



**UJI SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL  
TERPURIFIKASI *Arcangelisia flava* PADA SEL KANKER PAYUDARA  
MCF-7**

**SKRIPSI**

Oleh

**Yora Utami**

**NIM 112210101076**

**FAKULTAS FARMASI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**



**UJI SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL  
TERPURIFIKASI *Arcangelisia flava* PADA SEL KANKER PAYUDARA  
MCF-7**

**SKRIPSI**

diajukan untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu Fakultas Farmasi dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

**Yora Utami**

**NIM 112210101076**

**FAKULTAS FARMASI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**

**PERSEMBAHAN**

Penulis persembahkan skripsi ini untuk:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW
2. Orang tua tercinta, Ibu Inawati dan Bapak Sabdo Wulyo Utomo, yang telah membesarkanku dengan penuh kasih sayang, membimbingku, memberi doa, nasehat, dan semangat yang tidak pernah berhenti;
3. Adik-adikku, Ahmad Siddik Utomo, Ahmad Fadillah Utomo, dan Ahmad Fuzan Utomo yang telah memberi kasih sayang dan mendukungku selama ini;
4. Guru–guruku sejak TK sampai Perguruan Tinggi terhormat, yang dengan tulus memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran.
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTTO**

Jika kamu bersungguh-sungguh, kesungguhan itu untuk kebaikanmu sendiri.

(Al-Ankabut, ayat 6)

Selalu ada Allah untuk orang yang sabar.

(Al-Anfal, ayat 66)

Barang siapa menempuh suatu jalan untuk mencari ilmu, maka Allah memudahkannya mendapat jalan ke surga

( H.R Muslim)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Yora Utami

NIM : 112210101076

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul Uji Sitotoksisitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Terpurifikasi *Arcangelisia flava* pada Sel Kanker Payudara MCF-7 adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan 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, 23 Desember 2015

Yang menyatakan,

Yora Utami

NIM 112210101076

**SKRIPSI**

**UJI SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL  
TERPURIFIKASI *Arcangelisia flava* PADA SEL KANKER PAYUDARA  
MCF-7**

Oleh

Yora utami

NIM.112210101076

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Endah Puspitasari, S. Farm., M. Sc., Apt

Dosen Pembimbing Anggota : Dian Agung P, S. Farm., M. Sc., Apt

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul Uji Sitotoksitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Terpurifikasi *Arcangelisa flava* pada Sel Kanker Payudara MCF-7 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

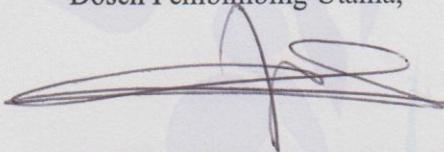
Hari : Rabu

Tanggal : 23 Desember 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

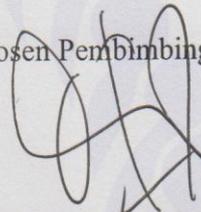
Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.  
NIP.198107232006042002

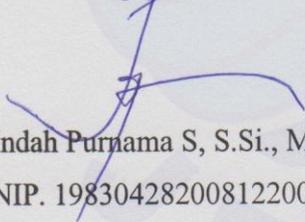
Dosen Pembimbing Anggota,



Dian Agung P, S.Farm., M.Sc., Apt.  
NIP.198410082008121004

Tim Penguji

Dosen Penguji I,



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

Dosen Penguji II,



Indah Yulia N, S.Farm., M.Farm., Apt.  
NIP.198407122008122002



Mengesahkan

Dekan,

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

NIP.197604142002122001

## RINGKASAN

**Uji Sitotoksisitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Terpurifikasi *Arcangelisia flava* pada Sel Kanker Payudara MCF-7;** Yora Utami, 112210101076; Skripsi; Desember; 2015; halaman 41; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kanker adalah salah satu penyakit yang sangat sulit ditangani dan menjadi penyebab kurang lebih 13% kematian di seluruh dunia. Berdasarkan data WHO pada tahun 2012, terdapat 14,1 juta kasus kanker dan diperkirakan akan terus meningkat sampai tahun 2030 menjadi 23,6 juta kasus setiap tahunnya. Menurut Riset Kesehatan Dasar dikatakan bahwa prevalensi penyakit kanker di Indonesia sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Kanker payudara merupakan tumor ganas yang tumbuh di sel-sel payudara. Tumor ganas adalah sekelompok sel kanker yang dapat tumbuh menjadi jaringan sekitarnya atau menyebar ke organ tubuh lain.

Menurut Tsao *et al.*, Pengobatan penyakit kanker dengan efek samping yang relatif kecil dan aman adalah dengan menggunakan bahan alam. Penggunaan senyawa alam, sintesis atau agen biologis kimia untuk membalikkan, menekan atau mencegah progresi karsinogenik hingga menjadi kanker yang invasif disebut dengan agen kemoprevensi. Tumbuhan *Arcangelisia flava* memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid protoberberin, yang terdiri dari berberin, palmatin, dan jatrorrhizin. Berberin memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231.

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari sampai bulan Agustus 2015 bertempat di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Jogjakarta untuk uji sitotoksisitas *in vitro*. Penelitian ini untuk mengetahui efek

sitotoksik dari ekstrak terpurifikasi daun *A. flava* terhadap sel MCF-7. Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT.

Pada penelitian sebelumnya, berdasarkan data dari Puspitasari *et al.*, diketahui bahwa ekstrak etanol total daun *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik yang selektif terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $136 \pm 17 \mu\text{g/ml}$  dan SI sebesar 9,85. Uji sitotoksik ekstrak terpurifikasi daun *A. flava* terhadap sel kanker payudara memberikan hasil berupa penurunan jumlah sel hidup seiring dengan peningkatan kadar. Semakin tinggi konsentrasi, maka semakin rendah jumlah sel hidup. Pada konsentrasi larutan uji 100  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan presentase hidup sebesar 86,47 %; 200  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 80,53 %; 400  $\mu\text{g/ml}$  78,25 %; 700  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 74,17 %; 1.000  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 65,81 %. Metode yang digunakan dalam penelitian ini merupakan metode yang valid karena nilai CV berada di bawah batas yang ditentukan yaitu 15,74 %, menurut Vanderperren *et al.*, batas maksimal yang diperbolehkan untuk uji menggunakan sel adalah sebesar 30 %. Nilai  $IC_{50}$  rata-rata dari 3 eksperimen yaitu sebesar  $1829,84 \pm 288,2 \mu\text{g/ml}$ . Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak *A. flava* terpurifikasi tidak memiliki potensi yang baik sebagai agen sitotoksik pada sel kanker payudara karena nilai  $IC_{50}$  yang di dapatkan lebih dari 1.000  $\mu\text{g/ml}$ . Menurut Omoregie *et al.*, suatu zat dikatakan tidak toksik bila nilai  $IC_{50} > 1.000 \mu\text{g/ml}$ , karena hasil tidak memenuhi syarat uji sitotoksik maka tidak dilakukan uji selektivitas. Untuk penelitian lebih lanjut, penulis menyarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji kombinasi antara ekstrak terpurifikasi *A. flava* dan agen kemoterapi lainnya.

## PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT atas karunia dan berkahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Terpurifikasi *Arcangelisia flava* pada 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 berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Ibu Lestyo Wulandari S.Si., M.Farm., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember.
2. Ibu Endah Puspitasari S.Farm., M.Sc., Apt., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Dian Agung S.Farm., M.Sc., Apt., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini.
3. Ibu Indah Yulia S.Si., Apt., M.Farm dan Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dosen Penguji atas segala masukan yang diberikan.
4. Orang tuaku Bapak Sabdo Wulyo Utomo dan Ibu Inawati atas kasih sayang, dukungan, dan doa yang tiada henti.
5. Vita, Habibi dan Ika yang menjadi tempat curhat dan tukar pikiran serta tak henti-hentinya memberikan dukungan dan selalu ada di saat suka maupun duka.
6. Teman-temanku seperjuangan Alan, Arif, Indarto, Een, Sendika, Nurul, Ditya, Anggar, Alela, Rahma, Elly, Anis, Rida dan teman ASMEF lainnya yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.
7. Rudi Purnomo yang telah membantu memberi semangat dan doa sampai terselesaikannya skripsi ini.

8. Seluruh civitas akademika atas segala bantuan dan kemudahan yang diberikan.
9. Seluruh teman-teman Farmasi dan pihak lain yang turut membantu terselesaikannya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 23 Desember 2015

Penulis

**DAFTAR ISI**

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>PRAKATA.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Tinjauan tentang <i>A. flava</i> .....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Klasifikasi Tumbuhan .....	5
2.1.2 Kandungan dan Khasiat <i>A. flava</i> .....	6
<b>2.2 Tinjauan Kanker Payudara .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Definisi Kanker Payudara .....	7
2.2.2 Insiden Kanker Payudara .....	8
2.2.3 Pengobatan Kanker .....	9
<b>2.3 Tinjauan tentang Sel MCF-7 .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Tinjauan tentang Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT.....</b>	<b>11</b>

2.5 Tinjauan tentang Uji Selektivitas .....	12
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>14</b>
3.1 Jenis Penelitian .....	14
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
3.3 Alat dan Bahan yang Digunakan.....	14
3.3.1 Alat .....	14
3.3.2 Bahan.....	14
3.4 Rancangan Penelitian .....	15
3.5 Variabel Penelitian .....	17
3.5.1 Variabel Bebas.....	17
3.5.2 Variabel Terikat .....	17
3.5.3 Variabel Terkendali .....	17
3.6 Definisi Operasional.....	17
3.7 Pelaksanaan Penelitian .....	18
3.7.1 Pembuatan Ekstrak Etanol <i>A. flava</i> .....	18
3.7.2 Preparasi Kultur Sel.....	20
3.7.3 Preparasi Sampel .....	21
3.7.4 Uji Sitotoksik Metode MTT .....	21
3.8 Analisis data.....	22
3.8.1 Uji Sitotoksisitas Menggunakan Metode MTT .....	22
3.8.2 Uji Selektivitas.....	23
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>24</b>
4.1 Hasil Uji Sitotoksisitas .....	24
4.1.1 Uji Sitotoksik Sel Kanker Payudara MCF-7 .....	24
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>29</b>
5.1 Kesimpulan .....	29
5.2 Saran .....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>35</b>

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 <i>Arcangelisia flava</i> .....	5
Gambar 2.2 Senyawa berberin.....	6
Gambar 2.3 Payudara normal dan payudara terkena tumor .....	7
Gambar 2.4 Sel kanker MCF-7.....	11
Gambar 2.5 Mekanisme MTT .....	12
Gambar 3.1 Diagram uji sitotoksitas <i>in vitro</i> .....	15
Gambar 3.2 Diagram alur penelitian .....	18
Gambar 3.3 Diagram alur proses ekstraksi <i>A. flava</i> .....	19
Gambar 3.4. Penampang <i>haemocytometer</i> .....	20
Gambar 4.1. Morfologi sel MCF-7.....	25
Gambar 4.2. Kurva uji sitotoksitas .....	26

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker adalah salah satu penyakit yang sangat sulit ditangani dan menjadi penyebab kurang lebih 13% kematian di seluruh dunia. Pada tahun 2012, terdapat 14,1 juta kasus kanker dan diperkirakan akan terus meningkat sampai tahun 2030 menjadi 23,6 juta kasus setiap tahunnya (WHO, 2014). Berdasarkan data WHO, 8-9% wanita menderita kanker payudara, dan kanker payudara menjadi penyebab kematian nomor dua pada wanita. Menurut Riset Kesehatan Dasar (2013) dikatakan bahwa prevalensi penyakit kanker di Indonesia sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang.

Obat antikanker dapat dibedakan menjadi dua yaitu obat konvensional dan obat dengan target molekuler yang spesifik. Obat konvensional yang dimaksud adalah obat-obat sitostatika (agen kemoterapi) seperti taksol, bleomisin, klorambusil, tiotepa, alkaloid indol seperti vinblastin, dan vinkristin. Obat sitostatika bekerja dengan mempengaruhi metabolisme asam nukleat terutama DNA atau biosintesis protein (Siswandono *et al.*, 2000).

Salah satu ciri sel kanker adalah tidak sensitif terhadap sinyal antiproliferasi. Oleh karena itu, pengobatan penyakit kanker dengan obat-obat sitostatik konvensional umumnya menggunakan dosis besar. Peningkatan dosis obat sitostatik menimbulkan masalah karena semakin banyak sel normal yang terserang dan mati. Selain itu, peningkatan dosis dapat menyebabkan sel kanker cepat menjadi resisten terhadap obat (Hanahan dan Weinberg, 2000).

Obat kanker dengan target molekuler yang spesifik seperti doksorubisin adalah agen kemoterapi yang umum dipakai untuk terapi kanker payudara, namun efektivitas penggunaan agen kemoterapi ini menjadi terbatas karena adanya masalah resistensi sel kanker dan adanya efek toksik pada jaringan normal tubuh (Fimognari *et al.*, 2006). Efek toksik pada jaringan tubuh dapat dihindari jika agen kemoterapi digunakan selektif terhadap sel kanker daripada sel normal.

Pengobatan penyakit kanker dengan efek samping yang relatif kecil dan aman adalah dengan menggunakan bahan alam. Penggunaan senyawa alam, sintesis atau agen biologis kimia untuk membalikkan, menekan atau mencegah progresi karsinogenik hingga menjadi kanker yang invasif disebut dengan agen kemoprevensi (Tsao *et al.*, 2004). Eksplorasi agen kemoprevensi kanker yang berasal dari bahan alam dapat dengan mudah dilakukan di Indonesia. Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam, baik flora maupun fauna. Kekayaan flora Indonesia banyak terdapat dalam hutan hujan tropika yaitu sekitar 30.000 spesies dan 1.260 spesies di antaranya berkhasiat obat (Hasanah, 2013).

Tumbuhan *Arcangelisia flava* (*A. flava*) memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid protoberberin, yang terdiri dari berberin, palmatin, dan jatrorrhizin. Berberin memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 (Kim *et al.*, 2008), memberikan efek penghambatan pada proliferasi dan reproduksi mikroorganisme tumorigenik tertentu, memiliki inhibitor enzim yang dapat mempengaruhi N-asetiltransferase, siklooksigenase-2 dan topoisomerase pada ekspresi gen atau protein serta menurunkan pertumbuhan tumor dan juga metastasis sel (Sun *et al.*, 2009). Berberin juga mampu memberikan beberapa penghambatan pada mitokondria kompleks I dan interaksi dengan adenin nukleotida *translocator* (Diogo *et al.*, 2015). Efek antiproliferasi berberin terhadap sel MCF-7 mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 20  $\mu\text{mol/l}$  (Sun *et al.*, 2009).

