

**UJI AKTIVITAS ANTIPROLIFERATIF EKSTRAK DAN
FRAKSI n-HEKSAN TUMBUHAN PAKU *Dryopteris marginalis*
(L) Grav TERHADAP KULTUR SEL KANKER PAYUDARA
MCF-7 DENGAN MTT ASSAY**

SKRIPSI



Oleh:

**NITA TRINOVITASARI
12613208**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
DESEMBER 2016**

**UJI AKTIVITAS ANTIPROLIFERATIF EKSTRAK DAN
FRAKSI n-HEKSAN TUMBUHAN PAKU *Dryopteris marginalis*
(L) Grav TERHADAP KULTUR SEL KANKER PAYUDARA
MCF-7 DENGAN MTT ASSAY**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh:

NITA TRINOVITASARI

12613208

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
DESEMBER 2016**

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIPROLIFERATIF EKSTRAK DAN
FRAKSI n-HEKSAN TUMBUHAN PAKU *Dryopteris marginalis*
(L) Grav TERHADAP KULTUR SEL KANKER PAYUDARA
MCF-7 DENGAN MTT ASSAY**



Pembimbing Utama,

Annisa Fitria, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping,

Rochmy Istikharah, M.Sc., Apt

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIPROLIFERATIF EKSTRAK DAN
FRAKSI n-HEKSAN TUMBUHAN PAKU *Dryopteris marginalis*
(L) Grav TERHADAP KULTUR SEL KANKER PAYUDARA
MCF-7 DENGAN MTT ASSAY**

Oleh:



Ketua penguji : Annisa Fitria, M.Sc., Apt (.....*Annisa*.....)

Anggota Penguji : 1. Rochmy Istikharah, M.Sc., Apt (.....*Rochmy*.....)

2. Prof. Dr. Ediati Sasmito, SE., Apt (.....*Ediati*.....)

3. Hady Anshory, M.Sc., Apt (.....*Hady*.....)

Mengetahui

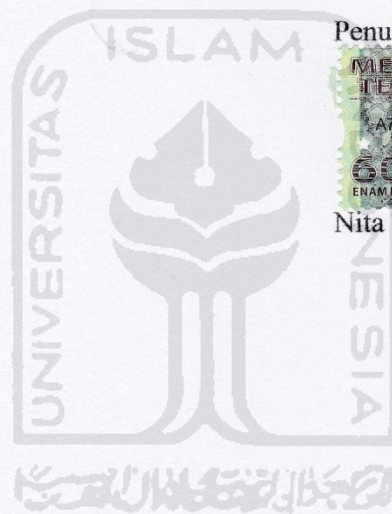
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

[Signature]
Drs. Aliwar, M.Sc., Ph.D

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, Desember 2016



Penulis,



Nita Trinovitasari

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini yang berjudul “Aktivitas Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi n-heksan Tumbuhan Paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav terhadap Kultur Sel Kanker Payudara MCF-7 dengan MTT Assay”. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana di jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia. Tanpa adanya bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak penulisan skripsi ini tidak dapat diselesaikan oleh penulis. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku tercinta yang selalu memberikan semangat, kasih sayang, nasehat, serta doa yang tiada hentinya untuk kelancaran dan kesuksesan studi penulis.
2. Dr. Ir. Harsoyo, Msc., selaku Rektor Universitas Islam Indonesia.
3. Drs. Allwar, M.Sc., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
4. Pinus Jumaryatno, M.Phil., Ph.D., Apt., selaku Ketua Program Studi Farmasi di Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia.
5. Annisa Fitria, M.Sc., Apt dan Rochmy Istikharah, M.Sc., Apt., selaku dosen pembimbing yang telah banyak membantu dengan meluangkan waktu, pikiran, serta tenaga untuk membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.
6. Prof. Dr. Ediati Sasmito, SE., Apt dan Hady Anshory, M.Sc., Apt., selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
7. Rumbiwati, dan seluruh laboran yang telah banyak membantu selama penelitian.
8. Teman seperjuangan skripsi Karina Savitri dan Maya Aulia terima kasih untuk segala masukan, semangat, dan dukungan selama penelitian hingga penyusunan skripsi ini terselesaikan.

9. Asri Tunjung Sari dan Galur Rani Tama terima kasih untuk segala dukungan, saran, dan motivasi yang telah diberikan.
10. Teman-teman seperjuangan semasa kuliah Farmasi C, Injectio 2012, terima kasih untuk segala kisah dan pelajaran hidup yang telah diberikan.
11. Sahabat-sahabatku yang berbeda raga tapi satu jiwa yang selalu mendukung, memberikan semangat serta doa.
12. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan namanya satu persatu yang telah banyak membantu.

Penulis menyadari skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan sehingga penulis mengharapkan dan akan menerima dengan lapang dada segala saran dan masukan yang diberikan. Akhir kata Penulis berharap semoga kebaikan dan amalan Bapak/Ibu/Saudara(i) sekalian dapat dibalas dengan lebih baik oleh Allah SWT.

Yogyakarta, Desember 2016

Nita Trinovitasari



HALAMAN PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat, karunia, dan hidayahNya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

Terima kasih penulis ucapkan untuk segala bantuan, dukungan, perhatian, serta kasih sayang yang telah diberikan kepada penulis dari orang-orang tersayang dan terkasih :

Bapak Harsid, SE., Msi dan ibu Dra. Zatna, bapak dan ibuku tercinta yang selalu memberikan dukungan, motivasi, kasih sayang, nasehat serta doa yang tiada hentinya hingga dapat terselesaikannya penulisan skripsi ini.

Togar Haryopranoto S.Farm., Apt, Ikhsan Hadisaputra S.Kom., kedua kakakku tersayang, dan Agrian Persada Gama adikku tersayang yang selalu memberikan doa, dukungan dan motivasi kepada penulis.

Saudara, sahabat, teman-teman seperjuangan, dan orang terkasih yang namanya tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan doa, bantuan, dukungan dan motivasi kepada penulis, serta telah menjadi potongan kisah indah untuk penulis.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II STUDI PUSTAKA.....	4
2.1 Tinjauan Pustaka.....	4
2.1.1 <i>Dryopteris marginalis</i> (L) Grav.....	4
2.1.2 Senyawa Steroid sebagai Antikanker.....	5
2.1.3 Kanker.....	5
2.1.4 Kanker Payudara.....	6
2.1.5 Sel Kultur.....	6
2.1.6 Sel Kanker Payudara MCF-7.....	7
2.1.7 Sel Vero.....	7
2.1.8 Metode Maserasi dan Fraksinasi.....	8
2.1.9 Aktivitas Antiproliferatif.....	8
2.1.10 MTT-Assay.....	8

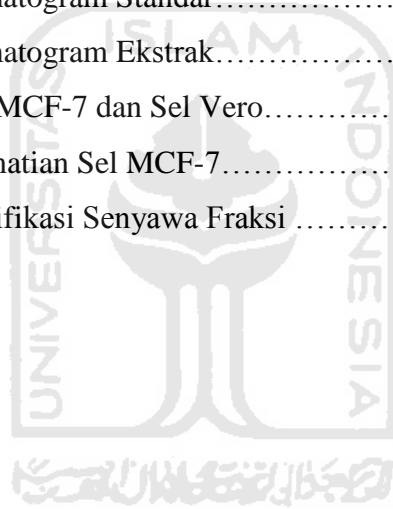
2.1.11 Kerangka Teori Penelitian.....	10
2.2 Landasan Teori.....	11
2.3 Hipotesis.....	11
BAB III METODE PENELITIAN.....	12
3.1 Jenis Penelitian.....	12
3.2 Lokasi Penelitian.....	12
3.3 Subjek Penelitian.....	12
3.4 Objek Penelitian.....	12
3.5 Instrumentasi Penelitian.....	12
3.6 Cara Kerja.....	13
3.6.1 Ekstraksi Tumbuhan Paku.....	13
3.6.2 Fraksinasi Ekstrak Tumbuhan Paku.....	13
3.6.3 Uji Fitokimia Fraksi Aktif.....	14
3.6.4 Analisis Kandungan Sisa Pelarut.....	14
3.6.5 Pembuatan Seri Kadar.....	15
3.6.6 Kultur Sel.....	15
3.6.7 Panen Sel.....	15
3.6.8 Uji Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi n-heksan.....	16
3.6.9 Metode Analisa Hasil.....	17
3.7 Kerangka Umum Penelitian.....	18
3.8 Kerangka Konsep Penelitian.....	19
BAB IV PEMBAHASAN.....	20
4.1 Hasil Kaji Etik Penelitian.....	20
4.2 Hasil Identifikasi Tumbuhan.....	20
4.3 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi.....	21
4.4 Hasil Uji Sisa Pelarut Ekstrak.....	26
4.5 Hasil Uji Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi.....	28
4.6 Hasil Uji Kandungan Fraksi Aktif.....	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	36

5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tumbuhan Paku <i>Dryopteris marginalis</i>	4
Gambar 2.2	Sel MCF-7 dan Sel Vero.....	7
Gambar 2.3	Reaksi Pembentukan Kristal formazan.....	9
Gambar 2.4	Kerangka Teori Penelitian.....	10
Gambar 3.1	Kerangka Umum Penelitian.....	18
Gambar 3.2	Kerangka Konsep Penelitian.....	19
Gambar 4.1	Ekstrak n-heksan.....	21
Gambar 4.2	Proses Fraksinasi.....	22
Gambar 4.3	Hasil Identifikasi Fraksi.....	23
Gambar 4.4	Hasil Identifikasi Fraksi 10-13.....	24
Gambar 4.5	Hasil Kromatogram Standar.....	27
Gambar 4.6	Hasil Kromatogram Ekstrak.....	27
Gambar 4.7	Kultur Sel MCF-7 dan Sel Vero.....	29
Gambar 4.8	Grafik Kematian Sel MCF-7.....	31
Gambar 4.9	Hasil Identifikasi Senyawa Fraksi	34



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Perbandingan Pelarut Ekstraksi.....	14
Tabel 4.1	Fraksi Yang Dihasilkan dari Proses Fraksinasi.....	22
Tabel 4.2	Hasil Rf, hRf, dan Penggabungan Fraksi.....	25
Tabel 4.3	Bobot Fraksi Yang Dihasilkan.....	26
Tabel 4.4	Hasil Uji Antiproliferatif Sel MCF-7 Sampel.....	30
Tabel 4.5	Hasil Uji Antiproliferatif Sel MCF-7.....	31
Tabel 4.6	Hasil Uji Antiproliferatif Sel Vero.....	32
Tabel 4.7	Nilai hRf Hasil Identifikasi Senyawa.....	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Ethical Clearance.....	39
Lampiran 2	Hasil Identifikasi Tumbuhan.....	40
Lampiran 3	Hasil Kromatografi GC-MS.....	41
Lampiran 4	Bobot Hasil Fraksinasi Ekstrak.....	45
Lampiran 5	Plate Sel MCF dan Sel Vero.....	46
Lampiran 6	Tabel Absorbansi, Persentase Kematian dan Grafik Sel MCF-7.....	47



Uji Aktivitas Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi n-Heksan Tumbuhan Paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav terhadap Kultur Sel Kanker Payudara MCF-7 dengan MTT Assay

**Nita Trinovitasari
Program Studi Farmasi**

INTISARI

Dryopteris marginalis (L) Grav, merupakan salah satu tumbuhan paku yang banyak ditemukan di Indonesia. Spesies tumbuhan paku ini memiliki senyawa steroid yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi n-heksan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7, dan toksisitasnya terhadap kultur sel Vero sebagai sel normal. Metode yang digunakan untuk menarik ekstrak adalah dengan cara maserasi menggunakan pelarut n-heksan, setelah itu ekstrak difraksinasi dengan kromatografi cair vakum menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, metanol dan campuran pelarut tersebut. Potensi aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi n-heksan daun tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* terhadap sel kanker payudara MCF-7, serta toksisitasnya terhadap sel Vero (sel normal), dapat dilihat dari kemampuan ekstrak dan fraksi untuk membunuh sel kanker menggunakan MTT assay. Analisa hasil dilakukan dengan menentukan konsentrasi ekstrak dan fraksi terpilih yang mampu membunuh 50% sel kanker (IC_{50}) berdasarkan hasil pembacaan nilai absorbansi. Nilai IC_{50} diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi linier dengan menghubungkan nilai konsentrasi sampel sebagai X dan nilai persentase kematian sel sebagai Y. Hasil identifikasi senyawa fraksi F, fraksi I, dan fraksi C mengandung senyawa steroid. Fraksi yang memiliki aktivitas antiproliferatif paling baik adalah fraksi F dengan nilai IC_{50} 765,92ppm dan tidak berbahaya bagi sel Vero sebagai sel normal dengan nilai IC_{50} NA (*Not Available*).

Kata Kunci : *Dryopteris marginalis*, Kanker Payudara, MCF-7, MTT Assay

Antiproliferative Activity Test of n-Hexane Extract and Fraction of Fern *Dryopteris marginalis* (L) Grav to MCF-7 Breast Cancer Cell with MTT Assay

ABSTRACT

Dryopteris marginalis (L) Grav, is one species of ferns that is often found in Indonesia. This species of fern have steroid compound that can be used to inhibit growth of breast cancer cells. The purpose of this research is to describe about antiproliferative activity of *Dryopteris marginalis* n-hexane extract and fraction to MCF-7 breast cancer culture cell, and its toxicity to Vero culture cell as normal cell. The method used to obtain the extract is by maceration using n-hexane, after that the extract fractionated by vacuum liquid chromatography using n-hexane, etil acetat, methanol, and gradient of the solven. Potential antiproliferative activity of n-hexane extract and fraction of *Dryopteris marginalis* leaf on breast cancer cells MCF-7, and its toxicity on Vero cells (normal cells), could be determined from its ability to kills cancer cells using MTT assay. Analysis is done by determination of concentration value of chosen extract and fraction that kills 50% cancer cells showed by it absorbance value. The IC₅₀ value is obtained from regression linier equation by relating the concentration value as X value and death cell percentage value as Y value. The result of identification are fraction F, fraction I, and fraction C have steroid compound. Fraction that has good antiproliferative activity is fraction F with IC₅₀ value of 765,92ppm and safe for Vero cells as normal cell with IC₅₀ value NA (Not Available).

Key Words : *Dryopteris marginalis*, breast cancer, MCF-7, MTT Assay

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia sangat dikenal dengan kekayaan alam nabatinya yang berlimpah ruah. Salah satu tumbuhan yang banyak hidup di Indonesia adalah jenis paku-pakuan (*Pteridophyta*). Tumbuhan paku memiliki daya adaptasi yang tinggi sehingga mampu tumbuh dimana saja⁽¹⁾. Dari sekitar 10.000 spesies tumbuhan paku yang ada di dunia, 3.000 spesies diantaranya tumbuh di Indonesia. Pemanfaatan tumbuhan paku sebagai bahan obat tidak terlepas dari kemampuan tumbuhan paku memproduksi senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, flavonoid, dan lain-lain⁽²⁾.

Berdasarkan hasil uji bioaktivitas suatu penelitian, beberapa metabolit sekunder dari tumbuhan paku menunjukkan aktivitas biologis yang dapat dimanfaatkan antara lain sebagai antikanker⁽²⁾. Senyawa yang berperan sebagai agen antikanker adalah senyawa *phytosteroid* diantaranya adalah β -sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol. Adapun beberapa penelitian sebelumnya yang berhubungan dengan hal ini antara lain adalah uji aktivitas antikanker ekstrak n-heksan tumbuhan paku *Christella arida* yang mengandung senyawa phytosteroid menunjukkan hasil potensial sebagai antikanker⁽³⁾. Pada penelitian Grattan (2013) membuktikan bahwa β -sitosterol dapat berikatan dengan reseptor α dan β dari estrogen yang merupakan mediator kanker⁽⁴⁾. Stigmasterol yang diisolasi dari tumbuhan paku *Navicula incerta* menunjukkan sitotoksitas yang ampuh dalam melawan hepatocarcinoma (HepG2)⁽⁵⁾, dan yang terakhir pada penelitian Ali *et al* (2015) menunjukkan bahwa stigmasterol yang dikombinasikan dengan *croton oil* memiliki efikasi yang baik untuk melawan kanker kulit⁽⁶⁾.

Dryopteris marginalis (L) Grav merupakan salah satu tumbuhan paku yang termasuk kedalam genus *Dryopteris*. Tumbuhan paku dengan genus *Dryopteris* memiliki kandungan metabolit sekunder diantaranya adalah: alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, tannin, dan lain-lain⁽⁷⁾. Pada penelitian sebelumnya beberapa spesies tumbuhan paku dari family *Dryopteridaceae* telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antikanker⁽⁸⁾. Telah dilakukan penelitian uji aktivitas antikanker dari tumbuhan *Dryopteris marginalis* (L) Grav sebelumnya. Akan tetapi

penelitian untuk tumbuhan spesies ini masih sangat minim. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya juga belum sampai pada tahap pengujian fraksi dari ekstrak tumbuhan paku tersebut. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Kanker atau yang disebut juga dengan neoplasma, secara harfiah berarti pertumbuhan baru. Neoplasma adalah masa abnormal jaringan yang pertumbuhannya berlebihan dan tidak terkoordinasi walaupun rangsangan yang memicu pertumbuhan tersebut terhenti⁽⁹⁾. Kanker payudara merupakan salah satu penyakit mematikan yang masih banyak terjadi. Menurut laporan WHO berdasarkan data statistik IARC (*International Agency for Research on Cancer*) angka kejadian kanker payudara di dunia hingga tahun 2012 ada 1,7 juta wanita yang mengalami kanker payudara dan 521 ribu wanita yang mengalami kematian karena kanker payudara^(10,11), sedangkan angka kejadian kanker payudara di Indonesia hingga tahun 2014 wanita yang positif kanker payudara sebanyak 48.998 dan wanita yang mengalami kematian karena kanker payudara sebanyak 19.731⁽¹²⁾.

Masih banyaknya kejadian kanker payudara menyebabkan penemuan obat baru terkait terapi pengobatannya masih sangat dibutuhkan. Adanya sumberdaya alam yang potensial untuk dijadikan antikanker salah satunya tumbuhan paku spesies *Dryopteris marginalis* (L) Grav, melatar belakangi peneliti untuk melakukan penelitian ini. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antiproliferasi ekstrak dan fraksi n-heksan terhadap jenis sel kanker MCF-7, yaitu sel kanker yang umum ditemui pada pasien kanker payudara karena memiliki beberapa karakteristik yang sama dengan epitel payudara terkait kemampuan memproses estrogen dalam bentuk estradiol melalui reseptor estrogen di dalam sitoplasma⁽¹³⁾. Hal ini erat hubungannya dengan mekanisme pengaturan estrogen pada senyawa steroid dalam ekstrak dan fraksi *Dryopteris marginalis* (L) Grav. Selain itu, pada penelitian ini dilakukan juga uji terhadap sel Vero sebagai sel normal, untuk mengetahui toksisitas efek antiproliferasi ekstrak dan fraksi dalam membunuh sel kanker.

