



**EFEK FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID DAUN
TEMBAKAU TERHADAP VIABILITAS
SEL KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

Oleh:
Fara Difka Afdilla
NIM 151810401040

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**EFEK FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID DAUN
TEMBAKAU TERHADAP VIABILITAS
SEL KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:
Fara Difka Afdilla
NIM 151810401040

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ibu saya tercinta yang saya banggakan Elok Faiqoh yang selalu mendoakan, memberi limpahan kasih sayang dan dukungan moral serta pengorbanan yang sangat besar dan ayah saya tersayang Purnomo yang telah merawat, mendidik dan memberi kasih sayang serta doa tiada hentinya.
2. Adik tersayang Lia Hikmatul Maula yang selalu menjadi penghibur saya.
3. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Hatiku tenang karena mengetahui bahwa apa yang melewatkanmu tidak akan pernah menjadi takdirmu dan apa yang ditakdirkan untukmu tidak akan pernah melewatkanmu”

(Umar bin Khattab)



*) Umar bin Khattab

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Fara Difka Afdilla

NIM : 151810401040

Dengan ini saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan proyek yang didanai oleh Dr.drg. Banun Kusumawardani M.Kes dan tidak dapat dipublikasikan tanpa ijin dari pihak yang mendanai. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 11 Juli 2019

Yang menyatakan,

Fara Difka Afdilla

SKRIPSI

**EFEK FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID DAUN
TEBKAU TERHADAP VIABILITAS
SEL KANKER PAYUDARA**

Oleh:

Fara Difka Afdilla

NIM 151810401040

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr.drg. Banun Kusumawardani, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas MIPA Universitas Jember pada:

Hari :
Tanggal :
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Mengetahui,

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Dra. Mahriani, M.Si.

NIP. 19570315 198702 2 001

Dr.drg. Banun Kusumawardani, M.Kes

NIP. 19700509 199903 2 001

Tim Penguji,

Penguji I

Penguji II

Dr. Rike Oktarianti, M.Si.

NIP. 19631026 199002 2 001

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.

NRP. 760016783

Mengesahkan
Dekan Fakultas MIPA

Drs. Sujito, Ph.D.

NIP. 19610204 198711 1 001

RINGKASAN

Efek Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara; Fara Difka Afdilla; 151810401040; 2019; 29 Halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling banyak menyerang wanita dan menyebabkan sejumlah besar kematian. Penanganan masalah kanker yang sering dilakukan hingga saat ini ialah pengangkatan organ, radioterapi dan kemoterapi. Penanganan tersebut memiliki dampak negatif seperti ketergantungan pada obat serta biaya yang dibutuhkan sangat mahal. Oleh karena itu, pengembangan terapi antikanker berbasis tanaman perlu dilakukan sebagai alternatif di bidang kesehatan. Tembakau merupakan komoditi unggulan di Kabupaten Jember. Tembakau diketahui mengandung senyawa sembranoid yang memiliki aktivitas sebagai antikanker.

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi Universitas Jember dan Laboratorium Biosains, Politeknik Negeri Jember serta Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada. Penelitian ini menggunakan sel kanker payudara MCF-7 yang diuji dengan ekstrak fraksi senyawa sembranoid daun tembakau dengan konsentrasi 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$ dan 64 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dilakukan menggunakan tiga plate 96 *well* dengan masing-masing tiga kali pengulangan. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah viabilitas sel kanker payudara MCF-7 pasca pemberian ekstrak fraksi senyawa sembranoid yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi hasil ELISA *Reader*. Data dianalisis menggunakan uji *General Linear Model* (GLM) dengan taraf kepercayaan 95 % atau $\alpha = 0,05$ dan dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan. Nilai IC_{50} dianalisis menggunakan analisis probit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel mengalami perubahan kepadatan dan morfologi setelah diberi perlakuan ekstrak fraksi senyawa sembranoid. Berdasarkan hasil analisis data, persentase viabilitas sel MCF-7 terendah ditunjukkan pada konsentrasi tertinggi. Jadi, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 64 $\mu\text{g/mL}$ memiliki efek sitotoksitas yang paling tinggi terhadap sel MCF-7 dibanding konsentrasi lainnya. Nilai IC_{50} ekstrak fraksi senyawa sembranoid terhadap sel MCF-7 adalah sebesar 44,284 $\mu\text{g/mL}$, artinya pada konsentrasi tersebut fraksi senyawa sembranoid mampu menghambat proliferasi sel MCF-7 sebesar 50 % dari total populasi.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, yang telah memberikan kemudahan, kesempatan dan kelancaran sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Efek Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau terhadap Viabilitas Sel Kanker Payudara”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Program Studi Strata Satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini, khususnya kepada:

1. Dra. Mahriani, M.Si dan Dr.drg. Banun Kusumawardani, M.Kes selaku dosen pembimbing, terima kasih atas dukungan dan saran yang diberikan serta bersedia menjadi pendamping dan membimbing dengan segenap hati dalam pengerjaan skripsi ini.
2. Dr. Rike Oktarianti, M.Si selaku Dosen Penguji I dan Dosen Penguji II Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si, yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat bermanfaat dan membangun dalam penulisan skripsi ini.
3. Rendy Setiawan, S. Si, M. Si selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberi arahan dan masukan positif.
4. Para Dosen beserta seluruh karyawan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, terima kasih atas segala dukungan selama ini.
5. Pak Ari Satia selaku dosen farmasi yang bersedia membantu dan membagikan ilmu selama penelitian di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember.
6. Elisa Erni selaku sahabat saya yang setia menemani dalam suka maupun duka.
7. Grace Chen selaku sahabat yang selalu memberi semangat dan motivasi kepada saya.

8. Sahabat Rodentia Isna, Rilla, Hilda, Reno, Supriyadi, dan Resa terimakasih karena telah berjuang bersama dan rekan Sembranoid Mbak Lidya dan Zilfi terimakasih atas kerjasamanya.
9. Mbak Dea yang dengan sabar selalu membantu dan memberi semangat.
10. Teman-teman seperjuangan BIOGENES15 angkatan 2015 Jurusan Biologi Universitas Jember yang sangat berjasa memberikan banyak pelajaran di kehidupan penulis selama berkuliah.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah memberikan sumbangan berupa pikiran dan tenaga kepada penulis selama menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, karena sempurna hanya milik Allah SWT. Harapan penulis adalah supaya informasi dari skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca.

Jember, 11 Juli 2019

Penulis

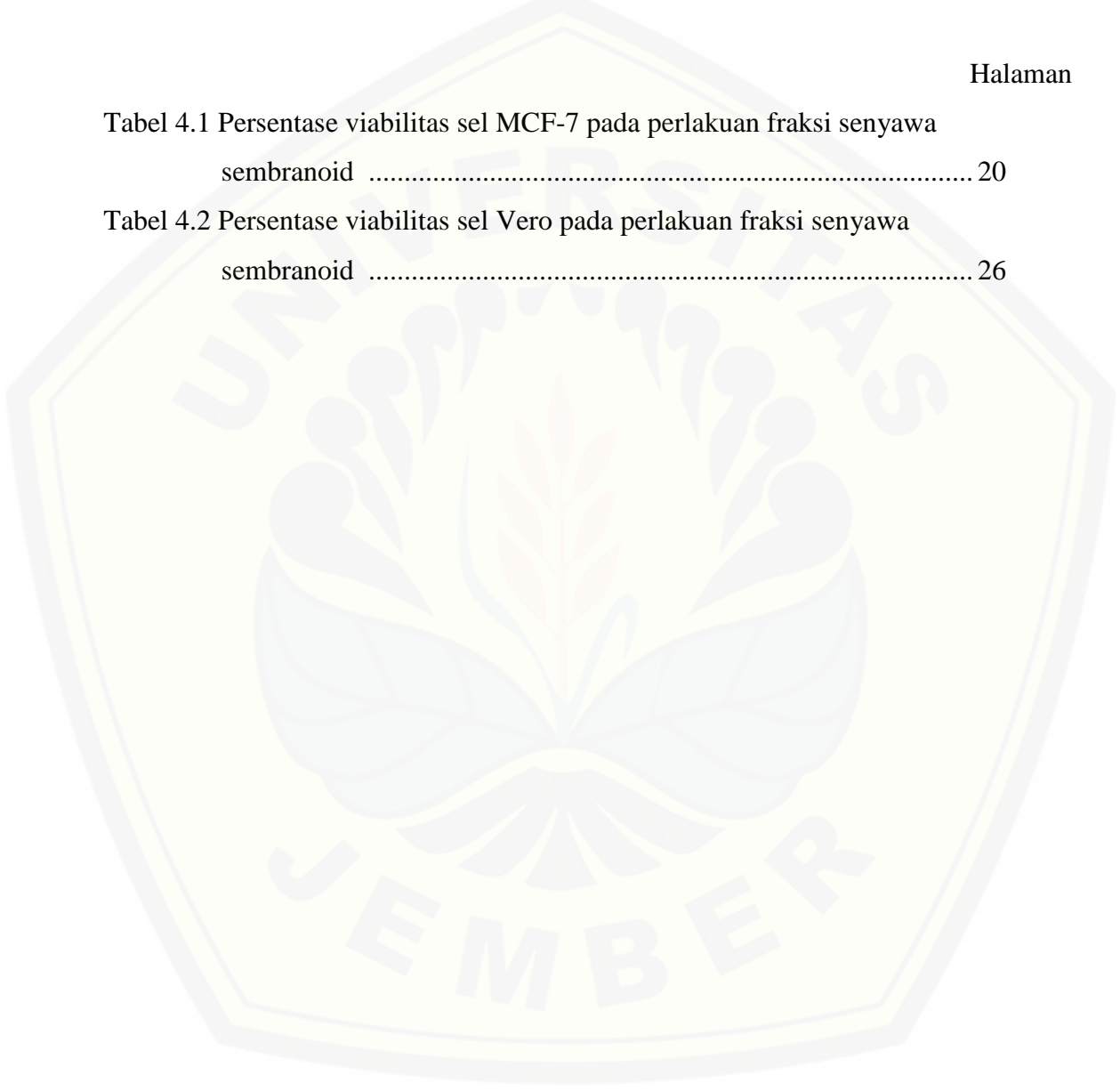
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Morfologi Tanaman Tembakau dan Kandungan Metabolit Sekundernya	4
2.2 Struktur Senyawa Sembranoid Daun Tembakau	5
2.3 Potensi Senyawa Sembranoid sebagai Antikanker	6
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	9
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	9

3.2 Alat dan Bahan	9
3.2.1 Alat.....	9
3.2.2 Bahan	9
3.3 Rancangan Penelitian	10
3.4 Tahap Penelitian	11
3.4.1 Koleksi Daun Tembakau.....	11
3.4.2 Ekstraksi Daun Tembakau	11
3.4.3 Fraksinasi Ekstrak Daun Tembakau menggunakan Metode “ <i>Short Colomn Chromatography</i> ”	11
3.4.4 Analisis Sembranoid Daun Tembakau menggunakan GC-MS	12
3.4.5 Pembuatan Media DMEM.....	12
3.4.6 Preparasi Sel Kultur	13
3.4.7 Perhitungan Sel	13
3.4.8 Uji Sitotoksisitas	14
3.5 Parameter Penelitian	15
3.6 Analisis Data	15
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Uji Sitotoksisitas Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau terhadap Sel MCF-7	17
4.2 Uji Sitotoksisitas Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau terhadap Sel Vero	25
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	29
5.1 Kesimpulan	29
5.2 Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	30

