

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

SKRIPSI



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

**UJI AKTIVITAS ANTIPROLIFERATIF EKSTRAK DAN
FRAKSI ETIL ASETAT 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

KARINA SAVITRI

12613322

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

YOGYAKARTA

DESEMBER 2016

SKRIPSI

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

Yang diajukan oleh:



Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Annisa Fitria., M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping,

Rochmy Istikharah, M.Sc., Apt

SKRIPSI

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

Oleh:

KARINA SAVITRI

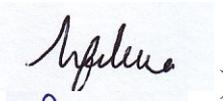
12613322

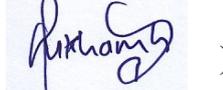
Telah lolos uji etik penelitian

Dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi

Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 21 Desember 2016

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

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

2. Prof. Dr. Ediati Sasmito, S.E., Apt ()

3. Hady Anshory T, S.Si., M.Sc., Apt ()

Mengetahui

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia


Drs. Aliwar, M.Sc., Ph.D
FAKULTAS MIPA

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu 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, 21 Desember 2016



KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji syukur alhamdulillah penulis panjatan ke hadirat Allah SWT karena atas berkat, rahmat, dan hidayahNya, serta shallawat serta salam kepada Baginda Rasulullah SAW., penulis mampu melaksanakan dan menyelesaikan penelitian skripsi dengan judul **“Uji Aktivitas Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Tumbuhan Paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav Terhadap Sel Kanker Payudara Sel MCF-7 dengan MTT Assay”**. Skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia. Skripsi ini saya persembahkan untuk kedua orang tua saya ayahanda Drs.H. Kamaluddin (Alm) dan ibunda Hj. Rustinah Rasyid,SH.

Skripsi ini dapat terwujud karena bimbingan, saran, dan dukungan berbagai pihak yang tidak bisa disebut satu persatu. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Ibu Annisa Fitria.,M.Sc., Apt selaku Pembimbing Utama atas segala kesabaran, waktu, saran, sumbangan pikiran, arahan serta bimbingan dalam penyusunan skripsi dari awal hingga akhir.
2. Ibu Rochmy Istikharah., M.Sc.,Apt selaku Pembimbing Pendamping yang telah memberikan pengarahan, masukan, motivasi dan perhatian sejak awal hingga akhir penelitian ini.
3. Bapak Drs. Allwar, M.Sc., Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
4. Bapak Pinus Jumaryatno, S.Si., M.Phil., Ph.D.,Apt selaku Ketua Program Studi Farmasi Universitas Islam Indonesia.
5. Ibu Asih Triastuti, M.Sc., Apt dan Ibu Chyntia Pradiftha Sari,M.Sc.,Apt selaku Dosen Pembimbing Akademik, terimakasih atas arahan dan bimbingan yang telah diberikan dari awal hingga akhir.
6. Laboran Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Islam Indonesia, Bapak Riyanto dan Mas Yon serta Laboran Laboratorium Parasitologi

Kedokteran Universitas Gadjah Mada Mbak Rumbiwati, terimakasih atas arahan dan pendampingan.

7. Keluarga besar Injunctio 2012, dan Farmasi E; Thea, Rina, Kartika, Esti, Istasya, Yuni, Dewi, dan Arin
8. Kakak-kakak ku tersayang Ahmad Wildy Haifan,S.T dan dr. Wilda Haliza,S. Ked., yang selalu menjadi panutanku terimakasih atas kasih sayang, semangat, doa, dan dukungannya.
9. Sahabat-sahabatku Aji Putri Cindy S., Dini Farida, Ignatia Andra Xaverya, Kinanti Chandra Kusumawardhani, Lionika Desilva dan Riska Gina Lathifa. Terimakasih atas canda tawanya dan kebersamaan dari SMA hingga di Jogja.
10. Teman-teman SMANSA 56 Jogjakarta, terimakasih atas canda tawanya.
11. Teman teman tim penelitian Maya Aulia dan Nita Trinovitasari atas motivasi dan kebersamaannya.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas bantuannya dalam proses penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh sebab itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk penyempurnaan penulisan selanjutnya. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan umumnya bagi pembaca.

Semoga Allah yang maha baik membalas semua kebaikan semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Dan semoga Allah selalu menyertai dan membimbing langkah kita dalam menuju kebenaran.

Yogyakarta, 8 November 2016

Penulis

Karina Savitri

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Perumusan 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 Flavonoid sebagai Agen Anti Kanker.....	6
2.1.3 Kanker.....	8
2.1.4 Kanker Payudara.....	10
2.1.5 Sel Kultur.....	11
2.1.6 Sel <i>Michigan Cancer Fondation-7</i>	11
2.1.7 Sel Vero.....	11
2.1.8 Maserasi dan Fraksinasi.....	12
2.1.9 <i>Vaccum Liquid Chromatography</i>	12

2.1.10 Aktivitas Antiproliferatif.....	13
2.1.11 MTT <i>assay</i>	13
2.1.12 Kerangka Teori Penelitian.....	15
2.2 Landasan Teori.....	16
2.3 Hipotesis.....	16
BAB III METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Jenis Penelitian.....	17
3.2 Lokasi Penelitian.....	17
3.3 Subjek Penelitian.....	17
3.4 Objek Penelitian.....	17
3.5 Instrumentasi Penelitian.....	17
3.5.1 Alat dan Bahan Penelitian.....	17
3.6 Cara Kerja.....	19
3.6.1 Penyiapan Sampel Tumbuhan <i>Dryopteris marginalis</i>	19
3.6.2 Pembuatan Reagen Uji.....	21
3.6.3 Analisis Kandungan Sisa Pelarut.....	21
3.6.4 Pembuatan Seri Kadar Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat.....	22
3.6.5 Kultur Sel.....	22
3.6.6 Uji Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi Tumbuhan <i>Dryopteris marginalis</i> terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 dan Sel Vero.....	23
3.6.7 Analisis Data IC ₅₀	24
3.7 Kerangka Umum Penelitian.....	25
3.8 Kerangka Konsep Penelitian.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1 Hasil Kaji Etik Penelitian.....	27
4.2 Hasil Identifikasi Tanaman.....	27
4.3 Hasil Pengeringan dan Penyerbukan.....	27
4.4 Hasil Ekstraksi Serbuk Tanaman <i>Dryopteris marginalis</i>	28
4.5 Hasil Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat <i>Dryopteris marginalis</i>	29

4.6 Hasil Uji Sisa Pelarut dalam Ekstrak Etil Asetat <i>Dryopteris marginalis</i>	35
4.7 Hasil Uji Aktivitas Antiproliferatif Sel MCF-7 dan Sel Vero.....	38
4.8 Uji Fitokimia Ekstrak dan Fraksi <i>Dryopteris marginalis</i>	44
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	52
Lampiran-lampiran.....	54



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Dryopteris marginalis</i> (L) Grav.....	5
Gambar 2.2 Kerangka Dasar Flavonoid.....	6
Gambar 2.3 Penggolongan Flavonoid.....	7
Gambar 2.4 Sel Kanker.....	9
Gambar 2.5 Reaksi MTT <i>assay</i>	14
Gambar 2.6 Kerangka Teori Penelitian.....	15
Gambar 3.1 Penampang <i>Haemocytometer</i>	23
Gambar 3.2 Kerangka Umum Penelitian.....	25
Gambar 3.3 Kerangka Konsep Penelitian.....	26
Gambar 4.1 Ekstrak Etil Asetat <i>Dryopteris marginalis</i>	28
Gambar 4.2 Proses Fraksinasi Ekstrak <i>Dryopteris marginalis</i>	30
Gambar 4.3 Hasil KLT Profil Kandungan Kimia Ekstrak.....	31
Gambar 4.4 Hasil Kromatogram Standard Etil Asetat <i>Dryopteris marginalis</i> GC-MS.....	36
Gambar 4.5 Hasil Kromatogram Ekstrak Etil Asetat GC-MS.....	37
Gambar 4.6 Hasil Kultur Sel MCF-7.....	39
Gambar 4.7 Hasil Kultur Sel Vero.....	39
Gambar 4.8 Grafik Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan persen Kematian Sel MCF-7.....	41
Gambar 4.9 Grafik Hubungan Konsentrasi Ekstrak dengan Persen Kematian Sel Vero.....	43
Gambar 4.10 Hasil Uji Fitokimia KLT Ekstrak <i>Dryopteris marginalis</i>	46
Gambar 4.11 Hasil Uji Fitokimia KLT Fraksi 1 dan 2 <i>Dryopteris marginalis</i>	47
Gambar 4.12 Hasil Uji Fitokimia KLT Fraksi 9 <i>Dryopteris marginalis</i>	48

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Perbandingan Fase Gerak n-Heksan:Etil Asetat.....	20
Tabel 3.2 Kategori nilai IC ₅₀ menurut <i>National Cancer Institute</i>	24
Tabel 4.1 Hasil Pemisahan Fraksinasi pada VLC.....	30
Tabel 4.2 Penggabungan Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat <i>Dryopteris marginalis</i>	32
Tabel 4.3 Hasil Uji Aktivitas Antiproliferatif terhadap Sel MCF-7.....	40
Tabel 4.4 Hasil Uji Aktivitas Antiproliferatif terhadap Sel Vero.....	41
Tabel 4.5 Hasil Uji Fitokimia KLT Ekstrak <i>Dryopteris marginalis</i>	46
Tabel 4.6 Hasil Uji Fitokimia KLT Fraksi 1 dan 2 <i>Dryopteris marginalis</i>	47
Tabel 4.7 Hasil Uji Fitokimia KLT Fraksi 9 <i>Dryopteris marginalis</i>	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 <i>Ethical Clearance</i>	54
Lampiran 2 Surat Determinasi Tanaman Paku <i>Dryopteris marginalis</i>	55
Lampiran 3 Kromatogram <i>Gas Chromatography</i> ekstrak etil <i>Dryopteris marginalis</i>	56
Lampiran 4 Hasil Uji Antiproliferatif Sel MCF-7 dan Sel Vero.....	60
Lampiran 5 Pola Platting Sel MCF-7 dan Sel Vero.....	62
Lampiran 6 Tabel Absorbansi, Persentase Kematian dan Grafik Sel MCF-7 & Sel Vero.....	66



**Uji Aktivitas Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Tumbuhan
Paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav Terhadap Kultur Sel Kanker Payudara
MCF-7 dengan MTT assay**

**Karina Savitri
Prodi Farmasi**

INTISARI

Dryopteris marginalis merupakan salah satu tumbuhan jenis paku pakuan yang masih belum banyak dicari manfaatnya dalam bidang kesehatan. Uji fitokimia ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* menunjukkan positif mengandung senyawa flavonoid dan steroid, yang berperan dalam aktivitas antiproliferatif pada jenis sel kanker payudara. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antiproliferatif dari ekstrak dan fraksi etil asetat *Dryopteris marginalis* terhadap sel kanker MCF-7 dan toksisitas terhadap sel Vero (sel normal) dengan metode MTT assay. Metode maserasi digunakan untuk menarik ekstrak dengan pelarut etil asetat, kemudian ekstrak difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum menggunakan perbandingan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol 100%. Potensi aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi etil asetat daun tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* terhadap sel kanker payudara MCF-7 dilihat dari kemampuan ekstrak dan fraksi membunuh sel kanker menggunakan metode MTT-Assay. Analisa hasil dilakukan dengan menentukan konsentrasi ekstrak dan fraksi yang mampu membunuh 50% sel kanker (IC₅₀) berdasarkan hasil pembacaan nilai absorbansi. Nilai IC₅₀ diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi linier dengan menghubungkan nilai logaritma konsentrasi sampel sebagai X dan nilai persentase kematian sel sebagai Y. Berdasarkan hasil yang diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antiproliferatif dengan nilai IC₅₀ sebesar 342,383 ppm dan memiliki toksisitas terhadap sel Vero dengan nilai IC₅₀ yang tidak dapat dikuantifikasi sebab memiliki nilai absorbansi rata-rata yang terlalu kecil hingga nilai IC₅₀ tidak dapat dikuantifikasi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* bersifat toksik terhadap sel MCF-7 maupun terhadap sel Vero (normal).

Kata Kunci: Paku-pakuan, *Dryopteris marginalis*, Flavonoid, MTT assay, MCF-7

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

ABSTRACT

Dryopteris marginalis is one type of ferns aren't sought after benefits in the health field. Phytochemical test the ethyl acetate extract *Dryopteris marginalis* showed positive contains flavonoids and steroids, which play a role in anti-proliferative activities on breast cancer cells. The aims of this study to determine anti-proliferative activity of extracts and fractions of ethyl acetate *Dryopteris marginalis* against cancer cells MCF-7 and toxicity to Vero cells (normal cells) by MTT assay method. Maceration method used to withdraw extract the solvent ethyl acetate, the extract was fractionated by column chromatography using a vacuum solvent with ratio of n-hexane, ethyl acetate, and 100% methanol. Potential anti-proliferative activity of ethyl acetate extracts and fractions fern leaves *Dryopteris marginalis* against breast cancer cells MCF-7 seen from the extracts and fractions abilities to kills cancer cells using MTT-Assay method. The results was determining the concentration of the extract and the fractions were able to kill 50% of cancer cells (IC_{50}) based on the results of the reading absorbance values. IC_{50} values obtained using the linear regression equation by connecting the log concentration of the sample as X and the percentage of cell death as Y. Based on the results obtained IC_{50} values the ethyl acetate extract has anti-proliferative activity with IC_{50} value of 342.383 ppm and has a toxicity to Vero cells with values IC_{50} which can not be quantified because it has an average absorbance values that are too small to IC_{50} value can not be quantified. It can be concluded that the ethyl acetate extract *Dryopteris marginalis* toxic to MCF-7 cells as well as the Vero cells (normal)

Key Words : Ferns, *Dryopteris marginalis*, Flavonoids, MTT assay, MCF-7

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan penyakit yang tidak menular disebabkan mutasi pada sel tubuh⁽¹⁾. Penyakit ini dikarakteristikan dengan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol serta bersifat abnormal. Kanker payudara merupakan penyakit dengan insidensi tinggi di Indonesia dengan jumlah sekitar 61.682 penderita di Indonesia pada tahun 2013. Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) mengungkapkan prevalensi rawat inap tertinggi di Rumah Sakit di Indonesia adalah jenis kanker payudara yaitu sebanyak 18,4% yang kemudian disusul oleh kanker leher rahim 10,3%⁽²⁾. Data dari Rumah Sakit Kanker Dharmais selama 4 tahun berturut-turut (2010-2013), menyatakan bahwa jumlah kasus kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker terbanyak di RS Kanker Dharmais dengan jumlah kasus baru serta jumlah kematian akibat kanker payudara terus meningkat. Tahun 2013, kota D.I. Yogyakarta menjadi prevalensi tertinggi penderita kanker payudara dengan jumlah kasus sebanyak 4.325 atau sebesar 2,4%. 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⁽³⁾. Berbagai usaha telah dilakukan dunia medis untuk menurunkan angka kematian melalui usaha pengobatan yang terus berkembang seperti pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi meskipun pada teknik pengobatan tersebut memiliki kekurangan. Tingginya angka kejadian kanker payudara menuntut untuk ditemukannya obat atau terapi baru terkait terapi kanker payudara.

Indonesia terkenal dengan kekayaan tumbuhan yang masih belum banyak dicari kemanfaatannya bagi manusia. Jenis tumbuhan di Indonesia diperkirakan berjumlah sekitar 28.000 jenis atau lebih dari 10% dari flora dunia. Tumbuhan paku (*Pteridophyta*) merupakan salah satu golongan tumbuhan yang hampir dapat dijumpai pada setiap wilayah di Indonesia⁽⁴⁾. Tumbuhan paku mengandung

berbagai metabolit sekunder antara lain golongan alkaloid, tanin, flavonoid, asam amino, steroid, saponin, terpenoid, dan antrakuinon⁽⁵⁾.

Flavonoid yang terkandung dalam tanaman paku dapat menginduksi sinyal apoptosis pada mitokondria. Jenis flavonoid yang berperan dalam antiproliferatif sel MCF-7 antara lain flavan, flavon, dan kuercetin. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa flavonoid dalam tanaman Putri Malu, Lidah Buaya, dan Meniran dapat menghambat pertumbuhan sel MCF-7 dengan nilai IC₅₀ Putri Malu sebesar 35,52 ppm, Lidah Buaya sebesar 54,97 ppm, dan Meniran sebesar 84,88 ppm. Flavonoid yang terkandung dalam buah Beri dan Leci memiliki juga aktivitas antiproliferatif pada sel MCF-7. Sedangkan pada uji aktivitas *in vitro* senyawa flavonoid fraksi etil asetat akar tumbuhan Tunjuk Langit (*Helminthostachis zeylanica*) didapatkan hasil uji antikanker dengan bioassay didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 2,4µg sehingga dapat dikatakan bahwa flavonoid berperan penting dalam penghambatan proliferasi sel kanker. Tumbuhan paku famili *Driopteridaceae* spesies *Dryopteris fragrans*, *Dryopteris erythrosora* dan *Dryopteris viilarii* memiliki aktivitas inhibisi sel kanker MCF-7⁽⁶⁾. Tumbuhan paku spesies *Dryopteris marginalis* (L) Grav berpotensi sebagai agen antikanker menjadi latar belakang peneliti untuk melakukan uji aktivitas antiproliferatif. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi etil asetat *Dryopteris marginalis* terhadap sel MCF-7, yakni sel kanker yang memiliki karakteristik sama dengan epitel payudara terkait dengan produksi estrogen dalam bentuk estradiol di dalam sitoplasma. Sel Vero digunakan sebagai kontrol 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 etil asetat *Dryopteris marginalis* sebagai agen antiproliferatif pada sel kanker payudara MCF-7 dan toksisitasnya terhadap sel Vero (sel normal), sehingga penelitian ini dapat berkontribusi dalam penemuan obat terbaru pada terapi kanker payudara.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah ekstrak dan fraksi etil asetat tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7?
2. Apakah ekstrak dan fraksi etil asetat tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap kultur sel Vero?

1.3 Tujuan Penelitian

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

1.4 Manfaat Penelitian

1. Masyarakat : Penelitian ini dapat berkontribusi sebagai pengetahuan yang baru bagi masyarakat luas akan penggunaan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis*.
2. Bidang kesehatan: Penelitian ini dapat berkontribusi dalam pengembangan ilmu kesehatan khususnya sebagai agen antikanker khususnya kanker payudara.
3. Ilmu Pengetahuan: Penelitian ini dapat berkontribusi dalam pengembangan penemuan obat anti kanker payudara.

BAB II STUDI PUSTAKA

2.1 Tinjauan Pustaka

2.1.1 *Dryopteris marginalis* (L) Grav.

Klasifikasi tumbuhan Paku (*Dryopteris marginalis*):

Kerajaan : Plantae
Divisi : Pteridophyta
Kelas : Pteridopsida
Ordo : Polypodiales
Keluarga : Dryopteridaceae
Genus : *Dryopteris*
Spesies : *Dryopteris marginalis* (L.) A. Grav⁽⁸⁾

Tanaman paku *Dryopteris marginalis* (gambar 2.1) tampak depan memiliki daun berbentuk lonjong lanset dan bergerigi yang berwarna hijau terang sampai gelap atau hijau kebiruan, selain itu daun terasa kasar dengan panjang mencapai 15-20". Tanaman paku *Dryopteris marginalis* memiliki tinggi 70 cm dengan lebar 20 cm. Pada gambar 2.1, terlihat spora yang terletak di belakang daun dengan sorus terletak ditepi atau margin dari sisi bawah pinnule, selain itu tinggi tanaman ini dapat mencapai 1,5-2 feet. *Dryopteris marginalis* yang dikenal dengan perisai pakis marjinal atau pakis kayu marjinal tumbuh di daerah yang lembab maupun daerah berbatuan yang tidak mengandung kapur. Penyebarannya sendiri berada di negara Amerika, benua Australia dan beberapa negara di Asia Tenggara salah satunya Indonesia⁽⁹⁾.

Tumbuhan Paku (Pteridophyta) atau nama populernya di Indonesia adalah tanaman Pakis merupakan tumbuhan purba yang masih dapat tumbuh dengan subur hingga saat ini memiliki manfaat yang sangat menguntungkan bagi kehidupan manusia⁽⁴⁾. *Dryopteris marginalis* merupakan salah satu spesies tanaman paku dari 1.300 spesies tanaman paku yang dapat ditemui di Indonesia. Tanaman ini tumbuh subur secara liar di hutan maupun di pinggir jalan. Seperti jenis tanaman tanaman

paku lainnya, tanaman paku *Dryopteris marginalis* hingga saat ini belum banyak terlihat pemanfaatannya khususnya dalam bidang kesehatan.

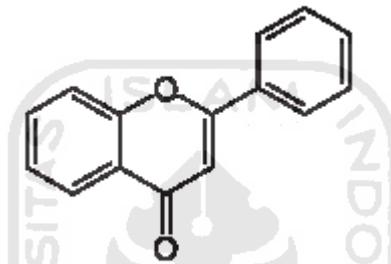


Gambar 2.1 *Dryopteris marginalis* (L) Grav

Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman paku antara lain terpenoid, saponin, steroid, fenilpropanoid, poliketida, flavonoid, alkaloid, stilben, santon turunan asam benzoat, lipid dan senyawa belerang, metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman paku ini dapat berpotensi sebagai pengembangan obat dari beberapa penyakit tertentu, salah satunya dapat menjadi obat antikanker⁽⁵⁾. Tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav, merupakan salah satu jenis spesies dari tanaman paku-pakuan yang ketersediaannya sangat melimpah di Indonesia. Berdasarkan hasil uji pendahuluan dengan pereaksi *Liebermann Burchard* ekstrak n-heksan daun tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* mengandung senyawa steroid, yang ditandai dengan perubahan warna yang terjadi yakni setelah ditetaskan dengan reagen larutan tanaman paku *Dryopteris marginalis* menjadi berwarna biru hijau kebiruan yang berdasarkan literatur menyatakan kandungan steroid dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna pada larutan uji menjadi hijau kebiruan sehingga dapat disimpulkan bahwa tanaman paku *Dryopteris marginalis* positif mengandung senyawa steroid⁽¹⁰⁾. Pereaksi *Liebermann Burchard* merupakan campuran antara asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat yang digunakan untuk mendeteksi adanya kandungan steroid pada ekstrak.

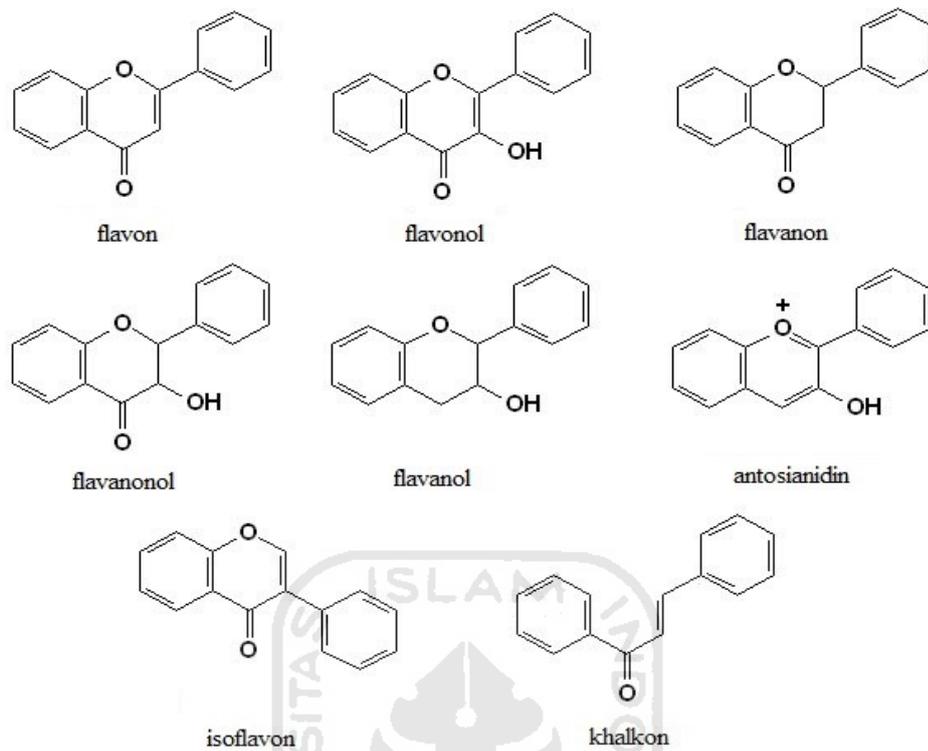
2.1.2 Flavonoid Sebagai Agen Anti Kanker

Flavonoid telah dikenal sebagai produk hasil alam dengan efek yang menguntungkan bagi kesehatan pertama kali ditemukan oleh Albert Szent Gyorgyi, pada tahun 1930. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, buah, dan biji. Pada tanaman, flavonoid berfungsi memberi warna kuning pada bunga dan buah. Inti dasar flavonoid tersusun atas konfigurasi $C_6-C_3-C_6$ (gambar 2.2) yakni 2 cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan 3 karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga⁽¹¹⁾.



