



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK
DAN FRAKSI EPIFIT LIKEN *Physcia millegrana* TERHADAP SEL
KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

SKRIPSI

Oleh:

Tinton Agung Laksono

NIM 152210101097

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2019



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK
DAN FRAKSI EPIFIT LIKEN *Physcia millegrana* TERHADAP SEL
KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

SKRIPSI

Oleh:

Tinton Agung Laksono

NIM 152210101097

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

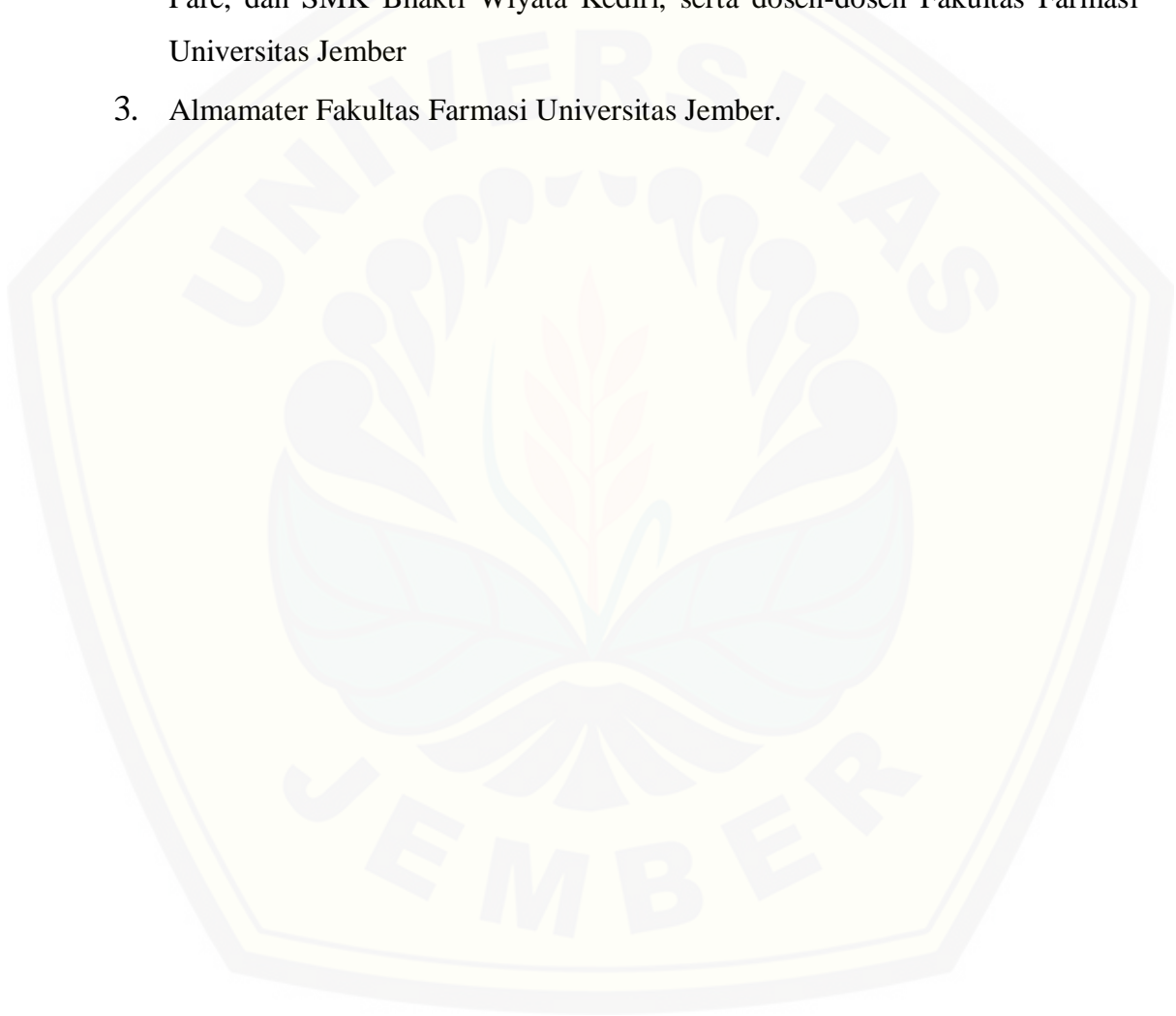
UNIVERSITAS JEMBER

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibu Ambar Minah dan Bapak Riyanto serta almarhum Kakek Musiran, Kakek Atim, Nenek Sukini, dan Nenek Sutini yang tercinta;
2. Guru-guruku dari TK ABA VII Gedangsewu, SDN Gedangsewu I, MTsN I Pare, dan SMK Bhakti Wiyata Kediri, serta dosen-dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.



MOTO

Tidak tahu apa-apa dihari lahir adalah kehendak Allah, tapi sampai akhir hayat
masih tidak tahu apa-apa adalah kesalahan diri sendiri



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Tinton Agung Laksono

NIM : 152210101097

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Epifit Liken *Phyiscia millegrana* terhadap sel kanker payudara (MCF-7)" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 15 Januari 2019

Yang menyatakan,

Tinton Agung Laksono

NIM 152210101097

SKRIPSI

**SKRINING FITOKIMA DAN UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAN
FRAKSI EPIFIT LIKEN *Physcia millegrana* TERHADAP SEL KANKER
PAYUDARA (MCF-7)**

Oleh:

Tinton Agung Laksono

NIM 152210101097

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Ari Satia Nugraha

Dosen Pembimbing Anggota : Dwi Koko Pratoko

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Epifit Liken *Physcia millegrana* terhadap sel kanker payudara (MCF-7)" karya Tinton Agung Laksono telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 31 Januari 2019

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Ari S. N., SF., GDipSc., MSc-Res., PhD., Apt.
NIP 197807212003121001

Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP 198504282009121004

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm
NIP 198204062006042002

Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt
NIP 198304282008122004

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Epifit Liken *Physcia millegrana* terhadap sel kanker payudara (MCF-7); Tinton Agung Laksono, 152210101097; 2019; 63 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kanker adalah pertumbuhan sel yang tidak terkontrol dan bersifat invasif terhadap sel normal disekitarnya. Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang paling mematikan khususnya bagi wanita. Berdasarkan data WHO di tahun 2014, kanker payudara ini telah menyebabkan kematian sebanyak 19.730 jiwa dan diprediksi meningkat setiap tahunnya. Beberapa faktor yang menjadi pemicu kanker payudara antara lain jenis kelamin (wanita), genetik, riwayat keluarga, riwayat reproduksi (tidak memiliki anak dan tidak menyusui), konsumsi alkohol, faktor lingkungan (radiasi)

Pengobatan kanker payudara secara garis besar terbagi menjadi dua metode yaitu tindakan operasi dan terapi farmakologi. Kemoterapi merupakan salah satu bagian terapi farmakologi yang banyak dipakai untuk membunuh sel kanker. Beberapa obat kemoterapi yang digunakan sebagai terapi utama kanker payudara antara lain *cyclophosphamide*, *methotrexate*, *doxorubin*, dan *epirubicin*. Penggunaan kemoterapi dalam jangka waktu yang lama memunculkan beberapa efek samping seperti rambut rontok, kuku menghitam, mual muntah hebat, dan efek samping lainnya karena kemoterapi ini tidak selektif menyerang sel kanker tetapi juga sel normal, selain itu juga muncul permasalahan baru yaitu resistensi. Perkembangan sel kanker payudara saat ini telah memunculkan sel mutan yang resistensi terhadap beberapa obat kemoterapi utama seperti *doxorubicin*, oleh karena itu penelitian untuk menemukan obat kemoterapi baru yang lebih poten dan selektif terus dilakukan untuk mengatasi permasalahan kemoterapi.

Bakteri, jamur, dan tanaman tingkat rendah merupakan sumber senyawa antikanker yang sedang banyak diteliti karena telah menghasilkan beberapa senyawa antikanker seperti *doxorubicin*, *myriocin*, *cotylenin*, dan *palmarumycin*. Liken merupakan organisme yang terbentuk dari simbiosis jamur (*mycobiont*) dan alga atau *cyanobacteria* (*photobiont*). Jamur menyusun 50-90% dari struktur liken dan memiliki peran penting dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder untuk mempertahankan diri dari stres biotik dan abiotik. Metabolit sekunder inilah yang menurut beberapa penelitian memiliki aktivitas sebagai antikanker sehingga liken memiliki peluang besar untuk diteliti lebih lanjut dalam rangka menemukan senyawa antikanker baru yang lebih poten dan selektif.

Pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia dan uji sitotoksisitas liken *Physcia millegrana* terhadap sel kanker payudara (MCF-7). Penelitian dimulai dengan mengambil sampel liken di salah satu pohon Palm di wilayah kampus Universitas Jember, kemudian sampel liken dilakukan determinasi tanaman di Fakultas Biologi UGM dan hasilnya liken yang diperoleh adalah *Physcia millegrana*. Sampel liken selanjutnya disortasi dan dikeringkan pada suhu ruang tanpa terpapar sinar matahari. Liken yang sudah kering lalu diserbuk dan diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pengadukan (*magnetic stirrer*).

Hasil ekstraksi kemudian di fraksinasi dengan partisi cair-cair menggunakan pelarut fase polar (air) dan fase non polar (heksana, etil asetat, dan diklorometana).

Hasil ekstraksi dan fraksinasi kemudian dikeringkan dan dilakukan skrining fitokimia menggunakan reagen penampak noda dengan bantuan kromatografi lapis tipis (KLT) agar terjadi proses pemisahan senyawa didalam ekstrak dan fraksi sehingga warna yang dihasilkan oleh reaksi antara golongan senyawa dengan reagen penampak noda lebih spesifik. Skrining fitokimia yang dilakukan merupakan golongan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas sitotoksitas, antara lain golongan alkaloid, polifenol, flavonoid, terpenoid, dan steroid. Pada ekstrak *Physcia millegrana* ditemukan golongan senyawa polifenol, flavonoid, terpenoid, dan steroid kemudian terbagi dalam fraksi heksana mengandung polifenol, terpenoid, dan steroid, fraksi etil asetat mengandung steroid, terpenoid, dan flavonoid, sementara fraksi diklorometana mengandung terpenoid dan steroid.

Ekstrak dan Fraksi *Physcia millegrana* selanjutnya dilakukan uji sitotoksitas terhadap sel MCF-7 menggunakan metode pewarnaan dengan MTT. Hasilnya diperoleh nilai IC_{50} ekstrak metanol liken *Physcia millegrana* sebesar 435,43 $\mu\text{g/ml}$, fraksi heksana sebesar 379,89 $\mu\text{g/ml}$, fraksi etil asetat sebesar 289,47 $\mu\text{g/ml}$, dan fraksi diklorometana sebesar 463,44 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan *United State National Cancer Institute* (NCI), ekstrak tanaman dikategorikan memiliki aktivitas sitotoksik yang poten apabila nilai $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$, sehingga baik ekstrak dan fraksi tidak memiliki aktivitas yang poten. Pada pengujian sel *vero* didapatkan nilai CC_{50} ekstrak metanol *Physcia millegrana* sebesar 514,89 $\mu\text{g/ml}$ dibanding nilai IC_{50} sebesar 435,43 $\mu\text{g/ml}$ maka *selectivity index* (SI) yang diperoleh adalah 1,18. Nilai SI yang kurang dari 2 menunjukkan ekstrak masih belum bekerja secara selektif terhadap sel kanker payudara (MCF-7) dibanding sel normal (sel *vero*).

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanallahu Wa Ta'ala atas segala rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Epifit Liken *Physcia millegrana* terhadap sel kanker payudara (MCF-7)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dari berbagai pihak, maka dari itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Ambar Minah, Bapak Riyanto, dan Adik Ria Mahardika serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan moral dan materi.
2. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt. atas kesempatan yang diberikan untuk menyelesaikan skripsi.
3. Bapak Ari Satia Nugraha, SF., GDipSc., MSc-Res., PhD., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, mendampingi, serta memberi fasilitas bagi penulis dalam menyusun skripsi.
4. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D., Ibu Nia Kristianingrum S.Farm., M.Farm., Apt., dan Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji atas segala kritik dan saran yang diberikan selama penyusunan skripsi.
5. Bapak Dwi Nurahmanto, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan bimbingan akademik selama penulis kuliah di Fakultas Farmasi Universitas Jember.
6. Ibu Wayan, Mbak Hani, Bu Itus, Mbak Juju, Mbak Rumbi, Mbak Parkha, dan Ibu Widi yang telah membantu penulis saat melakukan penelitian di laboratorium.
7. Rekan kerja Lichen Project (Mbak Yuvi, Mbak Tari, Lilla, dan Chintya) yang telah berjuang bersama dalam menyelesaikan proyek penelitian uji bioaktivitas liken.