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, diharapkan melalui penelitian ini dapat diketahui potensi ekstrak dan fraksi n-heksan daun *Dryopteris marginalis* sebagai agen antiproliferatif pada sel kanker payudara MCF-7, serta toksisitasnya terhadap sel Vero (sel normal), sehingga penelitian ini dapat berkontribusi dalam penemuan obat pada terapi kanker payudara.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak dan fraksi n-heksan dari tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7?
2. Apakah ekstrak dan fraksi n-heksan dari tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* memiliki toksisitas sebagai antiproliferatif terhadap kultur sel Vero (sel normal)?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi n-heksan dari tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.
2. Mengetahui toksisitas ekstrak dan fraksi n-heksan dari tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* terhadap kultur sel Vero (sel normal).

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi hasil penelitian mengenai potensi ekstrak dan fraksi n-heksan dari tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* terhadap sel kanker payudara MCF-7 beserta toksisitasnya terhadap sel Vero (sel normal).
2. Membantu dan ikut berkontribusi dalam proses penemuan obat baru untuk terapi kanker payudara.

BAB II
STUDI PUSTAKA
2.1 TINJAUAN PUSTAKA

2.1.1 *Dryopteris marginalis* (L) Grav

Tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* atau yang dikenal juga dengan nama perisai pakis marjinal atau pakis kayu marjinal memiliki daun berwarna hijau terang sampai gelap atau hijau kebiruan dengan bentuk lonjong lanset dan bergerigi yang terasa kasar, dengan panjang daun 15-20 *inch* (gambar 2.1). Pada belakang daun terdapat spora dengan sorus terletak ditepi atau margin dari sisi bawah *pinnule*. Tumbuhan paku ini memiliki tinggi sekitar 1,5-2 *feet*, tumbuh pada daerah lembab, maupun daerah berbatuan yang tidak mengandung kapur⁽¹⁴⁾.

Klasifikasi tumbuhan:⁽¹⁵⁾

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Division	: Pteridophyta
Class	: Filicopsida
Order	: Polypodiales
Family	: Dryopteridaceae
Genus	: <i>Dryopteris</i>
Spesies	: <i>Dryopteris marginalis</i> (L.) Grav



Gambar 2.1 Tumbuhan paku *Dryopteris marginalis*

Dryopteris marginalis (L) Grav merupakan salah satu tumbuhan paku yang termasuk kedalam genus *Dryopteris*. Tumbuhan paku dengan genus *Dryopteris* memiliki kandungan metabolit sekunder diantaranya adalah: alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, tannin, dan lain-lain⁽⁷⁾. Pada penelitian sebelumnya beberapa spesies tumbuhan paku dari family *Dryopteridaceae* telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antikanker⁽⁸⁾. Senyawa yang berperan sebagai agen antikanker adalah senyawa *phytosteroid* diantaranya adalah β -sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol.

2.1.2 Senyawa Steroid sebagai Antikanker

Steroid merupakan salah satu bentuk triterpena termodifikasi berupa senyawa organik, lemak sterol tidak terhidrolisis. Senyawa steroid yang berperan sebagai agen antikanker diantaranya adalah β -sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol. Beberapa penelitian sebelumnya yang berhubungan dengan hal ini antara lain adalah uji aktivitas antikanker ekstrak n-heksan tumbuhan paku *Christella arida* yang mengandung senyawa phytosteroid menunjukkan hasil potensial sebagai antikanker⁽³⁾. Pada penelitian Grattan (2013) membuktikan bahwa β -sitosterol dapat berikatan dengan reseptor α dan β dari estrogen yang merupakan mediator kanker⁽⁴⁾. Stigmasterol yang diisolasi dari tumbuhan paku *Navicula incerta* menunjukkan sitotoksitas yang ampuh dalam melawan hepatocarcinoma (HepG2)⁽⁵⁾, dan yang terakhir pada penelitian Ali *et al* (2015) menunjukkan bahwa stigmasterol yang dikombinasikan dengan *croton oil* memiliki efikasi yang baik untuk melawan kanker kulit⁽⁶⁾.

2.1.3 Kanker

Kanker merupakan suatu pertumbuhan sel yang tidak normal. Secara normal sel akan membelah saat dibutuhkan dan mengalami apoptosis saat terjadi kerusakan ataupun tidak dibutuhkan lagi. Pada sel kanker terjadi perubahan pada DNANYa sehingga walaupun sel mengalami kerusakan tidak akan terjadi apoptosis. Lambat laun sel kanker yang terus membelah ini akan membentuk suatu jaringan baru yang abnormal dan ganas, yang dapat melakukan invasi hingga metastasis⁽¹⁶⁾.

Terdapat beberapa hal yang dapat menjadi faktor risiko kanker diantaranya adalah faktor genetik, gaya hidup, lingkungan, dan hormonal. Faktor genetik yang menjadi salah satu faktor risiko kanker adalah perubahan genetik yang dapat terjadi

karena faktor bawaan dari orangtua. Faktor gaya hidup yang tidak sehat seperti merokok ataupun mengkonsumsi minuman beralkohol merupakan salah satu faktor risiko terjadinya kanker. Faktor lingkungan yang menjadi faktor risiko kanker adalah cemaran senyawa kimia yang bersifat karsinogen, polusi dari kendaraan bermotor, dan paparan sinar UV. Faktor hormonal yang sering menjadi faktor risiko kanker adalah hormon estrogen dan progesterone, hormon ini telah banyak diteliti dapat menyebabkan kanker payudara ataupun ovarium⁽¹⁷⁾.

2.1.4 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang banyak terjadi di dunia maupun di Indonesia. Kanker payudara bisa berawal dari beberapa bagian payudara seperti pada duktus, lobus, ataupun jaringan diantara keduanya. Kanker ini tidak hanya terjadi pada wanita saja tetapi bisa juga terjadi pada laki-laki⁽¹⁸⁾. Menurut laporan WHO berdasarkan data statistik IARC (*International Agency for Research on Cancer*) angka kejadian kanker payudara di dunia hingga tahun 2012 ada 1,7 juta wanita yang mengalami kanker payudara dan 521 ribu wanita yang mengalami kematian karena kanker payudara^(10,11), sedangkan angka kejadian kanker payudara di Indonesia hingga tahun 2014 wanita yang positif kanker payudara sebanyak 48.998 dan wanita yang mengalami kematian karena kanker payudara sebanyak 19.731⁽¹²⁾. Walaupun kasus kanker payudara yang terjadi pada wanita lebih banyak dibandingkan dengan laki-laki, menurut data US *breast cancer* pada tahun 2016 terdapat 246.660 kasus baru yang terjadi pada wanita dan 2.600 kasus baru yang terjadi pada laki-laki⁽¹⁹⁾.

2.1.5 Sel Kultur

Sel kultur merupakan suatu sel yang diambil dari hewan atau tumbuhan yang dikembangkan dan ditumbuhkan pada media kultur secara *in vitro* yang digunakan dalam penelitian. Selain dari jaringan asal, sel kultur juga dapat diperbanyak dengan menggunakan sel yang sudah ada. Proses dari kultur sel harus selalu terkontrol dan terjaga aseptiknya. Sel kultur telah banyak digunakan untuk penelitian uji senyawa atau ekstrak obat baru seperti uji senyawa antikanker secara *in vitro* karena penanganannya mudah, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi⁽²⁰⁾.

2.1.6 Sel Kanker Payudara MCF-7

Sel MCF-7 atau *Michigan Cancer Foundation-7* merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan reseptor estrogen (ER+) dengan *wild type* p53 sehingga sensitif terhadap agen kemoterapi. Sel MCF-7 dapat memproses estrogen dalam bentuk estradiol melalui reseptor estrogen dalam sitoplasma sel. Pertumbuhan dari sel MCF-7 dapat dihambat dengan *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) dan senyawa antiestrogen (senyawa yang dapat menghalangi ikatan estrogen dengan reseptornya). Pada saat pertama kali diisolasi sel MCF-7 ini memiliki kariotipe yang mengandung 85 kromosom, kemudian saat ini dikurangi 16 kromosom. Sehingga saat ini sel MCF-7 memiliki kariotipe yang mengandung 69 kromosom^(13,21). Sel MCF-7 dilihat di bawah mikroskop (perbesaran 100 kali) berbentuk bulat dan bergerombol (gambar 2.2 a).



(a)

(b)

Gambar 2.2 Kultur sel MCF-7 (a) dan kultur sel Vero (b)

2.1.7 Sel Vero

Sel Vero merupakan sel monolayer yang termasuk jenis *epithelial-like*, yang berasal dari ginjal monyet hijau Afrika. Sel Vero banyak digunakan dalam penelitian biologi molekuler, mikrobiologi, bahan pembuatan vaksin, dan penelitian antikanker. Sel Vero banyak digunakan dalam penelitian karena dapat bereplikasi secara cepat dan tidak terbatas pada suatu media secara *in vitro*. Sel ini menempel dengan kuat pada lapisan substrat yang berbahan polistiren dan membentuk ikatan kovalen⁽²²⁾. Sel Vero dilihat di bawah mikroskop (perbesaran 100 kali) berbentuk pipih dan menempel pada permukaan *plate* (gambar 2.2 b).

2.1.8 Metode Maserasi dan Fraksinasi

Maserasi merupakan salah satu proses ekstraksi yang digunakan untuk menyari senyawa atau metabolit dari suatu tumbuhan dengan menggunakan prinsip *like dissolve like*. Pada saat maserasi pelarut akan berdifusi ke dalam sel simplisia, yang lama kelamaan akan menjadi jenuh di dalam sel simplisia dan akhirnya sel mengalami lisis (pecah). Selama proses maserasi dilakukan pengojokan atau pengadukan berulang-ulang, upaya ini dilakukan untuk menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi. Setelah proses maserasi berakhir, selanjutnya ampas dari maserasi akan dimaserasi kembali dengan pelarut yang berbeda yang biasa disebut dengan remaserasi⁽⁹⁾.

Fraksinasi merupakan suatu proses pemisahan senyawa hasil ekstraksi yang dilakukan untuk mendapatkan sekelompok senyawa tertentu. Pemisahan ekstrak dengan metode fraksinasi dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut bergradien, dengan menggunakan bantuan kromatografi cair vakum. Proses fraksinasi ini dilakukan agar mendapatkan kandungan senyawa yang lebih sedikit (spesifik)⁽²³⁾.

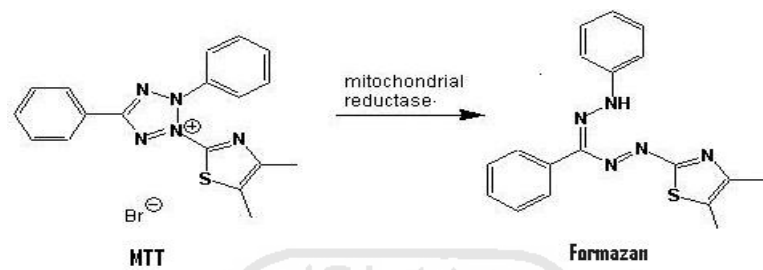
2.1.9 Aktivitas Antiproliferatif

Proliferasi merupakan suatu pertumbuhan atau perkembangbiakan sel untuk menghasilkan jaringan baru, bagian sel, maupun keturunan yang berlangsung secara cepat. Suatu senyawa yang dapat menghentikan proses pertumbuhan tersebut melalui berbagai mekanisme disebut sebagai senyawa yang memiliki aktivitas antiproliferatif. Aktivitas antiproliferatif dari suatu senyawa dapat dilihat berdasarkan jumlah sel yang masih hidup setelah pemberian senyawa tersebut. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel hidup yang masih tersisa adalah metode kolorimetrik yaitu MTT-Assay⁽⁹⁾.

2.1.10 MTT-Assay

MTT-Assay merupakan suatu teknik yang sering digunakan untuk menghitung jumlah sel yang masih hidup setelah diberikan senyawa antiproliferatif, teknik ini menggunakan perubahan warna garam tetrazolium atau 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) yang berwarna kuning yang akan dimetabolisme oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel hidup menjadi kristal formazan berwarna ungu. Kristal formazan

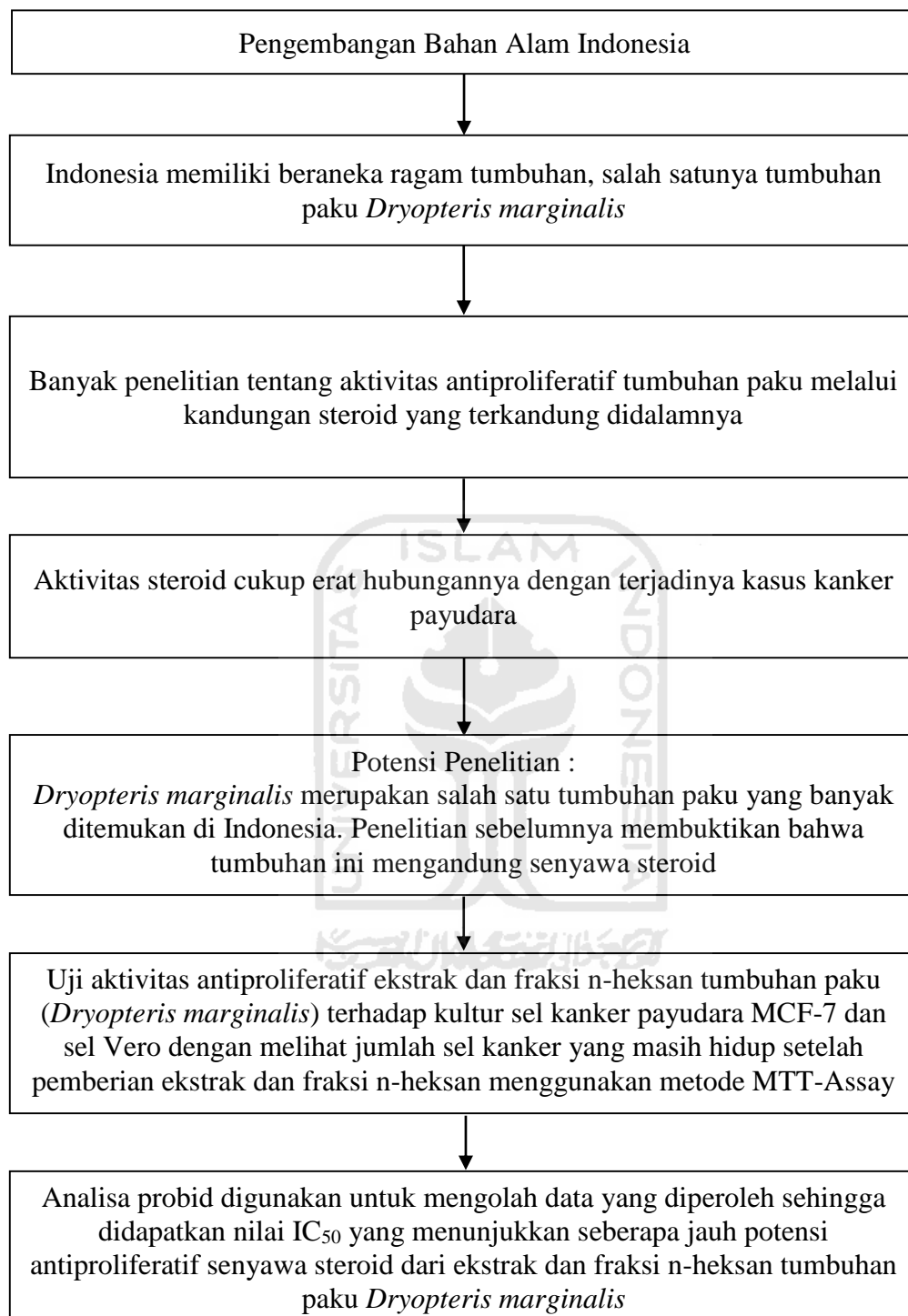
yang berwarna ungu yang terbentuk akan terlarut dengan penambahan bahan seperti SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*). Selanjutnya absorbansi dari larutan kristal formazan dibaca pada panjang gelombang 550-600nm. Intensitas warna yang terbentuk berbanding langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme. Reaksi pembentukan kristal formazan dapat dilihat pada gambar 2.3⁽⁹⁾.



Gambar 2.3 Reaksi Pembentukan Kristal formazan⁽²⁴⁾



2.1.11 Kerangka Teori Penelitian



Gambar 2.4 Kerangka Teori Penelitian

2.2 LANDASAN TEORI

Telah banyak penelitian pemanfaatan kandungan metabolit sekunder tumbuhan paku yang dapat dijadikan sebagai bahan baku obat baru. Salah satu tumbuhan paku yang telah banyak diteliti adalah *Dryopteris marginalis*. Kandungan metabolit sekunder tumbuhan paku ini memiliki aktivitas antiproliferatif. Kandungan senyawa tersebut merupakan senyawa steroid yaitu β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol. Aktivitas antiproliferatif dapat menghambat pertumbuhan sel kanker yang terjadi secara cepat dan tidak terkendali yang akan membentuk jaringan baru yang abnormal hingga ganas.

Pada suatu penelitian diketahui bahwa β -sitosterol dapat berikatan dengan reseptor α dan β dari estrogen yang merupakan mediator kanker. Pada penelitian lainnya diketahui bahwa senyawa stigmasterol dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Sel ini merupakan salah satu jenis sel adenokarsinoma payudara manusia yang telah banyak digunakan pada penelitian terkait aktivitas reseptor estrogen, karena kemampuannya untuk memproses estrogen dalam bentuk estradiol melalui reseptor estrogen di sitoplasma sel. Kandungan steroid pada tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* diduga memiliki kandungan senyawa yang sama dan aktivitas yang serupa terhadap sel kanker.

Pada penelitian aktivitas ekstrak n-heksan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* telah dibuktikan memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kultur kanker payudara MCF-7 dan tidak memiliki toksisitas terhadap sel Vero sebagai sel normal. Jadi, untuk mendapatkan senyawa yang lebih spesifik dan memiliki aktivitas antiproliferatif yang lebih baik digunakan fraksi n-heksan dari ekstrak tumbuhan tersebut. Fraksi digunakan karena memiliki jumlah senyawa yang lebih sedikit dibandingkan dengan ekstrak. Fraksinasi juga dilakukan karena diharapkan senyawa yang mungkin mengganggu kerja steroid dapat dipisahkan.