Gambar 2.2 Kerangka dasar Flavonoid⁽¹¹⁾

Penggolongan jenis flavonoid dalam jaringan tumbuhan mula-mula didasarkan pada telaah sifat kelarutan dan reaksi warna, diikuti dengan pemeriksaan ekstrak tumbuhan sebelum dan sesudah hidrolisis, secara kromatografi satu arah dan pemeriksaan ekstrak etanol secara dua arah. Perbedaan penggolongan didalam kelompok flavonoid dibedakan dengan penambahan rantai oksigen heterosiklik dan gugus hidroksil. Senyawa flavonoid meliputi katekin, leukoantosianidin, flavanon, flavanonol, flavon, antosianidin, flavonol, khalkon, auron, dan isoflavon



Gambar 2.3 Penggolongan Flavonoid⁽¹¹⁾

Pada ekstraksi awal tanaman paku dilakukan dengan pelarut n-heksan yang dilakukan untuk membebaskan bahan tanaman dari sterol, karoten, dan klorofil. Aglikon flavonoid secara umum larut dalam eter, sedangkan glikosida terlarut dalam etil asetat. Glikosida yang mengikat lebih dari satu molekul gula akan larut dalam campuran air dan alkohol⁽¹²⁾. Flavonoid merupakan senyawa polar sehingga dapat terlarut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol (MeOH), butanol aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid menyebabkan flavonoid mudah larut dalam air. Aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform⁽¹³⁾.

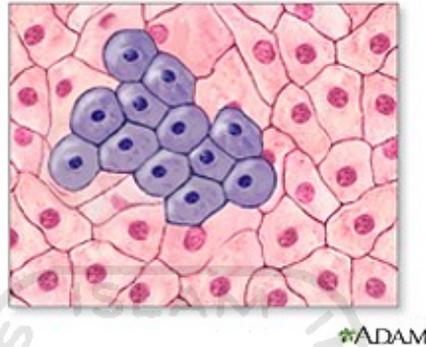
Flavonoid berkontribusi besar dalam pengembangan obat-obatan anti kanker. Beberapa penelitian sebelumnya juga menyatakan bahwa flavonoid memiliki aktivitas anti kanker khususnya pada sel MCF-7 seperti terdapat pada buah Leci⁽¹⁴⁾, buah beri⁽¹⁴⁾, dan ekstrak spesies *Marrubium persicum*⁽¹⁵⁾ adalah salah satu dari sekian banyak buah-buahan maupun tanaman bermetabolit sekunder

flavonoid yang memiliki aktivitas antikanker pada sel MCF-7. Penelitian isolasi flavonoid yang bersumber dari tanaman putri malu, meniran, dan lidah buaya juga memiliki potensi yang besar dalam penghambatan proliferasi sel kanker MCF-7 dengan di dapatkan nilai IC_{50} dari masing masing tanaman Putri Malu sebesar 35,52 ppm, lidah buaya sebesar 54,96 ppm, dan meniran sebesar 84,88 ppm sehingga kandungan flavonoid dalam tanaman putri malu memiliki potensi yang besar dalam penghambatan sel MCF-7 di dibandingkan dengan lidah buaya dan meniran. Hal ini diperkirakan tanaman putri malu memiliki kandungan flavonoid yang paling aktif dibandingkan dengan kedua tanaman yang lainnya. Sedangkan pada uji aktivitas *in vitro* senyawa flavonoid fraksi etil asetat akar tumbuhan Tunjuk Langit (*Helmynthostachis zeylanica*) didapatkan hasil uji antikanker dengan bioassay didapatkan nilai IC_{50} sebesar 2,4 μ g sehingga dapat dikatakan bahwa flavonoid berperan penting dalam penghambatan proliferasi sel kanker⁽¹⁶⁾. Flavonoid memiliki aktivitas antikanker seperti; menghambat pertumbuhan sel kanker, menghambat aktivitas protein kinase, menginduksi apoptosis, menginhibisi sekresi MMP, menginhibisi invasi sel tumor, menginhibisi adhesi sel, dan juga sebagai antiangiogenik. Isoflavonoid diketahui dapat menginhibisi pertumbuhan kanker khususnya kanker payudara dan memiliki efek bifasik pada proliferasi sel kanker payudara⁽⁶⁾.

2.1.3 Kanker

Kanker merupakan tergolong penyakit yang tidak menular dengan jumlah kelompok penyakit dengan lebih dari 100 jenis yang dikarakteristikkan dengan pertumbuhan sel yang secara cepat dan tidak terkontrol, dapat berinvasi pada jaringan lokal namun dapat bermetastasis (menyebar) ke jaringan yang lain⁽¹⁸⁾. Adanya mutasi pada rantai DNA pada satu sel dapat menyebabkan kanker. Normalnya tubuh akan membentuk sel-sel yang baru sesuai dengan kebutuhan tubuh itu sendiri yang akan menggantikan sel yang telah lama. Sel normal akan berhenti membelah saat terdapat sinyal 'stop' dari sel lainnya. Namun terkadang pada saat sintesis DNA sedang berlangsung terdapat kesalahan atau mutasi pada DNA yang pada ujungnya akan menyebabkan tumor. Perubahan tersebut disebabkan adanya perubahan atau transformasi genetik, terutama pada gen-gen

yang mengatur pertumbuhan, yaitu protoonkogen dan gen penekan tumor. Sel kanker akan terus aktif membelah dengan cepat hingga sel tersebut membentuk jaringan baru yang berbeda terhadap jaringan normal, organ maupun sel-sel normal (gambar 2.4). Tumor pada dasarnya dapat berproliferasi menjadi tumor jinak maupun tumor ganas⁽¹⁹⁾.



Gambar 2.4 Sel Kanker

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian paling utama di dunia, kanker menjadi penyebab kematian sekitar 8,2 juta orang menurut data dari WHO, diperkirakan setiap tahun 12 juta orang di seluruh dunia menderita kanker dan 7,6 juta diantaranya meninggal dunia. Diprediksi bahwa tingkat kejadian penderita kanker dan kematian akibat kanker akan terus meningkat, selain itu dinyatakan pula bahwa kejadian tersebut akan terjadi lebih cepat di negara miskin dan berkembang. Menurut data dari departemen kesehatan Indonesia pada tahun 2013, prevalensi penderita kanker pada penduduk semua umur di Indonesia sebesar 1,4%⁽³⁾. Faktor risiko yang dapat berpotensi untuk terkena kanker antara lain kebiasaan merokok, kebiasaan mengonsumsi alkohol, faktor diet termasuk kekurangan konsumsi sayuran dan buah, overweight dan obesitas, kurangnya aktivitas fisik, infeksi, radiasi, faktor lingkungan dan pekerjaan seperti radiasi sinar UV dan cemaran logam berat⁽¹⁾.

Pada satu batang rokok mengandung campuran lebih dari 7.000 bahan kimia dan substansi racun dan lebih dari 70 senyawa yang terdapat di rokok yang dapat menyebabkan mutagen atau karsinogen, yang biasa disebut dengan aromatik hidrokarbon seperti benzo(a)pyrene (BAP), tar, arsenic, benzene, cadmium, formaldehid, nitrosamin dan logam berat (nikel, cobalt, dan berilium). Senyawa

tersebut ketika masuk kedalam tubuh dapat memutasi atau mempengaruhi dari DNA yang akan membentuk sel-sel yang baru yang bersifat abnormal sehingga kebiasaan merokok erat kaitannya dengan kanker, utamanya dengan kanker paru-paru⁽²⁰⁾. Berbagai metode yang dapat digunakan guna menyembuhkan kanker, antara lain metode pembedahan, penyinaran, kemoterapi, dan imunoterapi namun pada metode ini terdapat kelemahan sehingga tingkat keberhasilan dalam terapi kanker masih rendah. Sebagian besar tumor tidak merespon pada obat-obatan terapan/sitotoksik maupun radioterapi⁽¹⁷⁾.

2.1.4 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan kanker yang paling mengancam khususnya pada kaum wanita. Sekitar 1,7 juta wanita didiagnosa menderita kanker payudara hingga menyebabkan kematian. Berdasarkan data yang dilaporkan IARC (*International Agency for Research on Cancer*) pada tahun 2013, penderita kanker payudara di Indonesia mencapai 25.208 penderita per 100.000 jiwa dan sebanyak 43% penderita kanker payudara ini mengalami kematian, hingga tahun 2013, terdapat sekitar 61.682 kasus pada kanker payudara di Indonesia⁽⁶⁾. Tes yang dapat dilakukan pada penderita kanker payudara antara lain HER2/neu test, reseptor estrogen maupun progesteron.

Sebanyak 30% kasus kanker payudara disebabkan oleh ekspresi berlebih *Human Epidermal Receptor-2* (HER-2). Reseptor HER-2 merupakan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dalam jumlah yang berlebih mampu mempengaruhi proliferasi sel tumor secara terus menerus hingga menyebabkan kanker payudara. Adanya ekspresi berlebih reseptor HER-2 pada kanker payudara mampu meningkatkan progresi sel tumor dan resistensinya terhadap agen kemoterapi. Oleh karena itu, penghambatan terhadap ekspresi reseptor HER-2 menjadi sangat penting⁽¹⁸⁾. Agen kemoterapi yang biasa diberikan sebagai penghambat reseptor HER-2 adalah Trastuzumab, dengan mekanisme menghambat HER-2 yang ekspresinya berlebih dapat dihambat oleh Trastuzumab yang menginduksi sel untuk kembali membelah normal dengan memodulasi proangiogenik dan faktor antiangiogenik. Pada hasil penelitian yang telah dihasilkan menunjukkan bahwa trastuzumab dapat berpotensi sebagai agen tunggal dalam pemberian terapi

kemoterapi konvensional pada pasien dengan kanker payudara. Sel payudara normal mengandung reseptor yang menangkap estrogen dan progesteron. Kedua hormon ini merupakan bahan untuk pertumbuhan pada sel kanker payudara⁽¹⁹⁾.

2.1.5 Sel Kultur

Sel kultur merupakan sel yang dapat hidup secara *in vitro* dan masih memiliki sifat-sifat yang masih mirip dengan sel asalnya. Sel kultur dapat pula diambil dari jaringan asal ataupun memperbanyak sel yang sudah ada. Menggunakan teknik sel kultur ini dapat digunakan untuk bermacam penelitian seperti aktivitas intraseluler, interaksi antar sel dan lainnya. Kelebihan dari sel kultur ini adalah mudah dikontrol fisikokimia lingkungan (pH, suhu, tekanan oksigen, dan CO₂) yang dapat dikontrol, ekonomis karena tidak menggunakan hewan coba, mudah dilakukan perlakuan, memiliki replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta dapat dengan mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi. Pada saat melakukan kultur sel, teknik aseptik harus terjaga dan terkontrol dengan baik⁽²⁰⁾.

2.1.6 Sel *Michigan Cancer Foundation-7*

Sel *Michigan Cancer Foundation-7* atau yang dikenal dengan sel MCF-7 adalah jenis sel adenokarsinoma payudara manusia dan telah digunakan secara luas dalam penelitian terkait dengan reseptor estrogen. Sel MCF-7 diambil dari jaringan payudara wanita Kaukasian berumur 69 tahun dengan golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS) 10% dan antibiotik *Penicillin-Streptomycin* 1%. Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi, mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- α), resisten terhadap doxorubicin dan tidak mengekspresikan caspase-3⁽²¹⁾.

2.1.7 Sel Vero

Sel Vero merupakan salah satu jenis sel normal yang banyak di kultur dan digunakan dalam berbagai jenis penelitian, khususnya penelitian dalam bidang biologi molekuler, mikrobiologi, maupun uji sitotoksik. Sel Vero dapat digunakan pada uji penyakit kronik. Hal ini dikarenakan sifat sel yang mampu bereplikasi tidak terbatas atau dapat diperbanyak (*Continuous cell line*) dari sel induk secara *in vitro*.

Salah satu contoh penggunaan sel ini adalah pembuatan vaksin. Sel ini pertama di isolasi dari jaringan ginjal monyet Afrika (*Cercopithecus aethiops*) pada tahun 1960 dan pertama kali dikultur pada tahun 1962 di Universitas Chiba, Jepang⁽²³⁾.

Sel Vero merupakan sel yang berbentuk *monolayer* dan termasuk *epithelial-like*. Sel ini menempel dengan kuat pada lapisan substrat yang berbahan polistiren dan membentuk ikatan kovalen yang kuat. Pada gambar mikroskopik sel Vero terlihat bahwa sel Vero berbentuk poligonal dan pipih⁽²²⁾.

2.1.8 Maserasi dan Fraksinasi

Maserasi merupakan salah satu teknik ekstraksi yang sederhana, istilah *maseration* berasal dari bahasa Latin *Macere* yang artinya merendam jadi. Maserasi dapat diartikan sebagai proses dimana serbuk tanaman yang sudah halus dapat memungkinkan untuk direndam dalam pelarut hingga meresap dan melunakkan susunan sel serbuk tumbuhan sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut pada pelarut yang sesuai dengan prinsip "*like dissolve like*". Cairan penyarian masuk kedalam sel melalui dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang berkonsentrasi tinggi akan mendesak keluar dan diganti oleh penyari dengan konsentrasi rendah, hasil akhir dari maserasi adalah di dapatkan maserat/ekstrak. Maserasi dilakukan pada suhu ruang dalam waktu 3 hari hingga bahan benar-benar melarut sesekali di aduk⁽²³⁾.

Fraksinasi adalah suatu metode pemisahan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Jumlah dan senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi berbeda-beda tergantung pada jenis tumbuhan. Pada penelitian ini dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom atau *Vaccum Liquid Chromatography*. Pemisahan yang terjadi pada kolom didasarkan pada sifat kepolaran pada setiap pelarut organik. Hasil akhir dari fraksinasi adalah didapatkan fraksi yang akan di pisahkan sesuai dengan tingkat kepolarannya⁽²³⁾.

2.1.9 *Vaccum Liquid Chromatography*

Metode VLC atau *Vaccum Liquid Chromatography* merupakan metode yang dikembangkan dari metode kromatografi kolom sederhana yang memiliki kekurangan pada waktu pemisahannya. Kelebihan dari tehnik pemisahan ini juga

diketahui dapat memisahkan komponen senyawa dengan baik, serta kromatografi kolom vakum dapat digunakan sampel dengan jumlah dibawah satu gram. Fase diam yang digunakan adalah silika gel yang diisi ke dalam kolom dengan bantuan pompa vakum untuk mempercepat proses elusi dan sistem elusi fase gerak berdasarkan gaya gravitasi. Metode VLC cenderung baik untuk fraksinasi dan memakan waktu yang tidak lama pula. Metode ini dapat dikatakan cukup efisien dari segi waktu, jumlah penyerap, jumlah eluen, dan ideal untuk sampel dengan jumlah kecil⁽²⁴⁾.

2.1.10 Aktivitas Antiproliferatif

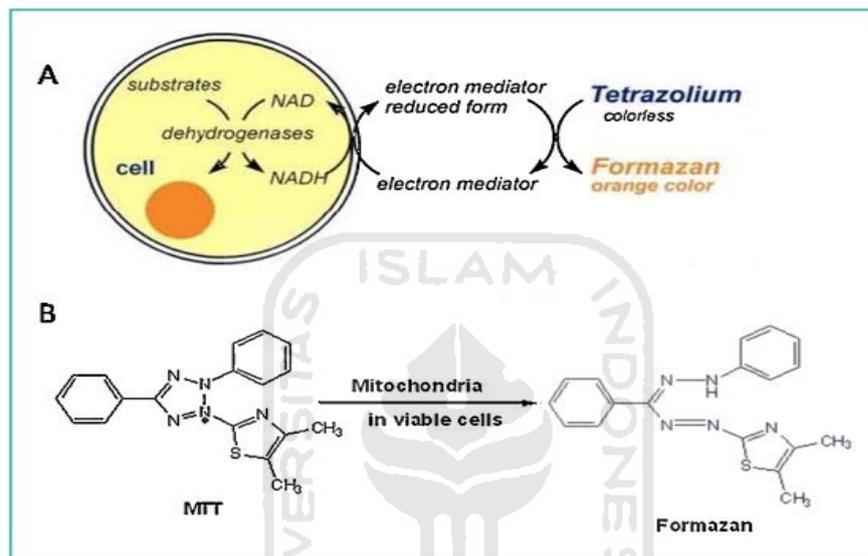
Proliferasi merupakan suatu pertumbuhan atau perkembangbiakan sel secara pesat untuk menghasilkan jaringan baru, bagian sel, maupun keturunan. Suatu senyawa yang dapat menghentikan proses tersebut melalui berbagai mekanisme disebut sebagai senyawa yang memiliki aktivitas antiproliferatif sel. Aktivitas ini dilihat berdasarkan jumlah sel setelah pemberian senyawa tersebut. Salah satu metode yang diketahui dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel hidup sehingga dapat diketahui ada tidaknya aktivitas antiproliferatif adalah metode MTT *assay*⁽²⁵⁾.

2.1.11 MTT *assay*

MTT *assay* merupakan metode yang digunakan dalam penelitian agen antikanker. Metode ini digunakan untuk menguji aktivitas sitotoksik sampel penelitian pada kultur sel yang di gunakan. Prinsip dari metode ini adalah reaksi redoks yang terjadi di dalam sel. Terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase.

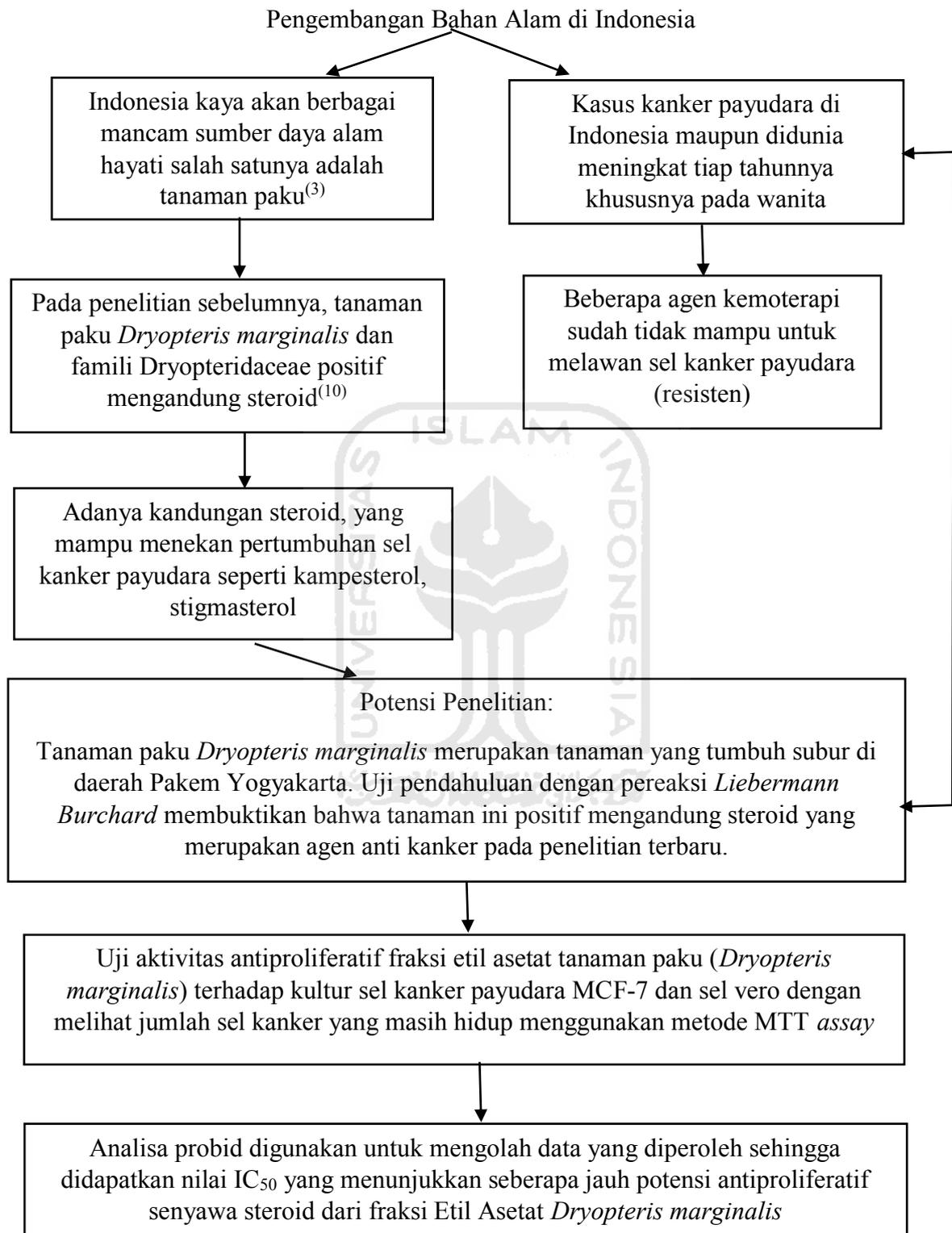
Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu yang terlarut dalam PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Reaksi dibiarkan terjadi selama 4 jam kemudian ditambahkan reagen stopper. Reagen stopper tersebut dapat melisiskan membran sel sehingga garam formazan dapat keluar dari sel, serta melarutkan garam formazan. Garam formazan yang terbentuk dikuantifikasi melalui nilai absorbansi menggunakan *microtiter plate reader* pada kisaran panjang gelombang antara 500nm hingga 600 nm. Garam formazan yang dihasilkan dalam

bentuk kristal, sehingga sebelum dilakukan perhitungan nilai absorbansi perlu diberikan reagen *stopper* SDS 10% (*Sodium Deodecyl Sulphate*) yang berfungsi untuk menghentikan reaksi MTT dan melarutkan kristal formazan kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*⁽²⁶⁾. Kuantifikasi kristal dapat dilihat dari intensitas warna ungu yang terbentuk dari kristal formazan berdasarkan nilai absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak sel yang hidup⁽²⁷⁾.



Gambar 2.5 Reaksi MTT assay⁽²⁸⁾

2.12 Kerangka Teori Penelitian



Gambar 2.6 Kerangka Teori Penelitian

2.2 LANDASAN TEORI

Pemanfaatan sumber bahan alam khususnya tanaman paku dirasa masih sangat kurang. Beberapa penelitian mengemukakan bahwa tanaman paku memiliki metabolit sekunder yang berpotensi sebagai bahan baku obat. Metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman paku antara lain golongan terpenoid, steroid, fenil propanoid, poliketida, flavonoid, alkaloid, stilben, santon, turunan asam benzoat, lipid dan senyawa belerang. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa tanaman paku *Dryopteris marginalis* positif mengandung steroid yang dapat berpotensi sebagai agen anti kanker. Flavonoid memiliki peran dalam menghambat pertumbuhan sel, menghambat aktivitas protein kinase, menginduksi apoptosis, menginhibisi sekresi MMP, serta sebagai anti-angiogenik sel sebagai salah satu senyawa bioaktif untuk antikanker karena senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan, yakni flavon, flavonol, isoflavon, dan khalkon.

