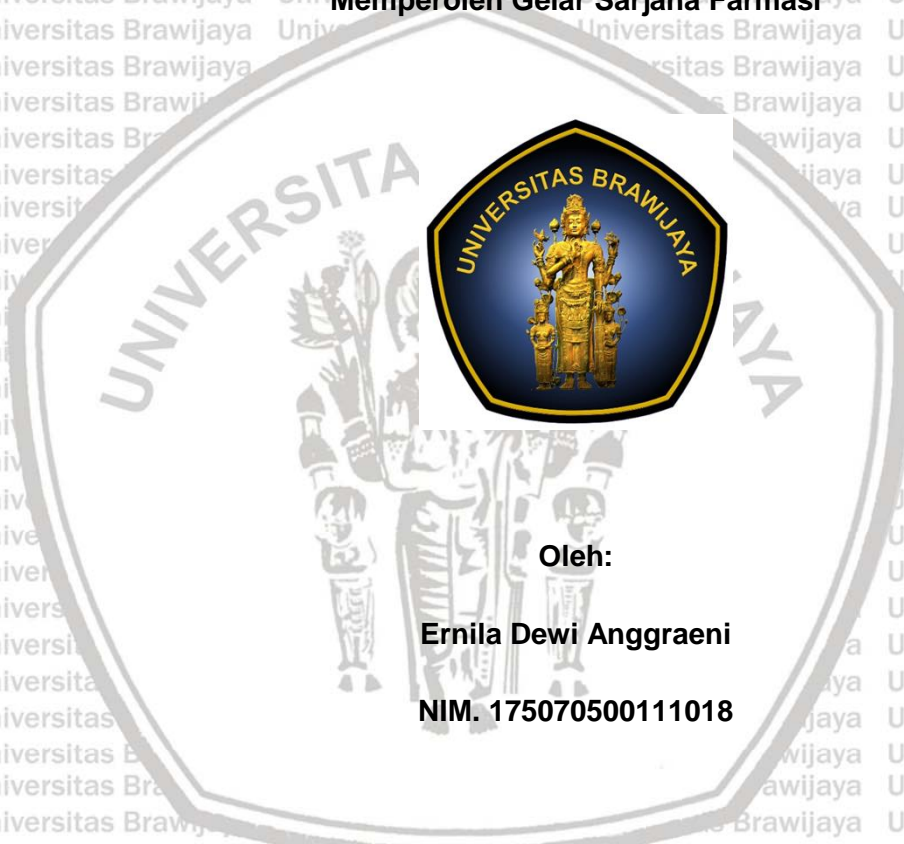


**POTENSI EKSTRAK DAGING BUAH JUWET (*Syzygium cumini*) L. SEBAGAI
AGEN SITOTOKSIK TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA 4T1**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh:

Ernila Dewi Anggraeni

NIM. 175070500111018

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

2021

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

POTENSI EKSTRAK DAGING BUAH JUWET (*Syzygium cumini*) L. SEBAGAI AGEN

SITOTOKSIK TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA 4T1

Oleh :

Ernila Dewi Anggraeni

NIM. 175070500111018

Telah diuji pada :

Hari : Jumat

Tanggal 30 April 2021

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I

Dr. apt. Valentina Yulina, S.Si., M.Si.

NIP. 198302092010122001

Pembimbing-I/Penguji-II

apt. Uswatun Khasanah, S. Farm., M. Farm

NIK. 2011068502181001

Pembimbing-II/Penguji-III

apt. Oktavia Rahayu A, S. Farm., M. Biomed

NIK. 2016058709291001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,



apt. Alvan Febrian Shalas, M.Farm.

NIP. 198502182019031007

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ernila Dewi Anggraeni

NIM : 175070500111018

Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 30 April 2021

Yang membuat pernyataan,



Ernila Dewi Anggraeni
NIM: 175070500111018

ABSTRAK

Anggraeni, Ernila Dewi. 2021. **Potensi Ekstrak Daging Buah Juwet (*Syzygium cumini*) L. sebagai Agen Sitotoksik terhadap Sel Kanker Payudara 4T1**. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) apt. Uswatun Khasanah, S. Farm., M. Farm. (2) apt. Oktavia Rahayu Adianingsih, S. Farm., M. Biomed.

Kanker payudara merupakan salah satu kondisi keganasan yang paling banyak menyerang wanita bahkan hingga menyebabkan kematian. Kanker payudara adalah keadaan abnormal dari pertumbuhan sel-sel yang menyusun organ payudara sehingga menyebabkan kondisi keganasan. Salah satu strategi dalam penanganan kanker payudara adalah pengembangan obat bahan alam. Salah satu tanaman yang menjadi kandidat agen kemoterapi bahan alam adalah buah juwet (*Syzygium cumini*). Tanaman juwet (*Syzygium cumini*) digunakan dalam pengobatan tradisional Ayurveda, India. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa buah *Syzygium cumini* menunjukkan efek sitotoksik pada sel MCF7. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi pemberian ekstrak etanol buah juwet (*Syzygium cumini*) sebagai efek sitotoksik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker 4T1. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi dengan etanol 96%. Kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada buah juwet diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Uji sitotoksik menggunakan MTT assay dengan parameter nilai IC_{50} . Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa buah juwet mengandung alkaloid, terpenoid, flavonoid, dan antosianin. Hasil uji MTT assay dengan rentang konsentrasi 400, 500, 600, 700, dan 800 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan efek sitotoksik yang rendah namun terdapat *dose dependent manner* yang ditunjukkan dengan adanya penurunan % viabilitas sel seiring dengan peningkatan konsentrasi sampel yang diberikan sehingga diperoleh nilai rata-rata IC_{50} sebesar $732,6876 \pm 69,41 \mu\text{g/ml}$.

Kata kunci : Kanker payudara, *Syzygium cumini*, sel 4T1, MTT Assay, sitotoksik.

ABSTRACT

Anggraeni, Ernila Dewi. 2021. **Potential of Juwet Fruit Extract (*Syzygium cumini*) L. as a Cytotoxic Agent against 4T1 Breast Cancer Cells**. Final Assignment, Pharmacy Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) apt. Uswatun Khasanah, S. Farm., M. Farm. (2) apt. Oktavia Rahayu Adianingsih, S. Farm., M. Biomed.

Breast cancer is one of the most malignant conditions that affects women and even causes death. Breast cancer is an abnormal condition of the growth of cells that make up the organs of the breast, causing malignancy. One of the strategies in treating breast cancer is the development of herbal medicine. *Syzygium cumini* was One of the plants that are candidates for natural chemotherapy agents is juwet fruit (*Syzygium cumini*). *Syzygium cumini* was traditionally used as medicine in Ayurveda India. Previous research showed that fruits of *Syzygium cumini* exhibited cytotoxic effect against MCF7. This study aims to determine the potential of giving ethanol extract of *Syzygium cumini* fruit as a cytotoxic effect in inhibiting the growth of 4T1 cancer cells. The extraction method used is maceration with 96% ethanol. The content of secondary metabolites found in juwet was identified using thin layer chromatography (TLC). Cytotoxic test using the MTT assay with the parameter value of IC_{50} . Based on the research results, it is known that juwet fruit contains alkaloids, terpenoids, flavonoids, and anthocyanins. The results of the MTT assay with a concentration range of 400, 500, 600, 700, and 800 $\mu\text{g} / \text{ml}$ showed a low cytotoxic effect but there was a dose dependent manner indicated by a decrease in the percentage of cell viability along with an increase in the concentration of the sample given so that the mean value was obtained. the IC_{50} average was $732.6876 \pm 69.41 \mu\text{g} / \text{ml}$.

Keywords : Breast cancer, *Syzygium cumini*, 4T1 cells, MTT Assay, cytotoxic.



DAFTAR ISI

TUGAS AKHIR..... i

HALAMAN PENGESAHAN..... ii

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN iii

KATA PENGANTAR iv

ABSTRAK vi

ABSTRACT vii

DAFTAR ISI viii

DAFTAR TABEL xiii

DAFTAR GAMBAR xiv

DAFTAR LAMPIRAN xvi

DAFTAR SINGKATAN xvii

BAB I PENDAHULUAN 1

 1.1. Latar Belakang 1

 1.2. Rumusan Masalah 3

 1.3. Tujuan Penelitian..... 4

 1.3.1. Tujuan Umum..... 4

 1.3.2. Tujuan Khusus 4

 1.4. Manfaat Penelitian..... 4

 1.4.1. Manfaat Akademis..... 4

 1.4.2. Manfaat Praktis..... 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... 5

 2.1. Kanker Payudara..... 5

 2.1.1. Definisi 5

2.1.2. Faktor Resiko	5
2.1.3. Patofisiologi	7
2.1.4. Manifestasi Klinis	9
2.1.5. Pengobatan Kanker	9
2.2. Juwet (<i>Syzygium cumini</i>)	10
2.2.1. Taksonomi	10
2.2.2. Morfologi	11
2.2.3. Kandungan Kimia	12
2.2.4. Aktivitas Antikanker	12
2.3. Sel Kanker Payudara 4T1	14
2.4. Maserasi	14
2.5. MTT Assay	15
2.6. Kromatografi Lapis Tipis	16
2.7. <i>Micrplate Reader</i>	18
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	19
3.1. Kerangka Konsep	19
3.2. Hipotesis Penelitian	20
BAB IV METODE PENELITIAN	21
4.1. Rancangan Penelitian	21
4.2. Subjek Penelitian	21
4.3. Variabel Penelitian	21
4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian	21
4.5. Bahan dan Alat Penelitian	22
4.5.1. Ekstraksi <i>Syzygium cumini</i>	22
4.5.1.1. Bahan	22



4.5.1.2. Alat	22
4.5.2. Skrining Fitokomia	22
4.5.2.1. Bahan	22
4.5.2.2. Alat	22
4.5.3. Kultur Sel 4T1	22
4.5.3.1. Bahan	22
4.5.3.2. Alat	23
4.5.4. Uji Sitotoksik dengan MTT Assay	23
4.5.4.1 Bahan	23
4.5.4.2 Alat	23
4.6. Definisi Operasional	23
4.7. Prosedur Penelitian	25
4.7.1. Alur Penelitian	25
4.7.2. Ekstraksi <i>Syzygium cumini</i>	25
4.7.3. Skrining Fitokimia	26
4.7.3.1. Identifikasi Fenol	26
4.7.3.2. Identifikasi Senyawa Tanin.....	27
4.7.3.3. Identifikasi Senyawa Alkaloid	27
4.7.3.4. Identifikasi Senyawa Steroid	28
4.7.3.5. Identifikasi Senyawa Terpenoid	29
4.7.3.6. Identifikasi Senyawa Saponin	30
4.7.3.7. Identifikasi Senyawa Flavonoid	30
4.7.3.8. Identifikasi Senyawa Antrakuinon.....	31
4.7.3.9. Identifikasi Senyawa Antosianin.....	32
4.7.4. Kultur Sel 4T1	33

4.7.4.1. Preparasi Media Kultur DMEM <i>High Glucose</i>	33
4.7.4.2. Preparasi Media Kultur Lengkap.....	33
4.7.4.3. Penggantian Media.....	34
4.7.4.4. Penumbuhan Sel (<i>Cell Thawing</i>).....	35
4.7.4.5. Panen Kultur Sel.....	36
4.7.4.6. <i>Cryopreservation</i>	37
4.7.4.7. Perhitungan Sel.....	37
4.7.4.8. Preparasi Sampel.....	39
4.7.5. Uji Sitotoksik Metode <i>MTT</i> assay.....	41
4.7.6. Pengukuran dengan <i>ELISA Reader</i>	43
4.7.7. Analisis Data.....	44
4.7.7.1. Perhitungan IC_{50}	44
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....	46
5.1. Hasil Ekstraksi Daging Buah Juwet (<i>Syzygium cumini</i>).....	46
5.2. Hasil Skrining Fitokimia.....	46
5.2.1. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Fenol.....	47
5.2.2. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Tanin.....	47
5.2.3. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid.....	48
5.2.4. Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Steroid.....	49
5.2.5. Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid.....	49
5.2.6. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Saponin.....	50
5.2.7. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid.....	51
5.2.8. Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Antrakuinon.....	51
5.2.9. Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Antosianin.....	52
5.3. Hasil Uji Sitotoksik Daging Buah Juwet (<i>Syzygium cumini</i>).....	53

BAB VI PEMBAHASAN..... 62

6.1. Pembahasan Hasil Penelitian..... 62

6.2. Implikasi di Bidang Farmasi..... 67

6.3. Keterbatasan Penelitian..... 67

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN..... 68

7.1. Kesimpulan..... 68

7.2. Saran..... 68

DAFTAR PUSTAKA..... 69

LAMPIRAN..... 75



DAFTAR TABEL

Tabel 5. 1. Nilai Rf Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid 49

Tabel 5. 2. Nilai Rf Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid..... 50

Tabel 5. 3. Nilai Rf Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid 51

Tabel 5. 4. Nilai Rf Skrining Fitokimia Senyawa Antosianin 53

Tabel 5. 5. Hasil uji sitotoksik ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini*..... 58



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Buah Juwet (Dokumentasi Pribadi)..... 12

Gambar 2. 2. Kultur Sel Kanker Payudara 4T1 (Sumber: ATCC, 2020) 14

Gambar 2. 3. Reduksi MTT menjadi formazan (Bahguna et al, 2017). 16

Gambar 3. 1. Kerangka Konsep Penelitian..... 19

Gambar 4. 1. Alur Penelitian..... 25

Gambar 4. 2. Denah MTT Assay..... 43

Gambar 5. 1. Ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* (dokumentasi pribadi)..... 46

Gambar 5. 2. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Fenol..... 47

Gambar 5. 3. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Tanin 48

Gambar 5. 4. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid 48

Gambar 5. 5. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Steroid 49

Gambar 5. 6. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid..... 50

Gambar 5. 7. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Saponin 50

Gambar 5. 8. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid 51

Gambar 5. 9. Plat KLT Skrining Fitokimia Senyawa Antrakuinon 52

Gambar 5. 10. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Antosianin 52

Gambar 5. 11. Sel 4T1 kelompok kontrol dan seri konsentrasi sebelum diberi sampel dan reagen MTT pada perbesaran 100x 55

Gambar 5. 12. Sel 4T1 kelompok kontrol dan seri konsentrasi setelah diberi sampel pada perbesaran 100x..... 56

Gambar 5. 13. Sel 4T1 kelompok kontrol dan seri konsentrasi setelah diberi sampel dan reagen MTT pada perbesaran 100x 57

Gambar 5. 14. Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daging Buah *Syzygium cumini* terhadap % viabilitas sel 4T1 pada replikasi 1 60

Gambar 5. 15. Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daging Buah *Syzygium cumini* terhadap % viabilitas sel 4T1 pada replikasi 2 60

Gambar 5. 16. Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daging Buah *Syzygium cumini* terhadap % viabilitas sel 4T1 pada replikasi 3..... 61



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Ekstraksi daging buah *Syzygium cumini* 75

Lampiran 2. Skrining Fitokimia..... 76

Lampiran 3. Foto Hasil Perlakuan Sel 4T1..... 83

Lampiran 4. Hasil Perhitungan SPSS dan Excel..... 84



DAFTAR SINGKATAN

Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma 2</i>
BRCA 1 dan 2	<i>Breast cancer associated gene 1 dan 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	<i>Dimetil Sulfoksida</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
EDTA	<i>Etilen Diamin Tetraasetat</i>
ER	<i>Esterogen Receptor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
HER-2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i>
IGF	<i>Insulin Like Growth Factor-1</i>
IL-3	<i>Interleukin-3</i>
JAK/STAT transcription	<i>Janus Kinase/Signal transducer and activator of</i>
KLT	<i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MKL	<i>Media Kultur Lengkap</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PR	<i>Progesteron Receptor</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TNBC	<i>Triple-negative breast cancer</i>



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sampai saat ini, penyakit kanker masih menjadi permasalahan bagi dunia medis karena tingginya angka kematian pada kasus kanker. Kanker merupakan penyakit keganasan yang dapat menyerang beberapa organ di tubuh manusia.

Salah satu jenis kanker dengan jumlah kejadian tertinggi menurut WHO (2020) adalah kanker payudara. Kanker payudara merupakan jenis kanker yang menyerang organ payudara di berbagai bagian. Jenis kanker payudara yang paling umum adalah karsinoma yang berasal dari sel epitel payudara. Sekitar 85% kanker payudara berasal dari sel-sel duktus dan 15% sisanya dimulai dalam sel yang melapisi lobul (*lobular carcinoma*) (Elsharkawy, 2014).