2.3 HIPOTESIS

Berdasarkan landasan teori yang telah dipaparkan, dapat disimpulkan sebuah hipotesa bahwa ekstrak dan fraksi n-heksan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* yang mengandung steroid memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7, dan tidak memiliki toksisitas sebagai antiproliferatif terhadap kultur sel Vero.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental karena menguji aktivitas antiproliferatif dari ekstrak dan fraksi n-heksan daun tumbuhan paku (*Dryopteris marginalis*) pada sel kanker payudara MCF-7 dan sel Vero.

3.2 Lokasi Penelitian

Penelitian uji antiproliferatif ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Program Studi Farmasi, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta dan Laboratorium Parasitologi, Gedung Radiopoetra, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.3 Subjek Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak dan fraksi n-heksan dari ekstrak tumbuhan paku (*Dryopteris marginalis*) sebagai senyawa antiproliferatif.

3.4 Objek Penelitian

Objek penelitiannya adalah sel kanker payudara MCF-7 dan sel Vero.

3.5 Instrumentasi Penelitian

a. Alat Penelitian

Alat-alat gelas steril, autoklaf, inkubator CO₂ (Inc Memmert), tangki nitrogen cair (Cryolab 35), *laminar air flow cabinet* (LAF), *inverted microscop* (Olympus), *tissue culture flask* (Nunclone), timbangan elektrik (Sartorius), mikropipet (Socorex), *microplate 96 well* (Nunclone), *microfilter 0,22* (Pall), *microtiter plate reader*, tabung konikal (Nunclone), Haemocytometer, kromatografi cair vakum, kromatografi lapis tipis (KLT), *rotary evaporator*, lampu *UV portable*, oven, linomat, *chamber*, sentrifugator, penangas air.

b. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : bahan uji (Tumbuhan paku *Dryopteris marginalis*; sel uji yang digunakan dalam uji antiproliferatif ini adalah sel kanker payudara MCF-7 dan sel Vero; bahan kimia yang digunakan yaitu akuades, asam klorida (HCl), DMSO (*Sulfoxide*

Dimetil) 0,2%, etanol 70%, FBS (*Fetal Bovine Serum*), fungison (Gibco), kalium fosfat (KH_2PO_4), kalium klorida (KCl), media pertumbuhan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), media pertumbuhan M199, reagen MTT, n-heksan, etil asetat, metanol, silika gel GF₂₅₄, natrium bifosfat (Na_2HPO_4), natrium bikarbonat (NaHCO_3), natrium klorida (NaCl), pereaksi semprot Lieberman-burchard, pereaksi semprot AlCl_3 , pereaksi semprot dragendrof, PBS (*phosphate buffer saline*), SDS (*sodium dodecyl sulphate*) 10% dalam HCl 0,01N, tripsin 0,025%, *blue tip*, *yellow tip*⁽²⁴⁾.

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Ekstraksi Tumbuhan Paku

Tumbuhan paku yang telah dikeringkan selama beberapa hari selanjutnya ditimbang untuk diekstraksi. Ekstraksi tumbuhan paku dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut n-heksan. Sebanyak 140g serbuk simplisia kering dimaserasi dengan menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 1,5L. Ekstraksi dilakukan selama 3 hari dengan melakukan penggojokan setiap harinya. Ekstraksi ini dilakukan berulang hingga ekstrak yang dihasilkan warnanya menjadi bening dengan pelarut yang sama. Hasil ekstraksi disatukan kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarut menggunakan *rotary evaporator* selama beberapa jam. Hasil dari ekstraksi didapatkan ekstrak n-heksan. Ekstrak yang didapatkan selanjutnya ditimbang agar dapat dihitung nilai rendemennya⁽²⁴⁾.

3.6.2 Fraksinasi Ekstrak Tumbuhan Paku

Ekstrak yang memiliki aktivitas antiproliferatif difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya. Sebanyak 1 gram ekstrak ditambahkan dengan serbuk silika sebanyak 1 gram dan diaduk sampai terbentuk serbuk yang kering. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah campuran dari pelarut n-heksan:etil asetat dengan perbandingan volume yang tertera pada tabel 3.1 serta metanol 100%. Eluat yang dihasilkan ditampung dengan flakon dan diuapkan, lalu diperiksa dengan menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Selanjutnya fraksi yang dihasilkan ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄ lalu dielusi dengan menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat (7:3). Fraksi dengan pola pita yang

sama digabungkan, kemudian dikeringkan dan ditimbang bobotnya untuk dihitung nilai rendemennya.

Tabel 3.1 Perbandingan Pelarut Fraksinasi

No.	n-heksan (mL)	Etil Asetat (mL)	Metanol (mL)
1.	10	0	0
2.	8	2	0
3.	7	3	0
4.	5	5	0
5.	3	7	0
6.	2	8	0
7.	0	10	0
8.	0	0	10

3.6.3 Uji Fitokimia Fraksi Aktif

Fraksi aktif dielusi kembali dengan menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ dengan menggunakan perbandingan pelarut yang sesuai. Kemudian plat hasil elusi disemprot dengan menggunakan pereaksi semprot yaitu Lieberman-burchard, AlCl₃, dan Dragendrof, selanjutnya plat dikeringkan selama 1 menit di dalam oven pada suhu 50°C. Dilihat perubahan warna yang terjadi untuk setiap plat⁽²⁵⁾.

3.6.4 Analisis Kandungan Sisa Pelarut

Ekstrak kental sebanyak 100mg dilarutkan dengan pelarut etil asetat sebanyak 5mL. Kemudian larutan ekstrak diambil dengan jarum injeksi kromatografi gas sebanyak 1µL. Setelah itu alat kromatografi gas dipastikan siap untuk digunakan. Terakhir ditekan tombol *start* untuk menjalankan alat kromatografi gas.

Pengujian sisa pelarut ekstrak menggunakan kromatografi gas dengan tambahan detektor spektrofotometer massa, menggunakan fase diam Rtx-5Ms dengan fase gerak helium. Tekanan kolom yang digunakan adalah 12kPa. Panjang kolom yang digunakan adalah 30m dengan diameter 0,25mm. Suhu injektor yang digunakan adalah 300°C dan suhu oven yang digunakan adalah 70°C.

3.6.5 Pembuatan Seri Kadar

Dibuat dua larutan uji DMEM untuk sel MCF-7 dan M199 untuk sel Vero, dengan cara: Ekstrak dan Fraksi kental *Dryopteris marginalis* ditimbang sebanyak 10mg dan dilarutkan menggunakan pelarut DMSO 100% sebanyak 0,1mL, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 100.000 µg/mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran terhadap 20µL larutan induk dengan 980µL DMEM untuk sel MCF-7 dan M199 untuk sel Vero sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2000µg/mL. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat 2:1 dari 1000µL larutan dengan konsentrasi 2000µg/mL. Diperoleh seri konsentrasi 2000µg/mL, 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL, untuk larutan uji dengan media DMEM yang akan diujikan terhadap sel MCF-7 dan untuk larutan uji dengan media M199 yang akan diujikan terhadap sel Vero sampai dengan konsentrasi 31,25µg/mL⁽²⁴⁾.

3.6.6 Kultur Sel

Sel yang inaktif dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37°C. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril yang berisi media masing-masing sel (sel kanker payudara MCF-7 dan sel Vero). Suspensi sel disentrifugasi 2000 rpm selama 5 menit, kemudian bagian supernatan dibuang, endapan putih yang terdapat di dasar konikal adalah koloni sel. Setelah supernatan dibuang, diganti media yang baru kemudian disuspensikan perlahan. Suspensi sel disentrifugasi lagi selama 5 menit, supernatan dibuang, pellet ditambah pada 1 mL media penumbuh dengan FBS 10%, diresuspensikan perlahan hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (3-4 buah), diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Dilihat 2-3 hari, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen (sel telah memenuhi *flask*) dan jumlahnya cukup untuk penelitian⁽²⁴⁾.

3.6.7 Panen Sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel konfluen dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali sampai bersih dari media, lalu larutan tersebut dibuang. Ditambahkan 1mL tripsin 0,025%, didiamkan 5 menit dalam inkubator CO₂ 5%, kemudian diamati dibawah mikroskop inverted dengan perbesaran 100 kali sampai

terlihat sel terlepas. Dilakukan resuspensi untuk membantu sel terlepas dari dinding plate. Dipindahkan sel ke tabung konikel, dihentikan kerja tripsin dengan media kultur 2mL dan ditambahkan PBS 1 x 10 mL. Disentrifugasi dengan kecepatan 1.500rpm selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang. Ditambahkan 1mL media M199 untuk sel Vero dan media DMEM untuk sel MCF-7, diresuspensi sampai pellet terlepas. Jumlah sel dihitung dengan cara:

$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik} \times 10^4 \text{ sel/mL}}{4}$$

Jumlah sel yang telah diketahui kemudian dibuat untuk 10.000 sel/sumuran⁽²⁴⁾.

3.6.8 Uji Antiproliferasi Ekstrak dan Fraksi n-Heksan

Masing-masing suspensi sel dalam media kultur (M199 untuk sel Vero dan DMEM untuk sel MCF-7) sebanyak 100µL dimasukkan pada masing-masing *microplate* 96 lubang sumuran. Setelah itu ditambahkan larutan uji pada berbagai konsentrasi ekstrak dan fraksi masing-masing sebanyak 100µL kecuali pada sumuran kontrol media dan kontrol sel. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100µL larutan 1 mg/ml MTT, diinkubasi selama 3 - 4 jam pada suhu 37°C, dalam inkubator CO₂ 5%. Setelah 3-4 jam terlihat adanya endapan ungu kristal formazan. Reaksi MTT dihentikan dengan menambahkan 100µL SDS 10%. Selanjutnya serapan dibaca dengan *microtiter plate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Pada metode MTT, persentase kematian sel merupakan selisih absorbansi kontrol media dengan absorbansi sampel dibagi selisih absorbansi kontrol sel dengan kontrol media dikalikan 100%. Perhitungan persen penghambatan (inhibisi) sel menggunakan metode MTT menggunakan rumus berikut:

Persentase sel hidup (%)

$$= \frac{\text{Absorbansi sampel uji} - \text{Absorbansi blank (media dan MTT)}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi blank (media dan MTT)}} \times 100\%$$

Persen kematian sel (%)

$$= 100\% - \text{persentase sel hidup}$$

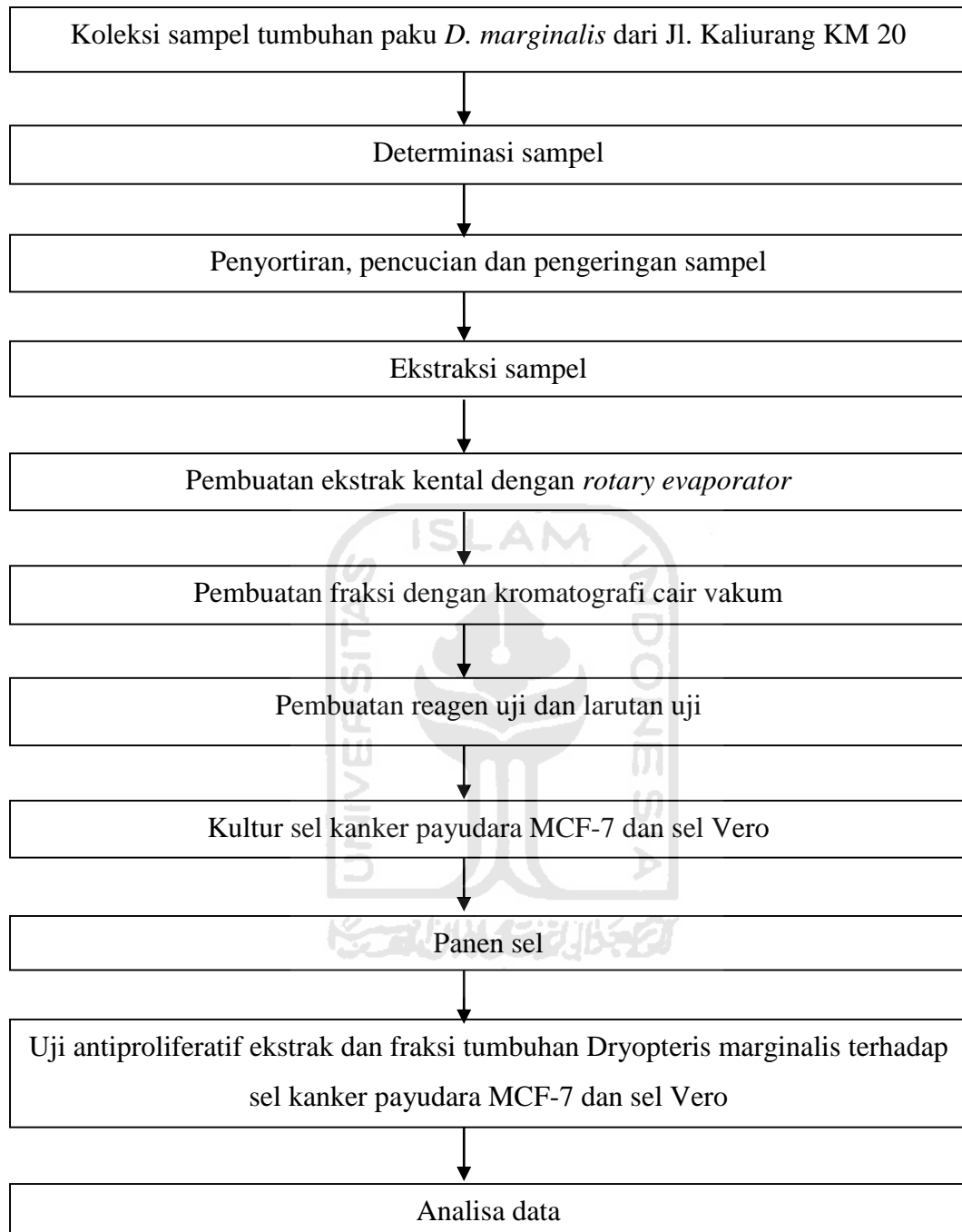
Uji antiproliferasi ini dilakukan baik pada sel MCF-7 maupun sel Vero dengan mekanisme kerja yang sama⁽²⁴⁾.

3.6.9 Metode Analisa Hasil

Hasil persentase penghambatan (inhibisi) digunakan untuk menentukan persentase hidup sel yang akan dipakai untuk menghitung harga IC_{50} dengan menggunakan persamaan regresi linier. Berdasarkan data yang didapatkan dibuat regresi linier hubungan antara konsentrasi sebagai X dengan nilai persentase kematian sebagai nilai Y, selanjutnya ditarik garis lurus yang paling baik melalui titik-titik yang ada (berdasarkan penglihatan) dan konsentrasi pada garis ini yang menyatakan 50% kematian sel (probit-5). Didapatkan persamaan regresi linier dari grafik yang dibentuk yaitu $y=bx+a$. Kemudian dengan menggunakan persamaan ini nilai IC_{50} dihitung dengan memasukkan nilai $y=50$ ⁽²⁴⁾.

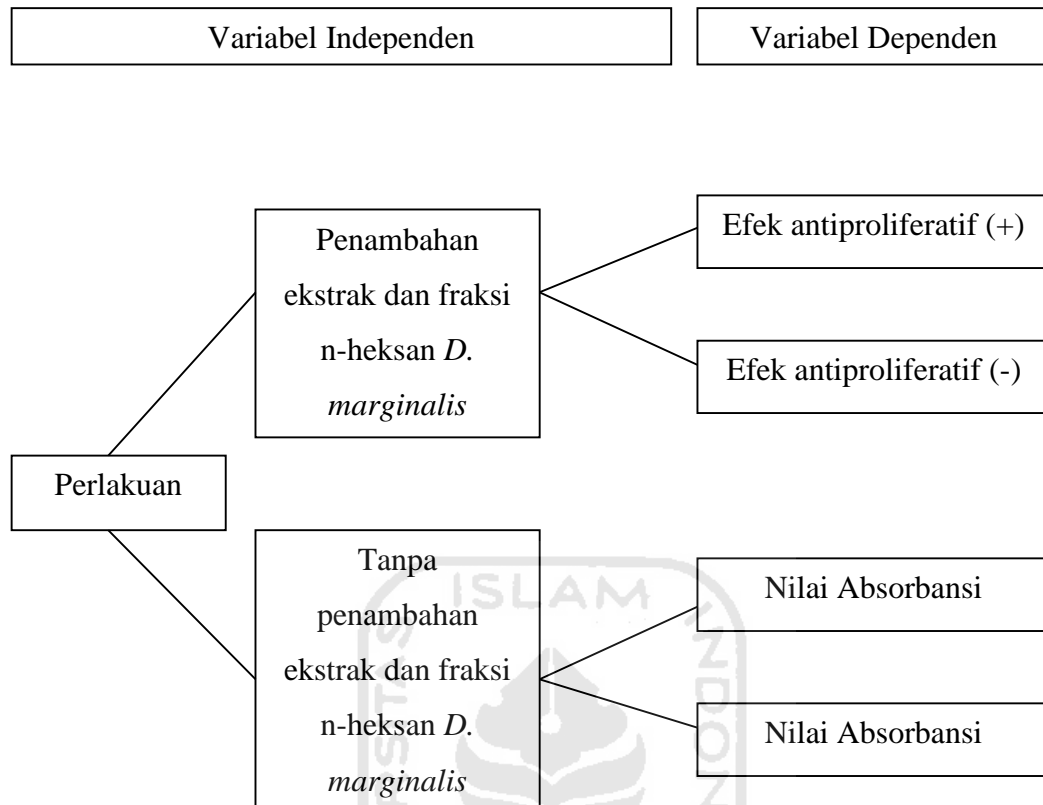


3.7 Kerangka Umum Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Umum Penelitian

3.8 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Hasil Kaji Etik Penelitian

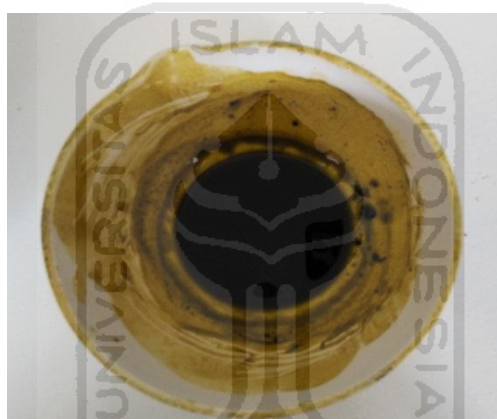
Sebelum penelitian ini dimulai dilakukan kaji etik terlebih dahulu apakah penelitian ini boleh dilakukan atau tidak. Kaji etik penelitian dilakukan oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Dari hasil kaji etik penelitian ditetapkan bahwa penelitian ini telah lulus kaji etik berdasarkan surat keputusan nomor: 24/Ka.Kom.Et/70/KE/V/2016 (Lampiran 1). Dengan diberikannya surat keterangan lulus kaji etik penelitian ini berarti penelitian yang akan dilakukan ini sudah sesuai dengan kaidah penelitian yang seharusnya. Kaidah penelitian yang dimaksud adalah intervensi ataupun cara perlakuan peneliti terhadap subjek uji yang nantinya akan dilakukan, serta penelitian ini telah memenuhi etika ilmiah suatu penelitian. Penelitian ini juga membutuhkan kaji etik karena objek yang digunakan merupakan bagian dari sel kanker, sehingga diharapkan tidak terjadinya kontaminasi terhadap diri sendiri maupun lingkungan jika metode dan etika yang dilakukan telah lulus dalam kaji etik penelitian.