Tanaman paku famili Driopteridaceae pada spesies *Dryopteris erythrosora*, *Dryopteris fragrans* memiliki aktivitas inhibisi sel kanker MCF-7. Pada penelitian sebelumnya, dilakukan uji antiproliferatif tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* dengan menggunakan ekstrak n-heksan, dan didapatkan ekstrak n-heksan tanaman paku dapat menginhibisi pertumbuhan sel kanker MCF-7. Fraksinasi dilakukan selain sebagai keterbaruan dalam penelitian ini juga untuk mengetahui kandungan senyawa yang aktif dalam aktivitas antiproliferatif MCF-7 serta toksisitas terhadap sel Vero. Pengujian terhadap sel Vero dilakukan untuk mendapatkan bukti ilmiah terhadap keamanan aktivitas antikanker ekstrak dan fraksi etil asetat *Dryopteris marginalis* terhadap sel normal manusia sehingga semakin berpotensi untuk dikembangkan menjadi bahan antikanker alami

2.3 HIPOTESIS

Berdasarkan landasan teori yang telah dipaparkan, dapat disimpulkan sebuah hipotesa bahwa ekstrak dan fraksi etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav. memiliki aktivitas antiproliferatif pada kultur sel kanker payudara MCF-7 tanpa mempengaruhi proliferasi pada sel Vero.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental karena menguji aktivitas antiproliferatif dari ekstrak dan fraksi etil asetat 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 dan Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.3 Subjek Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etil asetat serta fraksi etil asetat dari tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* sebagai senyawa antikanker.

3.4 Objek Penelitian

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

3.5 Instrumentasi Penelitian

3.5.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

1. Alat yang diperlukan dalam ekstraksi:
Seperangkat alat gelas, penyerbuk, seperangkat alat penyari, *Rotary evaporator*, dan oven.
2. Alat yang digunakan dalam fraksinasi:
Kolom kromatografi *Vaccum Liquid Chromatography*, alat-alat gelas, lampu UV₂₅₄ dan lampu UV₃₆₀ dan flakon
3. Alat yang diperlukan untuk memeriksa kandungan kimia :
Lempeng silika gel GF 254, alat-alat gelas, *chamber*, pipa kapiler, dan kertas saring.

4. Alat yang digunakan dalam uji antiproliferatif :

Alat-alat gelas steril, autoklaf, Inkubator CO₂ (Inc 2 Memmert), tanki nitrogen cair (Cryolab 35), *laminar air flow cabinet* (LAF) (Lab Konko), *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*.

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

1. Bahan Uji

Ekstrak etil asetat, dan fraksi etil asetat dari daun tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* yang diambil pada bulan Maret dari tanaman yang tumbuh di daerah Pakem, Kaliurang KM 20.

2. Sel Uji

Sel uji yang digunakan dalam uji antiproliferatif ini adalah sel kanker payudara MCF-7 dan sel Vero yang diperoleh dari stok Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM.

3. Bahan Kimia yang Digunakan

Bahan untuk ekstraksi dan fraksinasi:

n-Heksan, etil asetat, metanol, serbuk silika gel 60, silika gel 60 GF 254, kertas saring, dan Akuades.

Bahan untuk uji antiproliferatif:

Akuades, antibiotik Penisilin Streptomisin 1% v/v, asam klorida (HCl), *blue tip*, DMSO 0,2% , etanol 70%, FBS (*Fetal Bovine Serum*), Fungison (Gibco), HEPES (*N-2hidroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonic acid*), kalium fosfat (KH₂PO₄), kalium klorida (KCl), media pertumbuhan DMEM, media pertumbuhan M199, reagen MTT, n-heksana, natrium bifosfat (Na₂HPO₄), natrium bikarbonat (NaHCO₃), natrium klorida (NaCl), PBS (*phosphat buffer saline*), SDS (*sodium dodecyl sulphate*) 10% dalam HCl 0,01 N, Tripsin 0,025%, *white tip*, *yellow tip*.

3.6 Cara Kerja

3.6.1 Penyiapan Sampel Tumbuhan *Dryopteris marginalis*

1. Preparasi Sampel Tumbuhan *Dryopteris marginalis*

Tanaman paku *Dryopteris marginalis* yang digunakan dalam penelitian telah dideterminasi di Laboratorium Sistematika Tanaman Fakultas Biologi Universitas Gadjah mada.

2. Ekstraksi Serbuk Kering Tumbuhan *Dryopteris marginalis*

Sebanyak 140 gram serbuk daun tanaman paku *Dryopteris marginalis* di ekstrak dengan menggunakan metode maserasi bertingkat dari pelarut non polar hingga semi polar hingga jernih. Setelah didapatkan ekstrak dari pelarut n-heksan lalu dilanjutkan dengan pelarut kedua etil asetat, dengan prinsip yang sama yakni serbuk tanaman paku direndam dengan pelarut etil asetat selama 3 hari sesekali diaduk. Hal ini dilakukan agar senyawa-senyawa yang bersifat non polar dapat terlarut sempurna dalam pelarut n-heksan, sebab etil asetat dapat melarutkan sebagian senyawa-senyawa non polar. Setelah didapatkan ekstrak etil asetat, larutan kemudian diuapkan dengan menggunakan *Rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat *Dryopteris marginalis* dan dihitung rendemennya⁽¹⁰⁾.

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk simplisia}} \times 100\%$$

3. Fraksinasi Ekstrak Kental Tumbuhan *Dryopteris marginalis*

Penyiapan kolom *Vaccum Liquid Chromatography* dibuat dengan cara pencampuran sebanyak 1 gram serbuk silika gel di campurkan dengan 1 gram ekstrak etil asetat tanaman paku. Ditimbang sebanyak 20 gram silika gel dan dimasukkan ke dalam kolom kemudian di masukkan serbuk silika gel yang telah diimpregnasi dengan ekstrak tanaman paku, lalu dilakukan fraksinasi dengan menggunakan perbandingan pelarut *n*-Heksan : Etil Asetat dengan (tabel 3.1) menggunakan *Vaccum Liquid Chromatography* (VLC) yang kemudian fraksi-fraksi tersebut dikoleksi dan dijadikan bahan uji pada sel kanker MCF-7 dan sel Vero.

Tabel 3.1 Perbandingan fase gerak n-Heksan : Etil Asetat

<i>n</i> -Heksan (ml)	Etil Asetat (ml)
10	0
8	2
7	3
5	5
3	7
2	8
0	10

4. Pengujian Steroid

Ekstrak etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis* kental kemudian dianalisis kandungan pada tanaman paku dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan pereaksi *Liebermann Burchard*. Ekstrak kemudian di elusi menggunakan perbandingan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (6:4). Setelah terelusi sempurna kemudian lempeng KLT di semprot dengan reagen *Liebermann Burchard* dan lempeng KLT kemudian dianalisis pada sinar tampak, diamati jika ada perubahan warna pada lempeng KLT⁽³⁰⁾.

5. Pengujian Alkaloid

Ekstrak etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis* kental kemudian dianalisis kandungan pada tanaman paku dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan pereaksi Dragendroff. Ekstrak kemudian di elusi menggunakan perbandingan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (6:4). Setelah terelusi sempurna kemudian di semprot dengan reagen Dragendroff dan kemudian lempeng KLT dianalisis dengan menggunakan sinar tampak. Serta diamati jika ada perubahan warna pada lempeng KLT⁽³⁰⁾.

6. Pengujian Flavonoid

Ekstrak etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis* kental kemudian dianalisis kandungan pada tanaman paku dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan pereaksi AlCl₃. Ekstrak kemudian di elusi menggunakan perbandingan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (6:4). Setelah terelusi sempurna kemudian di semprot dengan reagen AlCl₃ dan

kemudian lempeng KLT dianalisis di lampu UV₂₅₄ dan UV₃₆₆. Serta diamati jika ada perubahan warna pada lempeng KLT⁽²⁹⁾.

3.6.2 Pembuatan Reagen Uji

1. Pembuatan Reagen *Dragendroff*

Sebanyak 8 gram Bi(NO₃)₃, H₂O dilarutkan dalam 30% b/v HNO₃ dan 27,2 gram KI dilarutkan dalam 50 ml air, lalu kedua larutan tersebut dicampurkan dan dibiarkan selama 24 jam, saring lalu ad air sampai volume keseluruhan campuran menjadi 100 ml⁽³⁰⁾.

2. Pembuatan Reagen *Liebermann Burchard*

Sebanyak 1 ml asam asetat anhidrat dicampurkan dengan 1 ml kloroform, lalu didinginkan pada suhu ruangan, lalu ditambahkan dengan 1 tetes asam sulfat pekat⁽³⁰⁾.

3. Pembuatan Reagen AlCl₃

Sebanyak 5 gram AlCl₃ dilarutkan kedalam alkohol 100 ml. Kemudian dilarutkan hingga homogen⁽²⁹⁾.

3.6.3 Analisis Kandungan Sisa Pelarut

Ekstrak kental sebanyak 100 mg dilarutkan dengan pelarut n-heksan 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 injector yang digunakan adalah 300°C dan suhu oven yang digunakan adalah 70°C.

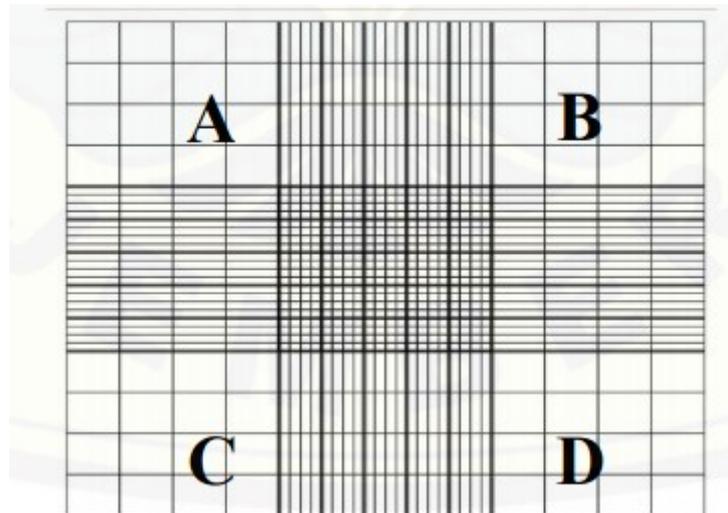
3.6.4 Pembuatan Seri Kadar Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat *Dryopteris marginalis*

Dibuat dua larutan uji DMEM untuk sel MCF-7 dan sel Vero, dengan cara:

Ekstrak dan Fraksi kental *Dryopteris marginalis* ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan menggunakan pelarut DMSO 0,2% sebanyak 0,1 ml, sehingga diperoleh larutan induk I dengan konsentrasi 100.000 μ g/ml. Selanjutnya dilakukan terhadap 50 μ L larutan induk I dengan 450 μ L DMEM menjadi larutan induk II dengan konsentrasi 10.000 μ g/ml. Kemudian dari 280 μ L larutan induk II, dilakukan pengenceran dengan 1120 μ L DMEM sehingga diperoleh larutan induk IV dengan konsentrasi 2000 μ g/ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dengan perbandingan 2:1 diawali dari larutan induk IV sebanyak 1400 μ L. Sehingga diperoleh seri konsentrasi 2000 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, dan 125 μ g/ml⁽¹⁰⁾.

3.6.5 Kultur Sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel konfluen dicuci PBS 3 kali sampai bersih dari media, larutan tersebut dibuang. Ditambahkan 1 ml 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 15 ml, dihentikan kerja tripsin dengan media kultur 2 ml dan ditambahkan PBS 1 x 10 ml, disentrifugasi 1500 rpm selama 15 menit, kemudian dibuang supernatan. Ditambahkan 1 ml media M199 untuk sel Vero dan media DMEM untuk sel MCF-7, diresuspensi sampai pelet terlepas. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru.



Gambar 3.1 Penampang *Haemocytometer*

Haemocytometer (gambar 3.1) terdiri dari 4 kamar hitung yang ditandai oleh huruf A, B, C, dan D, setiap kamar terdiri dari 16 kotak. Sel yang gelap (mati) dan sel yang terdapat di batas luar sebelah atas dan sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung dan dimasukkan pada perhitungan jumlah sel.

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/well⁽¹⁰⁾.

3.6.6 Uji Antiproliferatif Ekstrak dan Fraksi Tumbuhan *Dryopteris marginalis* terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 dan Sel Vero

Masing-masing suspensi sel dalam media kultur (M199 untuk sel Vero dan DMEM untuk sel MCF-7) sebanyak 100 μ L dimasukkan pada masing-masing microplate 96 lubang sumuran. Setelah itu ditambahkan larutan sampel uji pada berbagai konsentrasi masing-masing sebanyak 100 μ L kecuali pada sumuran kontrol media. Selanjutnya diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Ke dalam masing-masing sumur ditambahkan 50 μ L larutan 2mg/ml MTT. Inkubasi selama 3-4 jam pada 37°C, 5% CO₂. Setelah 3-4 jam terlihat adanya endapan ungu kristal formazan. Reaksi MTT dihentikan dengan menambahkan 50 μ L SDS 10%. Selanjutnya serapan dibaca dengan *microtiter plate reader* pada

panjang gelombang 595 nm. Pada metode MTT, presentase kematian sel merupakan selisih absorbansi kontrol sel dengan absorbansi sampel dibagi absorbansi kontrol sel dengan kontrol media dikalikan 100%. Masing masing absorbansi telah dikoreksi dengan absorbansi dari medium saja tiap kadar.

Perhitungan persen penghambatan (inhibisi) sel menggunakan metode MTT menggunakan rumus berikut:

- Presentase 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 antiproliferatif ini dilakukan baik pada sel MCF-7 maupun sel Vero dengan mekanisme kerja yang sama⁽¹⁰⁾.

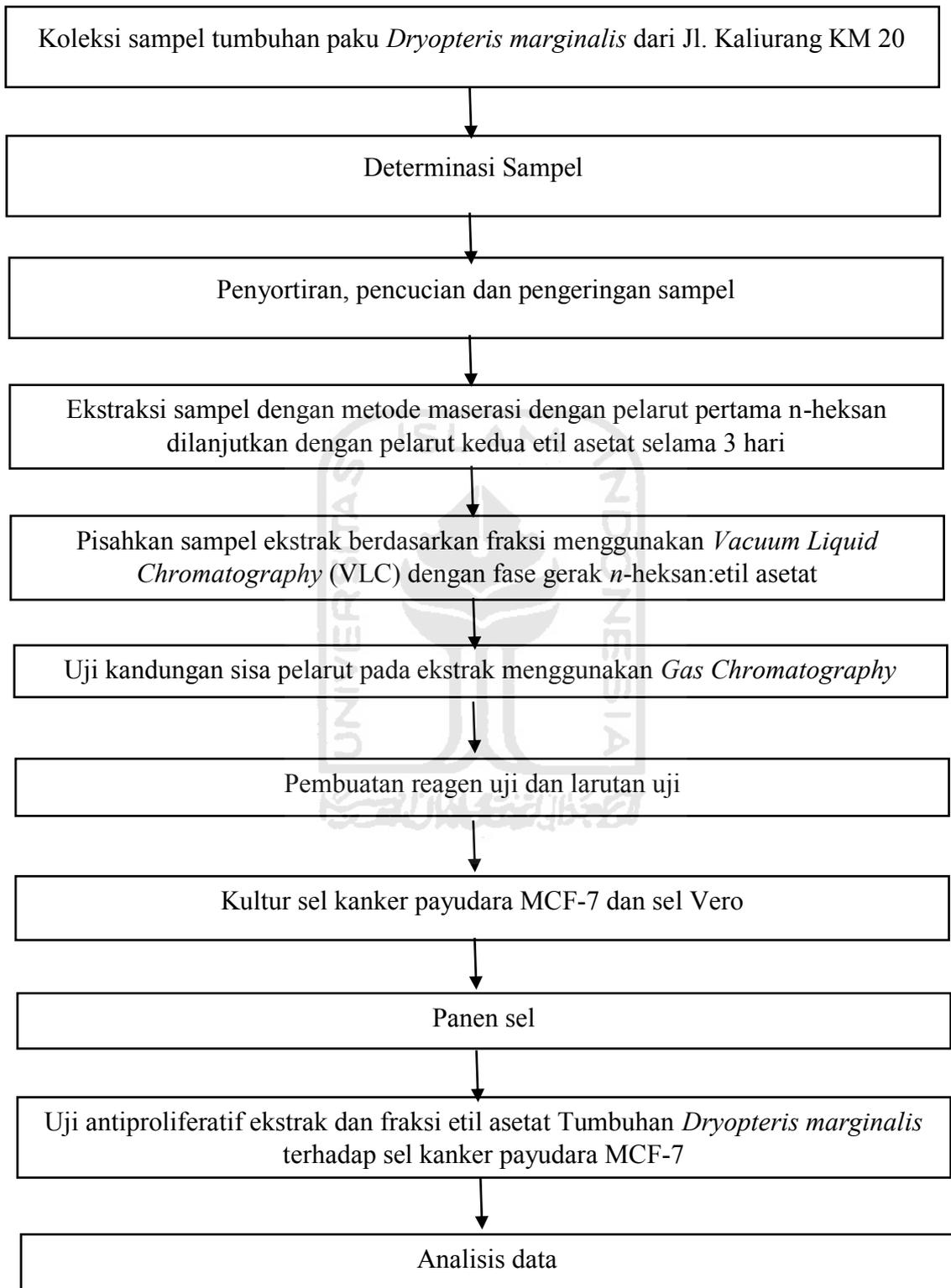
3.6.7 Analisis

Inhibition Concentration atau IC_{50} adalah konsentrasi penghambatan setengah maksimal yang mengukur efektivitas senyawa dalam fungsi biologis atau biokimia menghambat. Hasil presentase penghambatan (inhibisi) digunakan untuk menentukan pesentase hidup sel yang akan dipakai untuk menghitung harga IC_{50} dengan persamaan regresi linier. Berdasarkan data ini dibuat regresi linier hubungan antara konsentrasi sebagai X dengan nilai persentase kematian sebagai nilai Y, selanjutnya ditarik garis lurus yang paling balik melalui titik-titik yang ada (berdasarkan penglihatan) dan konsentrasi pada garis ini menyatakan 50% kematian (probit -5). Antilog titik ini disebut IC_{50} . Didapatkan persamaan regresi linier dari grafik yang dibentuk yaitu $y=bx+a$. Kemudian dengan menggunakan persamaan ini nilai IC_{50} dihitung dengan memasukkan nilai $y=50$ ⁽¹⁰⁾. Kemampuan suatu ekstrak dianggap bersifat toksik dapat dinyatakan dalam kategori nilai IC_{50} menurut NCI (*National Cancer Institute*) (tabel 3.2):

Tabel 3.2 Kategori nilai IC_{50} menurut *National Cancer Institute*⁽³⁰⁾

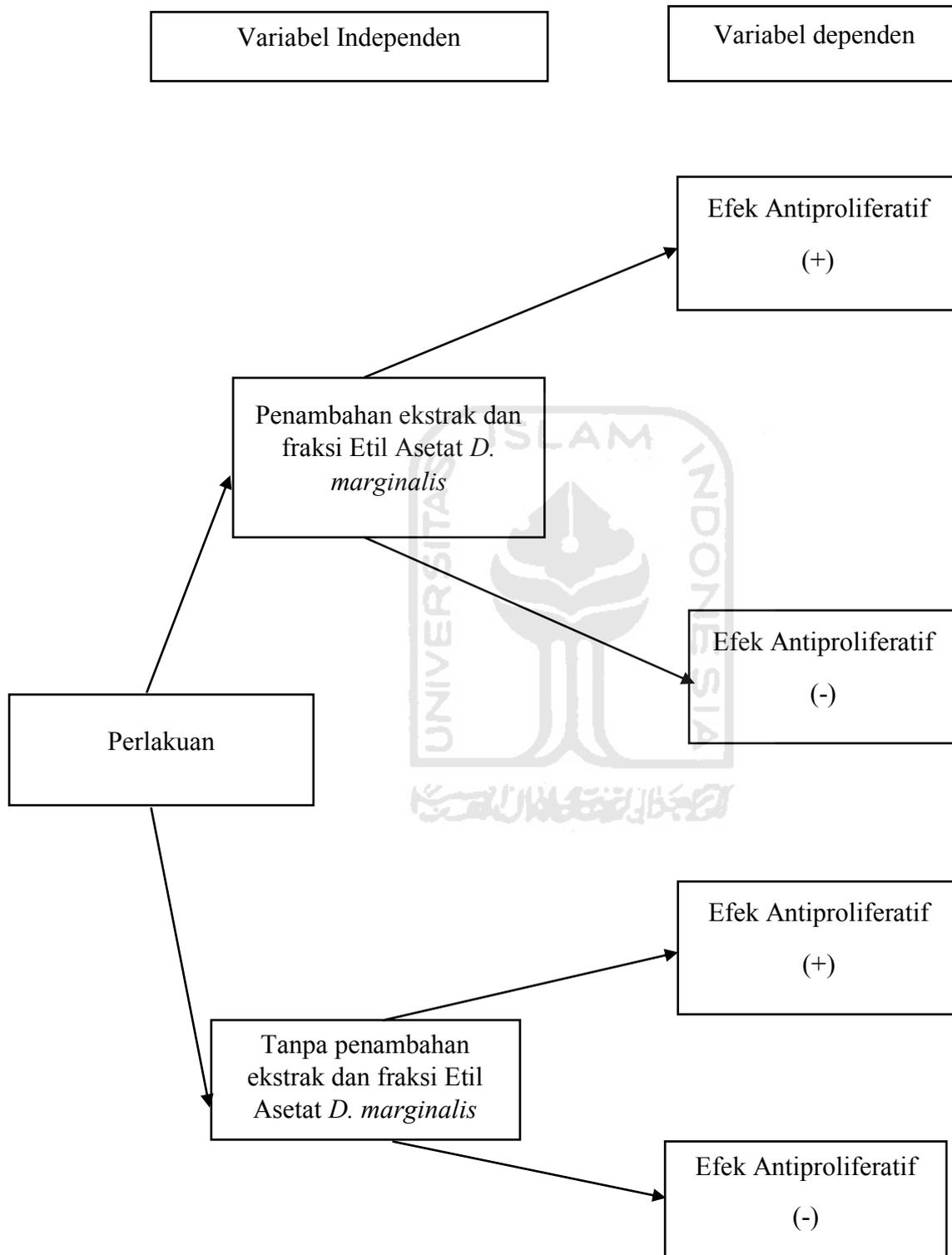
Kategori Nilai IC_{50}	
< 5 ppm	Sangat Aktif
5-10 ppm	Aktif
11-30 ppm	Sedang
>30 ppm	Tidak Aktif

3.7 Kerangka Umum Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Umum Penelitian

3.8 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.3 Kerangka Konsep Penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Kaji Etik Penelitian

Penelitian ini telah dikaji oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Hal ini dinyatakan lolos kaji etik dengan nomor kaji etik: 34/Ka.Kom.Et/70/KE/V/2016 (lampiran 1). Penelitian ini dilakukan setelah mendapatkan surat kaji etik dari komite etik sehingga penelitian ini dilakukan sesuai dengan prosedur dan tidak melanggar kode etik yang ada.

4.2 Hasil Identifikasi Tanaman

Determinasi tumbuhan ini dimaksudkan untuk mengetahui kebenaran identitas tumbuhan yang akan diteliti. Hal ini penting dilakukan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Bahan baku tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* yang digunakan dalam penelitian ini dikumpulkan pada bulan Februari 2016 di daerah Kaliurang Km 20, Kabupaten Sleman Yogyakarta. Kesesuaian jenis tumbuhan yang digunakan akan mempengaruhi mutu ekstrak sebagai faktor internal. Proses identifikasi dilakukan di Laboratorium Anatomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah sesuai dengan tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* melalui surat keterangan determinasi dengan nomor: 0753/S.Tb./II/2016. (lampiran 2).