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Persentase viabilitas sel MCF-7 pada perlakuan fraksi senyawa sembranoid	20
Tabel 4.2 Persentase viabilitas sel Vero pada perlakuan fraksi senyawa sembranoid	26



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur sembranoid tembakau dan <i>soft coral</i>	6
Gambar 2.2 Fase-fase dalam siklus sel	8
Gambar 3.1 Alur penelitian	10
Gambar 4.1 Sel MCF-7 sebelum dan sesudah perlakuan ekstrak fraksi senyawa sembranoid	18
Gambar 4.2 Sel MCF-7 setelah diberi reagen MTT	18
Gambar 4.3 Diagram batang rata-rata persentase viabilitas sel MCF-7.....	19
Gambar 4.3 Grafik pengaruh konsentrasi ekstrak fraksi senyawa sembranoid terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7.....	23
Gambar 4.4 Mekanisme sel tumor terhadap terapi anti-angiogenesis	24
Gambar 4.5 Sel Vero sebelum dan sesudah perlakuan ekstrak fraksi senyawa sembranoid	25
Gambar 4.6 Sel Vero setelah diberi reagen MTT	25
Gambar 4.7 Diagram batang rata-rata persentase viabilitas sel Vero.....	26
Gambar 4.8 Grafik pengaruh konsentrasi ekstrak fraksi senyawa sembranoid terhadap viabilitas sel Vero.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Hasil GC-MS Fraksi Senyawa Sembranoid	40
Lampiran B. Perhitungan Pengenceran.....	41
Lampiran C. Hasil Absorbansi menggunakan ELISA <i>Reader</i> dan Perhitungan Rata-Rata Viabilitas Sel MCF-7 dan Sel Vero	43
Lampiran D. Hasil Uji <i>General Linear Model</i> (GLM) dan Uji <i>Duncan</i> Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid terhadap Persentase Hidup Sel MCF-7 dan Sel Vero.....	45
Lampiran E. Perhitungan IC_{50}	50

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker dikenal sebagai masalah kesehatan yang utama di masyarakat (Khan dan Hasan, 2010). Kanker merupakan penyakit yang dicirikan dengan pertumbuhan sel secara abnormal (Granja *et al.*, 2016). Setiap tahunnya, jumlah penderita kanker terus meningkat. Menurut data WHO, pada tahun 2018 kasus kanker payudara mencapai 2,1 juta (World Health Organization, 2018). Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling banyak menyerang wanita dan menyebabkan sejumlah besar kematian (Vemuri *et al.*, 2017; Mitra dan Dash, 2018). Penanganan masalah kanker yang sering dilakukan ialah menggunakan pengangkatan organ atau operasi, kemoterapi dan radioterapi. Penanganan tersebut membutuhkan waktu yang lama dan kurang efektif karena memiliki dampak negatif seperti ketergantungan pada obat serta biaya yang dibutuhkan sangat mahal (Mitra dan Dash, 2018). Oleh karena itu, untuk pengobatannya perlu pengembangan terapi antikanker berbasis tanaman atau fitofarmaka yang menjadi alternatif di bidang kesehatan.

Tanaman yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker dapat menurunkan viabilitas sel kanker sehingga dapat dikatakan bahwa tanaman tersebut memiliki potensi sebagai antikanker (Haryanti dan Widiyastuti, 2017). Viabilitas sel adalah perbandingan jumlah sel yang hidup (*viable*) dengan jumlah sel yang mati (*non viable*) yang dihitung pada saat kultur sel (Kalanjati, 2006). Uji viabilitas sel digunakan untuk mengetahui kemampuan sel tertentu untuk hidup setelah dipapar oleh suatu yang senyawa bersifat sitotoksik terhadap sel tersebut. Penelitian Amir dan Bambang (2017) menyatakan bahwa daun *Phaleria macrocarpa* mampu menurunkan viabilitas sel kanker payudara MCF-7 pada konsentrasi kurang dari 30 µg/mL. Penelitian Jassbi *et al.*, (2017) menyebutkan bahwa ekstrak sembranoid daun

Nicotiana sylvestris mampu menurunkan proliferasi sel kanker payudara MCF-7 pada konsentrasi 44 μM .

Tanaman tembakau merupakan komoditas andalan Kabupaten Jember (Setiawan dkk, 2018). Jember menjadi daerah pengembangan tembakau lokal varietas kasturi terbesar di tingkat nasional (Herminingsih, 2014). Tembakau diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder meliputi fenol, alkaloid dan minyak atsiri yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Metabolit sekunder tersebut dapat memblok biosintesis dinding sel bakteri dengan cara menghambat kerja enzim dalam sintesis komponen dinding sel bakteri (Puspita, 2011). Sayed dan Sylvester (2007) menyebutkan bahwa daun tembakau juga mengandung metabolit sekunder yang bermanfaat bagi kesehatan antara lain untuk pengobatan kanker dan penyakit neurodegenerasi. Tembakau tidak hanya memiliki alkaloid dan flavonoid melainkan juga kelompok terpenoid. Kelas utama senyawa terpenoid pada tembakau antara lain sembranoid (Leffingwell, 1999).

Sembranoid banyak ditemukan pada invertebrata laut seperti *soft coral*, oktakoral dan gorgonia. Penelitian Hassan *et al.* (2011) menemukan bahwa pada *Sarcophyton glaucum* mengandung sarkopin yang merupakan salah satu jenis senyawa sembranoid. Senyawa sarkopin tersebut memiliki aktivitas antimigrasi yang mencegah metastasis kanker payudara MDA-MB-231 pada konsentrasi 4,83 μM sedangkan pada konsentrasi 15,53 μM mampu menghambat migrasi kanker prostat PC-3 (Sawadogo *et al.*, 2013). Menurut Liu *et al.*, (2015) sembranoid yang berasal dari *Sarcophyton elegans* juga menunjukkan aktivitas antikanker yaitu pada konsentrasi 10 μM dapat menghambat migrasi sel tumor payudara MDA-MB-231.

Tembakau memiliki senyawa sembranoid yang strukturnya mirip dengan senyawa sembranoid yang terdapat pada *soft coral* sehingga diduga sembranoid dari daun tembakau memiliki aktivitas sebagai antikanker yang sama dengan sembranoid yang berasal dari *soft coral* (Sayed dan Sylvester, 2007). Isolasi sembranoid dari *soft coral* secara terus menerus dapat merusak biota laut, sehingga mengganggu keseimbangan ekosistem bawah laut. Berdasarkan uraian di atas maka perlu

dilakukan penelitian mengenai fraksi senyawa sembranoid yang berasal dari daun tembakau yang berpotensi sebagai antikanker.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana efek fraksi senyawa sembranoid daun tembakau terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu

- a. Sel kanker payudara yang digunakan ialah MCF-7.
- b. Daun tembakau yang digunakan dalam penelitian ini adalah tembakau varietas kasturi.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini ialah untuk mengetahui sitotoksisitas fraksi senyawa sembranoid daun tembakau terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi senyawa sembranoid daun tembakau sebagai antikanker.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi Tanaman Tembakau dan Kandungan Metabolit Sekundernya

Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan salah satu tanaman tropis. Tanaman ini tergolong tanaman semusim dan merupakan tanaman perkebunan yang berasal dari Amerika selatan kemudian tersebar ke benua Eropa (Charlton, 2004; Irawan *et al.*, 2015; Samsumaharto, 2009). Tembakau memiliki sistem perakaran tunggang. Batang tembakau bertipe *herbaceus*, lunak tetapi kuat, berbentuk bulat, semakin ke ujung semakin kecil. Daun tembakau memiliki sistem pertulangan daun menyirip, ujungnya runcing dan permukaan daun kasar, karena adanya trikoma atau rambut-rambut daun (Susilowati, 2006). Trikoma daun tembakau berbentuk glandular yang memproduksi salah satu jenis diterpen yaitu senyawa sembranoid (Leffingwell, 1999; Yan *et al.*, 2019). Oleh karena itu, pada daun tembakau, diterpenoid alami ini ditemukan melimpah pada lapisan kutikula (Baraka *et al.*, 2011; Vélez-Carrasco *et al.*, 2015). Bunga tembakau merupakan bunga majemuk tipe tandan dan setiap tandan terdiri dari 15 bunga. Bunga berbentuk terompet dan berwarna merah muda sampai merah tua (Susilowati, 2006).

Tembakau mengandung banyak senyawa metabolit sekunder yang bersifat fitofarmaka. Metabolit sekunder diproduksi oleh tanaman sebagai bentuk adaptasi terhadap lingkungan, yang digunakan untuk berinteraksi dengan insekta, melawan herbivor dan patogen. Selain itu, metabolit sekunder juga berperan sebagai agen pertahanan seperti antioksidan, penangkap radikal bebas, penyerap sinar UV (*ultraviolet*) (Kennedy dan Wightman, 2011). Metabolit sekunder yang ada pada tembakau antara lain terpen, alkaloid, flavonoid dan antosianin (Nugroho dan Verpoorte, 2002; Sen *et al.*, 2016).

Kelompok senyawa derivat dari terpen yang terdapat pada tembakau yaitu sesquiterpen. Sesquiterpen berperan sebagai senyawa yang dapat melawan penyakit TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) pada tembakau secara efektif (Sen *et al.*, 2016). Senyawa metabolit sekunder lain yang terdapat pada tembakau yaitu flavonoid.

Flavonoid merupakan derivat dari fenol yang bersifat hidrofobik dan dapat dibagi menjadi 4 kelas utama yaitu antosianin, flavon, flavonol dan isoflavon. Antosianin merupakan kelas dari flavonoid yang berpigmen. Oleh karena itu, antosianin berperan dalam memberikan warna untuk menarik polinator. Antosianin pada tembakau terakumulasi sebagian besar di bunga (Taiz dan Zeiger, 2002). Alkaloid juga merupakan senyawa metabolit sekunder pada tembakau yang bersifat basa dan larut dalam air. Salah satu contoh alkaloid yang diproduksi oleh genus *Nicotiana* adalah nikotin (Scott, 2008).

2.2 Struktur Senyawa Sembranoid Daun Tembakau

Sembranoid merupakan senyawa alami yang tersebar luas pada *soft coral* dan tumbuhan khususnya tembakau. Bagian daun dan bunga dari genus *Nicotiana* spp. mengandung banyak senyawa diterpen alami yaitu sembranoid (Yan *et al.*, 2019). Sembranoid dari tembakau diketahui memiliki aktivitas insektisidal dan menghambat pertumbuhan spora jamur (Sayed *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2017). Pada bidang biomedik, sembranoid berperan selain sebagai antimikrobia juga sebagai antiinflamasi dan antitumor (Zubair *et al.*, 2014).

Sembranoid pada tembakau menunjukkan struktur yang mirip dengan sembranoid yang berasal dari *soft coral* (*sarcophytol A*) (Gambar 2.1). Keduanya memiliki rantai karbon 14 yang membentuk cincin makrosiklik, pada C nomor 1 (C1) terdapat gugus isopropil dan pada C4, C8 dan C12 terdapat kelompok metil (Aqil *et al.*, 2011; Sayed dan Sylvester, 2007). Oleh karena itu, senyawa sembranoid pada tembakau diduga mempunyai aktivitas yang sama dengan senyawa sembranoid pada *soft coral* sebagai antikanker (Yan *et al.*, 2016).