8. Kelompok NIMSQUAD (Reni, Nabila, dan Nita) sebagai teman cerita dan sumber semangat bagi penulis.
9. Rekan satu lab Jumahwi, Lanjar, Nimas, Ita, Resta, Ifan, Fawwas, Retno, dan Ridho yang selalu menghibur dan memberikan motivasi kepada penulis.
10. Segenap anggota grup riset *Drug Discovery Reserch Group*.
11. Seluruh teman-teman Fakultas Farmasi angkatan 2015 “Libitum”.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan penulis satu per satu.

Hanya do'a yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah Subhanallahu Wa Ta'ala. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi banyak orang.

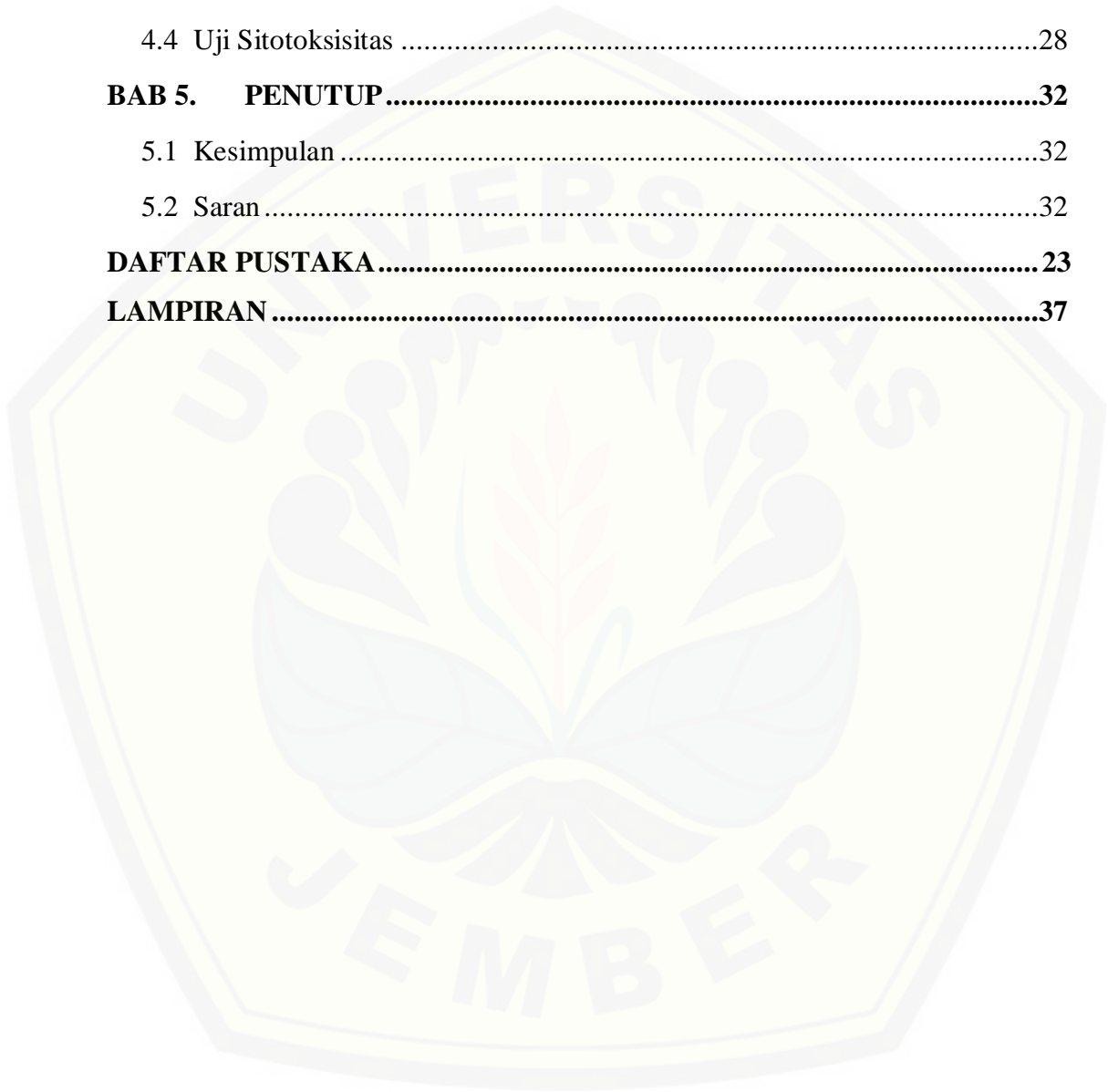
Jember, Januari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

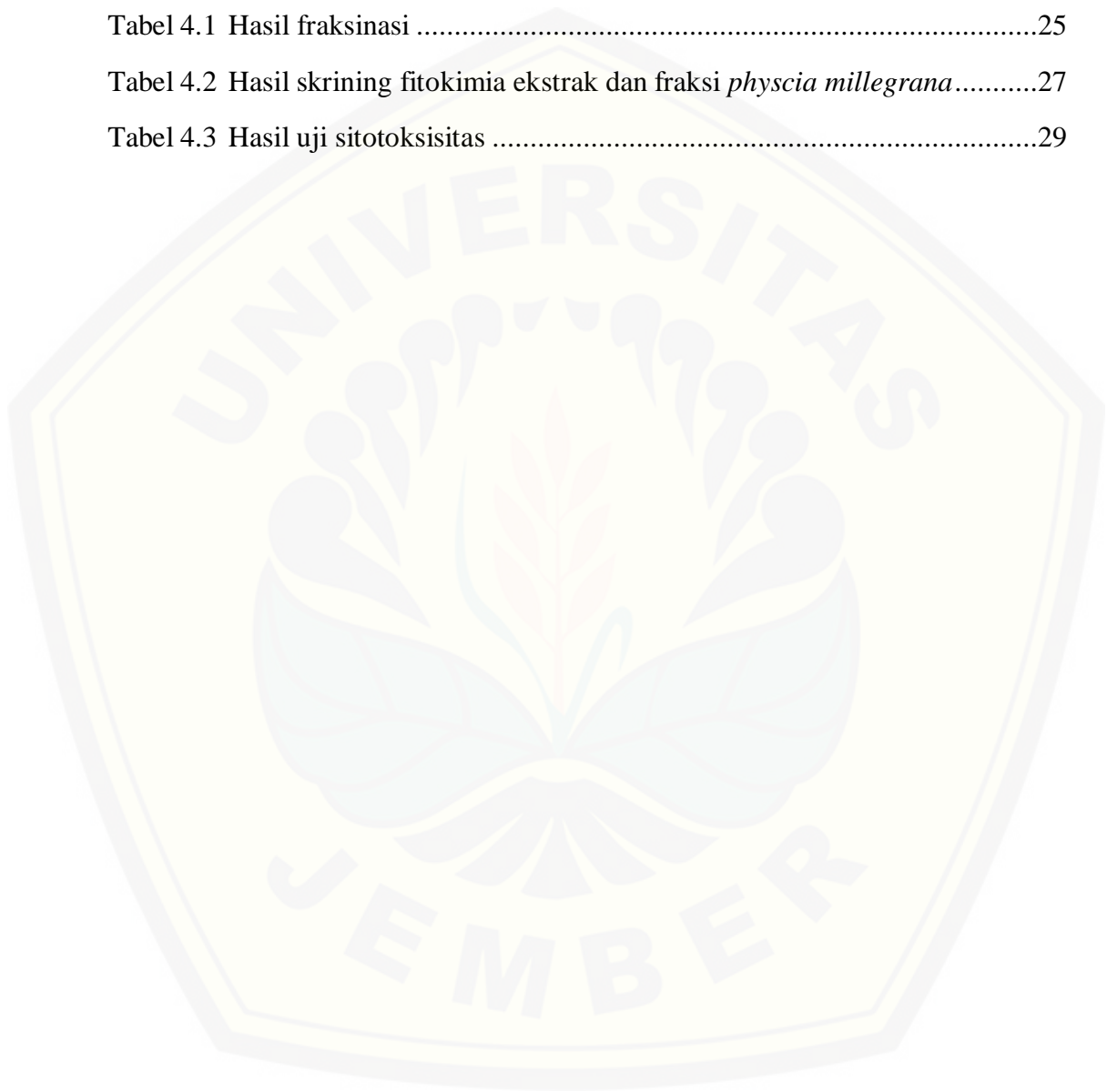
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAM PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	ixi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xivi
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kanker Payudara	5
2.2 Tinjauan tentang Liken	6
2.3 Metode Ekstraksi dan Fraksinasi	8
2.4 Metode Skrining Fitokimia.....	10
2.5 Uji Aktivitas Antikanker	10
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	14
3.1 Jenis Penelitian.....	14
3.2 Skema Penelitian	14
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.4 Alat dan Bahan.....	15
3.5 Variabel Penelitian	16
3.6 Definisi Operasional.....	16
3.7 Prosedur Penelitian.....	17

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1 Determinasi Epifit Liken	24
4.2 Ekstrak dan Fraksi <i>Physcia millegrana</i>	24
4.3 Skrining Fitokimia.....	26
4.4 Uji Sitotoksisitas	28
BAB 5. PENUTUP	32
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA.....	23
LAMPIRAN	37



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Senyawa metabolit sekunder liken sebagai antikanker.....	8
Tabel 3.1 Kondisi analisis skrining fitokimia	19
Tabel 4.1 Hasil fraksinasi	25
Tabel 4.2 Hasil skrining fitokimia ekstrak dan fraksi <i>physcia millegrana</i>	27
Tabel 4.3 Hasil uji sitotoksitas	29



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	<i>Physcia millegrana</i> yang hidup disekitar Universitas Jember.....	7
Gambar 2.2	Reaksi pembentukan formazan.....	11
Gambar 2.3	Morfologi sel kanker payudara (MCF-7)	13
Gambar 3.1	Skema penelitian	14
Gambar 3.2	Denah sampel pada <i>microplate</i> untuk uji sitotoksisitas	21
Gambar 4.1	Contoh dasar asam usneat, asam difraktaat (depsida), asam salazanat (depsidon)	26
Gambar 4.2	Struktur atranorin (depsida).....	27
Gambar 4.3	Kondisi sel diberbagai perlakuan.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi Liken <i>Physcia millegrana</i>	37
Lampiran 2 Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Fraksi.....	38
Lampiran 3 Skrining Fitokimia dengan metode KLT	40
Lampiran 4 Perhitungan Pembuatan Media Kultur Sel	41
Lampiran 5 Konsentrasi Uji Sitotoksistas	42
Lampiran 6 Data Absorbansi Uji Sitotoksistas	43
Lampiran 7 Analisis Statistik	45
Lampiran 8 Uji Sitotoksistas	47

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan keganasan atau pertumbuhan sel tidak terkontrol yang terjadi pada suatu organ atau jaringan dan menjadi penyebab kematian 1,8 milyar manusia diseluruh dunia pada tahun 2018. Kasus kematian ini paling besar terjadi di negara-negara berkembang karena keterbatasan biaya untuk pengobatan kanker yang mahal. Beberapa jenis kanker yang paling mematikan diantaranya kanker paru-paru, kolon, lambung, hati, dan payudara (World Health Organization, 2018). Di Indonesia, kanker payudara menempati urutan pertama sebagai kanker paling mematikan bagi wanita karena telah menyebabkan kematian sebanyak 19.730 orang di tahun 2014 (World Health Organization, 2014). Beberapa faktor yang menjadi pemicu kanker payudara antara lain jenis kelamin (wanita), genetik, riwayat keluarga, riwayat reproduksi (tidak memiliki anak dan tidak menyusui), konsumsi alkohol, faktor lingkungan (radiasi) (Panigoro dkk., 2017)

Pengobatan utama kanker payudara adalah tindakan operasi dan terapi farmakologi (kemoterapi). Kemoterapi kanker payudara yang ada di Indonesia tersedia beberapa macam obat sebagai terapi utama antara lain cyclophosphamide, methotrexate, doxorubin, dan epirubicin (Panigoro dkk., 2017). Permasalahan besar pengobatan kanker payudara adalah munculnya resistensi dan rendahnya efektivitas obat. Beberapa agen kemoterapi seperti *doxorubicin* telah mengalami resistensi pada sejumlah kasus kanker payudara (Ponnusamy dkk., 2018). Resistensi ini dapat terjadi melalui beberapa mekanisme yaitu efluks obat, *DNA repair pathways*, *breast cancer stem cells*, *PI3K pathways* (aktivasi mutasi), dan beberapa mekanisme lainnya (Marquette dan Nabell, 2012). Sebagian besar kemoterapi memiliki efek terhadap rusaknya sejumlah sel normal seperti kuku, rambut, kulit, dan lainnya. Akibat efek samping ini antara lain rambut rontok, kuku menghitam, kulit menghitam, mulut kering, hingga kematian pada janin (Oun dkk., 2018). Beberapa masalah inilah yang menjadi tantangan utama dalam pencarian kemoterapi baru yang lebih efektif dan spesifik terhadap sel kanker.