Berdasarkan data dari WHO, kanker payudara merupakan kanker terbanyak yang menyerang perempuan di dunia yaitu dengan jumlah angka kejadian 47,8 per 100.000 penduduk. Rata-rata kematian pada pasien kanker payudara di dunia adalah 13,6 per 100.000 penduduk (Global Cancer Observatory, 2020b). Kasus kejadian kanker di Indonesia berdasarkan data WHO menunjukkan bahwa kanker payudara juga menduduki peringkat pertama kejadian kanker yang paling banyak dialami perempuan kemudian disusul kanker serviks. Prevalensi kejadian kanker payudara di Indonesia yaitu mencapai 44 per 100.000 penduduk dengan angka kematian 15,3 per 100.000 penduduk (Global Cancer Observatory, 2020a). Data Riskesdas 2018 menunjukkan bahwa prevalensi kasus kanker di Indonesia mengalami

peningkatan yaitu dari 1,4 per 1000 penduduk pada tahun 2013 kini menjadi 1,9 per 1000 penduduk (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018)

Kasus kematian pada kanker didominasi oleh adanya metastasis kanker tersebut. Adanya metastasis pada kanker akan mempersulit proses pengobatan baik dengan kemoterapi, pembedahan, maupun radiasi. Pengobatan kanker yang sering digunakan adalah kemoterapi. Kemoterapi merupakan pengobatan dengan tujuan mematikan sel-sel kanker yang dapat diberikan melalui injeksi dan oral (Yudissanta & Ratna, 2012). Obat kemoterapi yang sering digunakan pada kasus kanker payudara adalah dari golongan antimetabolit seperti metotreksat, senyawa DNA interkalasi seperti cisplatin dan doxorubicin, senyawa antitubulin seperti taksan, hormone, dan terapi target (Nussbaumer et al., 2011). Namun penggunaan obat kemoterapi tersebut memiliki banyak efek samping yang dapat muncul seperti rambut yang rontok, supresi sumsum tulang, timbul resistensi obat, adanya lesi pada gastrointestinal, gangguan neurologi, bahkan bisa menyebabkan toksisitas pada jantung (Hosseini & Ghorbani, 2015)

Saat ini obat dari bahan alam banyak dikembangkan untuk terapi penunjang kanker dengan obat konvensional. Beberapa senyawa yang terkandung dalam bahan alam yang dianggap dapat dimanfaatkan sebagai antikanker antara lain *flavonoid*, *allicin*, *quercetin*, *curcumin*, *polifenol*, dan *carotenoid* (Shareef et al., 2016). Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai kandidat antikanker adalah juwet. Juwet (*Syzygium cumini*) merupakan tanaman musiman yang tumbuh banyak di Indonesia. Aktivitas farmakologi yang dimiliki oleh tanaman juwet antara lain sebagai antialergi, anti bakteri, antiinflamasi, antidiabetes, antifungal, antioksidan, hingga antikanker (Katiyar et al., 2016). Sebuah penelitian pada sel kanker serviks dengan uji MTT

menunjukkan bahwa ekstrak *Syzygium cumini* 40% dapat menghambat pertumbuhan sel kanker serviks sebanyak 14,4% (HeLa) dan 11,8% (SiHa).

Sedangkan pada konsentrasi ekstrak 80% dapat menghambat pertumbuhan sebanyak 30,3% HeLa dan 23,2 % SiHa (Barh & Viswanathan, 2008). Penelitian lain menunjukkan bahwa pada uji MTT ekstrak methanol buah juwet dengan konsentrasi 1000 µg/ml terhadap sel kanker payudara MCF-7 diperoleh penghambatan pertumbuhan sebesar 70,12%. Aktivitas sitotoksik tersebut dimungkinkan dari kandungan flavonoid yang terdapat pada buah juwet (Tripathy, 2015).

Berdasarkan uraian tersebut, dapat dilakukan penelitian mengenai aktivitas ekstrak etanol buah juwet sebagai antikanker payudara pada sel 4T1. Proses ekstraksi yang dipilih yaitu dengan metode maserasi. Pada penelitian ini digunakan model sel kanker payudara 4T1 karena memiliki karakteristik mampu berproliferasi dengan cepat (Tao et al., 2008). Uji sitotoksik yang digunakan yaitu MTT Assay. MTT assay didasarkan pada reduksi garam MTT berwarna kuning oleh sel yang aktif secara metabolik menjadi kristal formazan berwarna biru ungu yang selanjutnya dapat diketahui viabilitas sel (Bahuguna et al., 2017)

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dapat dituliskan rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Apakah kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam buah juwet (*Syzygium cumini*) ?
2. Apakah ekstrak etanol buah juwet (*Syzygium cumini*) memiliki efek sitotoksik pada sel kanker 4T1 ?

3. Apakah terdapat hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak dengan penurunan % viabilitas sel 4T1 ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada buah juwet dan aktivitas sitotoksik dari pemberian ekstrak etanol buah juwet terhadap kultur sel kanker payudara 4T1 dengan metode MTT Assay.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis kandungan metabolit sekunder buah juwet dan efek sitotoksik ekstrak etanol buah juwet terhadap kultur sel kanker payudara 4T1 yang dilihat dari nilai IC_{50} .

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademis

Manfaat akademis dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder buah juwet dan efek sitotoksik pemberian ekstrak etanol buah juwet (*Syzygium cumini*) terhadap kultur sel kanker payudara 4T1 sehingga dapat digunakan untuk pengembangan selanjutnya.

1.4.2. Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah mahasiswa mampu berkontribusi dalam perkembangan obat bahan alam dari ekstrak etanol buah juwet (*Syzygium cumini*) sebagai agen sitotoksik terhadap sel kanker payudara 4T1 sehingga dapat dijadikan terapi pendukung pada kanker payudara.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker Payudara

2.1.1. Definisi

Kanker dapat didefinisikan sebagai gangguan pertumbuhan sel yang abnormal dan tidak terkontrol dengan mengabaikan pertumbuhan sel normal.

Secara umum, sel normal akan tumbuh konstan sesuai sinyal yang diberikan apakah harus membelah, berdiferensiasi menjadi sel lain, atau mati. Sedangkan pada sel kanker, perkembangan sel yang terjadi tidak mengikuti sinyal yang semestinya sehingga menyebabkan pertumbuhan dan proliferasi sel yang tidak terkendali (Hejmadi, 2014).

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang menyerang organ payudara di berbagai bagian. Jenis kanker payudara yang paling umum adalah karsinoma yang berasal dari sel epitel payudara. Sekitar 85% kanker payudara berasal dari sel-sel duktus dan 15% sisanya dimulai dalam sel yang melapisi lobul (*lobular carcinoma*). Sel-sel kanker payudara dapat memasuki pembuluh limfatik dan menyebar ke kelenjar getah bening. Selain itu sel kanker juga dapat memasuki pembuluh darah dan menyebar ke bagian tubuh lain (Elsharkawy, 2014).

2.1.2. Faktor Resiko

Beberapa faktor resiko yang mungkin dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara antara lain:

1. Faktor lingkungan. Adanya radiasi dari pemakaian gadget, prosedur diagnostik kesehatan dapat meningkatkan resiko terjadinya kanker payudara (Angahar, 2017).
2. Riwayat hormonal. Semakin banyak siklus menstruasi yang dialami wanita selama hidupnya, maka semakin besar pula resiko terkena kanker payudara. Hal ini terkait dengan paparan kumulatif payudara terhadap estrogen dan progesterone (Angahar, 2017).
3. Usia *menarche* (permulaan mesntruasi) yang terlalu dini atau dibawah 12 tahun. Wanita dengan permulaan menstruasi yang terlalu dini memiliki resiko 9 kali terkena kanker payudara dibandingkan dengan wanita yang tidak mengalami *menarche* dini. Hal ini terjadi karena adanya paparan hormon estrogen dan progesterone yang akan mempengaruhi proses proliferasi jaringan termasuk jaringan payudara (Priyatin et al., 2013)
4. Usia kehamilan pertama diatas 35 tahun. Wanita yang hamil di usia tua memiliki siklus menstruasi yang lebih banyak. Hal ini menyebabkan adanya perubahan pada jaringan payudara akibat adanya hormon estrogen. Perubahan ini menimbulkan proses regenerasi sel yang tidak normal dan dapat memperbesar resiko terjadinya kanker payudara. Selain itu kehamilan pertama di usia diatas 35 tahun atau tidak pernah hamil dapat meningkatkan resiko terjadinya kanker payudara akibat adanya rangsangan pematangan sel-sel payudara yang disebabkan oleh kehamilan lebih peka terhadap perubahan ke arah keganasan (Priyatin et al., 2013)

5. Tidak pernah menyusui. Menyusui dapat menurunkan resiko kanker payudara. Waktu menyusui yang lebih lama dapat menurunkan kadar estrogen dan melindungi dari resiko terkena kanker (Priyatin et al., 2013)
6. Obesitas. Wanita yang mengalami obesitas memiliki kadar hormon estrogen dalam darah yang lebih tinggi. Hal ini dikarenakan jaringan lemak dapat menghasilkan estrogen yang dapat meningkatkan resiko terkena kanker payudara (Angahar, 2017)
7. Riwayat kanker payudara. Wanita yang pernah mengalami kanker payudara memiliki resiko terkena kanker payudara untuk kedua kalinya baik di bagian payudara yang sudah terkena maupun di payudara lainnya (Angahar, 2017)
8. Faktor genetik. Adanya gen BRCA-1 dan BRCA-2 dapat menyumbang sekitar 80% terjadinya kanker payudara. Wanita dengan BRCA-1 dan / atau BRCA-2 positif memiliki risiko seumur hidup 50% hingga 85% terkena kanker payudara (Angahar, 2017). Gen BRCA merupakan gen pensupresi tumor yang berperan penting dalam pembentukan kanker payudara (Priyatin et al., 2013)

2.1.3. Patofisiologi

Kanker merupakan kondisi yang ditandai dengan adanya perubahan mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel sehingga menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak normal. Aktivitas proliferasi pada sel sehat dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu eksternal dan internal. Faktor eksternal yang berpengaruh yaitu adanya *growth factor* (GF), *cyclin*, *cyclin dependent kinase* (CDKS), Rb family. Molekul faktor pertumbuhan ini akan berfungsi ketika berikatan dengan reseptornya yaitu *growth factor receptor* (GFR) yang terdapat

pada permukaan sel. Aktivasi GFR karena adanya ikatan dengan GF merupakan rangkaian aktivitas hingga pengikatan protein tertentu pada DNA dalam inti sel yang mengaktifkan beberapa gen pengontrol proliferasi sel menjadi aktif. Terdapat 3 jalur tipe transduksi sinyal yang merespon GF dan merangsang mitogenik yaitu jalur MAP Kinase (MAPK), protein kinase C (PKC), dan jalur lintas JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription*) (A. Rahmawati & Mutiah, 2014). Namun pada sel tumor, pembelahan tidak bergantung pada faktor pertumbuhan eksternal. Sel-sel tumor memproduksi faktor mitogenik internal/endogen yang dikeluarkan menuju ke permukaan sel atau matriks ekstraseluler. Adanya sinyal autokrin ini dapat merangsang proliferasi sel. Selain itu adanya ekspresi reseptor tirosin kinase yang berlebihan pada sel tumor dapat mengaktifkan jalur transduksi sinyal meskipun tanpa adanya faktor mitogenik (Leber & Efferth, 2009).

Sel kanker berkembang dengan peningkatan proliferasi sel dan penurunan program kematian sel atau apoptosis (Hejmadi, 2014). Apoptosis merupakan program kematian sel yang bertujuan untuk pengangkatan sel-sel tua dan sel yang diubah secara genetik yang tidak dapat diperbaiki. Regulasi apoptosis diperankan oleh beberapa faktor salah satunya adalah protein Bcl-2. Pada sel normal adanya kerusakan internal apapun pada sel akan menyebabkan penghambatan protein ini yang kemudian mengarah pada aktivasi protein Bax yang dikodekan oleh keluarga gen proapoptosis sehingga terjadi proses apoptosis (Azhar, 2011). Namun pada sel kanker dikembangkan strategi menghindari apoptosis dengan meningkatkan sintesis faktor antiapoptotik salah satunya yaitu Bcl-2 (Leber & Efferth, 2009).

Faktor adanya mutasi gen juga dapat menyebabkan sel kanker tidak dapat melakukan apoptosis seperti sel normal. Gen p53 merupakan salah satu gen penekan tumor yang paling sering bermutasi. Inaktivasi gen p53 dapat memberikan 50% karakteristik untuk menghindari apoptosis sel tumor. Jalur lain yang terlibat adalah jalur P13 Kinase-AKT/PKB yang berkaitan dengan sinyal antiapoptosis. Persinyalan ini ditemukan dan diregulasi oleh faktor ekstraseluler seperti IGF-1 dan IL-3 atau oleh sinyal intraseluler yang melibatkan RAS sehingga mengarah ke penghindaran apoptosis (Azhar, 2011).

2.1.4. Manifestasi Klinis

Gejala kanker payudara yang paling umum adalah adanya benjolan. Selain itu gejala yang dapat muncul pada kanker payudara adalah pembengkakan seluruh atau sebagian payudara, kulit payudara seperti kulit jeruk, nyeri payudara atau puting, retraksi puting, hingga kemerahan pada payudara. Kadang-kadang terjadi pembengkakan kelenjar getah bening karena kanker dapat menyebar ke kelenjar getah bening dan menyebabkan benjolan atau bengkak di bagian tersebut (American Cancer Society, 2020)

2.1.5. Pengobatan Kanker

Terapi kanker payudara yang saat ini banyak dilakukan adalah tindakan operasi pengangkatan jaringan, radioterapi, imunoterapi, dan kemoterapi. Agen kemoterapi untuk pengobatan kanker payudara terdiri dari beberapa golongan yaitu antimetabolit seperti doksorubicin, golongan imunologik seperti tratazumab, golongan hormonal seperti tamoxifen, golongan DNA alkilasi seperti cisplatin, golongan ion modulator seperti pamidornate bisodium, dan golongan antimitotik (antimikrotubul) seperti paclitaxel (Abotaleb et al., 2018).

Antiestrogen merupakan agen kemoterapi golongan hormonal yang bekerja dengan memblokir reseptor estrogen. Contoh obatnya adalah tamoxifen.

Tamoxifen digunakan sebagai pengobatan lini pertama pada kanker payudara yang mengalami metastasis dan diberikan pada pasien pasca-menopause.

Tamoxifen mencegah terjadinya pengikatan estrogen dalam sel kanker (antagonis estrogen, disisi lain tamoxifen menstimulasi estrogen di tulang, hati, dan rahim (agonis estrogen). Namun dalam aplikasinya biasanya disertai dengan peningkatan kadar transaminase, berkeringat, nyeri punggung, peningkatan resiko tromboemboli dan dapat memicu kanker endometrium (Abotaleb et al., 2018).

Agen kemoterapi lainnya yaitu dari golongan antimetabolit seperti doksorubicin. Terdapat dua mekanisme kerja doxorubicin dalam sel kanker yaitu (i) interkalasi ke dalam DNA dan gangguan perbaikan DNA yang dimediasi topoisomerase II dan (ii) pembentukan radikal bebas dan kerusakannya pada membrane sel, DNA, dan protein. Doksorubicin dioksidasi menjadi semiquinone, metabolit yang tidak stabil, yang diubah kembali menjadi doksorubicin dalam proses melepaskan *reactive oxygen species* (ROS). Adanya ROS dapat menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan membran, kerusakan DNA, stress oksidatif, dan memicu jalur apoptosis. Doksorubicin dapat memasuki nukleus dan meracuni topoisomerase II hingga mengakibatkan kerusakan DNA dan kematian sel (Thorn et al., 2011).

2.2. Juwet (*Syzygium cumini*)

2.2.1. Taksonomi

Taksonomi tanaman juwet adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi	: Tracheophyta	
Class	: Magnoliopsida	
Ordo	: Myrtales	
Family	: Myrtaceae	
Genus	: Syzygium	
Spesies	: <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	(GBIF, 2020)

2.2.2. Morfologi

Secara umum, juwet merupakan tanaman yang memiliki batang pendek dan percabangan rendah. Tinggi pohon juwet bisa mencapai sekitar 20 meter.

Batang pohon juwet tidak memiliki banir tetapi percabangannya rapat. Kulit batang dan cabangnya berwarna abu-abu gelap atau kecoklatan. Karakter daun juwet adalah bertipe daun tunggal yang tersusun berhadapan. Bentuk daunnya elips hingga oval dengan warna hijau tua, tepi daunnya rata, meruncing di bagian ujung daun atau melekuk seperti bentuk hati. Daun juwet berukuran sekitar 7-15 cm x 5-9 cm dengan tangkainya sepanjang 1-3,5 cm. karakter bunga juwet yaitu kecil dengan diameter 4-7 mm, kelopak dan mahkota bunga berwarna putih kekuningan, tersusun dalam satu perbungaan yang muncul di ketiak daun pada ujung ranting dan percabangan. Karakter buah juwet yaitu dengan tipe buah buni berbiji satu. Bentuk buahnya yaitu bulat sampai lonjong seperti pada **Gambar**

2.1. Saat sudah masak, buah berwarna merah tua keunguan dengan rasa manis kelat hingga manis (Mudiana & Ariyanti, 2020).



Gambar 2. 1. Buah Juwet (Dokumentasi Pribadi)

2.2.3. Kandungan Kimia

Juwet merupakan tanaman yang mengandung banyak metabolit sekunder diantaranya adalah antosianin, glikosida, asam elagik, isokuersetin, kaemferol, dan *myrecetin*. Pada bijinya mengandung flavonoid yang terkenal sebagai antioksidan dan protein serta kalsium. Daun juwet kaya akan *acylated flavonol glycosides, quercetin, myricetin, triterpenoids, galloyl carboxylase, dan tannin*. Sedangkan pada buahnya, juwet mengandung raffinosa, glukosa, fruktosa, asam sitrat, asam malat, asam galat, antosianin, *delphinidin-3-gentiobioside, malvidin-3-lamaribioside, petunidin-3-gentiobioside cyanidin diglycoside, petunidin* dan *malvidin* (Ayyanar & Subash-Babu, 2012). Buah juwet juga mengandung resveratrol yang memiliki sifat antioksidan, antiinflamasi, antitumor, dan antiaterosklerosis. Efek antikanker yang ada pada resveratrol telah terbukti memodulasi beberapa tahap perkembangan karsinogenik seperti inisiasi, progresi, dan metastasis (Fu et al., 2014).