Terdapat dua kelompok utama senyawa sembranoid pada tembakau yaitu α -sebranoid dan β -sebranoid (Sayed dan Sylvester, 2007; Yan *et al.*, 2016). Faktor lingkungan berperan penting dalam menentukan kadar sembranoid pada tembakau. Pemberian pupuk mampu meningkatkan jumlah trikoma yang terdapat pada permukaan daun tembakau secara signifikan. Selain pupuk, stres air pada tembakau

juga dapat meningkatkan jumlah trikoma daun. Paparan sinar matahari dapat meningkatkan jumlah terpen di daun. Tembakau yang ditanam di bawah naungan memiliki kadar sembranoid yang lebih rendah daripada tembakau yang ditanam di bawah sinar matahari langsung (Yan *et al.*, 2016).



Gambar 2.1 Struktur sembranoid tembakau (A) dan *soft coral* (B) (Aqil *et al.*, 2011)

2.3 Potensi Senyawa Sembranoid sebagai Antikanker

Sembranoid merupakan senyawa diterpen yang ditemukan selain pada *soft coral* juga ditemukan pada tumbuhan seperti tembakau dan pinus. Genus *Sarcophyton*, yang merupakan salah satu jenis *soft coral*, mengandung beberapa senyawa sembranoid yang memiliki aktivitas sebagai anti proliferasi dan sitotoksik terhadap sel kanker hati (HepG2), sel kanker kolon (HCT-116), sel kanker serviks (HeLa) dan sel kanker payudara (MCF-7) (Hegazy *et al.*, 2011). Penelitian Arif *et al.*, (2004) yang menggunakan dua senyawa sembranoid dari *soft coral* yaitu manzamin A dan sarkopin menyebutkan bahwa manzamin A pada konsentrasi 50 μM mampu menurunkan jumlah ekspresi protein P53. P53 adalah protein yang berperan sebagai faktor transkripsi penekan tumor (*tumor suppressor*) sedangkan pada konsentrasi yang sama, sarkopin mampu menginduksi protein P21. Peningkatan protein P21 dapat menghambat aktivitas CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*) yang termutasi sehingga perkembangan siklus sel kanker terhambat. Sarkopin juga meningkatkan

kemampuan perbaikan DNA pada sel MCF-7 sekitar 35 % dengan penyinaran UV 50 Joule/m².

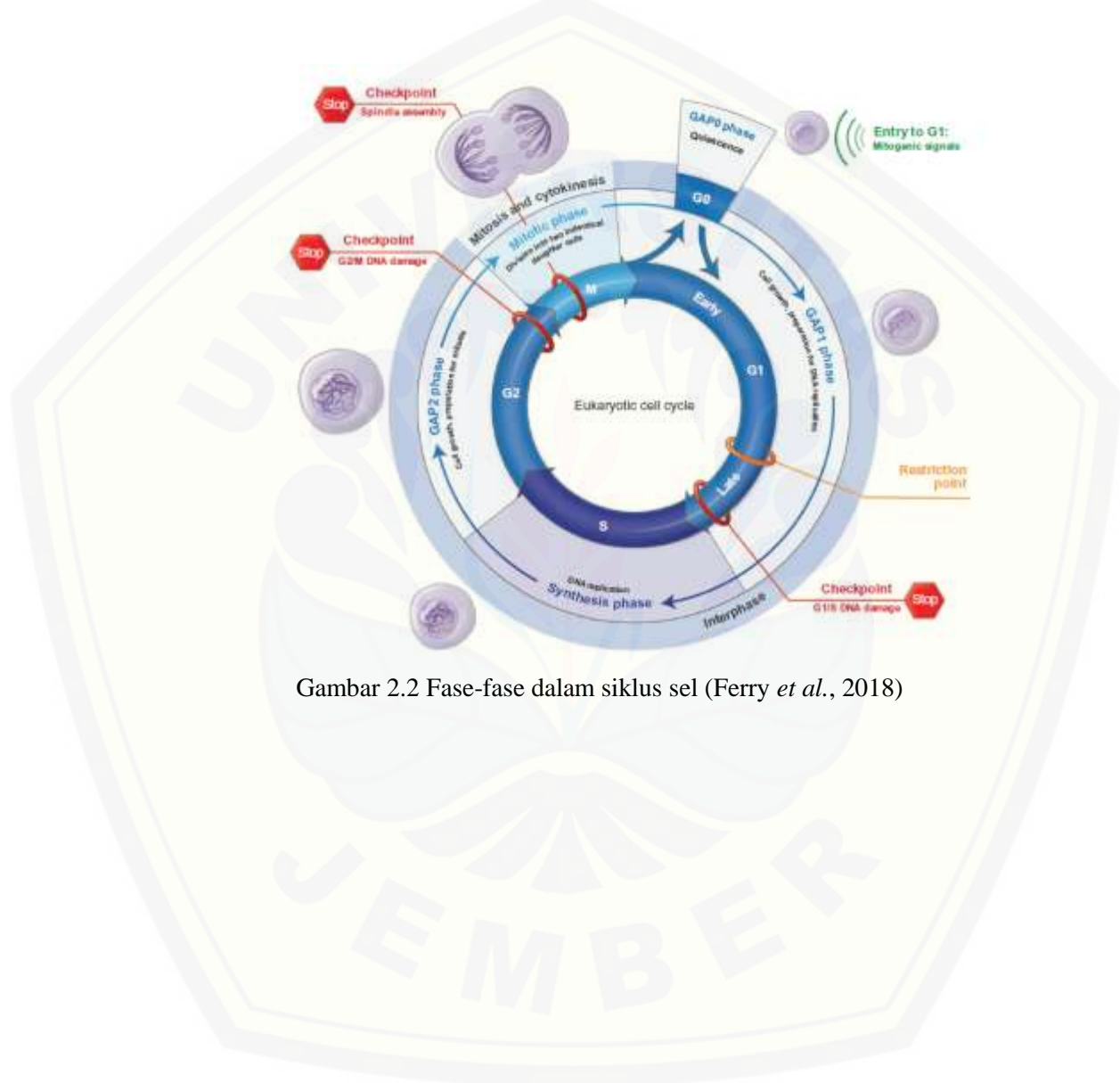
Disebutkan oleh Arif *et al.*, (2007) bahwa sarkopin pada konsentrasi 100 µM menyebabkan sel MCF-7 *arrest* pada fase G0/G1 tanpa menyebabkan kematian sel. Sarkopin memiliki aktivitas sebagai anti proliferasi dengan cara menginduksi senyawa penghambat CDK, p21^{WAF1/Cip1} dan perbaikan DNA pada sel MCF-7. Senyawa yang berperan sebagai anti proliferasi mengganggu sintesis maupun replikasi DNA.

Efek sitotoksitas senyawa sembranoid dapat diketahui menggunakan analisis *Docking* molekuler. Analisis *Docking* molekuler telah digunakan pada beberapa enzim dan reseptor protein yang berperan selama siklus sel, proliferasi sel dan replikasi DNA. Penelitian Zubair *et al.*, (2014) menggunakan enam protein dan enzim yaitu CDK-2, CDK-6, PKC (Protein Kinase C), VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*), DNA Topoisomerase II dan tubulin menyebutkan bahwa berdasarkan keenam molekul target tersebut, PKC dan tubulin diketahui memiliki potensi sebagai molekul target senyawa sembranoid.

Kanker pada manusia umumnya terjadi karena kerusakan regulasi pada siklus sel misalnya proliferasi yang tidak teratur, genom yang tidak stabil karena banyaknya DNA yang mengalami mutasi dan aberasi kromosom. Siklus sel normal pada mamalia dikontrol oleh suatu protein yang disebut CDK. CDK memiliki peranan penting selama proses pembelahan sel dan jumlahnya meningkat pada titik pemeriksaan atau *checkpoint* (Gambar 2.2). Mutasi pada CDK akan mengarah ke siklus sel tumor (Malumbres dan Barbacid, 2009).

Sel kanker akan mengalami ketidakstabilan kromosom misalnya kerusakan pada titik pemeriksaan mitosis, segregasi kromosom, kerusakan genomik seperti kerusakan pada DNA *repair* dan proliferasi yang terus menerus. Fitokimia alami dapat digunakan untuk menangani dan mencegah kanker (Hosseini dan Ghorbani, 2014; Wang *et al.*, 2012). Senyawa kimia dari tanaman yang berpotensi sebagai antikanker diharapkan dapat merusak langkah-langkah spesifik pada sel seperti

menghambat topoisomerase saat replikasi DNA, mencegah terjadinya metilasi DNA, modifikasi histon dan ekspresi dari mRNA yang semua itu terlibat dalam inisiasi pembentukan sel kanker (Singh *et al.*, 2016).



Gambar 2.2 Fase-fase dalam siklus sel (Ferry *et al.*, 2018)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk ekstraksi daun tembakau varietas Kasturi, Laboratorium Biosains Politeknik Negeri Jember untuk uji kandungan fraksi senyawa sembranoid menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada untuk kultur sel kanker payudara MCF-7. Penelitian dilakukan mulai bulan November 2018 hingga Maret 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan meliputi destilator (Electrothermal), GC-MS QP 2010 Plus (Shimadzu), Blender (Philips), *magnetic stirrer*, mikropipet 1000 μL , mikropipet 200 μL , mikropipet 20 μL , evaporator (Buchi R-114), *beaker glass* 100 mL, pH meter, filter 0,2 mikron, botol duran 1000 mL, inkubator CO₂, LAF (*Laminar Air Flow*), *conical tube* steril (Iwake), *petri dish*, *haemocytometer*, *hand counter*, tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, *96-well plate* (Iwake), Mikroskop *inverted* (Olympus), *ELISA Reader*.