Tumbuhan *A. flava* sering digunakan sebagai bahan obat, terutama bagian kayunya yang diperoleh dengan cara menebang keseluruhan dari pohonnya, sehingga terjadi peningkatan kepunahan tumbuhan *A. flava* yang juga memiliki pertumbuhan lambat, sehingga regenerasinya tidak terjamin (Setyowati, 2007). Daun tersedia dalam jumlah yang cukup banyak daripada batang dan akar (BAU, 2014). Pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak etanol total daun *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik yang selektif terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $136 \pm 17 \mu\text{g/ml}$  dan SI sebesar 9,85 (Puspitasari *et al.*, 2015). Manfaat

obat herbal dapat ditingkatkan dengan cara membuat ekstrak terpurifikasi, ekstraksi selektif diharapkan akan menghasilkan senyawa-senyawa berkhasiat dan membatasi kemungkinan zat balast yang ikut tersari (Harsini, 2008), sehingga diharapkan aktivitasnya lebih besar dibanding ekstrak etanol total. Penelitian ini diharapkan untuk mengetahui efek sitotoksik dari ekstrak terpurifikasi daun *A. flava* terhadap sel MCF-7. Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Uji selektivitas juga dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak tersebut lebih selektif terhadap sel kanker daripada sel normal. Uji selektivitas dapat dilakukan ketika hasil dari uji sitotoksik sel kanker memenuhi syarat yaitu nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan kurang dari 1.000  $\mu\text{g/ml}$ . Suatu zat dikatakan tidak toksik bila nilai  $IC_{50} > 1.000 \mu\text{g/ml}$  (Omoregie *et al.*, 2012). Sel MCF-7 adalah sel yang resisten terhadap doksorubisin dan tidak mengekspresikan caspase-3 (NCI, 2015). Jika hasil uji sitotoksik dan selektivitas memiliki nilai yang baik, maka dapat digunakan sebagai alternatif terhadap sel MCF-7 yang sudah resisten terhadap doksorubisin.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Apakah ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF 7?
- b. Apakah ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* selektif terhadap sel kanker payudara MCF-7 daripada sel normal Vero?

## 1.3 Tujuan Penelitian

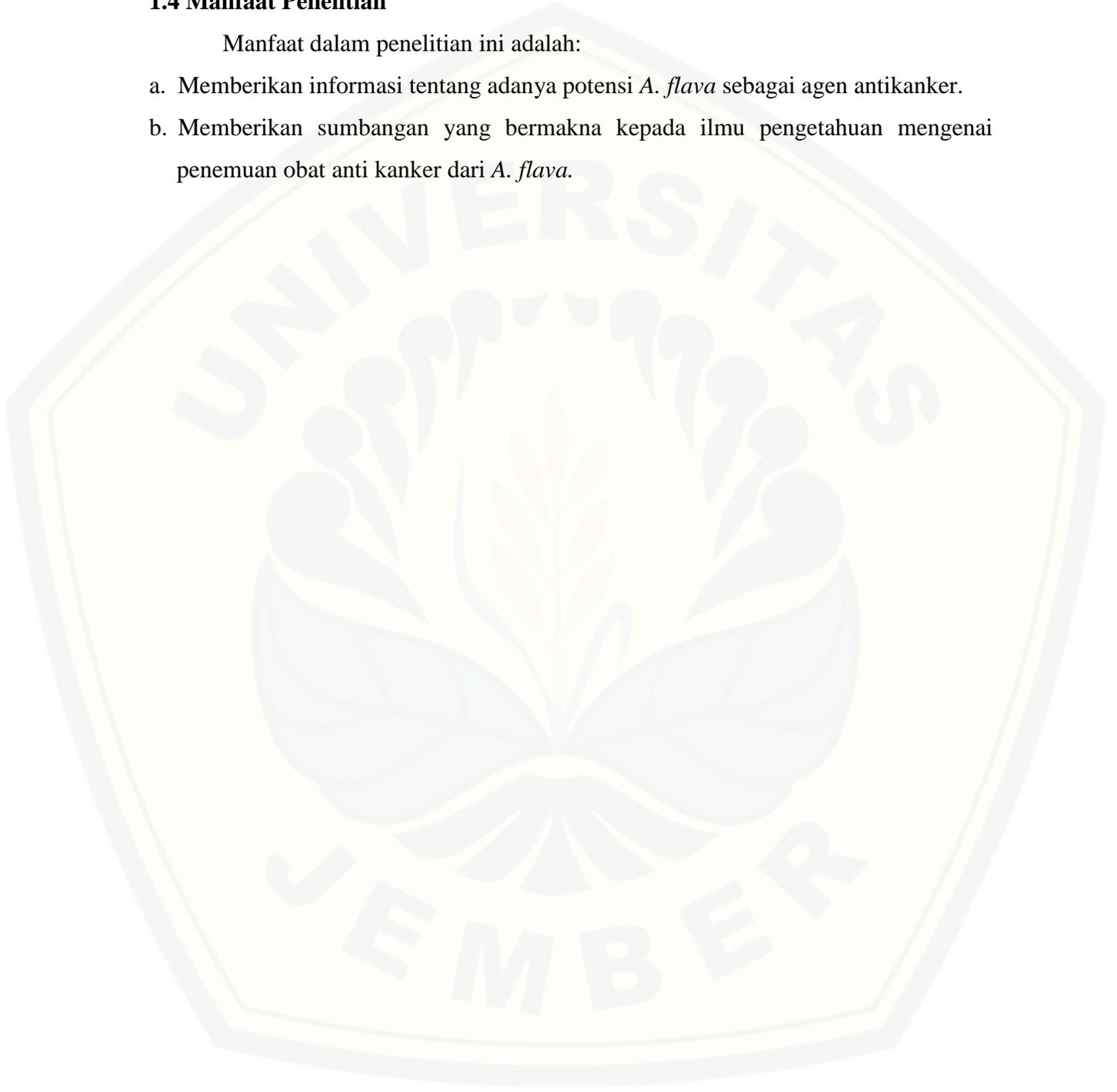
Penelitian ini bertujuan untuk:

- a. Mengetahui ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* sebagai agen antikanker dalam penggunaan tunggal melalui uji sitotoksitas.
- b. Mengetahui selektivitas ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* terhadap sel kanker payudara MCF-7 dibandingkan terhadap sel normal Vero.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian ini adalah:

- a. Memberikan informasi tentang adanya potensi *A. flava* sebagai agen antikanker.
- b. Memberikan sumbangan yang bermakna kepada ilmu pengetahuan mengenai penemuan obat anti kanker dari *A. flava*.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan *Arcangelisia flava*

#### 2.1.1. Klasifikasi Tumbuhan

Klasifikasi tumbuhan *A. flava* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheophyta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Magnolidae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Menispermaceae
Genus	: <i>Arcangelisia</i>
Spesies	: <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr (NCBI, 2013).

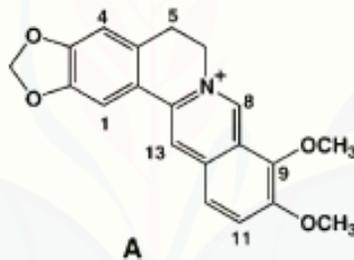
Salah satu tumbuhan yang dikenal sebagai obat adalah *A. flava* yang merupakan tumbuhan menjalar dengan batang kayu bulat, membelit pada pohon-pohon yang tinggi, daunnya berbentuk bulat telur, buahnya seperti duku, bergerombol dan keluar langsung dari batangnya (Gambar 2.1). Tumbuhan *A. flava* memiliki beberapa nama lain, Sunda menyebutnya aruey ki koneng, Jawa menyebutnya oyod sirawan, Minahasa menyebutnya uwas, Halmahera menyebutnya gumi modoku, Malaysia menyebutnya mebgkunyit (Mandia *et al.*, 1999).