Pencarian senyawa baru agen kemoterapi terus dilakukan hingga saat ini. Tumbuhan tingkat rendah dan jamur serta bakteri sedang banyak diteliti untuk pencarian senyawa baru karena memiliki potensi besar dalam memproduksi metabolit sekunder yang aktif sebagai agen kemoterapi. Salah satunya adalah *doxorubicin* sebagai agen kemoterapi lini pertama yang diisolasi dari bakteri tanah *Streptomyces peucetius*. Beberapa senyawa aktif lain yang berhasil diisolasi dari jamur antara lain myriocin (antagonis proliferasi), cotylenin (leukimia), dan palmarumycin (inhibitor tioredoksin) (Kennedy, 2011; Honma, 2003; Powis, 2009).

Salah satu tumbuhan tingkat rendah yang potensial dan ketersediaannya melimpah adalah liken. Liken merupakan epifit yang bertahan hidup dengan simbiosis antara jamur (*mycobiont*) dan alga atau *cyanobacteria* (*photobiont*) (Honegger, 2009). Epifit ini umumnya hidup dengan menempel pada permukaan batang pohon, batu, atau tembok bangunan. Liken hidup dengan memproduksi metabolit sekunder untuk melawan stres biotik dan (organisme pengganggu) dan stres abiotik (lingkungan ekstrim). Komposisi penyusun liken yang terdiri atas 50-90% jamur dan sisanya alga atau *cyanobacteria* menunjukkan adanya kemungkinan epifit ini memiliki potensi untuk memproduksi senyawa metabolit yang aktif (Stocker-wo, 2013). Berdasarkan penelitian yang ada, metabolit sekunder liken memiliki beberapa aktivitas seperti antibiotik, antikanker, antivirus, dan aktivitas inhibitor enzim (Molnár dan Farkas, 2010; Bhattarai dkk., 2013; Nguyen dkk., 2014)

Pemanfaatan ataupun penelitian tentang liken ini masih sangat sedikit berdasarkan literatur yang ada. Indonesia merupakan wilayah negara tropis yang banyak ditumbuhi spesies liken, salah satu diantaranya adalah *Physcia millegrana* yang belum pernah ada penelitiannya sebagai antikanker. Apabila dilihat dari uraian liken di atas maka spesies liken ini memiliki peluang besar untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dan dieksplorasi dalam rangka penemuan senyawa antikanker baru. Pada penelitian ini akan dilakukan uji sitotoksitas liken *Physcia millegrana* terhadap sel kanker payudara (MCF-7) sebagai salah

satu parameter uji antikanker untuk melihat apakah liken ini memproduksi metabolit sekunder yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas maka rumusan masalah dalam penelitian yaitu :

1. Golongan senyawa fitokimia apakah yang terkandung dalam ekstrak metanol, fraksi heksana, etil asetat, dan diklorometana epifit liken *Physcia millegrana*?
2. Berapakah nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC_{50}) dari ekstrak metanol epifit liken *Physcia millegrana* terhadap pertumbuhan sel kanker payudara (MCF-7)?
3. Berapakah nilai *Inhibitory Concentration 50%* (IC_{50}) dari fraksi heksana, etil asetat, dan diklorometana epifit liken *Physcia millegrana* terhadap pertumbuhan sel kanker payudara (MCF-7)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang ingin dicapai peneliti yaitu :

1. Mengetahui golongan senyawa fitokimia yang terkandung dalam ekstrak metanol dan fraksi (heksana, etil asetat, dan diklorometana) epifit liken *Physcia millegrana*.
2. Mengetahui nilai IC_{50} ekstrak liken *Physcia millegrana* terhadap pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7.
3. Mengetahui nilai IC_{50} fraksi liken *Physcia millegrana* terhadap pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin dicapai dalam penelitian ini yaitu :

1. Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan data pendukung untuk pencarian senyawa obat antikanker baru yang lebih potensial dan efektif.
2. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi terhadap pengembangan ilmu pengetahuan tentang obat dari bahan alam.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan keganasan atau pertumbuhan suatu sel abnormal yang tidak terkontrol dan menyerang jaringan normal payudara. Di Indonesia, kanker telah menyebabkan kematian sebanyak 92,200 wanita di tahun 2014 dan 21,4 % diantaranya disebabkan oleh kanker payudara (World Health Organization, 2014). Berdasarkan data World Health Organization (WHO), kanker payudara rata-rata menyerang kelompok usia 20 tahunan. Menurut prediksi data WHO, jumlah penderita kanker akan meningkat setiap tahunnya karena disebabkan oleh banyak faktor.

Faktor resiko kanker payudara dapat dipengaruhi jenis kelamin (wanita), aktivitas fisik, genetik, riwayat keluarga, riwayat reproduksi (tidak memiliki anak dan tidak menyusui), konsumsi alkohol, faktor lingkungan (radiasi) (Panigoro dkk., 2017). Aktivitas fisik yang kurang memberikan kontribusi terbesar penyebab kanker payudara yaitu sebesar 21,1% (World Health Organization, 2014). Olahraga yang cukup minimal 30 menit sehari akan mengurangi faktor resiko kanker, selain itu tidak merokok dan konsumsi alkohol merupakan upaya yang dapat mencegah kanker. Kanker payudara yang terlanjur berkembang tidak akan cukup bila hanya diterapi dengan pola hidup sehingga memerlukan manajemen terapi kanker.

Terapi kanker payudara sendiri terdiri atas tindakan pembedahan, terapi sistemik (kemoterapi), terapi hormonal, terapi target, dan radioterapi. Pada penelitian ini akan berfokus pada pencarian senyawa baru untuk terapi kemoterapi. Agen kemoterapi yang tersedia saat ini adalah Cyclophosphamide, methotrexate, *doxorubicin*, epirubicin, 5 fluoro uracil, dan lain sebagainya (Panigoro dkk., 2017). Permasalahan agen kemoterapi ini adalah rendahnya efektivitas, munculnya resistensi, dan efek sampingnya. Efek samping kemoterapi berupa rambut rontok, kuku menghitam, kulit menghitam, mulut kering, hingga kematian pada janin (Oun dkk., 2018)

2.2 Tinjauan tentang Liken

2.3.1 Deskripsi Liken

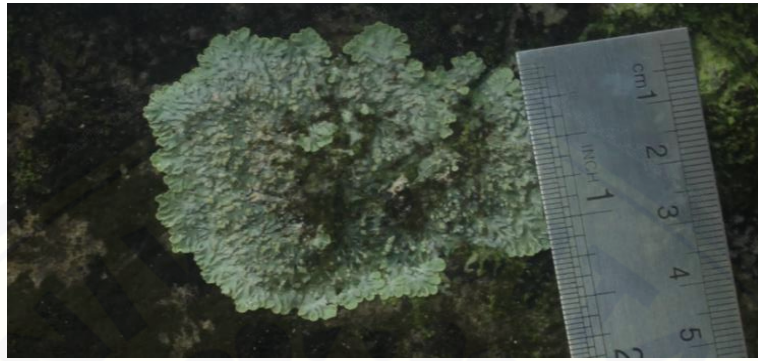
Liken adalah epifit yang bertahan hidup dengan simbiosis antara jamur (*mycobiont*) dan alga atau *cyanobacteria* (*photobiont*) (Honegger, 2009). Jamur memiliki sifat dominasi pada masa pertumbuhan liken dengan membentuk 50-90% dari total masa liken. Berdasarkan taksonomi liken, 99% dari populasinya masuk kedalam kingdom fungi, namun meskipun memiliki sifat dominasi, jamur ini tidak akan membunuh bagian *photobiont* tetapi hidup bersimbiosis untuk agar mampu bertahan hidup. Alga hijau merupakan *photobiont* dengan populasi terbanyak yaitu 85% dan 15% lagi terdiri dari *cyanobacteria* (Honegger, 2009).

Diseluruh dunia setidaknya terdapat 17.000-20.000 spesies lichen atau sekitar 20% dari jumlah jamur yang berubah menjadi liken (Honegger, 2009). Sebagian besar jenis liken ini mampu bertahan hidup pada cuaca yang ekstrim seperti temperatur yang panas atau dingin, kelembaban tinggi, dipegunungan yang tinggi, bahkan mampu hidup diwilayah antartika. Liken mampu bertahan hidup dalam cuaca ekstrim ini salah satunya dengan memproduksi metabolit sekunder. Beberapa liken memproduksi senyawa asam yang melapisi kutikula dan bersifat repelan sehingga mampu mencegah air berdifusi saat kelembaban udara sedang tinggi. Selain itu adapula yang memproduksi senyawa higroskopik dan dikristalisasi diujung rambut liken sehingga mampu menyerap air secara langsung dari udara (Stocker-wo, 2013)

Pada penelitian ini, digunakan sampel liken *Physcia millegrana* yang memiliki taksonomi sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Filum	: Ascomycota
Kelas	: Lecanoromycetes
Order	: Teloschistales
Famili	: Physciaceae
Genus	: <i>Physcia</i> (Schreb.) Michx
Spesies	: <i>Physcia millegrana</i> Degel. (ITIS, 1996)

Morfologi *Physcia millegrana* yaitu berukuran kecil, berwarna pucat abu-abu, lobus tipis dengan warna putih dibagian bawahnya, bentuk tepinya granular soledia. Liken ini biasanya tumbuh pada permukaan batang dan batu (Brodo dan Craig, 2006)

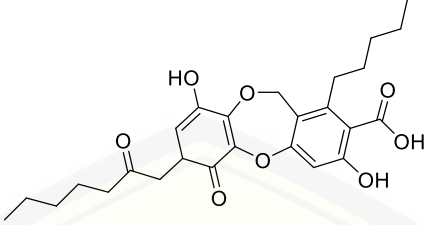
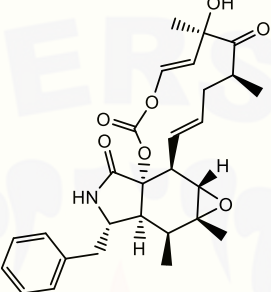
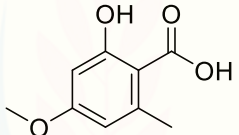



Gambar 2.1 *Physcia millegrana* yang hidup disekitar Universitas Jember (sumber : dokumen Drug Utilisation and Discovery Research Group)

2.3.2 Penelitian Terbaru tentang Liken

Liken memproduksi metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap perubahan cuaca atau upaya untuk berkompetisi dengan liken lain. Sebagai organisme yang hidup bersimbiosis, metabolit sekunder lebih banyak diproduksi oleh jamur sementara metabolit primer lebih banyak diproduksi oleh alga yang memiliki kemampuan untuk berfotosintesis (Honegger, 2009). Beberapa metabolit sekunder liken menurut penelitian memiliki berbagai aktivitas seperti antikanker (Aravind dkk., 2014; Nguyen dkk., 2014; Suh dkk., 2017), antiproliferatif (Bucar dkk., 2004; Burlando dkk., 2009; Brisdelli dkk., 2013; Bessadóttir dkk., 2014), antibakteri (Dieu dkk., 2014; Yuan, 2016), dan antioksidan (Thadhani dkk., 2011; Sisodia dkk., 2013). Beberapa senyawa yang berhasil diisolasi dan aktif sebagai antikanker antara lain dapat dilihat ditabel 2.1

Tabel 2.1 Senyawa metabolit sekunder liken sebagai antikanker

Spesies	Metabolit Sekunder	Aktivitas Antikanker
<i>Hypogymnia lugubris</i> (Pers.)	 <p><i>Physodic acid</i></p>	Memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker melanoma A375 pada konsentrasi 6.25-50 μM (Cardile dkk., 2017)
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	 <p><i>Cytochalasin E</i></p>	Memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker kolon (HT-29) dengan IC_{50} sebesar 6 $\mu\text{g/ml}$ (Delebassée dkk., 2017)
<i>Rocella montagnei</i>	 <p><i>Everninic acid</i></p>  <p><i>roccellic acid</i></p>	Memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker kolon (DLD-1, SW-620), payudara (MCF-7), leher dan kepala (FaDu). <i>Everninic acid</i> memiliki IC_{50} lebih besat dari 100 $\mu\text{g/ml}$ sementara <i>roccellic acid</i> memiliki IC_{50} sebesar 71,26 $\mu\text{g/ml}$ (Mishra dkk., 2017)

2.3 Metode Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi merupakan proses menarik keluar senyawa dari dalam tubuh hewan atau tumbuhan (Mandal dkk., 2015). Metode ekstraksi terdapat beberapa

macam berdasarkan prinsipnya yaitu maserasi, soxhletasi, perkolasi, infus, dekok, *microwave-assisted extraction (MAE)*, *Ultrasonic-Assisted Extraction* (Altemimi dkk., 2017).

