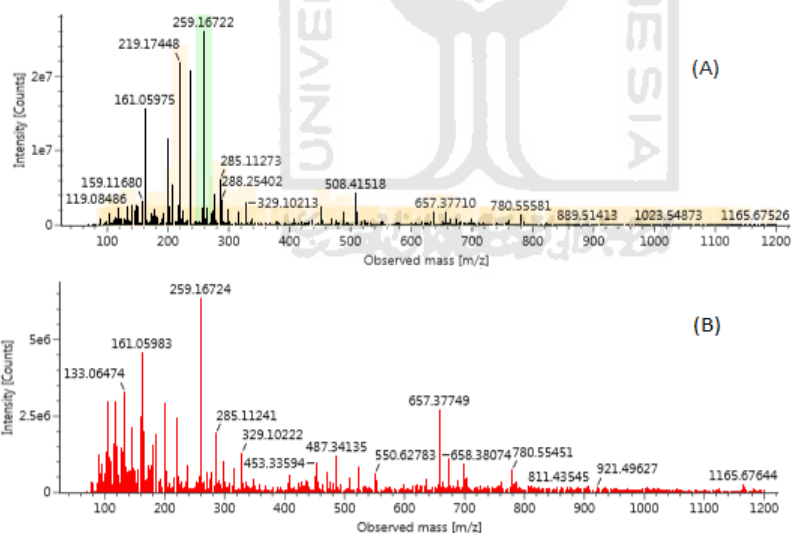
Gambar 24. Struktur senyawa 3-Tert-butyl-4-metoksifenol**Gambar 25.** Spektrum massa asam hiptatik (A) low energy, (B) high energy

Pada Gambar 25 memberikan informasi tentang spektrum massa asam hiptatik yang memiliki berat molekul sebesar 511,3404 m/z dan pada waktu retensi 9,18. Asam hiptatik memiliki formula $C_{30}H_{48}O_5$ dan memiliki berat molekul 488.35017 (Da) dimana berat molekul yang teridentifikasi oleh sampel yang dianalisis karena molekul yang teridentifikasi teradisi oleh 1 proton Na^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom Na yaitu 23.

Senyawa massa Asam hiptatik dapat diketahui dari formula dan strukturnya termasuk senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid yang teridentifikasi juga saat di uji fitokimia menggunakan pereaksi asam asetat anhidrat 0,5 mL dan asam sulfat pekat 2 mL.



Gambar 26. Struktur senyawa asam hiptatik

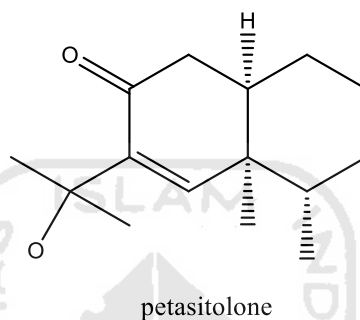


Gambar 27. Spektrum massa Petasitolon (A) low energy, (B) high energy

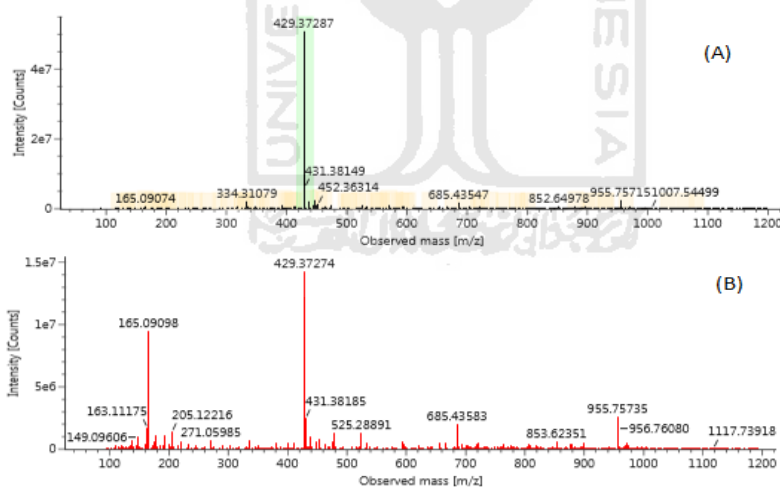
Pada Gambar 27 memberikan informasi tentang spektrum massa Petasitolon yang memiliki berat molekul sebesar 259,1672 m/z dan pada waktu retensi 9,18. Petasitolon memiliki formula $C_{15}H_{24}O_2$ dan memiliki berat molekul 236.17763 (Da) dimana berat molekul yang teridentifikasi oleh sampel yang dianalisis karena molekul

yang teridentifikasi teradisi oleh 1 proton Na^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom Na yaitu 23.

Senyawa massa Petasitolon dapat diketahui dari formula dan strukturnya termasuk senyawa metabolit sekunder golongan sesquiterpenoid yang merupakan golongan terpenoid yang teridentifikasi juga saat di uji fitokimia menggunakan pereaksi asam asetat anhidrat 0,5 mL dan asam sulfat pekat 2 mL.



Gambar 28. Struktur senyawa petasitolon

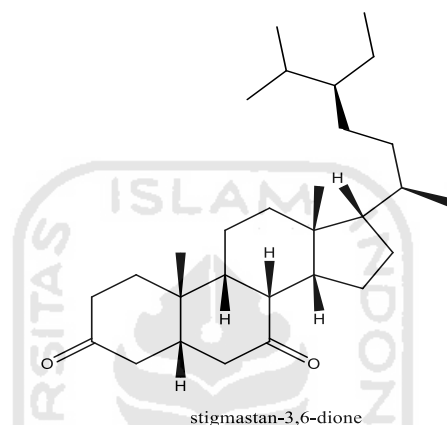


Gambar 29. Spektrum massa Stigmastan-3,6-dion (A) low energy, (B) high energy

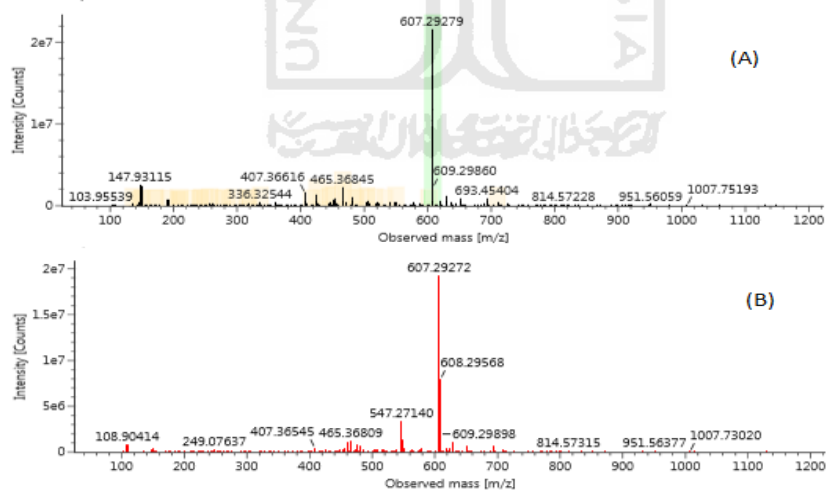
Pada Gambar 29 memberikan informasi tentang spektrum massa Stigmastan-3,6-dione yang memiliki berat molekul sebesar 429,3729 m/z dan pada waktu retensi 10,46. Stigmastan-3,6-dione memiliki formula $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$ dan memiliki berat molekul 428.36543 (Da) dimana berat molekul yang teridentifikasi oleh sampel yang dianalisis

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

Senyawa massa Stigmastan-3,6-dion dapat diketahui dari formula dan strukturnya termasuk senyawa metabolit sekunder golongan steroid yang teridentifikasi juga saat di uji fitokimia menggunakan pereaksi asam asetat anhidrat 0,5 mL dan asam sulfat pekat 2 mL.



Gambar 30. Struktur senyawa Stigmastan-3,6-dion

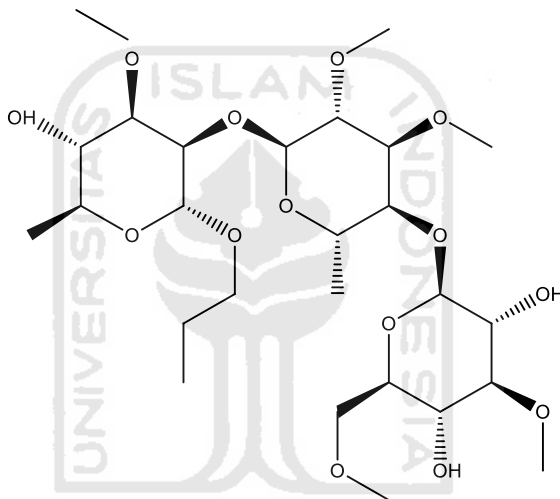


Gambar 31. Spektrum massa senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{14}$ (A) low energy, (B) high energy

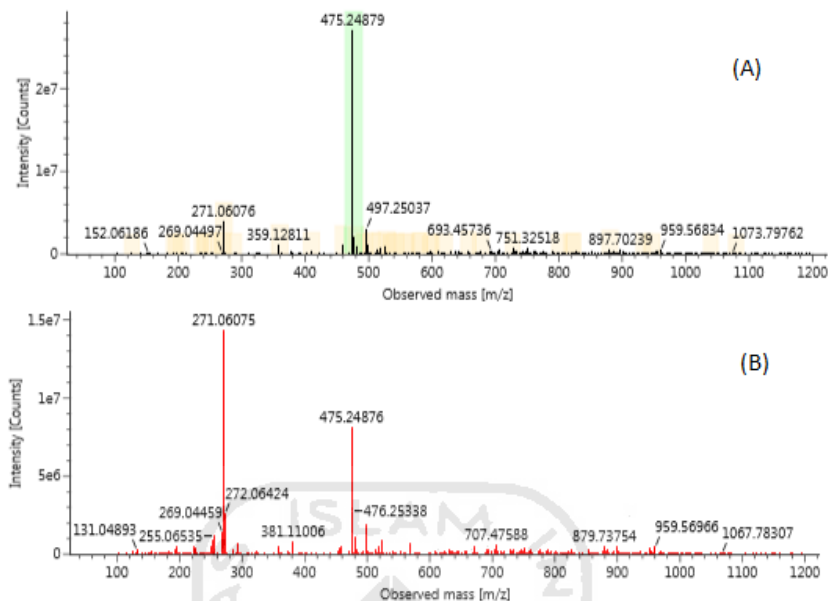
Pada Gambar 31 memberikan informasi tentang spektrum massa senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{14}$ yang memiliki berat molekul sebesar 607,2928m/z dan pada

waktu retensi 10,72. Memiliki formula $C_{26}H_{48}O_{14}$ dan memiliki berat molekul 584.30441 (Da) dimana berat molekul yang teridentifikasi oleh sampel yang dianalisis karena molekul yang teridentifikasi teradisi oleh 1 proton Na^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom Na yaitu 23.

Senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{14}$ dapat diketahui dari formula dan strukturnya termasuk senyawa gula yang membawa flavanoid yang teridentifikasi juga saat di uji fitokimia menggunakan pereaksi ditambahkan 0,05 g serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat.



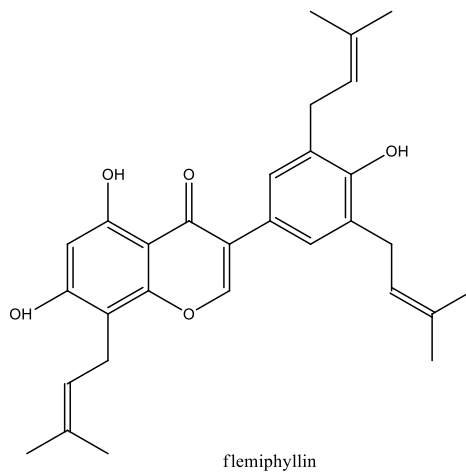
Gambar 32. Struktur senyawa senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{14}$



Gambar 33. Spektrum massa senyawa kandidat $C_{30}H_{34}O_5$ (A) low energy, (B) high energy

Pada Gambar 33 memberikan informasi tentang spektrum senyawa kandidat $C_{30}H_{34}O_5$ yang memiliki berat molekul sebesar 475,2488 m/z dan pada waktu retensi 11,24. Petasitolon memiliki formula $C_{30}H_{34}O_5$ dan memiliki berat molekul 474.24062 (Da) dimana berat molekul yang teridentifikasi oleh sampel yang dianalisis karena molekul yang teridentifikasi oleh sampel yang dianalisis teradisi oleh 1 proton H^+ sehingga berat molekul analit ditambah dengan berat 1 atom H yaitu 1.

Senyawa kandidat $C_{30}H_{34}O_5$ dapat diketahui dari formula dan strukturnya termasuk senyawa golongan flavanoid yang teridentifikasi juga saat di uji fitokimia menggunakan pereaksi ditambahkan 0,05 g serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat. Dapat diperkirakan senyawa tersebut adalah Flemiphyllin.



Gambar 34. Struktur senyawa kandidat $C_{30}H_{34}O_5$



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

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

1. Kandungan senyawa aktif terbesar dalam fraksi *n*-heksana diantaranya senyawa senyawa kandidat $C_{26}H_{48}O_{14}$ 607.2928 m/z; asam hiptatik 511.3404 m/z; kandidiat senyawa $C_{30}H_{34}O_5$ 475.2488 m/z; stigmastan-3,6-dion 429.3729 m/z; petasitolon 259.1672 m/z; dan 3-Tert-butyl-4-meetoksifenol 181.1224 m/z.
2. Ukuran partikel sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang diperoleh menggunakan perbandingan capryoll 90: tween 80 : PEG 400 secara berurutan yaitu 30 : 50 :20 pada konsentrasi 80% lebih kecil dibandingkan menggunakan variasi konsentrasi yang lainnya.
3. Nilai IC_{50} fraksi *n*-heksana konsentrasi 40%, 60%, dan 80% berturut-turut terhadap sel T47D sebesar 109,647; 107,151; dan 95,499 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} fraksi *n*-heksana konsentrasi 40%, 60%, dan 80% berturut-turut terhadap sel MCF-7 sebesar 82,794; 81,283; dan 75,85 $\mu\text{g/mL}$
4. Berdasarkan uji *in vitro* diketahui bahwa sediaan nanopartikel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara.

DAFTAR PUSTAKA

Aka J.A., Adjo Aka J. and Lin S.-X., 2012, Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7., *PloS one*, 7 (2), e31532

Ammerman, A.J., N. Efstratiou, M. Ntinou. 2008. Finding the Early Neolithic in Aegean Tharece. The use of Cores. *Antiquiti* 82: 139-50.

American Cancer Society. 2011. Kanker Payudara Fakta & Angka 2009 - 2010. Atlanta: American Cancer Society, Inc.

Avadi MR, Assal MMS, Nasser M, Seideh A, Fatemah a, Rassoul D, and Morteza R..2010, Preparation and Charaterization of Insulin Nanoparticle Using Chitosan and Arabic Gum with Ionic Gelation Method. *Nanomed Nanotechnol* 6: 58-63 DOI: 10.1016/j.nano.2009.04.007

Baskar, S., Joseph Raj, M., Rajesh., Subramanian, S., Palanichamyand., A.Thangarupathi.,2010, Formulasi and Evaluation of Celoxoxibloaded nanosized emulsion as transdermal drug delivery vehicle. *International Journal of Pharma Science an Research*, Vol 1 (2) 112-121.

Balakumar, K., Raghavan, C. V., Selvan, N. T., and Rahman, S. H.,2013, Self Emulsifying Drug Delivery System: Optimization and its Prototype for Various Compositions of Oils, Surfactants and Co-surfactants, *Journal of Pharmacy Research*, 6, 5, 510-514.

Bernardi, D.S., Pereira, T.A., Maciel, N.R., Bortoloto, J., Viera, G.S., Oliveira, G.C., dan Rocha-Filho, P.A., (2011): Formation and Stability of Oil-inWater Nanoemulsions Containing Rice Brain Oil: In Vitro and In vivo Assessment, *Journal of Nanobiotechnology*, 9:44, 1-9.

Burdall, E.S., Hanby, M.A., Landsdown, R.J.M., Speirs, V. (2003). Breast cancer cell line. *Breast Cancer Research*. 5(2), 89-95

Bragmann, C.P and Goncalves, M.R.F.2006. Thermal Insulators Made *with* Rice Husk Ashes: Production and Correlation Between Properties and Microstructure. Department of materials, school of engineering, federal university of rio grande do sul, Brasil.

Damar, A.C., Revolta, M.J.R., Defny, S., 2014. Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Total Ekstrak Etanol Daun Kayu Kapur (*Melanolepsis Multiglandulosa* Reinch f). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3(4), 11-21

Date AA, Desai N, Dixit R, et al. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. *Nanomedicine* (Lond). 2010; 5(10): 1595–1616.

Echalier G, 1997. *Drosophila* Cell in Culture. New York: Academic Press.