4.2 Hasil Identifikasi Tumbuhan

Penelitian ini dimulai dengan mengumpulkan tumbuhan paku dari daerah Kaliurang KM 20. Sebelum dilakukan pengumpulan ini terlebih dahulu dilakukan identifikasi tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada untuk memastikan kebenaran tumbuhan paku yang digunakan. Jika tumbuhan paku yang digunakan merupakan spesies yang berbeda kandungan ataupun efektivitasnya akan memberikan hasil yang berbeda. Hal ini dikarenakan setiap tumbuhan memiliki kandungan ataupun efektivitas yang berbeda-beda. Dari hasil identifikasi tumbuhan paku yang diperoleh menunjukkan bahwa tumbuhan paku yang digunakan merupakan tumbuhan paku yang benar yaitu *Dryopteris marginalis* (Lampiran 2). Hal ini berarti tumbuhan paku yang digunakan dalam penelitian sudah tepat dan merupakan spesies *Dryopteris marginalis*, sehingga tumbuhan yang digunakan dalam penelitian benar-benar merupakan tumbuhan paku yang ingin diteliti.

4.3 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi

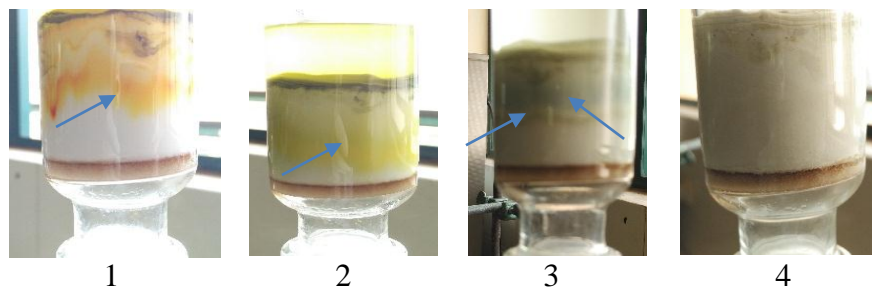
Tumbuhan paku yang telah dikumpulkan memiliki berat basah seberat 820g dan setelah dikeringkan menjadi seberat 150g. Tumbuhan paku yang telah dikeringkan selanjutnya diserbuk dengan menggunakan *filler* dan menghasilkan serbuk seberat 140g yang selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi. Ekstraksi tumbuhan paku sebanyak 140g serbuk yang dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 1,5L selama 3 hari dan diremaserasi sebanyak dua kali menghasilkan ekstrak sebanyak 9,62g (gambar 4.1). Didapatkan rendemen ekstrak sebesar 6,87%. Nilai rendemen yang didapatkan menggambarkan berapa banyak senyawa yang tersari dari serbuk simplisia yang digunakan pada saat proses maserasi.



Gambar 4.1 Ekstrak n-heksan

Ekstrak kental ini selanjutnya difraksinasi menggunakan Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan menggunakan pelarut n-heksan:etil asetat dan metanol dengan beberapa perbandingan pelarut yang sesuai (tabel 4.1) dan 20 gram serbuk silika sebagai medianya. Serbuk silika yang dimasukkan ke dalam suatu kromatografi cair vakum haruslah benar-benar rapat dan tidak memiliki rongga lagi. Jika masih ada rongga antar partikel silika, pemisahan yang dilakukan tidak akan sempurna. Hal ini dikarenakan memungkinkan adanya senyawa yang lebih dulu mencapai dasar kolom dan hal ini akan membuat pita yang terbentuk tidaklah lurus. Pemisahan senyawa berdasarkan pita-pita yang terbentuk akan sulit dilakukan. Proses fraksinasi yang dilakukan dapat dilihat pada gambar 4.2, dari kiri ke kanan menunjukkan proses pemisahan yang dilakukan berdasarkan pita-pita yang

terbentuk dan dilakukan hingga tidak ada lagi senyawa yang dapat disari oleh pelarut. Jadi, dapat dikatakan bahwa pemisahan yang dilakukan sudah baik karena fraksi dipisahkan berdasarkan pita yang terbentuk dan dilakukan hingga tidak ada lagi senyawa yang dapat dipisahkan.



Gambar 4.2 Proses fraksinasi dengan kromatografi cair vakum

Keterangan: proses fraksinasi ekstrak n-heksan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* dengan menggunakan kromatografi cair vakum dilakukan berdasarkan pita yang terbentuk pada silika, yang menggunakan campuran pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol. Pita yang terbentuk ditunjukkan pada gambar dengan panah berwarna biru. Pemisahan dilakukan hingga tidak ada lagi pita yang terbentuk.

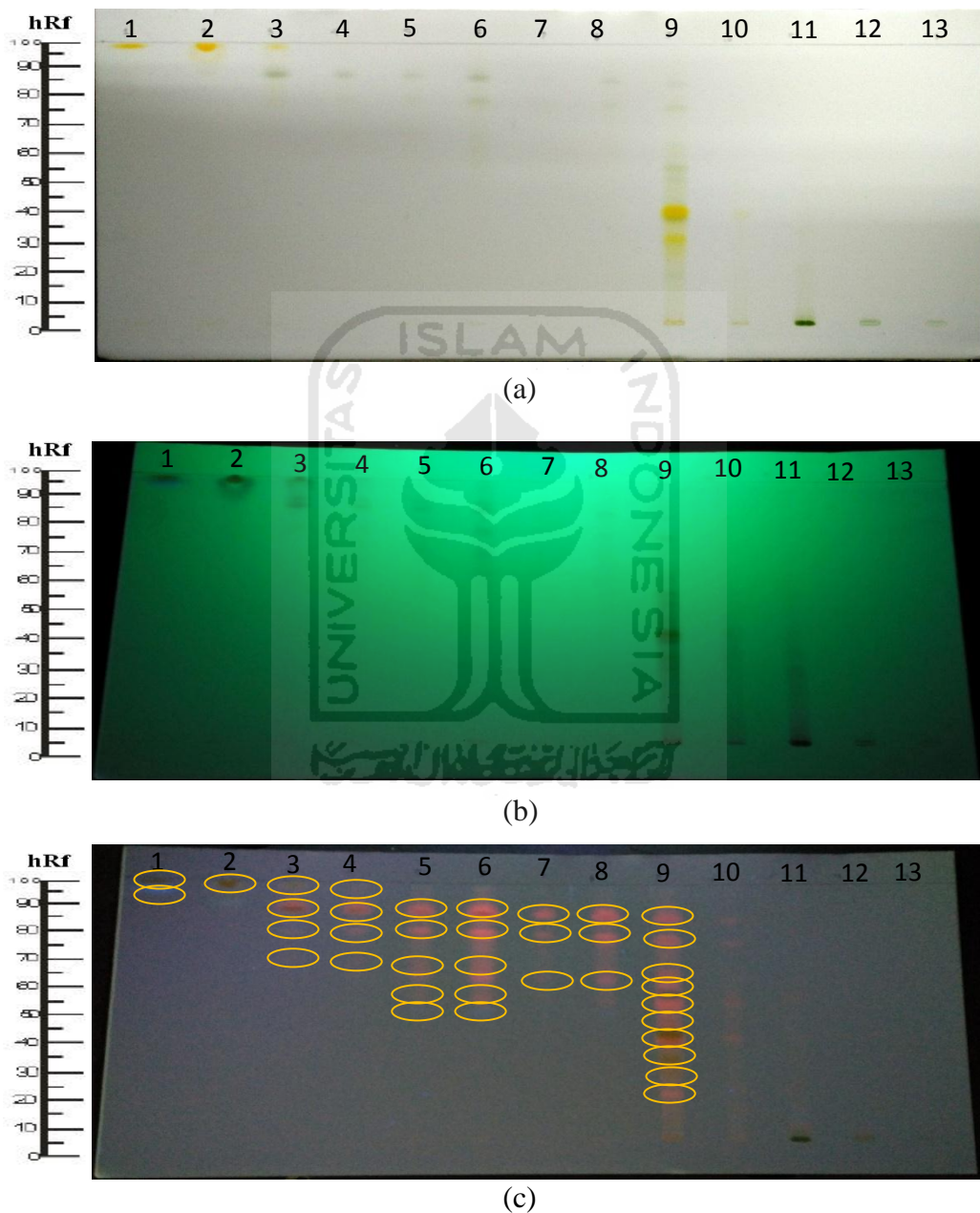
Tabel 4.1 Fraksi Yang Dihasilkan dari Proses Fraksinasi

Perbandingan Pelarut			Fraksi yang dihasilkan
n-heksan (mL)	etil asetat (mL)	metanol (mL)	
10	0	0	1
8	2	0	2 dan 3
7	3	0	4, 5, 6
5	5	0	6, 7, 8, 9
3	7	0	9 dan 10
2	8	0	10
0	10	0	-
0	0	10	11, 12, 13

Keterangan: Fraksi yang dihasilkan dengan pelarut etil asetat 100% tidak memiliki nilai rendemen sehingga dianggap tidak ada.

Pada tabel 4.1 dapat dilihat hasil dari proses fraksinasi yang telah dilakukan menghasilkan sebanyak 13 fraksi. Fraksi 1 dihasilkan dengan hanya menggunakan pelarut n-heksan, fraksi 2 hingga 10 dihasilkan dari perbandingan pelarut n-heksan dan etil asetat, dan yang terakhir fraksi 11 hingga 13 dihasilkan dengan hanya menggunakan pelarut metanol. Dari tabel juga dapat dilihat bahwa satu perbandingan pelarut dapat menghasilkan beberapa pita atau fraksi. Semua fraksi

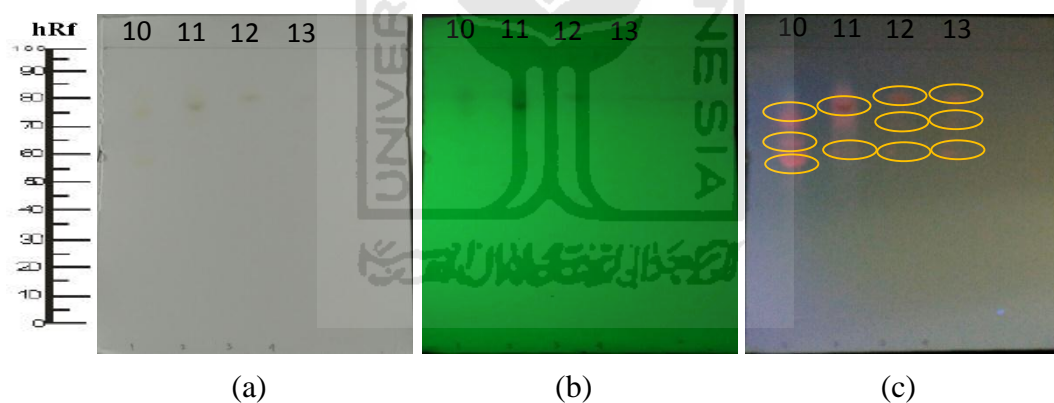
yang dihasilkan selanjutnya diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui fraksi-fraksi yang memiliki pola pita yang sama dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya merupakan perbandingan pelarut n-heksan:etil asetat (7:3). Hasil elusi dapat dilihat pada gambar 4.3 dan 4.4 serta nilai R_f dan hR_fnya dapat dilihat pada tabel 4.2.



Gambar 4.3 Hasil identifikasi fraksi dengan eluen n-heksan : etil asetat (7:3)

Keterangan : (a) Hasil elusi fraksi 1-13 pada sinar tampak; (b) Hasil elusi fraksi 1-13 pada sinar UV 254; (c) Hasil elusi fraksi 1-13 pada sinar UV 366. Pada gambar c dapat dilihat spot-spot fraksi yang dihasilkan pada lingkaran berwarna *orange*.

Berdasarkan hasil elusi pada gambar 4.3 fraksi 10 hingga 13 belum dapat diidentifikasi dengan menggunakan fase gerak tersebut, sehingga keempat fraksi tersebut diidentifikasi kembali dengan menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat (2:8) agar proses penggabungan fraksi yang dilakukan tepat dan merupakan hasil yang merepresentasikan fraksi secara tepat. Berdasarkan hasil elusi yang dapat dilihat pada gambar 4.3 dan gambar 4.4 beberapa fraksi masih memiliki spot yang sama seperti fraksi 3 dan 4, fraksi 5 dan 6, fraksi 7 dan 8, serta fraksi 12 dan 13 yang dapat dilihat dengan nilai R_f dan hR_f yang sama, yang dimiliki oleh fraksi-fraksi tersebut. Fraksi-fraksi tersebut kemudian disatukan karena masih ada beberapa fraksi yang memiliki spot yang sama. Setelah fraksi dengan spot yang sama disatukan, fraksi yang didapatkan ada sebanyak 9 fraksi. Berdasarkan hasil elusi ini juga dapat dilihat bahwa pemisahan atau fraksinasi yang dilakukan berhasil karena spot-spot yang dihasilkan oleh tiap fraksi berbeda-beda. Hal ini juga dapat diartikan bahwa tiap-tiap fraksi mengandung beberapa senyawa yang berbeda yang menandakan pemisahan senyawa yang dilakukan sudah baik.



Gambar 4.4 Hasil identifikasi fraksi dengan eluen n-heksan : etil asetat (2:8)
Keterangan : (a) Hasil elusi fraksi 10-13 pada sinar tampak; (b) Hasil elusi fraksi 10-13 pada sinar UV 254; (c) Hasil elusi fraksi 10-13 pada sinar UV 366. Pada gambar c dapat dilihat spot-spot fraksi yang dihasilkan pada lingkaran berwarna *orange*.

Sembilan fraksi tersebut selanjutnya dikeringkan untuk dihitung bobotnya sehingga dapat diketahui berapa persen rendemen yang dimiliki oleh fraksi (Lampiran 4). Fraksi B merupakan fraksi dengan bobot terbesar yaitu sebesar 0,2664 gram dengan nilai rendemen sebesar 26,64% sedangkan fraksi F yang memiliki senyawa paling banyak hanya memiliki nilai rendemen sebesar 14,72% (tabel 4.3).

Tabel 4.2 Hasil Rf, hRf, dan penggabungan fraksi

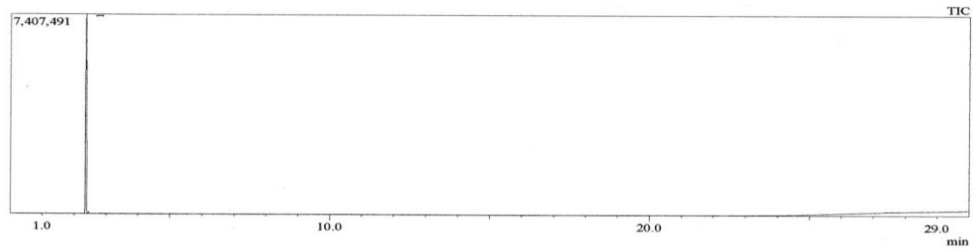
Fraksi	Spot	Rf	hRf	Penggabungan Fraksi	Nama Fraksi
1	2	0,10 0,95	100 95	1	A
2	1	0,99	99	2	B
3	4	0,96	96	3,4	C
		0,87	87		
		0,81	81		
4	4	0,71	71		
		0,96	96		
		0,87	87		
		0,80	80		
5	5	0,70	70	5,6	D
		0,87	87		
		0,80	80		
		0,67	67		
		0,57	57		
6	5	0,51	51		
		0,87	87		
		0,80	80		
		0,67	67		
7	3	0,57	57	7,8	E
		0,51	51		
		0,84	84		
8	3	0,78	78		
		0,61	61		
		0,84	84		
		0,78	78		
		0,61	61		
9	10	0,85	85	9	F
		0,77	77		
		0,65	65		
		0,61	61		
		0,56	56		
		0,47	47		
		0,42	42		
0,35	35				
10	3	0,28	28	10	G
		0,22	22		
		0,75	75		
11	2	0,64	64	11	H
		0,55	55		
12	3	0,76	76	12,13	I
		0,61	61		
		0,79	79		
13	3	0,74	74		
		0,60	60		
		0,80	80		
		0,74	74		
		0,60	60		

Tabel 4.3 Bobot Fraksi Yang Dihasilkan

Fraksi	Bobot Fraksi (g)	Rendemen (%)
A	0,0849	8,49
B	0,2664	26,64
C	0,1617	16,17
D	0,0883	8,83
E	0,0604	6,04
F	0,1472	14,72
G	0,0382	3,82
H	0,0366	3,66
I	0,0216	2,16
Jumlah	0,9053	90,53

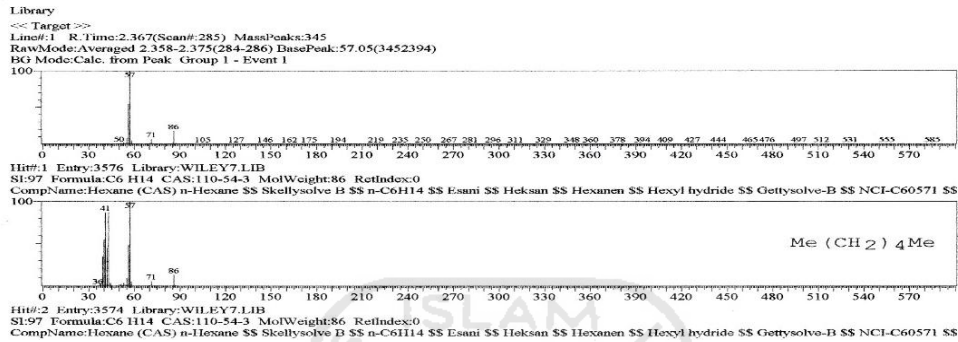
4.4 Hasil Uji Sisa Pelarut Ekstrak

Pelarut n-heksan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan salah satu pelarut organik yang dapat menyebabkan kematian pada sel⁽²⁶⁾. Oleh sebab itu dilakukan pengujian sisa pelarut ekstrak untuk memastikan bahwa hasil kematian sel yang didapatkan bukanlah dari pelarut yang digunakan melainkan berasal dari aktivitas senyawa yang telah diekstrak sehingga hasil yang didapatkan tidak bias dan merupakan hasil aktivitas yang sesungguhnya. Pengujian sisa pelarut ini dapat dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Gas karena sifat yang dimiliki dari pelarut n-heksan yang mudah menguap dengan titik didih 69°C⁽²⁶⁾. Hal ini juga sesuai dengan prinsip dari penggunaan Kromatografi Gas yaitu memisahkan senyawa berdasarkan volatilitasnya⁽²⁷⁾. Pengujian sisa pelarut ini tidak hanya menggunakan kromatografi gas saja melainkan ditambahkan dengan pengujian menggunakan spektrofotometri massa. Penambahan penggunaan spektrofotometri massa ini bertujuan untuk mengetahui senyawa dari pelarut yang digunakan, karena dengan kromatografi gas hanya didapatkan berapa banyak jumlah senyawa yang terkandung dalam larutan tersebut. Dipadukannya kedua metode ini diharapkan hasil yang didapatkan menjadi lebih akurat, karena beberapa senyawa dapat memiliki *peak* yang sama. Hal ini akan membuat hasil yang didapatkan sulit untuk dipastikan dan hanya dapat dibandingkan dengan literatur.