Pada penelitian ini digunakan ekstraksi dengan teknik maserasi yang dibantu pengadukan oleh *magnetic stirrer*. Teknik ini dipilih karena pengerjaannya sederhana, tidak merusak senyawa karena tanpa pemanasan, dan tidak memerlukan alat khusus. Fungsi pengadukan pada maserasi ini adalah meningkatkan kontak antara pelarut dengan sampel sehingga proses ekstraksi dapat berjalan lebih cepat dan menghasilkan maserat (senyawa yang terekstraksi) lebih banyak (Azmir dkk., 2013). Maserat ini selanjutnya dapat diuapkan untuk memisahkan pelarut dengan kandungan senyawanya. Proses penguapan ini dilakukan pada suhu ruang didalam lemari asam karena sifatnya metanol yang mudah menguap. Selanjutnya ekstrak dapat dikeringkan dengan bantuan oven bersuhu $< 40^{\circ}$ C untuk menghilangkan sisa pelarut dan meminimalisir kerusakan senyawa (Altemimi dkk., 2017).

Ekstrak yang telah kering selanjutnya dilakukan fraksinasi. Fraksinasi merupakan proses untuk memisahkan senyawa atau golongan senyawa dari sebuah campuran senyawa. Prinsip pemisahan ini biasanya didasarkan pada sifat fisika-kimia seperti polaritas, kelarutan, titik didih, dan pembentukan kompleks atau garam. Sementara teknik fraksinasi terbagi menjadi beberapa macam yaitu destilasi, kristalisasi, partisi cair-cair, dan kromatografi yang meliputi kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, dan High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) (Altemimi dkk., 2017)

Pada penelitian ini digunakan fraksinasi dengan metode partisi cair-cair dengan prinsip *like dissolve like* (Houghton dan Raman, 2012). Metode ini dipilih karena pengerjaannya sederhana, tidak memerlukan alat khusus, dapat dilakukan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah banyak, dan biayanya relatif murah (Pereira dkk., 2013). Fraksinasi ini menggunakan air sebagai fase polar (pelarut sampel) dan fase non polar berurutan heksana, diklorometana (DCM), dan etil asetat. Fase polar kemudian dicampur dengan satu pelarut non polar (heksana atau DCM atau etil asetat) dalam suatu wadah erlenmeyer. Setelah itu dilakukan

pengadukan dengan bantuan *magnetic stirrer* pada kecepatan 200 rpm selama 15 menit untuk meningkatkan kontak antara senyawa dan pelarut sehingga proses fraksinasi dapat berjalan optimal dan lebih cepat dibanding tanpa pengadukan. Selanjutnya apabila pelarut non polar telah jenuh oleh senyawa yang ditandai dengan perubahan warna pelarut maka bagian non polar ini dapat diambil dan diganti pelarut non polar lainnya. Hasil fraksinasi ini kemudian dapat dikeringkan seperti halnya metode ekstraksi.

2.4 Metode Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan proses penentuan golongan senyawa yang terkandung dalam suatu sampel. Penentuan golongan senyawa ini dikenal menjadi beberapa macam teknik yaitu uji tabung dan kromatografi. Berdasarkan sensitivitasnya, kromatografi lapis tipis lebih baik dibanding uji tabung karena mampu mendeteksi senyawa dalam jumlah yang kecil, selain itu jumlah sampel yang dibutuhkan untuk metode kromatografi lebih sedikit dan perlakuan terhadap sampel relatif sederhana dibanding uji tabung.

Pada penelitian ini dipilih metode kromatografi lapis tipis untuk skrining fitokimia. Adapun reagen penampak noda yang memberikan perubahan warna spesifik terhadap golongan senyawa tertentu antara lain *dragendorf* untuk alkaloid (kuning-jingga), FeCl_3 untuk polifenol (hitam), uap amonia untuk flavonoid (kuning intensif), dan anisaldehyd asam sulfat untuk terpenoid atau steroid bebas (merah-ungu) (Ndam dkk., 2014; Durai dkk., 2016).

2.5 Uji Aktivitas Antikanker

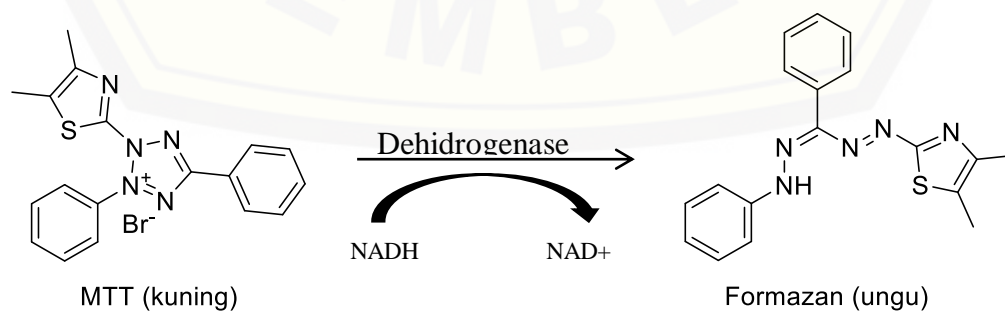
2.5.1 Metode Uji Aktivitas Antikanker

Uji aktivitas antikanker secara umum terbagi menjadi 2 macam, yaitu secara *in vivo* dan *vitro*. Metode *in vivo* dipilih untuk mengetahui aktivitas dari suatu senyawa terhadap sel kanker yang ditumbuhkan dalam tubuh hewan uji dan melalui uji ini akan diperoleh juga data farmakokinetik obat, dosis terapi, dan

lethal death 50 (LD50). Metode ini memiliki kelebihan yaitu mampu memberikan gambaran asli mengenai kondisi obat didalam tubuh, namun memiliki beberapa kelemahan yaitu pengerjaan yang lama, variabel yang tidak terkontrol lebih banyak terkait dengan fisiologis tubuh, data yang diperoleh lebih variatif antar individu, resiko kematian hewan uji tinggi, dan beberapa faktor lainnya.

Metode ini *in vitro* lebih banyak dipilih karena waktu pengerjaannya yang relatif singkat, variabel lebih mudah dikontrol, dan cocok untuk skrining awal uji senyawa yang diduga memiliki aktivitas antikanker karena hanya memerlukan jumlah sampel yang sedikit. Salah satu uji *in vitro* untuk uji aktivitas antikanker adalah uji sitotoksitas dengan teknik pewarnaan. Metode dengan teknik pewarnaan ini terdiri atas beberapa metode yaitu pengukuran protein, uji *neutral red* (NR) dan uji MTT. Uji pengukuran protein yaitu pewarnaan protein yang dihasilkan oleh sel yang hidup dengan reagen comassie blue kemudian diukur absorbansinya. Prinsip metode uji NR yaitu pewarnaan merah pada sel yang masih hidup. Uji MTT prinsipnya yaitu pembentukan garam formazan oleh sel yang hidup sehingga dapat diukur absorbansinya (Husøy dkk., 1993).

Pada penelitian ini dipilih uji MTT dengan prinsipnya yaitu adanya reduksi MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) didalam mitokondria oleh enzim dehidrogenase suksinat menjadi garam formazan. Reaksi ini berlangsung lebih kurang 4 jam dan dapat dihentikan dengan menambahkan reagen *stopper* yang dapat melisis sel lalu mengeluarkan dan melarutkan garam formazan sehingga dapat diukur menggunakan *elisa reader* pada panjang gelombang 500-600 nm (Duval dkk., 2012).



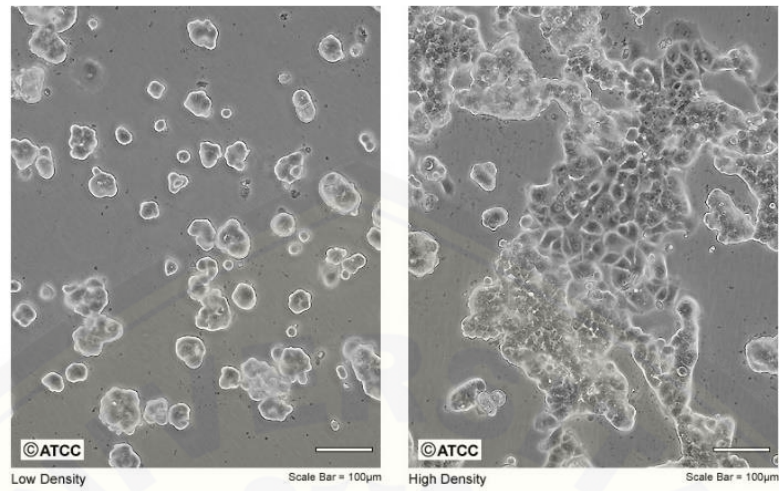
Gambar 2.2 Reaksi pembentukan formazan (Duval dkk., 2012)

2.5.2 Cell Lines Kanker

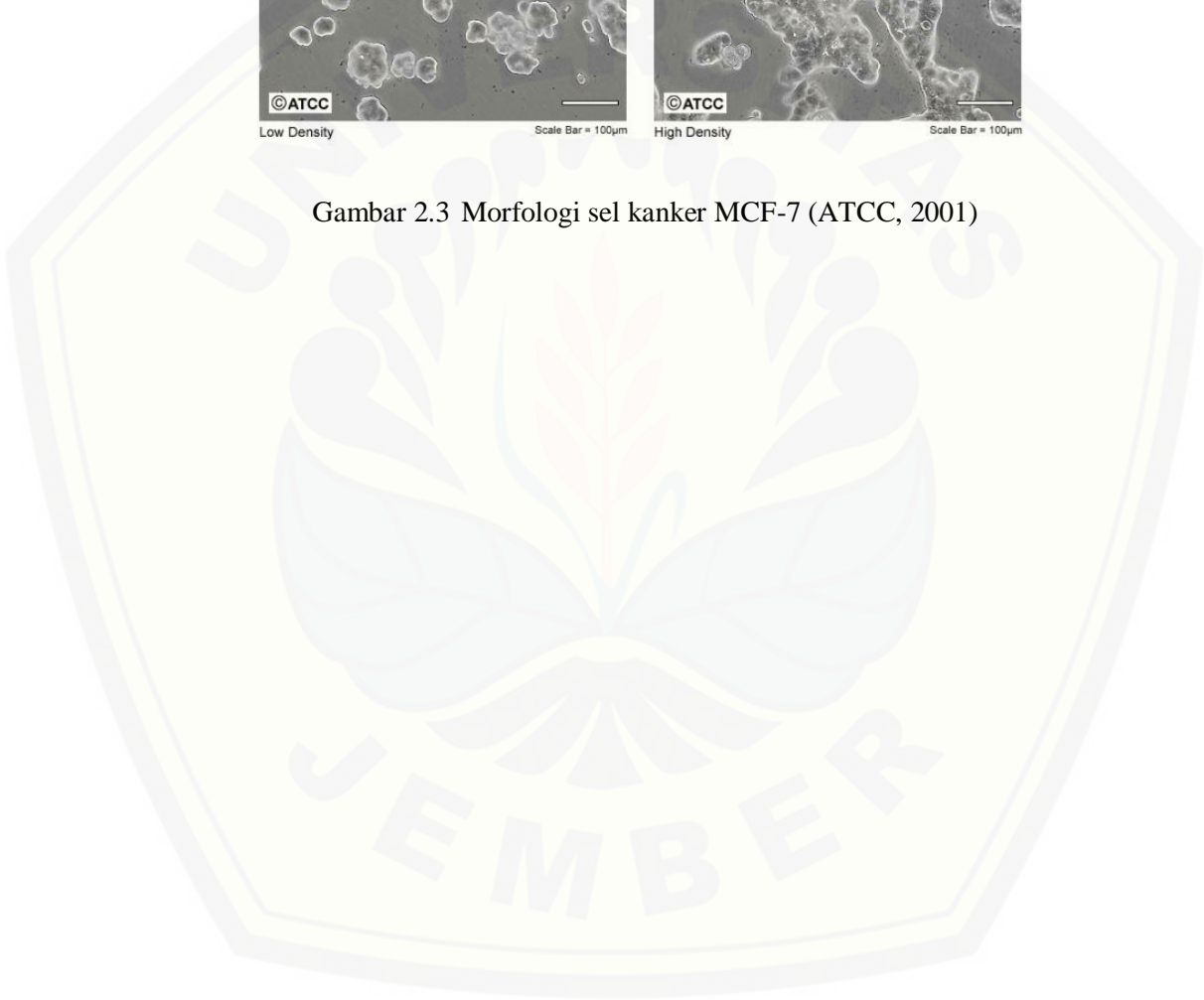
Sel kanker payudara yang digunakan untuk uji sitotoksitas terdapat beberapa macam antara lain MCF-7, T-47D, dan MDA-MB-231. Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang diisolasi dari spesies *Homo sapiens* jenis kelamin wanita, berusia 69 tahun, dan bergolongan darah O (ATCC, 2001). Sel kanker ini dapat ditumbuhkan dalam media RPMI (Roswell Park Memorial Institute) yang mengandung FBS (Foetal Bovine Serum 10%) dan antibiotik streptomisin 1%. Sel ini tumbuhnya melekat didasar media RPMI (menempel dipermukaan wadah media) karena memiliki sifat *adherent*. Sel kanker payudara MCF-7 dipilih karena memiliki banyak kemiripan dengan sel epitelium payudara, seperti memiliki respon terhadap hormon estrogen, mampu memproduksi hormon progesteron, memiliki sifat invasif yang tinggi, dan sensitif terhadap agen kemoterapi, selain itu data penelitian tentang sel MCF-7 lebih banyak tersedia dibanding sel lainnya (Dai, 2017).