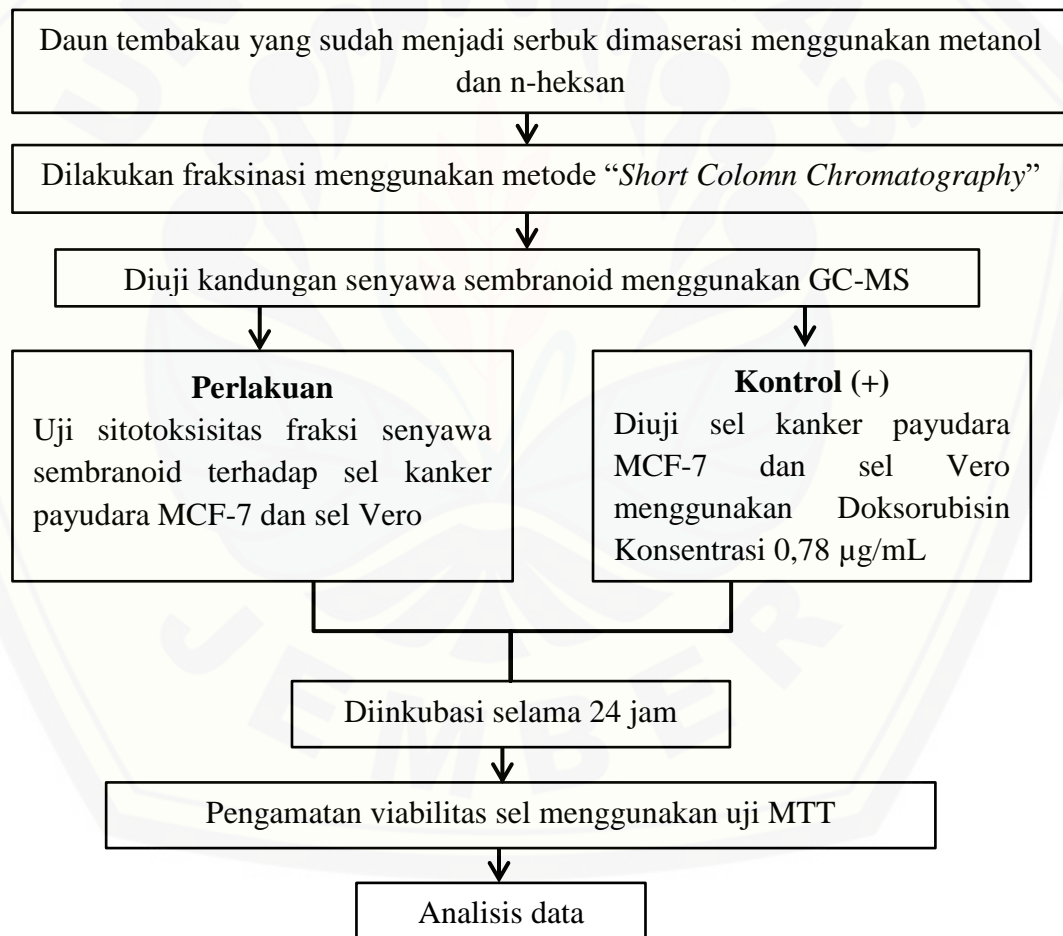
3.2.2 Bahan

Bahan yang diperlukan ialah daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.), doksorubisin (Kalbe), metanol, n-heksan, etil asetat, diklorometana, 10 % HCl (dari stok HCl 37%), gas hidrogen, akuabides 1000 mL, NaHCO₃, HCl, NaOH, sel kanker payudara MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) (ATCC), sel Vero, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco), Media 199 (M-199) (Gibco), 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*), 0,5 % fungizon (Amphotericin B), 1 % penisilin atau streptomisin (Gibco), DMSO (*Dimetil Sulfoksida*) (E-Merck), PBS (*Phosphate Buffer*

Saline), label, MTT (3-(4,5 dimetiltiazon-2-il)-2,5 difenil tetrazolium bromide) 5 mg/mL PBS (dalam 10 mL PBS terlarut 50 mg MTT) (Sigma), 10 % SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) dalam 0,01 N HCl (E-Merck), tisu, alumunium foil.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan ialah *experimental laboratory in vitro* artinya penelitian ini dilakukan dengan cara memberi perlakuan kepada variabel terikat dan setiap uji dilakukan di laboratorium. Secara garis besar alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.4 Tahap Penelitian

3.4.1 Koleksi Daun Tembakau

Lokasi pengambilan daun tembakau di daerah Antirogo, Jember, Jawa Timur. Daun tembakau yang diambil ialah varietas Kasturi atau *Voor oogst*. Daun tembakau dikering anginkan hingga menjadi simplisia.

3.4.2 Ekstraksi Daun Tembakau

Dua ratus gram simplisia yang sudah menjadi serbuk dimaserasi ke dalam 1200 mL metanol absolut (Al-Asady *et al.*, 2014). Ekstrak yang telah tercampur diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 24 jam sehingga dihasilkan produk kasarnya (*crude product*). Hasil ekstrak lalu dicampur dengan n-heksan sebanyak 600 mL. Kemudian diaduk selama sepuluh menit hingga terbentuk dua lapisan. N-heksan terletak pada lapisan atas dan bertindak sebagai pelarut yang dapat memisahkan fraksi yang mengandung sembranoid dan senyawa nikotin (Qian *et al.*, 2014). Lapisan atas yang mengandung banyak fraksi senyawa sembranoid diambil kemudian diuapkan dengan evaporator untuk menghilangkan pelarutnya. Ditambah dengan HCl 10% sebanyak 10 mL untuk mengendapkan sisa nikotin yang masih ada. Reaksi ini disebut acidosisasi. Ekstrak kemudian diuji menggunakan reagen Dragendorff untuk mengetahui kandungan nikotin. Ekstrak bebas nikotin ditunjukkan dengan warna kuning muda saat ditetesi dengan reagen Dragendorff sedangkan ekstrak yang masih mengandung nikotin akan berwarna jingga kecoklatan (Sandeep *et al.*, 2014).

3.4.3 Fraksinasi Ekstrak Daun Tembakau menggunakan Metode “*Short Column Chromatography*”

Pemisahan fraksi senyawa sembranoid menggunakan metode yang sama dengan Gao *et al.* (2016) yaitu eluen atau fase gerak yang digunakan adalah n-heksan, diklorometana dan etil asetat. Pertama dimasukkan gel silika ke dalam kolom kromatografi. Pelarut pertama yang digunakan ialah n-heksan. Sampel dimasukkan dalam kolom kromatografi yang diikuti dengan penambahan 100% n-heksan

sebanyak 20 mL. Setelah hasil fraksinasi ditampung, dimasukkan sebanyak 20 mL n-heksan dan diklorometana dengan perbandingan 50:50. Selanjutnya, dimasukkan 100% diklorometana sebanyak 20 mL kemudian diklorometana dan etil asetat dengan jumlah 20 mL masing-masing perbandingan 50:50. Terakhir dimasukkan 100% etil asetat sebanyak 20 mL ke dalam kolom kromatografi. Hasil dari masing-masing fraksi yang ditampung, dibiarkan menguap lalu dianalisis kandungan fraksi senyawa sembranoid menggunakan GC-MS.

3.4.4 Analisis Sembranoid Daun Tembakau menggunakan GC-MS

Analisis kandungan senyawa sembranoid pada daun tembakau menggunakan metode GC-MS. Metode ini dapat menguji kandungan senyawa sembranoid secara cepat dan efektif. Data yang dihasilkan berupa data kuantitatif. Gas pembawa (*carrier gas*) yang digunakan adalah helium (Qian *et al*, 2014).

Analisis dimulai dengan menginjeksikan 1 μ L sampel berupa ekstrak fraksi etil asetat ke dalam *injector* bersuhu 250 °C. Sampel akan bergerak menuju kolom. Suhu awal pada kolom ialah 160 °C selama 2 menit, kemudian suhu ditingkatkan 10 °C setiap satu menit hingga suhu mencapai 210 °C selama 35 menit. Suhu ditingkatkan kembali 10 °C per menit hingga suhu 250 °C dan dibiarkan selama 15 menit. Gas helium akan membawa aliran gas sebesar 1.2 mL/menit. Data akan dicatat dan diproses menggunakan Xcaliber 1.1 *software* (Zhou *et al*, 2016).

3.4.5 Pembuatan Media DMEM

Media cair yang akan digunakan sebagai medium disiapkan, lalu disiapkan pula akuabides 950 mL pada beaker glass 1000 mL. Kedua bahan tersebut kemudian dicampur dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut. Ditambahkan 2,2 g NaHCO_3 untuk setiap liter media yang dibuat dan diaduk rata. Akuabides ditambahkan kembali hingga volume 1000 mL. Proses pengadukan terus dilakukan sampai semua benar-benar larut dan dilakukan penyesuaian kadar pH. Penyesuaian kadar pH dilakukan dengan nilai 0,2-0,3 di bawah pH yang diinginkan. Pemberian

HCl 1 N apabila medium yang ingin dibuat dalam kondisi asam dan NaOH 1 N ditambahkan apabila medium yang diinginkan dalam suasana basa. Setelah itu, dilakukan filtrasi dengan filter 0,2 mikron dan medium ditampung dalam botol kultur. Diberi penanda media yang telah dibuat dan disimpan pada suhu 4 °C sampai digunakan. Langkah yang sama digunakan dalam pembuatan media M-199 (CCRC, 2017).

3.4.6 Preparasi Sel Kultur

Sel kanker payudara MCF-7 dan sel Vero diperoleh dari koleksi Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran UGM. Sel diambil dan dimasukkan ke dalam petri *dish*. Sel MCF-7 ditumbuhkan pada media DMEM sedangkan sel Vero ditumbuhkan pada media M-199. Masing-masing media mengandung 10 % FBS, 0.5 % fungizon dan 2 % penisilin atau streptomisin (Comsa *et al*, 2015). Inkubasi sel pada suhu 37 °C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, media diganti.

Penggantian media dilakukan dengan cara membuang media yang lama secara perlahan dengan mikropipet. Dituang 3 mL PBS ke dalam *dish* dan digoyang-goyangkan untuk mencuci sel. Selanjutnya, PBS dibuang dan dituang media kultur sebanyak 7-10 mL ke dalam *dish*. Pertumbuhan sel mencapai konfluen apabila media sudah bewarna merah pucat (CCRC, 2017).

Panen sel MCF-7 dilakukan apabila sel 80 % konfluen. Selanjutnya, media dibuang menggunakan mikropipet. Setelah itu, sel dicuci menggunakan PBS dan 0,25% tripsin dan diinkubasi pada inkubator CO₂ selama 2 menit agar sel terlepas. Langkah selanjutnya yaitu menambahkan media ± 3 mL untuk menginaktifkan tripsin. Jumlah sel dapat dihitung menggunakan *haemocytometer*. Sel yang telah terlepas satu-satu ditransfer ke *conical tube* steril baru (CCRC, 2017).

3.4.7 Perhitungan Sel

Sel yang dipanen, diresuspensikan ke dalam *conical tube*. Hasil resuspensi sel diambil 10 µL lalu ditetaskan pada *haemocytometer*. Sel dihitung di bawah

mikroskop menggunakan *hand counter* (CCRC, 2017). Perhitungan sel dilakukan dengan cara:

Jumlah sel per mL:

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{\sum \text{Sel kamar A} + \sum \text{Sel kamar B} + \sum \text{Sel kamar C} + \sum \text{Sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

Jumlah sel total yang diperlukan:

Jika menanam 10.000 sel pada tiap sumuran *96-well plate* maka jumlah total sel yang diperlukan adalah $10^4/\text{sumuran} \times 100 \text{ sumuran (dibuat lebih)} = 10^6$

Menghitung volume panen sel yang diperlukan (dalam mL):

$$\text{Volume panen sel yang ditransfer} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/mL}}$$

3.4.8 Uji Sitotoksitas

Efek penghambatan pertumbuhan atau kematian sel kanker dapat diuji menggunakan uji MTT. Uji MTT berdasarkan pada konversi warna kuning dari MTT menjadi ungu diakhir reaksi akan terbentuk garam formazan. Reaksi ini dapat terjadi karena adanya aktivitas enzim *succinate dehydrogenase* pada sel yang hidup (Jassbi *et al*, 2017).

Uji sitotoksitas sel kanker payudara MCF-7 sama dengan yang dilakukan oleh Amir dan Bambang (2017) yaitu sel kanker payudara MCF-7 didistribusikan dalam 96 sumuran *microplate* dalam jumlah 10.000 sel per sumuran lalu diinkubasi 24 jam. Tujuannya supaya sel dapat beradaptasi dan menempel tepat pada sumuran. Setelah itu, dibuang media dengan cara membalikkan plate 180° dan tiriskan sisa cairan dengan tisu. Fraksi senyawa sembranoid daun tembakau yang telah dilarutkan pada media komplit (Lampiran B.2) dengan konsentrasi 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$ dan 64 $\mu\text{g/mL}$ dimasukkan pada tiap sumuran kemudian diinkubasi selama 24 jam, suhu 37°C dengan 5 % CO_2 . Dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dalam tiga plate *96 well*.