Faidah, Nurul.I. 2019. Biosintesis Nanopartikel Perak (AgNP) Ekstrak Buah Tin (*Ficus carica* L.) Terhadap Aktivitas Antioksidan *dan* Toksisitas Larva *Artemia salina*. Skripsi. Universitas Islam Negri Sunan Ampel. Surabaya.

Gautam S., Singh A.K., 2014, Self nanoemulsifying drug delivery system-a novel approach for improving bioavailability. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*.4(6):33-38

Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S, and Marshall, N.J., 1995, Microculture Tetrazolium Assays: A comparison Between Two New Tetrazolium Salts, XTT and MTS, *Journal Immunol Methods*, 197(1), 95-103.

Goncalves AF, Andrade NM, Bezerra NSJ, Macrae A, Sousa VO, Fonteles FAA, Vieira HSF. 2008. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri*(Heller). *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 50(1):11-15.

Gupta, S., Chavan, S., dan Sawant, K. K., 2011, Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Adefovir Dipivoxil: Design, Characterization, in Vitro and ex Vivo Evaluation, *Physicochem. Eng. Aspects*.,392, 145-155.

Harahap, Y. 2007. Uji Sitotoksitas Sediaan Jadi Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) terhadap sel MCF-7 secara in vitro. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6 (2)

Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, *Diterjemahkan oleh K. Padmawinata dan I. Soediro*, ITB, Bandung.

Haryati, Nur Aini, Chairul Saleh, Erwin. 2015. Uji Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Merah (*Syzygium my tifolium Walp*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *J. Kimia Mulawarman*. 13 (1): 35-39

Istiqomah. 2013. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Ma'at, Suprpto. 2011. Teknik Dasar Kultur Sel Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis Retrofracti Fructus*). *Skripsi. UIN Jakarta, Surabaya: Airlangga University Press*.

Itharat A, Oraikul B. 2007. Research on Thai medicinal plants for cancer treatment. *Med Plant Res*.1(2): 287-317.

Joseph B, Priya M. 2011. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of guava (*Psidium guajava* Linn.) *IntJ Pharmand Bio Sci*.2:1:53-69.

Jurdall, E.S., Hanby M.A., Landsdown, R.J.M., and Speirs, V., Bereast Cancer Cell Line, *Breast Cancer Res.*, 2003: 5(2): 89-95 2

Kamanth JV, Nair R, Ashok KCK, Mohana Lakshmi S. 2008. *Psidium guajava*L: A determination of a spasmolytic principle. *ArchMedRes*.25(1): 5-11.

Kuber BR, Lakshmi MR, Deepika E, Yamini P. 2013. Phytochemical Screening, *in vitro*, *anti-bacterial and antioxidant* Activity of the *Psidium guajava* Root Bark. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2(10): 238-248.

Kothleitner, G., Grogger, W., Dienstleder, M., & Hofer, F. 2014. Linking TEM Analytical Spectroscopies for an Assumptionless Compositional Analysis. *Microscopy and Microanalysis*, 20(03), 678–686.

Kumar S, Gupta SK, Sharma PK. 2012. *Self-emulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for Oral delivery of lipid based formulation-a review. African Journal of Basic & Applied Sciences* 4:1-5

Lee SB, 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.

List PH dan Schmidt PC. 1989. *Phytopharmaceutical Technology. CRC Press Inc.* Boston.

Machana S, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Nonpunya A, Sripanidkulchai B, Thitimetharoch T. 2011. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human Hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chinese Medical Journal.* 6(39): 1-8.

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. J. Pharm. Res.*,3(1), 21-24

Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A. 2006. Antiproliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P38 cell lines. *Cancer Let.*235:114-120.

Manthey JA, Grohmann K, Guthrie N. 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem.* 8:135-153.

McLaughlin, J.L., Rogers, L.L. (1998). The Use Of Biological Assays To Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal.* 32: 513-517

Mohanraj, V.J., and Chen, Y., 2006, Nanoparticles, A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5,1.

Mukhtar HM, Ansari SH, Bhat ZA, Naved T, Singh P. 2006. Antidiabetic activity of Ethanol extract obtained from the stem bark of *Psidium guajava*(Myrtaceae). *Pharmazie.*61(8): 725-727.

Mulyani, S, 2013. Menopause Akhir Siklus Menstruasi Pada Wanita di Usia Pertengahan. Yogyakarta: Nuha Medika.

Novak., JaneiroI., P.,Seruga,M dan Oliveira-Brett, A.M. 2008. Ultrasound Extracted Flavonoids from Four Varieties of Portuguese Red Grape Skins Determined by Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytica Chimica Acta*.630:107-115.

Nuraini, Rizka.T. 2019. Pengaruh Variasi H₂SO₄ Pada Pembentukan Nanosilika Berbasis Batu Apung. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung

Parimin, 2005. Jambu Biji. *Budi Daya dan Ragam Pemanfaatannya*. Penebar Swadaya, Jakarta.

Patel J, Shah A. 2008. Self emulsifying delivery systems for poorly absorbed drugs. *Int J Pharm Sci and Nano Tech* 1(2): 123-128.

Pine, A.T.D., Alam, G dan Attamin., F., 2011. Standarisasi Mutu Ekstrak Daun Gedi (*Abelmoschus manihot (L) Medik*) dan Uji Efek Antioksidan dengan Metode DPPH. *Tesis*. Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Makasar

Rahul, L., Nidhi, Y., Davendra, P., Ajay, V., Sanjay, J., 2012, Recent advances in self drug delivery system.Novel Sci. *Int. J. Of Pharm. Sci.*, 1(9-10), 655-660

Rawat, M., Singh, D., and Saraf, S., 2006, Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs, *Pharm. Soc. Jpn*, 29, 1790–1798.

Rishika D, Sharma R. 2012. An update of pharmacological activity of Psidium guajava in the management of various disorder. *Int J Pharm Sci Res*.3(10): 3577-3584.

Ronson, 2012, Zeta Potensial Analysis of Nanoparticle, *Nano Composix*, San Diego.

Rosenauer, A. 2003. Transmission Electron Microscopy of Semiconductor Nanostructures: *Analysis of Composition and Strain State*. Springer.p. 1.

Rowe RC, Sheskey PJ, Cook WG, Quinn ME. 2009. Handbook of pharmaceutical excipients-6thedition. *Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association*.1-917

Sato R, Dang KM, McPherson BG, Brown AC. 2010. Anticancer activity of guava (*Psidium guajava*) extracts. *J ComplIntegMed*.7(1): 43.doi:10.2202/1553-3840.1361.

Siadi, K., 2012, Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan NaCl, *Jurnal MIPA Universitas Negeri Semarang*, 35(1), 77-83.

Singh, B., Bandopadhyay S., Kapil R., Singh R. & Katare O. P. (2009). Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*; 26(5); 427-521.

Soni GC., S.K. Prajapati, Nirvesh Chaudhri, 2014. Self nanoemulsion: advance form of drug delivery system. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*,. Volume 3, Issue 10, 410-436

Street, H.E. 1969. Growth in organised and unorganised systems. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants. *In Plant Physiology. A treatise*, vol. VB. ed. F.C. Steward, pp. 3-224. New York:

Sundari, I. 2010. Identifikasi Senyawa Dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus coneideus* Lamk.) *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret. Surakarta

Sudarmadji, S.B., Haryono., dan Suhardi., 2003, Analisa Bahan Makanan dan Pertanian, *Liberty*, Yogyakarta.

Sudarsono, Gunawan, D., wahyuono, S., Donatus, A.I., Purnomo, 2002, Tumbuhan Obat II Hasil Penelitian, Sifat-Sifat dan Penggunaan, *Pusat studi Obat Tradisional UGM*, Yogyakarta.

Sun, M. & Han, J. (2011). Design, Preparation and In Vitro Evaluation of Paclitaxel-Loaded Self Nanoemulsifying Drug Delivery System. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*; 6(1); 18

Sutejo RI, Putri H, Meiyanto E. 2016. Selektivitas Ekstrak Etanolik Buah Makassar (*Brucea javanica*) Pada Kanker Payudara Metastasis Secara *in vitro*. *Journal of Agromedicine and Medical Science*. 2(1): 1-5.

Utami, A.N. 2009. Perbandingan Efek Kurkumin Dalam Sediaan Topikal, *Skripsi Sarjana Kedokteran*. FK UI

Tadros, T.F., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C., 2004, Formation and Stability of Nanoemulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 109: 303-318.

Tsakalakos, T., Ovid'ko, I.A., dan Vasudevan, A.K, 2003, Nanostructures : Synthesis, Functional Properties, and Applications, 53, Kluwer Academic Publishers, Netherland

Vior, M.C.G., Monteagudo, E., Dixelio, L.E., Awruch, A., 2011, A Comparative Study of A Novel Lipophilic Phthalocyanine Incorporates into Nanoemulsion Formulations: Photophysics, Size, Solubility and Thermodynamic Stability, *Dyes and Pigments*, 91, 208-214.

Voight, R., 1995, Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandi, Universitas Gajah Mada press, Yogyakarta.

Wang I, Dong J, Chen J, Eastoe J, Li X. 2009. Design and optimization of a new Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System. *J. Colloid Interface Sci*330: 443-448.

West, A. R. 1984. *Basi Solid State Chemistry* Second Edition. Willey. New York.

Wattanapitayakul SK, Chularojmontri, Herunsalee, S Charuchongkolwongse, S Niumsakul, JA Bauer. 2005. Screening of Antioxidants from Medicinal.

Wilhelmina,C.E., 2011, Pembuatan dan Penentuan Nilai SPF Nanoemulsi Tabir Surya menggunakan Minyak Kencur (*Kaempferia galangal L.*) sebagai Fase Minyak, *Skripsi*, Farmasi-UI, Jakarta

Yuliani, S., L. Udarno & E. Hayani. 2003. Kadar Tanin Dan Quersetin Tiga Tipe Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*). *Buletin Tanaman Rempah dan Obat*. 14(1):17-24.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman Jambu Biji


UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN
Jalan Sekeloa Selatan 1, Yogyakarta 55281 Telpun (0271) 8563200-212, Fax (0271) 8563200

SURAT KETERANGAN
Nomor : 014796/S.Tb./17020

Yang bertanda tangan di bawah 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
Divisi : Tracheophyta
Classis : Magnoliopsida
Ordo : Myrtales
Familia : Myrtaceae
Genus : Psidium
Species : *Psidium guajava* L.
Sinonim : *Guajava pumila* (Vahl.) Kuntze, *Myrtus guajava* (L.) Kuntze,
Psidium cajuva L., *Spygium elaeagnum* E. Schum & Lauterb
Nama Lokal : Jambu batu, Jambu biji, Jambu Nutuk, Giewas

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

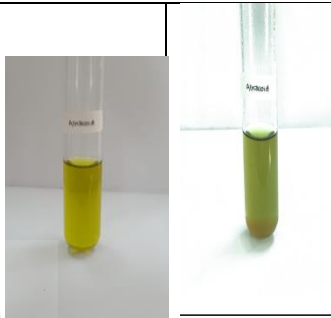
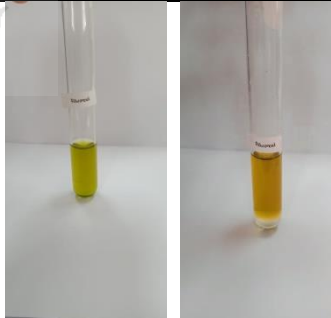
Yogyakarta, 14 Januari 2020
Kepala Laboratorium
Sistematika Tumbuhan
Fakultas Biologi UGM





Prof. Dr. Purwanto, M.S.,
NIP. 295504211982031005



Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada

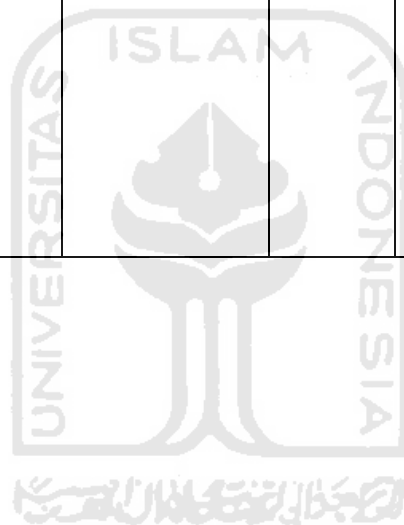
Prof. Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc.
NIP. 297003261995121001

Lampiran 2. Hasil Uji Penapisan Fitokimia

Sampel	Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil Pengamatan	Hasil uji	Gambar
Fraksi n-heksana	Alkaloid	<i>Dragendorff</i>	Larutan hijau	-	 <p>Sebelum ditambah pereaksi <i>Dragendorff</i> (larutan hijau)</p> <p>Setelah ditambah pereaksi <i>Dragendorff</i> (larutan hijau tua)</p>
	Flavonoid	HCl + Mg	Lapisan alkohol (larutan jingga)	+	 <p>Sebelum ditambah pereaksi (larutan hijau)</p> <p>Lapisan alkohol (larutan jingga)</p>

	Tanin	FeCl ₃	Larutan hijau kehitaman	+	 <p>Sebelum ditambah FeCl₃ 0,1% (larutan hijau muda)</p>	 <p>Setelah ditambah FeCl₃ 0,1% (larutan hijau kehitaman)</p>
	Terpenoid	+asam +H ₂ SO ₄ Pekat	Larutan merah keunguan	+	 <p>Sebelum ditambah pereaksi (larutan hijau)</p>	 <p>Setelah ditambah pereaksi (larutan merah keunguan dan terbentuk lapisan)</p>

	Fenolik	FeCl ₃	Larutan hijau + kehitaman			
					Sebelum ditambah FeCl ₃ 0,1% (larutan hijau muda)	Setelah ditambah FeCl ₃ 0,1% (larutan orange)



Lampiran 3. Hasil Uji PSA (Particle size analyzer)

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

2019.12.03 10:17:59

SZ-100

Measurement Results

Zeta 109.C.PSA.XI.2019.nzt

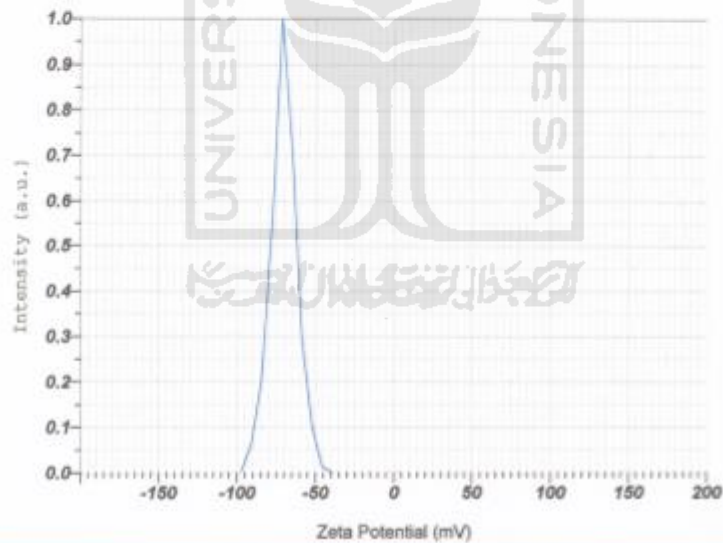
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 9:12:50 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 40%
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Conductivity : 0.075 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.8 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-70.3 mV	-0.000544 cm ² /Vs
2	---	---
3	---	---

Zeta Potential (Mean) : -70.3 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000544 cm²/Vs



HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

SZ-100

Measurement Results

Zeta 109.C.PSA.XI.2019 R2.nzt

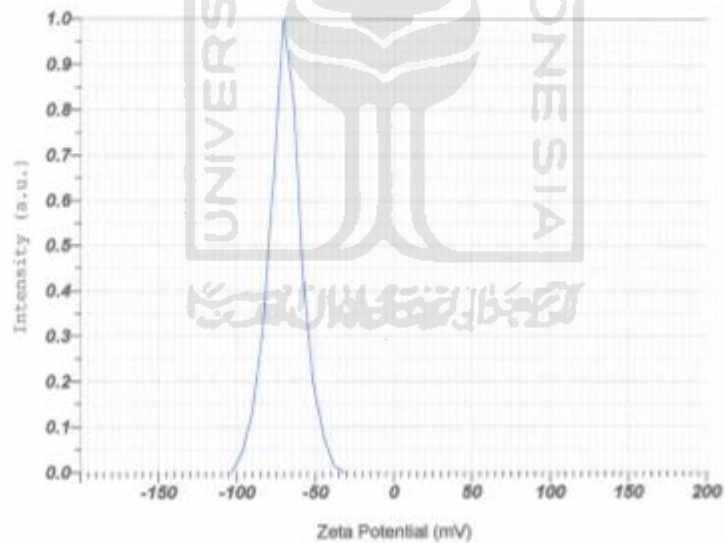
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 9:11:57 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 40%
 Temperature of the Holder : 25.0 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.895 mPa·s
 Conductivity : 0.075 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.9 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-69.3 mV	-0.000537 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -69.3 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000537 cm²/Vs