Gambar 2.1 Daun *Arcangelisia flava* Merr (Plantamor, 2012)

### 2.1.2 Kandungan dan Khasiat *A. flava*

*A. flava* yang merupakan famili dari Menispermaceae ini diketahui mengandung campuran alkaloid benzyloisoquinoline, yang secara biosintesis diperoleh dari asam amino phenilalanin atau tirosin (Mandia *et al.*, 1999). Pada batang tumbuhan *A. flava* mengandung enam macam senyawa alkaloid kuartener yaitu talifedin, dehidrocoridalim, jatrorizin, berberin, sinarin, dan palmatin. Selain itu juga mengandung tiga macam senyawa alkaloid tersier yaitu hidroksi-berberin, limasin, dan homoarmulin (Verpoote *et al.*, 1982). Berberin adalah garam amonium kuartener dari kelompok protoberberin alkaloid isokuinolin. Alkaloid protoberberin memiliki aktivitas sebagai inhibitor pertumbuhan sel-sel *ehrlich* dan *lymphoma acites* tumor (Mandia *et al.*, 1999). Di antara jenis alkaloid isokuinolin yang terkandung di dalamnya, kandungan terbesar adalah berberin (Gambar 2.2) (Keawpradub *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Struktur kimia senyawa berberin (Bhowmik *et al.*, 2012)

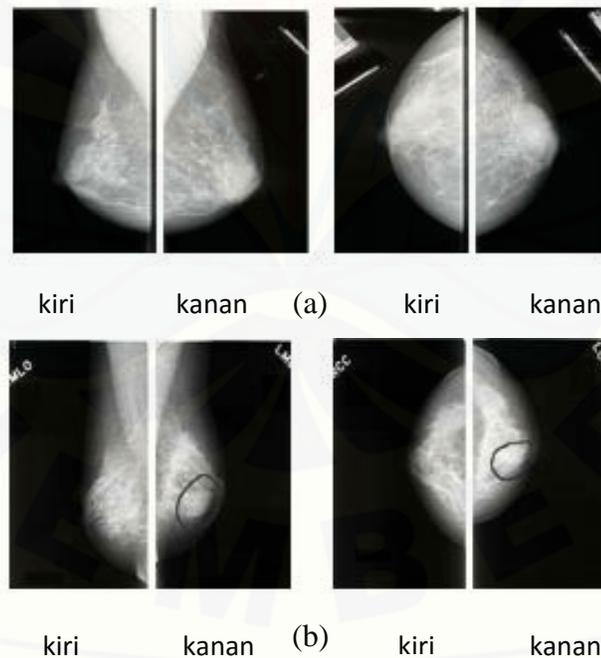
Ekstrak metanol kulit batang *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan  $IC_{50}$  sebesar  $7,7 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$  (Keawpradub *et al.*, 2005). Efek antiproliferasi berberin terhadap sel MCF-7 mempunyai  $IC_{50}$  sebesar  $20 \mu\text{mol/l}$  (Sun *et al.*, 2009). Ekstrak etanol tumbuhan *A. flava* juga dapat memberikan efek penghambatan terhadap proliferasi sel HeLa dengan  $IC_{50}$  sebesar  $49,96 \mu\text{g/ml}$  (Febrinasari, 2012). Ekstrak etanol total daun *A. flava* memiliki efek sitotoksik dengan  $IC_{50}$  sebesar  $136 \pm 17 \mu\text{g/ml}$  dan nilai indeks selektivitas sebesar 9,85 terhadap sel kanker payudara MCF-7 (Puspitasari *et al.*, 2015). Manfaat obat herbal

dapat ditingkatkan dengan cara membuat ekstrak terpurifikasi, ekstraksi selektif diharapkan akan menghasilkan senyawa-senyawa berkhasiat dan membatasi kemungkinan zat balast yang ikut tersari (Harsini, 2008), sehingga diharapkan aktivitas yang dihasilkan lebih besar dibanding ekstrak etanol total. Selain itu, ketika ekstrak kloroform *A. flava* dan doxorubicin dikombinasikan maka dapat memiliki aktivitas imunomodulator (Baroroh, 2014).

## 2.2 Tinjauan Kanker Payudara

### 2.2.1 Definisi Kanker Payudara

Kanker payudara (Gambar 2.3) merupakan tumor ganas yang tumbuh di sel-sel payudara. Tumor ganas adalah sekelompok sel kanker yang dapat tumbuh menjadi jaringan sekitarnya atau menyebar (metastasis) ke organ tubuh lain. Kanker payudara terjadi hampir seluruhnya pada wanita, dan sebagian kecil pada pria (ACS, 2015).



Gambar 2.3 Payudara normal (a) payudara terkena tumor (b) dilihat menggunakan ronsen (Indrati *et al.*, 2009)

### 2.2.2 Insiden Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang sering ditemui pada wanita di dunia, meliputi 16% dari semua jenis kanker yang diderita oleh wanita. Sebanyak 519.000 wanita dilaporkan mengalami kematian akibatnya pada tahun 2004 (WHO, 2004). Insiden kanker payudara yang terjadi pada tahun 2000 di Indonesia berdasarkan ASR adalah sebesar 20,6 per 100.000 penduduk dengan mortalitas sebesar 10,1 per 100.000 penduduk atau sebanyak 10.753 orang. Kanker payudara menurut ASR pada tahun 2005 memiliki mortalitas sebesar 10,9 per 100.000 penduduk dengan jumlah kematian sebanyak 12.352 orang. Kanker payudara merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting, karena morbiditas dan mortalitasnya yang tinggi (Tjindarbumi, 2004).

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2014) dikatakan bahwa kanker payudara berada di urutan kedua yang paling sering ditemukan pada wanita, setelah kanker mulut rahim. Ada beberapa tipe kanker payudara, di antaranya:

a. *Ductal carcinoma in situ* (DCIS)

DCIS diartikan dengan munculnya sel-sel abnormal yang melapisi saluran payudara tanpa adanya pertumbuhan di sepanjang dinding duktus hingga jaringan payudara sehingga disebut juga kanker payudara non-invasif.

b. *Invasive ductal carcinoma* (IDC)

IDC merupakan kanker payudara yang paling umum. Sel yang melapisi saluran payudara mengalami abnormal, kemudian sel-sel abnormal tersebut menerobos dinding duktus dan menyerang jaringan payudara sehingga sel-sel kanker dapat menyebar ke kelenjar getah bening terdekat atau bagian lain dari tubuh.

c. *Invasive lobular carcinoma* (ILC)

Kanker mulai terjadi pada sel-sel yang melapisi kelenjar susu (lobulus). Sel-sel abnormal tumbuh melalui dinding lobulus, kemudian dapat menyebar ke kelenjar getah bening terdekat atau bagian lain dari tubuh.

d. *Inflammatory breast cancer* (IBC)

IBC merupakan tipe yang jarang ditemui dari kanker payudara invasif. Pada penderita IBC, tidak ditemui benjolan tunggal atau tumor. Akan tetapi, kulit payudara terlihat merah, lebih tebal, dan terasa hangat (American Cancer Society, 2014).