Pengujian viabilitas sel dengan MTT dimulai dengan melarutkan 100 μL MTT dalam media DMEM atau media M-199 hingga 10 mL. Media uji dibuang lalu ditambahkan dengan 100 μL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media. *Microplate* diinkubasi lebih lanjut pada suhu 37 °C dengan 5 % CO_2 selama 4 jam hingga terbentuk garam formazan, kemudian ditambahkan *stopper* 100 μL SDS 10 % dalam 0,01 N HCl. *Plate* dibungkus dengan *aluminium foil* dan diinkubasi *overnight* pada suhu ruang. Selanjutnya, nilai absorbansi dibaca menggunakan *ELISA Reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Sel yang hidup bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan. Kemudian dibuat grafik dengan ordinat menunjukkan nilai absorbansi dan absis menunjukkan konsentrasi fraksi senyawa sembranoid. Langkah yang sama dilakukan terhadap sel normal (sel Vero) (CCRC, 2017).

3.5 Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah viabilitas sel kanker payudara MCF-7 pasca pemberian ekstrak fraksi senyawa sembranoid. Data berupa persentase sel hidup. Analisis nilai IC_{50} dilakukan dengan cara perhitungan nilai absorbansi dari kontrol sel, kontrol media dan senyawa uji. Kontrol yang digunakan ialah kontrol sel dan kontrol media. Kontrol sel berisi media kultur dan sel sedangkan kontrol media berisi media kultur. Senyawa uji berisi media kultur, sel dan senyawa uji (CCRC, 2017). Perhitungan sel hidup dilakukan dengan cara:

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

3.6 Analisis Data

Efek fraksi senyawa sembranoid dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 dapat diketahui melalui uji nilai IC_{50} yang dianalisis menggunakan *regression* probit SPSS. Pengaruh pemberian fraksi senyawa sembranoid terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan sel normal (Vero) dianalisis secara statistika

menggunakan *General Linear Model* (GLM) dan dilanjutkan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui beda nyata antar konsentrasi (Steel dan Torrie, 1993). Seluruh pengujian statistika menggunakan taraf kepercayaan 95% atau nilai sig. $\alpha=0,05$ dengan menggunakan program *SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version*.



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pemaparan ekstrak fraksi senyawa sembranoid konsentrasi 64 $\mu\text{g/mL}$ mampu menurunkan viabilitas sel MCF-7 sebesar 51,93 %. Sedangkan nilai IC_{50} ekstrak fraksi senyawa sembranoid terhadap sel MCF-7 ialah 44,284 $\mu\text{g/mL}$, artinya pada konsentrasi 44,284 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak fraksi senyawa sembranoid mampu menghambat proliferasi sebesar 50 % dari total populasi sel kanker payudara MCF-7.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, disarankan untuk:

1. Perlu dilakukan fraksinasi yang lebih lanjut untuk memperoleh ekstrak fraksi senyawa alphasembranoid yang lebih murni.
2. Perlu optimasi konsentrasi fraksi senyawa sembranoid dengan rentang konsentrasi yang lebih tinggi sehingga pengaruh viabilitas sel kanker payudara MCF-7 dapat diketahui dengan jelas.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan waktu inkubasi sel lebih dari satu sehingga respon sel terhadap fraksi senyawa sembranoid dapat diketahui dengan jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Asady, A. A. B., N. Y. Ahmed dan T. A. Mustafa. 2014. Cytotoxic and Cytogenetic Effects of Aqueous and Methanol Crude Extracts of *Nicotiana tabacum* on Rhabdomyosarcoma (RD) and L20B Cell Lines *In Vitro*. *European Journal of Experimental Biology*. 4(2): 164-171.
- Al-Lihaibi, S., W. M. Alarif, A. A. Lateff, S. N. Ayyad, A. B. Abdel-Naim, F. F. El-Senduny dan F. A. Badria. 2014. Three New Cembranoid-type Diterpenes from Red Sea Soft Coral *Sarcophyton glaucum*: Isolation and Antiproliferative Activity Against HepG2 Cells. *European Journal of Medical Chemistry*. 81: 314-322.
- Amir, H. dan B. G. Murcitro. 2017. Uji Microtetrazolium (MTT) Ekstrak Metanol Daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerls terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 1(1): 27-32.
- Aqil, F., M. Zahin, K. A. El Sayed, I. Ahmad, K. Y. Orabi dan J. M. Arif. 2011. Antimicrobial, Antioxidant and Antimutagenic Activities of Selected Marine Natural Products and Tobacco Cembranoids. *Drugs and Chemical Toxicology*. 34(2): 167-179.
- Arif, J. M., M. Kunhi, Y.M. Siddiqui, K. A. El-Sayed, K. Y. Orabi, A. A-Hazzani, M. N. Al-Ahdal dan F. M. Al-Khdairy. 2004. Role of Intermediary Biomarkers in Determining the Anticancer Efficacy of Marine Compounds. *Med Chem Res*. 13(6/7): 553-567.
- Arif, J. M., S. S. Sawant, K. A. El-Sayed, M. Kunhi, M. P. Subramanian, Y. M. Siddiqui, D. T. A. Youssef, K. Al-Hussain, M. N. Al-Ahdal dan F. Al-Khodairy. 2007. Antiproliferative Potential of Sarchopine and Its Semisynthetic Sulfur-containing Derivates Against Human Mammary Carcinoma Cell Lines. *J Nat Med*. 61: 154-158.

- Baraka, H. N., M. A. Khanfar, J. C. Williams, E. M. El-Giar, K. A. El-Sayed. 2011. Bioactive Natural, Biocatalytic and Semisynthetic Tobacco Cembranoids. *Planta Med.* 77: 467–476.
- CCRC. 2017. *Protokol In Vitro (Indonesian Society for Cancer Chemoprevention)*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Charlton, Anne. 2004. Medicinal Uses of Tobacco in History. *Journal of The Royal of Medicine.* 97: 292-296.
- Comsa, S., A. M. Cimpean dan M. Raica. 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research. *Anticancer Research.* 35: 3147-3154.
- Das, A., M. C. Das, N. Das dan S. Bhattacharjee. 2017. Evaluation of the Antileishmanial Potency, Toxicity and Phytochemical Constituents of Methanol Bark Extract of *Sterculia villosa*. *Pharmaceutical Biology.* 55(1): 998-1009.
- Denard, B., C. Lee dan J. Ye. 2016. Doxorubicin Blocks Proliferation of Cancer Cells through Proteolytic Activation of CREB3L1. *Biochemistry: Human biology and medicine.* eLife: 1.
- Ebrahim, H. Y., M. M. Moheyldin, M. M. Hailat dan K. A El Sayed. 2016. (1*S*,2*E*,4*S*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratriene-4,6-diol Semisynthetic Analogs as Novel c-Met Inhibitors for The Control of c-Met-Dependent Breast Malignancies. *Bioorg Med Chem.* 24(22): 5748–5761.
- Ferry, I., C. M. K. Fischer, E. Ernoult dan J. T Rutka. 2018. *Molecular Biology and Molecular Therapeutics*. Toronto: Elsevier Inc.
- Gao, W., N. Wu, W. Sun. 2016. Development and Validation of A Gas Chromatography/mass Spectrometry Method for the Determination of α - and β -2, 7, 11-cembratriene-4, 6-diols in Tobacco. *World Journal of Engineering.* 13(4): 341-347.

- Goel, H. L. dan A. M. Mercurio. 2013. VEGF Targets the Tumour Cell. *Nat Rev. Cancer*. 13(12): 871-882.
- Granja, A., M. Pinheiro dan S. Reis. 2016. Epigallocatechin Gallate Nanodelivery Systems for Cancer Therapy. *Nutrients*. 307 (8).
- Hailat, M. M, H. Y., Ebrahim, M. M. Moheyldin, A. A. Goda, A. B. Siddique dan K. A. El Sayed. 2017. The Tobacco Cembranoid (1*S*,2*E*,4*S*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratriene-4,6-diol as A Novel Angiogenesis Inhibitory Lead for The Control of Breast Malignancies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.028>.
- Haryanti, S. dan Y. Widiyastuti. 2017. Aktivitas Sitotoksik pada Sel MCF-7 dari Tumbuhan Indonesia untuk Pengobatan Tradisional Kanker Payudara. *Media Litbangkes*. 27(4): 247-254.
- Hassan, H. M., A. A. Sallam, R. Mohammed, M. S. Hifnawy, D. T. A. Youessef dan K. A. El Sayed. 2011. Semisynthetic Analogues of the Marine Cembranoid Sarcophine as Prostate and Breast Cancer Migration Inhibitors. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 19: 4928-4934.
- Hegazy, M. E. F., A. A El-Beih, A. Y. Moustofa, A. A. Hamdy, M. A. Alhammady, R. M. Selim, M. Abdel-Rehim dan Paul W. Pare. 2011. Cytotoxic Cembranoids from the Red Sea Soft Coral *Sarcophyton glaucum*. *Natural Product Communication*. 6 (12): 1809-1812.
- Herminingsih, Hesti. 2014. Hubungan Adaptasi Petani terhadap Perubahan Iklim dengan Produktivitas Tembakau pada Lahan Sawah dan Tegalan di Kabupaten Jember. *JSEP*. 7(2): 31-44.
- Hosseina A. dan A. Ghorbani. 2015. Cancer Therapy with Phytochemicals: Evidence from Clinical Studies. *Avicenna J Phytomed*. 5(2): 84-97.

- Irawan, D., Irsal dan Haryati. 2015. Respons Pertumbuhan Tembakau Deli (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap Pemberian Pupuk Nitrogen dan Zeolit. *Jurnal Online Agroekoteknologi*. 3(3): 904-914.
- Januar, H. I, N. P. Zamani, D. Soedharma, dan E. Chasanah. 2017. New Cytotoxic Cembranoid from Indonesian Soft Coral *Sarcophyton* sp. *Pharmacognosy Res.* 9(1): 65-68.
- Jarvinen, T. A. H, M. Tanner, V. Rantanen, M. Barlund, A. Borg, S. Grenman dan J. Isola. 2000. Amplification and Deletion of Topoisomerase II α Associate with ErbB-2 Amplification and Affect Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin in Breast Cancer. *American Journal of Pathology*. 156(3): 839-847.
- Jassbi, A. R., M. Vafapour, A. Shokrollahi, O. Firuzi, M. Zare, J. N. Chandran, B. Scheneider dan I. T. Baldwin. 2017. Cytotoxic Activity of Two Cembranoid Diterpenes from *Nicotiana sylvestris* Against Three Human Cancer Cell Lines. *The Open Bioactive Compounds Journal*. 05: 1-8.
- Kalanjati, Woro Wulandari. 2006. Perbedaan Konfluensitas dan Viabilitas Sel Kultur Primer Sel Fibroblas dari Jaringan Daun Telinga Rusa Bawean (*Axis Kuhlii*) pada Medium TCM 199 dan MEM. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Kennedy, D. O. dan E. L. Wightman. 2011. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *American Society for Nutrition Adv. Nutr.* 2: 32-50.
- Khan, N. dan H. Mukhtar. 2010. Cancer and Metastasis: Prevention and Treatment by Green Tea. *Cancer Metastasis Rev.* 29(3): 435-445.
- Krischke, M., G. Hempel, S. Voller, N. Andre, M. D'Incanci, G. Bisogno, W. Kopcke, M. Borrowski, R. Herold, A. V. Boddy, dan J. Boos. 2016. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Doxorubicin in Children with Cancer: Results of a "European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium" Trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 78: 1175-1184.