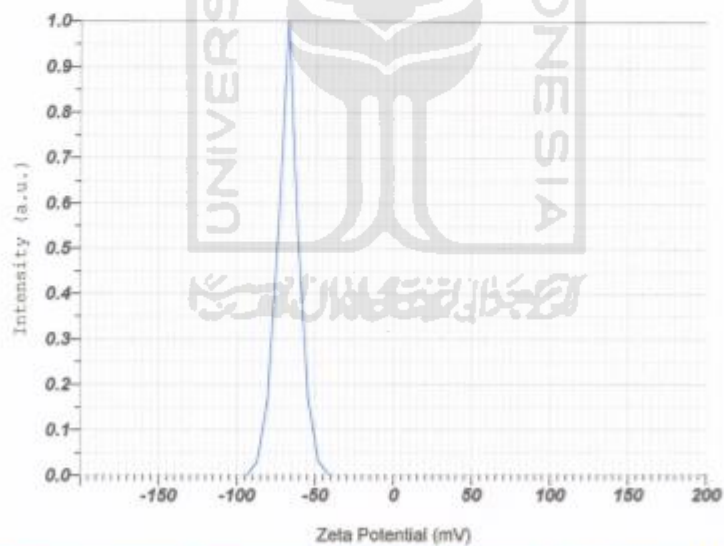
SZ-100
Measurement Results
Zeta 109.C.PSA.XI.2019 R3.nzt
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 9:11:38 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 40%
 Temperature of the Holder : 24.8 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.900 mPa·s
 Conductivity : 0.075 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.9 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-67.5 mV	-0.000520 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -67.5 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000520 cm²/Vs



SZ-100

111.C.PSA.IX.2019.nsz

Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 2:37:18 PM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : Fraksi n-heksan (30:50:20) 60%
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 24.8 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 1.087 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 27684
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1566 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	244.0 nm	175.6 nm	161.1 nm
2	—	— nm	— nm	— nm
3	—	— nm	— nm	— nm
Total	1.00	244.0 nm	175.6 nm	161.1 nm

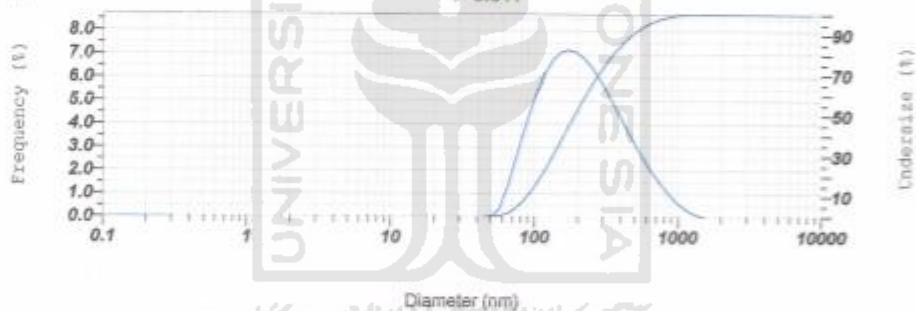
Cumulat Operations

Z-Average

: 137.8 nm

PI

: 0.311



No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation
1	0.34	0.000	0.000	22	4.43	0.000	0.000	43	57.79	0.000	0.344	54	740.39	1.400	87.548
2	0.38	0.000	0.000	23	4.91	0.000	0.000	44	64.06	0.000	1.049	55	877.07	1.600	89.148
3	0.43	0.000	0.000	24	5.37	0.000	0.000	45	72.37	0.000	1.774	56	948.16	1.710	90.358
4	0.48	0.000	0.000	25	5.84	0.000	0.000	46	82.33	0.000	2.250	57	1046.02	0.418	90.776
5	0.55	0.000	0.000	26	6.32	0.000	0.000	47	93.02	0.000	2.833	58	1170.24	0.194	90.970
6	0.62	0.000	0.000	27	6.81	0.000	0.000	48	105.35	0.000	3.668	59	1321.97	0.062	91.032
7	0.70	0.000	0.000	28	7.31	0.000	0.000	49	119.74	0.000	4.712	60	1491.04	0.000	91.032
8	0.80	0.000	0.000	29	7.84	0.000	0.000	50	136.18	0.000	5.978	61	1677.42	0.000	91.032
9	0.90	0.000	0.000	30	8.39	0.000	0.000	51	154.77	0.000	7.361	62	1881.14	0.000	91.032
10	1.00	0.000	0.000	31	8.97	0.000	0.000	52	175.59	0.000	8.866	63	2102.51	0.000	91.032
11	1.15	0.000	0.000	32	9.57	0.000	0.000	53	198.74	0.000	10.591	64	2341.25	0.000	91.032
12	1.30	0.000	0.000	33	10.20	0.000	0.000	54	224.32	0.000	12.532	65	2597.54	0.000	91.032
13	1.47	0.000	0.000	34	10.87	0.000	0.000	55	252.35	0.000	14.689	66	2970.89	0.000	91.032
14	1.66	0.000	0.000	35	11.59	0.000	0.000	56	282.84	0.000	17.062	67	3462.16	0.000	91.032
15	1.87	0.000	0.000	36	12.35	0.000	0.000	57	315.87	0.000	20.651	68	4071.33	0.000	91.032
16	2.11	0.000	0.000	37	13.15	0.000	0.000	58	351.45	0.000	25.463	69	4808.61	0.000	91.032
17	2.38	0.000	0.000	38	14.00	0.000	0.000	59	399.62	0.000	31.507	70	5673.96	0.000	91.032
18	2.70	0.000	0.000	39	14.90	0.000	0.000	60	450.39	0.000	38.884	71	6667.35	0.000	91.032
19	3.06	0.000	0.000	40	15.85	0.000	0.000	61	503.76	0.000	47.603	72	7789.70	0.000	91.032
20	3.45	0.000	0.000	41	16.85	0.000	0.000	62	569.74	0.000	57.646	73	9041.04	0.000	91.032
21	3.88	0.000	0.000	42	17.90	0.000	0.000	63	639.33	0.000	69.013	74	10422.37	0.000	91.032

SZ-100

111.C.PSA.IX.2019 R2.nsz

Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 2:50:43 PM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : Fraksi n-heksan (30:50:20) 60%
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 1.086 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 26752
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1515 kCPS

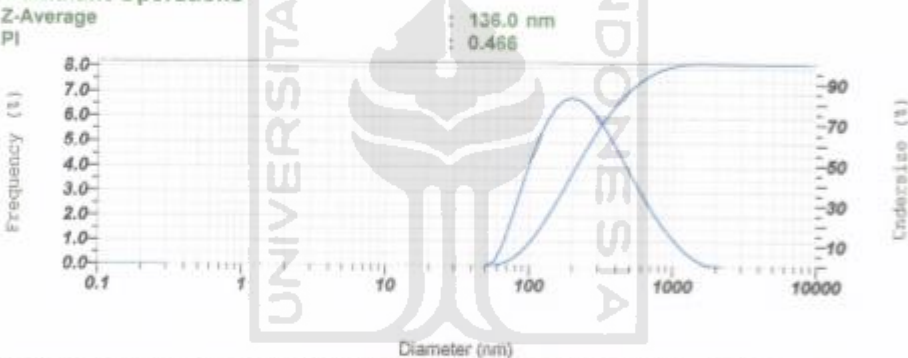
Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	204.7 nm	216.3 nm	182.1 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	204.7 nm	216.3 nm	182.1 nm

Cumulant Operations

Z-Average

PI



No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation
1	0.34	0.000	0.000	32	4.40	0.000	0.000	60	61.06	0.000	0.000
2	0.38	0.000	0.000	33	4.97	0.000	0.000	61	68.25	0.000	0.000
3	0.43	0.000	0.000	34	5.61	0.000	0.000	62	76.87	0.000	0.000
4	0.48	0.000	0.000	35	6.34	0.000	0.000	63	86.01	0.000	0.000
5	0.54	0.000	0.000	36	7.17	0.000	0.000	64	96.14	0.000	0.000
6	0.61	0.000	0.000	37	8.10	0.000	0.000	65	107.10	0.000	0.000
7	0.70	0.000	0.000	38	9.13	0.000	0.000	66	119.14	0.000	0.000
8	0.80	0.000	0.000	39	10.34	0.000	0.000	67	132.40	0.000	0.000
9	0.90	0.000	0.000	40	11.86	0.000	0.000	68	146.93	0.000	0.000
10	1.00	0.000	0.000	41	13.20	0.000	0.000	69	162.70	0.000	0.000
11	1.10	0.000	0.000	42	14.61	0.000	0.000	70	179.76	0.000	0.000
12	1.20	0.000	0.000	43	16.24	0.000	0.000	71	198.14	0.000	0.000
13	1.30	0.000	0.000	44	18.00	0.000	0.000	72	218.34	0.000	0.000
14	1.40	0.000	0.000	45	20.00	0.000	0.000	73	240.34	0.000	0.000
15	1.50	0.000	0.000	46	22.20	0.000	0.000	74	264.14	0.000	0.000
16	1.60	0.000	0.000	47	24.60	0.000	0.000	75	289.70	0.000	0.000
17	1.70	0.000	0.000	48	27.20	0.000	0.000	76	317.00	0.000	0.000
18	1.80	0.000	0.000	49	30.00	0.000	0.000	77	346.00	0.000	0.000
19	1.90	0.000	0.000	50	33.00	0.000	0.000	78	376.70	0.000	0.000
20	2.00	0.000	0.000	51	36.20	0.000	0.000	79	409.00	0.000	0.000
21	2.10	0.000	0.000	52	40.00	0.000	0.000	80	442.70	0.000	0.000

SZ-100

111.C.PSA.IX.2019 R3.nsz

Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 2:55:33 PM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : Fraksi n-heksan (30:50:20) 60%
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 1.086 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 27615
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1990 kCPS

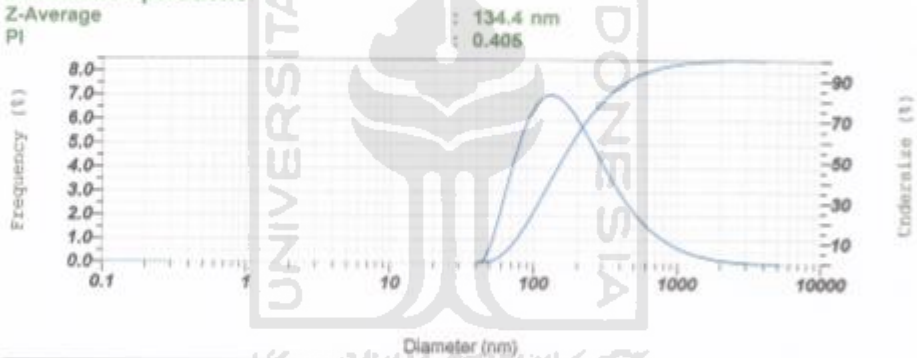
Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	230.9 nm	246.7 nm	126.1 nm
2	---	---	---	---
3	---	---	---	---
Total	1.00	230.9 nm	246.7 nm	126.1 nm

Cumulant Operations

Z-Average

PI



No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation
1	0.34	0.000	0.000	23	4.42	0.000	0.000	43	57.79	0.000	0.000	63	762.89	0.000	0.000
2	0.50	0.000	0.000	24	4.87	0.000	0.000	44	63.79	0.000	0.000	64	827.77	0.000	0.000
3	0.60	0.000	0.000	25	5.31	0.000	0.000	45	72.37	0.000	0.000	65	939.77	0.000	0.000
4	0.70	0.000	0.000	26	5.74	0.000	0.000	46	82.33	0.000	0.000	66	1074.00	0.000	0.000
5	0.85	0.000	0.000	27	6.17	0.000	0.000	47	93.00	0.000	0.000	67	1235.00	0.000	0.000
6	1.00	0.000	0.000	28	6.60	0.000	0.000	48	104.33	0.000	0.000	68	1424.00	0.000	0.000
7	1.20	0.000	0.000	29	7.03	0.000	0.000	49	117.33	0.000	0.000	69	1642.00	0.000	0.000
8	1.40	0.000	0.000	30	7.46	0.000	0.000	50	132.00	0.000	0.000	70	1890.00	0.000	0.000
9	1.60	0.000	0.000	31	7.89	0.000	0.000	51	148.33	0.000	0.000	71	2169.00	0.000	0.000
10	1.80	0.000	0.000	32	8.32	0.000	0.000	52	166.33	0.000	0.000	72	2481.00	0.000	0.000
11	2.00	0.000	0.000	33	8.75	0.000	0.000	53	186.00	0.000	0.000	73	2826.00	0.000	0.000
12	2.20	0.000	0.000	34	9.18	0.000	0.000	54	207.33	0.000	0.000	74	3204.00	0.000	0.000
13	2.40	0.000	0.000	35	9.61	0.000	0.000	55	230.33	0.000	0.000	75	3616.00	0.000	0.000
14	2.60	0.000	0.000	36	10.04	0.000	0.000	56	255.00	0.000	0.000	76	4062.00	0.000	0.000
15	2.80	0.000	0.000	37	10.47	0.000	0.000	57	281.33	0.000	0.000	77	4542.00	0.000	0.000
16	3.00	0.000	0.000	38	10.90	0.000	0.000	58	309.33	0.000	0.000	78	5056.00	0.000	0.000
17	3.20	0.000	0.000	39	11.33	0.000	0.000	59	339.00	0.000	0.000	79	5604.00	0.000	0.000
18	3.40	0.000	0.000	40	11.76	0.000	0.000	60	370.33	0.000	0.000	80	6186.00	0.000	0.000
19	3.60	0.000	0.000	41	12.19	0.000	0.000	61	403.33	0.000	0.000	81	6802.00	0.000	0.000
20	3.80	0.000	0.000	42	12.62	0.000	0.000	62	438.00	0.000	0.000	82	7452.00	0.000	0.000
21	4.00	0.000	0.000	43	13.05	0.000	0.000	63	474.33	0.000	0.000	83	8136.00	0.000	0.000

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

SZ-100

Measurement Results

Zeta 111.C.PSA.XI.2019.nzt

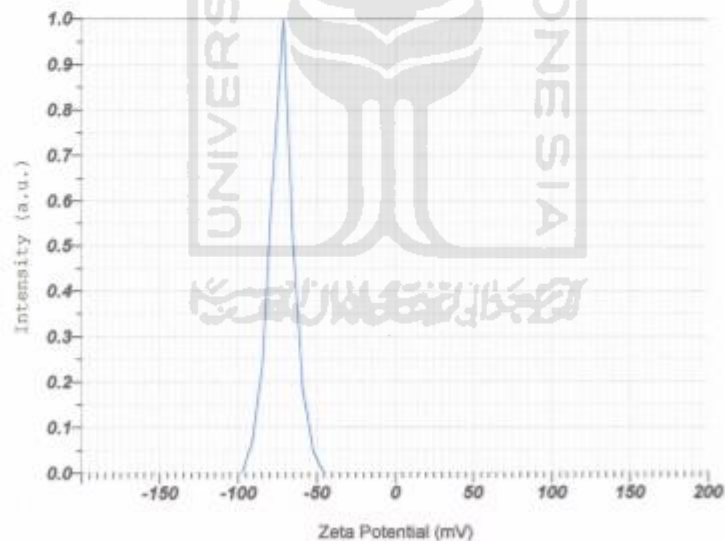
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 9:03:25 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 60%
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa-s
 Conductivity : 0.075 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.9 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-72.4 mV	-0.000559 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -72.4 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000559 cm²/Vs



2019.12.03 10:20:07

HORIBA
 Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

SZ-100

Measurement Results

Zeta 111.C.PSA.XI.2019 R2.nzt

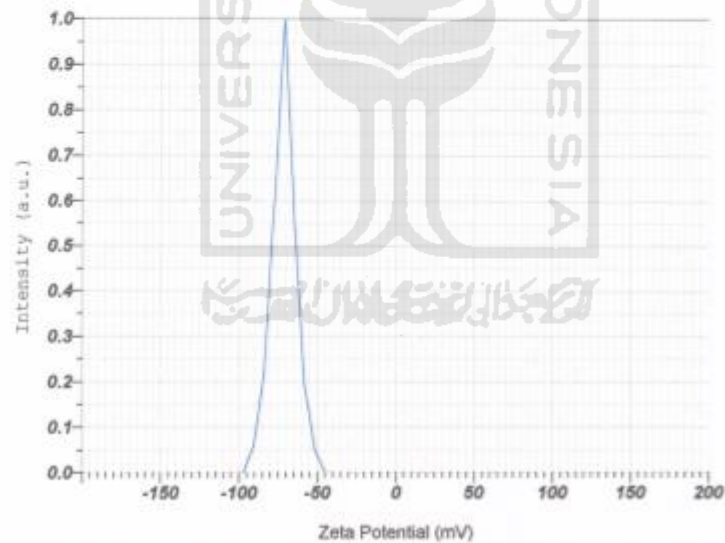
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 9:02:50 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 60%
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Conductivity : 0.075 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.9 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-71.4 mV	-0.000552 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -71.4 mV