4.3 Hasil Pengeringan dan Penyerbukan

Setelah dilakukan pengumpulan bahan, selanjutnya dilakukan proses pencucian tumbuhan yang berfungsi untuk menghilangkan kotoran seperti tanah maupun serangga pada tumbuhan. Bahan kemudian dikeringkan selama 3 hari di bawah sinar matahari. Sebanyak 140 gram tanaman paku kering kemudian dihaluskan menjadi serbuk menggunakan mesin *Miller*. Proses penyerbukan dilakukan agar proses ekstraksi menjadi lebih maksimal karena luas permukaan sel yang besar sehingga senyawa yang berhasil diekstraksi lebih banyak⁽³¹⁾. Didapatkan berat serbuk kering tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* sebesar 140 gram.

4.4 Hasil Ekstraksi Serbuk Tanaman Paku *Dryopteris marginalis*

Ekstraksi merupakan proses awal yang dilakukan dalam penelitian ini. Metode maserasi dipilih karena memiliki beberapa keuntungan dibandingkan metode lain, seperti: alat sederhana, murah, dan mudah dilakukan. Metode ini lebih tepat digunakan karena metode maserasi dengan cara perendaman dan tidak melalui proses pemanasan hingga diharapkan banyak senyawa aktif yang akan tersari dan aman untuk senyawa-senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan. Maserasi memiliki prinsip merendam simplisia dengan pelarut sehingga pelarut akan masuk ke dalam sel dan isi sel akan larut. Perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel menyebabkan pelarut dapat masuk ke sel. Larutan yang memiliki konsentrasi yang tinggi akan terdesak keluar sel dan diganti oleh pelarut dengan konsentrasi rendah sehingga dapat masuk ke dalam sel (proses difusi). Proses ini terjadi secara berulang sampai terjadi keseimbangan di dalam dan di luar sel⁽³²⁾.

Serbuk kering tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan pertama n-heksan kemudian dilanjutkan dengan pelarut kedua, etil asetat. Proses maserasi dihentikan setelah 72 jam perendaman dan saat ekstrak yang diperoleh sudah berwarna pekat dan filtrat sudah berwarna pucat. Hasil dari ekstrak cair kemudian diuapkan dengan alat *rotary evaporator* sehingga tidak ada sisa pelarut etil asetat. Hasil yang didapatkan berupa ekstrak kental berwarna hijau gelap kehitaman sebanyak 15,7 gram. Berdasarkan perolehan ekstrak kental tersebut nilai rendemen ekstrak kental yang diperoleh sebesar 11,2%.



Gambar 4.1 Ekstrak etil asetat tumbuhan paku *Dryopteris marginalis*

Rendemen menyatakan hasil banyaknya senyawa yang terkandung di dalam pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi. Semakin tinggi nilai rendemen, maka semakin banyak senyawa yang ditarik oleh pelarut. Ekstrak yang telah didapatkan kemudian disimpan di dalam desikator agar ekstrak dapat bertahan lebih lama dan tidak ditumbuhi jamur yang dapat mengganggu kestabilan ekstrak.

4.5 Hasil Fraksinasi Ekstrak Kental Etil Asetat Tanaman *Dryopteris marginalis*

Ekstrak kental yang didapatkan kemudian dilakukan fraksinasi dengan menggunakan *Vaccum Liquid Chromatography* (VLC). Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan kandungan-kandungan senyawa pada ekstrak berdasarkan tingkat kepolaran. Ekstrak kental etil asetat *Dryopteris marginalis* ditimbang sebanyak 1 gram kemudian diimpregnasi dengan silika gel 60 GF₂₅₄. Impregnasi bertujuan agar sampel yang akan difraksinasi dapat tersebar dengan homogen dan mendapatkan pemisahan yang baik⁽³³⁾.

Pada proses awal fraksinasi, silika gel 60 GF₂₅₄ sebagai fase diam ditimbang sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dipadatkan dengan bantuan vakum sehingga tidak terdapat rongga pada fase diam dan proses pemisahan menjadi tidak terganggu. Ekstrak yang telah diimpregnasi kemudian diletakkan diatas fase diam sambil perlahan-lahan dipadatkan dalam kondisi vakum dapat diperlihatkan pada gambar 4.2 bagian A. Pelarut pro analisis lebih baik digunakan untuk keperluan fraksinasi dibandingkan dengan pelarut yang bersifat teknis karena memiliki kemurnian yang lebih tinggi sehingga hasil pemisahan yang didapat juga lebih baik, saat diberikan fase gerak pada kolom terlihat pada gambar 4.2 bagian B dan C terlihat terbentuk pita-pita berwarna kuning dan hijau yang kemudian di koleksi per bagian pita.

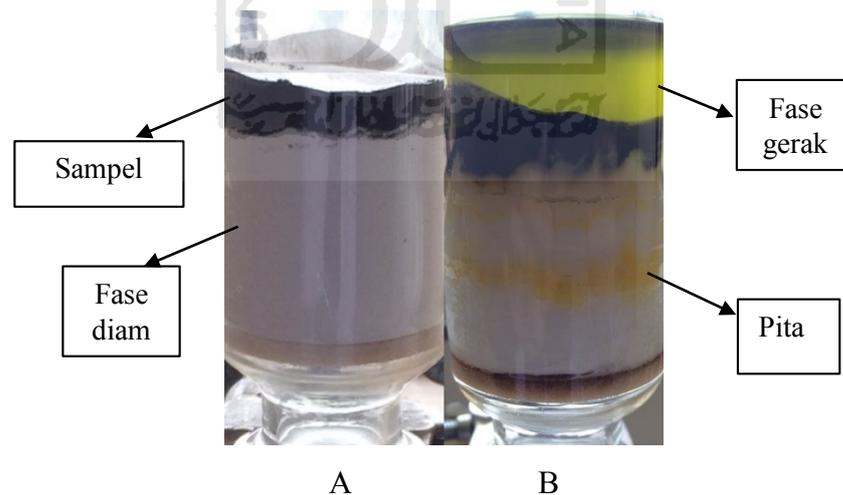
Fraksinasi ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* memiliki prinsip “*Like dissolve like*” dengan perbandingan pelarut n-heksan:etil asetat. Senyawa yang terkandung dan terbawa pada tiap perbandingan fase gerak berbeda ditunjukkan dengan terbentuknya pita-pita pada kolom VLC⁽³³⁾. Hasil dari pengambilan dari pita-pita pada kolom VLC dapat diperlihatkan pada tabel 4.1, dan proses fraksinasi

tersebut dikatakan berhasil karena ekstrak yang telah di impregnasi telah berwarna pucat (gambar 4.2 bagian D) pada kolom silika bermakna bahwa pemisahan dalam VLC telah selesai dilakukan.

Tabel 4.1 Perbandingan pelarut n-Heksan:Etil Asetat dan Hasil Pemisahan Fraksinasi pada VLC

n-Heksan (ml)	Etil Asetat (ml)	Metanol (ml)	Hasil Fraksi
100	0	0	1
70	30	0	2 dan 3
60	40	0	4
50	50	0	5
40	60	0	6 dan 7
30	70	0	8 dan 9
0	100	0	10
0	0	100	11, 12, dan 13

Pemisahan pada kromatografi kolom ini menggunakan fase gerak perbandingan antara *n*-heksan:etil asetat hingga terbentuk beberapa pita (Gambar 4.2). Elusi sampel dalam kolom dimulai dari eluen yang kepolarannya rendah yakni *n*-heksan 100% v/v, kemudian *n*-heksan:etil asetat dengan perbandingan (7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 0:10) dan metanol 100% v/v dengan jumlah masing masing eluen sebanyak 20 mL hingga didapatkan sebanyak 13 fraksi (tabel 4.1).

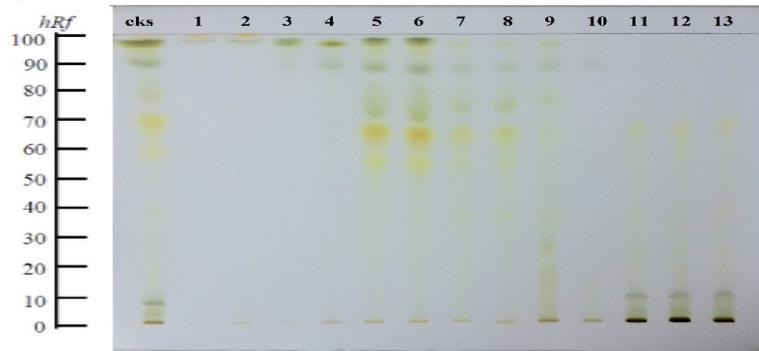


Gambar 4.2 Proses Fraksinasi Ekstrak *Dryopteris marginalis* dengan menggunakan *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC)

Keterangan : (A) Kolom VLC sebelum dilakukan fraksinasi (B) Kolom VLC setelah pemberian fase gerak *n*-heksan

Sebanyak 13 fraksi yang dihasilkan dari kolom VLC, dilakukan penguapan pelarut dengan menggunakan *rotary evaporator* agar didapatkan fraksi yang

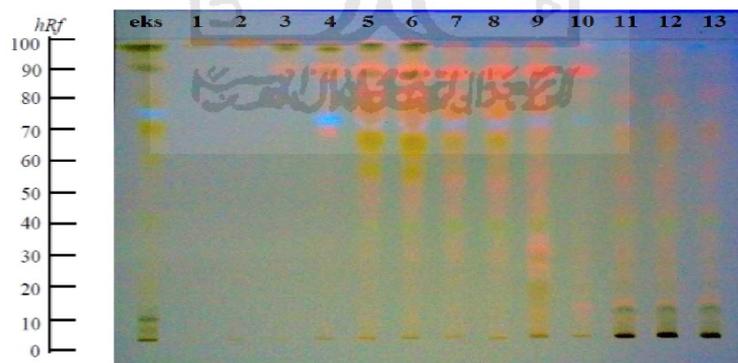
terbebas dari pelarut. Fraksi yang telah diuapkan kemudian dianalisis dengan KLT untuk pengelompokan fraksi berdasarkan kesamaan profil Rf (gambar 4.3).



A



B



C

Gambar 4.3 Hasil KLT Profil Kandungan Kimia Fraksi Etil Asetat *Dryopteris marginalis*.

Keterangan: (A) KLT Profil Kandungan Kimia Fraksi Etil Asetat pada sinar tampak, (B) KLT Profil Kandungan Kimia Fraksi Etil Asetat UV₂₅₄, (C) KLT Profil Kandungan Kimia Fraksi Etil Asetat UV₃₆₆.

Tabel 4.2 Data Hasil Penggabungan Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat *Dryopteris marginalis*

Sampel	Banyaknya bercak	hRf	Bercak UV₃₆₆	Penggabungan	
Ekstrak Etil Asetat	10	0	Hijau tua	Ekstrak Etil Asetat	
		5	Hijau muda		
		10	Hijau muda		
		40	Kuning		
		60	Kuning		
		70	Kuning		
		75	Berpendar biru		
		80	Hijau muda		
		90	Hijau muda		
		100	Hijau tua		
Fraksi 1	2	99	Hijau muda	Fraksi 1 dan 2	
		100	Merah muda		
Fraksi 2	2	99	Hijau muda		
		100	Merah muda		
Fraksi 3	3	90	Merah muda		Fraksi 3
		99	Hijau muda		
		10	Merah muda		
Fraksi 4	5	70	Merah muda		Fraksi 4
		75	Berpendar biru		
		80	Merah muda		
		90	Merah muda		
		100	Hijau tua		
Fraksi 5	9	30	Merah muda	Fraksi 5 dan 6	
		40	Hijau muda		
		50	Merah muda		
		60	Jingga muda		
		65	Jingga tua		
		70	Berpendar biru		
		75	Merah muda		
		90	Merah muda-hijau tua		
		100	Hijau tua		
Fraksi 6	9	30	Merah muda		
		40	Hijau muda		
		50	Merah muda		
		60	Jingga muda		
		65	Jingga tua		
		70	Berpendar biru		
		75	Merah muda		
		90	Merah muda-hijau tua		
		100	Hijau tua		

Lanjutan Tabel 4.2

Sampel	Banyaknya bercak	hRf	Bercak UV ₃₆₆	Penggabungan
Fraksi 7	9	30	Merah Muda	Fraksi 7 dan 8
		40	Hijau muda	
		50	Merah muda	
		65	Kuning	
		70	Jingga tua	
		75	Berpendar biru	
		80	Merah muda	
		90	Merah muda	
		98	Merah muda	
Fraksi 8	9	30	Merah muda	Fraksi 9
		40	Hijau muda	
		50	Merah muda	
		65	Kuning	
		70	Jingga tua	
		75	Berpendar biru	
		80	Merah muda	
		90	Merah muda	
		100	Merah muda	
Fraksi 9	10	10	Merah muda	Fraksi 10
		18	Hijau muda	
		30	Merah muda	
		40	Hijau muda	
		50	Merah muda	
		60	Merah muda-hijau	
		70	Berpendar biru	
		75	Merah muda	
		90	Merah muda	
		100	Merah muda	
Fraksi 10	7	10	Merah muda	Fraksi 11, 12 dan 13
		25	Merah muda	
		40	Hijau muda	
		50	Merah muda	
		70	Berpendar biru	
		85	Merah muda	
		100	Merah muda	
Fraksi 11	9	10	Hijau	Fraksi 11, 12 dan 13
		11	Merah muda	
		25	Merah muda	
		40	Hijau muda	
		50	Merah muda	
		65	Jingga	
		80	Merah muda	
90	Merah muda			

Lanjutan Tabel 4.2

Sampel	Banyaknya bercak	hRf	Bercak UV ₃₆₆	Penggabungan
Fraksi 11	9	100	Merah Muda	Fraksi 11, 12, dan 13
		10	Hijau	
		11	Merah muda	
Fraksi 12	9	25	Merah muda	
		40	Hijau muda	
		50	Merah muda	
		65	Jingga	
		80	Merah muda	
		90	Merah muda	
		100	Merah muda	
Fraksi 13	9	10	Hijau	
		11	Merah muda	
		25	Merah muda	
		40	Hijau muda	
		50	Merah muda	
		65	Jingga	
		80	Merah muda	
		90	Merah muda	
		100	Merah muda	

Fase gerak yang digunakan pada analisis pengelompokan fraksi dengan KLT adalah n-heksan:etil asetat (6:4 v/v). Perbandingan fase gerak tersebut dapat memberikan pemisahan yang cukup baik terhadap ekstrak, dibuktikan pada gambar 4.3 diperlihatkan bahwa sebanyak 13 fraksi memiliki profil spot yang berbeda. Deteksi profil kandungan kimia ekstrak dan fraksi etil asetat *Dryopteris marginalis* menggunakan sinar tampak, sinar UV₂₅₄ dan sinar UV₃₆₆. Gambar 4.3 adalah profil kandungan kimia ekstrak dan fraksi etil asetat tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* pada sinar tampak, UV₂₅₄, dan UV₃₆₆.

Berdasarkan profil kandungan kimia pada gambar 4.3, dan tabel 4.2, hasil penggabungan ekstrak dan fraksi-fraksi berdasarkan profil KLT pada tabel 4.2 didapatkan sebanyak 9 gabungan fraksi yakni: sampel ekstrak etil asetat, fraksi 1 dan 2, fraksi 3, fraksi 4, fraksi 5 dan 6, fraksi 7 dan 8, fraksi 9, fraksi 10, dan fraksi 11, 12, dan 13 memiliki karakteristik nilai hRf maupun kandungan kimia yang mirip, dengan pertimbangan fraksi-fraksi tersebut memiliki kandungan senyawa kimia yang hampir sama. Selanjutnya fraksi-fraksi yang telah disatukan kemudian

diuji potensi antiproliferatif terhadap sel MCF-7 dan sel Vero untuk mendapatkan nilai IC₅₀.

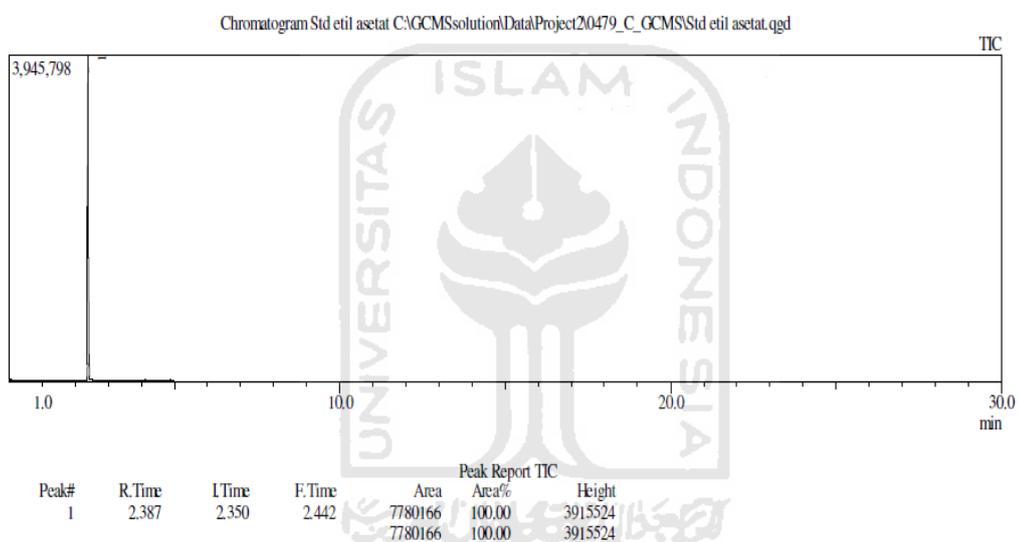
4.6 Hasil Uji Sisa Pelarut dalam Ekstrak Etil Asetat dari Tumbuhan Paku *Dryopteris marginalis*

Etil asetat yang digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi pada penelitian ini merupakan salah satu jenis pelarut organik semi polar yang sering digunakan dalam ekstraksi. Pelarut organik ini memiliki sifat toksik terhadap sel, mempengaruhi akurasi uji aktivitas yang menggunakan sel hidup, dan bersifat menginduksi kematian sel (apoptosis)⁽³⁴⁾. Oleh karena itu, pengujian sisa pelarut yang terdapat pada sampel ekstrak penting dilakukan karena dapat mempengaruhi hasil yang didapatkan.

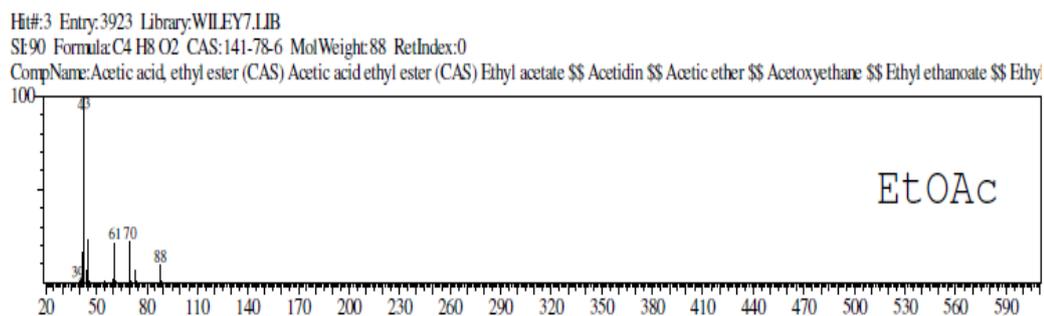
Gas Chromatography (GC) merupakan metode yang tepat dalam pengujian sisa pelarut yang bersifat *volatile* atau mudah menguap. Pada penelitian ini menggunakan instrumen GC-MS yang merupakan salah satu metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu kromatografi gas (GC) untuk menganalisis jumlah senyawa secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) untuk menganalisis struktur molekul senyawa analit. Gas kromatografi merupakan salah satu teknik spektroskopi yang menggunakan prinsip pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi komponen-komponen penyusunnya yang biasa digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa yang terdapat pada campuran gas dan juga menentukan konsentrasi suatu senyawa dalam fase gas⁽³⁵⁾.

Spektroskopi massa adalah salah satu metode untuk mendapatkan berat molekul dengan cara mencari perbandingan massa terhadap muatan dari ion yang muatannya diketahui dengan mengukur jari-jari orbit melingkarnya dalam medan magnetik seragam. Penggunaan kromatografi gas dengan spektroskopi massa dapat menghasilkan data yang lebih akurat dalam pengidentifikasian senyawa yang dilengkapi dengan struktur molekulnya. Etil asetat dapat dikuantifikasi dalam *Gas Chromatography* karena memiliki sifat *volatile* dengan titik didih 77,1⁰C dan memiliki berat molekul 88,11 g/mol⁽³⁶⁾.

Berdasarkan hasil kromatogram gambar 4.4 bagian A dan B menunjukkan hasil pengujian pada standard etil asetat. Gambar 4.4 bagian A merupakan hasil kromatogram *gas chromatography* dan menunjukkan 1 puncak dengan waktu retensi 2.387. Kromatogram spektrofotometer massa pada gambar 4.4 bagian B menunjukkan kandungan yang terdapat pada standard etil asetat hanya mengandung etil asetat dan memiliki berat molekul sebesar 88. Berdasarkan pada gambar 4.4 bagian C, menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat tidak terkandung pada ekstrak yang dapat mempengaruhi hasil pada uji antiproliferatif sel MCF-7 maupun sel Vero.



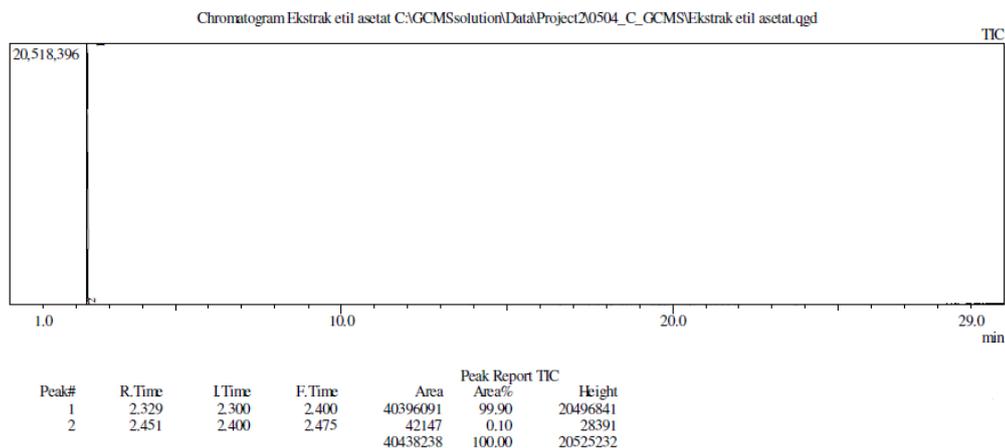
A



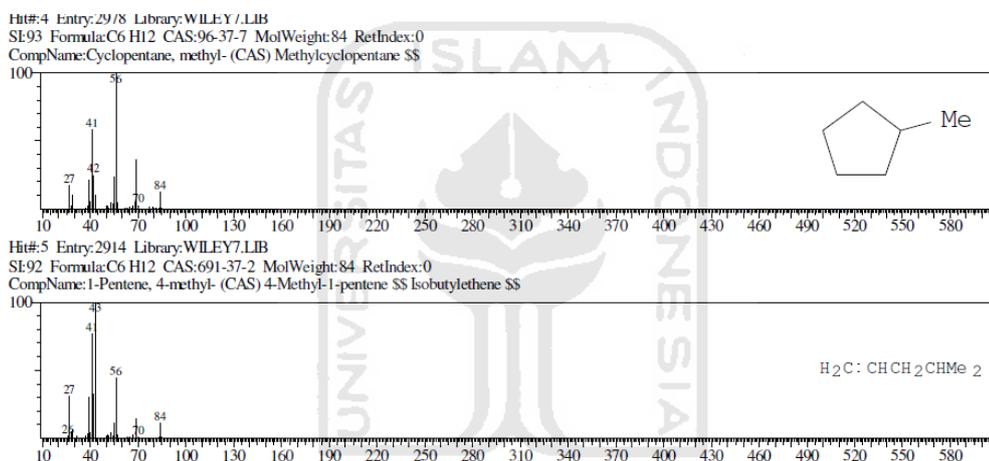
B

Gambar 4.4 Hasil Kromatogram Ekstrak Etil Asetat *Dryopteris marginalis* GC-MS

Keterangan : (A) Hasil Kromatogram GC Standard Etil Asetat, (B) Hasil Kromatogram GC-MS Standard Etil Asetat



A



B

Gambar 4.5 Hasil Kromatogram Ekstrak Etil Asetat *Dryopteris marginalis* GC-MS

Keterangan: (A) Hasil Kromatogram GC Ekstrak Etil Asetat, (B) Hasil Kromatogram GC-MS Ekstrak Etil Asetat

Hasil uji *Gas Chromatography* menunjukkan bahwa tidak terkandung pelarut etil asetat dalam ekstrak etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis*. Berdasarkan waktu retensi sampel ekstrak sebesar 2,329 dan 2,451 dibandingkan dengan waktu retensi sampel standard etil asetat sebesar 2,387 meskipun terdapat kemiripan waktu retensi pada kromatogram antara waktu retensi *standard* dengan ekstrak namun pada kromatogram MS tidak menunjukkan kandungan pelarut etil asetat serta didapatkan berat molekul yang berbeda yakni sebesar 84 g/mol

sedangkan berat molekul etil asetat sebesar 88,11 g/mol. Kemiripan waktu retensi dimungkinkan pada *Methylcyclopentane* maupun *4-methyl-1-pentene* memiliki titik lebur yang mirip dengan etil asetat. Ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* dapat dipastikan tidak terdapat adanya pelarut etil asetat yang dapat mempengaruhi hasil pengujian aktivitas antiproliferatif.