- Leffingwell, J. C. 1999. *Leaf Chemistry*. dalam: Davis D. Layten dan Mark T. Nielson, Eds. *Tobacco: Production, Chemistry, And Technology*. Blackwell Science (Pub.)
- Liu, X., J. Zhang, Q. Liu, G. Tang, H. Wang, C. Fan dan Sheng Yin. 2015. Bioactive Cembranoids from the South China Sea Soft Coral *Sarcophyton elegans*. *Molecules*. 20: 13324-13335.
- Liu, Z., L. Qi, Y. Li, X. Zhao dan B. Sun. 2017. VEGFR2 Regulates Endothelial Differentiation of Colon Cancer Cells. *BMC Cancer*. 17(593).
- Malumbres, M. dan M. Barbacid. 2009. Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm. *Nature reviews*. 9. doi: 10.1038/nrc2602.
- Meng, L., F. Zhu, X. Zhou, Y. Zheng, Z. Ding, B. Li, M. Xu dan S. Sun. 2018. Survivin is Critically Involved in VEGFR2 Signaling-mediated Esophageal Cancer Cell Survival. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 107: 139-145.
- Mirzayans, R., B. Andrais dan D. Murray. 2018. Viability Assessment Following Anticancer Treatment Requires Single-Cell Visualization. *Cancers*. 10(255).
- Mitra, S. dan R. Dash. 2018. Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. *Hindawi*. 2018. Article ID 8324696.
- Muzaiyanah, S. dan G. W. A. Santoso. 2016. Hubungan Beberapa Karakter Agronomi terhadap Hasil Kedelai Toleran Kekeringan. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi* 2016.
- Nacoulma, A. P., V. Megalizzil, L. R. Pottier, M. De Lorenzil, S. Thoret, J. Dubois, O. M. Vandeputte, P. Duez, D. Vereecke dan M. El Jaziri. 2013. Potent Antiproliferative Cembranoids Accumulate in Tobacco upon Infection with *Rhodococcus fascians* and Trigger Unusual Microtubule Dynamics in Human Glioblastoma Cells. *PLoS ONE*. 8(10): e77529.

- Nair, S. V. G., M. Hettihewa dan H. P. V. Rupasinghe. 2014. Apoptotic and Inhibitory Effects on Cell Proliferation of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells by Methanol Leaf Extract of *Costus speciosus*. *Biomed Research International*. 2014. Article ID 637098.
- Niepel, M., M. Harfner, M. Chung dan P. K. Sorger. 2018. Measuring Cancer Drug Sensitivity and Resistance in Cultured Cells. *Curr Protoc Chem Biol*. 9(2): 55-74.
- Nugroho, L. H. dan R. Verpoorte. 2002. Secondary Metabolism in Tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **68**: 105-125.
- Prayong, P., S. Barusrux dan N. Weepreeyakul. 2008. Cytotoxic Activity Screening of Some Indigenous Thai Plants. *Fitoterapia*.79: 598-601.
- Qian, X. B., J. P. Ye, X. M. Chen, C. H. Zhang, Y. J. Liang, Z. H. Li dan J. Yang. 2014. Analysis of Cembranoids in Flue-cured Tobacco by Accelerated Solvent Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Selected Ion Monitoring. *J. Chin. Chem. Soc.* 61: 1133-1140
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella dan L. Minor. 2016. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rodrigues, I. G., M. G. Miguel dan W. Mnif. 2019. A Brief Review on New Naturally Occurring Cembranoid Diterpene Derivatives from the Soft Corals of the Genera *Sarcophyton*, *Sinularia*, and *Lobophytum* Since 2016. *Molecules*. 781(24).
- Sahib, H. B., A. A Al-Zubaidy, S. M. Hussein, S. S Dahham, F. S Al-Suede dan A.M Shah. 2015. The Anti-poliferative Activity of *Vitex agnus-castus* Leaves Methanol Extract against Breast and Prostate Cancer Cell Line. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 3(02): 159-166.

- Sandeep, K., B. B. Singh dan K. Narinder. 2014. Physico-Chemical and Phytochemical Investigation of Plant *Sesbania sesban*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5(1): 110-117.
- Sayed, K. A El dan Paul W. S. 2007. Biocatalytic and Semisynthetic Studies of the Anticancer Tobacco Cembranoids. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 16(6): 877-887.
- Sayed, Khalid A. El, S. Laphookhieo, M. Yousaf, J. A. Prestridge, A. B. Shirode, V. B. Wali dan Paul W. Sylvester. 2008. Semisynthetic and Biotransformation Studies of (1*S*,2*E*,4*S*,6*R*,7*E*,11*E*)-2,7,11-Cembratriene-4,6-diol. *J. Nat. Prod.* 71: 117-122.
- Sawadogo, W. R., M. Schumacher, M. H. Teiten, C. Cerella, M. Dicato dan M. Diederich. 2013. A Survey of Marine Natural Compunds and Their Derivatives with Anti-Cancer Activity Reported in 2011. *Molecules*. 18: 3641-3673.
- Samsumaharto, Ratna Agung. 2009. Induksi Kandungan Saponin Kalus Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) dalam Kultur *In Vitro*. *Biomedika*. 2(2).
- Scott, Peter. 2008. *Physiology and Behaviour of Plants*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd,.
- Septisetyani, E. P., R. A. Ningrum, Y. Romadhani, P. H. Wisnuwardhani dan A. Santoso. 2014. Optimization of Sodium dodecyl Sulphate as A Formazan Solvent and Comparison of 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay with WST-1 Assay in MCF-7 Cells. *Indonesian J. Pharm.* 25(4): 245-254.
- Setiawan, R. F., S. Widayanti dan Sudiyarto. 2018. Analisis Daya Saing Usahatani Tembakau Kasturi di Kabupaten Jember. *P-ISSN: 14121816, E-ISSN:2614-454*. 18(1): 93-105.
- Shen, Q. P, Xing M. Xu, L. Li, W. Zhao, N. J. Xiang, G. Y Yang, Y. K Chen, M. M Miao, C. B Liu dan Z. H Liu. 2016. Sesquiterpenes from the Leaves of

Nicotiana tabacum and Their Anti-Tobacco Mosaic Virus Activity. *Chin. Chem. Lett.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cclet.2016.01.048>.

Shibuya, Masabumi. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer* 2(12): 1097-1105.

Shirazi, F. H. 2011. *Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds, Breast Cancer – Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis, Prof. Mehmet Gunduz (Ed.)*. InTech: 85-102.

Silva, S. R, K. A. Bowen, P. G. Rychahou, L. N. Jackson, H. L. Weiss, E. Y. Lee, C. M. Townsend Jr. dan B. M. Evers. 2011. VEGFR-2 Expression in Carcinoid Cancer Cells and Its Role in Tumor Growth and Metastasis. *Int J Cancer*. 128(5): 1045-1056.

Singh, S., B. Sharma, S. S. Kanwar dan A. Kumar. 2016. Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development. *Front. Plant Sci.* 7(1667).

Steel, R. dan J. H. Torrie. 1993. *Principles and Procedures of Statistics*. Jakarta: Gramedia Pustaka.

Susilowati, E. Y. 2006. Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Kering dan Uji Efektivitas Ekstrak Daun Tembakau sebagai Insektisida Pengerek Batang Padi (*Scirpophaga inonata*). *Skripsi*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.

Taiz, Lincoln dan E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology 3rd Edition*. Sunderland: Sinauer.

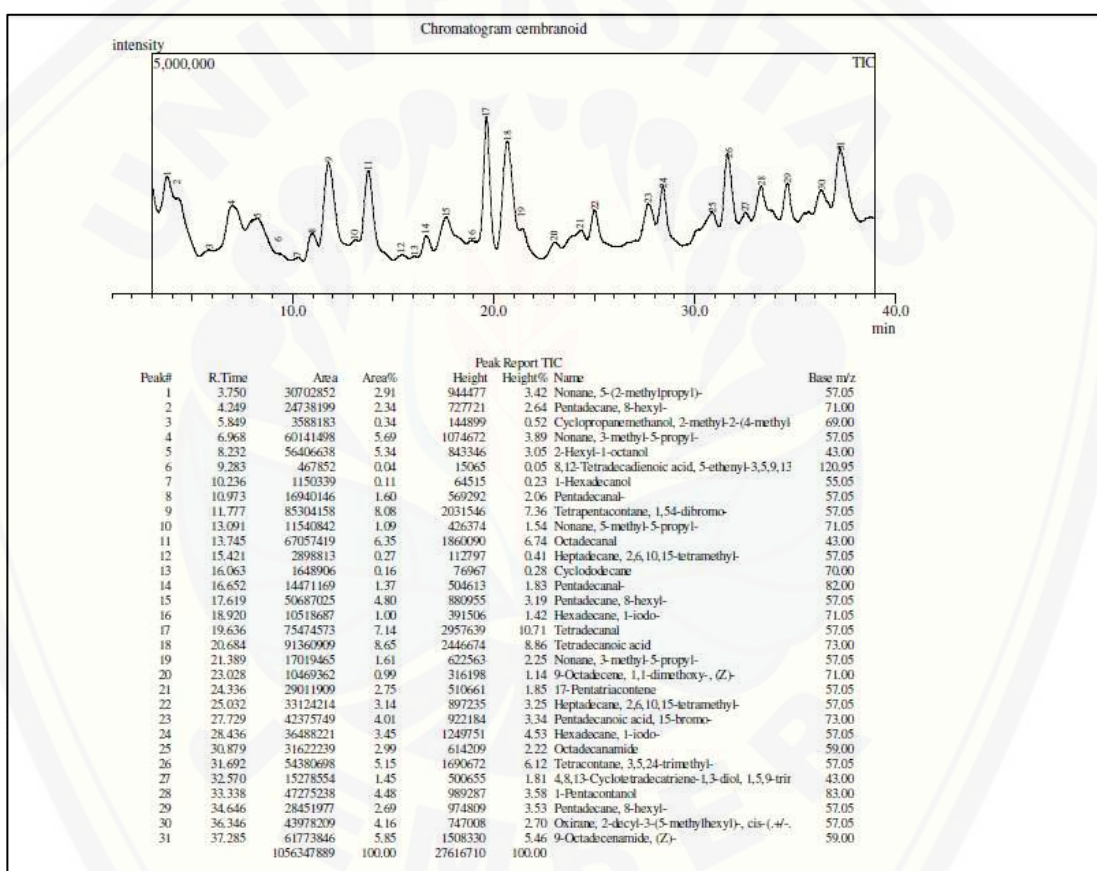
Trebnova, M., G. Laputkova, E. Slaba, K. Lacjakova dan E. Verebova. 2012. Effects of Docetaxel, Doxorubicin and Cyclophosphamide on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Anticancer Research* 32: 2849-2854.