Peak#	R.Time	L.Time	F.Time	Area	Area%	Height
1	2.365	2.325	2.417	15250739	100.00	7392683
				15250739	100.00	7392683

(a)



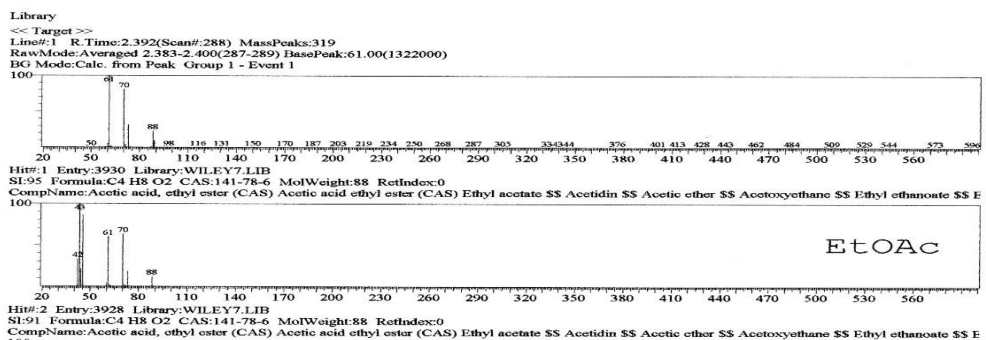
(b)

Gambar 4.5 Hasil Kromatogram standar n-heksan. Kromatogram *Gas Chromatography* (GC) (a) dan Kromatogram *Mass Spectrophotometry* (b).



Peak#	R.Time	L.Time	F.Time	Area	Area%	Height
1	2.393	2.350	2.458	8166642	100.00	3658133
				8166642	100.00	3658133

(a)



(b)

Gambar 4.6 Hasil Kromatogram ekstrak n-heksan tumbuhan paku *D. marginalis*. Kromatogram *Gas Chromatography* (a) dan Kromatogram *Mass Spectrophotometry* (b)

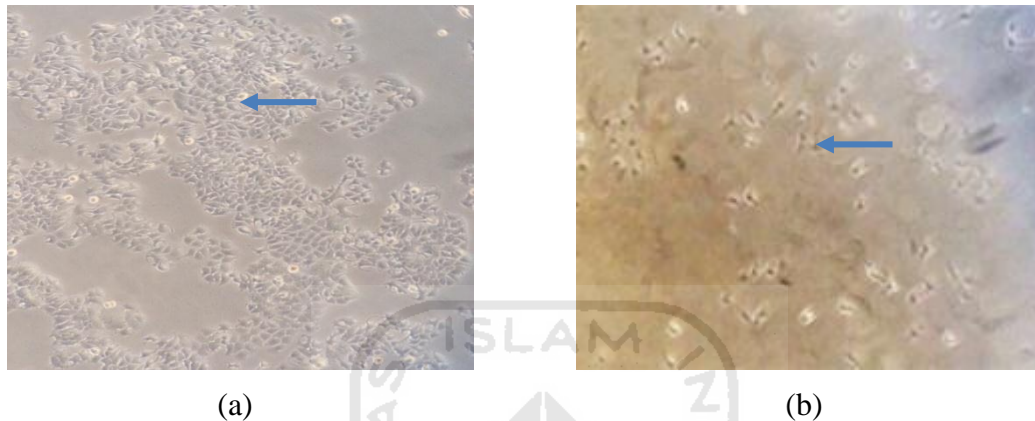
Keterangan: etil asetat yang terbaca pada kromatogram merupakan pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak pada saat pengujian dengan kromatografi gas.

Berdasarkan hasil pengujian didapatkan bahwa sampel ekstrak yang digunakan tidak mengandung pelarut n-heksan (Lampiran 3). Hasil ini membuktikan bahwa ekstrak yang digunakan untuk fraksinasi sudah tidak mengandung pelarut n-heksan lagi. Serta ekstrak yang digunakan dalam pengujian aktivitas antiproliferatif terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 merupakan efektivitas dari ekstrak tersebut bukanlah efek dari kandungan pelarut n-heksan yang digunakan dalam proses ekstraksi. Hal ini dapat dilihat pada kromatogram (gambar 4.5a dan gambar 4.6a) yang dihasilkan memiliki *peak* yang berbeda yaitu 2,365 untuk waktu retensi standar n-heksan dan 2,393 untuk waktu retensi ekstrak. Berdasarkan nilai *peak* dari kedua larutan uji dapat dilihat bahwa nilai yang dihasilkan tidak terlalu jauh berbeda sehingga dilakukan pembacaan senyawa dengan spektrofotometer massa agar dapat dipastikan senyawa tersebut berbeda walaupun memiliki nilai *peak* yang tidak jauh berbeda. Berdasarkan hasil pembacaan dengan spektrofotometer massa pada gambar 4.5b dan gambar 4.6b dapat dilihat bahwa pelarut yang terkandung dalam standar merupakan n-heksan dan yang terkandung dalam ekstrak merupakan etil asetat. Jadi, dapat disimpulkan bahwa ekstrak yang digunakan tidak mengandung pelarut n-heksan.

4.5 Hasil Uji Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi

Pada penelitian ini dilakukan pengujian sampel terhadap dua sel yaitu sel MCF-7 sebagai sel kanker payudara dan sel Vero sebagai sel normal. Pengujian sampel terhadap sel MCF-7 dilakukan untuk mendapatkan aktivitas antiproliferatif dari ekstrak dan fraksi sedangkan pengujian sampel terhadap sel Vero dilakukan untuk mengetahui toksisitas dari ekstrak dan fraksi. Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan reseptor estrogen (ER+) dengan *wild type* p53 sehingga sensitive terhadap agen kemoterapi. Sel MCF-7 dapat memproses estrogen dalam bentuk estradiol melalui reseptor estrogen dalam sitoplasma sel. Pertumbuhan dari sel MCF-7 dapat dihambat dengan *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) dan senyawa antiestrogen (senyawa yang dapat menghalangi ikatan estrogen dengan reseptornya)^(13,22). Sel MCF-7 pada penelitian ini terlihat dari mikroskop (perbesaran 100 kali) berbentuk bulat dan bergerombol (gambar 4.7 a). Sel Vero banyak digunakan dalam penelitian karena dapat bereplikasi secara cepat dan tidak terbatas pada suatu media secara *in vitro*. Sel ini menempel dengan kuat

pada lapisan substrat yang berbahan polistiren dan membentuk ikatan kovalen⁽²³⁾. Sel Vero pada penelitian ini terlihat dari mikroskop (perbesaran 100 kali) berbentuk pipih dan menempel pada permukaan plate (gambar 4.7 b). Terlihat dari mikroskop bahwa sel yang memiliki kualitas baik dan dapat digunakan dalam penelitian, adalah sel yang terlihat menempel pada dinding *tissue culture flask*.



Gambar 4.7 Kultur sel MCF-7 (a) dan kultur sel Vero (b) dibawah mikroskop perbesaran 100 kali (tanda selnya yg mana)

Pengujian aktivitas antiproliferatif terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan sebanyak 10 larutan uji. Salah satunya merupakan ekstrak n-heksan tumbuhan paku *D. marginalis* dan sisanya merupakan fraksi yang dihasilkan dari ekstrak n-heksan. Kemudian untuk pengujian toksisitasnya dalam membunuh sel hanya digunakan 4 larutan uji yang memiliki aktivitas antiproliferatif paling baik. Pengujian aktivitas antiproliferatif larutan uji dilakukan dengan membuat 6 seri kadar yaitu 62,5ppm, 125ppm, 250ppm, 500ppm, 1000ppm, 2000ppm sedangkan untuk pengujian toksisitasnya dilakukan dengan membuat 7 seri kadar dimulai dari 31,25ppm. Semua seri kadar dilakukan pengulangan atau replikasi sebanyak 3 kali, yang disusun dalam *plate* 96 sumuran (Lampiran 5).

Uji aktivitas ekstrak dan fraksi tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* sebagai agen antiproliferatif dilakukan dengan menggunakan metode MTT-assay. MTT-Assay merupakan suatu teknik yang sering digunakan untuk menghitung jumlah sel yang masih hidup setelah diberikan senyawa antiproliferatif. Teknik ini menggunakan garam tetrazolium atau MTT yang berwarna kuning yang akan

dimetabolisme oleh enzim suksinat dehidrogenase yang hanya terdapat pada mitokondria sel hidup menjadi kristal formazan berwarna ungu. Kristal formazan yang berwarna ungu yang terbentuk akan terlarut dengan penambahan bahan seperti SDS. Selanjutnya absorbansi dari larutan Kristal formazan dibaca pada panjang gelombang 550-600nm. Intensitas warna yang terbentuk berbanding langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme⁽⁹⁾.

Berdasarkan hasil uji antiproliferatif ekstrak dan fraksi terhadap sel MCF-7 didapatkan bahwa beberapa fraksi memiliki aktivitas atau nilai IC_{50} yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak yang hanya memiliki nilai $IC_{50} > 1000$ ppm yaitu sebesar 1.260,16ppm. Tiga fraksi yang memiliki aktivitas paling baik berturut-turut adalah fraksi F dengan nilai IC_{50} sebesar 765,92 ppm, fraksi I dengan nilai IC_{50} sebesar 881,56 ppm, dan yang terakhir adalah fraksi C dengan nilai IC_{50} sebesar 1.076,71 ppm yang dapat dilihat pada tabel 4.4.

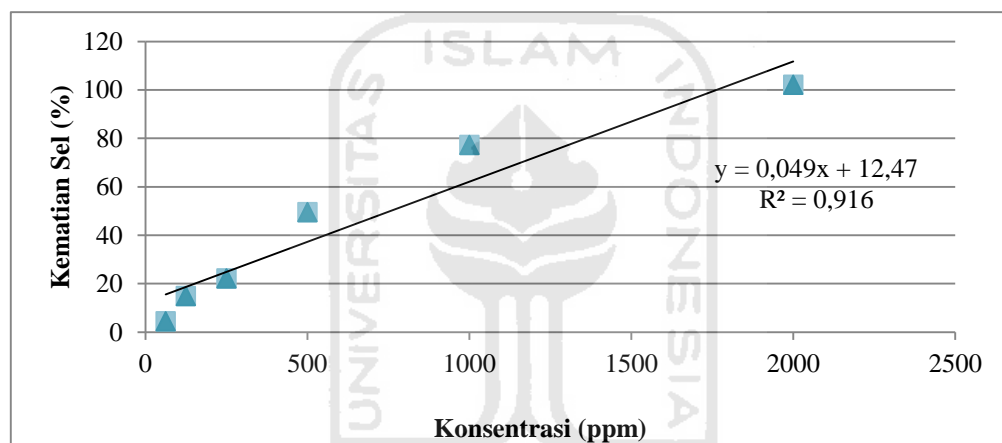
Tabel 4.4 Hasil Uji Antiproliferatif Sel MCF-7 Seluruh Sampel

Sampel	IC_{50} (ppm)
Ekstrak	1.260,16
Fraksi A	1.089,71
Fraksi B	1.181,27
Fraksi C	1.076,71
Fraksi D	1.166,77
Fraksi E	1.621,67
Fraksi F	765,92
Fraksi G	1.447,03
Fraksi H	1.318,91
Fraksi I	881,56

Hasil uji aktivitas antiproliferatif fraksi F n-heksan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* terhadap sel kanker payudara MCF-7 ditunjukkan pada tabel 4.5. Aktivitas mulai terlihat pada kadar 62,5ppm dan terus meningkat seiring dengan peningkatan kadar fraksi, yang ditandai dengan nilai absorbansi yang semakin kecil. Potensi ekstrak dan fraksi untuk membunuh sel dapat dilihat melalui nilai IC_{50} . Nilai konsentrasi ekstrak dan fraksi *Dryopteris marginalis* yang dapat membunuh 50% sel (IC_{50}) ini dihitung menggunakan persamaan regresi, data yang diperoleh dibuat kedalam persamaan regresi linier hubungan antara konsentrasi sebagai X dan persen kematian sel sebagai Y.

Tabel 4.5 Hasil Uji Antiproliferatif Fraksi F Terhadap Sel MCF-7

Konsentrasi Fraksi F (ppm)	Rata-rata Absorbansi	Kematian Sel (%)	IC ₅₀
2000	0,11	102,06	765,92ppm
1000	0,18	77,31	
500	0,26	49,45	
250	0,33	22,15	
125	0,35	14,87	
62,5	0,38	4,49	
Kontrol Sel	0,39		
Kontrol Media	0,12		

**Gambar 4.8** Grafik hubungan konsentrasi fraksi F dengan persen kematian sel MCF-7

Berdasarkan data hubungan konsentrasi fraksi F dengan persen kematian sel MCF-7 pada enam titik (gambar 4.8), diperoleh persamaan sebagai berikut:

$$y = 0,049 x + 12,47$$

Nilai IC₅₀ diperoleh dengan mendistribusikan nilai $y = 50$, sehingga diperoleh nilai IC₅₀ fraksi F terhadap sel kanker payudara MCF-7 sebesar 765,92ppm. Pada penelitian Yang et al (2015) fraksi n-heksan dari tumbuhan paku *Lepisorus thunbergianus* dengan konsentrasi 500ppm mampu membuat kultur sel kanker payudara MCF-7 yang bertahan hidup hanya sebanyak <40% sel⁽²⁸⁾.

Selanjutnya fraksi aktif diujikan lagi terhadap sel Vero untuk mengetahui keamanan fraksi terhadap sel normal. Berdasarkan hasil uji dapat dikatakan bahwa ketiga fraksi tersebut aman terhadap sel normal atau memiliki selektifitas dalam membunuh sel. Hal ini dapat dilihat dari nilai IC_{50} ketiga fraksi tersebut yang tidak dapat dikuantifikasikan sehingga nilainya dianggap NA (*Not Available*) karena memiliki nilai absorbansi yang sama dengan kontrol selnya (Lampiran 6). Nilai absorbansi yang sama ini juga dapat diartikan bahwa sel yang diberikan larutan uji masih banyak yang hidup dan jumlahnya tidak jauh berbeda dengan kontrol sel. Selain itu nilai IC_{50} tidak dapat dikuantifikasikan juga dikarenakan fraksi bersifat inert terhadap pertumbuhan sel Vero. Hal ini juga dapat dilihat dari warna sel setelah diberikan MTT dan diinkubasi selama 24 jam tetap berwarna ungu yang menandakan bahwa banyak sel yang hidup ataupun dapat dilihat dari nilai absorbansi yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai absorbansi maka semakin banyak kristal formazan yang terbentuk. Diketahui bahwa kristal formazan hanya akan terbentuk karena adanya enzim reduktase suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi mitokondria. Enzim ini hanya dimiliki oleh mitokondria sel hidup, yang ditandai dengan perubahan warna kuning menjadi ungu (Lampiran 5)⁽⁹⁾.