2.2.4. Aktivitas Antikanker

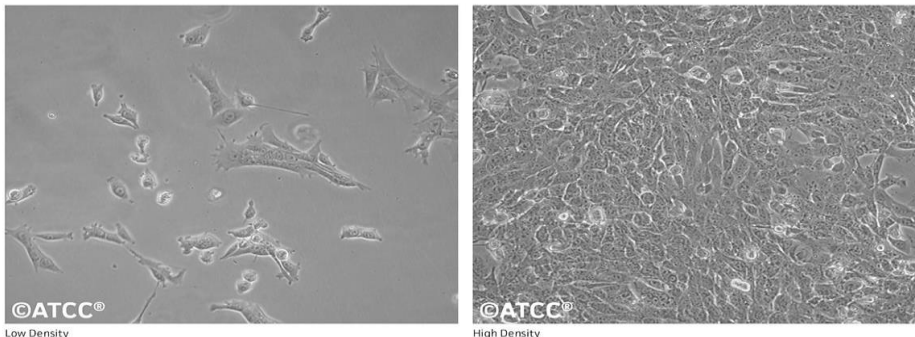
Penelitian mengenai aktivitas antikanker pada tanaman juwet telah banyak dilakukan. Sebuah studi menunjukkan efek pemberian ekstrak metanol buah juwet terhadap kultur sel kanker MCF-7 yaitu pada dosis ekstrak 1000 µg/ml diketahui secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan sel sebanyak 70,12% (Tripathy, 2015). Penelitian lain yang dilakukan yaitu pemberian ekstrak

buah juwet pada *cell line* kanker paru-paru (*human non-small cell lung carcinoma cell line* (A549)) yang menunjukkan adanya aktivitas antiproliferasi yang kuat dengan nilai $IC_{50} = 59 \pm 4 \mu\text{g} / \text{ml}$. Sedangkan pada ekstrak biji juwet diketahui menunjukkan aktivitas antiproliferasi yaitu dengan nilai $IC_{50} = 38 \pm 3 \mu\text{g} / \text{ml}$. Adanya kandungan antosianidin pada buah juwet dan kandungan polifenol pada biji juwet dimungkinkan dapat memberikan efek antiproliferatif pada sel kanker yang berbeda. Efek antiproliferatif dan pro-apoptosis pada buah juwet juga diujikan pada sel kanker payudara estrogen dependent/aromatase positif (MCF-7aro), sel kanker payudara estrogen independent (MDA-MB-231), dan sel kanker payudara normal/non tumorigenic (MCF-10A). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak buah juwet menekan pertumbuhan sel MCF-7aro dengan nilai $IC_{50} = 27 \mu\text{g/ml}$, pada sel kanker MDMB-23 nilai IC_{50} sebesar $40 \mu\text{g/ml}$, dan pada sel kanker payudara MCF-10A hanya menunjukkan efek antiproliferatif dengan nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ (Frauches et al., 2016). Interpretasi nilai IC_{50} adalah sebagai berikut :

- a. Aktivitas sitotoksik tinggi dengan nilai $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$
- b. Aktivitas sitotoksik sedang dengan nilai IC_{50} 20-100 $\mu\text{g/ml}$
- c. Aktivitas sitotoksik lemah dengan nilai IC_{50} 201-500 $\mu\text{g/ml}$
- d. Aktivitas sitotoksik sangat lemah bahkan tidak terdapat efek dengan nilai $IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$ (Sajjadi et al., 2015)

2.3. Sel Kanker Payudara 4T1

ATCC Number: CRL-2539
Designation: 4T1



Gambar 2. 2Kultur Sel Kanker Payudara 4T1 (Sumber: ATCC, 2020)

Sel 4T1 merupakan model sel kanker payudara yang menggambarkan stadium akhir dari kanker payudara karena memiliki karakteristik agresif, metastasis yang kuat, dan imunogenik rendah. Sel 4T1 diisolasi dari sel kanker payudara pada tikus. Karakteristik sel 4T1 ini adalah cepat membelah dan bermetastasis ke beberapa organ seperti hati, paru-paru, kelenjar getah bening, otak, serta tulang (Sztalmachova et al., 2015).

Sel 4T1 merupakan model sel *triple-negative* yaitu yang tidak mengekspresikan reseptor estrogen (ER), reseptor progesterone (PR), dan HER-2 (Hasanah, 2018). *Triple-negative breast cell* (TNBC) tidak responsif terhadap terapi standar dikarenakan sel nya tidak mengekspresikan reseptor tersebut. Hal ini menyebabkan terapi yang diberikan tidak adekuat dan meningkatkan resiko kekambuhan dan kelangsungan hidup pasien TNBC yang rendah (Permana et al., 2019).

2.4. Maserasi

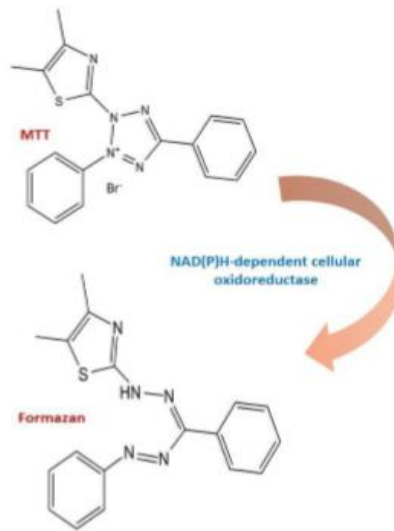
Maserasi merupakan teknik ekstraksi menggunakan pelarut tertentu dengan tujuan menarik senyawa atau zat aktif yang terdapat dalam sampel. Pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan pada kemampuan pelarut tersebut

dalam melarutkan zat aktif secara maksimal sehingga diperoleh ekstrak.

Maserasi dilakukan dengan pengadukan atau pengocokan sampel dengan pelarut kemudian didiamkan sekitar 24 jam pada suhu ruang. Metode ini tidak menggunakan pemanasan sehingga dapat meminimalkan kemungkinan zat aktif atau senyawa pada sampel yang rusak atau terdegradasi. Proses maserasi membutuhkan waktu yang lama dan dalam keadaan diam sehingga dapat memungkinkan banyaknya senyawa yang terekstraksi (Susanty & Bachmid, 2016).

2.5. MTT Assay

Senyawa atau obat baru yang disintesis memerlukan uji sitotoksik untuk memeriksa efeknya pada sel kanker yang dikenal sebagai uji viabilitas sel. Metode yang paling sering digunakan adalah *MTT Assay*. Uji ini menggunakan (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) dan didasarkan pada reduksi MTT (warna kuning) dan pewarna tetrazolium lainnya yang tergantung pada aktivitas metabolisme seluler dari enzim *NADP(H)-dependent cellular oxidoreductase*. Reaksi warna ditunjukkan pada **Gambar 2.3** Sel-sel yang tumbuh dengan cepat akan menunjukkan tingkat reduksi membentuk kristal formazan dan menghasilkan warna ungu. Intensitas warna ungu yang pekat menunjukkan nilai viabilitas sel yang tinggi, sedangkan intensitas warna ungu yang rendah menunjukkan jumlah sel berkurang dan senyawa yang diujikan memiliki efek sitotoksik yang baik (Bahuguna et al., 2017).



Gambar 2. 3. Reduksi MTT menjadi formazan (Bahguna et al, 2017).

Sel yang memiliki metabolisme aktif akan mengubah MTT menjadi Kristal formazan berwarna ungu dengan absorbansi maksimum mendekati 570 nm. Jika sel mati maka sel akan kehilangan kemampuan untuk mengubah MTT menjadi formazan sehingga pembentukan warna ungu merupakan penanda untuk sel yang masih aktif. Produk formazan merupakan produk yang tidak larut dalam air sehingga sebelum dilakukan pembacaan absorbansi perlu untuk dilarutkan dengan pelarut yang sesuai seperti isopropanol, DMSO, dimetilformamida, dan SDS (Riss et al., 2016). Parameter yang dilihat dari MTT Assay adalah nilai *Inhibitory Concentration* 50% (IC_{50}) yang menunjukkan besarnya konsentrasi sampel dalam menghambat pertumbuhan sel sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka efek yang dihasilkan semakin toksik terhadap sel.

2.6. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah teknik kromatografi yang digunakan untuk memisahkan senyawa dalam suatu sampel. Pemisahan senyawa tersebut

didasarkan pada kompetisi ikatan antara zat terlarut dalam sampel (solut) dengan fase gerak dan fase diam. Jika fase diam (silica gel) bersifat polar sedangkan fase gerak bersifat non polar, maka senyawa dalam sampel yang bersifat polar akan memiliki interaksi lebih kuat dengan fase diam. Akibatnya senyawa yang kurang polar akan bergerak lebih tinggi terbawa fase gerak dan menghasilkan nilai Rf yang lebih tinggi. Nilai Rf merupakan hasil yang diperoleh dari membagi jarak yang ditempuh senyawa dari posisi semula dengan jarak yang ditempuh pelarut dari posisi semula (Bele & Khale, 2011).

Beberapa senyawa yang dapat dilakukan identifikasi menggunakan KLT antara lain alkaloid, antrakuinon, terpenoid, tannin, dan flavonoid. Identifikasi senyawa tersebut dilihat dari nilai Rf dan warna noda pada plat silica setelah diberi pereaksi yang sesuai. Identifikasi alkaloid dapat dilihat dengan perubahan warna noda pada plat KLT menjadi coklat atau orange-coklat setelah disemprot dengan reagen Dragendorff. Senyawa antrakuinon dapat diidentifikasi menggunakan KLT dengan pereaksi warna KOH dan noda akan berubah menjadi merah. Identifikasi terpenoid dapat dilakukan dengan memberikan reagen pereaksi anisaldehyd-asam sulfat yang dapat menyebabkan noda pada plat KLT berubah menjadi biru violet (Wagner & Bladt, 1996). Kandungan flavonoid dapat diidentifikasi menggunakan KLT dengan penambahan pereaksi seperti amoniak, NaOH, $AlCl_3$, sitroborat akan memberikan warna kuning (Mulyani & Laksana, 2011). Identifikasi tannin menggunakan KLT dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi $FeCl_3$ yang akan menghasilkan noda berwarna coklat (Sonam et al., 2017).

2.7 *Micrplate Reader*

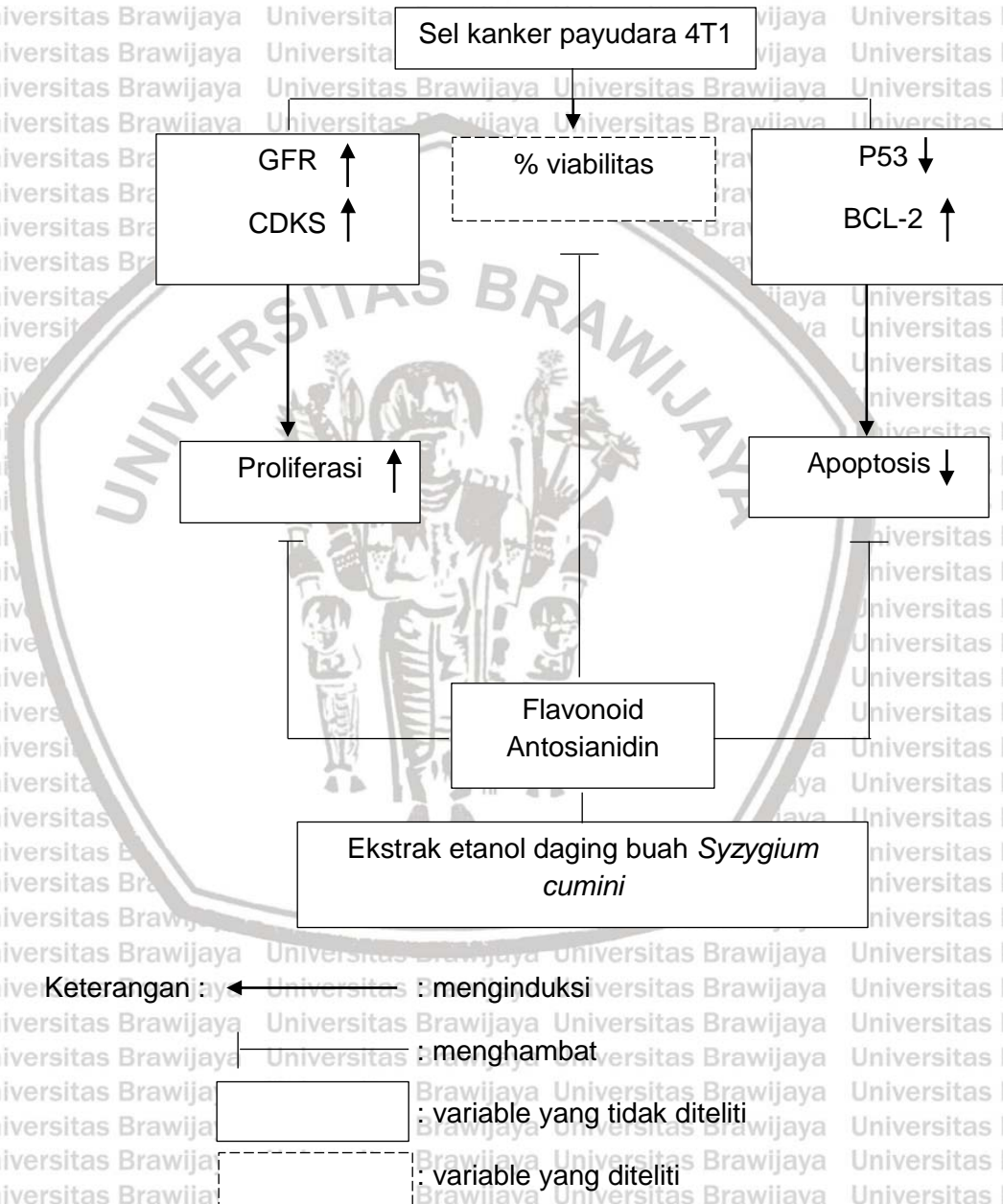
Microplate reader merupakan instrumen laboratorium yang digunakan untuk reaksi kimia, biologis maupun fisik, sifat, dan analit dalam *microplate well*. Mikroplate terdiri dari sumuran kecil tempat terjadinya reaksi. reaksi ini mengubah adanya analit atau proses biokimia menjadi sinyal optik. Pengukuran menggunakan *microplate reader* mendeteksi sinyal cahaya yang dihasilkan oleh sampel dan diukur dengan detektor, biasanya digunakan *photomultiplier tube* (PMT) (Labtech, 2020).

Microplate reader memiliki prinsip kerja yang mirip dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu apabila terdapat sinar yang melewati sampel dan mengenai elektron-elektron, maka elektron-elektron tersebut akan terkesitasi dari keadaan dasar ke tingkat yang lebih tinggi dan dinyatakan sebagai panjang gelombang dan absorbansi (Suhartati, 2017) . Berbeda dengan spektrofotometer konvensional yang memfasilitasi pembacaan pada berbagai panjang gelombang, *microplate reader* memiliki filter atau kisi difraksi yang membatasinya umunya antara 400 hingga 750 nm. Berkas cahaya yang melewati sampel memiliki diameter antara 1-3 mm. Sistem deteksi mendekteksi cahaya yang datang dari sampel, memperkuat sinyal, dan menentukan absorbansi sampel. Sistem kemudian akan mengubahnya menjadi data yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil tes (WHO, 2008).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep



Gambar 3. 1. Kerangka Konsep Penelitian

Sel kanker memiliki kemampuan dalam berkembang dan memperbanyak diri secara abnormal. Sel kanker mempunyai karakteristik peningkatan proliferasi dan penurunan apoptosis yang diperantarai oleh peningkatan protein antiapoptosis Bcl-2 dan penurunan p53 dimana gen p53 merupakan salah satu gen penekan tumor yang paling sering bermutasi. Selain itu adanya peningkatan sensitivitas GFR dan peningkatan aktivitas CDKS dapat meningkatkan proliferasi sel.

Buah juwet memiliki beberapa senyawa metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan untuk membantu menurunkan proses perkembangan sel kanker tersebut. Kandungan antosianidin dan flavonoid diduga dapat menghambat proliferasi dan meningkatkan apoptosis sel kanker dengan meningkatkan ekspresi gen p53 dan menurunkan ekspresi CDK2. Berdasarkan penjelasan tersebut maka dilakukan uji sitotoksik ekstrak etanol buah juwet dengan metode MTT assay yang dilihat berdasarkan % viabilitas sel.

3.2. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah ekstrak etanol daging buah juwet (*Syzygium cumini*) memiliki efek sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara 4T1 yang dilihat dari nilai % viabilitas sel dan terdapat hubungan antara kenaikan konsentrasi ekstrak dengan penurunan % viabilitas sel.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vitro* di laboratorium dengan *post only control group design* sehingga dapat diketahui efek ekstrak etanol buah juwet (*Syzygium cumini*) pada kultur sel 4T1.

4.2. Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian adalah sel 4T1 yang merupakan model sel kanker payudara yang dikultur. Sel 4T1 diperoleh dari Laboratorium Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Universitas Gadjah Mada.

4.3. Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian adalah konsenrasi senyawa ekstrak buah juwet (*Syzygium cumini*). Variabel terikat dalam penelitian yaitu % viabilitas sel dan IC_{50} . Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah sel 4T1, media pertumbuhan sel, suhu inkubasi sel 4T1, dan lama inkubasi sel 4T1.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Ekstraksi buah juwet (*Syzygium cumini*) dilakukan di Laboratorium Farmasi Divisi Bahan Alam Farmasi FKUB. Kultur sel 4T1 dan pemberian perlakuan dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya.

Waktu penelitian dibagi menjadi 2 bagian yaitu proses ekstraksi dilakukan pada bulan Oktober 2019 dan uji MTT Assay dilakukan pada bulan Juli 2020-September 2020.

4.5. Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1. Ekstraksi *Syzygium cumini*

4.5.1.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah buah juwet (*Syzygium cumini*), etanol 96% pa, n-heksana pa, etil asetat pa, aquades, dan kertas saring. Buah *Syzygium cumini* didapatkan dari kota Surabaya.

4.5.1.2. Alat

Alat yang digunakan adalah *overhead stirrer* (IKA®), *rotary evaporator* (IKA®), oven (Memmert®), corong kaca, toples kaca, neraca analitik (Ohaus®) dan batang pengaduk.

4.5.2. Skrining Fitokomia

4.5.2.1. Bahan

Bahan yang digunakan pada proses skrining fitokimia adalah ekstrak etanol buah juwet (*Syzygium cumini*), etanol 96% pa, aseton, asam formiat, reagen anisaldehyd asam sulfat, asam asetat glasial, asam sulfat konsentrat, etil asetat, aquades, KOH, n-butanol, AlCl₃, FeCl₃, dan reagen *dragendroff*.

4.5.2.2. Alat

Alat yang digunakan yaitu plat KLT (MERCK®), kertas saring, *chamber*, pinset, pipet volume, pipa kapiler, kaca persegi, hot plate (IKA®), vial.