Sel vero merupakan sel normal yang digunakan sebagai kontrol uji sitotoksitas. Sel vero diisolasi dari sel epitelium ginjal normal monyet afrika (*Cercopithecus aethiops*) dewasa (ATCC, 2005). Sel ini memiliki sifat *adherent* sehingga mampu menempel pada wadah media tumbuhnya. Sel vero banyak dipilih karena memiliki kelebihan mudah dipreparasi, cepat tumbuh, dan memiliki kemampuan untuk tumbuh pada media yang sama dengan sel kanker MCF-7 (Senthilraja, 2015)

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**



Gambar 2.3 Morfologi sel kanker MCF-7 (ATCC, 2001)



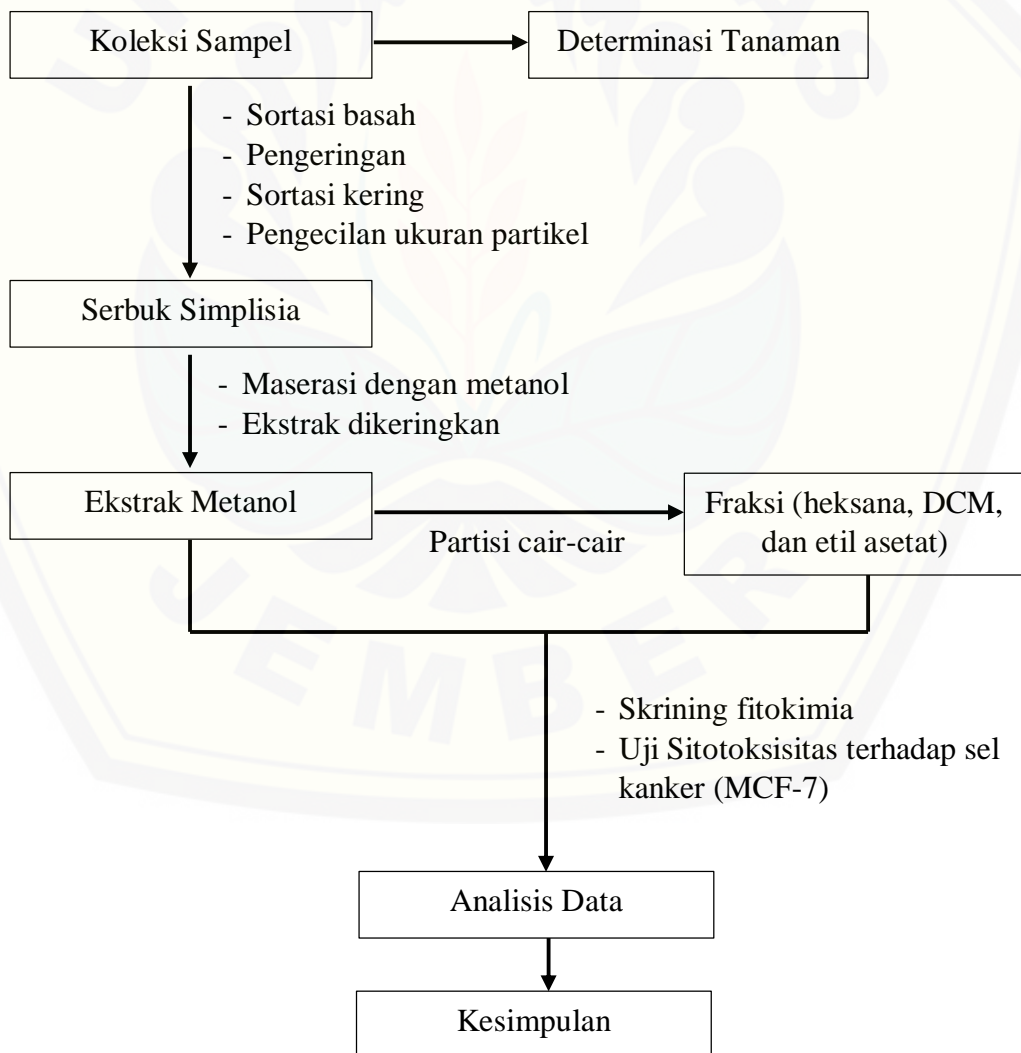
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Epifit Liken *Physcia millegrana* terhadap sel kanker payudara (MCF-7) ini merupakan penelitian *true experimental*

3.2 Skema Penelitian

Alur penelitian ini selanjutnya akan dilakukan sebagai berikut :



Gambar 3.1 Skema penelitian

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada pada bulan November 2018 hingga selesai.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah *beaker glass*, erlenmeyer, gelas ukur (IWAKI), cawan porselin, lempeng KLT (kromatografi lapis tipis), pipet tetes, pipa kapiler, mikropipet (SOCOREX), *microtube* (EPENDORF), penyemprot reagen, batang pengaduk, spatula, blender (KF-WLI A20), ayakan, *chamber* KLT, mortir, stamper, *Biological Safety Cabinet* (BCS) *Class II* (ESCO), lemari asam, tip biru, tip kuning, *magnetic stirrer* (HEIDOLPH), vortex, inkubator karbon dioksida (HERA CELL), *microplate reader* (BIORAD), *microplate flat bottom 96 wells* (IWAKI), neraca analitik dan autoklaf.

3.4.2 Bahan

Liken *Physcia millegrana* yang didapatkan dari pohon disekitar Universitas Jember, aquadest, metanol, heksana, dikolorometana (DCM), etil asetat, kertas saring *whatman* no. 1, reagen *dragendorf*, reagen anisaldehyda asam sulfat, asam asetat glasial, FeCl_3 , reagen vanilin, kloroform, butanol, SDS (*sodium dodecyl sulfate*), PBS (*phospate buffered saline*), FBS (*foetal bovine serum*), penisillin, streptomisin, amphoterizin, media RPMI 1640, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), reagen MTT, sel kanker payudara (MCF-7), dan sel normal (vero)

3.5 Variabel Penelitian

3.7.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian yaitu konsentrasi sampel untuk uji aktivitas sel kanker dengan metode MTT. Uji aktivitas sitotoksik ekstrak metanol liken *Physcia millegrana* terhadap sel kanker payudara (MCF-7) dan sel *vero* dilakukan dengan konsentrasi masing-masing 1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, dan 64 µg/ml, 32 µg/ml, dan 16 µg/ml. Uji sitotoksitas fraksi heksana, fraksi diklorometana, dan etil asetat terhadap sel kanker payudara dilakukan dengan seri konsentrasi 600 µg/ml, 300 µg/ml, 150 µg/ml, 75 µg/ml, dan 37,5 µg/ml, 18,75 µg/ml, dan 9,375 µg/ml

3.7.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang ditetapkan pada penelitian ini adalah nilai IC₅₀ ekstrak metanol dan fraksi (heksana, diklorometana, dan etil asetat) liken *Physcia millegrana* terhadap sel MCF-7, beserta nilai CC₅₀ ekstrak metanol terhadap sel *vero*.

3.7.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu kondisi pengeringan pembuatan simplisia, ukuran serbuk simplisia, metode ekstraksi maserasi dengan pengadukan, metode fraksinasi partisi cair-cair, kondisi analisis skrining fitokimia, media RPMI, kondisi lingkungan uji aktivitas sel kanker dengan metode MTT, dan cara pengukuran hasil uji aktivitas.

3.6 Definisi Operasional

1. Sampel adalah epifit lichen *Physcia millegrana* yang dikoleksi di wilayah sekitar kampus Universitas Jember dan telah dilakukan determinasi spesies.
2. Ekstraksi merupakan metode yang digunakan untuk menarik senyawa dari dalam jaringan atau matriks menggunakan pelarut yang sesuai. Pada

penelitian ini digunakan pelarut metanol untuk menarik senyawa yang terkandung dalam liken *Physcia millegrana*

3. Fraksinasi adalah metode untuk memisahkan senyawa dari suatu campuran. Fraksinasi dengan metode partisi cair-cair adalah teknik memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan polaritasnya. Penelitian ini menggunakan pelarut air sebagai fase polar dan fase non polarnya yaitu heksana, diklorometana, dan etil asetat.
4. Sel Kanker Payudara yang digunakan dalam penelitian yaitu sel MCF-7.
5. Sel normal yang digunakan sebagai pembanding adalah sel vero

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pengumpulan Sampel dan Determinasi Tanaman

Liken *Physcia millegrana* dikoleksi dari pohon-pohon disekitar kampus Universitas Jember. Sampel yang bagus (morfologi lengkap, tidak terkontaminasi spesies lain, dan tidak rusak) dipilih untuk determinasi lalu dikirim ke Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada untuk dideterminasi spesiesnya.

3.7.2 Pembuatan Simplisia

Sampel liken *Physcia millegrana* diambil dari pohon-pohon disekitar kampus Universitas Jember. Sampel selanjutnya dilakukan sortasi untuk memisahkan liken dengan pengotornya (kulit batang tanaman, lumut, dan pengotor lainnya). Liken yang telah disortasi kemudian dibuat simplisia dengan dikeringkan pada suhu kamar terkendali (27° C) dan terhindar panas matahari. Simplisia kemudian dihaluskan dengan blender dan diayak untuk menyeragamkan ukuran serbuk, kemudian simplisia yang tidak lolos ayakan lalu digerus menggunakan mortir dan stamper dan kembali diayak.

3.7.3 Ekstraksi

Ekstraksi liken *Physcia millegrana* menggunakan metode maserasi dengan pengadukan. Sebanyak 100 g simplisia dimasukan erlenmeyer 1000 ml, kemudian

ditambahkan pelarut metanol dengan perbandingan awal 1:5 yaitu 500ml. Ekstraksi kemudian dibantu pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 200 rpm selama 6 jam. Ekstrak hasil maserasi selanjutnya diambil dan dipisahkan dari residunya menggunakan kertas saring. Residu kemudian dilakukan remaserasi lagi dengan penambahan pelarut yang sama hingga cairan hasil ekstraksi berwarna jernih, sementara hasil ekstrak dikumpulkan dalam *beaker glas* 1000 ml kemudian dipekatkan dengan menguapkan pelarutnya dalam lemari asam, ekstrak lalu dikeringkan dalam lemari asam. Hasil ekstrak kemudian dihitung rendeman kasarnya dengan rumus :

$$\% \text{ Rendeman} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

3.7.4 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan melarutkan sejumlah ekstrak dalam metanol-air (1:9) sebagai fase polar dalam erlenmeyer. Cara kerjanya yaitu ekstrak dilarutkan dalam metanol terlebih dahulu untuk meningkatkan kelarutannya kemudian ditambahkan air dan aduk hingga semua ekstrak larut. Tambahkan heksana sebagai fase non polar pada perbandingan yang sama dengan fase polar, kemudian lakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* 200 rpm selama 15 menit, Fraksi heksana kemudian diambil menggunakan pipet atau corong pisah dan hasilnya dapat dikeringkan dalam lemari asam. Fraksi air yang tersisa kemudian ditambahkan etil asetat dengan perbandingan yang sama lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* 200 rpm selama 15 menit. Fraksi etil asetat selanjutnya dipisahkan dengan corong pisah dan dikeringkan dalam lemari asam. Fraksi air yang tersisa kemudian ditambahkan diklorometana dengan perbandingan yang sama lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* 200 rpm selama 15 menit. diklorometana selanjutnya dipisahkan dari residu dengan pipet atau corong pisah lalu masing-masing keringkan untuk dihitung persen rendemennya dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Fraksi}}{\text{Bobot Ekstrak}} \times 100\%$$

3.7.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk menentukan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol dan fraksi (heksana, diklorometana, etil asetat, dan residu) *Physcia millegrana*. Cara kerjanya yaitu dilarutkan 5 mg sampel kedalam metanol tepat larut, setelah itu totolkan pada lempeng KLT hingga memberikan noda dibawah sinar UV. Proses eluasi selanjutnya dilakukan menggunakan fase gerak (eluen) yang sesuai hingga selesai (Tabel 3.1). Penampak noda digunakan untuk memberikan perubahan warna spesifik dari golongan senyawa yang akan dideteksi, pemberian penampak noda ini dilakukan dengan menyemprotkan reagen penampak noda diatas lempeng KLT yang telah selesai dieluasi lalu amati perubahan warna spesifik yang terjadi. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Kondisi analisis skrining fitokimia (Sharma dkk., 2011; Ndam dkk., 2014; Durai dkk., 2016; Garampalli, 2018)