Tabel 4.6 Hasil Uji Selektivitas Fraksi F Terhadap Sel Vero

Konsentrasi Fraksi F (ppm)	Rata-rata Absorbansi	Kematian Sel (%)	IC_{50}
2000	0,42	-17,44	
1000	0,39	-8,67	
500	0,39	-6,67	
250	0,36	4	
125	0,35	4	NA
62,5	0,34	7,44	
31,25	0,34	10	
Kontrol Sel	0,37		
Kontrol Media	0,07		

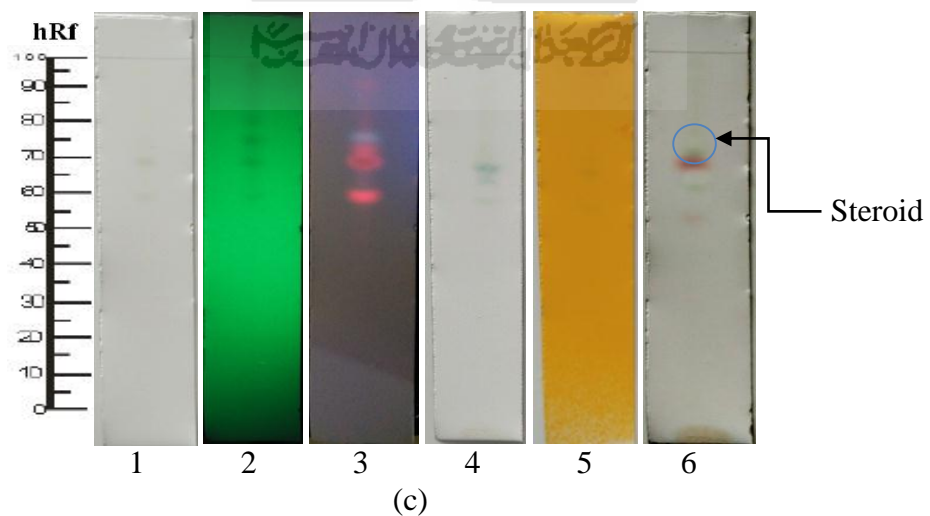
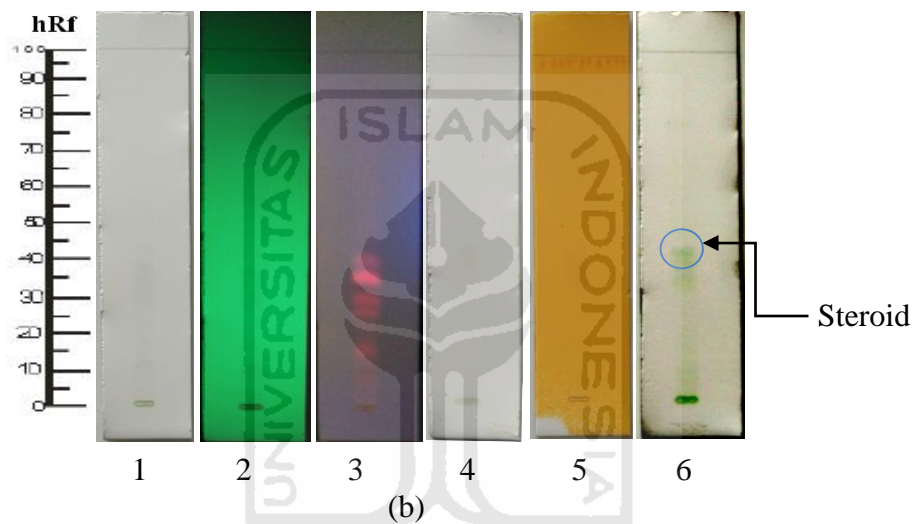
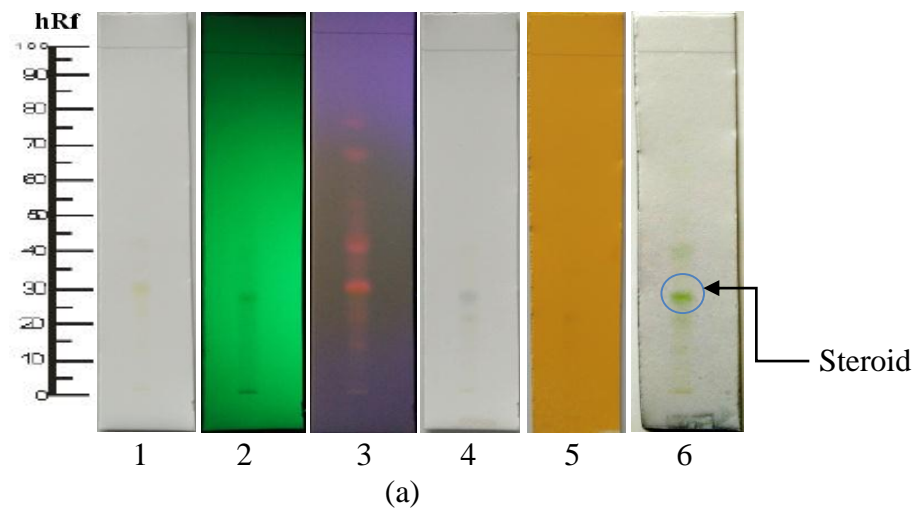
Keterangan: NA (*Not Available*) ini didapatkan karena nilai absorbansi dari sumuran yang diberikan larutan uji tidak jauh berbeda dengan kontrol sel yang artinya masih banyak sel yang hidup setelah perlakuan.

Hasil uji aktivitas antiproliferatif fraksi F tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* terhadap sel Vero sebagai kontrol sel normal, ditunjukkan pada tabel 4.6. Berdasarkan hasil rata-rata absorbansi yang didapatkan dapat dilihat bahwa nilai absorbansi fraksi F tidak jauh berbeda dengan absorbansi kontrol sel. Nilai absorbansi yang tidak jauh berbeda ini menandakan bahwa jumlah sel yang diberikan fraksi dengan yang tidak diberikan fraksi jumlahnya tidak jauh berbeda. Dari nilai absorbansi yang tidak jauh berbeda ini juga dapat disimpulkan bahwa masih banyak sel yang hidup. Hal ini menyebabkan nilai absorbansi yang didapatkan tidak dapat dikuantifikasikan, sehingga nilai IC_{50} fraksi F terhadap sel Vero dianggap NA.

Berdasarkan hasil dari penelitian yang didapatkan, nilai IC_{50} terbaik adalah fraksi F dengan nilai IC_{50} sebesar 765,92ppm. Jika dibandingkan dengan penelitian Yang et al (2015) yang menggunakan fraksi n-heksan dari tumbuhan paku *Lepisorus thunbergianus* yang memiliki nilai IC_{50} sekitar 500ppm, hasil yang didapatkan tidak terlalu jauh berbeda. Untuk mendapatkan nilai IC_{50} yang lebih baik lagi bisa dikembangkan cara fraksinasi yang lebih baik atau dengan memilih perbandingan pelarut yang dapat memisahkan dengan lebih maksimal ataupun dengan mencoba cara ekstraksi lain yang mungkin saja dapat menyari senyawa steroid lebih banyak lagi dibandingkan dengan maserasi agar pada saat tahap fraksinasi ekstrak senyawa steroid yang didapatkan lebih banyak lagi.

4.6 Hasil Uji Kandungan Fraksi Aktif

Tiga fraksi yang memiliki aktivitas paling baik terhadap sel MCF-7 selanjutnya diuji kandungannya. Uji kandungan ini dilakukan dengan cara memisahkan fraksi pada plat silika gel GF₂₅₄ dengan menggunakan pelarut yang cocok yaitu perbandingan pelarut n-heksan:etil asetat (7:3) untuk fraksi F dan fraksi C, dan perbandingan pelarut n-heksan:etil asetat (2:8) untuk fraksi I yang selanjutnya disemprotkan dengan beberapa macam pereaksi semprot yaitu Lieberman-burchard, $AlCl_3$, dan Dragendrof. Pereaksi semprot Lieberman-burchard digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa steroid, pereaksi semprot $AlCl_3$ digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid, dan pereaksi semprot Dragendrof digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa alkaloid.



Gambar 4.9 Hasil Identifikasi Senyawa pada Fraksi F(a), fraksi I(b), dan fraksi C(c)
 Keterangan : 1 = Sebelum disemprot menggunakan pereaksi pada sinar tampak; 2 = Sebelum disemprot menggunakan pereaksi pada sinar UV 254; 3 = Sebelum disemprot menggunakan pereaksi pada sinar UV 366; 4 = Setelah disemprotkan pereaksi semprot AlCl_3 ; 5 = Setelah disemprotkan pereaksi semprot dragendrof; 6 = Setelah disemprotkan pereaksi semprot Liebermann-burchard.

Setelah ketiga fraksi disemprotkan dengan beberapa pereaksi semprot didapatkan hasil bahwa ketiga fraksi tersebut mengandung senyawa steroid dan tidak mengandung senyawa flavonoid, maupun senyawa alkaloid. Adanya senyawa steroid pada fraksi ditandai dengan spot yang berubah warna menjadi kehijauan, untuk senyawa flavonoid ditandai dengan spot yang berubah warna menjadi kuning, sedangkan untuk senyawa alkaloid ditandai dengan spot yang berubah warna menjadi kecoklatan⁽²⁸⁾. Berdasarkan hasil identifikasi senyawa setiap fraksi memiliki nilai hRf yang berbeda-beda untuk senyawa steroidnya yaitu fraksi F memiliki nilai hRf sebesar 28, fraksi I memiliki nilai hRf sebesar 42, dan yang terakhir fraksi C memiliki nilai hRf sebesar 71 (tabel 4.7).

Senyawa-senyawa steroid ini jika diamati dibawah sinar UV 254 akan terlihat meredam dan jika diamati dibawah sinar UV 366 akan terlihat berpendar dengan warna merah muda yang dapat dilihat pada gambar 4.10. Berdasarkan hasil uji kandungan ini juga membuktikan bahwa senyawa steroid yang diperkirakan memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 dan tidak memiliki toksisitas terhadap kultur sel Vero memang terkandung didalam setiap ketiga fraksi tersebut.

Tabel 4.7 Nilai hRf Hasil Identifikasi Senyawa

Fraksi	hRf		
	Steroid	Flavonoid	Alkaloid
F	28	-	-
I	42	-	-
C	71	-	-

BAB V

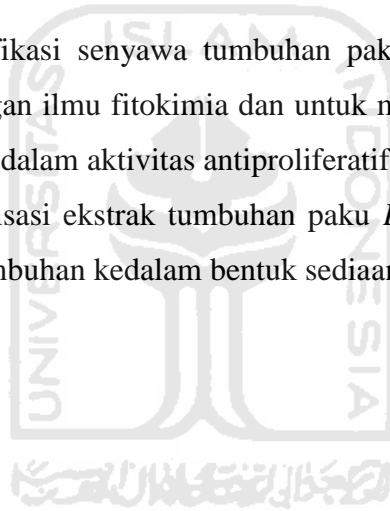
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Fraksi n-heksan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* yang memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 paling baik adalah fraksi F dengan IC_{50} sebesar 765,92ppm.
2. Fraksi n-heksan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* tidak memiliki toksisitas terhadap kultur sel Vero atau dapat diartikan bahwa fraksi aman terhadap sel normal.

5.2 SARAN

1. Isolasi dan identifikasi senyawa tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* untuk pengembangan ilmu fitokimia dan untuk mengetahui senyawa yang bertanggungjawab dalam aktivitas antiproliferatif.
2. Dilakukan standarisasi ekstrak tumbuhan paku *Dyopteris marginalis* dan pengembangan tumbuhan kedalam bentuk sediaan farmasi.



DAFTAR PUSTAKA

- (1) Lubis SR. Keanekaragaman dan Pola Distribusi Tumbuhan Paku di Hutan Wisata Alam Taman Eden Kabupaten Toba Samosir Provinsi Sumatera Utara [tesis]. Sumatra Utara: Universitas Sumatra Utara; 2009. hal:27
- (2) Ni'mah M. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Daun Paku *Nephrolepis falcata* (Cav) C. Chr. Terhadap Penghambatan Denaturasi Protein secara In Vitro [skripsi]. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta; 2014. hal:2,6
- (3) Permata F, Suyatno. Uji Aktivitas Pendahuluan Sebagai Antikanker Senyawa Non Fenolik Ekstrak n-Heksan Tumbuhan Paku *Christella arida*. UNESA J Chem. 2013;2(3). hal:90-93
- (4) Grattan BJ. Plant Sterols as Anticancer Nutrients: Evidence for Their Role in Breast Cancer. *Nutrients*. 2013;5(3). hal:361-362
- (5) Kim Y-S, Li X-F, Kang K-H, Ryu BM, Kim SK. Stigmasterol Isolated from Marine Microalgae *Navicula Incerta* Induces Apoptosis in Human Hepatoma HepG2 Cells. *BMB Rep*. 2014;47(8). hal:432,435
- (6) Ali H, Dixit S, Ali D, Alqahtani SM, Alkahtani S, Alarifi S. Isolation and Evaluation of Anticancer Efficacy of Stigmasterol in a Mouse Model of DMBA-Induced Skin Carcinoma. *DovePress*. 2015;9. hal:2796-2797
- (7) Maulana A. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif dari Daun Paku Limat (*Dryopteris irregularis*) [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2001. hal:1-2
- (8) Zhang Y, Luo M, Zu Y, Fu Y, Gu C, Wang W, Yao L, Efferth T. Chemico-Biological Interactions Dryofragin, a phloroglucinol derivate, Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through ROS-mediated Mitochondrial Pathway. *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier Ireland Ltd. 2012;199(2). hal:130
- (9) Sitorus S. Uji Sitoksisitas Ekstrak Etanol *Angiopteris angustifolis* C. Presl terhadap Kultur Sel Kanker Payudara (MCF-7 Cell Line) secara in vitro [skripsi]. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta; 2013. hal:10, 18-19
- (10) Bustero F. A Month to Remember-Breast Cancer Awareness Month. *World Health Organization*. 2015. Diambil dari <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/breast-cancer-awareness/en/> diakses 6 November 2016
- (11) World Health Organization. Cancer. *World Health Organization* 2015. Diambil dari <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> diakses 6 November 2016
- (12) World Health Organization. 103,100. *Cancer Country Profiles*. 2014:22-23
- (13) Anonim. MCF-7 Information. Diambil dari <http://www.mcf7.com/> diakses 3 Februari 2016
- (14) Anonim. *Dryopteris marginalis* (L) Gray. Diambil dari <http://hardyfernlibrary.com/ferns/listSpecies.cfm?Auto=14> diakses 4 Februari 2016
- (15) United State Departement of Agriculture. *Dryopteris marginalis* Classification. Diambil dari <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=drma4> diakses 26 Januari 2016
- (16) American Cancer Association. Cancer. Diambil dari <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer> diakses 27 Januari

2016

- (17) American Cancer Association. Cancer Cause. Diambil dari <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/index> diakses 28 Januari 2016
- (18) American Cancer Association. Types of Breast Cancer. Diambil dari <http://www.breastcancer.org/symptoms/types> diakses 28 Januari 2016
- (19) American Cancer Association. US Breast Cancer Statistic. Diambil dari http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics diakses 3 Maret 2016
- (20) Anonim. Cell Culture Basic. Diambil dari <http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf> diakses 3 Februari 2016
- (21) Jenie RI, Meiyanto E. Aplikasi Ko-Kemoterapi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbensis* (Lour.) Merr.) Pada Sel Kanker Payudara MCF-7. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2009;6(3). hal:136
- (22) Marbawati D, Sarjiman. Konsentrasi Aman Kurkumin dan PGV-0 terhadap Sel Vero Berdasarkan Hasil Uji Sitotoksik. *J Kefarmasian Indonesia*. 2015;5(2). hal:68-70
- (23) Firdaus I, Retnowati R, Sutrisno. Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Mangga Katsuri (*Mangifera catsuri kosterm*) dengan Pelarut n-Butanol. *Kimia Student J*. 2015;1(1). hal:786-788
- (24) Annisa L. Uji Aktivitas Antiproliferatif Ekstrak n-Heksan Tumbuhan Paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav Terhadap Kultur Sel Kanker Payudara MCF-7 dengan MTT Assay [skripsi]. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia; 2015. hal:5-6,15,20-25
- (25) Rachma FA. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Kulit Batang Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Sel T47D serta Profil Kromatografi Lapis Tipis [Makalah Publikasi]. Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2012. hal:9-10
- (26) Anonim, Material Safety Data Sheet : Hexanes MSDS. Diambil dari <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927187>. diakses 9 Oktober 2016
- (27) Watson DG. Analisis Farmasi : buku ajar untuk mahasiswa farmasi dan praktisi kimia. Alih Bahasa, Winny R. Syarief. Editor edisi Indonesia, Amalia H. Hadinata. Edisi 2. Jakarta : EGC. 2010; hal:277
- (28) Yang J, Kwon YS, Lim JD, Yu CY, Kim MJ. Antioxidant and Anticancer Properties of the Extracts from *Lepisorus thunbergianus* (Kaulf.) Ching. *KJMCS*. 2015;23(4). hal:329

LAMPIRAN

Lampiran 1

Ethical Clearance




UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMITE ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN DAN KESEHATAN
 Sekretariat : Jl. Kaliurang Km. 14,5 YOGYAKARTA 55584
 Telp. (0274) 898444 ext. 2060 Fax. (0274) 898444 ext. 2007; E-mail : ke.fkuii@yahoo.co.id

Nomor : 24/Ka.Kom.Et/70/KE/V/2016

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :

“Uji Aktivitas Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi n-Heksan Tumbuhan Paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav terhadap Kultur Sel Kanker Payudara MCF-7 dengan MTT Assay.”

Peneliti Utama : Nita Trinovitasari
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Farmasi FMIPA UII
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
and approved the above-mentioned protocol.

Yogyakarta, 17 Mei 2016
 Ketua
 Chairman

 Prof. Dr. Dra. Widyayun Lestaryana, Apt

**Ethical Approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan

**Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tangan jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

Lampiran 2

Hasil Identifikasi Tumbuhan



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

SURAT KETERANGAN

Nomor : 0754/S.Tb./II/2016

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

Nama : Nita Trinovitasari
NIM : 12613208
Asal instansi : Fakultas MIPA - UII Yogyakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan paku dengan hasil sebagai berikut,

NO.	FAMILIA	GENUS	SPESIES
1	Dryopteridaceae	<i>Dryopteris</i>	<i>Dryopteris marginalis</i> (L.) Gray

identifikasi tersebut dibantu oleh Drs. Heri Sujadmiko, M.Si.
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Yogyakarta, 17 Februari 2016

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada

Prof. Dr. Suwarno Hadisusanto, S.U.
NIP. 195411161983031002

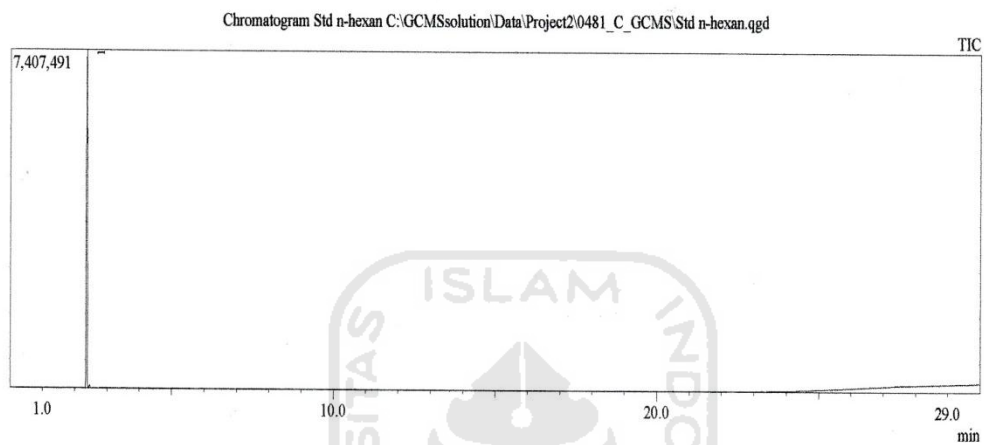
Kepala Laboratorium
Sistematika Tumbuhan
Fakultas Biologi UGM

Dr. Purnomo, M.S.
NIP. 195504211982031005

Lampiran 3

Hasil Kromatogram GC-MS Standar n-heksan

Sample Information
Analyzed by : Admin
Analyzed : 9/22/2016 11:14:40 AM
Sample Name : Std n-hexan
Sample ID : 1
Injection Volume : 0.10
Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project2\0481_C_GCMS\Std n-hexan.qgd
Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\Tuning 10052016.qgt



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Peak Report TIC		
				Area	Area%	Height
1	2.365	2.325	2.417	15250739	100.00	7392683
				15250739	100.00	7392683

Lanjutan Hasil Kromatogram GC-MS Standar n-heksan

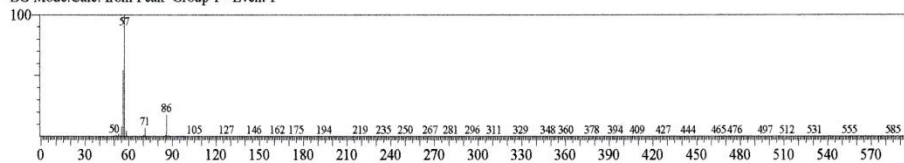
Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:2.367(Scan#:285) MassPeaks:345