4.5.3. Kultur Sel 4T1

4.5.3.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam proses kultur adalah serbuk DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*) *high glucose* (#12800017, Gibco®, USA), WFI,

HEPES (Gibco®), NaHCO₃, HCl, NaOH, penisilin-streptomisin, fetal bovine serum (FBS) qualified (#BCBW5652, Sigma®, USA), phosphate buffer saline (PBS), tripsin-EDTA (#25200056, Gibco®, Canada), dimetil sulfoksida (DMSO), dan tip mikropipet.

4.5.3.2. Alat

Alat yang digunakan dalam proses kultur adalah *culture flask* (SPL), *conical tube* 15mL (Falcon), *conical tube* 50mL (Falcon), spuit 10mL (OneMed), mikropipet 100-1000µL (Dragon-med®), mikropipet 20-200µL (Dragon-med®), membrane filter 0,22 mikron (Minisart®), *sentrifuge*, sonikator, timbangan analitik (Ohaus), *mikroskop inverted* (Olympus), hemasitometer (Assistent), mikrotube, rak tabung, *96-well plate* (costar®), *scraper*, *counter*, dan pHmeter.

4.5.4. Uji Sitotoksik dengan MTT Assay

4.5.4.1 Bahan

Bahan yang digunakan untuk proses uji sitotoksik adalah ekstrak etanol buah juwet (*Syzygium cumini*), media kultur lengkap (MKL DMEM), DMSO, *phosphate buffer saline* (PBS), reagen MTT (Thermo Fisher®), tip mikropipet, tripan blue.

4.5.4.2 Alat

Alat yang digunakan untuk proses uji sitotoksik adalah mikropipet (dragon-med®), mikrotube, *96-well plate* (Costar®), *conical tube* (Falcon), rak *conical tube*, *mikroskop inverted* (Olympus), timbangan analitik (Ohaus), *counter*, membran filter 0,22 mikron, spuit (Onemed), dan ELISA reader.

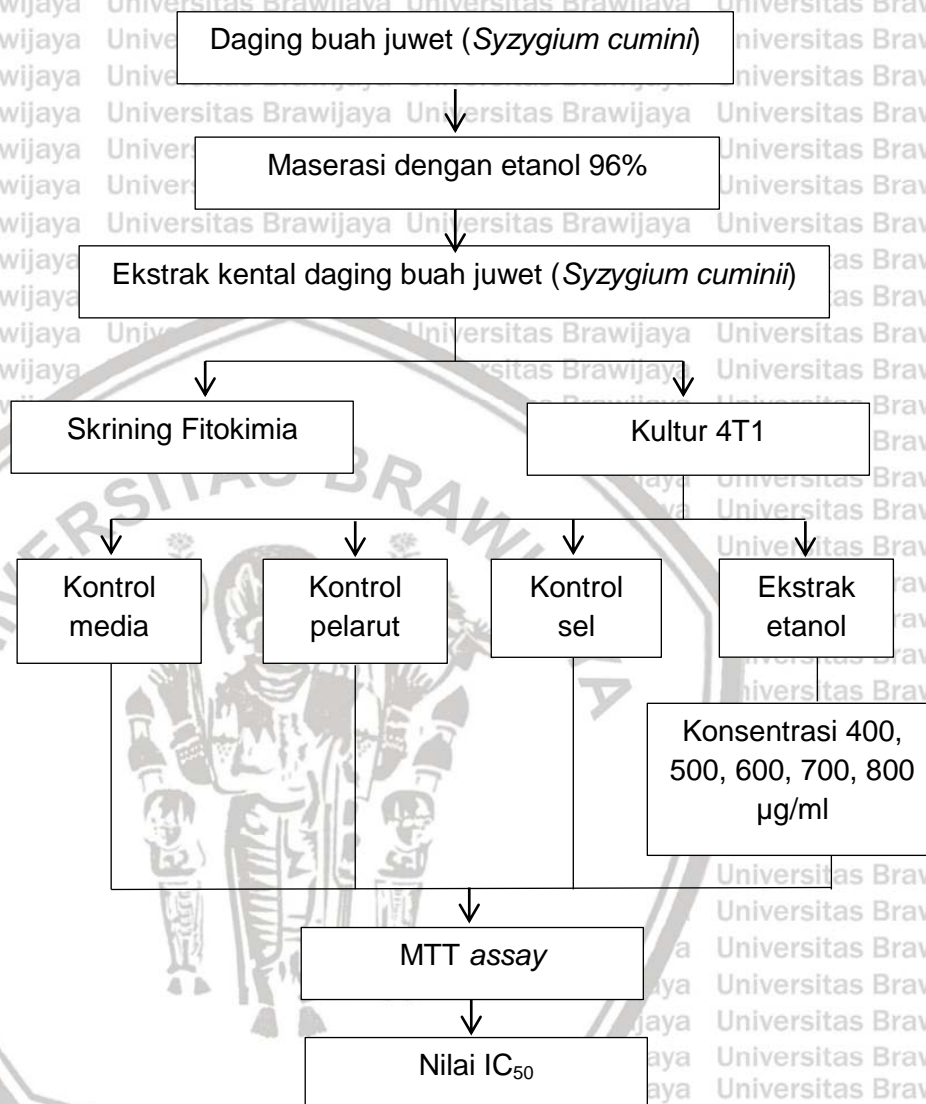
4.6. Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah

1. Sel 4T1 adalah sel kanker payudara yang digunakan sebagai subjek dalam penelitian dan diperoleh dari Laboratorium *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Universitas Gadjah Mada.
2. Ekstrak buah juwet (*Syzygium cumini*) diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
3. Maserasi adalah metode perendaman sampel pada temperature kamar menggunakan pelarut yang sesuai, menggunakan pengadukan, dan penyaringan berulang kali dalam suhu ruang.
4. Prinsip MTT Assay yaitu adanya reduksi garam tetrazolium oleh sistem reduktase membentuk kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Pemberian reagen stopper akan menyebabkan kristal tersebut larut air dan selanjutnya dapat diukur absorbansinya menggunakan ELISA *reader*. Semakin tinggi intensitas warna ungu maka jumlah sel hidup semakin banyak.
5. IC_{50} adalah dosis ekstrak dari pengujian MTT yang mampu membunuh sebanyak 50% dari sel kultur 4T1.
6. Persentase viabilitas sel adalah jumlah yang terukur dari sel hidup. Persentase viabilitas sel diperoleh dari pembacaan *microplate reader* berupa nilai absorbansi yang kemudian dilakukan perhitungan ke dalam rumus dan diperoleh hasil dalam bentuk persen.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Alur Penelitian



Gambar 4. 1. Alur Penelitian

4.7.2. Ekstraksi *Syzygium cumini*

Prosedur ekstraksi daging buah juwet (*Syzygium cumini*) dengan metode maserasi dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Ditimbang 250 g daging buah *Syzygium cumini*
2. Disiapkan etanol 96% sebanyak 2500 mL
3. Dilakukan maserasi I dengan etanol 1000 mL

4. Diaduk dengan menggunakan *overhead stirrer* 100 rpm selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam
5. Hasil rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring
6. Filtrate diambil, residu ampas dimaserasi kembali
7. Dilakukan maserasi II dengan etanol 1000 mL
8. Diaduk dengan menggunakan *overhead stirrer* 100 rpm selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam
9. Hasil rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring
10. Filtrat diambil, residu ampas dimaserasi kembali
11. Dilakukan maserasi III dengan etanol 500 mL
12. Diaduk dengan menggunakan *overhead stirrer* 100 rpm selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam
13. Hasil rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring
14. Hasil saringan (filtrat) diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan kecepatan 80 rpm
15. Dikeringkan pada suhu 37°C
16. Diperoleh ekstrak kental *Syzygium cumini*

4.7.3. Skrining Fitokimia

4.7.3.1. Identifikasi Fenol

Prosedur identifikasi senyawa fenol dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Disiapkan plat KLT silica GF 254 nm dengan ukuran 3x10 cm serta kertas saring 3x10 cm
2. Dibuat fase gerak sebanyak 10 mL dengan perbandingan etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25)
3. Fase gerak dijenuhkan dengan menggunakan kertas saring

4. Masing-masing sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml
5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (4 μ l)
6. Plat KLT dieluasi dengan menggunakan fase gerak yang telah dibuat
7. Dikeringkan plat KLT yang telah dieluasi, kemudian diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm
8. Disemprot dengan penampak noda FeCl_3
9. Diamati kembali pada sinar tampak dan UV 366 nm
10. Hasil positif ditunjukkan dengan noda berwarna hitam pada sinar UV 254 nm dan sinar tampak
11. Dihitung Rf masing-masing noda

4.7.3.2. Identifikasi Senyawa Tanin

Prosedur identifikasi senyawa tannin dijelaskan dalam tahap-tahap berikut :

1. Sampel ekstrak ditimbang sebanyak 20 mg
2. dilarutkan dalam 4 ml etanol
3. Dibagi menjadi 2 tabung reaksi dan diberi label A sebagai kontrol B yang dilakukan uji
4. Ditetaskan gelatin ke dalam tabung reaksi B
5. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna putih

4.7.3.3. Identifikasi Senyawa Alkaloid

Prosedur identifikasi senyawa alkaloid dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Disiapkan plat KLT silica GF 254 nm dengan ukuran 3x10 cm serta kertas saring 3x10 cm
2. Dibuat fase gerak sebanyak 10 ml dengan perbandingan etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25)
3. Fase gerak dijenuhkan dengan menggunakan kertas saring
4. Masing-masing sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml
5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (4 μ l)
6. Plat KLT dieluasi dengan menggunakan fase gerak yang telah dibuat
7. Dikeringkan plat KLT yang telah dieluasi, kemudian diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm
8. Disemprot dengan penampak noda *dragendorff*
9. Hasil positif ditunjukkan dengan noda berwarna oranye pada pengamatan sinar tampak
10. Dihitung Rf masing-masing noda

4.7.3.4. Identifikasi Senyawa Steroid

Prosedur identifikasi senyawa steroid dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Disiapkan plat KLT silica GF 254 nm dengan ukuran 3x10 cm serta kertas saring 3x10 cm
2. Dibuat fase gerak sebanyak 10 ml dengan perbandingan etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25)
3. Fase gerak dijenuhkan dengan menggunakan kertas saring
4. Masing-masing sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml

5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (4 μ l)
6. Plat KLT diekspansi dengan menggunakan fase gerak yang telah dibuat
7. Dikeringkan plat KLT yang telah diekspansi, kemudian diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm
8. Disemprot dengan penampak noda Lieberman-Burchard
9. Diamati kembali pada sinar tampak dan 366 nm
10. Hasil positif ditunjukkan dengan noda berwarna biru setelah diberi penampak noda dan diamati pada sinar tampak
11. Dihitung Rf masing-masing noda

4.7.3.5. Identifikasi Senyawa Terpenoid

Prosedur identifikasi senyawa terpenoid dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Disiapkan plat KLT silica GF 254 nm dengan ukuran 3x10 cm serta kertas saring 3x10 cm
2. Dibuat fase gerak sebanyak 10 ml dengan perbandingan atil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25)
3. Fase gerak dituangkan dengan menggunakan kertas saring
4. Masing-masing sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml
5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (4 μ l)
6. Plat KLT diekspansi dengan menggunakan fase gerak yang telah dibuat
7. Dikeringkan plat KLT yang telah diekspansi, kemudian diamati dibawah sinar tampak, sinar UV 254 dan 366 nm
8. Disemprot dengan penampak noda H_2SO_4

9. Diamati kembali pada UV 366 nm dan sinar tampak
10. Hasil positif ditunjukkan dengan noda berwarna ungu setelah diberi penampak noda dan diamati pada sinar tampak
11. Dihitung Rf masing-masing noda

4.7.3.6. Identifikasi Senyawa Saponin

Prosedur identifikasi senyawa saponin dijelaskan dalam tahap-tahap berikut :

1. Sampel ditimbang sebanyak 10 mg
2. Dilarutkan dalam 2 ml aquades
3. Dipindahkan ke tabung reaksi dan dikocok selama 3 menit
4. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya buih setelah dikocok dan stabil selama 10 menit

4.7.3.7. Identifikasi Senyawa Flavonoid

Prosedur identifikasi senyawa flavonoid dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Disiapkan plat KLT silica GF 254 nm dengan ukuran 3x10 cm serta kertas saring 3x10 cm
2. Dibuat fase gerak sebanyak 10 ml dengan perbandingan etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25)
3. Fase gerak dijenuhkan dengan menggunakan kertas saring
4. Masing-masing sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml
5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (4 μ l)
6. Plat KLT dieluasi dengan menggunakan fase gerak yang telah dibuat

7. Dikeringkan plat KLT yang telah dieluasi, kemudian diamati di sinar UV 254 nm dan 366 nm
8. Disemprot dengan reagen $AlCl_3$
9. Diamati kembali pada sinar tampak dan UV 366 nm
10. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna kuning pada pengamatan sinar tampak
11. Dihitung Rf masing-masing noda

4.7.3.8. Identifikasi Senyawa Antrakuinon

Prosedur identifikasi senyawa antrakuinon dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Disiapkan plat KLT silica GF 254 nm dengan ukuran 3x10 cm serta kertas saring 3x10 cm
2. Dibuat fase gerak sebanyak 10 ml dengan perbandingan etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25)
3. Fase gerak dijenuhkan dengan menggunakan kertas saring
4. Masing-masing sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml
5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (2 μ l)
6. Plat KLT dieluasi dengan menggunakan fase gerak yang telah dibuat
7. Dikeringkan plat KLT yang telah dieluasi, kemudian diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm
8. Disemprot dengan penampak noda KOH
9. Diamati kembali pada sinar tampak

10. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya noda berwarna oranye kecoklatan setelah diberi penampak noda dan diamati pada sinar tampak

11. Dihitung Rf masing-masing noda

4.7.3.9. Identifikasi Senyawa Antosianin

Prosedur identifikasi senyawa antosianin dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Disiapkan plat KLT silica GF 254 nm dengan ukuran 1x10 cm serta kertas saring 1x10 cm
2. Dibuat fase gerak sebanyak 10 ml dengan perbandingan n-butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5)
3. Fase gerak dijenuhkan dengan menggunakan kertas saring
4. Masing-masing sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml
5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (4 μ l)
6. Plat KLT dieluasi dengan menggunakan fase gerak yang telah dibuat
7. Dikeringkan plat KLT yang telah dieluasi, kemudian diamati dibawah sinar UV 254, 366 nm dan sinar tampak
8. Hasil positif ditunjukkan dengan noda berwarna merah keunguan pada sinar tampak
9. Dihitung Rf masing-masing noda

4.7.4. Kultur Sel 4T1

4.7.4.1. Preparasi Media Kultur DMEM *High Glucose*

Prosedur preparasi media kultur DMEM *High Glucose* dijelaskan dalam tahap-tahap berikut :

1. Ditimbang serbuk DMEM *High Glucose* sebanyak 1,35 gram
2. Ditimbang serbuk NaHCO₃ sebanyak 0,37 gram
3. Serbuk DMEM dicampur dengan serbuk NaHCO₃ ke dalam *conical tube* 50ml
4. Ditambahkan HEPES 1M sebanyak 1ml
5. Ditambahkan WFI ad 50 ml dan dihomogenkan
6. Media dibagi ke dalam 2 *conical tube* 50ml
7. Masing-masing media dalam *conical tube* ditambahkan WFI ad 50 ml
8. Dilakukan adjust pH dengan menambahkan NaOH 1N atau HCl 1N hingga didapatkan pH 7,4-7,6
9. Media disterilkan dengan menggunakan membrane filter 0,22 mikron kemudian dimasukkan dalam *conical tube* dan disimpan di kulkas dengan suhu 4°C

4.7.4.2. Preparasi Media Kultur Lengkap

Komposisi media yang digunakan adalah :

Penisilin-Streptomisin	0,75 ml (1,5%)
Fetal Bovine Serum (FBS) qualified	5 ml (10%)
Media (DMEM)	ad 50 ml (100%)

Prosedur preparasi media dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Dicairkan FBS dan Penisilin-Streptomisin pada suhu kamar 25°C

2. Alat dan bahan yang akan digunakan disemprot dengan alcohol 70% sebelum dimasukkan ke dalam *laminar air flow* (LAF).
3. Diambil 5 ml FBS dengan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube*
4. Ditambahkan dengan Penisilin-Streptomisin sebanyak 0,75ml
5. Ditambahkan media DMEM ad 50ml
6. Dilakukan *adjust* pH dengan penambahan HCl atau NaOH hingga diperoleh pH 7,4-7,6.
7. Media kultur lengkap kemudian disaring dengan membrane filter 0,22 mikron
8. Dimasukkan ke dalam *conical tube* baru dan disimpan dalam kulkas suhu 4°C.