Golongan Senyawa	Eluen	Penampak Noda	Perubahan Warna
Alkaloid	Etil asetat : metanol : air (9:2:2)	<i>Dragendorf</i>	Kuning-jingga
Polifenol	Kloroform : etil asetat (1:9)	FeCl ₃	Hitam
Flavonoid	Butanol : Asam asetat glasial : Air (4:1:5) *diambil fase atas	Uap Amonia	Kuning intensif
Terpenoid atau steroid bebas	Heksana : etil asetat (4:1)	Anisaldehyd asam sulfat *dipanaskan hingga suhu 110°C	Merah-ungu

3.7.6 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas pada penelitian ini mengacu pada protokol uji sitotoksitas yang dikeluarkan oleh *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi UGM (Meiyanto, 2013). Langkah kerjanya sebagai berikut:

a. Pembuatan Media dan Reagen MTT

Media kultur yang pertama kali dibuat adalah media cair. Cara pembuatannya yaitu melarutkan 5 g media RPMI kedalam aquabidest steril

sampai 100 ml, setelah itu tambahkan 2,2 g NaHCO₃ dan aduk homogen, kemudian filtrasi dengan filter 0,2 mikron. Langkah kedua yaitu membuat media kultur lengkap. Cara pembuatannya yaitu mencampurkan 10 ml FBS (Foetal Bovine Serum) dan 1 ml penisilin-streptomisin dalam erlenmeyer 100 ml lalu tambahkan media cair hingga 100 ml. Konsentrasi MTT untuk uji sitotoksisitas adalah 0,5 mg/ml yang dapat dibuat dengan mencampurkan stok 1 ml MTT dalam PBS (5 mg/ml) kedalam 10 ml media kultur cair.

b. Penumbuhan dan Pemanenan Sel

Sel MCF-7 dan sel vero yang disimpan dalam *cryo tube* ditumbuhkan dahulu sebelum dipakai. Caranya dengan mengambil 1 ml suspensi sel lalu kembangbiakan dengan 10 ml media kultur lengkap dalam cawan petri menggunakan Inkubator CO₂ selama 24 jam. Panen sel dilakukan setelah inkubasi dengan cara membuang medianya (sel sehat akan menempel didinding cawan petri), lalu sisa media yang tertinggal dicuci dengan larutan PBS sebanyak 2x dengan jumlah volume setengah media awal. Tripsin-EDTA (tripsim 0,25%) ditambahkan secara merata pada permukaan cawan yang ditumbuhi sel dan inkubasi selama 3 menit. Sebanyak 5 ml media kultur lengkap lalu ditambahkan, resuspensi dan amati keadaan sel dibawah mikroskop, apabila terdapat sel yang menggerombol lakukan resuspensi lagi. Panen sel dilakukan dengan memindahkan sel yang hidup kedalam *conical tube* baru dan jumlah sel dihitung setiap 10 µl suspensi sel dengan hemasitometer.

c. Penanaman Sel

Hasil penumbuhan sel yang telah dipanen kemudian diambil dan dimasukan suspensi sel kedalam *microplate 96 well* sebanyak 100 µL/sumur yang mengandung sel sejumlah 5×10^3 sel/sumur untuk melakukan uji sitotoksisitas. Jumlah sumuran yang diisi suspensi adalah seri konsentrasi uji (triplo), seri kontrol positif *doxorubicin* (triplo), dan kontrol negatif media (triplo). Amati distribusi sel dengan mikroskop inverted kemudian lakukan inkubasi bila sel telah

terdistribusi rata dalam sumuran. Inkubasi dilakukan selama minimal 4 jam dalam inkubator CO₂ untuk memulihkan kondisi sel.

d. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan melarutkan sampel kedalam DMSO. Langkah pertama dibuat larutan induk dengan melarutkan 5 mg sampel kedalam 50 μ L DMSO (gunakan vortex bila perlu), setelah itu buat pengenceran dengan seri konsentrasi 600 ppm, 300 ppm, 150 ppm, 75 ppm, 37,5 ppm, 18,75 ppm, dan 9,38 ppm menggunakan media kultur dengan volume akhir tiap sumuran sebanyak 100 μ L/sumur (triplo) (Meiyanto, 2013). Seri konsentrasi *Doxorubicin* kemudian dibuat 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,13 ppm, dan 1,56 ppm

Microplate 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	pink	pink	pink	yellow	yellow	yellow						
B	pink	pink	pink	yellow	yellow	yellow						
C	pink	pink	pink	yellow	yellow	yellow						
D	pink	pink	pink	yellow	yellow	yellow						
E	pink	pink	pink	yellow	yellow	yellow						
F	pink	pink	pink	yellow	yellow	yellow						
G	pink	pink	pink	yellow	yellow	yellow						
H	purple	purple	purple	brown	brown	brown						

Microplate 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	yellow	yellow	yellow	red	red	red	blue	blue	blue	green	green	green
B	yellow	yellow	yellow	red	red	red	blue	blue	blue	green	green	green
C	yellow	yellow	yellow	red	red	red	blue	blue	blue	green	green	green
D	yellow	yellow	yellow	red	red	red	blue	blue	blue	green	green	green
E	yellow	yellow	yellow	red	red	red	blue	blue	blue	green	green	green
F	yellow	yellow	yellow	red	red	red	blue	blue	blue	green	green	green
G	yellow	yellow	yellow	red	red	red	blue	blue	blue	green	green	green
H	purple	purple	purple	brown	brown	brown						

Keterangan : ■ *Doxorubicin*, ■ Fraksi Heksana, ■ Fraksi DCM, ■ Fraksi Etil asetat, ■ Kontrol Sel, ■ Kontrol Media, ■ ekstrak metanol

Gambar 3.2 Denah sampel pada *microplate* untuk uji sitotoksitas

e. Perlakuan Sampel pada Sel

Sel kanker yang siap untuk uji sitotoksitas diambil dan dimasukkan kedalam LAF, setelah itu buka penutup *microplate* kemudian dibuang medianya dengan cara membalik *microplate* secara cepat. Sel kanker yang normal akan menempel pada dinding sumuran sehingga tidak akan ikut terbang. Sisa media yang tertinggal kemudian dicuci dengan memasukan PBS 100 μ L kedalam tiap sumuran lalu buang, setelah itu masukan seri larutan uji (sampel dan *doxorubicin*) pada setiap sumuran yang telah berisi sel dimulai dari konsentrasi yang paling kecil. Kelompok kontrol sel dibuat dengan memasukan 100 μ L media kultur kedalam sumuran yang telah berisi sel (triplo). Kontrol media dibuat dengan memasukan media kultur 100 μ L kedalam sumuran kosong (triplo) (Gambar 3.1)

f. Pewarnaan MTT dan Pengukuran Absorbansi

Seluruh kelompok sel perlakuan yang telah diinkubasi selama 24 jam kemudian diambil dan dibuang larutan ujinnya. Sisa media yang tertinggal lalu dicuci dengan 100 μ L PBS sebanyak 3x dan masukan 100 μ L MTT pada setiap sumuran lalu inkubasi selama 4 jam dan tambahkan *stopper* 100 μ L SDS 10% dalam HCl 0,1 N. *Microplate* lalu dibungkus dengan aluminium foil dan biarkan ditempat gelap pada suhu ruang selama semalaman. Aluminium foil lalu dibuka dan diukur absorbansi formazan yang terbentuk menggunakan elisa reader pada panjang gelombang 550-600 nm.

g. Perhitungan Persentase Jumlah Sel yang Hidup

Data uji aktivitas sitotoksitas yang diperoleh adalah nilai absorbansi. Data ini kemudian dapat digunakan untuk menghitung persentase jumlah sel yang hidup menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{Abs P - Abs M}{Abs S - Abs M} \times 100\%$$

Ket:

Abs = Absorbansi

M = Kontrol Media

S = Kontrol Sel

P = Kelompok Perlakuan (ekstrak/fraksi/doksorubisin)

3.7.7 Analisis Data

Data persentase sel hidup yang didapatkan dari masing ekstrak dan fraksi dapat digunakan untuk menentukan nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) terhadap sel MCF-7 (sel kanker payudara) dan *Cytotoxic Concentration* (CC_{50}) terhadap sel vero (sel normal). Nilai IC_{50} dan CC_{50} dihitung menggunakan analisis *Probit* untuk menentukan kadar konsentrasi uji yang mampu membunuh 50% dari total populasi sel. Hasil perhitungan nilai IC_{50} kemudian dilakukan analisis *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar kelompok uji, selanjutnya nilai IC_{50} dibandingkan terhadap nilai CC_{50} untuk menentukan *Selectivity Index* (SI) yang menunjukkan kemampuan selektivitas sampel dalam membunuh sel kanker payudara tetapi tidak mematikan bagi sel normal dengan rumus rasio CC_{50} dibanding IC_{50} (de Oliveira dkk., 2015).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data yang diperoleh dari penelitian maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak Metanol *Phyiscia millegrana* mengandung golongan senyawa polifenol, flavonoid, terpenoid dan steroid kemudian terbagi dalam fraksi heksana mengandung polifenol, terpenoid, dan steroid, fraksi etil asetat mengandung steroid, terpenoid, dan flavonoid, sementara fraksi diklorometana mengandung terpenoid dan steroid.
2. Nilai IC₅₀ yang diperoleh dari uji stitoksisitas ekstrak methanol liken *Phyiscia millegrana* terhadap sel MCF-7 sebesar 435,43 µg/ml
3. Nilai IC₅₀ terhadap sel MCF-7 fraksi heksana sebesar 379,89 µg/ml, fraksi etil asetat sebesar 289,47 µg/ml, dan fraksi diklorometana sebesar 463,44 µg/ml.

5.1 Saran

Beberapa kekurangan data pada penelitian ini maka sebaiknya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang :

1. Uji sitotoksisitas fraksi liken *Phyiscia millegrana* terhadap sel normal
2. Uji sitotoksisitas terhadap sel kanker lain untuk melihat kemungkinan selektivitas antikankernya

DAFTAR PUSTAKA

- ATCC. 2001. ATCC MCF7.
- Altemimi, A., N. Lakhssassi, A. Baharlouei, dan D. G. Watson. 2017. Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts
- Aravind, S. R., T. T. Sreelekha, B. S. Dileep Kumar, S. N. Kumar, dan C. Mohandas. 2014. Characterization of Three Depside Compounds from A Western Ghat Lichen *Parmelia Erumpens* Kurok With Special Reference To Antimicrobial And Anticancer Activity. *RSC Advances*. 4(65):34632–34643.
- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, dan A. K. M. Omar. 2013. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *Journal of Food Engineering*. 117(4):426–436.
- Badisa, R. B., S. F. Darling-reed, P. Joseph, S. John, L. M. Latinwo, dan C. B. Goodman. 2010. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. 29(8):2993–2996.
- Bazaid, S. A., M. M. Shohayeb, M. M. El-sayed, dan E. A. El-wakil. 2012. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant , Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus Erectus* L . Growing In Taif , Saudi Arabia. 2(2):93–112.
- Bessadóttir, M., E. Skúladóttir, S. Gowan, S. Eccles, S. Ómarsdóttir, dan H. M. Ögmundsdóttir. 2014. Effects of Anti-Proliferative Lichen Metabolite, Protolichesterinic Acid on Fatty Acid Synthase, Cell Signalling and Drug Response in Breast Cancer Cells. *Phytomedicine*. 21(12):1717–1724.
- Bhattacharai, H. D., T. Kim, H. Oh, dan J. H. Yim. 2013. A New Pseudodepsidone from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum* and Its Antioxidant, Antibacterial Activity. *Journal of Antibiotics*. 66(9):559–561.
- Bhattacharai, H. D., B. Paudel, S. G. Hong, H. K. Lee, dan J. H. Yim. 2008. Thin Layer Chromatography Analysis of Antioxidant Constituents of Lichens from Antarctica. *Journal of Natural Medicines*. 62(4):481–484.
- Brisdelli, F., M. Perilli, D. Sellitri, M. Piovano, J. A. Garbarino, M. Nicoletti, A. Bozzi, G. Amicosante, dan G. Celenza. 2013. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. *Phytotherapy Research*. 27(3):431–437.
- Brodo, I. M. dan B. Craig. 2006. Identifying Mixed Hardwood Forest Lichens
- Bucar, F., I. Schneider, H. Ögmundsdóttir, dan K. Ingólfssdóttir. 2004. Anti-Proliferative Lichen Compounds With Inhibitory Activity on 12(S)-HETE Production in Human Platelets. *Phytomedicine*. 11(7–8):602–606.
- Burlando, B., E. Ranzato, A. Volante, G. Appendino, F. Pollastro, dan L. Verotta.