RawMode:Averaged 2.358-2.375(284-286) BasePeak:57.05(3452394)

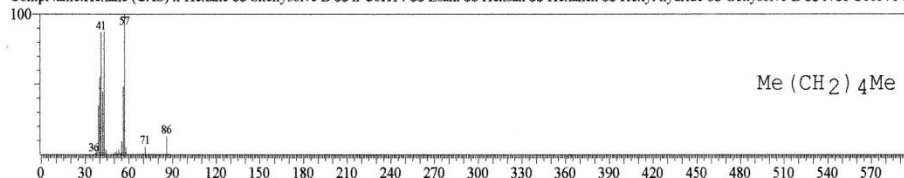
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:3576 Library:WILEY7.LIB

SI:97 Formula:C6 H14 CAS:110-54-3 MolWeight:86 RetIndex:0

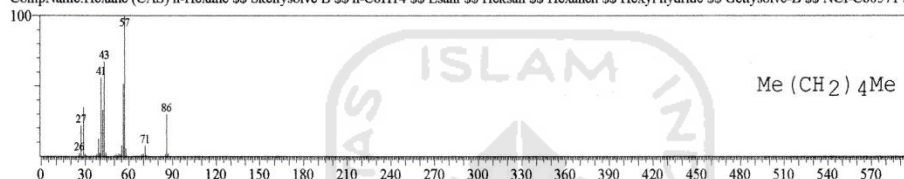
CompName:Hexane (CAS) n-Hexane \$\$ Skellysolve B \$\$ n-C6H14 \$\$ Esani \$\$ Heksan \$\$ Hexanen \$\$ Hexyl hydride \$\$ Gettysolve-B \$\$ NCI-C60571 \$\$



Hit#:2 Entry:3574 Library:WILEY7.LIB

SI:97 Formula:C6 H14 CAS:110-54-3 MolWeight:86 RetIndex:0

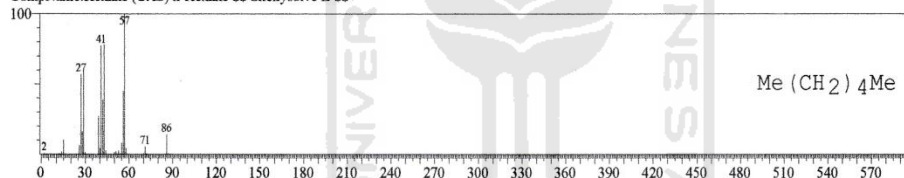
CompName:Hexane (CAS) n-Hexane \$\$ Skellysolve B \$\$ n-C6H14 \$\$ Esani \$\$ Heksan \$\$ Hexanen \$\$ Hexyl hydride \$\$ Gettysolve-B \$\$ NCI-C60571 \$\$



Hit#:3 Entry:3575 Library:WILEY7.LIB

SI:97 Formula:C6 H14 CAS:110-54-3 MolWeight:86 RetIndex:0

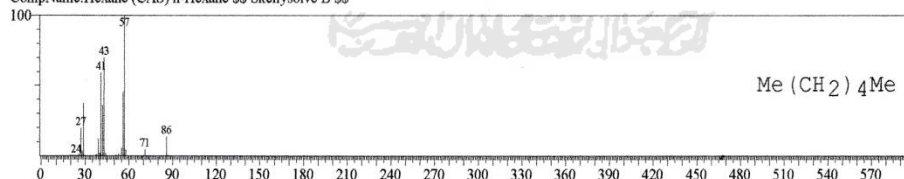
CompName:Hexane (CAS) n-Hexane \$\$ Skellysolve B \$\$



Hit#:4 Entry:3573 Library:WILEY7.LIB

SI:97 Formula:C6 H14 CAS:110-54-3 MolWeight:86 RetIndex:0

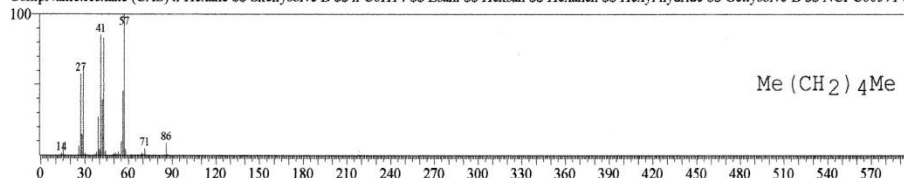
CompName:Hexane (CAS) n-Hexane \$\$ Skellysolve B \$\$



Hit#:5 Entry:3577 Library:WILEY7.LIB

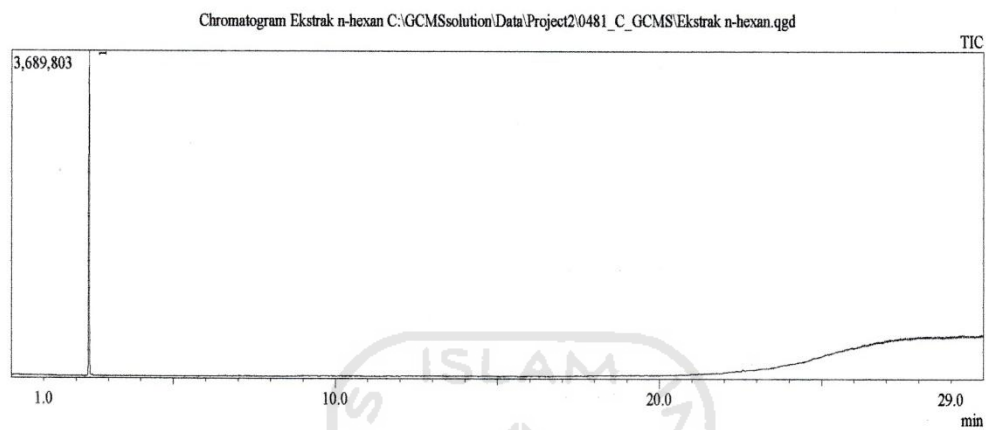
SI:96 Formula:C6 H14 CAS:110-54-3 MolWeight:86 RetIndex:0

CompName:Hexane (CAS) n-Hexane \$\$ Skellysolve B \$\$ n-C6H14 \$\$ Esani \$\$ Heksan \$\$ Hexanen \$\$ Hexyl hydride \$\$ Gettysolve-B \$\$ NCI-C60571 \$\$

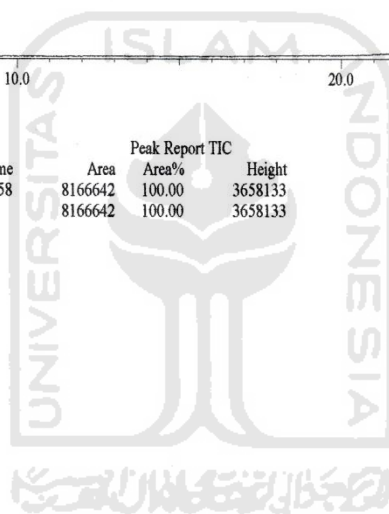


Hasil Kromatogram GC-MS Ekstrak

Sample Information
Analyzed by : Admin
Analyzed : 9/22/2016 11:48:53 AM
Sample Name : Ekstrak n-hexan
Sample ID : 2
Injection Volume : 0.10
Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project2\0481_C_GCMS\Ekstrak n-hexan.qgd
Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\Tuning 10052016.qgt



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Peak Report TIC		
				Area	Area%	Height
1	2.393	2.350	2.458	8166642	100.00	3658133
				8166642	100.00	3658133



Lanjutan Hasil Kromatogram GC-MS Ekstrak

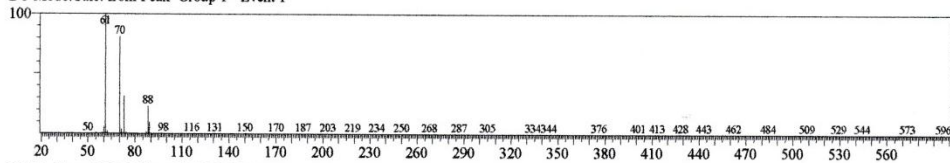
Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:2.392(Scan#:288) MassPeaks:319

RawMode:Averaged 2.383-2.400(287-289) BasePeak:61.00(1322000)

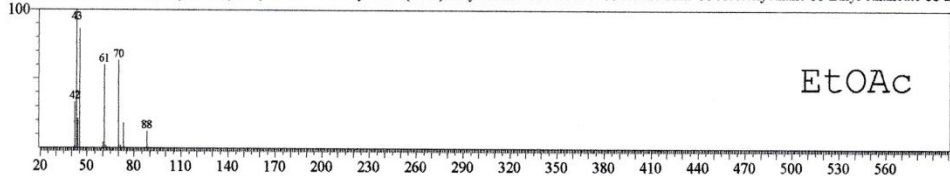
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:3930 Library:WILEY7.LIB

SI:95 Formula:C4 H8 O2 CAS:141-78-6 MolWeight:88 RetIndex:0

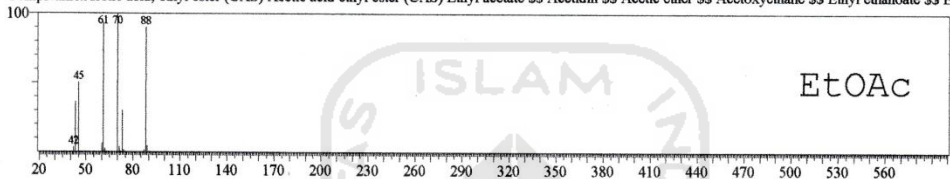
CompName:Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate \$\$ Acetidin \$\$ Acetic ether \$\$ Acetoxyethane \$\$ Ethyl ethanoate \$\$ F



Hit#:2 Entry:3928 Library:WILEY7.LIB

SI:91 Formula:C4 H8 O2 CAS:141-78-6 MolWeight:88 RetIndex:0

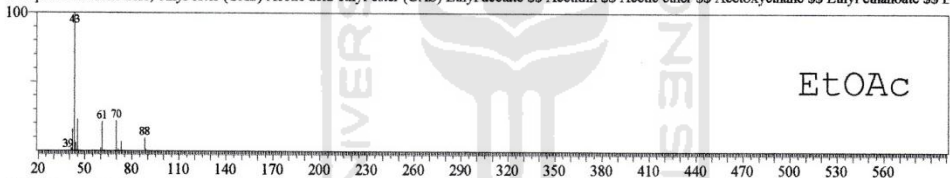
CompName:Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate \$\$ Acetidin \$\$ Acetic ether \$\$ Acetoxyethane \$\$ Ethyl ethanoate \$\$ F



Hit#:3 Entry:3923 Library:WILEY7.LIB

SI:90 Formula:C4 H8 O2 CAS:141-78-6 MolWeight:88 RetIndex:0

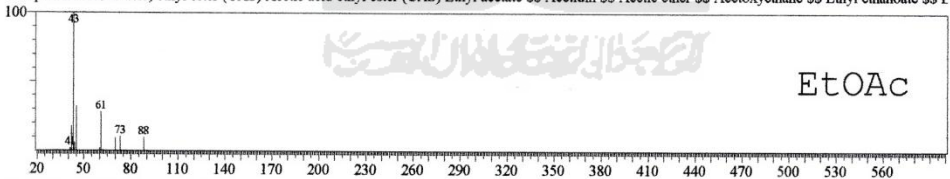
CompName:Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate \$\$ Acetidin \$\$ Acetic ether \$\$ Acetoxyethane \$\$ Ethyl ethanoate \$\$ F



Hit#:4 Entry:3927 Library:WILEY7.LIB

SI:89 Formula:C4 H8 O2 CAS:141-78-6 MolWeight:88 RetIndex:0

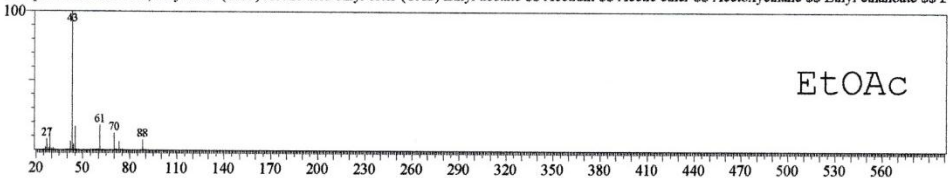
CompName:Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate \$\$ Acetidin \$\$ Acetic ether \$\$ Acetoxyethane \$\$ Ethyl ethanoate \$\$ F



Hit#:5 Entry:3918 Library:WILEY7.LIB

SI:84 Formula:C4 H8 O2 CAS:141-78-6 MolWeight:88 RetIndex:0

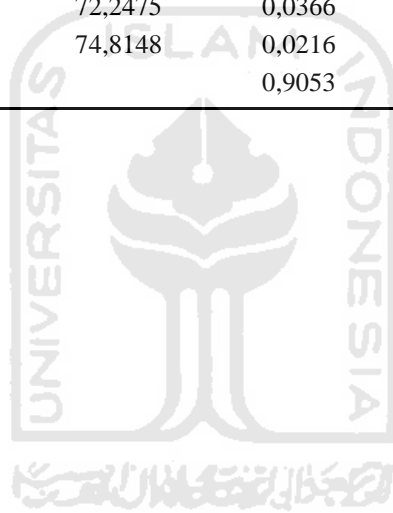
CompName:Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate \$\$ Acetidin \$\$ Acetic ether \$\$ Acetoxyethane \$\$ Ethyl ethanoate \$\$ F



Lampiran 4

Bobot Hasil Fraksinasi Ekstrak

Fraksi	Bobot Mangkok (g)	Bobot Mangkok + Fraksi (g)	Bobot Fraksi (g)	Bobot Ekstrak (g)	Rendemen (%)
A	69,9386	70,0235	0,0849	1	8,49
B	71,1187	71,3851	0,2664	1	26,64
C	71,4528	71,6145	0,1617	1	16,17
D	73,0899	73,1782	0,0883	1	8,83
E	74,6295	74,6899	0,0604	1	6,04
F	70,9069	71,0541	0,1472	1	14,72
G	72,1935	72,2317	0,0382	1	3,82
H	72,2109	72,2475	0,0366	1	3,66
I	74,7932	74,8148	0,0216	1	2,16
Jumlah			0,9053		90,53



Lampiran 5 Plate Sel MCF-7 dan Sel Vero

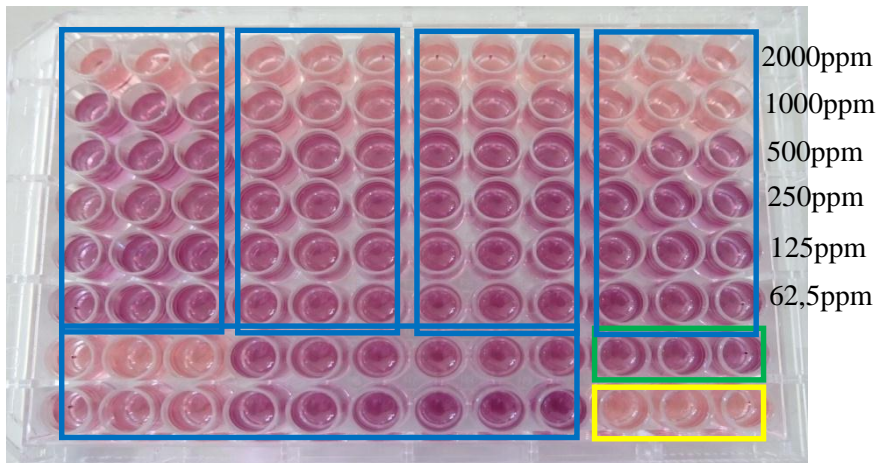


Plate Sel MCF-7 Ekstrak – Fraksi D

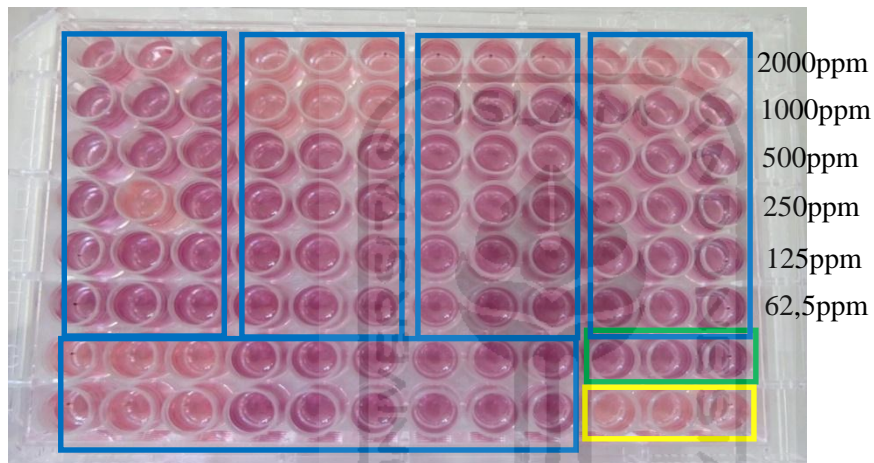


Plate Sel MCF-7 Fraksi E – Fraksi I

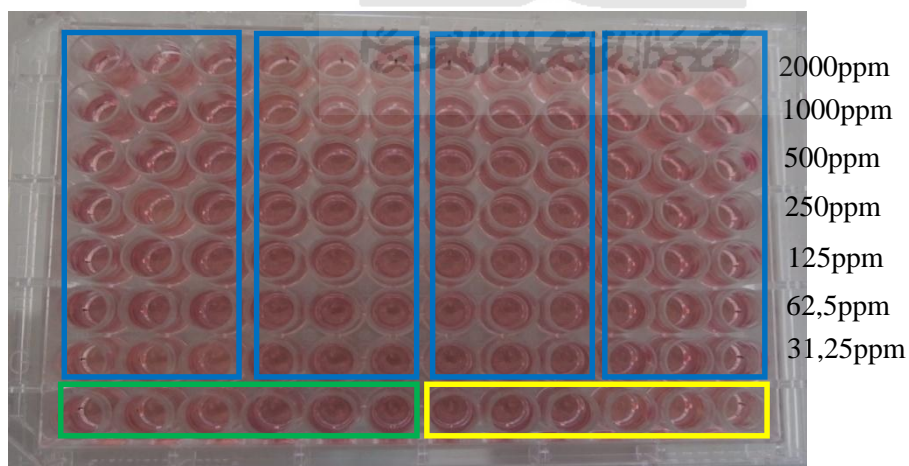


Plate Sel Vero Fraksi Aktif

Keterangan :