4.7 Hasil Uji Aktivitas Antiproliferatif Sel MCF-7 dan Sel Vero

Pengujian aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi etil asetat tumbuhan *Dryopteris marginalis* ini menggunakan sel MCF-7 dan sel Vero sebagai sel pembanding kontrol sel normal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis* terhadap sel MCF-7 maupun pada sel Vero. Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas dalam suatu senyawa. Metode uji sitotoksik yang dipilih adalah metode MTT *assay*. Alasan penggunaan MTT antara lain cepat, sensitif serta merupakan metode yang paling umum digunakan dalam pengujian secara *in vitro*.

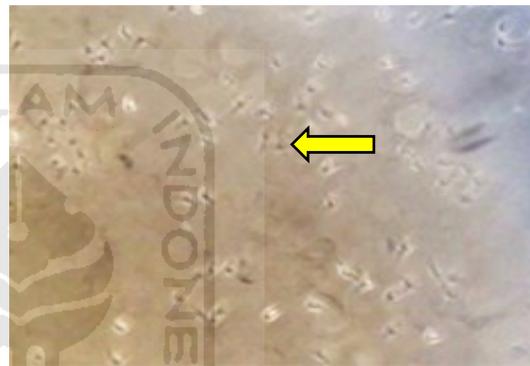
Sel MCF-7 adalah salah satu jenis sel adenokarsinoma yang sering digunakan dalam penelitian *in vitro* terkait aktivitas reseptor estrogen dibandingkan dengan sel T47D. Media penumbuh sel MCF-7 adalah DMEM sedangkan pada sel Vero adalah M199. Serum yang digunakan pada media adalah FBS (*Fetal Bovine Serum*) yang berfungsi sebagai nutrisi untuk kelangsungan hidup sel kultur. Serum FBS adalah serum yang paling sering digunakan sebagai media sebab pada serum ini sebagai sumber mineral, lipid, dan hormon-hormon. Selain itu, serum ini juga mengandung faktor pengikat (*adhesion factor*) yang berfungsi untuk meningkatkan daya ikat sel pada *culture flask* serta *antitrypsin*⁽³⁷⁾.

Fungsi dari reagen PBS (*phosphat buffer saline*) untuk mempertahankan pH, pengatur tekanan osmosis dalam medium sebagai ion inorganik juga sebagai larutan pencuci sel untuk menghilangkan sisa serum yang masih menempel pada sel serta mengangkat sel-sel yang telah mati. Adapun Tripsin digunakan untuk melepaskan sel yang melekat pada dinding *culture flask*. Tripsin merupakan enzim protease, yakni matriks seluler pada sel yang menempel pada dinding *flask* dipotong

oleh Tripsin. Keuntungan menggunakan Tripsin diantaranya adalah Tripsin dapat ditoleransi oleh banyak jenis sel dan sisa Tripsin yang masih tertinggal dalam suspensi sel dapat dinetralkan oleh serum dalam media⁽³⁷⁾. Untuk mengetahui kepadatan sel dilakukan perhitungan menggunakan *haemocytometer* dibawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100 kali. Kultur sel MCF-7 berbentuk bulat dan bergerombol terlihat pada gambar 4.5, dan terlihat dari mikroskop bahwa sel memiliki kualitas yang baik dan dapat digunakan dalam penelitian yang terlihat menempel pada dinding *tissue culture flask*. Sel Vero dapat diperlihatkan pada gambar 4.6 menunjukkan berbentuk pipih dan menempel pada plate.



Gambar 4.6 Hasil Kultur sel MCF-7



Gambar 4.7 Hasil Kultur sel Vero

MTT *assay* merupakan metode yang didasarkan oleh kuantifikasi sel hidup setelah pemberian sampel ekstrak maupun fraksi. Sel hidup dihitung berdasarkan jumlah garam formazan yang terbentuk, garam formazan ini terbentuk dari reaksi reduksi senyawa MTT dengan enzim mitokondria reduktase dalam rantai respirasi mitokondria. Semakin banyak garam formazan yang terbentuk maka jumlah sel yang hidup juga banyak. Terbentuknya garam formazan secara kualitatif dapat dilihat dari warna ungu yang terbentuk setelah penambahan senyawa MTT dan inkubasi (lampiran 4), sedangkan secara kuantitatif senyawa formazan dapat dihitung berdasarkan nilai absorbansinya pada panjang gelombang 525 nm⁽²¹⁾.

Potensi uji aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi etil asetat *Dryopteris marginalis* untuk membunuh sel dapat dilihat melalui nilai IC₅₀. Nilai konsentrasi dari ekstrak dan fraksi etil asetat *Dryopteris marginalis* yang dapat membunuh 50% sel (IC₅₀) ini dihitung melalui persamaan regresi. Data yang telah diperoleh

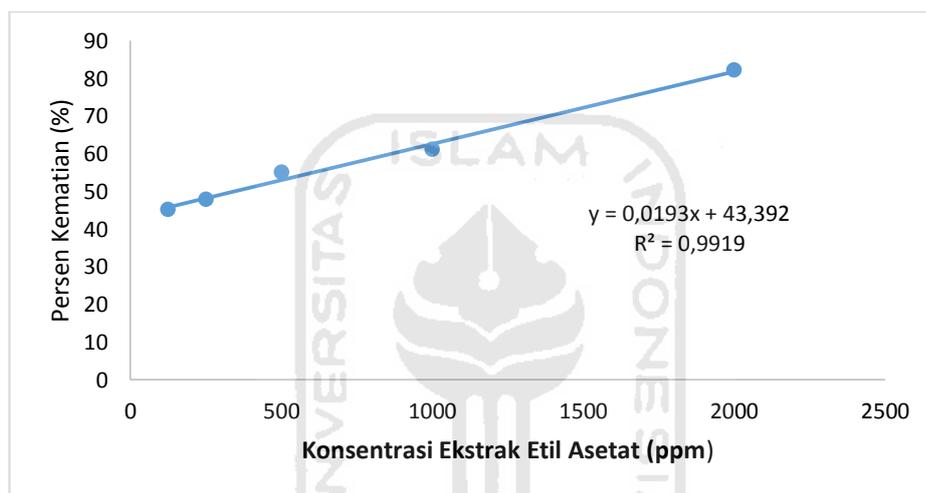
kemudian dibuat kedalam persamaan regresi linier hubungan antara logaritma konsentrasi sebagai X dan persen kematian sel sebagai Y (lampiran 6).

Tabel 4.3 Hasil Uji Aktivitas Antiproliferatif terhadap Sel MCF-7

Sampel	Kadar (ppm)	Absorbansi Rata-rata	SD	Kontrol Sel \pm SD	Kontrol Media \pm SD	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
Ekstrak	2000	0,184	0,005			82,239	342,383 ppm
	1000	0,268	0,022			61,153	
	500	0,292	0,004	0,510 \pm 0,055	0,114 \pm 0,002	55,092	
	250	0,320	0,001			47,900	
	125	0,331	0,033			45,244	
Fraksi 1 dan 2	2000	0,250	0,008			66,838	1.502,749 ppm
	1000	0,391	0,02			35,913	
	500	0,504	0,008	0,553 \pm 0,21	0,1 \pm 0,004	10,932	
	250	0,543	0,004			2,458	
	125	0,555	0,009			-0,293	
Fraksi 3	2000	0,133	0,002			92,699	1.101,522 ppm
	1000	0,331	0,006			49,010	
	500	0,455	0,004	0,553 \pm 0,21	0,1 \pm 0,004	21,827	
	250	0,521	0,003			7,300	
	125	0,565	0,005			-2,384	
Fraksi 4	2000	0,518	0,004			7,960	12.747,62 ppm
	1000	0,535	0,001			4,219	
	500	0,544	0,003	0,553 \pm 0,21	0,1 \pm 0,004	2,128	
	250	0,547	0,002			1,467	
	125	0,551	0			0,587	
Fraksi 5 dan 6	2000	0,447	0,001			15,951	<i>Not Available</i>
	1000	0,435	0,003			18,981	
	500	0,427	0,002	0,510 \pm 0,055	0,114 \pm 0,002	21,002	
	250	0,423	0,002			21,886	
	125	0,420	0,004			22,643	
Fraksi 7 dan 8	2000	0,456	0,001			13,678	<i>Not Available</i>
	1000	0,433	0,002			19,487	
	500	0,422	0,001	0,510 \pm 0,055	0,114 \pm 0,002	22,138	
	250	0,417	0,001			23,401	
	125	0,412	0,001			24,790	
Fraksi 9	2000	0,197	0,002			78,956	1.093,333 ppm
	1000	0,326	0,002			46,380	
	500	0,390	0,002	0,510 \pm 0,055	0,114 \pm 0,002	30,345	
	250	0,418	0,001			23,274	
	125	0,425	0,003			21,507	
Fraksi 10	2000	0,387	0,016			33,249	4.807,213 ppm
	1000	0,407	0,003			26,052	
	500	0,416	0,003	0,510 \pm 0,055	0,114 \pm 0,002	23,779	
	250	0,421	0,003			22,391	
	125	0,424	0,005			21,633	
Fraksi 11, 12, dan 13	2000	0,370	0,017			35,396	2.867,211 ppm
	1000	0,434	0,003			19,108	
	500	0,464	0,002	0,51 \pm 0,055	0,114 \pm 0,002	11,532	
	250	0,479	0,002			7,744	
	125	0,499	0,011			2,964	

Keterangan: *Not Available*, nilai tidak dapat dikuantifikasi disebabkan nilai absorbansi rata-rata mendekati kontrol sel

Potensi ekstrak dan fraksi 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. Hubungan konsentrasi ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* dapat dilihat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7 Grafik hubungan konsentrasi ekstrak dengan persen kematian sel MCF-7

Berdasarkan gambar 4.7, data hubungan konsentrasi ekstrak dengan persen kematian sel Vero, diperoleh persamaan sebagai berikut:

$$Y = 0,0193x + 43,392$$

Nilai IC_{50} diperoleh dengan mensubstitusikan nilai $Y = 50$, sehingga didapatkan nilai IC_{50} ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* sebesar 342,383 ppm. IC_{50} sebesar 342,383 ppm bermakna pada kadar tersebut dapat membunuh 50% sel kanker MCF-7. Sedangkan pada fraksi 1 dan 2 didapatkan hasil sebesar 1.502,383 ppm, fraksi 3 sebesar 1.101,522 ppm, fraksi 4 sebesar 12.747,62 ppm, fraksi 5 dan 6, dan fraksi 7 dan 8 tidak dapat dikuantifikasi (*not available*), fraksi 9 sebesar 1.093,333 ppm, fraksi 10 sebesar 4.807,213 ppm, dan fraksi 11, 12, dan 13 sebesar 2.867,211 ppm yang tercantum pada tabel 4.2.

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa sampel fraksi membutuhkan kadar yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak. Pada fraksi 5 dan 6, serta fraksi 7 dan 8 nilai IC₅₀ tidak dapat dikuantifikasi, disebabkan karena pada fraksi 5 dan 6 serta fraksi 7 dan 8 memiliki nilai absorbansi yang mendekati nilai kontrol sel sehingga persen kematian yang di dapatkan bernilai sangat kecil dan persen hidup yang tinggi. Pada tabel 4.2 terlihat pada fraksi 5 dan 6 serta fraksi 7 dan 8 semakin tinggi konsentrasi atau kadar fraksi yang diberikan pada sel MCF-7, maka absorbansi yang didapatkan semakin tinggi pula hal ini bermakna semakin tinggi konsentrasi maka sel MCF-7 semakin aktif membelah hingga didapatkan hasil IC₅₀ bernilai *minus* (-) sehingga pada fraksi-fraksi tersebut nilai IC₅₀ tidak dapat di kuantifikasi.

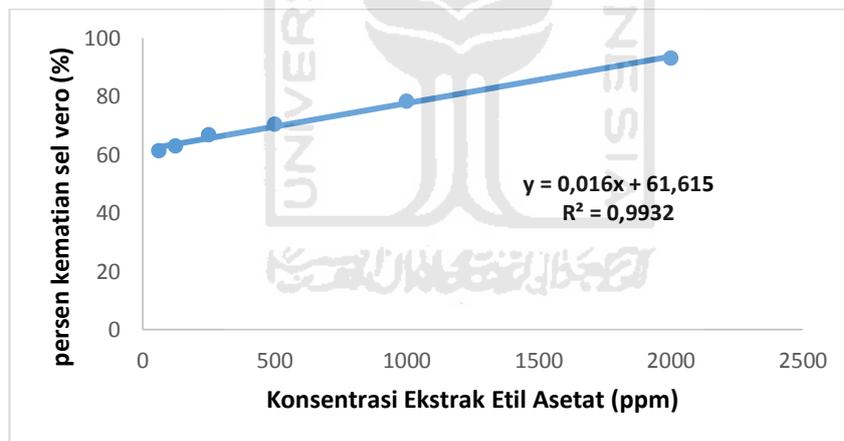
Dari hasil uji yang telah didapatkan, pada pengujian aktivitas antiproliferatif terhadap sel Vero atau sel kontrol diambil sampel ekstrak dan fraksi yang memiliki aktivitas dalam penghambatan sel MCF-7 dibawah konsentrasi 2000 ppm, yakni sampel ekstrak etil asetat, fraksi 1 dan 2, dan fraksi 9. Hasil uji aktivitas antiproliferatif sel Vero dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.4 Hasil Uji Aktivitas Antiproliferatif terhadap Sel Vero

Sampel	Kadar (ppm)	Absorbansi Rata-rata	SD	Kontrol Sel ± SD	Kontrol Media ± SD	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
Ekstrak Etil Asetat	2000	0,093	0,001			93,051	<i>Not Available</i>
	1000	0,135	0,003			78,210	
	500	0,157	0,001	0,356 ±	0,073 ±	70,436	
	250	0,168	0,002	0,009	0,006	66,726	
	125	0,178	0,004			63,015	
	62,5	0,183	0,001			61,249	
Fraksi 1 dan 2	2000	0,220	0,005			48,174	2.058,942 ppm
	1000	0,280	0,002			27,150	
	500	0,313	0,002	0,356 ±	0,073 ±	15,489	
	250	0,330	0,001	0,009	0,006	9,305	
	125	0,334	0,002			7,892	
	62,5	0,345	0,004			4,181	
Fraksi 9	2000	0,084	0,001			96,408	760,052 ppm
	1000	0,185	0,003			60,718	
	500	0,236	0,002	0,356 ±	0,073 ±	42,697	
	250	0,266	0,002	0,009	0,006	31,920	
	125	0,286	0,003			25,029	
	62,5	0,302	0,006			19,199	

Keterangan: not available nilai tidak dapat dikuantifikasi karena nilai absorbansi terlalu kecil dan mendekati nilai kontrol media

Hasil uji dari aktivitas antiproliferatif ekstrak dan fraksi etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis*, terhadap sel Vero sebagai kontrol menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antara ekstrak etil asetat dan fraksi etil asetat. Berdasarkan nilai IC₅₀ ekstrak (tabel 4.3), menunjukkan semakin tinggi kadar ekstrak yang diberikan maka semakin kecil absorbansi rata-rata dan aktivitas antiproliferatif. Hal ini bermakna bahwa kristal formazan yang dihasilkan oleh sel hidup berkurang sehingga absorbansi yang didapatkan juga rendah menunjukkan kematian sel yang semakin tinggi intensitasnya, maka dapat dilihat berdasarkan tabel hasil absorbansi (lampiran 5). Potensi ekstrak untuk membunuh sel dapat dilihat melalui nilai IC₅₀. Nilai konsentrasi dari ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* dihitung menggunakan persamaan regresi, data yang diperoleh kemudian dibuat kedalam persamaan regresi linier hubungan konsentrasi sebagai X dan persen kematian sel sebagai Y yang dapat dilihat pada gambar 4.9.



Gambar 4.8 Grafik hubungan konsentrasi ekstrak dengan persen kematian sel Vero

Berdasarkan data hubungan konsentrasi ekstrak dengan persen kematian sel Vero, diperoleh persamaan sebagai berikut:

$$Y = 0,016x + 61,615$$

Nilai IC₅₀ diperoleh dengan mensubstitusikan nilai Y = 50, didapatkan nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* terlalu kecil atau tidak dapat dikuantifikasi (*not available*). Pada tabel 4.3, menunjukkan bahwa dengan pemberian kadar dari 62,5 ppm hingga 2000 ppm memberikan aktivitas

penghambatan pembelahan sel Vero hal ini di buktikan dengan rata rata absorbansi ekstrak etil asetat pada kadar 2000 ppm sebesar 0,093 hampir mirip dengan kontrol media dengan nilai sebesar 0,073. Ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* bersifat toksik terhadap sel Vero (normal) atau bersifat tidak selektif antiproliferatif terhadap sel MCF-7 dan sel Vero.

Fraksi 1 dan 2 didapatkan hasil IC_{50} sebesar 2.058,942 ppm, hal ini menandakan untuk membunuh 50% sel Vero dibutuhkan kadar 2.058,942 ppm. Hasil uji antiproliferatif fraksi 9 didapatkan nilai IC_{50} sebesar 760,052 ppm sehingga dapat dikatakan bahwa pada kadar sebesar 1.093,333 ppm fraksi 9 dapat membunuh 50% sel MCF-7 namun juga pada kadar sebesar 760,052 ppm bersifat toksik pada sel Vero atau sel normal sehingga fraksi 9 bersifat toksik. Hasil terbaik pada uji antiproliferatif MCF-7 ini adalah sampel ekstrak etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis* namun bersifat sangat toksik terhadap sel Vero. Ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* memiliki aktifitas antiproliferatif yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi. Hal ini disebabkan ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* mengandung lebih banyak senyawa kompleks dibandingkan dengan fraksi yang merupakan hasil penyarian dari ekstrak dengan bantuan fase gerak dari non polar hingga polar sehingga senyawa senyawa yang terkandung pada fraksi lebih sederhana dibandingkan dengan ekstrak.

4.8 Uji Fitokimia Ekstrak dan Fraksi *Dryopteris marginalis*

Berdasarkan uji aktivitas antiproliferatif sel MCF-7 dan sel Vero menggunakan metode MTT *assay*, diketahui bahwa ekstrak etil asetat, fraksi 1 dan 2, dan fraksi 9 merupakan komponen yang paling aktif menghambat sel MCF-7. Selanjutnya dilakukan uji kualitatif deteksi golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak maupun fraksi tersebut. Golongan metabolit sekunder yang diidentifikasi dalam ekstrak etil asetat adalah golongan alkaloid, flavonoid, dan steroid menggunakan KLT. Kromatografi Lapis Tipis merupakan suatu metode pemisahan yang sangat sederhana dan dapat memisahkan senyawa senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti lipida-lipida dan hidrokarbon yang sukar dikerjakan dengan kromatografi kertas. Hasil dari KLT ini berupa pemisahan senyawa dan

nilai Rf. Nilai Rf berguna untuk identifikasi senyawa nilai Rf dapat di definisikan sebagai jarak tempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Oleh karena itu nilai Rf dapat dikatakan baik apabila setiap senyawa dapat terpisah dengan sempurna juga dalam pemilihan pelarut, pelarut yang digunakan pelarut atau fase gerak pro analisis sebab KLT merupakan suatu teknik pemisahan yang sangat sensitif⁽³³⁾.

1. Identifikasi Senyawa Golongan Alkaloid

Senyawa alkaloid dideteksi dengan menggunakan pereaksi semprot *Dragendorff*. Hasil positif alkaloid jika warna spot pada plat KLT berubah menjadi warna jingga dengan warna latar belakang kuning, hal tersebut dikarenakan adanya reaksi antara atom nitrogen dengan logam⁽³⁹⁾. Ion Bi^{3+} dari bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam Bismut(III)iodida yang kemudian melarut didalam kalium idodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat⁽²⁹⁾.

2. Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

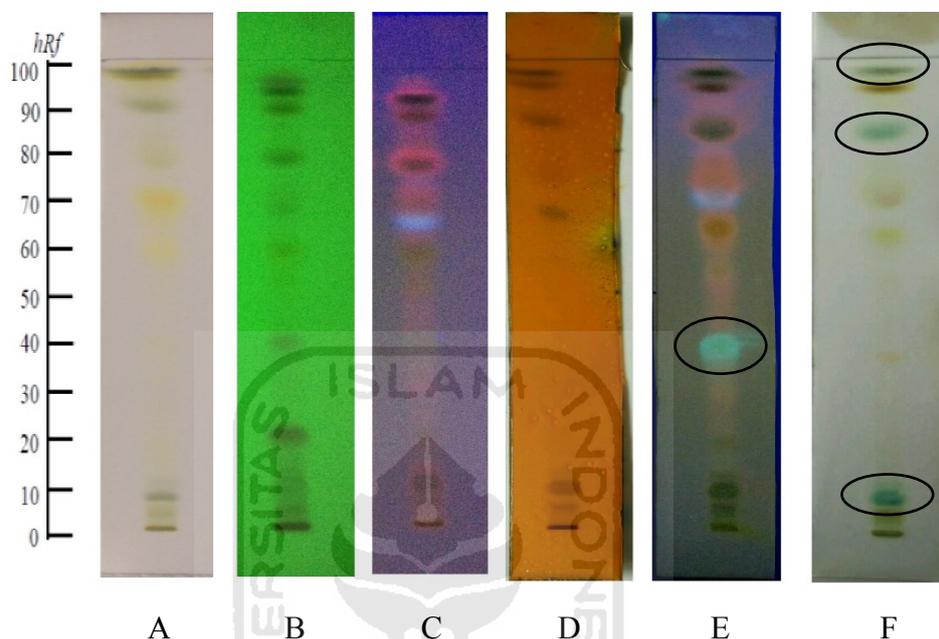
Identifikasi senyawa flavonoid pada penelitian ini menggunakan pereaksi semprot AlCl_3 5% dalam etanol. Hasil positif mengandung flavonoid apabila terjadi perubahan warna bercak menjadi warna hijau kuning dibawah sinar UV. Senyawa flavonoid memiliki cincin aromatik yang terkonjugasi, sehingga dapat terlihat pada sinar UV dan visibel. Reaksi antara AlCl_3 dengan golongan flavonoid membentuk kompleks antara gugus hidroksil dan keton yang berterangga atau dengan gugus hidroksil yang saling bertetangga⁽²⁸⁾.

3. Identifikasi Senyawa Golongan Steroid

Identifikasi senyawa steroid dan terpenoid pada penelitian ini menggunakan pereaksi semprot *Liebermann Burchard*. Hasil positif mengandung steroid apabila terjadi perubahan warna bercak menjadi hijau kebiruan⁽²⁹⁾.

Identifikasi senyawa golongan metabolit sekunder pada ekstrak, fraksi 1 dan 2, dan fraksi 9 diawali dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat (6:4 v/v). Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₅₄

dengan jarak pengembangan 10 cm. Penotolan KLT dilakukan menggunakan *linomat* sebanyak 2 μ L sampel setiap totolan. Setelah proses elusi selesai, masing-masing hasil KLT diidentifikasi menggunakan pereaksi semprot.