 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000552 cm²/Vs


Copyright © 2019 HORIBA

HORIBA Scientific | Zeta Potential Analyzer | Model SZ-100

HORIBA

1 / 1

2019.12.03 10:20:06

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

SZ-100

Measurement Results

Zeta 111.C.PSA.XI.2019 R3.nzt

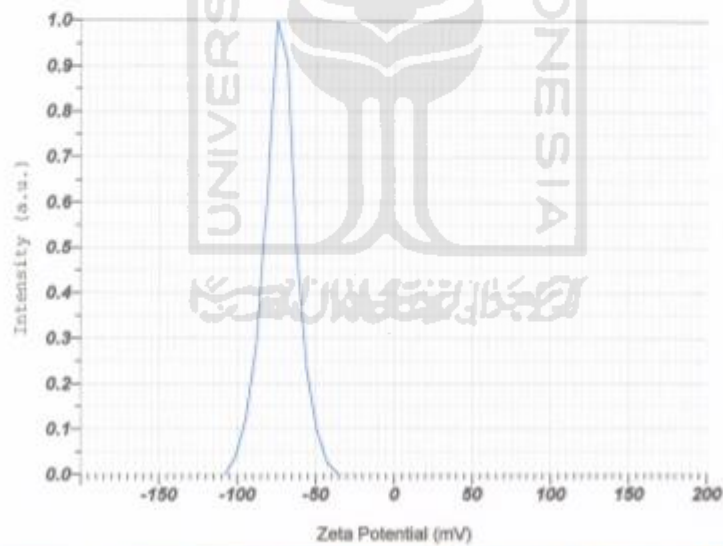
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 9:02:13 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 60%
 Temperature of the Holder : 24.8 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.898 mPa·s
 Conductivity : 0.075 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.9 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-72.7 mV	-0.000561 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -72.7 mV

 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000561 cm²/Vs
 

Empower the Future

Application Software | Process & Instrumentation | Analytical | Environmental | Laboratory

HORIBA

1/1

SZ-100

112.C.PSA.IX.2019.nsz

Measurement Results

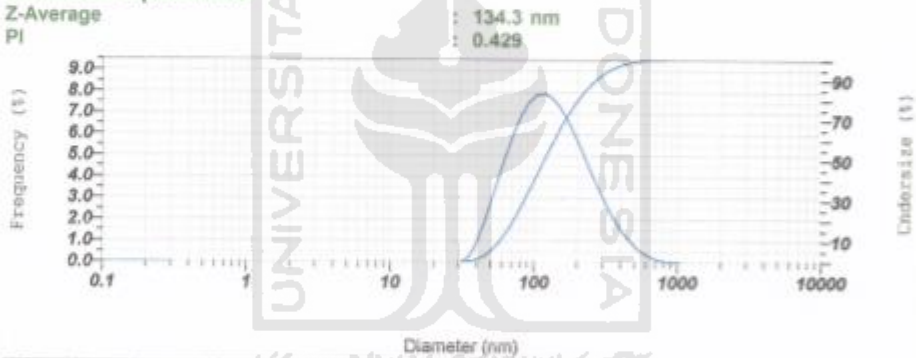
Date : Tuesday, December 03, 2019 10:50:15 AM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : Fraksi n-hexan (30:50:20) 80%
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 24.8 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 1.088 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 27076
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodisperse
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1927 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	144.0 nm	93.7 nm	111.6 nm
2	--	-- nm	-- nm	-- nm
3	--	-- nm	-- nm	-- nm
Total	1.00	144.0 nm	93.7 nm	111.6 nm

Cumulat Operations

Z-Average
PI



No.	Diameter	Frequency	Cumulative No.	Diameter	Frequency	Cumulative No.	Diameter	Frequency	Cumulative No.	Diameter	Frequency	Cumulative
1	0.34	0.000	0.000	31	4.81	0.000	49	37.08	0.000	125	0.000	125
2	0.56	0.000	0.000	32	4.87	0.000	50	37.28	0.000	126	0.000	126
3	0.43	0.000	0.000	34	5.81	0.000	55	43.87	0.000	131	0.000	131
4	0.46	0.000	0.000	35	6.34	0.000	56	45.35	0.000	132	0.000	132
5	0.55	0.000	0.000	36	7.17	0.000	57	48.09	0.000	133	0.000	133
6	0.82	0.000	0.000	37	8.10	0.000	58	50.83	0.000	134	0.000	134
7	0.75	0.000	0.000	38	8.15	0.000	59	51.58	0.000	135	0.000	135
8	0.80	0.000	0.000	39	10.34	0.000	60	53.16	0.000	136	0.000	136
9	0.90	0.000	0.000	40	11.68	0.000	61	54.87	0.000	137	0.000	137
10	1.00	0.000	0.000	41	13.30	0.000	62	56.76	0.000	138	0.000	138
11	1.15	0.000	0.000	42	14.87	0.000	63	58.81	0.000	139	0.000	139
12	1.30	0.000	0.000	43	16.34	0.000	64	61.00	0.000	140	0.000	140
13	1.47	0.000	0.000	44	18.03	0.000	65	63.36	0.000	141	0.000	141
14	1.64	0.000	0.000	45	19.95	0.000	66	65.89	0.000	142	0.000	142
15	1.87	0.000	0.000	46	22.20	0.000	67	68.57	0.000	143	0.000	143
16	2.11	0.000	0.000	47	24.80	0.000	68	71.40	0.000	144	0.000	144
17	2.28	0.000	0.000	48	27.01	0.000	69	74.38	0.000	145	0.000	145
18	2.50	0.000	0.000	49	29.00	0.000	70	77.50	0.000	146	0.000	146
19	2.70	0.000	0.000	50	30.00	0.000	71	80.75	0.000	147	0.000	147
20	3.45	0.000	0.000	51	44.72	0.000	72	84.20	0.000	148	0.000	148
21	3.88	0.000	0.000	52	60.85	0.000	73	87.90	0.000	149	0.000	149

SZ-100

112.C.PSA.IX.2019 R2.nsz

Measurement Results

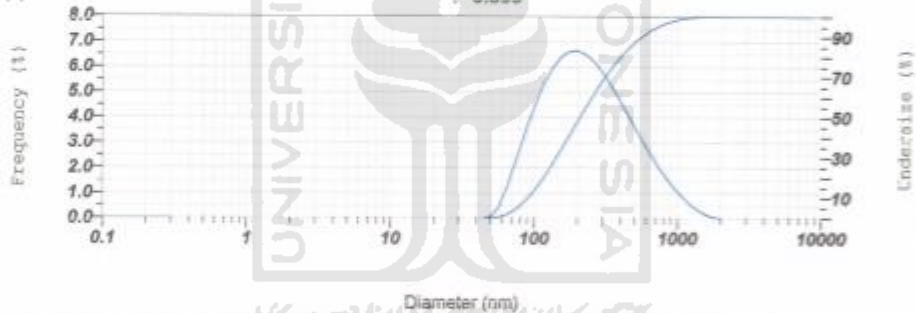
Date : Tuesday, December 03, 2019 2:32:25 PM
 Measurement Type : Particle Size
 Sample Name : Fraksi n-heksan (30:50:20) 80%
 Scattering Angle : 90
 Temperature of the Holder : 24.8 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 1.088 mPa·s
 Transmission Intensity before Meas. : 28073
 Distribution Form : Standard
 Distribution Form(Dispersity) : Monodispersa
 Representation of Result : Scattering Light Intensity
 Count Rate : 1907 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	277.1 nm	215.9 nm	182.0 nm
2	—	— nm	— nm	— nm
3	—	— nm	— nm	— nm
Total	1.00	277.1 nm	215.9 nm	182.0 nm

Cumulant Operations

Z-Average
PI



No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation	No.	Diameter	Frequency	Cumulation
1	0.54	0.000	0.000	32	4.87	0.000	0.000	48	87.09	0.408	0.408	54	160.89	1.888	80.504
2	0.58	0.000	0.000	33	4.97	0.000	0.000	49	88.90	1.187	1.187	55	163.57	1.565	82.069
3	0.63	0.000	0.000	34	5.07	0.000	0.000	50	90.71	2.051	3.238	56	166.24	1.156	83.225
4	0.68	0.000	0.000	35	5.18	0.000	0.000	51	92.53	2.986	6.224	57	168.91	0.884	84.109
5	0.74	0.000	0.000	36	5.29	0.000	0.000	52	94.35	3.991	10.215	58	171.58	0.588	84.697
6	0.81	0.000	0.000	37	5.41	0.000	0.000	53	96.17	4.976	15.191	59	174.25	0.324	85.021
7	0.89	0.000	0.000	38	5.53	0.000	0.000	54	98.00	5.941	21.132	60	176.92	0.181	85.202
8	0.98	0.000	0.000	39	5.66	0.000	0.000	55	99.83	6.886	28.018	61	179.59	0.096	85.298
9	1.08	0.000	0.000	40	5.79	0.000	0.000	56	101.66	7.811	35.829	62	182.26	0.051	85.349
10	1.20	0.000	0.000	41	5.93	0.000	0.000	57	103.50	8.716	44.545	63	184.93	0.026	85.375
11	1.34	0.000	0.000	42	6.07	0.000	0.000	58	105.34	9.591	54.036	64	187.60	0.014	85.389
12	1.50	0.000	0.000	43	6.22	0.000	0.000	59	107.18	10.436	64.472	65	190.27	0.007	85.396
13	1.67	0.000	0.000	44	6.38	0.000	0.000	60	109.03	11.251	75.723	66	192.94	0.004	85.399
14	1.86	0.000	0.000	45	6.54	0.000	0.000	61	110.88	12.036	87.759	67	195.61	0.002	85.401
15	2.07	0.000	0.000	46	6.71	0.000	0.000	62	112.73	12.791	100.550	68	198.28	0.001	85.402
16	2.30	0.000	0.000	47	6.88	0.000	0.000	63	114.58	13.516	114.066	69	200.95	0.000	85.402
17	2.56	0.000	0.000	48	7.06	0.000	0.000	64	116.43	14.211	128.277	70	203.62	0.000	85.402
18	2.70	0.000	0.000	49	7.25	0.000	0.000	65	118.28	14.876	143.153	71	206.29	0.000	85.402
19	3.06	0.000	0.000	50	7.44	0.000	0.000	66	120.13	15.521	158.674	72	208.96	0.000	85.402
20	3.48	0.000	0.000	51	7.64	0.000	0.000	67	122.00	16.146	174.820	73	211.63	0.000	85.402
21	3.99	0.000	0.000	52	7.85	0.000	0.000	68	123.87	16.751	191.571	74	214.30	0.000	85.402

SZ-100

112.C.PSA.IX.2019 R3.nsz

Measurement Results

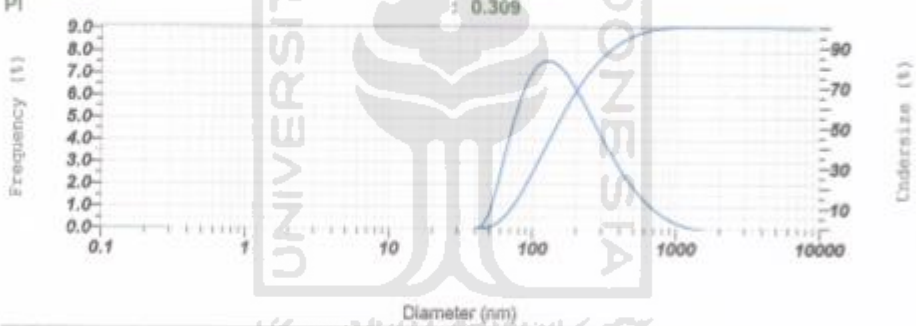
Date	: Tuesday, December 03, 2019 2:32:55 PM
Measurement Type	: Particle Size
Sample Name	: Fraksi n-heksan (30:50:20) 80%
Scattering Angle	: 90
Temperature of the Holder	: 24.8 °C
Dispersion Medium Viscosity	: 1.087 mPa·s
Transmission Intensity before Meas.	: 28073
Distribution Form	: Standard
Distribution Form(Dispersity)	: Monodisperse
Representation of Result	: Scattering Light Intensity
Count Rate	: 1773 kCPS

Calculation Results

Peak No.	S.P./Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	190.0 nm	143.7 nm	126.0 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	190.0 nm	142.7 nm	126.0 nm

Cumulat Operations

Z-Average



No.	Diameter	Frequency	Cumulative	No.	Diameter	Frequency	Cumulative	No.	Diameter	Frequency	Cumulative	No.	Diameter	Frequency	Cumulative
1	2.34	0.000	0.000	23	4.47	0.000	0.000	45	12.28	1.000	2.912	75	30.30	0.000	86.474
2	2.56	0.000	0.000	24	4.97	0.000	0.000	46	14.86	3.000	5.912	76	32.97	0.000	89.474
3	0.42	0.000	0.000	25	5.07	0.000	0.000	47	16.86	5.000	10.912	77	35.71	0.000	92.474
4	0.44	0.000	0.000	26	5.34	0.000	0.000	48	18.33	6.000	16.912	78	38.60	0.000	95.474
5	0.55	0.000	0.000	27	5.77	0.000	0.000	49	20.37	7.000	23.912	79	41.75	0.000	98.474
6	0.62	0.000	0.000	28	6.10	0.000	0.000	50	22.97	7.000	30.912	80	45.17	0.000	101.474
7	0.72	0.000	0.000	29	6.55	0.000	0.000	51	26.13	7.000	37.912	81	48.86	0.000	104.474
8	0.82	0.000	0.000	30	7.04	0.000	0.000	52	29.86	7.000	44.912	82	52.83	0.000	107.474
9	0.95	0.000	0.000	31	7.57	0.000	0.000	53	34.17	7.000	51.912	83	57.06	0.000	110.474
10	1.09	0.000	0.000	32	8.14	0.000	0.000	54	39.17	7.000	58.912	84	61.55	0.000	113.474
11	1.15	0.000	0.000	33	8.74	0.000	0.000	55	44.86	7.000	65.912	85	66.29	0.000	116.474
12	1.30	0.000	0.000	34	9.37	0.000	0.000	56	51.25	7.000	72.912	86	71.28	0.000	119.474
13	1.47	0.000	0.000	35	10.03	0.000	0.000	57	58.34	7.000	79.912	87	76.52	0.000	122.474
14	1.66	0.000	0.000	36	10.72	0.000	0.000	58	66.13	7.000	86.912	88	81.99	0.000	125.474
15	1.87	0.000	0.000	37	11.44	0.000	0.000	59	74.64	7.000	93.912	89	88.00	0.000	128.474
16	2.11	0.000	0.000	38	12.19	0.000	0.000	60	83.87	7.000	100.912	90	94.56	0.000	131.474
17	2.39	0.000	0.000	39	13.00	0.000	0.000	61	93.92	7.000	107.912	91	101.67	0.000	134.474
18	2.70	0.000	0.000	40	13.87	0.000	0.000	62	104.79	7.000	114.912	92	109.34	0.000	137.474
19	3.05	0.000	0.000	41	14.80	0.000	0.000	63	116.50	7.000	121.912	93	117.57	0.000	140.474
20	3.45	0.000	0.000	42	15.79	0.000	0.000	64	128.95	7.000	128.912	94	126.36	0.000	143.474
21	3.89	0.000	0.000	43	16.93	0.000	0.000	65	142.24	7.000	135.912	95	135.70	0.000	146.474

HORIBA
Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

2019.12.03 10:21:59

SZ-100

Measurement Results

Zeta 112.C.PSA.XI.2019.nzt

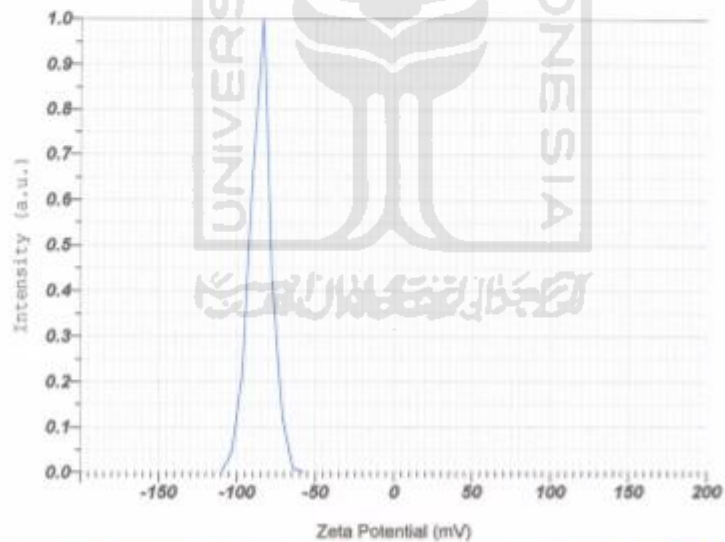
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 8:59:04 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 80%
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Conductivity : 0.086 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.9 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-85.3 mV	-0.000659 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -85.3 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000659 cm²/Vs