### 2.2.3 Pengobatan Kanker

Penyakit kanker memiliki bermacam-macam metode terapi, seperti operasi, radioterapi, kemoterapi, hormonoterapi, imunoterapi, bioterapi, dan terapi lain-lain. (Sukardja, 2000). Klasifikasi obat antikanker umumnya didasarkan atas cara kerja obat di dalam dalam siklus pertumbuhan sel. Berikut klasifikasi obat antikanker:

a. Alkilasi

Senyawa yang mempunyai mekanisme menunjukkan terjadinya alkilasi. Obat-obat tersebut adalah prokarbazin, dekarbazin, altretamin (heksametilmelamin), dan sisplatin (Katzung, 1997). Senyawa ini memiliki efek samping yaitu efek toksik serius pada ginjal, sumsum tulang, dan telinga (Martindale, 2009)

b. Antimetabolit

Penggunaannya sebagai obat kanker didasarkan atas kenyataan bahwa metabolisme purin dan pirimidin lebih tinggi pada sel kanker daripada sel normal (Nafrialdi & Gan, 2012). Penggunaan obat ini dapat mengakibatkan efek samping berupa depresi sumsum tulang dapat terjadi tiba-tiba, dan leukopenia, trombositopenia, anemia (Martindale, 2009).

c. Produk alamiah

Berbagai obat yang berasal dari alam (tumbuhan dan hewan) digunakan sebagai antikanker, antara lain alkaloid vinka, taksan, epipodofilotoksin, dan kamptotesin (Nafrialdi & Gan, 2012). Efek samping obat ini adalah cedera tendon dalam, gangguan fungsi motorik pada pergelangan tangan juga kaki, ataksia dan kelainan gaya berjalan. (Martindale, 2009).

d. Antibiotik

Obat antibiotik yang ada sekarang merupakan hasil dari berbagai jamur tanah *Streptomyces*, termasuk diantaranya antrasiklin, aktinomisin, bleomisin, mitomisin, dan plikamisin (Katzung, 1997). Obat ini memiliki efek samping yaitu neutropenia diikuti oleh septicemia dan dapat mengakibatkan kelahiran prematur pada ibu hamil (Martindale, 2009).

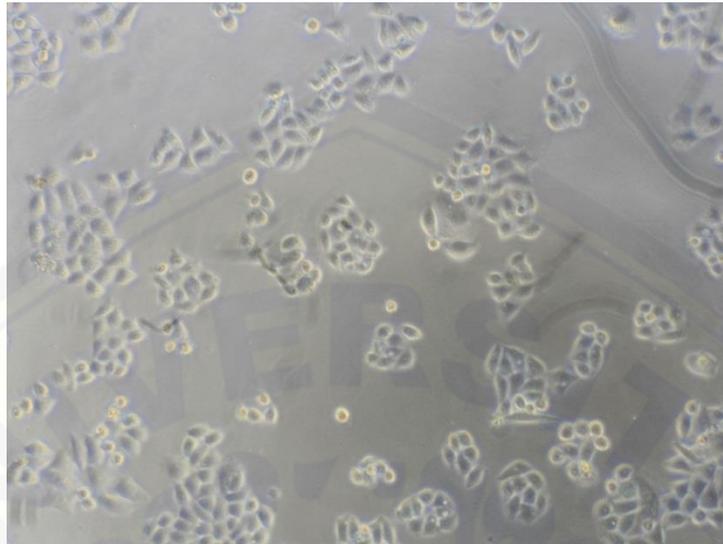
e. Hormon dan antagonis

Berbagai hormon steroid digunakan pada pengobatan kanker. Antara lain kortikosteroid (prednison), hormon progesterin (hidroksi progesteron kaproat), estrogen (megestrol asetat), dan androgen (testosteron propionat). Hormon-hormon tersebut biasanya digunakan untuk tumor endometrium, payudara, prostat, dan limfoma (Nafrialdi & Gan, 2012). Efek samping pengobatan ini diantaranya gangguan gastrointestinal seperti mual atau muntah, chloasma (melasma), sakit kepala, retensi air, nyeri payudara, dan perubahan libido. Ketidakteraturan menstruasi seperti bercak, perdarahan, atau amenorea dapat terjadi selama pengobatan (Martindale, 2009).

Oleh karena itu, banyak peneliti mencari alternatif pengobatan baru yang lebih efektif dan memiliki efek samping yang lebih kecil.

### 2.3 Tinjauan tentang Sel MCF-7

Sel MCF-7 (Gambar 2.4) adalah kultur sel (*cell line*) yang diambil dari jaringan pleural kanker payudara seorang pasien wanita Kaukasian berumur 69 tahun dengan golongan darah O dan Rh positif. Sel MCF-7 telah menjadi model standar untuk penelitian di seluruh dunia dan pertama kali dikembangkan di *Michigan Cancer Foundation* pada tahun 1970. Sel MCF-7 mengekspresikan reseptor ER- $\alpha$  yang diekspresikan oleh 80% kanker payudara, bersifat adhesif dan memiliki *doubling time* selama 29 jam (NCI, 2015).



Gambar 2.4 Sel kanker MCF-7 di bawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x

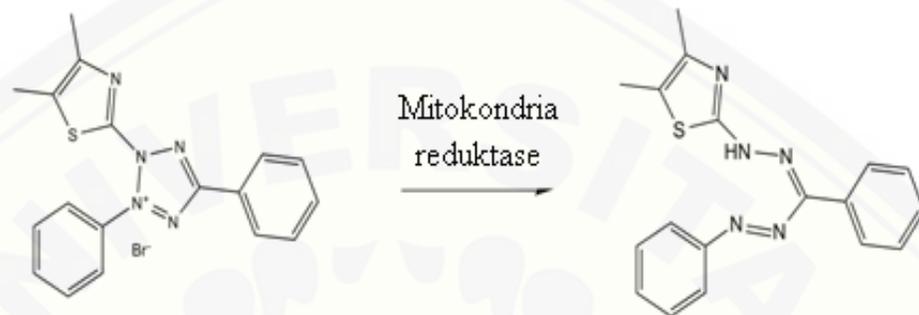
Media DMEM adalah penumbuh sel MCF-7, untuk memperoleh media kompleks, maka ditambahkan 0,01 mg/ml insulin bovine dan FBS hingga konsentrasi akhir FBS dalam media menjadi 10%. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% (ATCC, 2012). Sel MCF-7 resisten terhadap doksorubisin, dan tidak mengekspresikan caspase-3. Karakteristik tersebut membedakannya dengan sel kanker payudara lain, seperti sel T47D (NCI, 2015). Banyak peneliti yang mencari alternatif bahan lain untuk mengatasi resistensi tersebut.

#### **2.4 Tinjauan tentang Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT**

Uji sitotoksik adalah kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik. Kemampuan sel untuk bertahan hidup dapat diartikan sebagai adanya metabolik atau proliferasi yang dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel, naiknya jumlah protein, atau DNA yang disintesis (Wilson, 2000). Suatu zat dikatakan tidak toksik bila nilai IC<sub>50</sub> > 1.000 µg/ml (Omorieg *et al.*, 2012).

Prinsip dari metode MTT adalah 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 dan tidak larut air (Gambar 2.5) (Mosmann, 1983).