4.7.4.3. Penggantian Media

Prosedur penggantian media dijelaskan dalam tahap-tahap berikut :

1. Disiapkan PBS di *conical tube*
2. Dibuang media lama pada *culture flask* menggunakan spuit 10ml
3. Dicuci *culture flask* dengan menambahkan PBS steril sebanyak 4 ml/flask
4. *Culture flask* digeser-geser ke kanan dan kiri kemudian dibuang menggunakan spuit 10ml.
5. Proses pencucian dengan PBS dilakukan 2x
6. Ditambahkan MKL steril sebanyak 5 ml/flask. Dihomogenkan dan diamati kondisi sel serta jumlah sel secara kualitatif pada mikroskop inverted
7. Diinkubasi selama 24 jam dan diganti media kembali jika warna media berubah menjadi merah pucat atau saat sel kotor

8. Diamati keadaan sel sebelum dan sesudah penggantian media dan dilakukan dokumentasi.

4.7.4.4. Penumbuhan Sel (*Cell Thawing*)

Prosedur penumbuhan sel dijabarkan dalam tahap-tahap berikut:

1. Alat dan bahan yang akan digunakan disemprot dengan alcohol 70 sebelum dimasukkan ke dalam LAF
2. Diambil flask/*cryotube* yang berisi sel dari *freezer* suhu -80°C kemudian dicairkan pada suhu ruang
3. Dimasukkan MKL steril sebanyak 3 ml ke dalam *conical tube* 15 ml
4. Diambil *suspense* sel sebanyak 1000 μl dari *cryotube* dan dimasukkan ke dalam MKL yang telah disiapkan di *conical tube*
5. Tutup rapat *conical tube* dan kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit.
6. Jika belum terlihat ada endapan pellet, maka sentrifugasi ditambah 5 menit
7. Kembali ke LAF, *conical tube* berisi MKL dan sel disemprot dengan alcohol 70% sebelum dimasukkan dalam LAF
8. Dibuang supernatant
9. Kembali ke dalam LAF, disemprot *conical tube* dan tangan dengan alkohol 70%
10. Dibuang supernatant dan ditambahkan MKL steril baru sebanyak 4 ml dan dihomogenkan
11. Dipindahkan ke dalam 2 *culture flask* dengan jumlah yang sama
12. Ditambahkan masing-masing 5ml MKL steril ke dalam *culture flask* kemudian dihomogenkan

13. Diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*

14. Disimpan dalam inkubator

4.7.4.5. Panen Kultur Sel

Prosedur panen kultur sel dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Diambil sel dari inkubator CO₂, amati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen

2. Dibuang media dengan spuit 10 ml

3. Sel dicuci dengan PBS sebanyak 4 ml kemudian *culture flask* digoyang-goyangkan untuk mencuci sel

4. Dibuang PBS dengan spuit 10 ml dan diulangi pencucian dengan PBS kembali

5. Ditambahkan 1ml tripsin-EDTA secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 2 menit

6. Dikeluarkan *culture flask* dari incubator dan dilakukan *scrap* selama 1 menit

7. Ditambahkan MKL steril sebanyak 5 ml untuk menginaktifkan tripsin-EDTA

8. Sel diresuspensi dengan pipet volum 10 ml hingga tidak menggerombol

9. Diamati keadaan sel dengan mikroskop dan diresuspensi kembali jika masih ada sel yang bergerombol

10. Ditransfer sel yang sudah tidak bergerombol ke dalam *conical tube* baru menggunakan pipet volum 10 ml

11. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit

12. Supernatan dibuang dan ditambah MKL steril sebanyak 4ml

13. Dihomogekan dengan mikropipet

14. Dibagi ke dalam 2 *culture flask* baru dan masing-masing *culture flask* ditambah MKL steril sebanyak 4ml

15. *Culture flask* kemudian disimpan dalam inkubator

4.7.4.6. Cryopreservation

Prosedur *cryopreservation* dijelaskan dalam tahap-tahap berikut :

1. Disiapkan kultur sel yang akan dilakukan *cryopreservation*
2. Disiapkan *cryotube*
3. Sel diberi perlakuan seperti panen sel hingga pada tahap sentrifugasi
4. Supernatant dibuang
5. Ditambahkan MKL steril sebanyak 1ml
6. Dihomogenkan dengan mikropipet
7. Dibuat media steril baru *cryopreservation* di conical tube dengan komposisi sebagai berikut :
 - a. Diambil 0,5 ml FBS 10% dan dimasukkan dalam *conical tube*
 - b. Ditambahkan 0,5 ml DMSO 10%
 - c. Ditambahkan MKL steril ad 5 ml
8. Ditambahkan media baru tersebut ke *conical tube*
9. Dihomogenkan dengan mikropipet
10. Dibagi ke dalam *cryotube* dan diberi tanda nama sel dan tanggal pembuatan
11. Disimpan dalam *Mr. Frozti* selama 24 jam kemudian dipindahkan ke freezer -80°C

4.7.4.7. Perhitungan Sel

Prosedur perhitungan sel dijelaskan dalam tahap berikut:

1. Dilakukan resuspensi sel di *conical tube* dari hasil panen sel (seperti prosedur panen sel hingga metode sentrifugasi)
2. Diambil panen sel sebanyak 10 µl dan dimasukkan dalam mikrotube
3. Ditambahkan 10 µl *tripan blue*
4. Dilakukan homogenisasi dengan mikropipet
5. Diteteskan pada hemasitometer
6. Dilakukan perhitungan sel dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*.

Cara perhitungan sel dijelaskan seperti berikut :

- Sel yang dihitung yaitu yang berada pada 4 kamar hemasitometer (16 kotak tiap kamar)

- Dihitung juga sel yang berada pada batas kiri dan batas bawah
- Sel yang berwarna gelap atau mati dan sel yang berada di batas luar di sebelah atas dan sebelah kanan tidak dihitung

- Jumlah sel terhitung/ml =

$$\frac{\Sigma \text{sel kamar A} + \Sigma \text{sel kamar B} + \Sigma \text{sel kamar C} + \Sigma \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

- Dihitung jumlah total sel yang diperlukan

- Dihitung volume panen sel yang diperlukan (dalam ml) dengan rumus berikut :

- Volume panen sel yang ditransfer : $\frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/ml}}$

7. Dilakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam *conical tube* baru dan ditambahkan 5-7 MKL steril atau dapat dilakukan penanaman sel
8. Sisa suspensi sel dilakukan *cryopreservation* atau dilakukan subkultur

4.7.4.8. Preparasi Sampel

Prosedur preparasi sampel dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini

1. Dibuat 5 seri konsentrasi dengan rentang 400-800 ppm dengan rumus :

$$f = \sqrt[n-1]{Dt/Dr} \rightarrow f = \sqrt[5-1]{800/400} \rightarrow f = \sqrt[4]{2} \rightarrow f = 1,2$$

keterangan : n = banyaknya dosis

Dt = dosis tertinggi

Dr = dosis terendah

Sehingga diperoleh seri konsentrasi yaitu 400, 500, 600, 700, dan 800 ppm. Volume akhir tiap seri konsentrasi untuk perlakuan minimal adalah 1000 μ l (100 μ l/sumuran, 5x replikasi)

2. Ditimbang sampel kurang lebih 5 mg dengan seksama di dalam gelas arloji
3. Diuji kelarutan dalam aquades 5ml kemudian disonikasi pada suhu 40°C selama 10 menit, jika tidak larut pada suhu dinaikkan menjadi 50°C selama 5-10 menit
4. Dibuat stok baru sampel dalam pelarut campur setiap kali akan digunakan untuk perlakuan
5. Dibuat seri kadar sampel dengan pengenceran stok dalam pelarut campur menggunakan MKL
6. Prosedur pengenceran sampel (1000 μ g/ml = 1000 ppm = 1000mg/ml = 10mg/10ml)
 - a. Ditimbang sebanyak 10 mg sampel dalam botol timbang dan dilarutkan dalam pelarut campur sebanyak 10ml sehingga didapatkan konsentrasi sampel yaitu 1000 mg/L

b. Dilakukan pengenceran menjadi 400, 500, 600, 700, dan 800

µg/ml dengan cara

c. Perhitungan :

d. $1000 \mu\text{g/ml} = 1000 \text{ ppm} = 1000 \text{ mg/L} = 10 \text{ mg/ml}$

▪ Pengenceran 800 µg/ml

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 800 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 800 \mu\text{l}$$

▪ Pengenceran 700 µg/ml

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 700 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 700 \mu\text{l}$$

▪ Pengenceran 600 µg/ml

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 600 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 600 \mu\text{l}$$

▪ Pengenceran 500 µg/ml

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 500 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

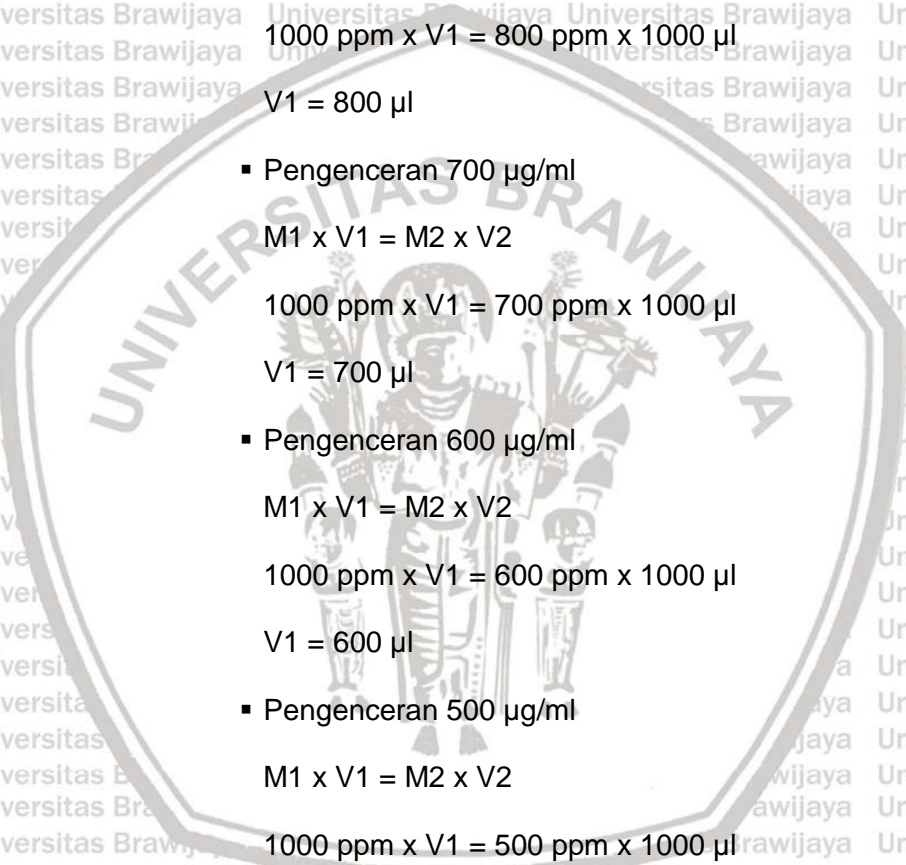
$$V_1 = 500 \mu\text{l}$$

▪ Pengenceran 400 µg/ml

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 400 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 400 \mu\text{l}$$



4.7.5. Uji Sitotoksik Metode MTT assay

Prosedur uji sitotoksik dengan MTT assay dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Diambil sel dari inkubator CO₂
2. Ditransfer sel ke dalam sumuran 96 *well plate*, masing-masing 5×10^3 dengan cara :
 - Tiap ml kebutuhan sel ditambahkan MKL ad 1,5ml sebanyak 5 agar distribusi sel lebih homogen
 - Tiap sumuran mengandung campuran sebanyak 100 μ l
3. Dilakukan resuspensi sel kembali setiap mengisi 6 sumuran agar tetap homogen
4. Disisakan sebanyak 10 sumuran kosong sebagai kontrol media dan blanko
5. Keadaan sel diamati pada mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel dan dilakukan pendokumentasian
6. Diinkubasi sel di dalam inkubator selama minimal 4 jam
7. Jika sel belum attach maka diinkubasi kembali maksimal 24 jam
8. Dibuang media sel dengan mikropipet 100-1000 μ l
9. Dimasukkan 100 μ l PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS seperti (8)
10. Dimasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran
11. Diinkubasi sel didalam inkubator CO₂ selama 24 jam
12. Didokumentasikan kondisi sel menjelang akhir waktu inkubasi
13. Disiapkan reagen MTT untuk perlakuan (5 mg/ml) dengan cara :

- Dibuat stok MTT dengan menimbang serbuk MTT sebanyak 5 mg, dilarutkan dalam PBS ad 1 ml, kemudian ditutup dengan aluminium foil dan disimpan dalam freezer
- 1ml stok MTT dalam PBS (5 mg/ml) diencerkan dengan MKL ad 10ml (untuk 1 buah 96 well plate)

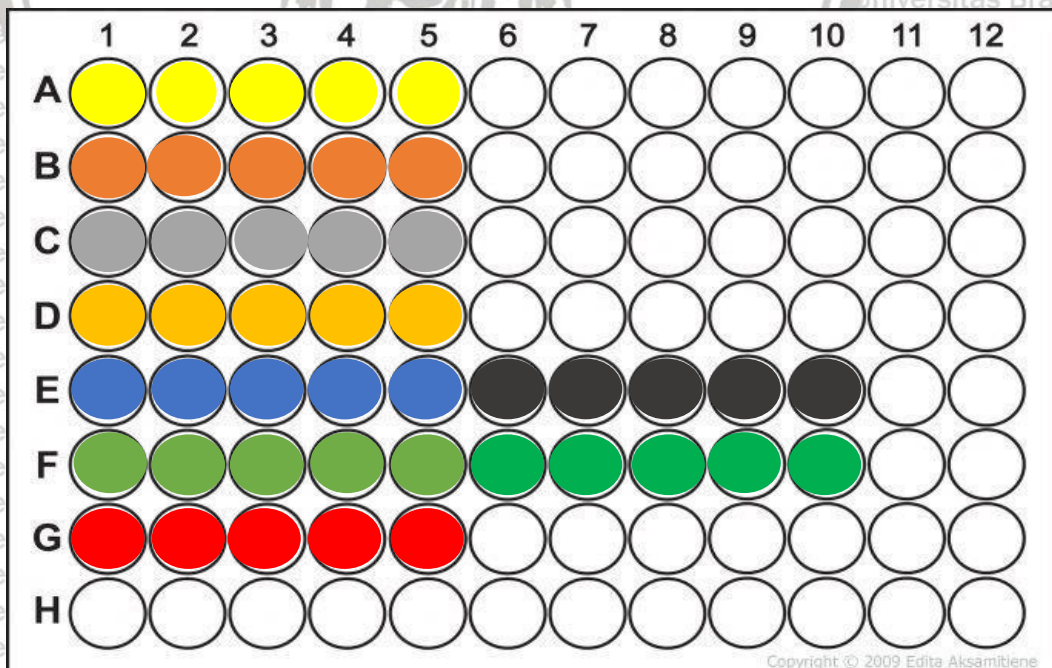
14. Dibuang media sel, cuci PBS (8) dan ditambah reagen MTT 100 μ l ke setiap sumuran, termasuk kontrol media

15. Diinkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator CO₂

16. Diperiksa kondisi sel dengan mikroskop inverted. Jika sudah terbentuk formazan dengan jelas, ditambahkan stopper DMSO sebanyak 100 μ l tiap sumuran

17. Well-plate dapat diukur menggunakan ELISA reader

18. Berikut adalah design plate yang digunakan



Keterangan :

- | | | | |
|---|-------------------|---|-------------------|
|  | Kontrol sel |  | Ekstrak 700 µg/ml |
|  | Kontrol pelarut |  | Ekstrak 800 µg/ml |
|  | Ekstrak 400 µg/ml |  | Kontrol media |
|  | Ekstrak 500 µg/ml |  | Blanko |
|  | Ekstrak 600 µg/ml | | |

Gambar 4. 2. Denah MTT Assay.

4.7.6. Pengukuran dengan ELISA Reader

Prosedur pengukuran dengan ELISA reader dijelaskan dalam tahap-tahap berikut

1. Dihidupkan ELISA reader, tunggu proses progressing hingga selesai
2. Dibuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Dimasukkan ke dalam ELISA reader. Dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan $\lambda = 595 \text{ nm}$
3. Ditekan tombol START
4. Dimatikan kembali ELISA reader
5. Dibuat grafik absorbansi
6. Dihitung prosentase sel hidup

Jika absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel

$$\frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Jika absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel

$$\frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol pelarut} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

4.7.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil MTT Assay adalah berupa absorbansi.

Hasil absorbansi tersebut kemudian dilakukan perhitungan dengan rumus yang sudah ditentukan dalam *Microsoft Excel* sehingga didapatkan nilai % viabilitas dan nilai IC_{50} . Selanjutnya dapat ditentukan efek sitotoksik ekstrak etanol daging buah juwet termasuk tinggi atau rendah. Kemudian dilakukan uji normalitas data dan uji korelasi Pearson menggunakan SPSS untuk mengetahui adanya hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan % viabilitas sel.

4.7.7.1. Perhitungan IC_{50}

Prosedur perhitungan IC_{50} dijelaskan dalam tahapan berikut :

1. Dilihat terlebih dahulu apakah absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari kontrol sel atau sama dengan kontrol sel. Jika absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel maka hitung prosentase sel hidup dengan rumus berikut :
$$\frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}) \times 100\%}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})}$$

Jika absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel maka hitung prosentase sel hidup dengan rumus berikut :

$$\frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}) \times 100\%}{(\text{absorbansi kontrol pelarut} - \text{absorbansi kontrol media})}$$

2. Dibuat grafik log konsentrasi vs prosentase sel hidup dengan *chart type scatter* dan *chart subtype compare pairs of values*.
3. Cari persamaan regresi linier dari grafik tersebut dengan menambahkan *add trendline*-regresi linier
4. Dilihat parameter r pada persamaan regresi linier. Jika r lebih besar dari r table maka persamaan regresi linier memenuhi standar untuk mencari

IC_{50} .

5. Dimasukkan $y = 50\%$ pada persamaan regresi linier dan cari x nya kemudian dihitung antilog dari konsentrasi tersebut sehingga diperoleh

IC_{50} .



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1. Hasil Ekstraksi Daging Buah Juwet (*Syzygium cumini*)

Daging buah juwet (*Syzygium cumini*) sebanyak 250 g diekstraksi hingga diperoleh ekstrak etanol kental dengan berat sebanyak 53,64 gram dan % rendemen sebesar 21,46%. Ekstrak kental tersebut memiliki karakteristik organoleptis yaitu berwarna ungu, bertekstur kental, dan berbau khas yang ditunjukkan seperti **Gambar 5.1**



Gambar 5. 1. Ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* (dokumentasi pribadi)

5.2. Hasil Skrining Fitokimia

Ekstrak yang telah didapatkan kemudian dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak daging buah *Syzygium cumini*. Proses skrining fitokimia diawali dengan optimasi fase gerak agar diperoleh perbandingan fase gerak yang sesuai untuk menghasilkan noda yang optimal. Beberapa fase gerak yang digunakan dalam proses optimasi dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Fase gerak yang digunakan dari hasil optimasi adalah etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25) dan n-butanol : asam asetat glasial : air (4 : 1 : 5).