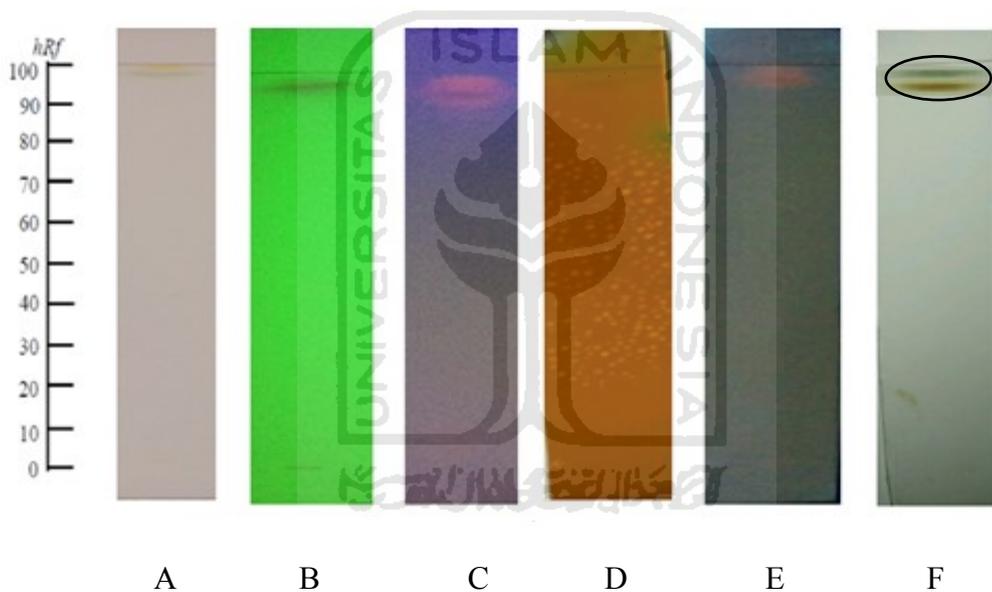
Gambar 4.10 Hasil Uji Fitokima KLT Ekstrak Etil Asetat *Dryopteris marginalis*

Keterangan = (A) sinar tampak, (B) UV₂₅₄, (C) UV₃₆₆, (D) setelah disemprot *dragendroff*, (E) setelah di semprot AlCl₃, (F) setelah disemprot *Liebermann Burchard*

Tabel 4.5 Hasil Uji Fitokima KLT Ekstrak Etil Asetat *Dryopteris marginalis*

Bercak	hRf	UV ₃₆₆	Pereaksi Semprot			Senyawa
			<i>Dragendroff</i>	AlCl ₃	<i>Liebermann Burchard</i>	
Hijau Muda	10	Tidak berpendar	-	-	Hijau Tua	Steroid
Kekuningan	40	Tidak berpendar	-	Berpendar biru	-	Flavonoid
Kuning	74	Berpendar	Coklat	-	-	-
Hijau Muda	85	Tidak berpendar	-	-	Hijau Tua	Steroid
Hijau Muda	96	Tidak berpendar	-	-	Hijau Tua	Steroid

Hasil uji KLT ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* terdapat 6 bercak dapat diperlihatkan pada gambar 4.10. Identifikasi menggunakan pereaksi AlCl_3 pada hRf 40 (tabel 4.4) menunjukkan perubahan warna pada sinar tampak menjadi kuning terang dan pada sinar UV_{366} bercak berpendar biru. Identifikasi steroid dengan menggunakan *Liebermann Burchard* ditunjukkan pada hRf 10, 85, dan 96 yakni terjadi perubahan warna menjadi hijau tua. Pada hRf 10 menandakan steroid yang bersifat semi polar salah satu contoh steroid semi polar adalah fitosterol. Ekstrak etil asetat tidak mengandung alkaloid hal ini dibuktikan pada hRf 74 pada bercak berubah warna menjadi coklat. Hasil positif alkaloid apabila terjadi perubahan warna bercak menjadi berwarna merah.



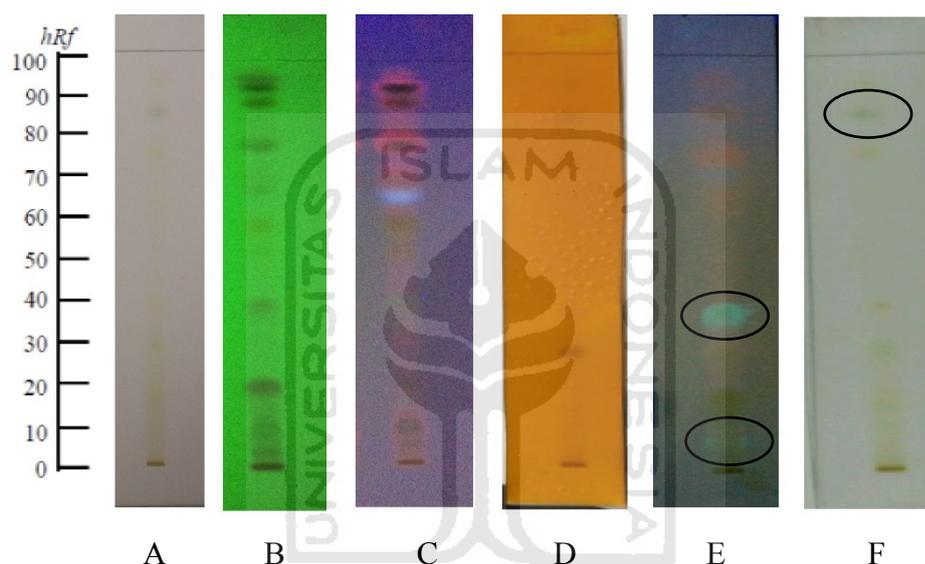
Gambar 4.11 Hasil Uji Fitokima KLT Fraksi 1 dan 2 *Dryopteris marginalis*

Keterangan = (A) sinar tampak, (B) UV_{254} , (C) UV_{366} , (D) setelah disemprot *dragendroff*, (E) setelah di semprot AlCl_3 , (F) setelah disemprot *Liebermann Burchard*

Tabel 4.6 Hasil Uji Fitokima KLT Fraksi 1 dan 2 *Dryopteris marginalis*

Bercak	hRf	UV_{366}	Pereaksi Semprot			Senyawa
			<i>Dragendroff</i>	AlCl_3	<i>Liebermann Burchard</i>	
Kuning	100	Tidak Berpendar	-	-	-	-
Hijau Muda	98	Tidak Berpendar	-	-	Hijau Tua	Steroid

Hasil uji KLT fraksi 1 dan 2 *Dryopteris marginalis* terdapat 2 bercak. Pada identifikasi menggunakan pereaksi AlCl_3 pada KLT tidak menunjukkan perubahan warna pada sinar tampak menjadi kuning terang dan pada sinar UV_{366} (gambar 4.11). Identifikasi steroid dengan menggunakan *Liebermann Burchard* ditunjukkan pada hRf 98 yakni terjadi perubahan warna menjadi hijau tua. Ekstrak etil asetat tidak mengandung alkaloid hal ini dibuktikan pada KLT (gambar 4.11) tidak menunjukkan perubahan warna pada spot spot KLT.



Gambar 4.12 Hasil Uji Fitokima KLT Fraksi 9 *Dryopteris marginalis*
Keterangan = (A) sinar tampak, (B) UV_{254} , (C) UV_{366} , (D) setelah disemprot *dragendroff*, (E) setelah di semprot AlCl_3 , (F) setelah disemprot *Liebermann Burchard*

Tabel 4.7 Hasil Uji Fitokima KLT Fraksi 9 *Dryopteris marginalis*

Bercak	hRf	UV_{366}	Pereaksi Semprot			Senyawa
			<i>Dragendroff</i>	AlCl_3	<i>Liebermann Burchard</i>	
Cokelat	10	Tidak Bercak	-	Bercak biru	-	Flavonoid
Cokelat	30	Tidak Bercak	Cokelat	-	-	-
Cokelat Muda	35	Tidak Bercak	-	Bercak biru	-	Flavonoid
Hijau Muda	85	Tidak Bercak	-	-	Hijau Tua	Steroid

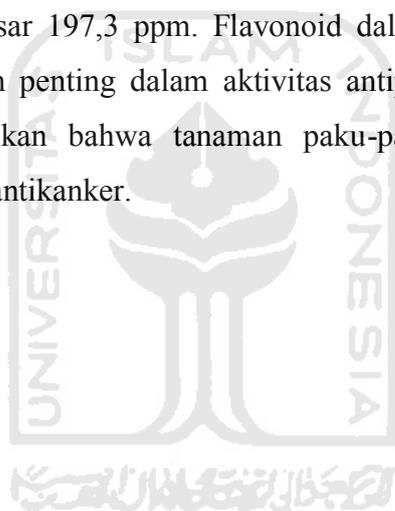
Hasil uji KLT fraksi 9 etil asetat *Dryopteris marginalis* terdapat 4 bercak. Pada identifikasi menggunakan pereaksi $AlCl_3$ pada hRf 10 dan 35 menunjukkan perubahan warna pada sinar tampak menjadi kuning terang dan pada sinar UV_{366} bercak berpendar biru. Identifikasi steroid dengan menggunakan *Liebermann Burchard* ditunjukkan pada hRf 85 yakni terjadi perubahan warna menjadi hijau tua. Sedangkan pada ekstrak etil asetat tidak mengandung alkaloid hal ini dibuktikan pada hRf 30 pada bercak berubah warna menjadi coklat, hasil positif alkaloid apabila terjadi perubahan warna bercak menjadi berwarna merah.

Sel kanker berkembang untuk menghindari sinyal apoptosis untuk dapat bertahan hidup. Sedangkan induksi dari apoptosis atau kematian sel merupakan salah satu metode pengobatan dari kanker. Pada penelitian ini, dengan menggunakan ekstrak etil asetat tanaman paku *Dryopteris marginalis* menunjukkan adanya apoptosis sel MCF-7 ditandai dengan konsentrasi sebesar 342,383 ppm dapat membunuh 50% sel kanker MCF-7. *American National Cancer Institute* (NCI) menyatakan kategori nilai IC_{50} dapat dinyatakan memiliki aktivitas antiproliferatif apabila memiliki nilai $IC_{50} < 30$ ppm, namun terdapat penelitian yang menyatakan bahwa ekstrak kasar yang memiliki nilai $IC_{50} < 1000$ ppm memiliki potensi sebagai agen antikanker⁽³⁶⁾. Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* menunjukkan positif mengandung steroid, dan flavonoid. Senyawa flavonoid memiliki mekanisme aksi dapat menginduksi apoptosis serta menurunkan ekspresi Bcl-2 yang merupakan penginisiasi sel kanker payudara dapat di tekan pada sel MCF-7⁽⁷⁾.

Terdapat jenis flavonoid yang bersifat toksik terhadap sel Vero (normal) dan meningkatkan proliferasi sel. Jenis Flavonoid yang bersifat toksik terhadap sel normal adalah quercetin dan 3-hidroxyflavone. Meskipun belum banyak penelitian mengenai toksisitas flavonoid terhadap sel normal, namun toksisitas flavonoid terhadap sel normal diperkirakan flavonoid dapat meningkatkan aktivitas radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxydative Species*) dalam sel hal ini berkaitan terhadap aktivitas ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* terhadap sel Vero⁽³⁷⁾. Jenis flavonoid yang bersifat meningkatkan proliferasi sel adalah quercetin dan rutin.

Pada penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etil asetat tanaman *Dryopteris marginalis* bersifat sitotoksik dan bersifat tidak selektif dalam menghambat proliferasi sel MCF-7 serta sel Vero.

Famili *Dryopteridaceae* lainnya yang memiliki aktivitas antiproliferatif antara lain *Dryopteris fragrans*, *Dryopteris erythrosora*, dan *Dryopteris villarii*. Ekstrak *Dryopteris fragrans* menunjukkan aktivitas antiproliferatif dan berpotensi sebagai agen antikanker MCF-7 dengan MTT assay. Nilai IC₅₀ ekstrak *Dryopteris fragrans* didapatkan sebesar 24,14ppm⁽³⁹⁾. Penelitian serupa pada ekstrak *Acrostichum aureum* L menunjukkan aktivitas antiproliferatif dan berpotensi sebagai agen antikanker MCF-7 dengan MTT assay. Nilai IC₅₀ ekstrak *Dryopteris fragrans* didapatkan sebesar 197,3 ppm. Flavonoid dalam ekstrak *Acrostichum aureum* L memiliki peran penting dalam aktivitas antiproliferatif⁽⁴⁰⁾. Penelitian tersebut dapat membuktikan bahwa tanaman paku-pakuan memiliki potensi pengembangan baru obat antikanker.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antiproliferatif paling tinggi dibandingkan dengan fraksi-fraksi etil asetat lainnya terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC₅₀ sebesar 342,383 ppm.
2. Ekstrak etil asetat memiliki toksisitas yang sangat tinggi terhadap sel Vero, sehingga ekstrak etil asetat *Dryopteris marginalis* bersifat tidak selektif dalam menghambat proliferasi sel Vero (normal) maupun sel MCF-7.

5.2 Saran

1. Dilakukan uji aktivitas antikanker lanjutan terhadap jenis sel kanker yang berbeda secara *in vitro*.
2. Isolasi senyawa steroid dan flavonoid yang memiliki aktivitas antiproliferatif.
3. Dilakukan uji standarisasi ekstrak *Dryopteris marginalis*.

DAFTAR PUSTAKA

- (1) DiPiro J.et.al. *Pharmacotherapy a Pathophysiologic Approach*. McGraw-Hill Medical. New York, 2008; Hal: 318
- (2) Anonim, *Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan Republik Indonesia*. Kementrian Kesehatan RI., 2015; Hal: 4-6
- (3) Anonim. Cancer. World Health Organization 2015. Diambil dari <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> diakses 6 November 2016
- (4) Arini DID, Kinho J., Keragaman Jenis Tumbuhan Paku (Pteridophyta) di Cagar Alam Gunung Ambang Sulawesi Utara. *Info BPPK Manado*. 2012;vol 2. Hal: 18-19
- (5) Kathirvel A., Sujatha V. Phytochemical Studies, Antioxidant Activities and Identification of Active Compounds using GC-MS of *Dryopteris cochleata* Leaves. *Arabian Journal of Chemistry*. 2012;vol 30. Hal: 4
- (6) Cao J,et.al. Characterization of Flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and Evaluation of their Antioxidant, Anticancer and Acetylcholinesterase Inhibition Activities. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; vol 31. Hal: 244-249
- (7) Davies NM.,et.al. *Flavonoid Pharmacokinetics Method of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology*; Wiley. 2013. hal: 13
- (8) United State Departement of Agriculture. *Dryopteris marginalis* classification available at <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=drma4>, Accessed February 7,2016.
- (9) Marginal Wood Fern. *Dryopteris marginalis* (L) Grav. Available at <http://hardyferlibrary.com/ferns/listSpecies.cfm?Auto=14>, Accessed February 7, 2016
- (10) 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
- (11) Goodwin TM. *Chemistry and Biochemistry of Plants Pigments*, Academic Press, London.1986; hal: 39
- (12) Robinson T. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*, ITB Bandung.1995; hal: 70
- (13) Zhao.M.et.al. Immunomodulatory and Anticancer Activities of Flavonoids Extracted from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp. *International Immunopharmacology*. 2007; hal:162-164
- (14) Tang,Jessica.et.al. Delphinidin and Cyanidin Exhibit Antiproliferative and Apoptotic Effects in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. 2015;vol(2).hal: 83
- (15) Hamedeyazdan,Sanz.et.al. Antiproliferative Activity of *Marrubium persicum* extract in the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*. 2012;vol(13). hal: 5843

- (16) Fitrya., Anwar L., Uji Aktivitas Antikanker secara In Vitro dengan Sel Murine P-388 Senyawa Flavonoid dari Fraksi Etil Asetat Akar Tumbuhan Tunjuk Langit (*Helmynthostachis zeylanica* (Linn) Hook), *Jurnal Penelitian Sains*.2009;vol 12. Hal: 1-4
- (17) Salem,AF., et.al. Cigarette Smoke Metabolically Promotes Cancer, via Autophagy and Premature Aging in the host Stromal Microenvironment. *Landes Bioscience*. 2013;vol12 (15) . Hal: 818
- (18) Harmann,C.et.al. Atypical Hyperplasia of the Breast-Risk Assessment and Management Options. *NEJM*. 2015;vol 372(1). Hal: 78.
- (19) Hudis, C.,et.al. Trastuzumab-Mechanism of Action and Use in Clinical Practice, *NEJM*. 2007;vol(357). Hal: 30
- (20) ATCC, 2008, Cell Biology, ATCC® Number: HTB-22TM, Designations: MCF-7,
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>, diakses tanggal 2 Februari 2016.
- (21) MCF-7 Cells Human Breast Adenocarcinoma Cell Line, MCF-7 information available at <http://www.mcf7.com>, diakses tanggal 20 Februari 2016
- (22) Vero Cell, ATCC available at <http://www.atcc.org/Product/All/CCL-81.aspx#characteristics>, diakses tanggal 7 Februari 2016
- (23) Anonim. *Farmakope Indonesia ed.4*. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 1995; Hal: 48
- (24) Coll JC. dan Bowden BF. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixture, *J. Nat Prod*. 1986;49(5), hal: 934-936
- (25) Kusumadewi SW. Uji Efek Antiproliferasi Senyawa Eugenol terhadap Kultur Sel Kanker Serviks (*Hella CELL LINE*). [Skripsi]. Jakarta:Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah;2011. Hal: 21-27
- (26) Hughes D. dan Mehmet J. *Cell Proliferation and Apoptosis*, Garland Science, University of London, London United Kingdom. 2013. Hal: 31
- (27) Stockert JC. et.al. MTT assay for cell viability: Intracellular Localization of the Formazan Product is in Lipid Droplets. *Elsivier*. 2012;vol(114) hlmn.786
- (28) Sava C. dan Sirbu R. Analytical Study of the Determination of Flavonoids in Black Sea Algae, *OUAC*, 2010; 21 (1). Hal: 29-34
- (29) Harborne JB. *Phytochemical Methods*, In Niksolihin, S., *Metode Fitokimia*. Penerbit ITB Bandung. 1987;4-158. Hal: 234
- (30) National Cancer Institute, breast Cancer available at <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>, Accessed September 14, 2016
- (31) Ansel HC. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi edisi IV*, diterjemahkan oleh Farida Ibrahim. UI Press Jakarta.1989; hal: 206,255,259, 261-269
- (32) Anonim, *Farmakope Herbal Indonesia*, Direktorat Jenderal POM-Depkes RI, Jakarta. 2000; hal 234
- (33) Coll JC. dan Bowden BF. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixture, *J. Nat. Prod.*, 1986;49(5). Hal: 934-936

- (34) Tripathy *et.al.* Induction of Apoptosis and Reduction of Endogenous Glutathione Level by the Ethyl Acetate Soluble Fraction of the Methanol Extract of the Roots of *Potentilla fulgens* in Cancer Cells, *Plos one.* 2015;10.1371. hal: 1-5
- (35) Hussain, SZ. dan Maqbool. GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *International Journal Curr Science*, 2014;13. hal: 116-126
- (36) Yetri E, Leonardus BS, Kardono, Partomuan S. Tablet Formulation of The Ethyl Acetate Soluble Extract of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves. *Asian Journal of Applied Sciences.* 2014; 2:327-328
- (37) Matsuo M, Sasaki N, Saga K. Cytotoxicity of Flavonoids toward Cultured Normal Human Cells. *Pharmaceutical Society of Japan.* 2005; 28: 253-254
- (38) Srivastava S, dkk. Assesment of the Role of Flavonoids for Inducing Osteoblast Differentiation in Isolated Mouse Bone Marrow Derived. *Elsivier.* 2013; 4:30
- (39) Freshney RI. *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique and Specialized Application 6th edition*, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010; hal: 144, 373, 600
- (40) Li Z. dan Wang C. ChemInform Abstract: Phytochemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Dryopteris*. *Research Gate.* 2015;vol 12. Hal: 1158
- (41) Uddin SJ. Evaluation of Cytotoxic Activity of Patriscabratine, Tetrasosane, and Various Flavonoids Isolated from the Bangladeshi Medicinal Plant *Acrostichum aureum*. *Pharmaceutical Biology*, 2012; 50(10). Hal:1276

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 : 34/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 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 Etil Asetat Tumbuhan Paku *Dryopteris marginalis* (L) Grav. terhadap Kultur Sel Kanker Payudara MCF-7 dengan MTT-Assay.”

Peneliti Utama : Karina Savitri
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, 26 Mei 2016

Ketua
Chairman

Prof. Dr. Dra. Winyatun Lestariyana, 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 tengah 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

Surat Determinasi Tanaman Paku *Dryopteris marginalis*



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN

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

SURAT KETERANGAN

Nomor : 0753/S.Tb./II/2016

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

Nama : Karina Savitri
NIM : 12613322
Asal instansi : Fakultas MIPA - UII Yogyakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan paku dengan hasil sebagai berikut,

NO.	FAMILIA	GENUS	SPESES
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

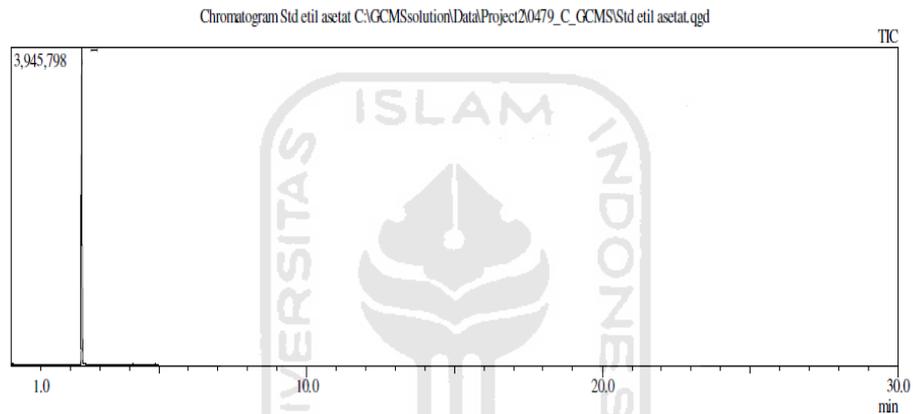
Dr. Purnomo, M.S.
NIP. 195504211982031005

Lampiran 3

Hasil Kromatogram *Gas Chromatography* ekstrak etil asetat tumbuhan paku *Dryopteris marginalis* (L)Grav.