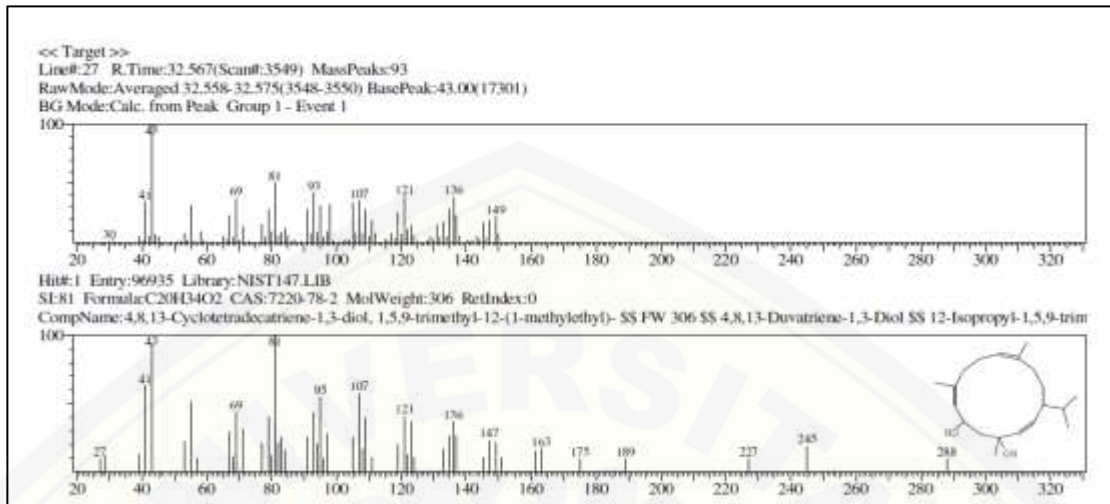
- Tsai, T. C., K. H. Lai, J. H. Su, Y. J. Wu dan J. H. Sheu. 2018. 7-Acetylsinumaximol B Induces Apoptosis and Autophagy in Human Gastric Carcinoma Cells through Mitochondria Dysfunction and Activation of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway. *Marine drugs*. 16(104).
- Velez-Carrasco, W., C. E. Green, P. Catz, A. Furimsky, K. O'Loughlin, V. A. Eterovi dan P. A. Ferchmin. 2015. Pharmacokinetics and Metabolism of 4R-Cembranoid. *PLoS ONE*. 10(3): e0121540.
- Verpoorte R (2000) *Secondary metabolism*. dalam: Verpoorte R & Alfermann AW (eds). *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* (pp 1–29). Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Vemuri, S. K., R. R. Banala, G.P.V. Subbaiah, S. K. Srivastava, A.V. Gurava Reddy dan T. Malarvili. 2017. Anti-cancer Potential of a Mix of Natural Extracts of Turmeric, Ginger and Garlic: A Cell-based Study. *Egyptian Journal of Basic and Applied Science*. 4: 332-344.
- Wang, H., T. O. Khor, L. Shu, Z. Su, F. Fuentes, J. H. Lee, dan A. T. Kong. 2012. Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anticancer Agents Med Chem*. 12(10): 1281-1305.
- Wang, X., Z. Teng, H. Wang, C. Wang, Y. Liu, J. Wu, J. Sun, H. Wang, J. Wang dan G. Lu. 2014. Increasing the Cytotoxicity of Doxorubicin in Breast Cancer MCF-7 Cells with Multidrug Resistance using a Mesoporous Silica Nanoparticle Drug Delivery System. *Int J Clin Exp Pathol*. 7(4): 1337-1347.
- Wardati, Fauchil. 2017. Potensi Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana*) sebagai Kandidat Terapeutik Kanker Payudara secara *In Vitro* dengan Menggunakan Sel T-47D. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Witranti, R. G., E. C A. Ruspendi, dan D. S Saputro. 2015. Keanekaragaman Pohon Berpotensi Obat Antikanker di Kawasan Kampus Ketingan Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 1(3): 477-483.

- World Health Organization. 2018. Cancer. <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>. [Diakses 07 Oktober 2018]
- Yan, N., Y. Du, X. Liu, H. Zhang, Y. Liu, P. Zhang, D. Gong dan Z. Zhang. 2016. Chemical Structure, Biosynthesis, Bioactivities, Biocatalysis and Semisynthesis of Tobacco Cembranoids: An Overview. *Industrial Crops and Products*. 83: 66-80.
- Yan, N., Y. Du, X. Liu, H. Zhang, Y. Liu, J. Shi, S. J. Xue, dan Z. Zhang. 2017. Analyses of Effects of α -cembratrien-diol on Cell Morphology and Transcriptome of *Valsa mali* var. *mali*. *Food Chemistry*. 214:110-118.
- Yan, N., Y. Du, X. Liu, H. Zhang, Y. Liu dan Z. Zhang. 2019. A Review of Bioactivities of Tobacco Cembranoid Diterpenes. *Biomolecules*. 9(30). doi:10.3390/biom9010030.
- Yang, J., Y. Wu, Y. Shen, C. Zhou, Y. F. Li, R. R. He dan M. Liu. 2016. Enhanced Therapeutic Efficacy of Doxorubicin for Breast Cancer using Chitosan Oligosaccharide Modified Halloysite Nanotubes. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. DOI: 10.1021/acsami.6b09074.
- Yuan, X. L., X. X. Mao, Y. M. Du, P. Z. Yan, X. D. Hou dan Z. F. Zhang. 2019. Anti-Tumor Activity of Cembranoid-Type Diterpenes Isolated from *Nicotiana tabacum* L. *Biomolecules*. 9(45). doi: 10.3390/biom9020045.
- Zhou, Y., Y. Yang, X. L. Li, Z. Y. Chen, Q. B. Liu, X. L. Zhu dan J. Yang. 2016. Determination of Cembrenediols in Tobacco by Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Selected Ion Monitoring with Precolumn Derivatization. *Acta Chromatographica*. 28(4): 513-524.
- Zubair, M. S., S. Anam, K. O. Al-Footy, A. Abdel-Lateef dan W. M Alarif. 2014. Cembranoid Diterpenes ad Antitumor: Molecular Docking Study to Several Protein Receptor Targets. *Proceeding of 3rd International Conference on Computation for Science and Technology Volume 2*. September 2014: 121-125.

Lampiran

A. Hasil GC-MS Fraksi Senyawa Sembranoid





B. Perhitungan Pengenceran

B.1 Perhitungan Konsentrasi Sel

- Jumlah Sel terhitung menggunakan *Haemocytometer* di bawah Mikroskop

Inverted

A	B
C	D

Jumlah sel MCF-7 yang terhitung (mL⁻¹):

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{\sum \text{Sel kamar A} + \sum \text{Sel kamar B} + \sum \text{Sel kamar C} + \sum \text{Sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

$$= \frac{79+67+82+87}{4} \times 10^4$$

$$= 79 \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

- Jumlah mL panen Sel MCF-7 yang ditransfer (mL)

Kepadatan sel yang ditanam per sumuran = 10.000 sel tiap sumuran

$$\text{Volume panen sel yang ditransfer} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/mL}}$$

$$= \frac{10.000 \times 100 \text{ (96 well, dibuat lebih)}}{79 \times 10^4}$$

$$= 1,26 \text{ mL}$$

- **Volume yang dibutuhkan untuk penanaman sel MCF-7 dalam 1 plate:**

$$V = 100 \text{ } \mu\text{l (per well)} \times 100 \text{ (96 well, dibuat lebih)}$$

$$= 10.000 \text{ } \mu\text{l atau 10 mL}$$

Jadi, volume panen sel yang dibutuhkan untuk satu plate ialah 1,26 mL dan ditambahkan ke media DMEM hingga 10 mL.

Jumlah sel Vero yang terhitung (mL^{-1}):

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{\sum \text{Sel kamar A} + \sum \text{Sel kamar B} + \sum \text{Sel kamar C} + \sum \text{Sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

$$= \frac{43+60+52+45}{4} \times 10^4$$

$$= 50 \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

- **Jumlah mL panen Sel Vero yang ditransfer (mL)**

Kepadatan sel yang ditanam per sumuran = 10.000 sel tiap sumuran

$$\text{Volume panen sel yang ditransfer} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/mL}}$$

$$= \frac{10.000 \times 100 \text{ (96 well, dibuat lebih)}}{50 \times 10^4}$$

$$= 2 \text{ mL}$$

- **Volume yang dibutuhkan untuk penanaman sel Vero dalam 1 plate:**

$$V = 100 \text{ } \mu\text{l (per well)} \times 100 \text{ (96 well, dibuat lebih)}$$

$$= 10.000 \text{ } \mu\text{l atau 10 mL}$$

Jadi, volume panen sel yang dibutuhkan untuk satu plate ialah 2 mL dan ditambahkan ke media M-199 hingga 10 mL.

B.2 Pengenceran Fraksi Senyawa Sembranoid

Penelitian ini dilakukan secara triplo dengan tiga kali replikasi sehingga diperoleh 9 data pada tiap konsentrasi. Pengenceran fraksi senyawa sembranoid pada konsentrasi 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml dan 2 µg/ml menggunakan *serial dillution*. Rumus yang digunakan yaitu:

$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ 1800 \cdot 64 &= V_2 \cdot 100.000 \\ 115.200 &= V_2 \cdot 100.000 \\ 1,152 \mu\text{l} &= V_2 \end{aligned}$$

Sehingga dibutuhkan 1,152 µl fraksi senyawa sembranoid yang ditambahkan pada media DMEM (sel MCF-7) dan media M-199 (sel Vero) hingga 1800 µl.

B.3 Pengenceran Doksorubisin

Konsentrasi stok doksorubisin ialah 2000 µg/ml. Maka pengenceran untuk konsentrasi 0,78 µg/ml yaitu:

$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ 1800 \cdot 0,78 &= V_2 \cdot 2000 \\ 1404 &= V_2 \cdot 2000 \\ 0,702 \mu\text{l} &= V_2 \end{aligned}$$

Sehingga dibutuhkan doksorubisin dengan volume 0,702 µl yang ditambahkan pada media DMEM (sel MCF-7) dan media M-199 (sel Vero) hingga 1800 µl.