Gambar 2.5 Mekanisme MTT (Mosmann, 1983)

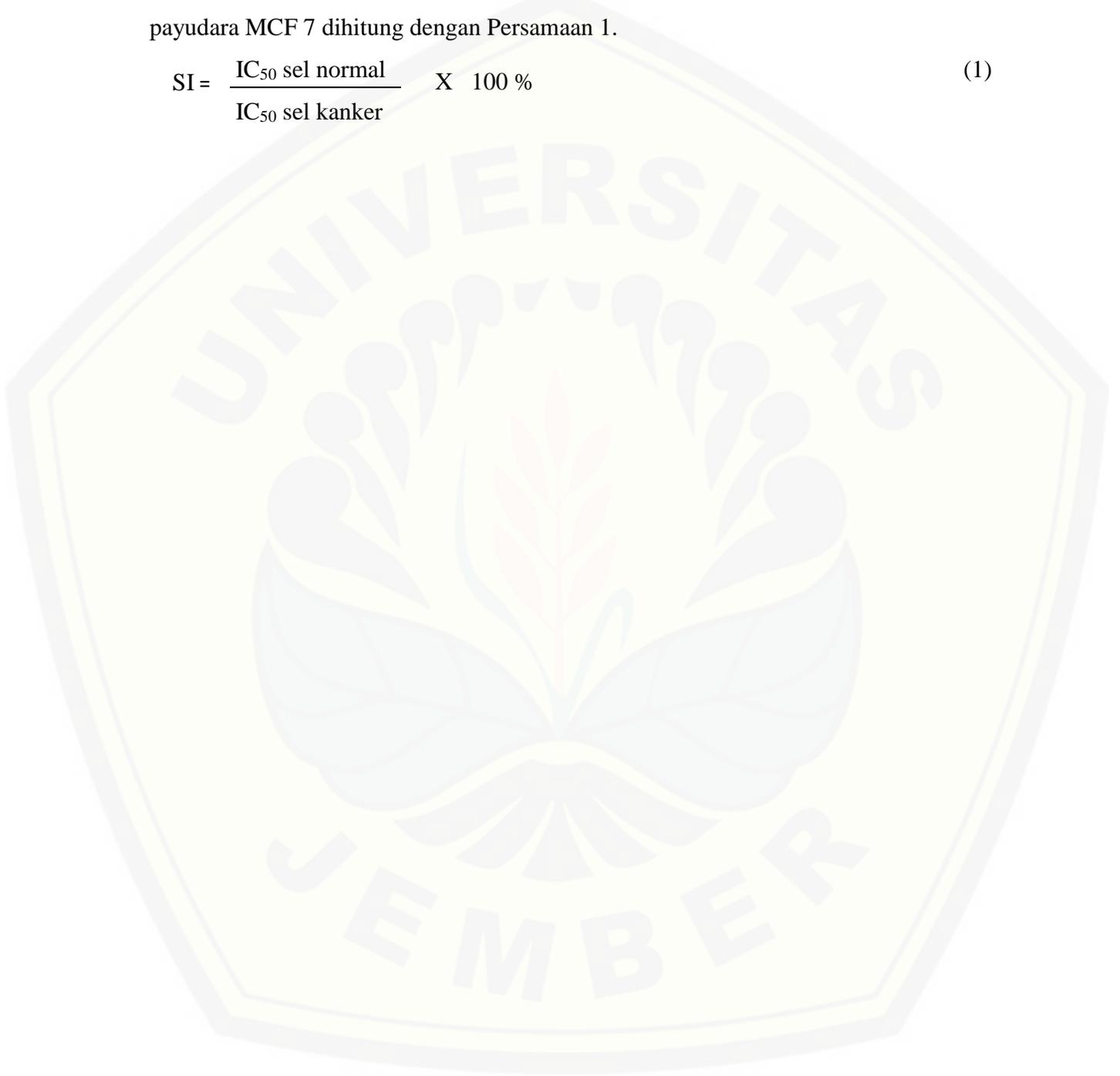
Penambahan reagen *stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak. Hasil yang diperoleh dari uji sitotoksik berupa nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan penghambatan proliferasi sel 50% serta menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel (Mosmann, 1983).

## 2.5 Tinjauan tentang Uji Selektivitas

Indeks selektivitas atau *Selectivity Indeks* (SI) menunjukkan selektivitas sitotoksik dari ekstrak kasar terhadap sel kanker dibandingkan sel normal, dihitung dari  $IC_{50}$  sampel kasar pada sel normal terhadap sel kanker. Nilai  $SI > 3$  menunjukkan selektivitas tinggi (Machana *et al*, 2011). Uji ini dilakukan ketika hasil uji sitotoksik sel kanker memenuhi syarat, dengan nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan kurang dari 1.000  $\mu\text{g/ml}$ . Suatu zat dikatakan tidak toksik bila nilai  $IC_{50} > 1.000 \mu\text{g/ml}$  (Omorieg *et al.*, 2012).

Nilai SI menunjukkan selektivitas sampel terhadap sel uji. Selektivitas efek sitotoksik ekstrak etanol terpurifikasi sel normal Vero dibandingkan sel kanker payudara MCF 7 dihitung dengan Persamaan 1.

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ sel normal}}{IC_{50} \text{ sel kanker}} \times 100 \% \quad (1)$$



## BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (*true experimental laboratories*) yang bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksitas dan selektivitas ekstrak etanol *A. flava* terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari sampai bulan Agustus 2015 bertempat di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol *A. flava*, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Jogjakarta untuk uji sitotoksitas *in vitro*.

### 3.3 Alat dan Bahan yang Digunakan

#### 3.3.1 Alat

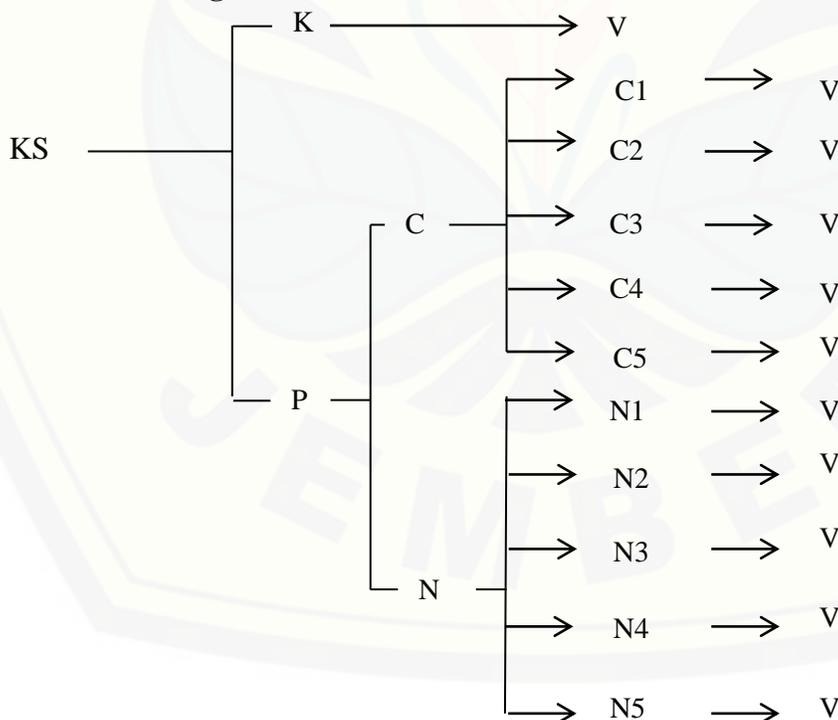
Pembuatan ekstrak etanol *A. flava* membutuhkan seperangkat alat gelas, *rotary evaporator* (Heidolph-4000), oven, dan corong *buchner*. Penelitian uji sitotoksitas *in vitro* membutuhkan *inverted microscope* (Zeiss), *autoclave*, *class II biosafety cabinet*, *haemocytometer*, *cell counter*, mikropipet, *ELISA reader* (SLT 240 ATC), inkubator CO<sub>2</sub> (Heraceus) dan *sentrifuge*.