Protect the Future

Software for Zeta Potential Measurement Model 7000 Series

HORIBA

1 / 1

2019.12.03 10:21:59

HORIBA
 Scientific

HORIBA SZ-100 for Windows [Z Type] Ver2.00

SZ-100

Measurement Results

Zeta 112.C.PSA.XI.2019 R2.nzt

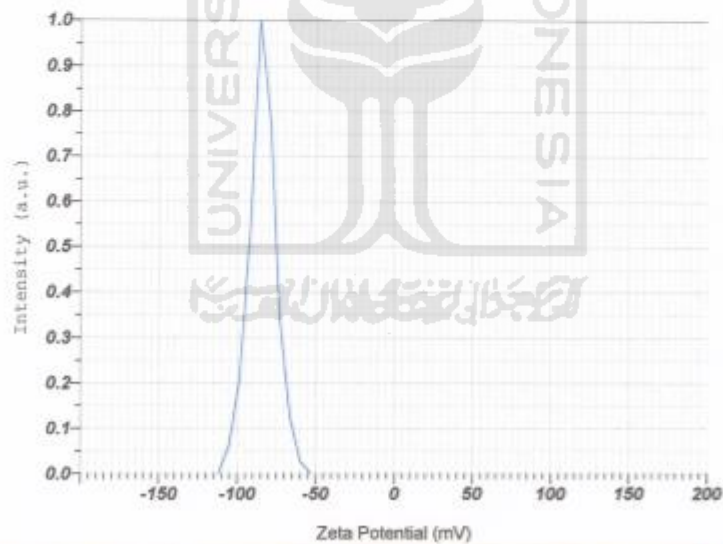
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 8:58:28 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 80%
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Conductivity : 0.086 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.8 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-84.0 mV	-0.000649 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -84.0 mV
 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000649 cm²/Vs



Capture the Blue

Horiba for Zeta Potential & Conductivity | Model | Zeta Potential | Conductivity

HORIBA

1/1

h

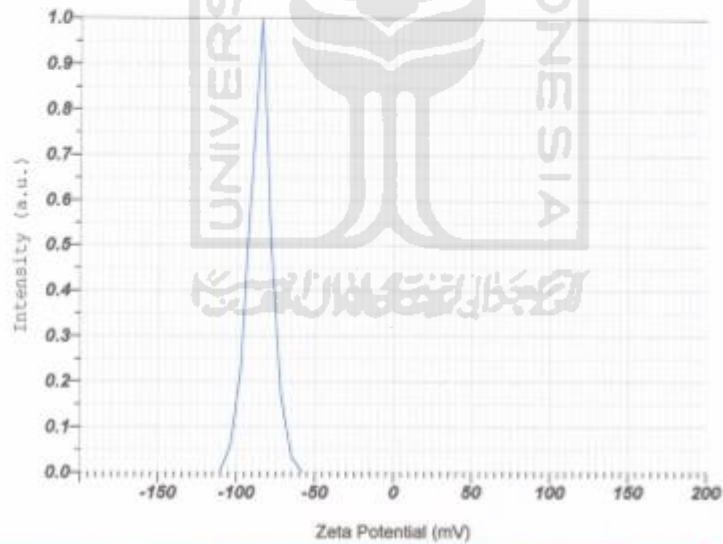
SZ-100
Measurement Results
Zeta 112.C.PSA.XI.2019 R3.nzt
Measurement Results

Date : Tuesday, December 03, 2019 8:57:33 AM
 Measurement Type : Zeta Potential
 Sample Name : Fraksi n - heksan (30:50:20) 80%
 Temperature of the Holder : 24.9 °C
 Dispersion Medium Viscosity : 0.897 mPa·s
 Conductivity : 0.086 mS/cm
 Electrode Voltage : 3.8 V

Calculation Results

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	-85.3 mV	-0.000659 cm ² /Vs
2	-- mV	-- cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -85.3 mV

 Electrophoretic Mobility Mean : -0.000659 cm²/Vs


Lampiran 4. Perhitungan Data-Data Penelitian

Tabel I. Absorbansi sel kanker payudara T47D dengan fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 80%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata- Rata	SD
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,57	0,534	0,527	0,543667	0,02928
kontrol media	0,103	0,118	0,119	0,113333	0,02409
15,625	0,492	0,55	0,514	0,518867	0,018358
31.25	0,519	0,475	0,48	0,491333	0,024705
62,5	0,438	0,443	0,472	0,451	0,001732
125	0,326	0,375	0,345	0,348667	0,003215
250	0,11	0,11	0,13	0,111	0,002

Abs sampel 1- abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3- abs media	Abs sel-abs media
0,378667	0,436667	0,400667	0,430334
0,405667	0,361667	0,366667	0,430334
0,405667	0,329667	0,358667	0,430334
0,212667	0,261667	0,231667	0,430334
-0,003333	-0,003333	0,016667	0,430334

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata Viabilitas	Standar Deviasi
87,9937444	101,4716476	93,106053	94,1904815	6,804077
94,2679407	84,04332449	85,205213	87,83882597	5,598003
94,2679407	76,60723996	83,346192	84,74045741	8,912523
49,4190559	60,80556033	53,834231	54,68628244	5,740872
-0,77451468	-0,77451468	3,8730382	0,774669598	2,683266

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD

Tabel II. Absorbansi sel kanker payudara T47D dengan fraksi *n*-heksana ekstral etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 60%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata- Rata	SD
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,57	0,534	0,527	0,543667	0,03034
kontrol media	0,103	0,118	0,119	0,113333	0,0127
15,625	0,55	0,553	0,499	0,534	0,019
31.25	0,487	0,509	0,487	0,494333	0,01193
62,5	0,447	0,466	0,485	0,466	0,021362
125	0,398	0,392	0,375	0,388333	0,00516
250	0,102	0,109	0,142	0,117667	0,00571

Abs sampel 1- abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3- abs media	Abs sel-abs media
0,436667	0,439667	0,385667	0,430334
0,373667	0,395667	0,373667	0,430334
0,333667	0,352667	0,371667	0,430334
0,284667	0,278667	0,261667	0,430334
-0,011333	-0,004333	0,028667	0,430334

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Rata-rata Viabilitas	SD
101,471648	102,1687805	89,620388	97,75360534	7,052192
86,8318562	91,9441643	86,831856	88,53595889	2,951592
77,5367505	81,95192571	86,367101	81,95192571	4,415175
66,1502461	64,75598024	60,80556	63,90392889	2,772347
-2,63353581	-1,00689232	6,6615699	1,007047239	4,964042

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD

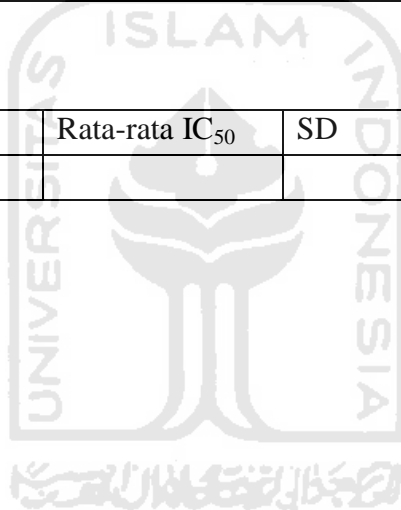
Tabel III. Absorbansi sel kanker payudara T47D dengan fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 40%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-Rata	Standar deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,57	0,534	0,527	0,543667	0,02307235
kontrol media	0,103	0,118	0,119	0,113333	0,00896289
15,625	0,522	0,513	0,515	0,516667	0,00472582
31,25	0,485	0,489	0,493	0,492667	0,004
62,5	0,511	0,446	0,454	0,470333	0,03544479
125	0,434	0,437	0,42	0,430333	0,00907377
250	0,112	0,114	0,127	0,117667	0,00814453
500	0,114	0,114	0,118	0,145333	0,0023094
1000	0,102	0,101	0,107	0,10275	0,0032145

Abs sampel 1- abs media	Abs sampel 2- abs media	Abs sampel 3- abs media	Abs sel- media
0,408667	0,399667	0,401667	0,430334
0,371667	0,375667	0,379667	0,430334
0,397667	0,332667	0,340667	0,430334
0,320667	0,323667	0,306667	0,430334
-0,001333	0,000667	0,013667	0,430334
0,000667	0,000667	0,004667	0,430334
-0,011333	-0,012333	-0,006333	0,430334

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Ratarata Viabilitas	Standard Deviasi
94,9650736	92,87367487	93,33843	93,72572622	1,098174
86,3671009	87,29661147	88,226122	87,29661147	0,929511
92,4089196	77,30437288	79,163394	82,95889549	8,236577
74,5158412	75,21297411	71,262554	73,66378983	2,108542
-0,3097594	0,154995887	3,1759052	1,007047239	1,892606
0,15499589	0,154995887	1,0845065	0,464832742	0,536653
-2,63353581	-2,86591345	-1,4716476	-2,323698956	0,74699

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD



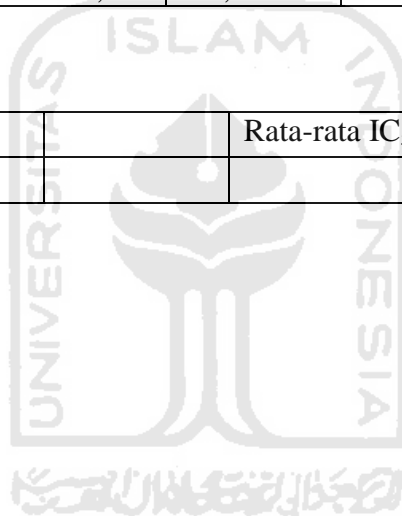
Tabel IV. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 dengan fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 80%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi				Rata-rata
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4	
Kontrol sel	0,224	0,222	0,221	0,221	0,222
kontrol media	0,092	0,097	0,099	0,098	0,965
15,625	0,193	0,197	0,179	0,197	0,1915
31,25	0,18	0,166	0,187	0,184	0,17925
62,5	0,174	0,171	0,171	0,173	0,17225
125	0,159	0,154	0,156	0,159	0,157
250	0,155	0,139	0,15	0,135	0,14475
500	0,101	0,093	0,15	0,135	0,095
1000	0,09	0,087	0,083	0,089	0,08725

Standar Deviasi	Abs sampel 1- absmedia	Abs sampel 2- absmedia	Abs sampel 3- absmedia	Abs sampel 4- absmedia	abs media
0,222					
0,965	0,0965	0,1005	0,0825	0,1005	0,1255
0,1915	0,0835	0,0695	0,0905	0,0875	0,1255
0,17925	0,0775	0,0745	0,0745	0,0765	0,1255
0,17225	0,0625	0,0575	0,0595	0,0625	0,1255
0,157	0,0585	0,0425	0,0535	0,0385	0,1255
0,14475	0,0045	-0,0035	0,0535	0,0385	0,1255
0,095	-0,0065	-0,0095	-0,0135	-0,0075	0,1255
0,08725					

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Viabilitas 4	Ratarata viabilitas	Standar deviasi
76,89243	80,07968	65,73705	80,07968	75,6972	6,80797
66,53386	55,37849	72,11155	69,72112	65,9363	7,40007
61,75299	59,36255	59,36255	60,95618	60,3586	1,19522
49,8008	45,81673	47,41036	49,8008	48,2072	1,95178
46,61355	33,86454	42,62948	30,67729	38,4462	7,42861
3,585657	-2,788845	42,62948	30,67729	18,5259	21,65
-5,179283	-7,569721	-10,757	-5,976096	-7,3705	2,46669

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3		Rata-rata IC ₅₀	SD



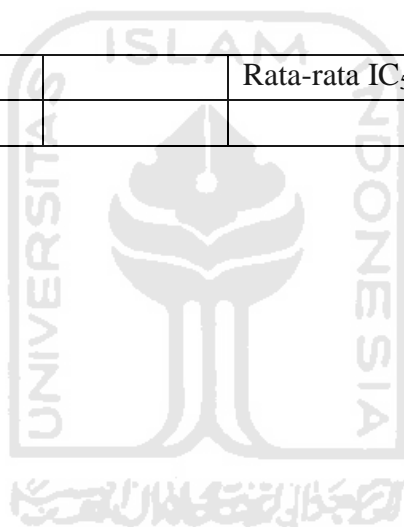
Tabel V. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 dengan fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 60%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi				Rata-rata
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4	
Kontrol sel	0,224	0,222	0,221	0,221	0,222
kontrol media	0,092	0,097	0,099	0,098	0,965
15,625	0,187	0,189	0,187	0,191	0,189
31.25	0,184	0,194	0,189	0,193	0,18866
62,5	0,179	0,183	0,185	0,181	0,182
125	0,154	0,158	0,152	0,154	0,1545
250	0,135	0,135	0,135	0,135	0,135
500	0,098	0,101	0,089	0,095	0,09575
1000	0,094	0,087	0,083	0,082	0,0865

Standar deviasi	Abs sampel 1- absmedia	Abs sampel 2- absmedia	Abs sampel 3- absmedia	Abs sampel 4- absmedia	abs media
0,001414214	0,0905	0,0925	0,0905	0,0945	0,1255
0,003109126	0,0875	0,0975	0,0925	0,0965	0,1255
0,001914854	0,0875	0,0865	0,0885	0,0845	0,1255
0,004546061	0,0575	0,0615	0,0555	0,0575	0,1255
0,002581989	0,0385	0,0385	0,0385	0,0385	0,1255
0,002516611	0,0015	0,0045	-0,0075	-0,0015	0,1255
0	-0,0025	-0,0095	-0,0135	-0,0145	0,1255
0,005123475					
0,005446712					

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Viabilitas 4	Ratarata viabilitas	Standar deviasi
72,1115538	73,7051793	72,111554	75,2988048	73,3067729	1,52578
69,7211155	77,689243	73,705179	76,8924303	74,501992	3,622359
69,7211155	68,9243028	70,517928	67,3306773	69,123506	1,360817
45,8167331	49,0039841	44,223108	45,8167331	46,2151394	2,005268
30,6772908	30,6772908	30,677291	30,6772908	30,6772908	0
1,19521912	3,58565737	-5,976096	-1,1952191	-0,5976096	4,082451
-1,9920319	-7,5697211	-10,75697	-11,553785	-7,9681275	4,340009

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3		Rata-rata IC ₅₀	SD



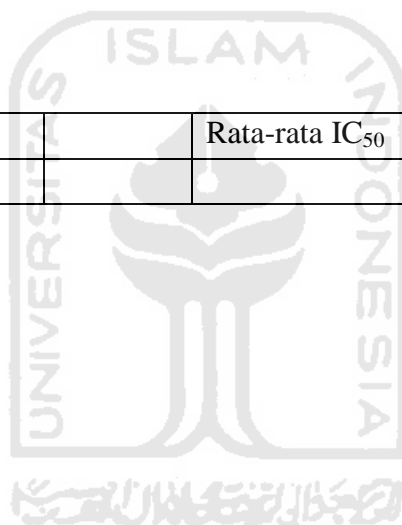
Tabel VI. Absorbansi sel kanker payudara MCF-7 dengan fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 40%

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi				Rata-rata
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4	
Kontrol sel	0,224	0,222	0,221	0,221	0,222
kontrol media	0,092	0,097	0,099	0,098	0,965
15,625	0,194	0,194	0,199	0,196	0,19575
31,25	0,184	0,184	0,194	0,181	0,18575
62,5	0,186	0,175	0,176	0,173	0,1775
125	0,155	0,149	0,142	0,150	0,149
250	0,138	0,135	0,131	0,151	0,13875
500	0,096	0,096	0,101	0,106	0,09975
1000	0,083	0,089	0,087	0,101	0,09

Standard Deviasi	Abs sampel 1- absmedia	Abs sampel 2- absmedia	Abs sampel 3- absmedia	Abs sampel 4- absmedia	abs media
0,001414214	0,0975	0,0975	0,1025	0,0995	0,1255
0,003109126	0,0875	0,0875	0,0975	0,0845	0,1255
0,002362908	0,0895	0,0785	0,0795	0,0845	0,1255
0,005678908	0,0585	0,0525	0,0455	0,0535	0,1255
0,005802298	0,0415	0,0385	0,0345	0,0545	0,1255
0,005354126	-0,0005	-0,0005	0,0045	0,0095	0,1255
0,008655441	-0,0135	-0,0075	-0,0095	0,0045	0,1255
0,004787136					
0,007745967					

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Viabilitas 4	Ratarata viabilitas	Standar deviasi
77,689243	77,689243	81,673307	79,2828685	79,0836653	1,882795
69,7211155	69,7211155	77,689243	67,3306773	71,1155378	4,525027
71,314741	62,5498008	63,346614	67,3306773	66,1354582	4,036835
46,6135458	41,8326693	36,25498	42,6294821	41,8326693	4,266236
33,0677291	30,6772908	27,49004	43,4262948	33,6653386	6,896766
-0,3984064	-0,3984064	3,5856574	7,56972112	2,58964143	3,814451
-10,756972	-5,9760956	-7,569721	3,58565737	-5,1792829	6,172085