5.2.1. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Fenol

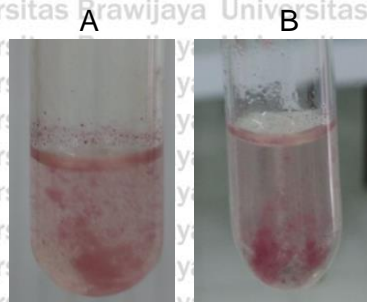
Hasil skrining fitokimia dengan fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25) menunjukkan hasil negatif pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang diamati pada UV 254 nm dan sinar tampak setelah diberi reagen penampak noda FeCl_3 yang ditunjukkan pada **Gambar 5.2**. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya spot berwarna hitam pada pengamatan UV 254 sebelum diberi reagen penampak noda dan sinar tampak setelah diberi penampak noda.



Gambar 5. 2. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Fenol . Keterangan : (A) Plat KLT sebelum diberi penampak noda FeCl_3 dan diamati pada UV 254 nm; (B) Plat KLT sesudah diberi penampak noda FeCl_3 dan diamati pada sinar tampak

5.2.2. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Tanin

Hasil skrining fitokimia senyawa tannin dengan uji gelatin menunjukkan hasil negatif pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang dilihat dari tidak terbentuknya endapan berwarna putih yang ditunjukkan pada **Gambar 5.3**. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna putih.



Gambar 5. 3. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Tanin. Keterangan : (A) sebelum diberi gelatin, (B) setelah diberi gelatin

5.2.3. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid

Hasil skrining fitokimia dengan fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25) menunjukkan hasil positif mengandung alkaloid pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang diamati pada sinar tampak setelah diberi reagen *dragendroff* yang ditunjukkan pada **Gambar 5.4**. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya spot berwarna orange pada pengamatan sinar tampak setelah diberi reagen penampak noda *dragendroff*.



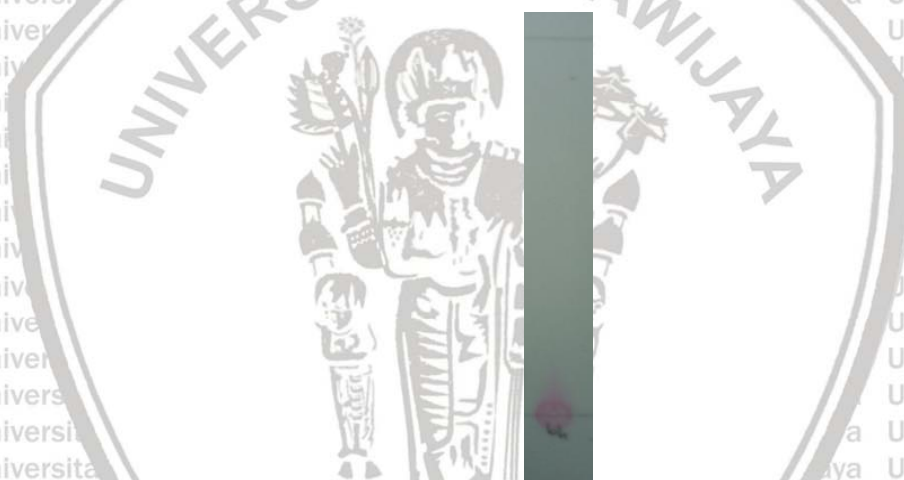
Gambar 5. 4. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid. Keterangan : (A) Plat KLT sesudah diberi penampak noda *dragendroff* dan diamati pada sinar tampak.

Tabel 5. 1. Nilai Rf Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid

No	Perhitungan	Hasil
1.	0,5/8 (<i>tailing</i>)	0,0625 (oranye)

5.2.4. Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Steroid

Hasil skrining fitokimia dengan fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25) menunjukkan hasil negatif pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang diamati pada sinar tampak setelah diberi reagen Lieberman-Burchad yang ditunjukkan pada **Gambar 5.5**. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya spot berwarna biru pada pengamatan sinar tampak setelah diberi reagen penampak noda Lieberman-Burchad.



Gambar 5. 5. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Steroid. Keterangan : (Plat KLT sesudah diberi reagen dan diamati pada sinar tampak)

5.2.5. Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid

Hasil skrining fitokimia dengan fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25) menunjukkan hasil positif pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang diamati pada sinar tampak setelah diberi reagen H_2SO_4 yang ditunjukkan pada **Gambar 5.6**. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya spot berwarna ungu pada pengamatan sinar tampak setelah diberi reagen penampak noda H_2SO_4 .



Gambar 5. 6. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid.

Keterangan : (A) Plat KLT sebelum diberi reagen dan diamati pada UV 366 nm; (B) Plat KLT sesudah diberi reagen penampak noda H₂SO₄ dan diamati pada sinar tampak.

Tabel 5. 2. Nilai Rf Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid

No	Perhitungan	Hasil
1.	5,7/8	0,713 (ungu)
2.	5,3/8	0,663 (ungu)

5.2.6. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Saponin

Hasil skrining fitokimia senyawa saponin dengan uji buih menunjukkan hasil negatif pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang dilihat dari tidak terbentuknya buih yang stabil selama 10 menit setelah pengocokan yang ditunjukkan pada **Gambar 5.7**. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya buih yang stabil selama 10 menit.



Gambar 5. 7. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Saponin. Keterangan : tidak terdapat buih pada sampel uji setelah dilakukan pengocokan dan dibiarkan selama 10 menit.

5.2.7. Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid

Hasil skrining fitokimia dengan fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25) menunjukkan hasil positif pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang diamati pada UV 366 nm sebelum diberi penampak noda dan sinar tampak setelah diberi reagen $AlCl_3$ yang ditunjukkan pada **Gambar 5.8**.

Hasil positif ditunjukkan dengan adanya spot merah keunguan yang merupakan flavonoid jenis antosianin.



Gambar 5. 8. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid.

Keterangan : (A) Plat KLT sebelum diberi reagen dan diamati pada UV 366 nm; (B) Plat KLT sesudah diberi reagen dan diamati pada sinar tampak.

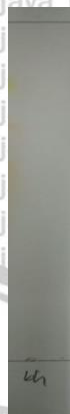
Tabel 5. 3. Nilai Rf Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid

No	Perhitungan	Hasil
1.	1,7/8 (tailing)	0,2125 (ungu samar)

5.2.8. Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Antrakuinon

Hasil skrining fitokimia dengan fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25) menunjukkan hasil negatif pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang diamati pada sinar tampak setelah diberi reagen KOH

yang ditunjukkan pada **Gambar 5.9**. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya spot berwarna orange kecoklatan pada pengamatan sinar tampak setelah diberi reagen penampak noda KOH.



Gambar 5.9. Plat KLT Skrining Fitokimia Senyawa Antraquinon. Keterangan : Plat KLT sesudah diberi reagen penampak noda KOH dan diamati pada sinar tampak.

5.2.9. Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Antosianin

Hasil skrining fitokimia dengan fase gerak n-butanol : asam asetat glasial : air (4 : 1 : 5) menunjukkan hasil positif mengandung antosianin pada ekstrak daging buah *Syzygium cumini* yang diamati pada sinar tampak ditunjukkan pada

Gambar 5.10. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya spot berwarna ungu.



Gambar 5.10. Plat KLT Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Antosianin. Keterangan : Plat KLT sesudah diberi reagen dan diamati pada sinar tampak.

Tabel 5. 4. Nilai Rf Skrining Fitokimia Senyawa Antosianin

No	Perhitungan	Hasil
1.	1,4/8,2	0,1707 (ungu kebiruan)

5.3. Hasil Uji Sitotoksik Daging Buah Juwet (*Syzygium cumini*)

Uji sitotoksik dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik suatu sampel yaitu ekstrak etanol daging buah juwet terhadap kultur sel kanker payudara 4T1 dengan metode *MTT Assay*. Parameter yang diukur pada uji sitotoksik ini adalah nilai IC_{50} .

Pada penelitian ini dosis yang digunakan ditentukan dari optimasi yang terlebih dahulu dilakukan. Penentuan rentang dosis dihitung menggunakan rumus $f = \sqrt[n-1]{Dt/Dr}$ yang sesuai dengan pedoman CCRC. Optimasi dosis yang telah dilakukan menggunakan seri konsentrasi 3, 12, 48, 192, 768 $\mu\text{g/ml}$ dengan jumlah sel tiap sumuran sebanyak 5000 sel/sumuran. Namun dari hasil optimasi tersebut diketahui bahwa konsentrasi terlalu rendah dan masih banyak sel yang hidup sehingga dosis disesuaikan dan digunakan rentang 400-800 $\mu\text{g/ml}$ dan dilakukan perhitungan dengan rumus tersebut hingga diperoleh konsentrasi uji yaitu 400, 500, 600, 700, dan 800 $\mu\text{g/ml}$. Jumlah sel tiap sumuran yang digunakan yaitu 5000 sel/sumuran dengan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam.

Jumlah tersebut sesuai dengan pedoman CCRC yaitu dengan optimasi jumlah sel 5000 sel/sumuran dengan waktu inkubasi 24 jam didapatkan sel yang sudah konfluen 80%.

Kultur sel 4T1 memiliki karakteristik morfologi sel yang khas. Dilihat dari bentuk morfologinya, sel 4T1 pada kondisi normal dan belum diberikan perlakuan memiliki karakteristik sel berbentuk lonjong. Kedua ujung dari selnya berbentuk lancip. Pada sel 4T1 yang masih hidup juga memiliki inti sel yang berbentuk bulat sesuai pada **Gambar 5.11**.

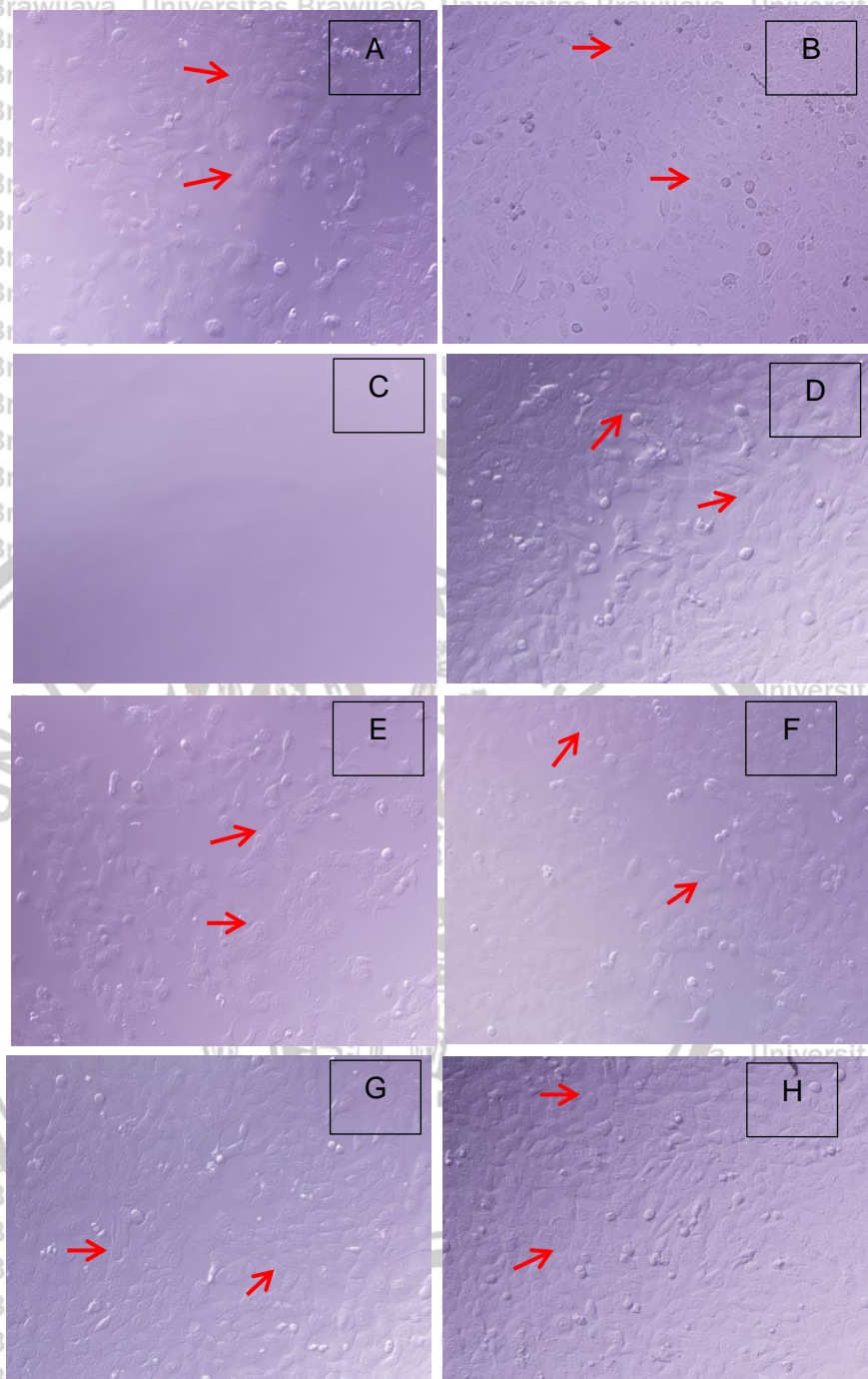
Sedangkan pada kultur sel 4T1 yang sudah diberikan perlakuan memiliki karakteristik yang berbeda dengan sel 4T1 yang normal. Secara morfologi sel yang mati akan berubah bentuk menjadi tidak beraturan. Tidak terdapat inti sel layaknya sel 4T1 yang normal. Selain itu sel juga berubah menjadi mengkerut seperti pada **Gambar 5.12**.

Pemberian reagen MTT dilakukan untuk mengetahui dengan jelas perbedaan antara sel yang masih hidup dan yang telah mati. Setelah diberikan reagen MTT, sel yang masih hidup akan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Sedangkan sel yang sudah mati tidak akan menghasilkan kristal formazan.

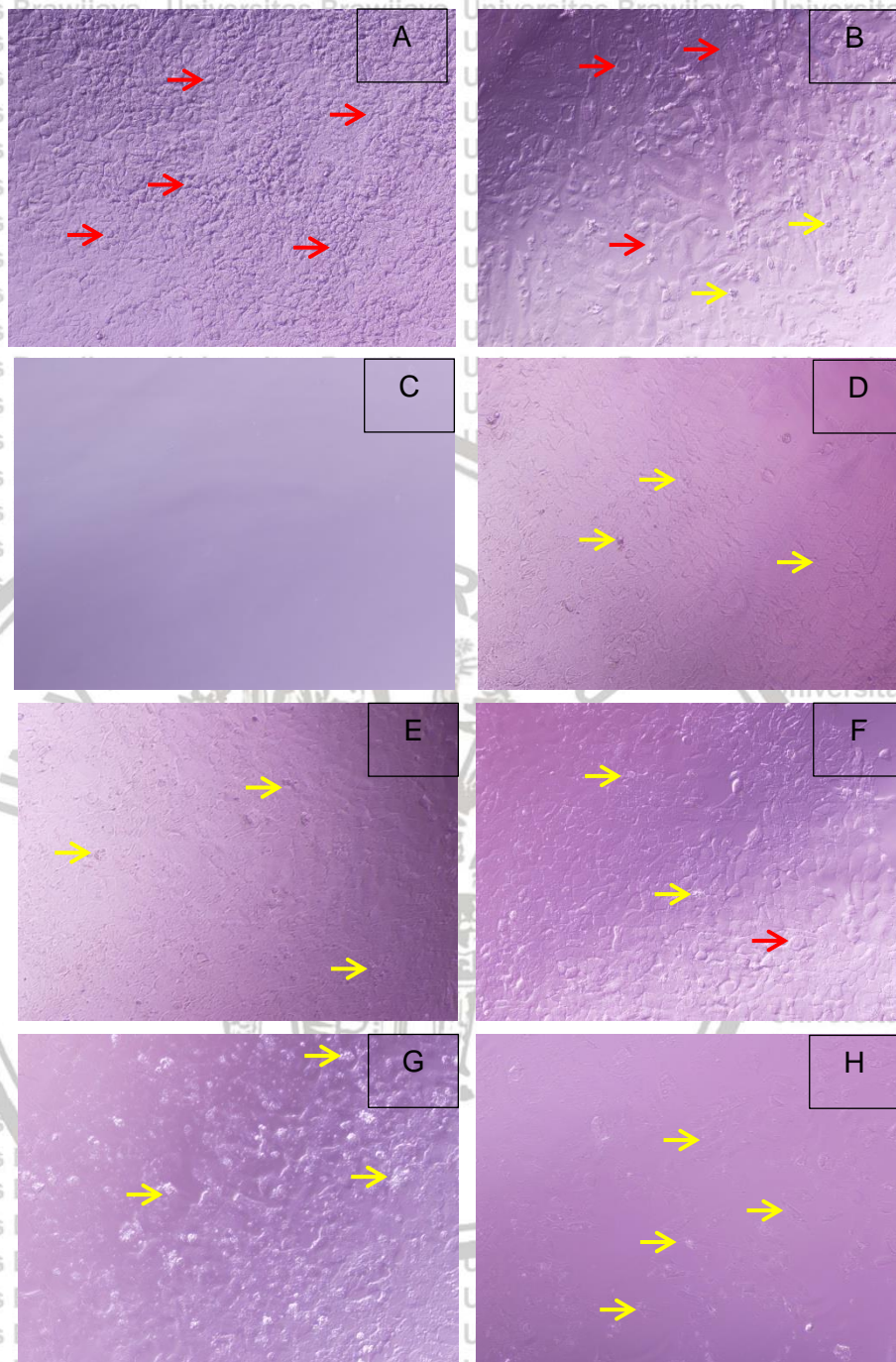
Jika intensitas warna ungu semakin besar maka jumlah sel hidup juga masih banyak, dan sebaliknya jika intensitas warna ungu semakin kecil maka jumlah sel yang mati semakin banyak sesuai dengan **Gambar 5.13**.