#### 3.3.2 Bahan

1. Bahan utama : daun *A. flava*, daun yang digunakan adalah daun yang tua, empat helai dari ujung tangkai daun, dari tumbuhan yang telah berbunga penuh, diperoleh dari koleksi Taman Nasional Meru Betiri.
2. Bahan ekstraksi daun *A. flava* : etanol 70%

3. Bahan uji *in vitro* : ekstrak *A. flava* dilarutkan dalam 0,1 ml DMSO (Gibco) sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Kultur sel kanker payudara (sel MCF-7) dan kultur sel normal (sel Vero). Kultur sel MCF-7 ditumbuhkan dalam media kultur *Dulbecco's Modified Eagle Media* (Gibco). Sel Vero ditumbuhkan dalam media kultur M199 (Gibco). Media kultur mengandung *fetal bovineserum* (Gibco) 10% (v/v) dan antibiotika penisilin-streptomisin 1% (Gibco). Semua sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>. Sel dipanen dari *tissue culture dish* menggunakan tripsin-EDTA 0,25% (Gibco) untuk membantu melepaskan sel dan PBS (Sigma) untuk mencuci sel. Sel ditanam lagi pada 96 *well plate* (Nunc) kemudian diinkubasi kembali.
4. Bahan uji sitotoksisitas dengan metode MTT membutuhkan pereaksi berikut: Pereaksi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma) dan pereaksi *stopper* yang mengandung natrium dodesil sulfat (SDS) (Sigma) 10% dalam 0,1 N HCl (Merck).

### 3.4 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Diagram uji sitotoksisitas *in vitro*

## Keterangan :

- KS : Kultur sel
- K : Kelompok kontrol (tanpa perlakuan)
- P : Kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*
- C : Kelompok sel kanker dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*
- N : Kelompok sel normal dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*
- C1 : Kelompok sel kanker dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
100 µg/ml
- C2 : Kelompok sel kanker dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
200 µg/ml
- C3 : Kelompok sel kanker dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
400 µg/ml
- C4 : Kelompok sel kanker dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
700 µg/ml
- C5 : Kelompok sel kanker dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
1.000 µg/ml
- N1 : Kelompok sel normal dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
100 µg/ml
- N2 : Kelompok sel normal dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
200 µg/ml
- N3 : Kelompok sel normal dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
400 µg/ml
- N4 : Kelompok sel normal dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
700 µg/ml
- N5 : Kelompok sel normal dengan perlakuan ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava*  
1.000 µg/ml
- V : Penentuan viabilitas sel

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah 5 konsentrasi ekstrak etanol terpurifikasi daun *A. flava*.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah viabilitas sel MCF-7 dan hasil indeks selektivitas (SI) pada uji selektivitas.

#### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, jenis sel kanker, dan perlakuan terhadap sel kanker payudara (sel MCF-7).

### 3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Ekstrak etanol terpurifikasi dibuat dengan cara maserasi serbuk *A. flava* menggunakan pelarut *n*-heksana, kloroform, dan etanol secara berurutan, selanjutnya maserat hasil ekstraksi dengan etanol dipekatkan dan disebut dengan ekstrak terpurifikasi
- b. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode MTT terhadap sel payudara MCF-7 dan inkubasi selama 24 jam.
- c. Uji selektivitas dilakukan dengan cara membandingkan hasil uji sitotoksik ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* dari sel normal Vero terhadap sel payudara MCF-7 dengan inkubasi 24 jam. Uji ini dilakukan ketika hasil uji sitotoksik sel kanker memenuhi syarat, dengan nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan kurang dari 1.000  $\mu\text{g/ml}$ . Suatu zat dikatakan tidak toksik bila nilai  $IC_{50} > 1.000 \mu\text{g/ml}$  (Omoregie *et al.*, 2012).

### 3.7. Pelaksanaan Penelitian

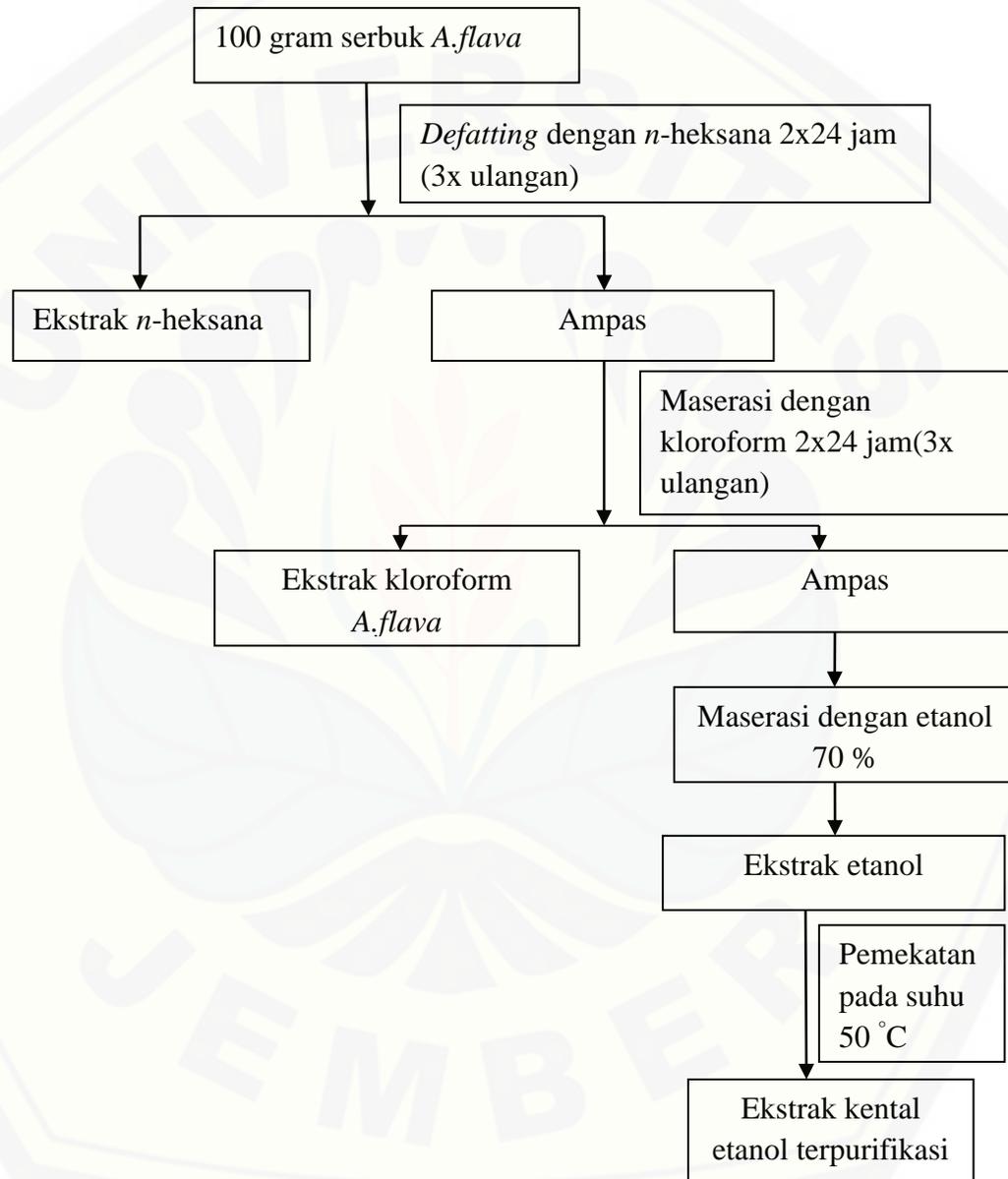


Gambar 3.2 Diagram alur penelitian

#### 3.7.1. Pembuatan ekstrak etanol *A. flava*

Pada penelitian ini, daun *A. flava* disortir dan dijemur dengan diangin-anginkan hingga kering, kemudian diserbuk dan diayak. Sebanyak 100 g serbuk daun kering diekstraksi dengan *n*-heksana diulang sebanyak 3 kali, kemudian ampas dimaserasi dengan kloroform diulang sebanyak 3 kali, ampas yang diperoleh