2009. Antiproliferative Effects on Tumour Cells And Promotion of Keratinocyte Wound Healing by Different Lichen Compounds. *Planta Medica*. 75(6):607–613.
- Cardile, V., A. C. E. Graziano, R. Avola, M. Piovano, dan A. Russo. 2017. Chemico-Biological Interactions Potential Anticancer Activity of Lichen Secondary Metabolite Physodic Acid. *Chemico-Biological Interactions*. 263:36–45.
- de Oliveira, P. F., J. M. Alves, J. L. Damasceno, R. A. M. Oliveira, H. Júnior Dias, A. E. M. Crotti, dan D. C. Tavares. 2015. Cytotoxicity Screening of Essential Oils in Cancer Cell Lines. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 25(2):183–188.
- Delebassée, S., L. Mambu, E. Pinault, Y. Champavier, B. Liagre, dan M. Millot. 2017. Cytochalasin E In The Lichen Pleurosticta Acetabulum. Anti-Proliferative Activity Against Human HT-29 Colorectal Cancer Cells And Quantitative Variability. *Fitoterapia*. 121(May):146–151.
- Dieu, A., M. Millot, Y. Champavier, L. Mambu, V. Chaleix, V. Sol, dan V. Gloaguen. 2014. Uncommon Chlorinated Xanthone And Other Antibacterial Compounds From The Lichen *Cladonia incrassata*. *Planta Medica*. 80(11):931–935.
- Durai, M. V, G. Balamuniappan, dan S. Geetha. 2016. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Leaf , Seed and Central-Fruit-Axis Crude Extract of *Swietenia Macrophylla* King. 5(3):181–186.
- Duval, R. E., I. Clarot, F. Dumarcay-Charbonnier, S. Fontanay, dan A. Marsura. 2012. Interest of Designed Cyclodextrin-Tools in Gene Delivery. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 70(6):360–369.
- Fernandez-Moriano, C., P. K. Divakar, A. Crespo, dan M. P. Gomez-Serranillos. 2015. Neuroprotective Activity and Cytotoxic Potential of Two Parmeliaceae Lichens: Identification Of Active Compounds. *Phytomedicine*. 22(9):847–855.
- Garampalli, R. H. 2018. Chemical Composition and Correlation Study on Phytochemicals of Some Species Lichens. 5(3): 167-176
- Gulluce, M., A. Aslan, M. Sokmen, F. Sahin, A. Adiguzel, G. Agar, dan A. Sokmen. 2006. Screening The Antioxidant and Antimicrobial Properties of The Lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine*. 13(7):515–521.
- Honegger, R. 2009. *The Mycota*. September.
- Houghton, P. J. dan A. Raman. 2012. Laboratory Handbook for The Fractionation Of Natural Extracts. Springer.

- Husøy, T., T. Syversen, dan J. Jenssen. 1993. Comparisons of Four In Vitro Cytotoxicity Tests: The MTT Assay, NR Assay, Uridine Incorporation and Protein Measurements. *Toxicology in Vitro*. 7(2):149–154.
- ITIS. 1996. *Phyiscia millegrana Degel*. ITIS Report. TSN 191100
- Ludwiczuk, A., K. Skalicka-Woźniak, dan M. I. Georgiev. 2017. *Terpenoids. Pharmacognosy*.
- Mandal, D. S. C., D. V. Mandal, dan D. A. K. Das. 2015. Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications. London: Elsevier Inc.
- Marquette, C. dan L. Nabell. 2012. Chemotherapy-Resistant Metastatic Breast Cancer. 263–275.
- Meiyanto, E. 2013. Uji Sitotoksik Metode MTT. *Fakultas Farmasi, UGM*
- Mishra, T., S. Shukla, S. Meena, R. Singh, M. Pal, D. K. Upreti, dan D. Datta. 2017. Isolation and Identification of Cytotoxic Compounds from A Fruticose Lichen *Roccella montagnei*, and It's In Silico Docking Study Against CDK-10. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 4–8.
- Molnár, K. dan E. Farkas. 2010. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: A Review. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 65(3–4):157–173.
- Ndam, L. M., A. M. Mih, A. G. N. Fongod, A. S. Tening, R. K. Tonjock, J. E. Enang, dan Y. Fujii. 2014. Phytochemical Screening of The Bioactive Compounds in Twenty (20) Cameroonian Medicinal Plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(12):768–778.
- Nguyen, T. T., S. Yoon, Y. Yang, H.-B. Lee, S. Oh, M.-H. Jeong, J.-J. Kim, S.-T. Yee, F. Crisan, C. Moon, K. Y. Lee, K. K. Kim, J.-S. Hur, dan H. Kim. 2014. Lichen Secondary Metabolites in Flavocetraria Cucullata Exhibit Anti-Cancer Effects on Human Cancer Cells Through The Induction of Apoptosis and Suppression of Tumorigenic Potentials. *PLoS One*. 9(10)
- NIH. 2019. Atranorin. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/479-20-9> [Diakses pada Januari 17, 2019].
- Oun, R., Y. E. Moussa, dan N. J. Wheate. 2018. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalton Transactions*. 47(19):6645–6653.
- Panigoro, S., B. S. Hernowo, H. Purwanto, dan et al. 2017. Kanker Payudara. *Kementrian Kesehatan Republik Indonesia*. 1–124.
- Pereira, J., J. Gonçalves, V. Alves, dan J. S. Câmara. 2013. Microextraction Using Packed Sorbent as An Effective and High-Throughput Sample Extraction Technique: Recent Applications and Future Trends. *Sample Preparation*. 1:38–53.

- Ponnusamy, L., P. K. S. Mahalingaiah, Y. Chang, dan K. P. Singh. 2018. Reversal of Epigenetic Aberrations Associated with The Acquisition of Doxorubicin Resistance Restores Drug Sensitivity In Breast Cancer Cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 123(April):56–69.
- Rankovic, B. dan M. Kosanic. 2011. Antioxidant and Antimicrobial Properties Of Some Lichens and Their Constituents. 14(September 2009):1624–1630.
- Sharma, N., M. Dobhal, Y. Joshi, dan M. Chahar. 2011. Flavonoids: A Versatile Source of Anticancer Drugs. *Pharmacognosy Reviews*. 5(9):1.
- Singh, N., D. Nambiar, R. K. Kale, dan R. P. Singh. 2013. Usnic Acid Inhibits Growth And Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis In Human Lung Carcinoma A549 Cells. *Nutrition and Cancer*. 65:36–43.
- Sisodia, R., M. Geol, S. Verma, A. Rani, dan P. Dureja. 2013. Antibacterial and Antioxidant Activity of Lichen Species *Ramalina roesleri*. *Natural Product Research*. 27(23):2235–2239.
- Smallwood, I. . 1996. Handbook of Organic Solvent Properties. *Arnold*. 7(9):256.
- Stocker-Wörgötter, E., L. M. C. Cordeiro, dan M. Iacomini. 2013. Accumulation of Potential Pharmaceutically Relevant Lichen Metabolites in Lichens and Cultured Lichen Symbionts
- Suh, S.-S., T. Kim, J. Kim, J.-M. Hong, T. Nguyen, S. Han, U. Youn, J. Yim, dan I.-C. Kim. 2017. Anticancer Activity of Ramalin: A Secondary Metabolite from The Antarctic Lichen *Ramalina terebrata* Against Colorectal Cancer Cells. *Molecules*. 22(8):1361.
- Thadhani, V. M., M. I. Choudhary, S. Ali, I. Omar, H. Siddique, dan V. Karunaratne. 2011. Antioxidant Activity of Some Lichen Metabolites. *Natural Product Research*. 25(19):1827–1837.
- World Health Organization. 2018. Cancer. <https://www.who.int/cancer/en/> [Diakses pada Januari 17, 2019].
- World Health Organization. 2014. Cancer Country Profile: Indonesia. *Cancer Country Profiles*. 22–23.
- Yuan, C. 2016. Antibacterial Compounds and Other Constituents of *Evernia divaricata* (L .) Ach . *Journal- Chemical Society of Pakistan*. 32(2)

LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi Lichen *Physcia millegrana*


UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN
Jalan Tekniko Selatan Sekeloa Utara Yogyakarta 55281 Telp: (0274) 6492262/6492277, Fax: (0274) 80639

SURAT KETERANGAN
Nomor : 014452/ S.Tb. /I/ 2019

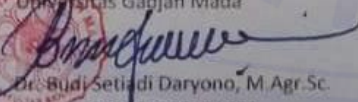
Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,

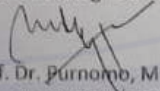
Nama : Tinton Agung Laksono
NIM : 152210101097
Asal instansi : Fakultas Farmasi Universitas Jember

telah melakukan identifikasi Lichen dengan hasil sebagai berikut,

Divisi : Ascomycota
Class : Lecanoromycetes
Ordo : Teleschistales
Familia : Physciaceae
Genus : Physcia
Species : *Physcia millegrana* Degel

identifikasi tersebut dibantu oleh Ludmilla Fitri Untari, S.Si., M.Sc.
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada

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

Yogyakarta, 16 Januari 2019
Kepala Laboratorium
Sistematika Tumbuhan
Fakultas Biologi UGM

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

Lampiran 2 Perhitungan Rendemen Ekstrak d**1. Rendemen Ekstrak Metanol**

Berat serbuk kering liken	= 100 gram
Berat wadah + ekstrak kering	= 18,08 gram
Berat wadah kosong	= 12,82 gram
Ekstrak kering	= 5,26 gram
Rendemen ekstrak etanol	$= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Berat serbuk awal}} \times 100\%$
	$= \frac{5,26 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100\%$
	= 5,26 %

2. Rendemen Fraksi Heksana

Berat ekstrak untuk fraksinasi	= 1,5 gram
Berat wadah + fraksi heksana	= 13,36 gram
Berat wadah kosong	= 12,93 gram
Fraksi heksana	= 0,43 gram
Rendemen fraksi heksana	$= \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi}} \times 100\%$
	$= \frac{0,43 \text{ gram}}{1,5 \text{ gram}} \times 100\%$
	= 28,67 %

3. Rendemen Fraksi Etil Asetat

Berat ekstrak untuk fraksinasi	= 1,5 gram
Berat wadah + fraksi etil asetat	= 12,585 gram
Berat wadah kosong	= 12,56 gram
Fraksi etil asetat	= 0,025 gram

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen fraksi etil asetat} &= \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,025 \text{ gram}}{1,50 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 1,66 \%
 \end{aligned}$$

4. Rendemen Fraksi Diklorometana

$$\begin{aligned}
 \text{Berat ekstrak untuk fraksinasi} &= 1,5 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah + fraksi diklorometana} &= 13,55 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah kosong} &= 12,58 \text{ gram} \\
 \text{Fraksi diklorometana} &= 0,972 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen fraksi diklorometana} &= \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak untuk fraksinasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,972 \text{ gram}}{1,50 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 64,8\%
 \end{aligned}$$

5. Rendemen Residu

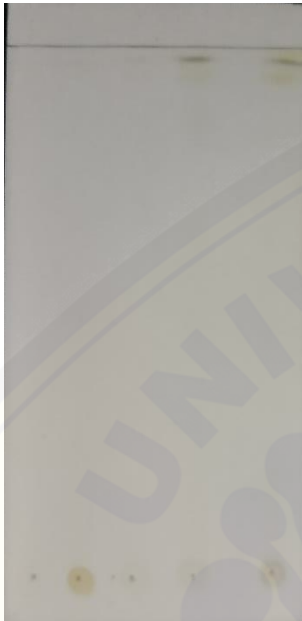
$$\begin{aligned}
 \text{Residu} &= 1,5 \text{ g} - (\text{Berat Total Fraksi}) \\
 &= 1,5 - 1,498 = 0,073 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen Residu} &= \frac{0,073 \text{ gram}}{1,50 \text{ gram}} \times 100\% = 4,8 \%
 \end{aligned}$$

6. Dokumentasi Sampel



Lampiran 3 Skrining Fitokimia dengan metode KLT

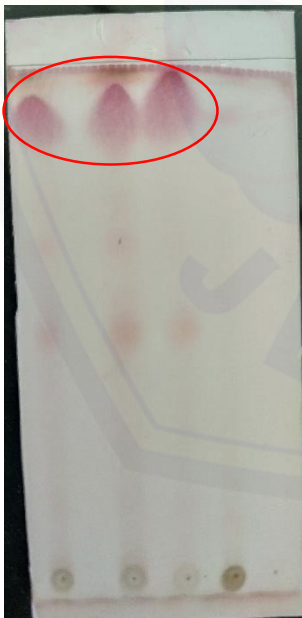
1. Alkaloid



3. Flavonoid



2. Terpenoid dan Steroid



4. Polifenol



Lampiran 4 Perhitungan Pembuatan Media Kultur Sel

Media Kultur dibuat dengan resep sebagai berikut :