	: Sampel Ekstrak dan Fraksi
	: Kontrol Sel (Sel + Media)
	: Kontrol Media

Lampiran 6

Tabel Absorbansi, Persentase Kematian dan Grafik Sel MCF-7

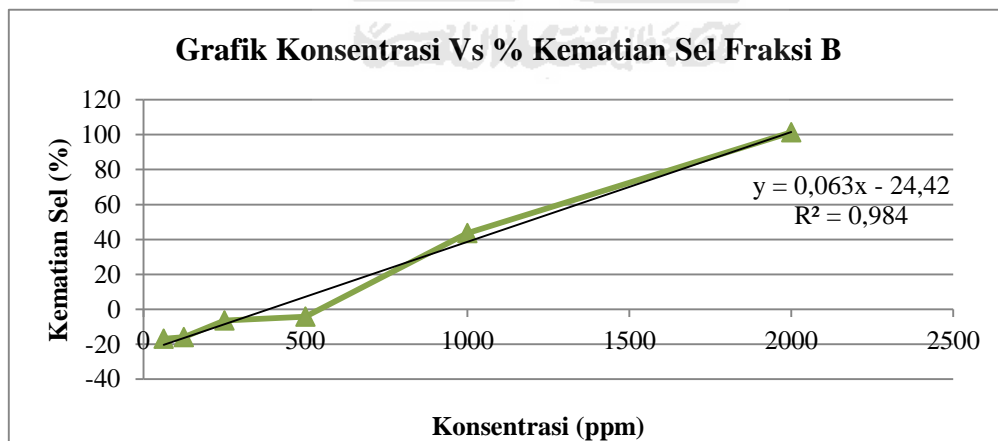
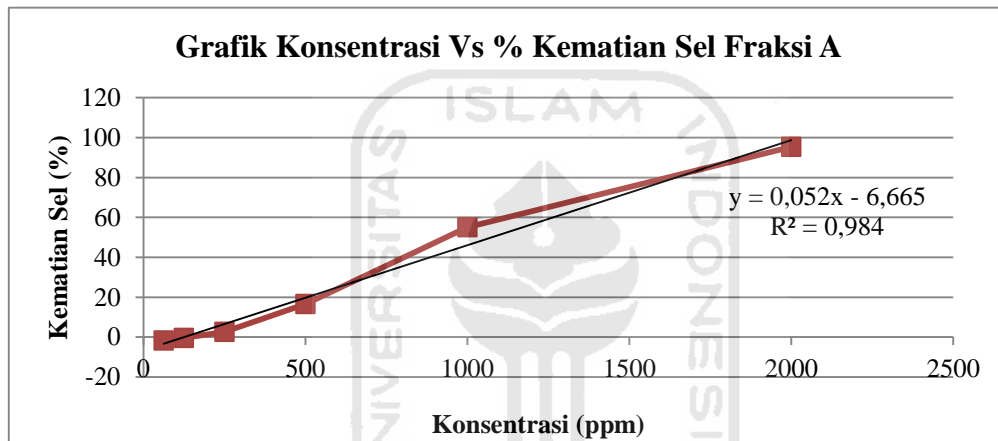
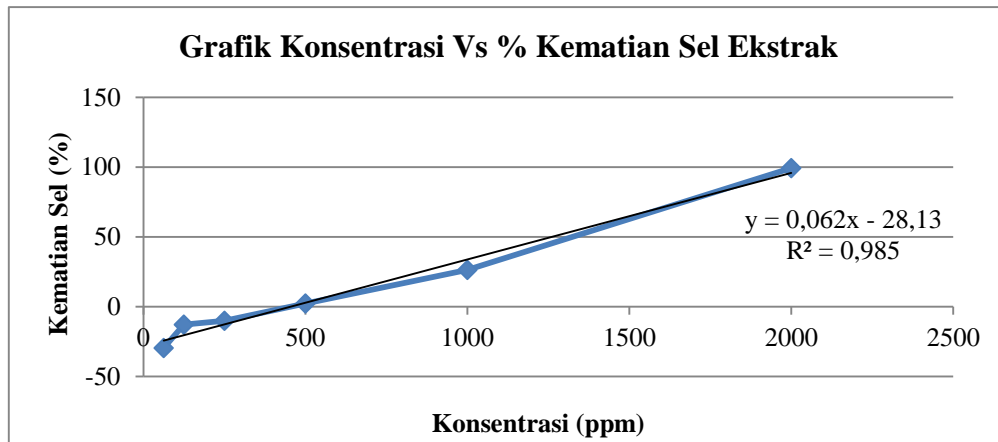
Tabel Absorbansi Sel MCF-7

Sampel	Konsentrasi (ppm)					
	2000	1000	500	250	125	62.5
Ekstrak	0,13	0,39	0,48	0,53	0,54	0,60
Fraksi A	0,14	0,29	0,43	0,48	0,49	0,50
Fraksi B	0,12	0,33	0,51	0,51	0,55	0,55
Fraksi C	0,12	0,20	0,46	0,55	0,57	0,62
Fraksi D	0,12	0,30	0,48	0,49	0,51	0,65
Fraksi E	0,22	0,32	0,33	0,36	0,36	0,38
Fraksi F	0,11	0,18	0,26	0,33	0,35	0,38
Fraksi G	0,21	0,28	0,37	0,38	0,39	0,39
Fraksi H	0,15	0,33	0,38	0,38	0,39	0,41
Fraksi I	0,12	0,18	0,29	0,35	0,39	0,41
Kontrol Sel		0,49			0,39	
Kontrol Media		0,12			0,12	

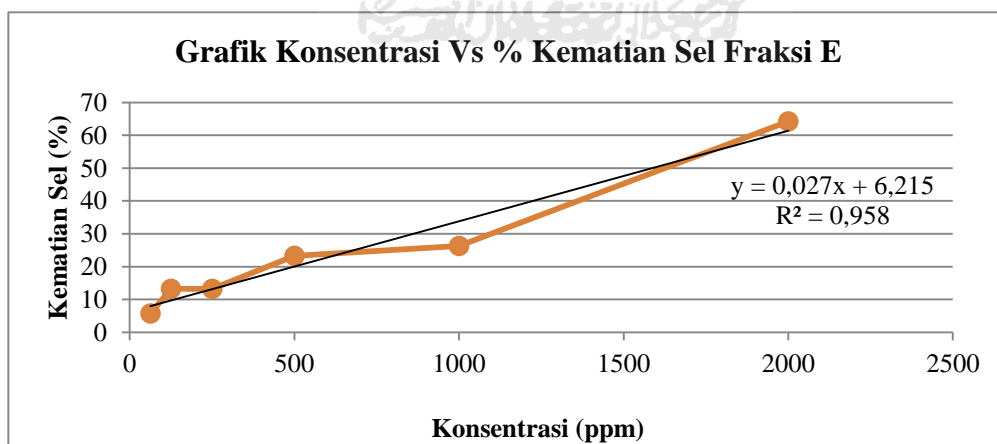
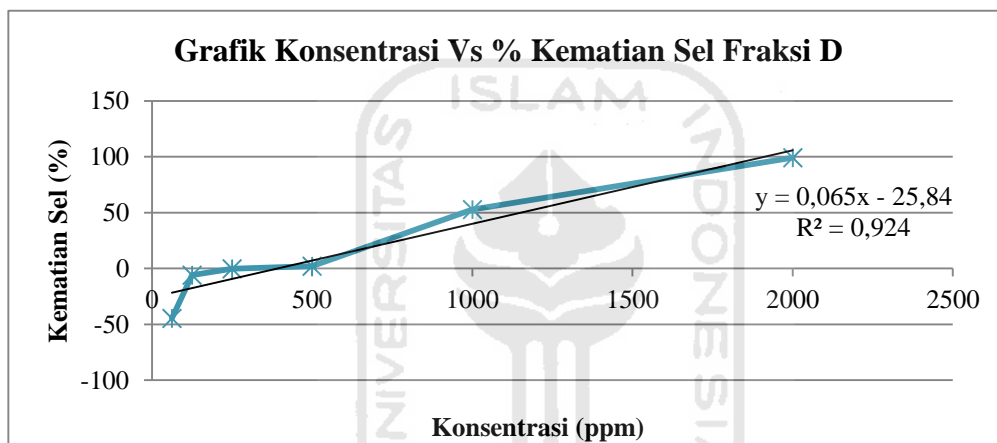
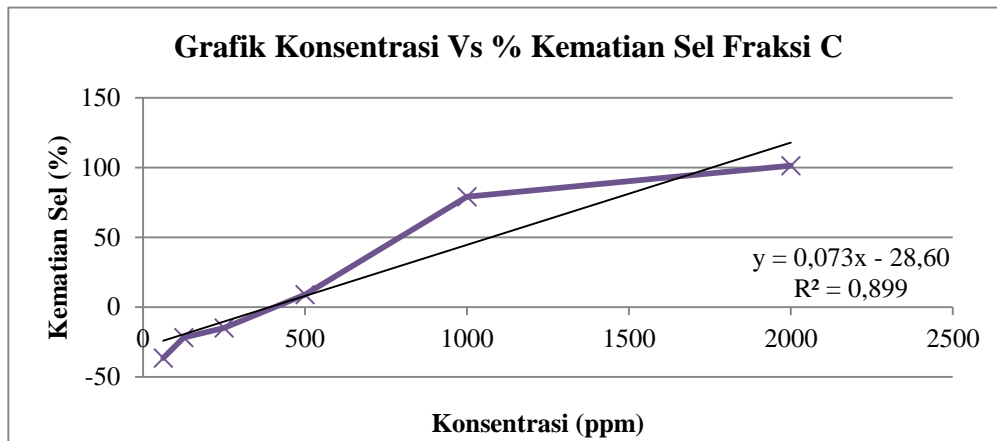
Tabel Persentase Kematian Sel MCF-7

Sampel	Konsentrasi (ppm)					
	2000	1000	500	250	125	62.5
Ekstrak	99,19	26,29	2,26	-10,09	-12,81	-29,50
Fraksi A	95,38	55,07	16,52	2,53	-0,45	-1,67
Fraksi B	101,36	43,67	-4,25	-6,43	-15,93	-17,01
Fraksi C	101,36	79,23	8,91	-14,84	-21,76	-36,29
Fraksi D	99,37	52,76	2,26	-0,05	-5,88	-44,43
Fraksi E	64,20	26,33	23,24	13,23	13,23	5,76
Fraksi F	102,06	77,31	49,45	22,15	14,87	4,49
Fraksi G	68,02	42,54	8,31	5,04	2,67	3,22
Fraksi H	88,96	21,78	6,86	4,31	0,30	-4,61
Fraksi I	98,97	79,67	36,71	15,23	2,67	-4,43

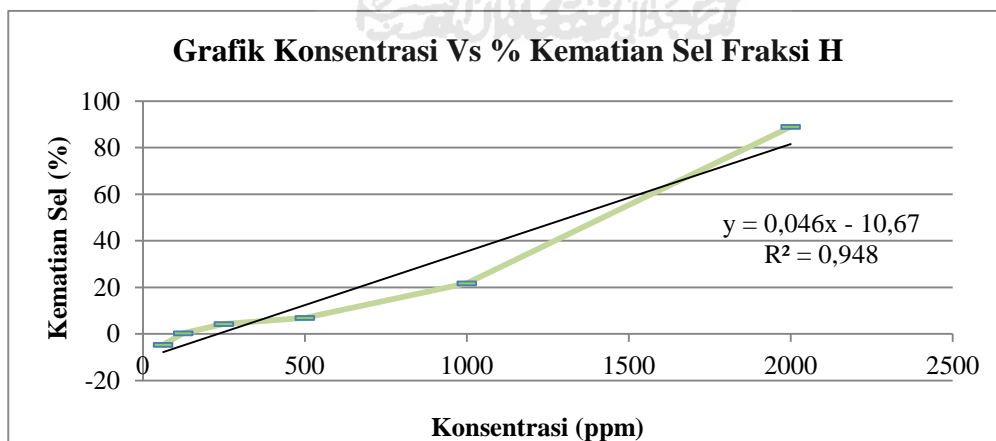
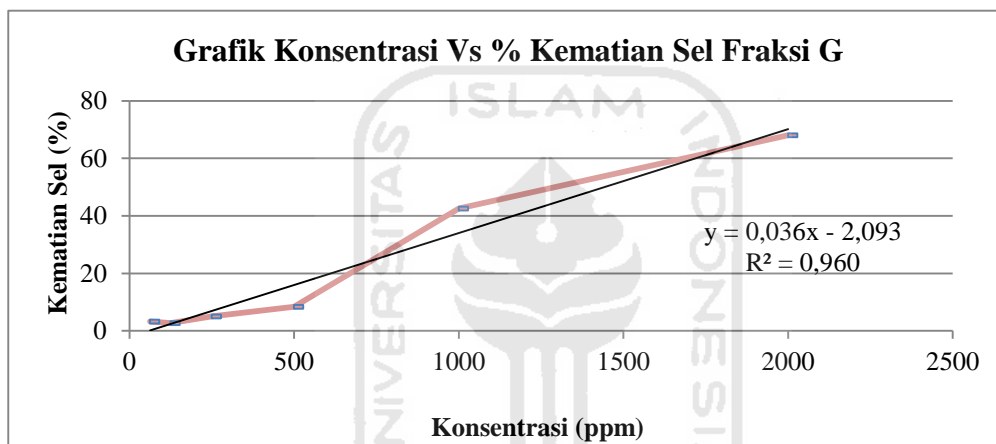
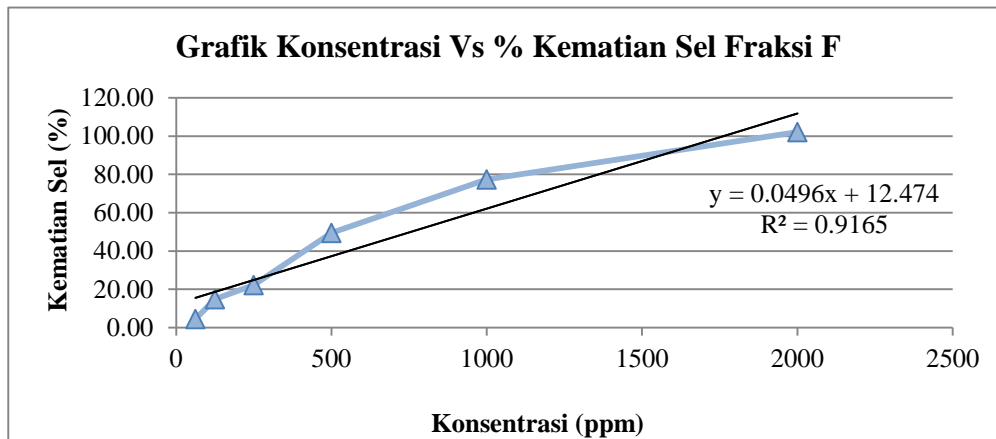
Grafik Persentase Kematian Sel MCF-7



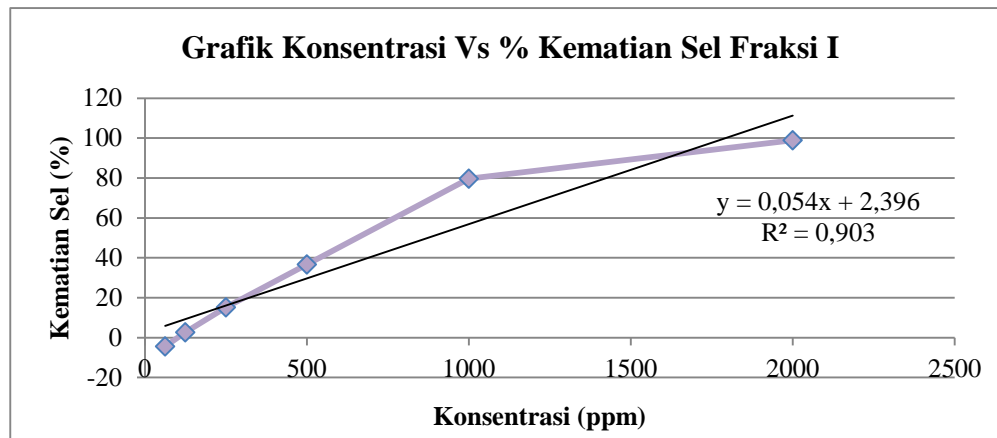
Lanjutan Grafik Persentase Kematian Sel MCF-7



Lanjutan Grafik Persentase Kematian Sel MCF-7



Lanjutan Grafik Persentase Kematian Sel MCF-7



Perhitungan IC₅₀ Sel MCF-7

Ekstrak	$y = 0,062x - 28,13$ $50 = 0,062x - 28,13$ $x = 1260,16\text{ppm}$	Fraksi E	$y = 0,027x + 6,215$ $50 = 0,027x + 6,215$ $x = 1621,67\text{ppm}$
Fraksi A	$y = 0,052x - 6,665$ $50 = 0,052x - 6,665$ $x = 1089,71\text{ppm}$	Fraksi F	$y = 0,049x + 12,47$ $50 = 0,049x + 12,47$ $x = 765,92\text{ppm}$
Fraksi B	$y = 0,063x - 24,42$ $50 = 0,063x - 24,42$ $x = 1181,27\text{ppm}$	Fraksi G	$y = 0,036x - 2,093$ $50 = 0,036x - 2,093$ $x = 1447,03\text{ppm}$
Fraksi C	$y = 0,073x - 28,60$ $50 = 0,073x - 28,60$ $x = 1076,71\text{ppm}$	Fraksi H	$y = 0,046x - 10,67$ $50 = 0,046x - 10,67$ $x = 1318,91\text{ppm}$
Fraksi D	$y = 0,065x - 25,84$ $50 = 0,065x - 25,84$ $x = 1166,77\text{ppm}$	Fraksi I	$y = 0,054x + 2,396$ $50 = 0,054x + 2,396$ $x = 881,56\text{ppm}$

Tabel Absorbansi Sel Vero

Sampel	Konsentrasi (ppm)						
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25
Fraksi A	0,43	0,41	0,39	0,36	0,36	0,36	0,37
Fraksi C	0,40	0,38	0,37	0,34	0,35	0,36	0,36
Fraksi F	0,42	0,39	0,39	0,36	0,35	0,34	0,34
Fraksi I	0,39	0,41	0,40	0,35	0,36	0,35	0,37
Kontrol Sel				0,37			
Kontrol Media				0,07			

Tabel Persentase Kematian Sel Vero

Sampel	Konsentrasi (ppm)						
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25
Fraksi A	-20	-15	-9,11	1	1,33	2,44	-1
Fraksi C	-11,44	-4	-2,33	11	6	2,56	3,56
Fraksi F	-17,44	-8,67	-6,67	4	4	7,44	10
Fraksi I	-8	-13	-10	6,89	3	5	-2