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3		Rata-rata IC ₅₀	SD



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

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-rata	Standar deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,254	0,262	0,251	0,2555	0,00566
kontrol media	0,073	0,078	0,074	0,07475	0,002646
62,5	0,251	0,243	0,265	0,253	0,011136
125	0,271	0,265	0,272	0,269333	0,003786
250	0,248	0,25	0,25	0,249333	0,001155
500	0,075	0,078	0,082	0,078333	0,003512
1000	0,073	0,077	0,075	0,075	0,002

Abs sampel 1- absmedia	Abs sampel 2- absmedia	Abs sampel 3- absmedia	abs media
0,17625	0,16825	0,19025	0,18075
0,19625	0,19025	0,19725	0,18075
0,17325	0,17525	0,17525	0,18075
0,00025	0,00325	0,00725	0,18075
-0,00175	0,00225	0,00025	0,18075

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Ratarata viabilitas	Standar deviasi
97,5103734	93,0843707	105,2558783	98,616874	6,160735
108,57538	105,255878	109,1286307	107,6533	2,094572
95,8506224	96,9571231	96,9571231	96,58829	0,638838
0,13831259	1,79806362	4,011065007	1,9824804	1,942951
-0,9681881	1,24481328	0,138312586	0,1383126	1,106501

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD

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

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-rata	Standar deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
Kontrol sel	0,254	0,262	0,251	0,2555	0,005686
kontrol media	0,073	0,078	0,074	0,07475	0,002646
62,5	0,247	0,253	0,258	0,252667	0,005508
125	0,251	0,255	0,258	0,254667	0,003512
250	0,243	0,2454	0,242	0,243333	0,001747
500	0,077	0,079	0,066	0,074	0,007
1000	0,073	0,075	0,061	0,049333	0,007572

Abs sampel 1- absmedia	Abs sampel 2- absmedia	Abs sampel 3- absmedia	abs media
0,17225	0,17825	0,18325	0,18075
0,17625	0,18025	0,18325	0,18075
0,16825	0,17065	0,16725	0,18075
0,00225	0,00425	-0,00875	0,18075
-0,00175	0,00025	-0,01375	0,18075

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Ratarata viabilitas	Standar deviasi
95,2973721	98,6168741	101,3831259	98,432457	3,047065
97,5103734	99,7233748	101,3831259	99,538958	1,942951
93,0843707	94,4121715	92,53112033	93,342554	0,966738
1,24481328	2,35131397	-4,84094053	0,4149378	3,872752
-0,9681881	0,13831259	-7,60719225	2,8123559	4,189144

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD

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

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-rata	Standar deviasi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulang an 3		
Kontrol sel	0,254	0,262	0,251	0,2555	0,00568624
kontrol media	0,073	0,078	0,074	0,07475	0,00264575
62,5	0,253	0,259	0,228	0,246667	0,01644182
125	0,245	0,244	0,242	0,243667	0,00152753
250	0,216	0,225	0,233	0,22	0,0085049
500	0,075	0,068	0,075	0,072667	0,00404145
1000	0,067	0,066	0,075	0,069333	0,00493288

Abs sampel 1- absmedia	Abs sampel 2- absmedia	Abs sampel 3- absmedia	abs media
0,17825	0,18425	0,15325	0,18075
0,17025	0,16925	0,16725	0,18075
0,14125	0,15025	0,15825	0,18075
0,00025	-0,00675	0,00025	0,18075
-0,00775	-0,00875	0,00025	0,18075

Viabilitas 1	Viabilitas 2	Viabilitas 3	Ratarata viabilitas	Standar deviasi
98,6168741	101,936376	84,78561549	95,112955	9,096441
94,1908714	93,637621	92,53112033	93,453204	0,845104
78,1466113	83,1258645	87,55186722	82,941448	4,705339
0,13831259	-3,7344398	0,138312586	1,1526049	2,235935
-4,2876902	-4,8409405	0,138312586	2,9967727	2,729119

IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	Rata-rata IC ₅₀	SD

Lampiran 5. Data Perhitungan rendemen ekstrak kasar dan fraksi daun jambu biji

1.1 Rendemen ekstrak kasar

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

$$\% \text{Rendemen} = \frac{287,935}{750} \times 100\% = 38,39\%$$

1.2 Rendemen fraksi

$$\% \text{Rendemen fraksi n-heksan} = \frac{5,526}{153,5} \times 100\%$$

$$\% \text{Rendemen} = 2,77\%$$

1.3 Panen Sel

1. Sel vero

$$R = \frac{\text{jumlah sel}}{4} \times 10^4$$

$$R = \frac{960}{4} \times 10^4 = 225 \times 10^4$$

2. Sel T47D

$$R = \frac{666}{4} \times 10^4 = 142 \times 10^4$$

3. Sel MCF-7

$$4. R = \frac{488}{4} \times 10^4 = 122 \times 10^4$$

Lampiran 6. Perhitungan nilai IC₅₀ tiap fraksi terhadap sel kaker T47D

1. Perhitungan nilai IC₅₀

Fraksi *n*-heksana daun jambu biji

Sel T47D

Konsentrasi 80%

$$y = -73,875x + 197,71$$

$$50 = -73,875x + 197,71$$

$$x = (50 - 197,71) / -73,875x$$

$$x = 1,9$$

$$\text{antilog} = 97,723$$

$$y = -75,65x + 200,29$$

$$50 = -75,65x + 200,29$$

$$x = (50 - 200,29) / -75,65x$$

$$x = 1,98$$

$$\text{antilog} = 95,499$$

$$y = -69,706x + 189,06$$

$$50 = -69,706x + 189,06$$

$$x = (50 - 189,06) / -69,706x$$

$$x = 1,99$$

$$\text{antilog} = 97,723$$

$$\text{IC}_{50} \text{ Fraksi n-heksana pada T47D} = (\text{IC}_{50} 1 + \text{IC}_{50} 2 + \text{IC}_{50} 3) / 3 = 96,981$$

Konsentrasi 60%

$$y = -76,036x + 202,42$$

$$50 = -76,036x + 202,42$$

$$x = (50 - 202,42) / -76,036x$$

$$x = 2,00$$

$$\text{antilog } 2,00 = 100$$

$$y = -77,58x + 207,29$$

$$50 = -77,58x + 207,29$$

$$x = (50 - 207,29) / -77,58x$$

$$x = 2,02$$

$$\text{antilog } 2,02 = 104,712$$

$$y = -63,762x + 180,57$$

$$50 = -63,762x + 180,57$$

$$x = (50 - 180,57) / -63,762x$$

$$x = 2,04$$

$$\text{antilog } 2,04 = 109,647$$

$$IC_{50} \text{ Fraksi } n\text{-heksana pada T47D} = (IC_{50} 1 + IC_{50} 2 + IC_{50} 3) / 3 = 104,786$$

Konsentrasi 40%

$$y = -66,194x + 188,16$$

$$50 = -66,194x + 188,16$$

$$x = (50 - 188,16) / -66,194$$

$$x = 2,08$$

$$\text{antilog } 2,08 = 120,226$$

$$y = -63,906x + 181,17$$

$$50 = -63,906x + 181,17$$

$$x = (50 - 181,17) / -63,906x$$

$$x = 2,05$$

$$\text{antilog } 2,05 = 112,201$$

$$y = -63,437x + 180,85$$

$$50 = -63,437x + 180,85$$

$$x = (50 - 180,85) / -63,437x$$

$$x = 2,06$$

$$\text{antilog } 2,06 = 114,815$$

$$IC_{50} \text{ Fraksi } n\text{-heksana pada T47D} = (IC_{50} 1 + IC_{50} 2 + IC_{50} 3) / 3 = 115,747$$

Fraksi *n*-heksana daun jambu biji

Sel MCF-7

Konsentrasi 80%

$$y = -45,944x + 139,2$$

$$50 = -45,944x + 139,2$$

$$x = (50 - 139,2) / -45,944x$$

$$x = 1,97$$

$$\text{antilog } 1,97 = 93,325$$

$$y = -48,023x + 138,44$$

$$50 = -48,023x + 138,44$$

$$x = (50 - 138,44) / -48,023x$$

$$x = 1,84$$

$$\text{antilog } 1,84 = 69,183$$

$$y = -36,207x + 121,51$$

$$50 = -36,207x + 121,51$$

$$x = (50 - 121,51) / -36,207x$$

$$x = 1,92$$

$$\text{antilog } 1,92 = 83,176$$

$$y = -43,486x + 136,32$$

$$50 = -43,486x + 136,32$$

$$x = (50 - 136,32) / -43,486x$$

$$x = 1,91$$

$$\text{antilog } 1,91 = 81,283$$

$$\text{IC}_{50} \text{ Fraksi n-heksana pada T47D} = (\text{IC}_{50} 1 + \text{IC}_{50} 2 + \text{IC}_{50} 3 + \text{IC}_{50} 4) / 4 =$$

$$81,706$$

Konsentrasi 60%

$$y = -47,267x + 140,15$$

$$50 = -47,267x + 140,15$$

$$x = (50 - 140,15) / -47,267$$

$$x = 1,90$$

$$\text{antilog } 1,90 = 79,432$$

$$y = -51,048x + 149,33$$

$$50 = -51,048x + 149,33$$

$$x = (50 - 149,33) / -51,048x$$

$$x = 1,94$$

$$\text{antilog } 1,94 = 87,096$$

$$y = -53,79x + 153,26$$

$$50 = -53,79x + 153,26$$

$$x = (50 - 153,26) / -53,79x$$

$$x = 1,91$$

$$\text{antilog } 1,91 = 81,283$$

$$y = -51,308x + 148,34$$

$$50 = -51,308x + 148,34$$

$$x = (50 - 148,34) / -51,308x$$

$$x = 1,91$$

$$\text{antilog } 1,91 = 81,283$$

$$IC_{50} \text{ Fraksi n-heksana pada T47D} = (IC_{50} 1 + IC_{50} 2 + IC_{50} 3 + IC_{50} 4) / 4 =$$

$$82,603$$

Konsentrasi 40%

$$y = -52,655x + 151,45$$

$$50 = -52,655x + 151,45$$

$$x = (50 - 151,45) / -52,655x$$

$$x = 1,92$$

$$\text{antilog } 1,92 = 83,176$$

$$y = -50,198x + 144,7$$

$$50 = -50,198x + 144,7$$

$$x = (50 - 144,7) / -50,198x$$

$$x = 1,88$$

$$\text{antilog } 1,88 = 75,857$$

$$y = -53,601x + 152,75$$

$$50 = -53,601x + 152,75$$

$$x = (50 - 152,75) / -53,601$$

$$x = 1,91$$

$$\text{antilog } = 81,283$$

$$y = -43,958x + 136,63$$

$$50 = -43,958x + 136,63$$

$$x = (50 - 136,63) / -43,958$$

$$x = 1,97$$

$$\text{antilog } 1,97 = 93,325$$

$$\text{IC}_{50} \text{ Fraksi } n\text{-heksana pada T47D} = (\text{IC}_{50} 1 + \text{IC}_{50} 2 + \text{IC}_{50} 3 + \text{IC}_{50} 4) / 4 =$$

$$83,410$$

2. Perhitungan Nilai SI (selectivity Indeks)

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

a. SI Terhadap Sel T47d fraksi *n*-heksana

$$40\% = \frac{269,513}{115,7477} = 2,32$$

$$60\% = \frac{295,329}{104,786} = 2,818$$

$$80\% = \frac{321,195}{96,981} = 3,311$$

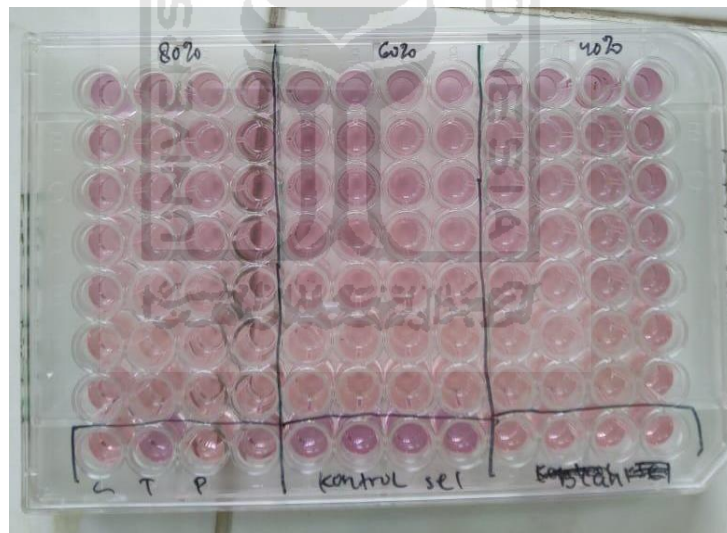
b. SI terhadap sel MCF-7

$$40\% = \frac{269,513}{83,410} = 3,231$$

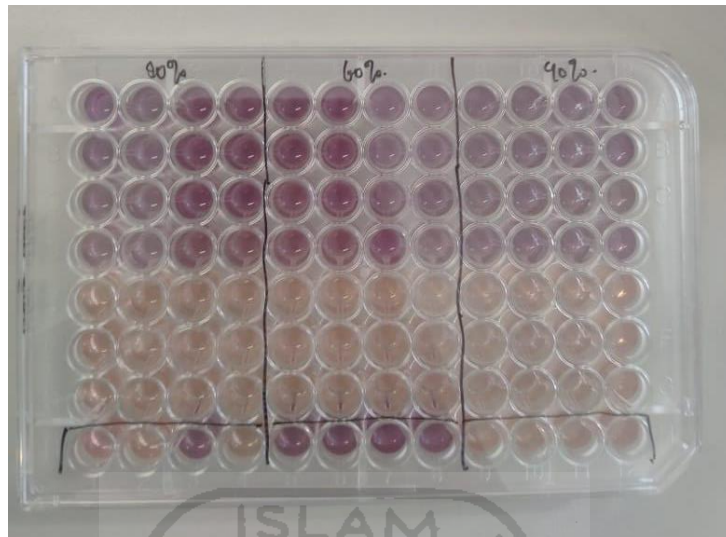
$$60\% = \frac{295,329}{82,603} = 3,575$$

$$80\% = \frac{321,195}{81,706} = 3,937$$

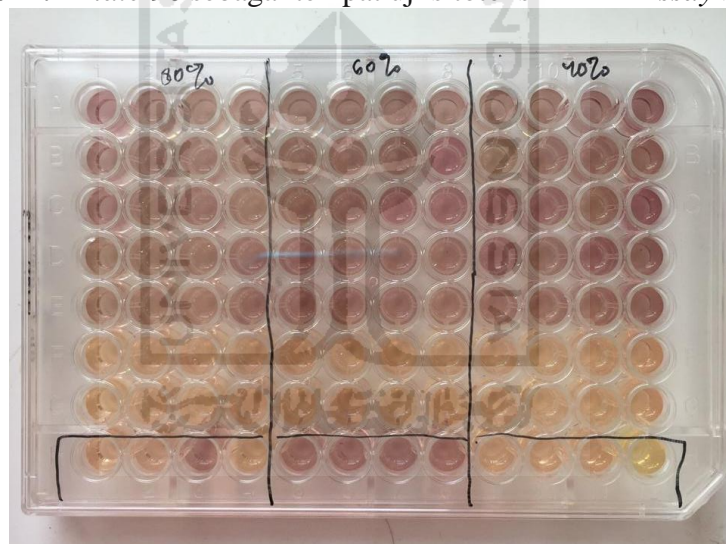
Lampiran VII. Alat dan bahan pada uji sitotoksitas fraksi daun jambu biji