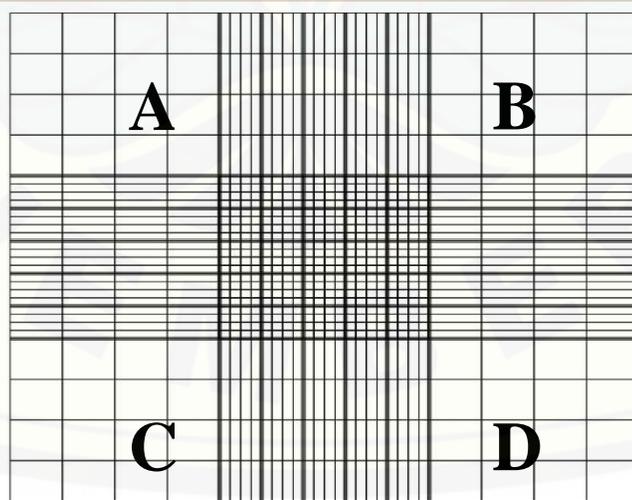
kemudian dimaserasi kembali dengan etanol 70 %. Ekstrak etanol kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ekstrak etanol terpurifikasi *A. flava* selanjutnya dibuat sediaan suspensi dalam 0,5 % DMSO untuk uji *in vitro* (Gambar 3.3)



Gambar 3.3 Diagram alur proses ekstraksi *A. flava*

### 3.7.2 Preparasi kultur sel

Sel diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian sel tersebut dicairkan. Menyemprot ampul dengan etanol 70% dan dimasukkan ke dalam LAF. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru yang berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit, dan supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang. Media kultur yang baru ditambahkan pada endapan sel dan disuspensikan perlahan hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa buah *tissue culture dish* dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dan aliran CO<sub>2</sub> 5%. Dua puluh empat jam kemudian dilakukan penggantian media kultur, selanjutnya sel ditumbuhkan hingga konfluen, dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Setelah sel konfluen, media dibuang dan sel dicuci dengan PBS dua kali. Sel ditambah tripsin 0,25% untuk melepas sel dari *tissue culture dish* dan dilakukan inkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Media ditambahkan ke dalam *tissue culture dish* dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *tissue culture dish*. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru. Sel dihitung dengan *haemocytometer* dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan. Alat *haemocytometer* dapat dilihat pada (Gambar 3.4).



Gambar 3.4 Penampang *haemocytometer* dilihat dibawah mikroskop *inverted*

*Haemocytometer* terdiri dari 4 kamar hitung yang ditandai oleh huruf A, B, C, D, setiap kamar hitung 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 Persamaan 2.

$$\sum \text{Sel} = \frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D} \times 10^4}{4} \quad (2)$$

Jumlah ml panen sel yang ditransfer =  $\frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/ml}}$ , kemudian ditambahkan media kultur sampai sejumlah yang diperlukan.

### 3.7.3 Preparasi sampel

Sampel ditimbang lebih kurang 20 mg dengan seksama di dalam *microtube*. Sampel tersebut ditambahkan 0,1 ml DMSO (200.000 µg/ml) dan dilarutkan dengan bantuan vortex. Dari larutan dengan kadar 200.000 µg/ml, dibuat seri kadar sampel dengan konsentrasi 100, 200, 400, 700, dan 1.000 µg/ml.

### 3.7.4 Uji sitotoksik metode MTT

Mengamati kondisi sel dari inkubator CO<sub>2</sub>. Setelah itu, sel dipanen dan dihitung jumlah selnya untuk dapat membuat pengenceran sel dengan media kultur sesuai dengan penghitungan sel. Sel ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing sumuran sebesar 100 µl. Setiap kali mengisi 12 sumuran, resuspensi kembali sel agar tetap homogen. Disisakan 3 sumuran kosong sebagai kontrol media. Keadaan sel diamati menggunakan mikroskop untuk melihat distribusi sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali pada keadaan normal. Setelah sel normal kembali, kemudian membuat seri konsentrasi sebesar 100, 200, 400, 700, dan 1.000 µg/ml. *Plate* yang telah berisi sel MCF-7 dari inkubator dibuang media selnya dan memasukkan 100 µl PBS ke dalam

semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang. Sisa cairan dalam sumuran ditiriskan dengan tisu. Setelah itu dimasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran secara triplo dan diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Kemudian, membuang media sel, setelah itu pipet 100  $\mu$ l PBS tuangkan pada setiap sumuran dalam *plate*, kemudian tambahkan reagen MTT sebesar 100  $\mu$ l ke setiap sumuran, termasuk kontrol media. Sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Kondisi sel diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Setelah itu *plate* dibungkus dengan kertas dan diinkubasi di tempat gelap dengan suhu ruangan. Masing-masing sumuran dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA reader  $\lambda=550-600$  nm (TMA, 2007).

### 3.8 Analisis data

#### 3.8.1. Uji sitotoksitas menggunakan MTT *assay*

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran kemudian dikonversi ke dalam persen viabilitas sel. Persentase viabilitas sel dihitung menggunakan Persamaan 3.

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (3)$$

Disajikan grafik konsentrasi senyawa uji dan viabilitas sel sebagai data yang menentukan liniernya suatu eksperimen. Aktivitas sitotoksik dinyatakan dengan IC<sub>50</sub> (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50 % populasi sel). Jika koefisien korelasi hitung lebih besar daripada koefisien korelasi tabel (n=5, p=0,05), maka IC<sub>50</sub> dapat dihitung berdasarkan persamaan regresi linier dari grafik konsentrasi senyawa uji dan viabilitas sel. IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan 50% populasi hingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya (Doyle and Griffiths, 2000).

### 3.8.2. Uji Selektivitas

Penentuan selektivitas dilakukan dengan uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan sel normal Vero. Uji selektivitas dapat dilakukan ketika hasil dari uji sitotoksik sel kanker memenuhi syarat yaitu nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan kurang dari 1.000  $\mu\text{g/ml}$ . Suatu zat dikatakan tidak toksik bila nilai  $IC_{50} > 1.000$   $\mu\text{g/ml}$  (Omoregie *et al.*, 2012).  $IC_{50}$  terpilih yang dipandang selektif berdasarkan uji sitotoksitas dikarakterisasi menggunakan pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA (Mudyantini, 2010). Selektivitas efek sitotoksik ekstrak etanol *A. flava* terhadap sel normal dibandingkan terhadap sel kanker dihitung dengan Persamaan 1.