1. FBS (Foetal Bovine Serum) 10%
2. Penisilin-streptomisin 1%
3. Amphoterizine B 5%
4. Media RPMI ad 100%

Setiap microplate membutuhkan 10 mL media kultur untuk penanaman sel, maka bahan yang diperlukan :

1. FBS (Foetal Bovine Serum) $= \frac{10}{100} \times 10 = 10 \text{ ml}$
2. Penisilin-streptomisin $= \frac{1}{100} \times 10 = 0,1 \text{ ml}$
3. Amphoterizine B $= \frac{5}{100} \times 10 = 0,5 \text{ ml}$
4. Media RPMI $= \text{ad } 10 \text{ ml}$

Lampiran 5 Konsentrasi Uji Sitotoksistas

1. Larutan Induk Ekstrak dan Fraksi

$$\begin{aligned} \text{Penimbangan sampel} &= 5 \text{ mg} \\ \text{Konsentrasi sampel dalam DMSO} &= \frac{5 \text{ mg}}{50 \mu\text{L}} \times 10^6 \\ &= 100,000 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

2. Pengenceran Ekstrak dan Fraksi Liken *Physcia millegrana*

Larutan induk kemudian diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi bertingkat kelipatan 2 menggunakan pelarut media RPMI sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{a. } &\frac{6 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100.000 \mu\text{g/ml} = 600 \mu\text{g/ml} \\ \text{b. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 600 \mu\text{g/ml} = 300 \mu\text{g/ml} \\ \text{c. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 300 \mu\text{g/ml} = 150 \mu\text{g/ml} \\ \text{d. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 150 \mu\text{g/ml} = 75 \mu\text{g/ml} \\ \text{e. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 75 \mu\text{g/ml} = 37,5 \mu\text{g/ml} \\ \text{f. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 37,5 \mu\text{g/ml} = 18,75 \mu\text{g/ml} \\ \text{g. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 17,75 \mu\text{g/ml} = 9,375 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

3. Pembuatan Larutan Uji *Doxorubicin*

Larutan induk *Doxorubicin* 2 mg/ml diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi bertingkat kelipatan 2 menggunakan pelarut media RPMI sebagai berikut :

$$\begin{aligned} \text{a. } &\frac{50 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 2.000 \mu\text{g/ml} = 100 \mu\text{g/ml} \\ \text{b. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 100 \mu\text{g/ml} = 50 \mu\text{g/ml} \\ \text{c. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 50 \mu\text{g/ml} = 25 \mu\text{g/ml} \\ \text{d. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 25 \mu\text{g/ml} = 12,5 \mu\text{g/ml} \\ \text{e. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 12,5 \mu\text{g/ml} = 6,25 \mu\text{g/ml} \\ \text{f. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 6,25 \mu\text{g/ml} = 3,125 \mu\text{g/ml} \\ \text{g. } &\frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \times 3,125 \mu\text{g/ml} = 1,5625 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Lampiran 6 Data Absorbansi Uji Sitotoksitas

1. Absorbansi Uji Sitotoksitas Ekstrak Metanol terhadap Sel MCF-7

Ekstrak Metanol						
Konsentrasi	Absorbansi			\bar{X}	SD	% Sel Hidup
1000	0,164	0,153	0,138	0,15166667	0,01305118	10,94036552
500	0,304	0,283	0,283	0,29	0,01212436	37,18459495
250	0,435	0,539	0,524	0,49933333	0,05621684	76,89875419
125	0,544	0,665	0,644	0,61766667	0,0646555	99,3486372
62,5	0,567	0,712	0,715	0,66466667	0,08459511	108,2653513
31,25	0,593	0,736	0,692	0,67366667	0,07324161	109,9728072
15,625	0,652	0,76	0,724	0,712	0,05499091	117,2453045
Kontrol Sel		Kontrol Media		Kontrol Sel - Kontrol Media		
0,6211		0,094		0,5271		

2. Absorbansi Uji Sitotoksitas Fraksi Heksan terhadap Sel MCF-7

Heksan						
Konsentrasi	Absorbansi			\bar{X}	SD	% Sel Hidup
600	0,186	0,176	0,221	0,194333	0,023629	31,75105485
300	0,264	0,266	0,293	0,274333	0,016197	57,06751055
150	0,365	0,347	0,384	0,365333	0,018502	85,8649789
75	0,453	0,436	0,498	0,462333	0,032036	116,5611814
37,5	0,437	0,435	0,477	0,449667	0,023692	112,5527426
18,75	0,438	0,441	0,488	0,455667	0,028042	114,4514768
9,375	0,426	0,432	0,476	0,444667	0,027301	110,9704641
Kontrol Sel		Kontrol Media		Kontrol Sel - Kontrol Media		
0,41		0,094		0,316		

3. Absorbansi Uji Sitotoksitas Fraksi Diklorometana terhadap Sel MCF-7

Diklorometana						
Konsentrasi	Absorbansi			\bar{X}	SD	% Sel Hidup
600	0,232	0,213	0,223	0,222667	0,009504	40,71729958
300	0,278	0,26	0,266	0,268	0,009165	55,06329114
150	0,378	0,352	0,344	0,358	0,017776	83,5443038
75	0,394	0,411	0,417	0,407333	0,01193	99,15611814
37,5	0,434	0,415	0,402	0,417	0,016093	102,2151899
18,75	0,447	0,44	0,413	0,433333	0,017954	107,3839662
9,375	0,435	0,442	0,423	0,433333	0,009609	107,3839662
Kontrol Sel		Kontrol Media		Kontrol Sel - Kontrol Media		
0,41		0,094		0,316		

4. Absorbansi Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat terhadap Sel MCF-7

Diklorometana						
Konsentrasi	Absorbansi			\bar{X}	SD	% Sel Hidup
600	0,122	0,117	0,124	0,121	0,003606	8,544303797
300	0,258	0,294	0,204	0,252	0,045299	50
150	0,273	0,335	0,262	0,29	0,039357	62,02531646
75	0,348	0,37	0,345	0,354333	0,01365	82,38396624
37,5	0,368	0,406	0,455	0,409667	0,043616	99,89451477
18,75	0,42	0,422	0,441	0,427667	0,01159	105,5907173
9,375	0,458	0,391	0,432	0,427	0,033779	105,3797468
Kontrol Sel	Kontrol Media			Kontrol Sel - Kontrol Media		
0,41	0,094			0,316		

5. Absorbansi Uji Sitotoksitas Doxorubicin terhadap Sel MCF-7

Doxorubicin						
Konsentrasi	Absorbansi			\bar{X}	SD	% Sel Hidup
100	0,186	0,176	0,221	0,194333	0,023629	31,96635
50	0,264	0,266	0,293	0,274333	0,016197	57,20294
25	0,365	0,347	0,384	0,365333	0,018502	85,90957
12,5	0,453	0,436	0,498	0,462333	0,032036	116,5089
6,25	0,437	0,435	0,477	0,449667	0,023692	112,5131
3,125	0,438	0,441	0,488	0,455667	0,028042	114,4059
1,563	0,426	0,432	0,476	0,444667	0,027301	110,9359
Kontrol Sel	Kontrol Media			Kontrol Sel - Kontrol Media		
0,41	0,094			0,316		

6. Absorbansi Uji Sitotoksitas Ekstrak terhadap Sel Vero

Diklorometana						
Konsentrasi	Absorbansi			\bar{X}	SD	% Sel Hidup
600	0,122	0,133	0,127	0,122	0,126	5,733333333
300	0,32	0,351	0,377	0,365	0,35325	39,4
150	0,644	0,774	0,714	0,686	0,7045	91,43703704
75	0,615	0,772	0,775	0,741	0,72575	94,58518519
37,5	0,702	0,869	0,821	0,795	0,79675	105,1037037
18,75	0,673	0,839	0,83	0,789	0,78275	103,0296296
9,375	0,753	0,897	0,937	0,816	0,85075	113,1037037
Kontrol Sel	Kontrol Media			Kontrol Sel - Kontrol Media		
0,7623	0,0873			0,675		

Lampiran 7 Analisis Statistik

1. Tabel Normalitas

		Tests of Normality					
sampel		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50	metanol	,292	3	,	,924	3	,466
	heksan	,314	3	,	,892	3	,362
	dcm	,223	3	,	,985	3	,764
	etil	,268	3	,	,951	3	,573

2. Tabel Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
IC ₅₀			
	Levene Statistic	df1	Sig.
	1,241	3	,357

3. Rata-rata Nilai IC₅₀

Descriptives						
	N	Mean (IC ₅₀)	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
metanol	3	435,4300	61,79432	35,67697	281,9244	588,9356
heksan	3	379,8967	65,41433	37,76698	217,3985	542,3949
dcm	3	463,4400	33,16891	19,15008	381,0438	545,8362
etil	3	298,4700	35,36442	20,41766	210,6199	386,3201
Total	12	394,3092	78,90464	22,77781	344,1755	444,4428

4. Analisis One Way Anova

ANOVA					
IC ₅₀					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	47588,583	3	15862,861	6,073	,019
Within Groups	20896,783	8	2612,098		
Total	68485,366	11			

5. Analisis LSD

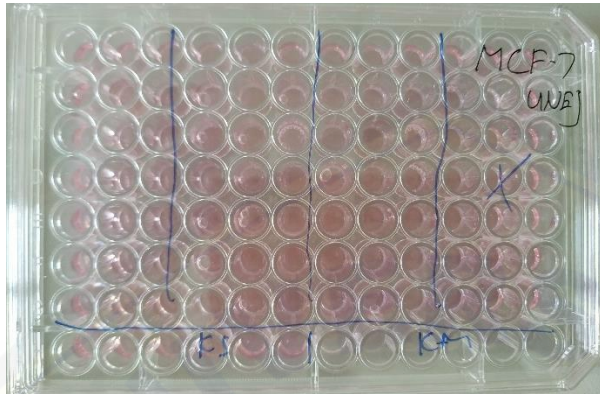
Multiple Comparisons						
Dependent Variable: ic50						
LSD						
(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
metanol	heksan	55,53333	41,73007	,220	-40,6964	151,7630
	dcm	-28,01000	41,73007	,521	-124,2397	68,2197
	etil	136,96000*	41,73007	,011	40,7303	233,1897
heksan	metanol	-55,53333	41,73007	,220	-151,7630	40,6964
	dcm	-83,54333	41,73007	,080	-179,7730	12,6864
	etil	81,42667	41,73007	,087	-14,8030	177,6564
Dam	metanol	28,01000	41,73007	,521	-68,2197	124,2397
	heksan	83,54333	41,73007	,080	-12,6864	179,7730
	etil	164,97000*	41,73007	,004	68,7403	261,1997
Etil	metanol	-136,96000*	41,73007	,011	-233,1897	-40,7303
	heksan	-81,42667	41,73007	,087	-177,6564	14,8030
	dcm	-164,97000*	41,73007	,004	-261,1997	-68,7403

6. Rata-rata Nilai CC₅₀

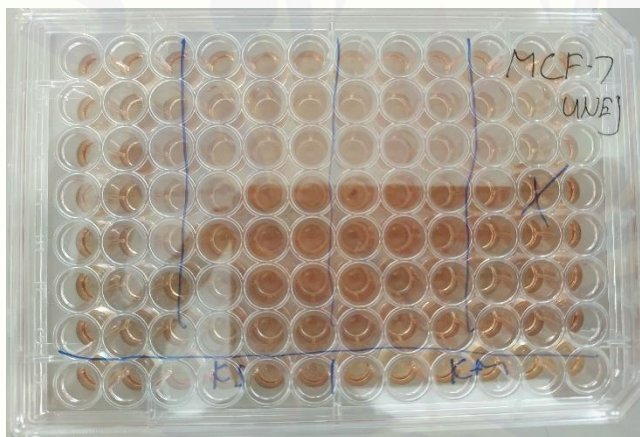
Report			
CC ₅₀			
sampel	Mean	N	Std, Deviation
Vero	514,8867	3	63,41481
Total	514,8867	3	63,41481

Lampiran 8 Uji Sitotoksitas

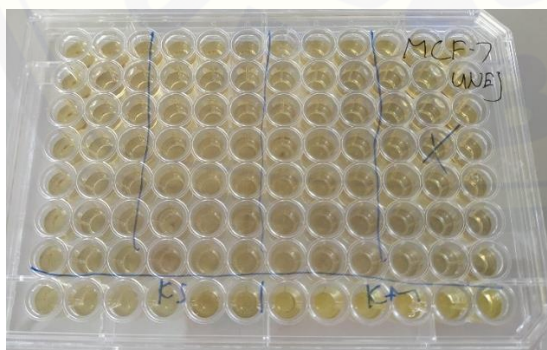
1. Sel sebelum perlakuan



2. Pewarnaan sel yang telah diuji dan diberi pewarnaan



3. Penambahan reagen stopper



4. Hasil pengukuran absorbansi