Gambar 7.1 Plate 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel MCF-7



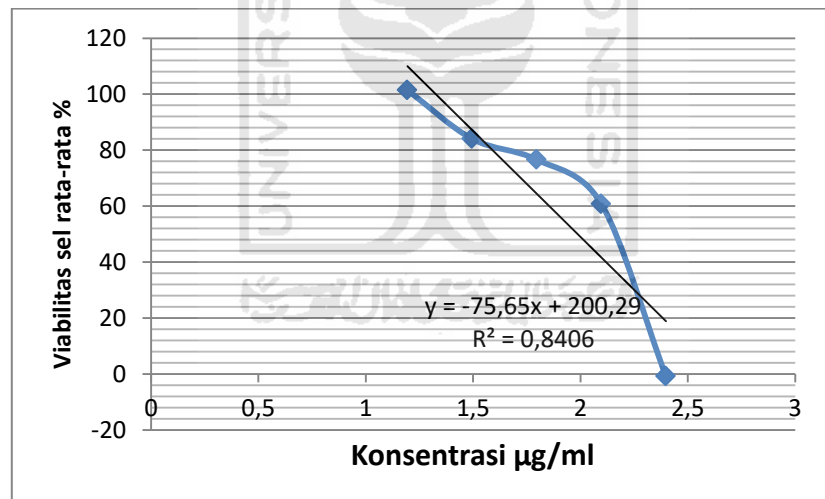
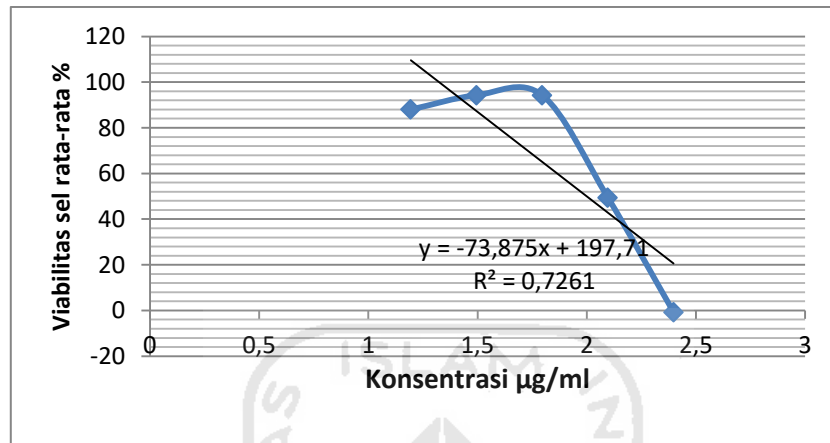
Gambar 7.2 Plate 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel T47D

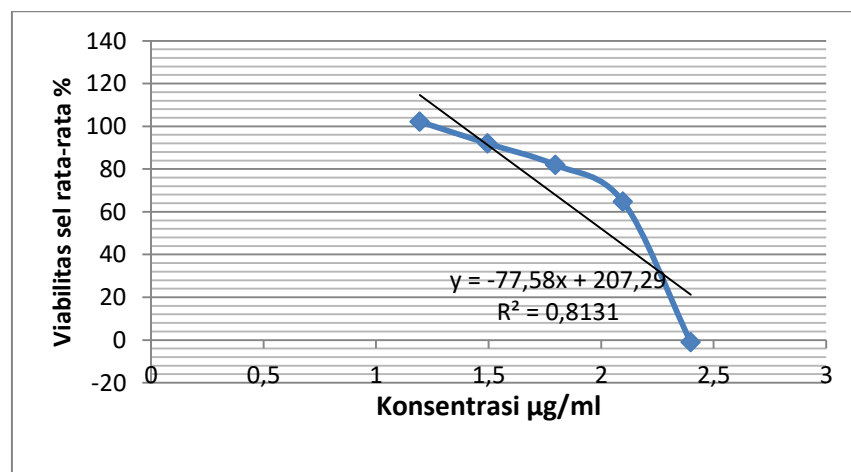
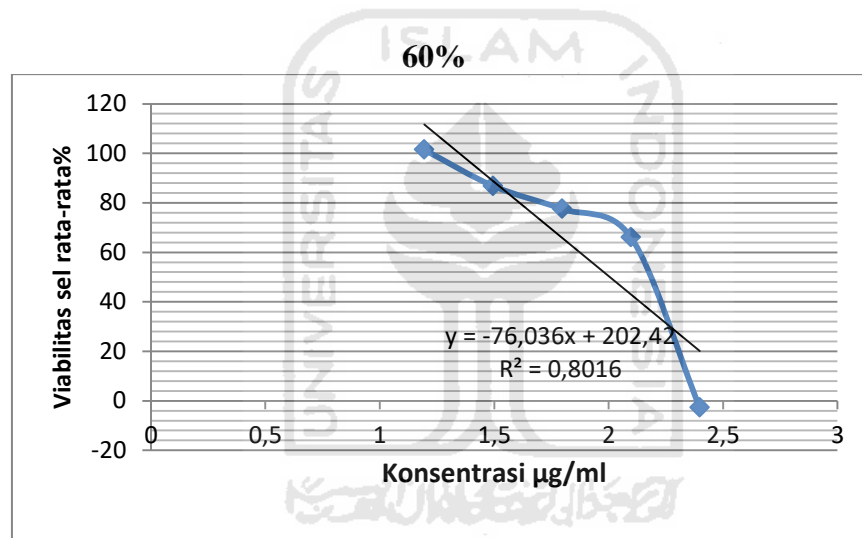
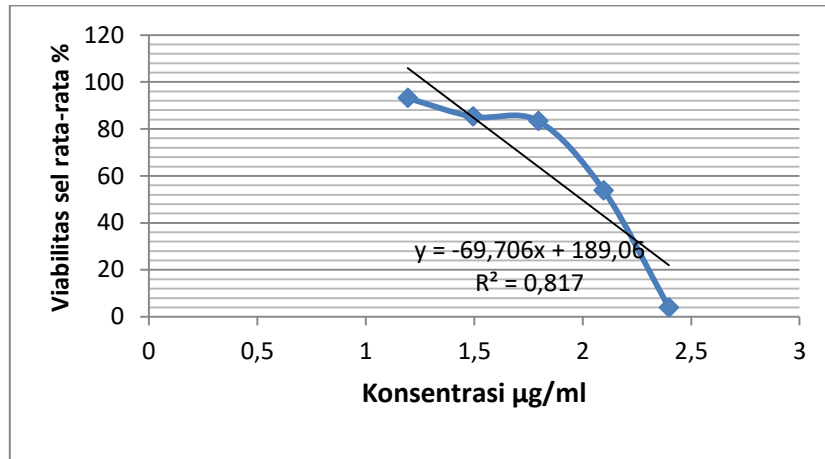


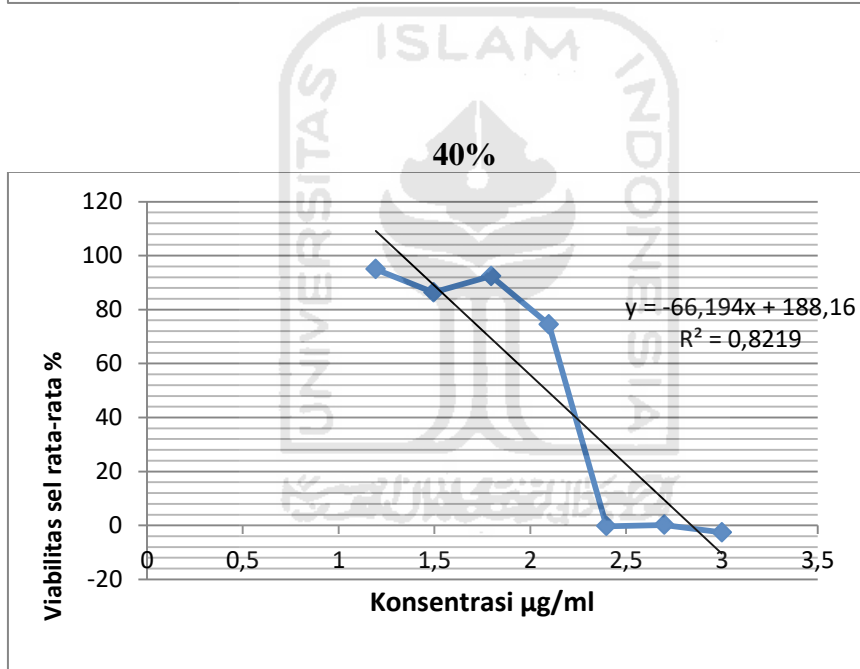
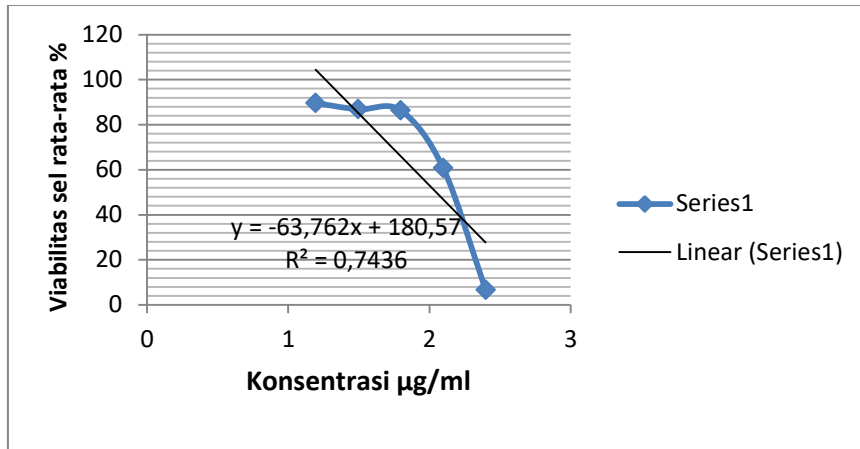
Gambar 7.3 Plate 96 sebagai tempat uji sitotoksik MTT Assay sel Vero

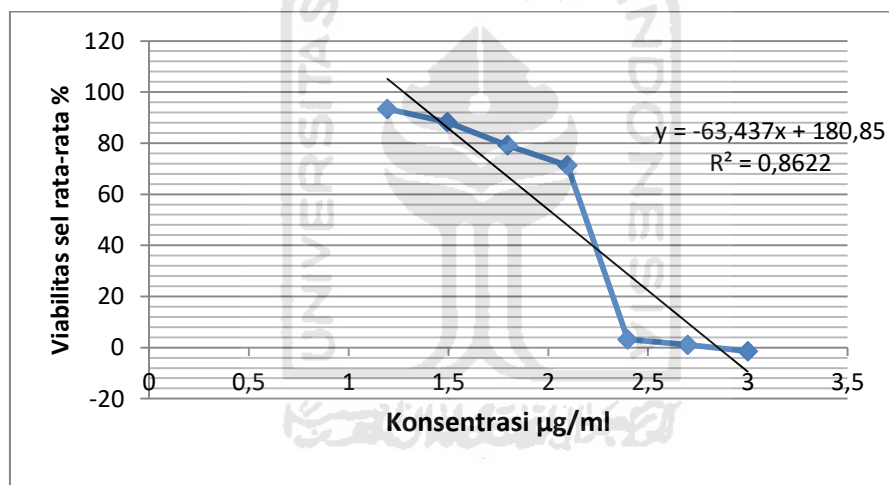
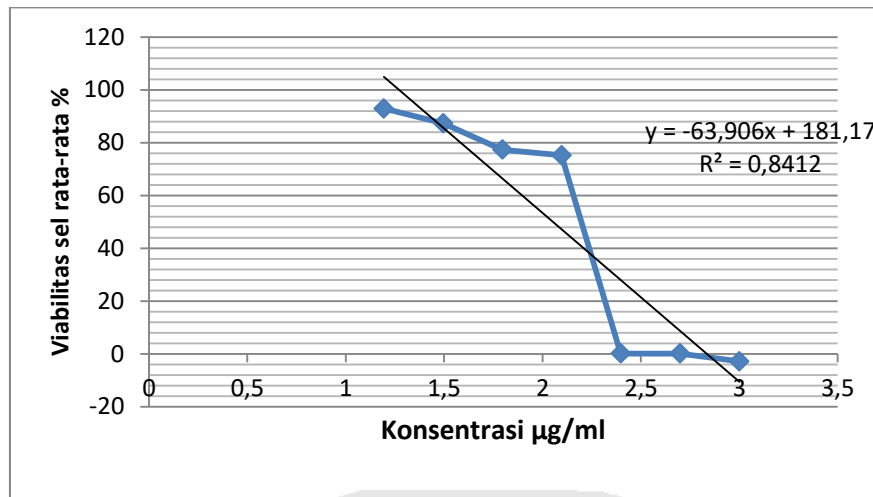
Lampiran VIII. Grafik hubungan konsentrasi sampel tiap fraksi daun jambu biji terhadap Viabilitas sel kanker payudara T47D

80%



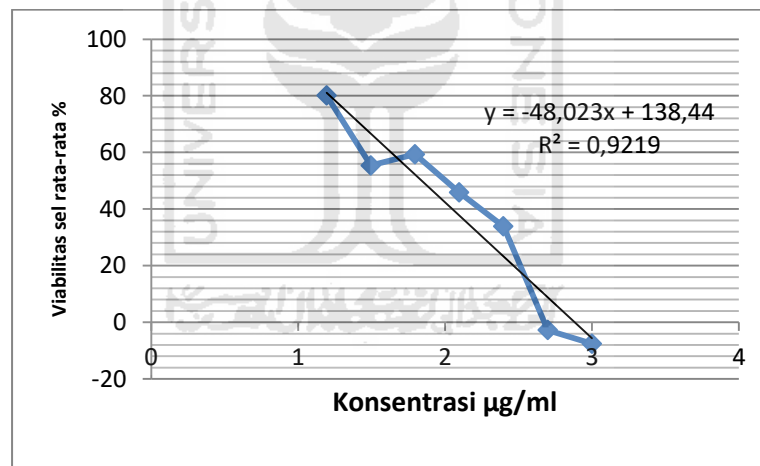
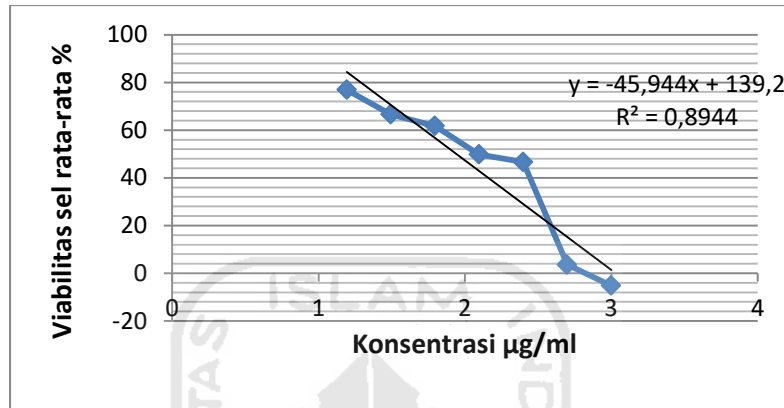


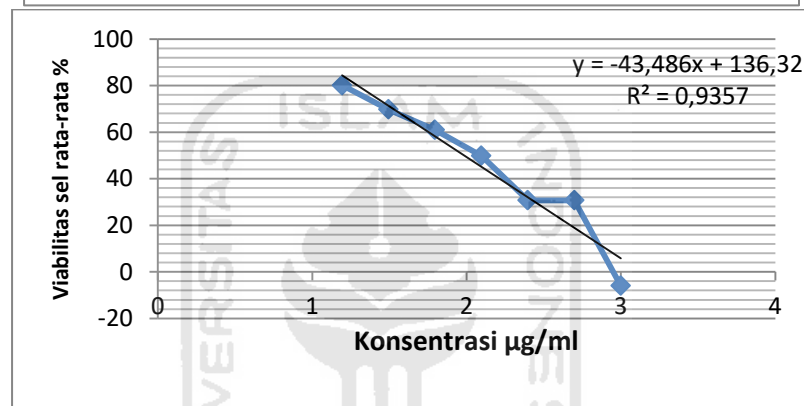
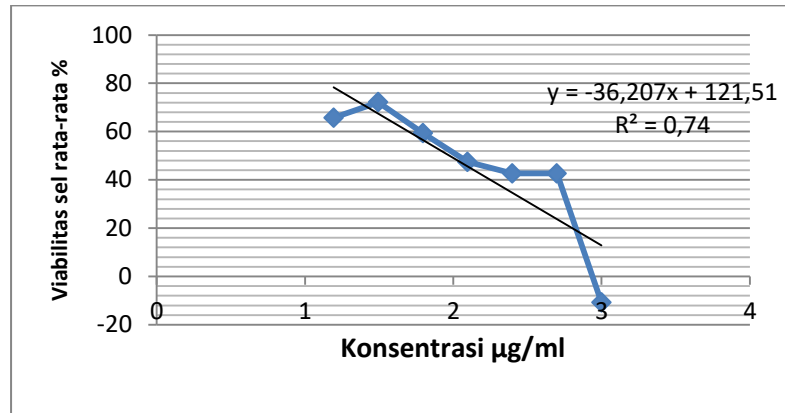




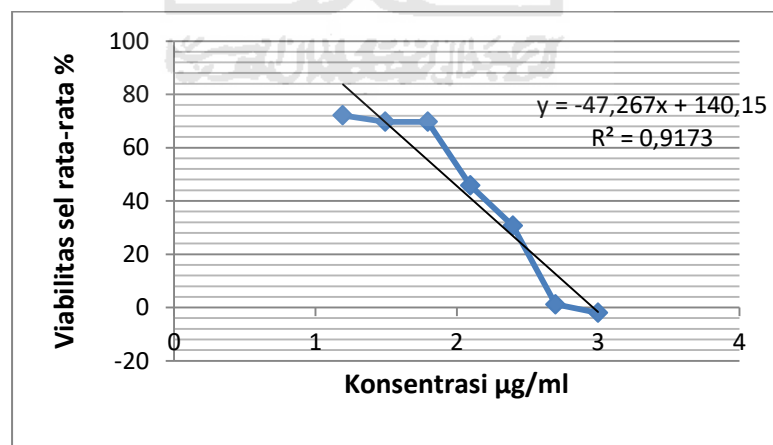
Lampiran IX. Grafik hubungan konsentrasi sampel tiap fraksi daun jambu biji terhadap Viabilitas sel kanker payudara MCF-7