C. Hasil Absorbansi menggunakan ELISA Reader dan Penghitungan Rata-Rata Viabilitas Sel MCF-7 dan sel Vero

- Sel MCF-7

	Absorbansi Plate 1	Absorbansi Plate 2	Absorbansi Plate 3

Konsentrasi	1	2	3	1	2	3	1	2	3
64	0.472	0.49	0.494	0.385	0.43	0.476	0.328	0.448	0.493
32	0.697	0.531	0.559	0.444	0.634	0.578	0.412	0.608	0.721
16	0.641	0.722	0.627	0.607	0.497	0.631	0.515	0.614	0.858
8	0.551	0.968	0.658	0.501	0.637	0.489	0.43	0.629	0.599
4	0.6	0.664	0.69	0.446	0.749	0.49	0.407	0.573	0.838
2	0.618	0.825	0.936	0.383	0.446	0.45	0.368	0.551	0.808

Konsentrasi	Viabilitas Plate 1 (%)			Viabilitas Plate 2 (%)			Viabilitas Plate 3 (%)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
64	57.762	60.791	61.464	45.7132	52.825	60.095	29.165	50.603	48.995
32	95.625	67.69	72.402	55.0375	85.065	76.215	44.172	79.187	99.375
16	86.201	99.832	83.845	80.7981	63.414	84.591	62.573	80.259	123.85
8	71.056	141.23	89.062	64.0458	85.539	62.149	47.387	82.939	77.579
4	79.302	90.072	94.447	55.3536	103.24	62.307	43.278	72.934	120.28
2	82.331	117.16	135.84	45.3971	55.354	55.986	36.311	69.004	114.92

- **Sel Vero**

Konsentrasi	Absorbansi Plate 1			Absorbansi Plate 2			Absorbansi Plate 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
64	0.515	0.597	0.652	0.433	0.452	0.504	0.528	0.398	0.382
32	0.702	0.728	0.784	0.448	0.438	0.435	0.394	0.41	0.396
16	0.719	0.721	0.711	0.473	0.493	0.457	0.425	0.426	0.478
8	0.606	0.722	0.822	0.469	0.517	0.466	0.382	0.378	0.382
4	0.629	0.8	0.859	0.458	0.49	0.47	0.396	0.413	0.43
2	0.624	0.779	0.843	0.484	0.503	0.495	0.392	0.42	0.463

Konsentrasi	Viabilitas Plate 1 (%)			Viabilitas Plate 2 (%)			Viabilitas Plate 3 (%)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
64	65.004	77.494	85.872	136.32	96.136	91.19	98.556	104.04	119.06
32	93.488	97.449	105.98	94.9	99.845	95.518	102.89	100	99.134
16	96.078	96.382	94.859	104.48	104.79	120.87	110.11	115.88	105.49
8	78.865	96.535	111.77	91.19	89.954	91.19	108.95	122.82	108.09
4	82.369	108.42	117.4	95.518	100.77	106.03	105.78	115.02	109.24
2	81.607	105.22	114.97	94.281	102.94	116.23	113.29	118.77	116.46

D. Hasil Uji *General Linear Model (GLM)* dan Uji *Duncan* Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid terhadap Persentase Hidup Sel MCF-7 dan Sel Vero

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Persentase Sel Hidup	126	84.8835	24.20490	29.16	141.23

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Persentase Sel Hidup	
N		126	
Normal Parameters(a,b)	Mean	84.8835	
	Std. Deviation	24.20490	
Most Extreme Differences	Absolute	.080	
	Positive	.075	
	Negative	-.080	
Kolmogorov-Smirnov Z		.894	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.401	
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.	.384(c)	
	95% Confidence Interval	Lower Bound	.374
	Upper Bound	.393	

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

c Based on 10000 sampled tables with starting seed 2000000.

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Sel	1	Sel Vero	63
	2	Sel MCF	63
Sembranoid	1	Doxo	18
	2	Dosis 2	18
	3	Dosis 4	18
	4	Dosis 8	18
	5	Dosis 16	18
	6	Dosis 32	18
	7	Dosis 64	18

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Persentase Sel Hidup

Sel	Sembranoid	Mean	Std. Deviation	N
SelVero	Doxo	58.9188	6.90453	9
	Dosis 2	107.0840	12.46218	9
	Dosis 4	104.5047	10.62583	9
	Dosis 8	99.9285	13.78123	9
	Dosis 16	105.4376	9.02647	9
	Dosis 32	98.8000	3.98306	9
	Dosis 64	97.0754	21.35247	9
	Total		95.9641	19.52080
SelMCF	Doxo	65.2809	7.19792	9
	Dosis 2	79.1453	35.58251	9
	Dosis 4	80.1345	24.47364	9
	Dosis 8	80.1096	26.44069	9
	Dosis 16	85.0403	18.51120	9
	Dosis 32	74.9743	17.84969	9
	Dosis 64	51.9347	10.23577	9
	Total		73.8028	23.46527
Total	Doxo	62.0999	7.58483	18
	Dosis 2	93.1147	29.58930	18
	Dosis 4	92.3196	22.18573	18
	Dosis 8	90.0190	22.85480	18
	Dosis 16	95.2389	17.59907	18
	Dosis 32	86.8871	17.54038	18
	Dosis 64	74.5051	28.34155	18
	Total		84.8835	24.20490

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Persentase Sel Hidup

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	37705.699(a)	13	2900.438	9.143	.000
Intercept	907855.362	1	907855.362	2861.885	.000
Kelompok	15470.452	1	15470.452	48.768	.000
Dosis	15974.570	6	2662.428	8.393	.000
Kelompok * Dosis	6260.678	6	1043.446	3.289	.005
Error	35528.959	112	317.223		
Total	981090.021	126			
Corrected Total	73234.659	125			

a. R Squared = .515 (Adjusted R Squared = .459)

Estimated Marginal Means

1. Grand Mean

Dependent Variable: Persentase Sel Hidup

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound
84.883	1.587	81.740	88.027

Post Hoc Tests

Semrannoid

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Persentase Sel Hidup

(I) Semrannoid	(J) Semrannoid	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Upper Bound	Lower Bound	
LSD	Doxo	Dosis 2	-31.0148(*)	5.93692	.000	-42.7780	-19.2515
		Dosis 4	-30.2197(*)	5.93692	.000	-41.9829	-18.4565
		Dosis 8	-27.9192(*)	5.93692	.000	-39.6824	-16.1559

	Dosis 16	-33.1391(*)	5.93692	.000	-44.9023	-21.3758
	Dosis 32	-24.7873(*)	5.93692	.000	-36.5505	-13.0240
	Dosis 64	-12.4052(*)	5.93692	.039	-24.1684	-.6420
Dosis 2	Doxo	31.0148(*)	5.93692	.000	19.2515	42.7780
	Dosis 4	.7951	5.93692	.894	-10.9682	12.5583
	Dosis 8	3.0956	5.93692	.603	-8.6676	14.8589
	Dosis 16	-2.1243	5.93692	.721	-13.8875	9.6390
	Dosis 32	6.2275	5.93692	.296	-5.5357	17.9908
	Dosis 64	18.6096(*)	5.93692	.002	6.8464	30.3728
Dosis 4	Doxo	30.2197(*)	5.93692	.000	18.4565	41.9829
	Dosis 2	-.7951	5.93692	.894	-12.5583	10.9682
	Dosis 8	2.3005	5.93692	.699	-9.4627	14.0638
	Dosis 16	-2.9194	5.93692	.624	-14.6826	8.8439
	Dosis 32	5.4324	5.93692	.362	-6.3308	17.1957
	Dosis 64	17.8145(*)	5.93692	.003	6.0513	29.5777
Dosis 8	Doxo	27.9192(*)	5.93692	.000	16.1559	39.6824
	Dosis 2	-3.0956	5.93692	.603	-14.8589	8.6676
	Dosis 4	-2.3005	5.93692	.699	-14.0638	9.4627
	Dosis 16	-5.2199	5.93692	.381	-16.9832	6.5433
	Dosis 32	3.1319	5.93692	.599	-8.6313	14.8951
	Dosis 64	15.5140(*)	5.93692	.010	3.7507	27.2772
Dosis 16	Doxo	33.1391(*)	5.93692	.000	21.3758	44.9023
	Dosis 2	2.1243	5.93692	.721	-9.6390	13.8875
	Dosis 4	2.9194	5.93692	.624	-8.8439	14.6826
	Dosis 8	5.2199	5.93692	.381	-6.5433	16.9832
	Dosis 32	8.3518	5.93692	.162	-3.4114	20.1150
	Dosis 64	20.7339(*)	5.93692	.001	8.9706	32.4971
Dosis 32	Doxo	24.7873(*)	5.93692	.000	13.0240	36.5505
	Dosis 2	-6.2275	5.93692	.296	-17.9908	5.5357
	Dosis 4	-5.4324	5.93692	.362	-17.1957	6.3308
	Dosis 8	-3.1319	5.93692	.599	-14.8951	8.6313
	Dosis 16	-8.3518	5.93692	.162	-20.1150	3.4114
	Dosis 64	12.3821(*)	5.93692	.039	.6188	24.1453
Dosis 64	Doxo	12.4052(*)	5.93692	.039	.6420	24.1684

Dosis 2	-18.6096(*)	5.93692	.002	-30.3728	-6.8464
Dosis 4	-17.8145(*)	5.93692	.003	-29.5777	-6.0513
Dosis 8	-15.5140(*)	5.93692	.010	-27.2772	-3.7507
Dosis 16	-20.7339(*)	5.93692	.001	-32.4971	-8.9706
Dosis 32	-12.3821(*)	5.93692	.039	-24.1453	-.6188

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.

Uji Duncan

Persentase Sel Hidup

- Sel MCF-7**

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0,05						
		1	2	3	4	5	6	7
Duncan (a,b) MCF 64	9	51.9347						
Doxo MCF	9	65.2809	65.2809	65.2809	65.2809			
MCF 32	9		74.9743	74.9743	74.9743			
MCF 2	9			79.1453	79.1453	79.1453		
MCF 8	9			80.1096	80.1096	80.1096		
MCF 4	9			80.1345	80.1345	80.1345		
MCF 16	9				85.0403	85.0403	85.0403	
Sig.		.136	.073	.119	.294	.058	.109	

- Sel Vero**

Perlakuan	N	Subset					
		1	2	3	4	5	1
Duncan (a,b) Doxo Vero	9	58.9188	58.9188				
Vero 64	9				97.0754	97.0754	97.0754
Vero 32	9					98.8000	98.8000
Vero 8	9					99.9285	99.9285
Vero 4	9						104.5047
Vero 16	9						105.4376
Vero 2	9						107.0840
Sig.		.136	.073	.058	.109	.307	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

- The error term is Mean Square(Error) = 317.223.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
 b Alpha = .05.

E. Perhitungan IC₅₀

IC₅₀ Fraksi Senyawa Sembranoid MCF-7

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	176.258	.	.
(a)	.020	160.793	.	.
	.030	150.981	.	.
	.040	143.600	.	.
	.050	137.597	.	.
	.060	132.486	.	.
	.070	128.006	.	.
	.080	123.994	.	.
	.090	120.345	.	.
	.100	116.987	.	.
	.150	103.081	.	.
	.200	92.029	.	.
	.250	82.548	.	.
	.300	74.033	.	.
	.350	66.143	.	.
	.400	58.657	.	.
	.450	51.413	.	.
	.500	44.284	.	.
	.550	37.156	.	.
	.600	29.912	.	.

.650	22.425	.	.
.700	14.535	.	.
.750	6.021	.	.
.800	-3.461	.	.
.850	-14.512	.	.
.900	-28.418	.	.
.910	-31.776	.	.
.920	-35.425	.	.
.930	-39.437	.	.
.940	-43.918	.	.
.950	-49.028	.	.
.960	-55.032	.	.
.970	-62.413	.	.
.980	-72.225	.	.
.990	-87.689	.	.

IC₅₀ Fraksi Senyawa Sembranoid Vero

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	285.859	.	.
(a)	.020	265.962	.	.
	.030	253.338	.	.
	.040	243.841	.	.
	.050	236.116	.	.
	.060	229.542	.	.
	.070	223.777	.	.
	.080	218.615	.	.
	.090	213.920	.	.
	.100	209.599	.	.
	.150	191.708	.	.
	.200	177.489	.	.
	.250	165.290	.	.
	.300	154.335	.	.
	.350	144.184	.	.
	.400	134.551	.	.
	.450	125.231	.	.
	.500	116.059	.	.
	.550	106.887	.	.
	.600	97.567	.	.
	.650	87.935	.	.
	.700	77.783	.	.

.750	66.828	.	.
.800	54.629	.	.
.850	40.410	.	.
.900	22.519	.	.
.910	18.198	.	.
.920	13.503	.	.
.930	8.342	.	.
.940	2.577	.	.
.950	-3.998	.	.
.960	-11.723	.	.
.970	-21.219	.	.
.980	-33.843	.	.
.990	-53.740	.	.