1. Kromatogram Standard Etil Asetat

Sample Information
Analyzed by : Admin
Analyzed : 9/22/2016 9:01:25 AM
Sample Name : Std etil asetat
Sample ID : 1
Injection Volume : 0.10
Data File : C:\GCMSolution\Data\Project20479_C_GCMS\Std etil asetat.qgd
Tuning File : C:\GCMSolution\System\Tune1\Tuning 10052016.qgt



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height
1	2.387	2.350	2.442	7780166	100.00	3915524
				7780166	100.00	3915524

2. Kromatoram Standard Etil Asetat (MS)

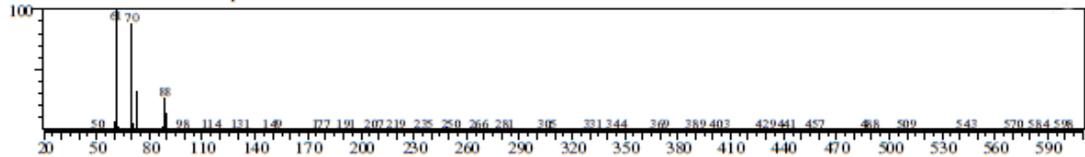
Library

<< Target >>

Line#: 1 R. Time: 2.383 (Scan#: 287) MassPeaks: 333

Raw Mode: Averaged 2.375-2.392 (286-288) Base Peak: 61.00 (1175282)

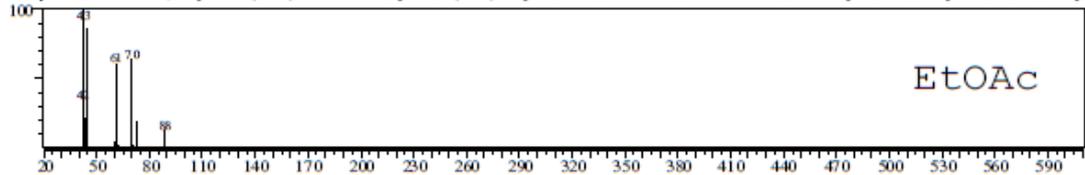
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



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

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

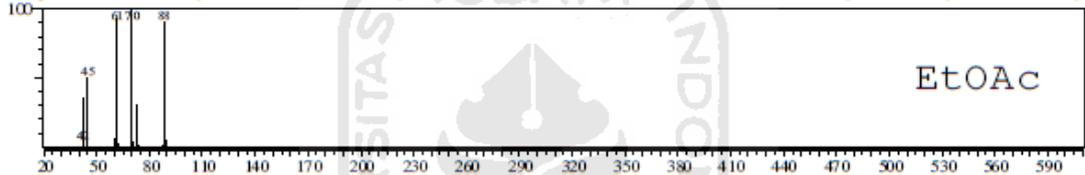
CompName: Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate SS Acetidin SS Acetic ether SS Acetoxyethane SS Ethyl ethanoate SS Ethyl



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

SI: 92 Formula: C4 H8 O2 CAS: 141-78-6 MolWeight: 88 RetIndex: 0

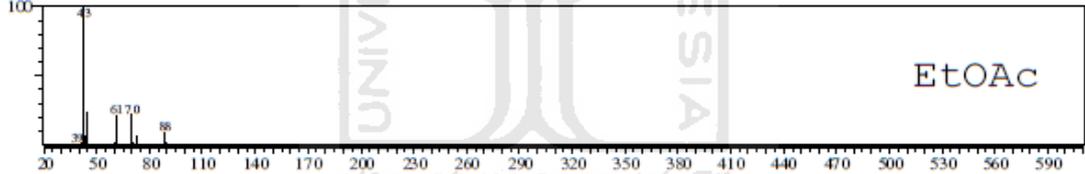
CompName: Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate SS Acetidin SS Acetic ether SS Acetoxyethane SS Ethyl ethanoate SS Ethyl



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

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

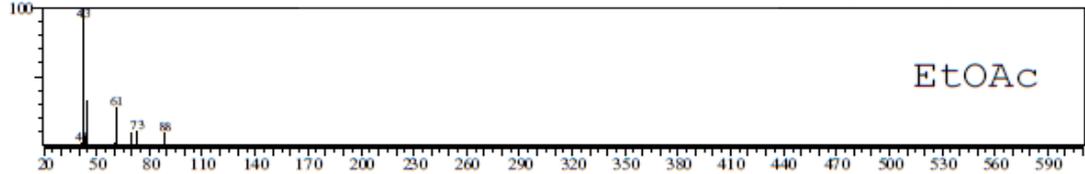
CompName: Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate SS Acetidin SS Acetic ether SS Acetoxyethane SS Ethyl ethanoate SS Ethyl



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

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

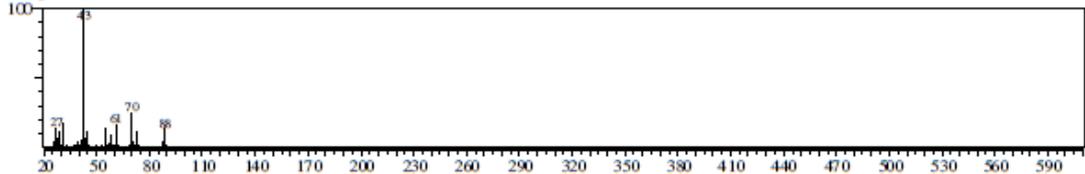
CompName: Acetic acid, ethyl ester (CAS) Acetic acid ethyl ester (CAS) Ethyl acetate SS Acetidin SS Acetic ether SS Acetoxyethane SS Ethyl ethanoate SS Ethyl



Hit#: 5 Entry: 3785 Library: WILEY7.LIB

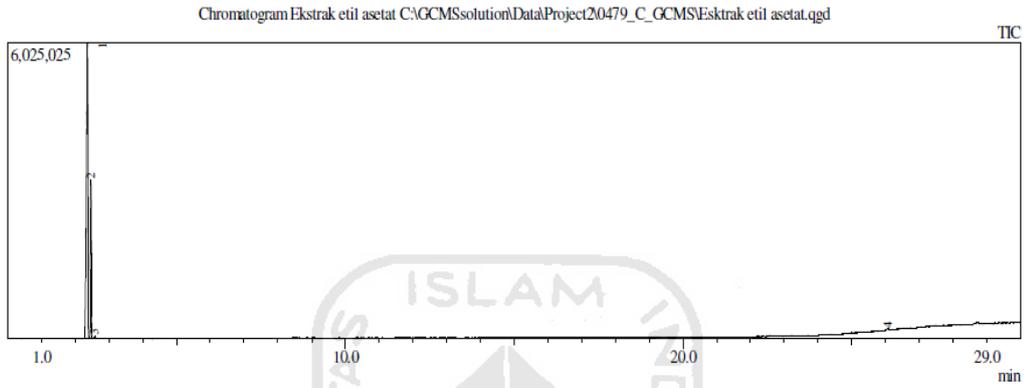
SI: 83 Formula: C4 H8 O2 CAS: 0-00-0 MolWeight: 88 RetIndex: 0

CompName:

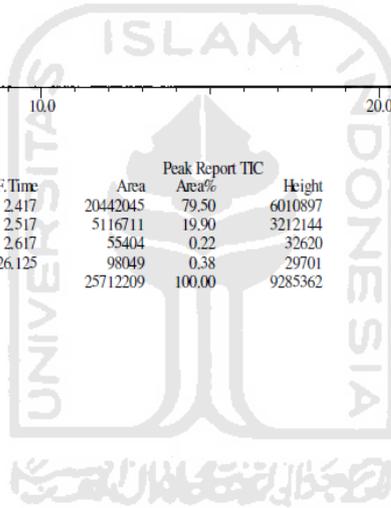


3. Kromatogram Ekstrak Etil Asetat *Dryopteris marginalis*

Sample Information
 Analyzed by : Admin
 Analyzed : 9/22/2016 9:09:23 AM
 Sample Name : Ekstrak etil asetat
 Sample ID : 2
 Injection Volume : 0.10
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project20479_C_GCMS\Ekstrak etil asetat.qgd
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\Tuning 10052016.qgt



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height
1	2.365	2.275	2.417	20442045	79.50	6010897
2	2.463	2.417	2.517	5116711	19.90	3212144
3	2.580	2.550	2.617	55404	0.22	32620
4	26.072	26.017	26.125	98049	0.38	29701
				25712209	100.00	9285362



4. Kromatogram Ekstrak Etil Asetat *Dryopteris marginalis* MS

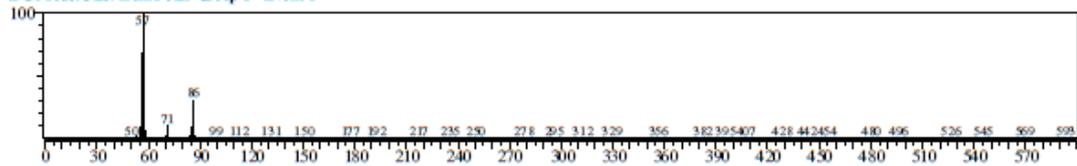
Library

<< Target >>

Line#:1 RTime: 2.325 Scan#:280 MassPeaks:346

RawMode:Averaged 2.317-2.333(279-281) BasePeak:57.05(5484190)

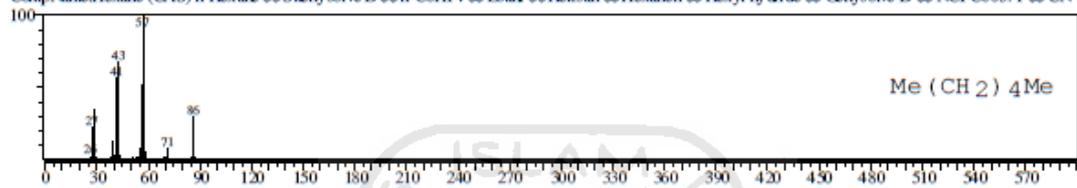
BGMode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#1 Entry:3574 Library:WILEY7.LIB

SE:96 Formula:C6H14 CAS:110-54-3 MolWeight:86 RefIndex:0

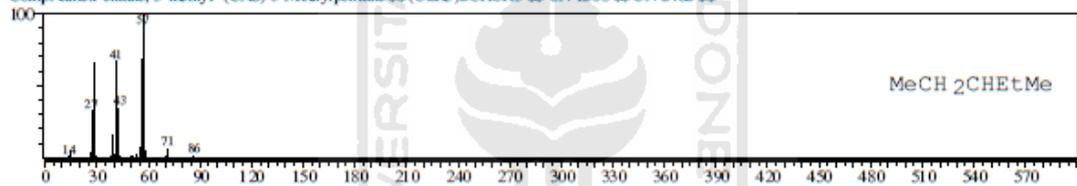
CompName:Hexane (CAS) n-Hexane \$\$Stethyl solve B \$\$ n-C6H14 \$\$ Esani \$\$Heksan \$\$Hexanen \$\$Hexyl hydride \$\$ Gettysolve-B \$\$ NCI-C60571 \$\$ UN:



Hit#2 Entry:3599 Library:WILEY7.LIB

SE:94 Formula:C6H14 CAS:96-14-0 MolWeight:86 RefIndex:0

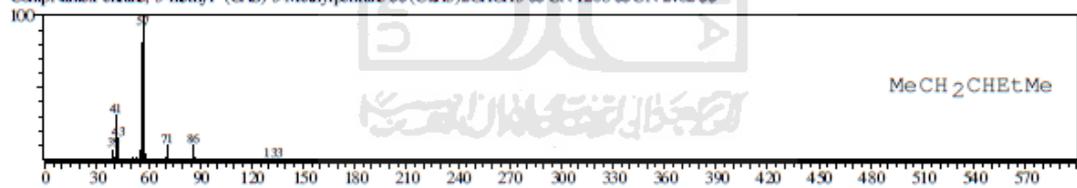
CompName:3-Methylpentane (CAS) 3-Methylpentane \$\$ (C2H5)2CHCH3 \$\$ UN 1208 \$\$ UN 2462 \$\$



Hit#3 Entry:3602 Library:WILEY7.LIB

SE:94 Formula:C6H14 CAS:96-14-0 MolWeight:86 RefIndex:0

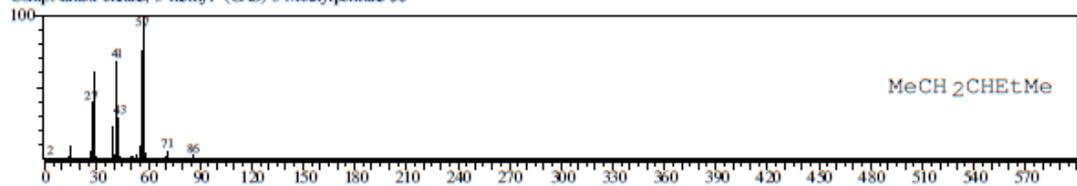
CompName:3-Methylpentane (CAS) 3-Methylpentane \$\$ (C2H5)2CHCH3 \$\$ UN 1208 \$\$ UN 2462 \$\$



Hit#4 Entry:3596 Library:WILEY7.LIB

SE:93 Formula:C6H14 CAS:96-14-0 MolWeight:86 RefIndex:0

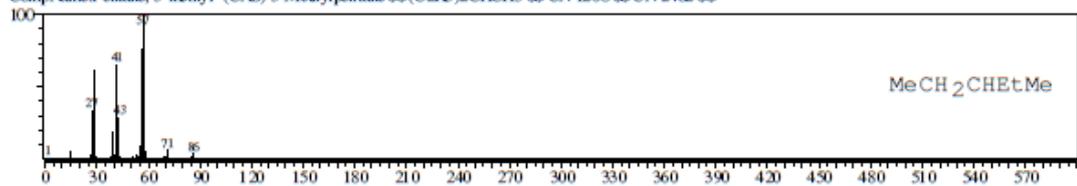
CompName:3-Methylpentane (CAS) 3-Methylpentane \$\$



Hit#5 Entry:3597 Library:WILEY7.LIB

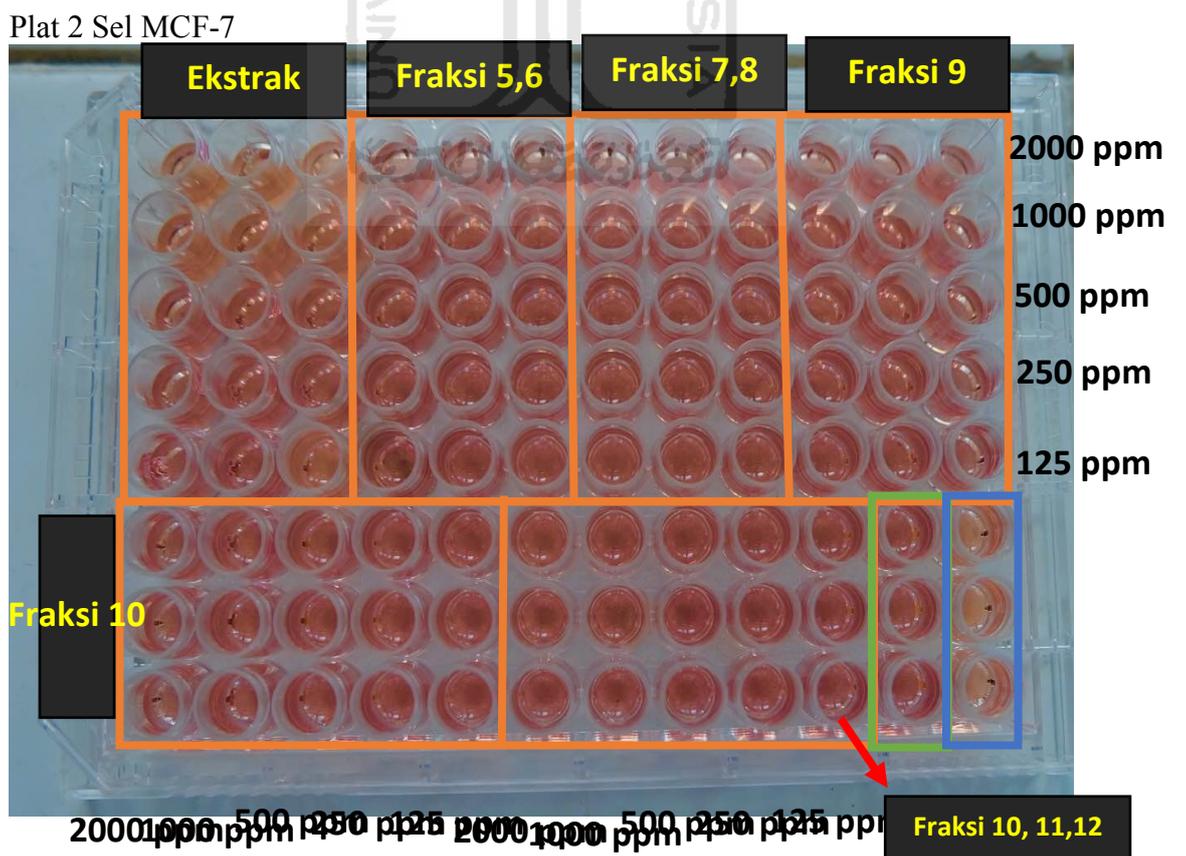
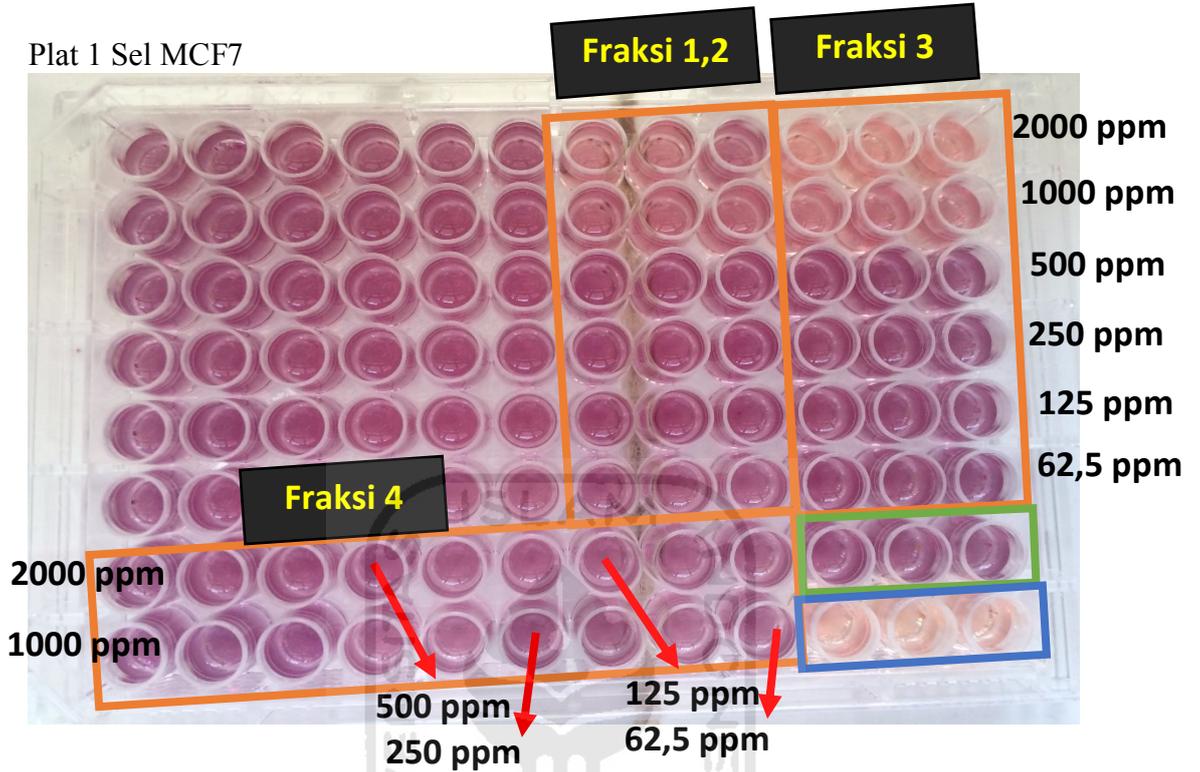
SE:93 Formula:C6H14 CAS:96-14-0 MolWeight:86 RefIndex:0

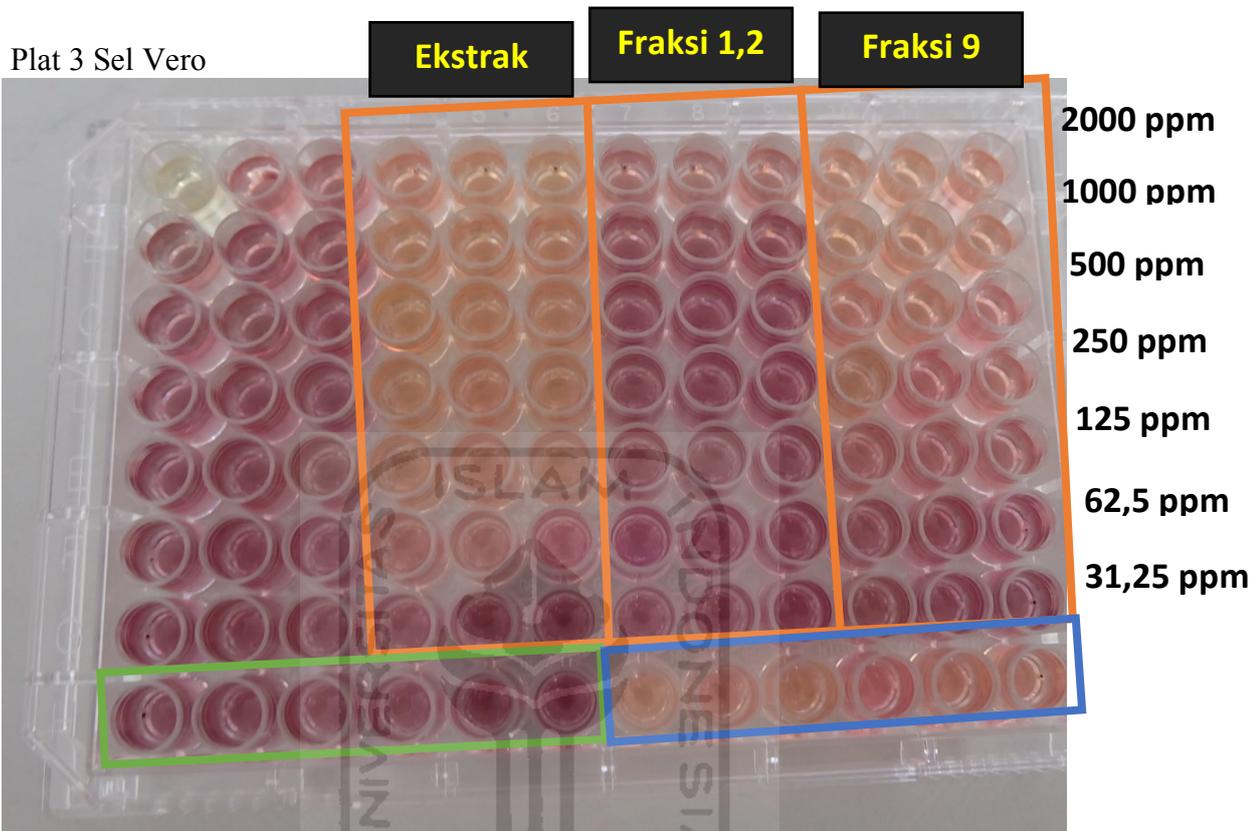
CompName:3-Methylpentane (CAS) 3-Methylpentane \$\$ (C2H5)2CHCH3 \$\$ UN 1208 \$\$ UN 2462 \$\$



Lampiran 4

Hasil Aktivitas Antiproliferatif Sel MCF-7 dan Sel Vero





Keterangan



: Sampel Ekstrak dan Fraksi



: Kontrol Sel (sel+media)



: Kontrol Media (MTT)

Lampiran 5

Gambar Pola Platting Sampel Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Tumbuhan Paku *Dryopteris marginalis* pada sumuran

EKS (1)	EKS (1)	EKS (1)	F5,6 (1)	F5,6 (1)	F5,6 (1)	F7,8 (1)	F7,8 (1)	F7,8 (1)	F9 (1)	F9 (1)	F9 (1)
EKS (2)	EKS (2)	EKS (2)	F5,6 (2)	F5,6 (2)	F5,6 (2)	F7,8 (2)	F7,8 (2)	F7,8 (2)	F9 (2)	F9 (2)	F9 (2)
EKS (3)	EKS (3)	EKS (3)	F5,6 (3)	F5,6 (3)	F5,6 (3)	F7,8 (3)	F7,8 (3)	F7,8 (3)	F9 (3)	F9 (3)	F9 (3)
EKS (4)	EKS (4)	EKS (4)	F5,6 (4)	F5,6 (4)	F5,6 (4)	F7,8 (4)	F7,8 (4)	F7,8 (4)	F9 (4)	F9 (4)	F9 (4)
EKS (5)	EKS (5)	EKS (5)	F5,6 (5)	F5,6 (5)	F5,6 (5)	F7,8 (5)	F7,8 (5)	F7,8 (5)	F9 (5)	F9 (5)	F9 (5)
F10 (1)	F10 (1)	F10 (1)	F10 (4)	F10 (4)	F10 (4)	F11 (2)	F11 (2)	F11 (2)	F11 (5)	F11 (5)	F11 (5)
F10 (2)	F10 (2)	F10 (2)	F10 (5)	F10 (5)	F10 (5)	F11 (3)	F11 (3)	F11 (3)	KM	KM	KM
F10 (3)	F10 (3)	F10 (3)	F11 (1)	F11 (1)	F11 (1)	F11 (4)	F11 (4)	F11 (4)	KS	KS	KS