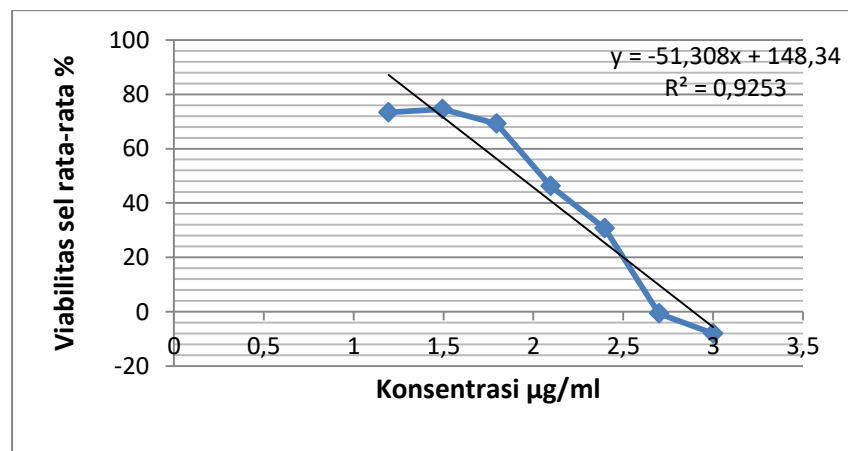
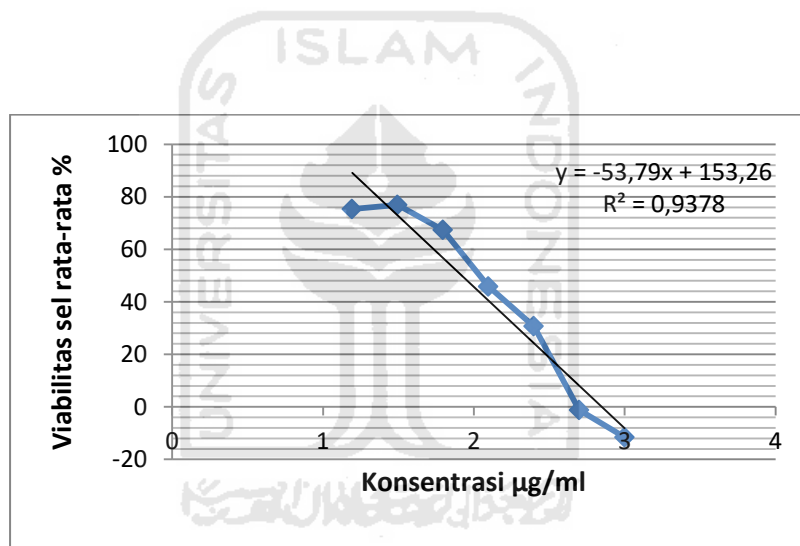
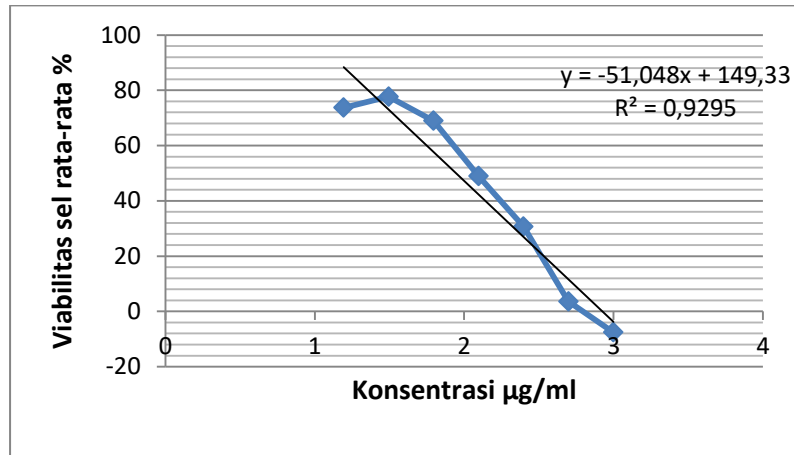
80%



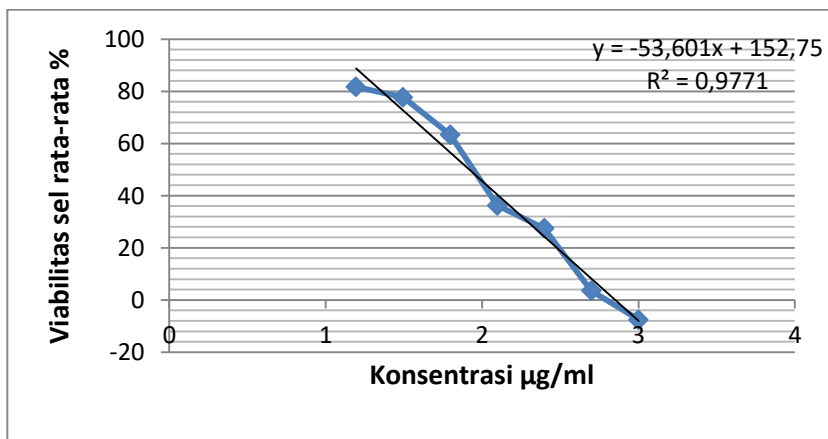
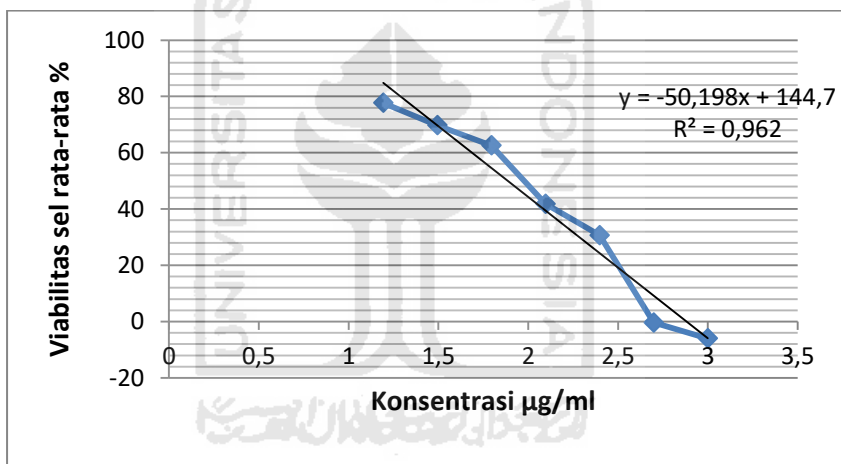
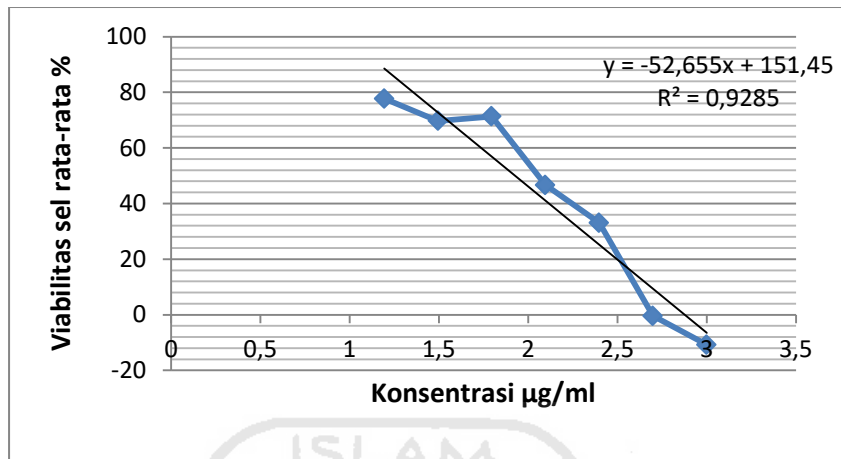


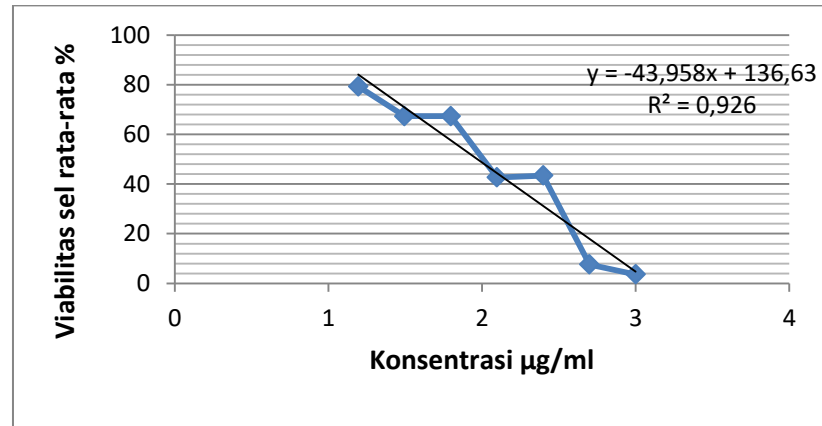
60%



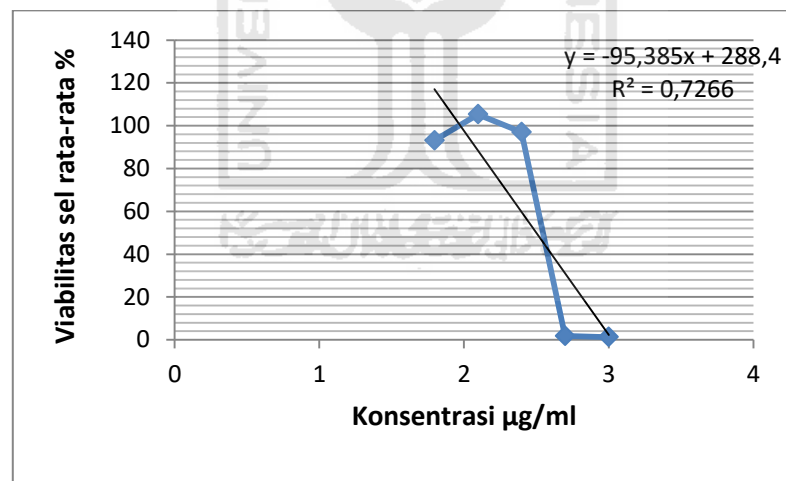


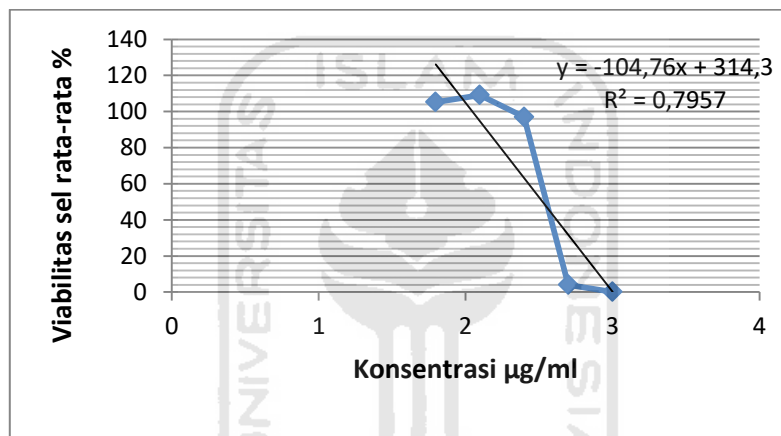
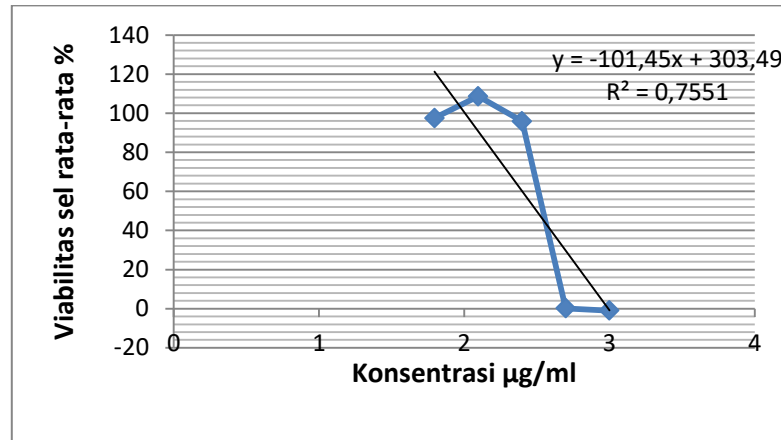
40%



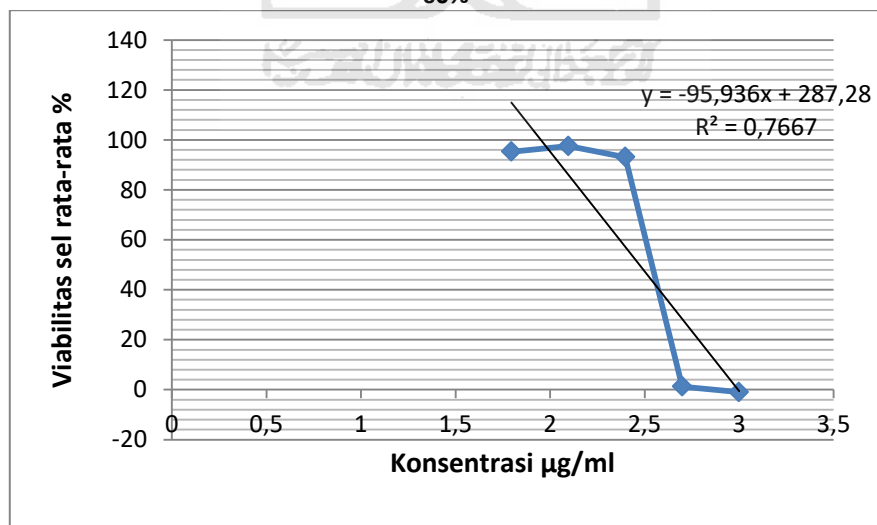


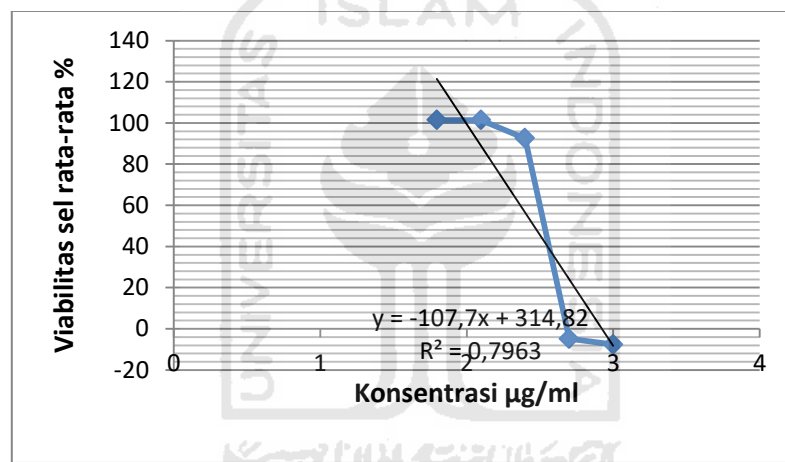
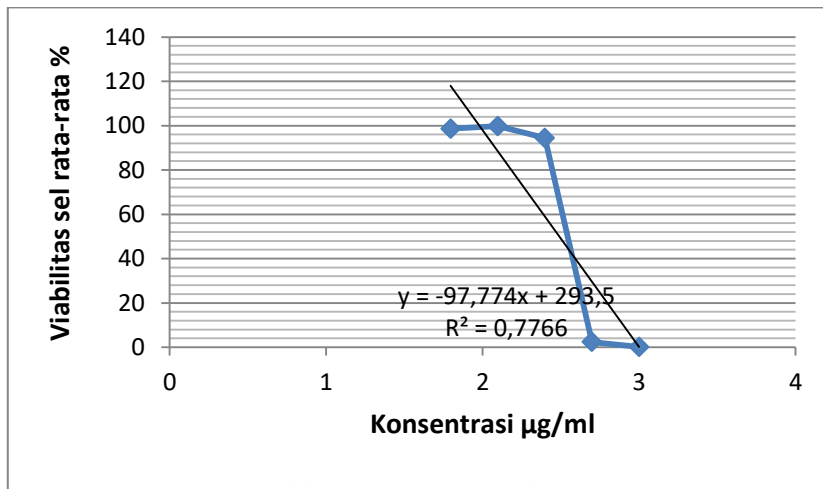
Lampiran X. Grafik hubungan konsentrasi sampel tiap fraksi daun jambu biji terhadap Viabilitas sel Vero





60%





40%