						F1,2 (1)	F1,2 (1)	F1,2 (1)	F3 (1)	F3 (1)	F3 (1)
						F1,2 (2)	F1,2 (2)	F1,2 (2)	F3 (2)	F3 (2)	F3 (2)
						F1,2 (3)	F1,2 (3)	F1,2 (3)	F3 (3)	F3 (3)	F3 (3)
						F1,2 (4)	F1,2 (4)	F1,2 (4)	F3 (4)	F3 (4)	F3 (4)
						F1,2 (5)	F1,2 (5)	F1,2 (5)	F3 (5)	F3 (5)	F3 (5)
						F1,2 (6)	F1,2 (6)	F1,2 (6)	F3 (6)	F3 (6)	F3 (6)
F4 (1)	F4 (1)	F4 (1)	F4 (3)	F4 (3)	F4 (3)	F4 (5)	F4 (5)	F4 (5)	KM	KM	KM
F4 (2)	F4 (2)	F4 (2)	F4 (4)	F4 (4)	F4 (4)	F4 (6)	F4 (6)	F4 (6)	KS	KS	KS

Pola plating sampel ekstrak dan fraksi etil asetat pada sel Vero dengan MTT assay

EKS (1)	EKS (1)	EKS (1)	F1,2 (1)	F1,2 (1)	F1,2 (1)	F9 (1)	F9 (1)	F9 (1)			
EKS (2)	EKS (2)	EKS (2)	F1,2 (2)	F1,2 (2)	F1,2 (2)	F9 (2)	F9 (2)	F9 (2)			
EKS (3)	EKS (3)	EKS (3)	F1,2 (3)	F1,2 (3)	F1,2 (3)	F9 (3)	F9 (3)	F9 (3)			
EKS (4)	EKS (4)	EKS (4)	F1,2 (4)	F1,2 (4)	F1,2 (4)	F9 (4)	F9 (4)	F9 (4)			
EKS (5)	EKS (5)	EKS (5)	F1,2 (5)	F1,2 (5)	F1,2 (5)	F9 (5)	F9 (5)	F9 (5)			
EKS (6)	EKS (6)	EKS (6)	F1,2 (6)	F1,2 (6)	F1,2 (6)	F9 (6)	F9 (6)	F9 (6)			
						KM	KM	KM	KS	KS	KS
						KM	KM	KM	KS	KS	KS

Keterangan:

- EKS = Sampel ekstrak etil asetat
 F1,2 = Fraksi 1 dan 2
 F3 = Fraksi 3
 F4 = Fraksi 4
 F5,6 = Fraksi 5 dan 6
 F7,8 = Fraksi 7 dan 8
 F9 = Fraksi 9
 F10 = Fraksi 10
 F11 = Fraksi 11, 12, dan 13
 1 = Konsentrasi sampel 1000 ppm
 2 = Konsentrasi sampel 500 ppm
 3 = Konsentrasi sampel 250 ppm
 4 = Konsentrasi sampel 125 ppm
 5 = Konsentrasi sampel 62,5 ppm
 6 = Konsentrasi sampel 31,25 ppm
 KM = Kontrol media
 KS = Kontrol sel

Lampiran 6

Tabel Absorbansi, Persentase Kematian dan Grafik Sel MCF-7 & Sel Vero
Sel MCF-7

1. Ekstrak Etil Asetat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Ekstrak Etil Asetat	2000	0,189	0,179	0,184	0,005	17,761	82,239	342,383 ppm
	1000	0,246	0,289	0,268	0,022	38,847	61,153	
	500	0,295	0,288	0,292	0,004	44,907	55,093	
	250	0,319	0,321	0,320	0,001	52,104	47,896	
	125	0,298	0,363	0,330	0,033	54,756	45,244	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,541	1	0,117
2	0,432	2	0,11
3	0,556	3	0,113
Rata-rata	0,510	Rata-rata	0,114
SD	0,0553	SD	0,002

2. Fraksi 1 dan 2

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Fraksi 1 dan 2	2000	0,242	0,258	0,250	0,008	33,162	66,837	1.502,749 ppm
	1000	0,389	0,392	0,391	0,002	64,087	35,913	
	500	0,496	0,512	0,504	0,008	89,068	10,932	
	250	0,546	0,539	0,543	0,004	97,542	2,458	
	125	0,564	0,546	0,555	0,009	100,293	-0,293	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,527	1	0,103
2	0,555	2	0,093
3	0,579	3	0,102
Rata-rata	0,554	Rata-rata	0,099
SD	0,021	SD	0,004

3. Fraksi 3

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Fraksi 3	2000	0,134	0,131	0,133	0,002	7,300	92,699	1.101,522 ppm
	1000	0,325	0,337	0,331	0,006	50,990	49,100	
	500	0,458	0,451	0,455	0,004	78,173	21,827	
	250	0,518	0,523	0,521	0,003	92,699	7,300	
	125	0,560	0,569	0,565	0,005	102,384	-2,3844	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,527	1	0,103
2	0,555	2	0,093
3	0,579	3	0,102
Rata-rata	0,554	Rata-rata	0,099
SD	0,021	SD	0,004

4. Fraksi 4

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Fraksi 4	2000	0,514	0,521	0,518	0,004	92,039	7,960	12.747,62 ppm
	1000	0,534	0,535	0,535	0,001	95,781	4,219	
	500	0,547	0,541	0,544	0,003	97,872	2,128	
	250	0,549	0,545	0,547	0,002	98,533	1,467	
	125	0,551	0,551	0,551	0	99,413	0,587	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,527	1	0,103
2	0,555	2	0,093
3	0,579	3	0,102
Rata-rata	0,554	Rata-rata	0,099
SD	0,021	SD	0,004

5. Fraksi 5 dan 6

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Fraksi 5 dan 6	2000	0,447	0,446	0,447	0,001	84,049	15,951	0 ppm
	1000	0,437	0,432	0,435	0,003	81,019	18,981	
	500	0,428	0,425	0,427	0,002	78,998	21,002	
	250	0,421	0,425	0,423	0,002	78,114	21,886	
	125	0,424	0,416	0,420	0,004	77,357	22,643	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,541	1	0,117
2	0,432	2	0,11
3	0,556	3	0,113
Rata-rata	0,510	Rata-rata	0,114
SD	0,0553	SD	0,002

6. Fraksi 7 dan 8

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Fraksi 7 dan 8	2000	0,455	0,456	0,456	0,001	86,322	13,678	0 ppm
	1000	0,431	0,434	0,433	0,002	80,513	19,487	
	500	0,421	0,423	0,422	0,001	77,513	22,138	
	250	0,418	0,416	0,417	0,001	76,599	23,401	
	125	0,411	0,412	0,412	0,001	75,210	24,790	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,541	1	0,117
2	0,432	2	0,11
3	0,556	3	0,113
Rata-rata	0,510	Rata-rata	0,114
SD	0,0553	SD	0,002

7. Fraksi 9

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Fraksi 9	2000	0,199	0,195	0,197	0,002	21,044	78,956	1.093,333 ppm
	1000	0,328	0,324	0,326	0,002	53,619	46,380	
	500	0,388	0,391	0,390	0,002	69,655	30,345	
	250	0,417	0,418	0,418	0,001	76,726	23,274	
	125	0,427	0,422	0,425	0,003	78,493	21,507	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,541	1	0,117
2	0,432	2	0,11
3	0,556	3	0,113
Rata-rata	0,510	Rata-rata	0,114
SD	0,0553	SD	0,002

8. Fraksi 10

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Fraksi 10	2000	0,394	0,362	0,378	0,016	66,751	33,249	4.807,213 ppm
	1000	0,409	0,404	0,407	0,003	73,988	26,052	
	500	0,418	0,413	0,416	0,003	76,221	23,779	
	250	0,418	0,424	0,421	0,003	77,609	22,391	
	125	0,429	0,419	0,424	0,005	78,367	21,633	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,541	1	0,117
2	0,432	2	0,11
3	0,556	3	0,113
Rata-rata	0,510	Rata-rata	0,114
SD	0,0553	SD	0,002

9. Fraksi 11, 12, dan 13

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Fraksi 11, 12, dan 13	2000	0,353	0,386	0,370	0,017	64,604	35,396	2.867,211 ppm
	1000	0,437	0,431	0,434	0,003	80,892	19,108	
	500	0,466	0,462	0,464	0,002	88,468	11,532	
	250	0,477	0,481	0,479	0,002	92,256	7,744	
	125	0,510	0,488	0,499	0,011	97,306	2,964	

Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,541	1	0,117
2	0,432	2	0,11
3	0,556	3	0,113
Rata-rata	0,510	Rata-rata	0,114
SD	0,0553	SD	0,002

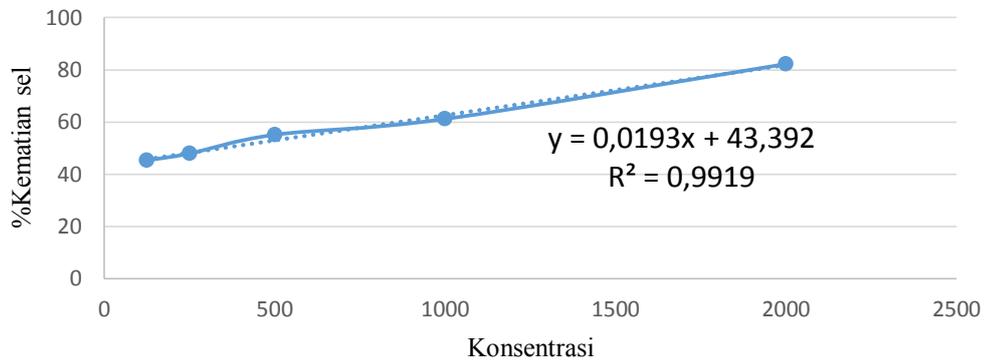
Sel Vero

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Rata-rata	SD	Persen Hidup (%)	Persen Kematian (%)	IC ₅₀
		Rep 1	Rep 2					
Ekstrak Etil Asetat	2000	0,0092	0,094	0,093	0,001	6,949	93,051	0 ppm
	1000	0,132	0,138	0,135	0,003	21,790	78,210	
	500	0,158	0,156	0,157	0,001	29,564	70,436	
	250	0,169	0,166	0,168	0,002	33,274	66,726	
	125	0,174	0,182	0,178	0,004	36,985	63,015	
	62,5	0,182	0,184	0,183	0,001	38,751	61,249	
Fraksi 1 dan 2	2000	0,215	0,225	0,220	0,005	51,826	48,174	2.058,942 ppm
	1000	0,278	0,281	0,280	0,002	72,850	27,150	
	500	0,314	0,311	0,313	0,002	84,511	15,489	
	250	0,331	0,329	0,330	0,001	90,695	9,305	
	125	0,332	0,336	0,334	0,002	92,108	7,892	
	62,5	0,348	0,341	0,345	0,004	95,819	4,181	
Fraksi 9	2000	0,084	0,083	0,084	0,001	3,592	96,408	760,052 ppm
	1000	0,182	0,187	0,185	0,003	39,282	60,718	
	500	0,234	0,237	0,236	0,002	57,303	42,697	
	250	0,268	0,264	0,266	0,002	68,080	31,920	
	125	0,288	0,283	0,286	0,003	74,971	25,029	
	62,5	0,296	0,308	0,302	0,006	80,801	19,199	

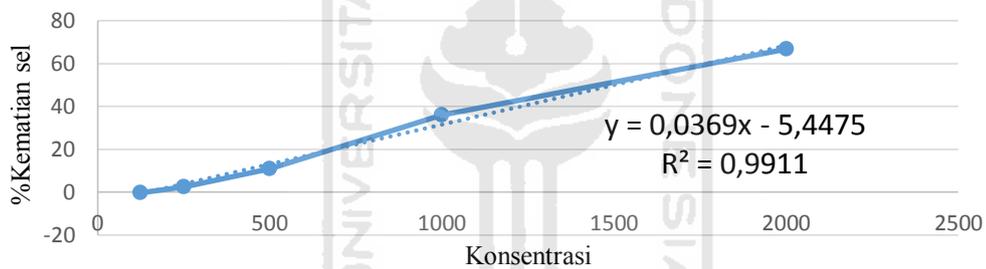
Kontrol sel		Kontrol media	
Replikasi	Absorbansi	Replikasi	Absorbansi
1	0,369	1	0,063
2	0,350	2	0,071
3	0,346	3	0,074
4	0,364	4	0,085
5	0,349	5	0,072
6	0,359	6	0,075
Rata-rata	0,356	Rata-rata	0,073
SD	0,009	SD	0,006



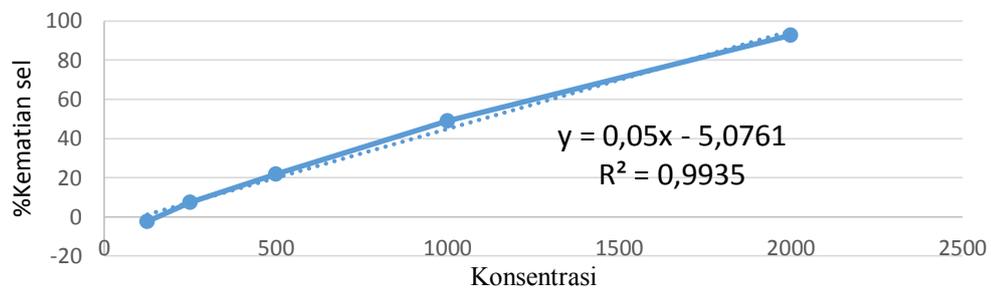
Grafik Konsentrasi Vs % Kematian sel MCF-7 ekstrak etil asetat



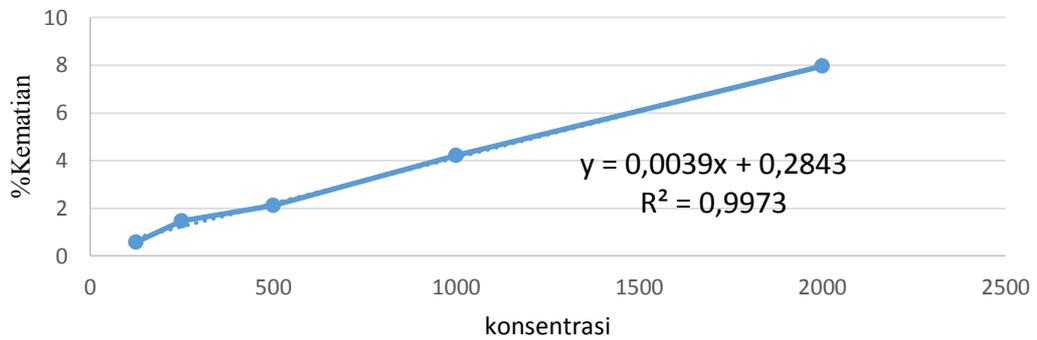
Grafik Konsentrasi Vs % Kematian Sel MCF-7 fraksi 1 dan 2



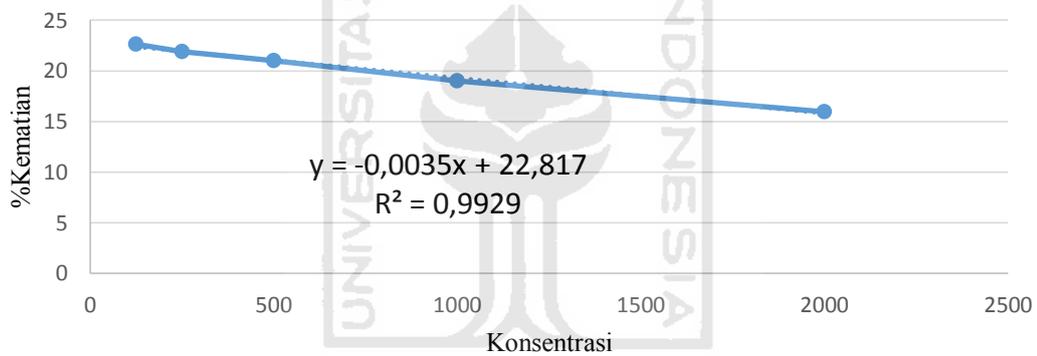
Grafik Konsentrasi Vs % Kematian sel MCF-7 fraksi 3



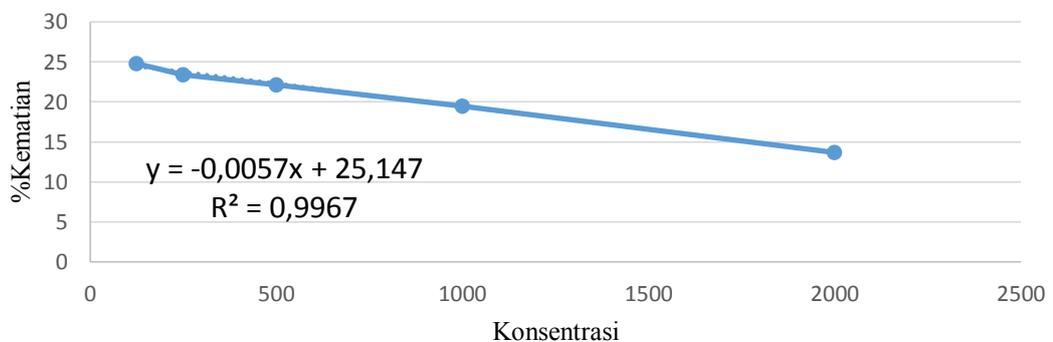
**Grafik konsentrasi Vs % Kematian Sel MCF-7
fraksi 4**



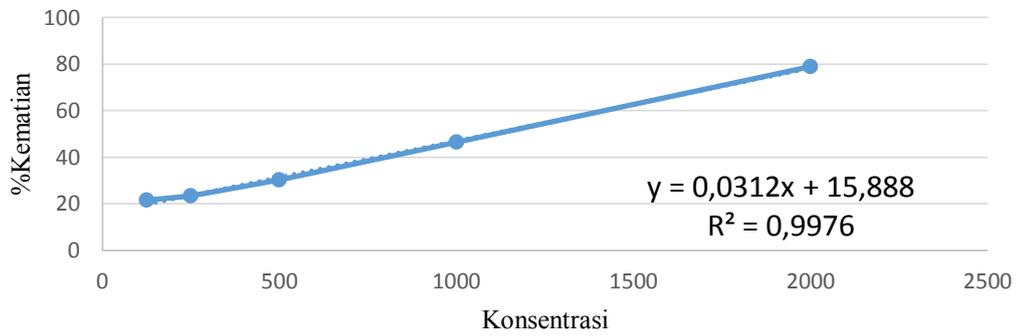
**Grafik Konsentrasi Vs % Kematian Sel MCF-7
fraksi 5 dan 6**



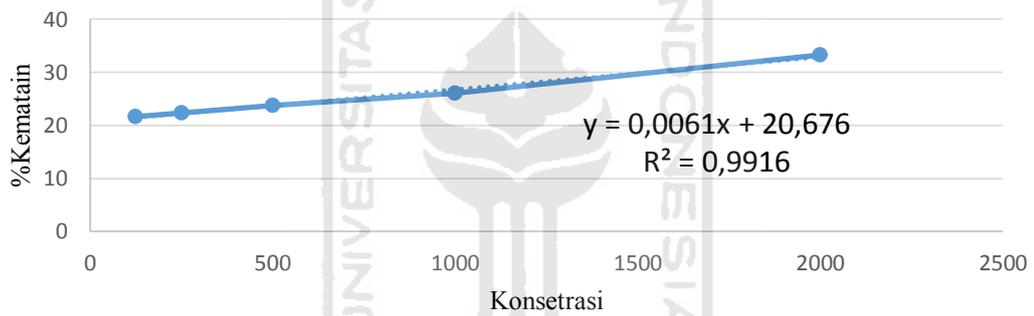
**Grafik Konsentrasi Vs % Kematian Sel MCF-7
fraksi 7 dan 8**



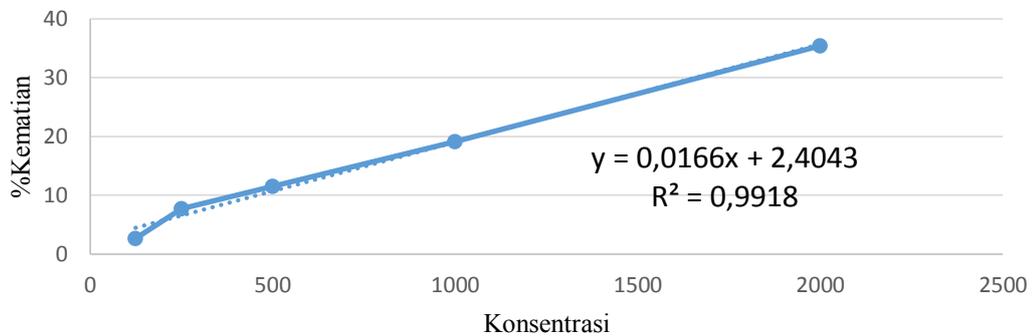
**Grafik Konsentrasi Vs % Kematian Sel MCF-7
fraksi 9**



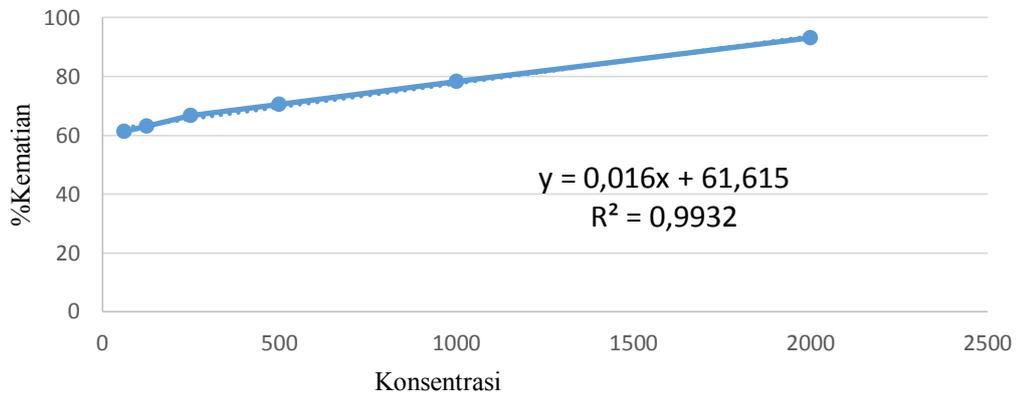
**Grafik Konsentrasi Vs %Kematian Sel MCF-7
fraksi 10**



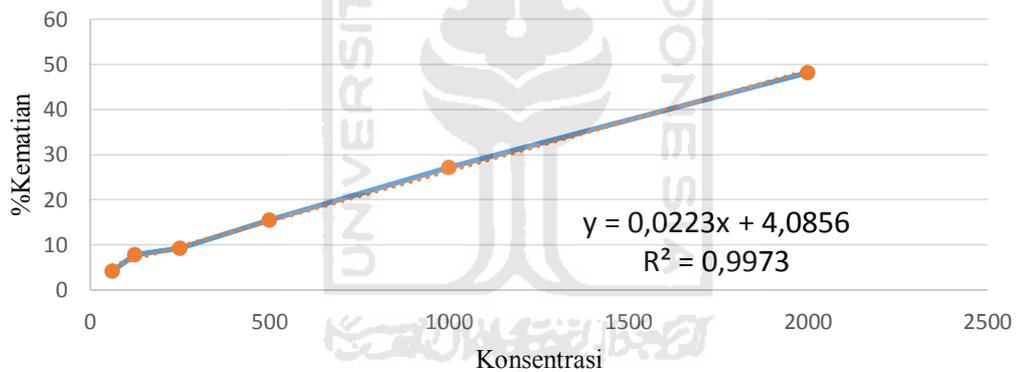
**Grafik Konsentrasi Vs % Kematian Sel MCF-7
fraksi 11, 12 dan 13**



**Grafik Konsentrasi Vs %Persen Kematian Sel Vero
Ekstrak Etil Asetat**



**Grafik Konsentrasi Vs %Kematian Sel Vero
Fraksi 1 dan 2**



**Grafik Konsentrasi Vs %Kematian sel Vero
Fraksi 9**