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* terhadap kultur sel 4T1. Efek pemberian ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* dapat dilihat dengan penambahan reagen MTT yang hasilnya dapat diketahui dari pembentukan kristal formazan berwarna ungu yang menandakan bahwa sel masih hidup.

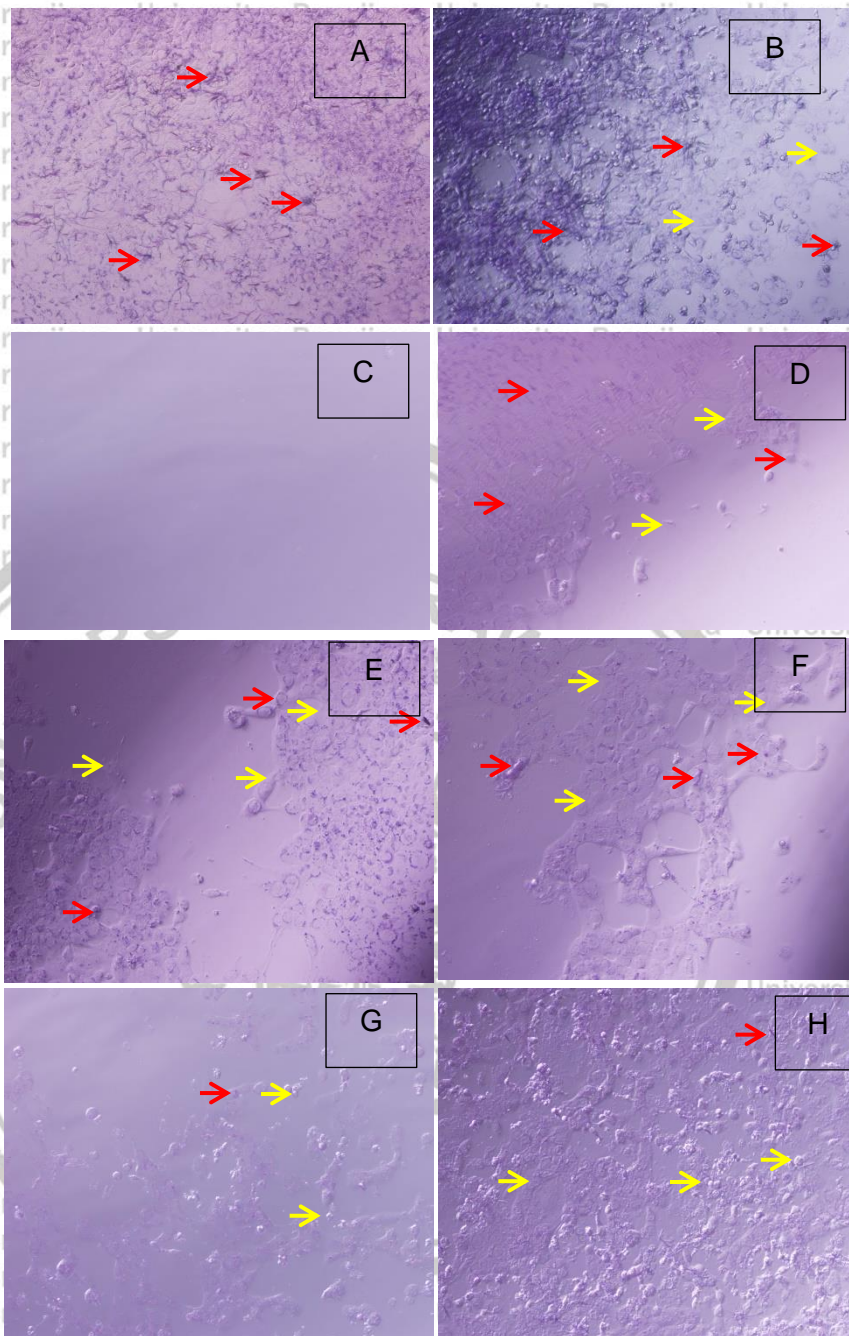
Semakin tinggi konsentrasi, intensitas warna yang terbentuk semakin sedikit yang menandakan bahwa jumlah sel yang masih hidup sedikit dan terdapat adanya efek sitotoksik dari sampel yang diberikan.



Gambar 5. 11. Sel 4T1 kelompok kontrol dan seri konsentrasi sebelum diberi sampel dan reagen MTT pada perbesaran 100x. Keterangan : (A) kontrol sel, (B) kontrol pelarut, (C) kontrol media, (D) konsentrasi 400 ppm, (E) konsentrasi 500 ppm, (F) konsentrasi 600 ppm, (G) konsentrasi 700 ppm, (H) konsentrasi 800 ppm. → Sel yang hidup



Gambar 5.12. Sel 4T1 kelompok kontrol dan seri konsentrasi setelah diberi sampel pada perbesaran 100x. Keterangan : (A) kontrol sel, (B) kontrol pelarut, (C) kontrol media, (D) konsentrasi 400 ppm, (E) konsentrasi 500 ppm, (F) konsentrasi 600 ppm, (G) konsentrasi 700 ppm, (H) konsentrasi 800 ppm. → Sel yang hidup. → Sel yang mati



Gambar 5. 13. Sel 4T1 kelompok kontrol dan seri konsentrasi setelah diberi sampel dan reagen MTT pada perbesaran 100x. Keterangan : (A) kontrol sel, (B) kontrol pelarut, (C) kontrol media, (D) konsentrasi 400 ppm, (E) konsentrasi 500 ppm, (F) konsentrasi 600 ppm, (G) konsentrasi 700 ppm, (H) konsentrasi 800 ppm. → Sel yang hidup. → Sel yang mati

Beberapa data yang diperoleh dari uji MTT ini antara lain nilai absorbansi dari kontrol sel, kontrol pelarut, kontrol media, dan absorbansi dari masing-masing perlakuan. Data tersebut digunakan untuk menentukan nilai prosentase sel 4T1 yang masih hidup (% viabilitas sel) setelah diberi seri konsentrasi ekstrak sehingga dapat diketahui efek pemberian ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* terhadap sel 4T1.

Tabel 5. 5. Hasil uji sitotoksik ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini*

Konsentrasi	% viabilitas			Rata-rata % viabilitas	Rata-rata IC ₅₀
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3		
400 µg/ml	128,64	87,5	212,12	142,75	
500 µg/ml	115,05	71,67	101,21	95,98	
600 µg/ml	79,61	52,5	82,42	71,51	
700 µg/ml	41,75	39,58	82,42	54,59	
800 µg/ml	55,34	35,83	65,45	52,21	
IC ₅₀	754,9795 µg/ml	654,8744 µg/ml	788,2089 µg/ml		732,6876 µg/ml ± 69,41 µg/ml

Perhitungan tersebut diawali dengan menentukan nilai %viabilitas sel pada masing-masing konsentrasi di tiap replikasi. Berdasarkan data nilai absorbansi kontrol pelarut dan kontrol sel diketahui bahwa nilai absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel sehingga berdasarkan pedoman CCRC rumus untuk menghitung % viabilitas sel adalah menggunakan :

$$\frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}) \times 100\%}{(\text{absorbansi kontrol pelarut} - \text{absorbansi kontrol media})}$$

Data % viabilitas sel tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dari masing-masing replikasi.

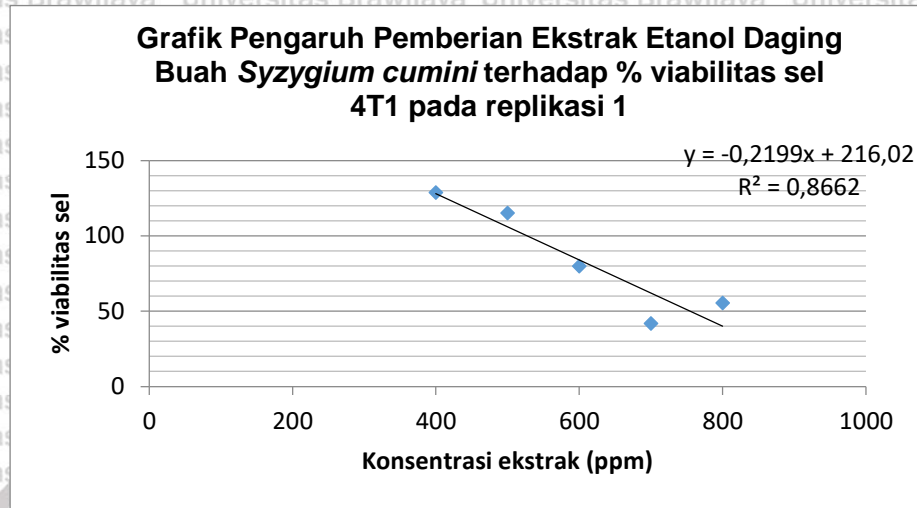
Berdasarkan hasil perhitungan diketahui bahwa pada replikasi 1 nilai % viabilitas sel mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi sampel yang diberikan. Persamaan regresi pada replikasi 1 yaitu $y = -0,2199x + 216,02$ dengan nilai $r = -0,9307$ sesuai grafik yang ditunjukkan **Gambar 5.14**.

Setelah dilakukan perhitungan didapatkan nilai IC_{50} untuk replikasi 1 yaitu sebesar 754,9795 $\mu\text{g/ml}$.

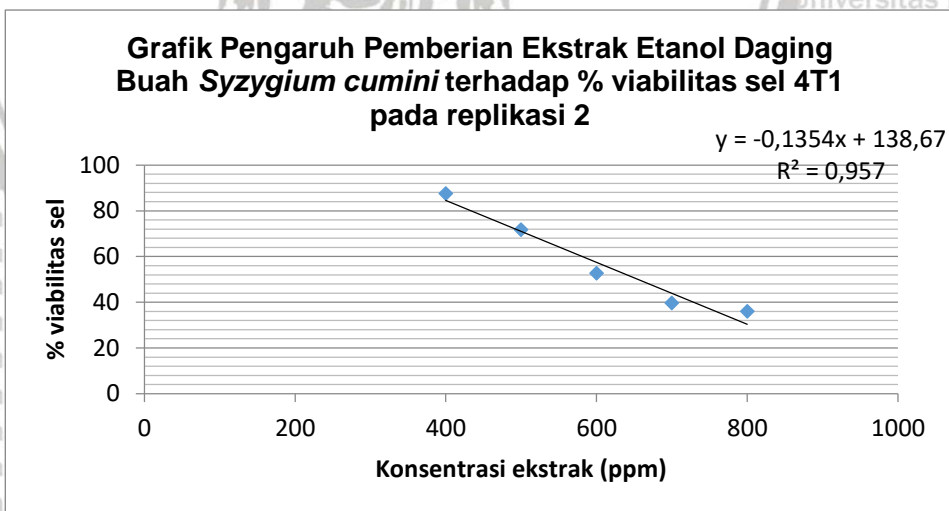
Hasil perhitungan pada replikasi 2 menunjukkan hal yang sama yaitu nilai % viabilitas sel mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi sampel yang diberikan. Persamaan regresi pada replikasi 2 yaitu $y = -0,1354x + 138,67$ dengan nilai $r = -0,9783$ sesuai grafik yang ditunjukkan pada **Gambar 5.15**. Setelah dilakukan perhitungan didapatkan nilai IC_{50} untuk replikasi 2 yaitu sebesar 654,8744 $\mu\text{g/ml}$.

Perhitungan yang dilakukan pada replikasi 3 juga menunjukkan hal yang sama seperti replikasi sebelumnya yaitu adanya penurunan nilai % viabilitas sel seiring dengan peningkatan konsentrasi sampel yang diberikan. Persamaan regresi pada replikasi 3 yaitu $y = -0,3121x + 296$ dengan nilai $r = -0,8341$ sesuai grafik yang ditunjukkan pada **Gambar 5.16**. Setelah dilakukan perhitungan didapatkan nilai IC_{50} untuk replikasi 3 sebesar 788,2089 $\mu\text{g/ml}$.

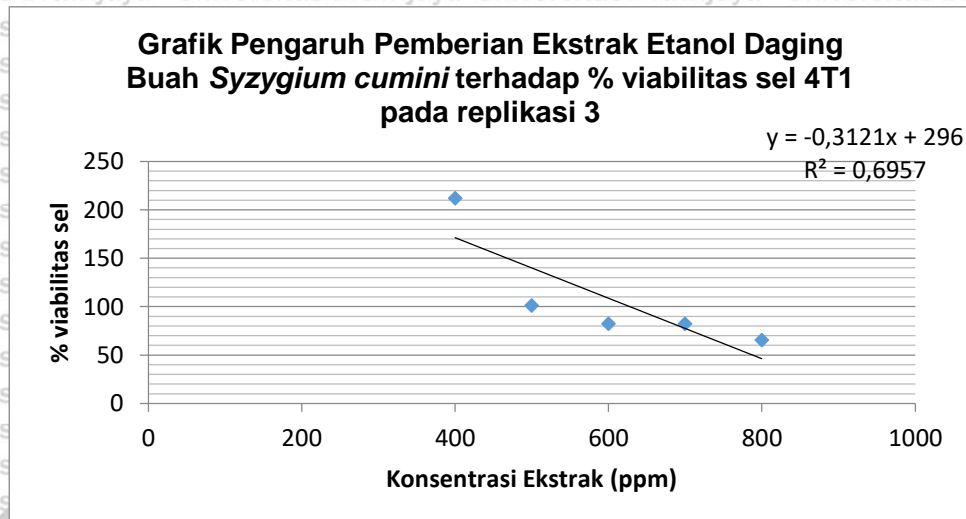
Selanjutnya dilakukan uji korelasi untuk mengetahui adanya hubungan antara konsentrasi dengan % viabilitas sel. Berdasarkan hasil uji normalitas, data yang didapatkan terdistribusi normal. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai signifikansi $> 0,05$ yaitu sebesar 0,834. Kemudian dilakukan uji korelasi Pearson untuk mengetahui adanya hubungan antara konsentrasi dan % viabilitas sel. Berdasarkan hasil uji tersebut diketahui nilai signifikansi $< 0,05$ yaitu 0,002 dan derajat korelasi *pearson correlation* sebesar -0,727 sesuai hasil olah data pada **Lampiran 4**. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi sampel berkorelasi negative terhadap % viabilitas sel dengan derajat korelasi kuat. Dapat dikatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel yang diberikan maka semakin kecil nilai % viabilitas sel yang dihasilkan dan sebaliknya.



Gambar 5. 14. Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daging Buah *Syzygium cumini* terhadap % viabilitas sel 4T1 pada replikasi 1. Keterangan : Pengaruh pemberian ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* terhadap kultur sel kanker 4T1 dengan waktu inkubasi 24 jam dan diberikan seri konsentrasi ekstrak kemudian diukur dengan ELISA reader.



Gambar 5. 15. Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daging Buah *Syzygium cumini* terhadap % viabilitas sel 4T1 pada replikasi 2. Keterangan : Pengaruh pemberian ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* terhadap kultur sel kanker 4T1 dengan waktu inkubasi 24 jam dan diberikan seri konsentrasi ekstrak kemudian diukur dengan ELISA reader.



Gambar 5. 16. Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daging Buah *Syzygium cumini* terhadap % viabilitas sel 4T1 pada replikasi 3. Keterangan : Pengaruh pemberian ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* terhadap kultur sel kanker 4T1 dengan waktu inkubasi 24 jam dan diberikan seri konsentrasi ekstrak kemudian diukur dengan ELISA reader.



BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Pembahasan Hasil Penelitian

Proses ekstraksi daging buah *Syzygium cumini* menggunakan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut tertentu dengan tujuan menarik senyawa atau zat aktif yang terdapat dalam sampel. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh hasil ekstrak etanol daging buah juwet sebesar 53,46 g dengan % rendemen sebesar 21,46%. Pada penelitian lain didapatkan hasil rendemen ekstrak etanol buah juwet sebesar 30,87% (P. O. Rahmawati, 2018). Rendemen merupakan perbandingan berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat bahan baku awal. Nilai rendemen yang tinggi menunjukkan banyaknya komponen bioaktif yang terkandung dalam ekstrak. Semakin tinggi rendemen ekstrak maka semakin tinggi pula kandungan zat yang tertarik pada suatu bahan baku (Senduk et al., 2020). Perbedaan hasil rendemen ekstrak dapat disebabkan beberapa faktor diantaranya perbedaan metode ekstraksi, lama ekstraksi, jumlah sampel, waktu dan kondisi penyimpanan, serta perbandingan sampel dengan jumlah pelarut (Sayuti, 2017).

Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang ada pada ekstrak daging buah juwet. Skrining fitokimia yang dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Prinsip pemisahan menggunakan KLT adalah berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran sampel dan pelarut. Fase diam yang digunakan yaitu silica gel GF254 yang bersifat polar sedangkan fase gerak yang digunakan bersifat lebih non polar sehingga senyawa yang memiliki sifat lebih polar akan

tertahan pada silica gel dan memiliki nilai Rf yang lebih kecil dibandingkan senyawa yang bersifat lebih non polar.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan, diketahui bahwa ekstrak daging buah *Syzygium cumini* positif mengandung alkaloid. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya spot noda berwarna orange pada plat KLT setelah diberi penampak noda *dragendroff* dan diamati pada sinar tampak dengan nilai Rf yaitu 0,0625. Spot noda yang terbentuk pada identifikasi alkaloid membentuk *tailing* (berekor). Hal ini dimungkinkan terjadi karena beberapa factor seperti jenis eluen yang perlu dimodifikasi atau dioptimasi kembali agar diperoleh noda yang terlihat jelas. Selain itu noda yang berekor dapat dimungkinkan karena adanya afinitas senyawa yang lebih kuat pada fase diam dibandingkan pada fase gerak sehingga banyak yang tertinggal pada fase diam. Berdasarkan literature terdapat jenis alkaloid yang berwarna merah keunguan yaitu betasianin (Coy-Barrera, 2020).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia diketahui bahwa ekstrak daging buah *Syzygium cumini* positif mengandung terpenoid. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya spot noda berwarna ungu pada plat KLT setelah diberi penampak noda H_2SO_4 10% dan diamati pada sinar tampak. Spot noda tersebut memiliki nilai Rf 0,713 dan 0,663. Literature menunjukkan bahwa daging buah juwet mengandung terpenoid jenis monoterpen yaitu citronelol, geraniol, linalool, dan linalool oxide (Ramya et al., 2012).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia diketahui bahwa ekstrak daging buah *Syzygium cumini* positif mengandung flavonoid golongan antosianin. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan adanya spot noda berwarna ungu samar-samar dengan nilai Rf 0,2125. Spot noda yang terbentuk pada identifikasi flavonoid

membentuk *tailing* (berekor). Hal ini dimungkinkan terjadi karena beberapa factor seperti jenis eluen yang perlu dimodifikasi atau dioptimasi kembali agar diperoleh noda yang terlihat jelas. Selain itu noda yang berekor dapat dimungkinkan karena adanya afinitas senyawa yang lebih kuat pada fase diam dibandingkan pada fase gerak sehingga banyak yang tertinggal pada fase diam. Selanjutnya hasil positif antosianin ditunjukkan dengan noda berwarna ungu yang dilihat dari sinar tampak dengan nilai R_f 0,1707. Adanya kandungan antosianin memberikan warna keunguan pada buah juwet. Berdasarkan jenisnya, antosianin yang dapat memberikan warna ungu adalah jenis delphidin dan sianidin (Khoo et al., 2017)

Uji sitotoksik yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan uji MTT.

Tujuan dari uji sitotoksik ini adalah untuk mengetahui efek sitotoksik dari suatu sampel yaitu ekstrak daging buah *Syzygium cumini* terhadap kultur sel kanker payudara 4T1. Parameter uji sitotoksik ini adalah nilai IC_{50} yang menunjukkan besar dosis atau konsentrasi sampel yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50% populasi. Apabila semakin tinggi nilai IC_{50} maka semakin kecil efek sitotoksik yang dihasilkan oleh suatu sampel tersebut dan sebaliknya semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin tinggi efek sitotoksik yang diberikan. Sel 4T1 digunakan pada penelitian ini karena merupakan sel kanker *triple negative* yang mampu berproliferasi dengan cepat. Dari karakteristik tersebut maka dapat dilakukan uji antikanker lain yaitu uji antimigrasi untuk mengetahui efek antimigrasi sampel karena sel 4T1 mudah mengalami metastasis.

Uji sitotoksik dilakukan sebanyak 3 replikasi. Pada ketiga replikasi tersebut diketahui bahwa terdapat hubungan *dose dependent manner* yaitu semakin besar dosis ekstrak yang diberikan maka nilai % viabilitas sel semakin kecil. Pada replikasi pertama didapatkan hasil nilai IC_{50} sebesar 754,9795 $\mu\text{g/ml}$.

Pada replikasi kedua didapatkan hasil nilai IC_{50} sebesar 654,8744 $\mu\text{g/ml}$. Pada replikasi ketiga didapatkan hasil nilai IC_{50} sebesar 788,2089 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan hasil uji sitotoksik tersebut, diketahui bahwa ekstrak daging buah juwet memiliki aktivitas sitotoksik dengan rata-rata nilai IC_{50} sebesar $732,6876 \pm 69,41 \mu\text{g/ml}$ terhadap kultur sel 4T1. Berdasarkan literature, nilai IC_{50} tersebut masuk dalam rentang $> 500 \mu\text{g/ml}$ yang artinya tidak terdapat efek sitotoksik yang signifikan (Sajjadi et al., 2015). Hasil penelitian lain menunjukkan adanya efek sitotoksik buah juwet yang diujikan pada sel kanker payudara MCF-7aro dengan nilai IC_{50} sebesar 27 $\mu\text{g/ml}$, MDA-MB-231 dengan nilai IC_{50} sebesar 40 $\mu\text{g/ml}$, dan pada sel MCF-10A yang merupakan sel non tumorigenesis dengan $IC_{50} > 100\mu\text{g/ml}$ (Frauches et al., 2016). Sel kanker payudara MCF-7aro memiliki karakteristik overekspresi aromatase dan ER+ (Amaral et al., 2017). Tipe sel kanker payudara lainnya yaitu MDA-MB-231 yang merupakan *cell line* kanker payudara manusia yang memiliki karakteristik *triple negative* karena tidak mengekspresikan ER, PR, serta HER2 (ECACC, 2017). Penelitian terkait efek antikanker ekstrak buah juwet terhadap sel 4T1 belum dilakukan sehingga perbedaan hasil penelitian tersebut dapat dimungkinkan karena perbedaan sel yang digunakan.

Secara morfologi juga terlihat adanya perbedaan kondisi sel yang hidup dan yang telah mati sesuai dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan. Sel 4T1 yang masih hidup berbentuk lonjong dengan runcing di kedua sisi dan terdapat inti sel berwarna bulat sesuai pada **Gambar 5.11**. Sementara sel yang mati akan berubah bentuk menjadi tidak beraturan, tidak terdapat inti sel didalamnya, serta menjadi mengekerut. Kondisi tersebut terlihat jelas pada kultur sel 4T1 yang diberikan konsentrasi ekstrak 700 $\mu\text{g/ml}$ pada **Gambar 5.12** yang menunjukkan bahwa banyak sel 4T1 yang telah mati. Selanjutnya pemberian

reagen MTT bertujuan sebagai indikator untuk mengetahui sel yang hidup dan yang telah mati dari terbentuknya kristal formazan berwarna ungu. Seiring dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan, diketahui bahwa semakin sedikit pula intensitas warna yang terbentuk setelah pemberian reagen MTT. Pada konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$, intensitas warna ungu masih terlihat dan berkurang hingga pada konsentrasi 800 $\mu\text{g/ml}$ yaitu intensitas warna ungu sudah tidak terlihat sesuai pada **Gambar 5.13**.

Kondisi sel yang mati atau lisis tersebut dikarenakan karena adanya senyawa yang bersifat sitotoksik pada sampel yang diujikan. Pada buah juwet diketahui mengandung alkaloid, terpenoid, dan antosianin. Betasianin merupakan alkaloid yang memiliki pigmen warna merah keunguan. Betasianin memiliki aktivitas antioksidan yang mampu membersihkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker (J Kapadia et al., 2011). Terpenoid yang terdapat pada buah juwet merupakan jenis monoterpen salah satunya adalah citronelol (Ramya et al., 2012). Citronelol berperan sebagai antioksidan sehingga dapat menangkal radikal bebas yang dapat menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga timbul sel mutan. Apabila kondisi tersebut berlangsung jangka panjang maka dapat menimbulkan perkembangan sel kanker (Werdhasari, 2014). Kandungan lain pada buah juwet yang diduga memiliki aktivitas sebagai agen sitotoksik adalah adanya flavonoid jenis antosianin. Antosianin berperan sebagai antitumor dengan menargetkan RTK dengan bekerja pada jalur transduksi sinyal Ras-MAPK dan PI3K/Akt yang mengarah pada penghentian siklus sel sehingga menghambat proliferasi sel. Antosianin juga dapat menginduksi apoptosis sel kanker dengan mengaktifkan caspase yang dimediasi ROS dan JNK/p38-MAPK (Lin et al., 2017).

6.2. Implikasi di Bidang Farmasi

Obat bahan alam masih menjadi salah satu pilihan masyarakat dalam mengobati dan mencegah berbagai macam penyakit termasuk kanker. Adanya hasil bahwa ekstrak buah juwet memiliki efek sitotoksik dapat menjadi dasar pengembangan penelitian selanjutnya dalam bidang kefarmasian terkait manfaat sebagai agen sitotoksik pada kanker payudara.

6.3. Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah :

1. Tidak adanya pembandingan antara sampel ekstrak dengan obat konvensional pada saat dilakukan uji
2. Keterbatasan waktu dan kendala bahan penelitian menyebabkan penelitian tidak bisa dilanjutkan hingga uji *scratch wound healing*
3. Tidak membandingkan efek sitotoksik dari bagian lain tanaman juwet seperti daun dan biji.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daging buah *Syzygium cumini* mengandung metabolit sekunder alkaloid, terpenoid, flavonoid, dan antosianin. Ekstrak daging buah *Syzygium cumini* memiliki efek sitotoksik yang dilihat dari penurunan persen viabilitas sel dan diperoleh rata-rata nilai IC_{50} sebesar $732,6876 \pm 69,41 \mu\text{g/ml}$. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka nilai % viabilitas sel semakin kecil.

7.2. Saran

Dari keterbatasan penelitian dapat disarankan pada peneliti selanjutnya yang dapat dilakukan yaitu :

1. Digunakan obat konvensional seperti doksorubicin yang berfungsi sebagai pembanding dengan kelompok perlakuan.
2. Dilakukan uji *scratch wound healing* untuk mengetahui efek antimigrasi dari ekstrak daging buah *Syzygium cumini*. Dapat pula dilakukan uji antikanker lain untuk membuktikan efek antikanker seperti uji apoptosis, uji *cell cycle*, uji aktivitas MMP dengan gelatin zymogen.
3. Dapat dibandingkan efek sitotoksik dari daun, buah, dan biji juwet.

DAFTAR PUSTAKA

- Abotaleb, M., Kubatka, P., Caprnda, M., Varghese, E., Zolakova, B., Zubor, P., Opatrilova, R., Kruzliak, P., Stefanicka, P., & Busselberg, D. (2018). Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomedicines and Pharmacotherapy*, 101, 458–477.
- Amaral, C., Tolo, M. R. T., Vasconcelos, L. D., Fonseca, M. J. V., Correia-da-Silva, G., & Teixeira, N. (2017). The role of soybean extracts and isoflavones in hormone-dependent breast cancer: aromatase activity and biological effects. *Food & Function*, 8(9), 3064–3074.
- American Cancer Society. (2020). *No Title*. <https://www.cancer.org/>
- Angahar, L. T. (2017). An overview of breast cancer epidemiology, risk factors, pathophysiology, and cancer risks reduction. *MOJ Biology and Medicine*, 1(4).
- Ayyanar, M., & Subash-Babu, P. (2012). *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 240–246.
- Azhar, J. (2011). TUMOROGENESIS: EVASION OF APOPTOSIS BY THE CANCER CELLS. *Pakistan Oral & Dental Journal*, 31(2).
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. */// Bangladesh Journal of Pharmacology///*, 12(2), 115–118.
- Barh, D., & Viswanathan, G. (2008). *Syzygium cumini* inhibits growth and induces apoptosis in cervical cancer cell lines: a primary study. *Ecancermedicalscience*, 2.

Bele, A. A., & Khale, A. (2011). An overview on thin layer chromatography.

International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2(2), 256.

Coy-Barrera, E. (2020). Analysis of betalains (betacyanins and betaxanthins). In

Recent Advances in Natural Products Analysis (pp. 593–619). Elsevier.

ECACC. (2017). *Cell line profile MDA-MB-231*. Public Health England.

<https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>

Elsharkawy, A. M. (2014). *Principles and Practice of Cancer Prevention and*

Control. (R. A. Al-Naggar (ed.)). OMICS Group eBooks.

Frauches, N. S., do Amaral, T. O., Lagueza, C. B. D., & Teodoro, A. J. (2016).

Brazilian Myrtaceae fruits: a review of anticancer proprieties. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1–15.

Fu, Y., Chang, H., Peng, X., Bai, Q., Yi, L., Zhou, Y., Zhu, J., & Mi, M. (2014).

Resveratrol inhibits breast cancer stem-like cells and induces autophagy via suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway. *PloS One*, 9(7), e102535.

GBIF. (2020). *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Bull. Bur. Pl. Industr. U.S.D.A.

248:25. 1912. <https://www.gbif.org/species/3183840>

Global Cancer Observatory. (2020a). *Indonesia*.

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-factsheets.pdf>

Global Cancer Observatory. (2020b). *World*.

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-factsheets.pdf>

Hasanah, U. (2018). *Aktivitas Penghambatan Migrasi Sel Kanker Payudara 4T1*

Dengan Pemberian Ekstrak Etilasetat Herba Poguntano (Picria fel-terrae



- Lour.) [Universitas Sumatera Utara].
<http://repositori.usu.ac.id/handle/123456789/3966%0D>
- Hejmadi, M. (2014). *Introduction to cancer biology*. Bookboon.
- Hosseini, Aay & Ghorbani, A. (2015). Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(2), 84.
- J Kapadia, G., A Azuine, M., Subba Rao, G., Arai, T., Iida, A., & Tokuda, H. (2011). Cytotoxic effect of the red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract compared to doxorubicin (Adriamycin) in the human prostate (PC-3) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 11(3), 280–284.
- Katiyar, D., Singh, V., & Ali, M. (2016). Recent advances in pharmacological potential of *Syzygium cumini*: A review. *Adv. Appl. Sci. Res*, 7(3), 1–12.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2018). *Hasil Utama Riskesdas 2018*.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *FOOD & NUTRITION RESEARCH*, 61.
- Labtech, B. (2020). *Microplate Reader*. <https://www.bmglabtech.com/microplate-reader/>
- Leber, M. F., & Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis. *International Journal of Oncology*, 34(4), 881–895.
- Lin, B.-W., Gong, C.-C., Song, H.-F., & Cui, Y.-Y. (2017). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*, 174, 1226–1243.

Mudiana, D., & Ariyanti, E. E. (2020). Karakterisasi Morfologi Juwet (*Syzygium cumini* [L.] Skeels.) di Kebun Raya Purwodadi. *Buletin Plasma Nutrafah*, 26(1), 11–20.

Mulyani, S., & Laksana, T. (2011). Analisis flavonoid dan tannin dengan metoda mikroskopi-mikrokimiawi. *Majalah Obat Tradisional*, 16(3), 109–114.

Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L., & Fleury-Souverain, S. (2011). Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*, 85(5), 2265–2289.

Permana, K. A. W., Permana, M. A. Y., & Nisa, S. (2019). Asosiasi Triple Negative Breast Cancer (TNBC) Dengan Mutasi BRCA-1 Dan Etnisitas. *Jurnal Medula*, 9(3), 398–403.

Priyatin, C., Ulfiana, E., & Sumarni, S. (2013). Faktor Risiko yang Berpengaruh Terhadap Kejadian Kanker Payudara di RSUP dr. Kariadi Semarang. *Jurnal Kebidanan*, 2(5).

Rahmawati, A., & Mutiah, R. (2014). *Potensi ekstrak daun widuri (Calatropis gigantea) sebagai obat antikanker fibrosarkoma*. UIN-Maliki Press.

Rahmawati, P. O. (2018). *PENGARUH EKSTRAK ETANOL BUAH DUWET (Syzygium cumini L.) TERHADAP KADAR GLUKOSA DARAH DAN KADAR MALONDIALDEHID PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI ALOKSAN*. Universitas Setia Budi.

Ramya, S., Neethirajan, K., & Jayakumararaj, R. (2012). Profile of bioactive compounds in *Syzygium cumini*—a review. *J. Pharm. Res*, 5(8), 4548–4553.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [Internet].

Sajjadi, S. E., Ghanadian, M., Haghghi, M., & Mouhebat, L. (2015). Cytotoxic

effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4(1), 15–19.

Sayuti, M. (2017). Pengaruh perbedaan metode ekstraksi, bagian dan jenis pelarut terhadap rendemen dan aktifitas antioksidan bambu laut (*Isis hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*, 1(3).

Senduk, T. W., Montolalu, L. A. D. Y., & Dotulong, V. (2020). The rendement of boiled water extract of mature leaves of mangrove *Sonneratia alba*. *JURNAL PERIKANAN DAN KELAUTAN TROPIS*, 11(1), 9–15.

Shareef, M., Ashraf, M. A., & Sarfraz, M. (2016). *Natural cures for breast cancer treatment: a review*.

Sonam, M., Singh, R. P., & Pooja, S. (2017). Phytochemical screening and TLC profiling of various extracts of *Reinwardtia indica*. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res*, 9(4), 523–527.

Suhartati, T. (2017). *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. AURA.

Susanty, S., & Bachmid, F. (2016). Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan refluks terhadap kadar fenolik dari ekstrak tongkol jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Konversi*, 5(2), 87–92.

Sztalmachova, M., Gumulec, J., Raudenska, M., Polanska, H., Holubova, M., Balvan, J., Hudcova, K., Knopfova, L., Kizek, R., & Adam, V. (2015).

Molecular response of 4T1-induced mouse mammary tumours and healthy tissues to zinc treatment. *International Journal of Oncology*, 46(4), 1810–1818.

Tao, K., Fang, M., Alroy, J., & Sahagian, G. G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*, 8(1), 1–19.

- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), 440.
- Tripathy, G. & D. P. (2015). In-Vitro Anti Breast Cancer Activity of Syzygium Cumini Against MCF-7 Cell Line. *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*, 2(2), 119–124.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- Werdhasari, A. (2014). Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 3(2), 59–68.
- WHO. (2008). *Maintenance Manual For Laboratory Equipment* (2nd ed.). WHO Press.
- Yudissanta, A., & Ratna, M. (2012). Analisis pemakaian kemoterapi pada kasus kanker payudara dengan menggunakan metode regresi logistik multinomial (studi kasus pasien di rumah sakit “x” surabaya). *Jurnal Sains Dan Seni Its*, 1(1), D112–D117.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Ekstraksi daging buah *Syzygium cumini*

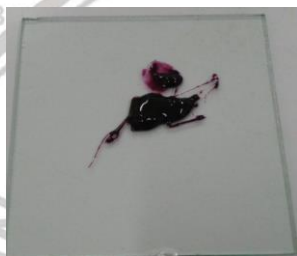
1.1. Perhitungan rendemen ekstrak :

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

$$= \frac{53,64 \text{ g}}{250 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 21,46\%$$

1.2. Dokumentasi ekstrak yang diperoleh

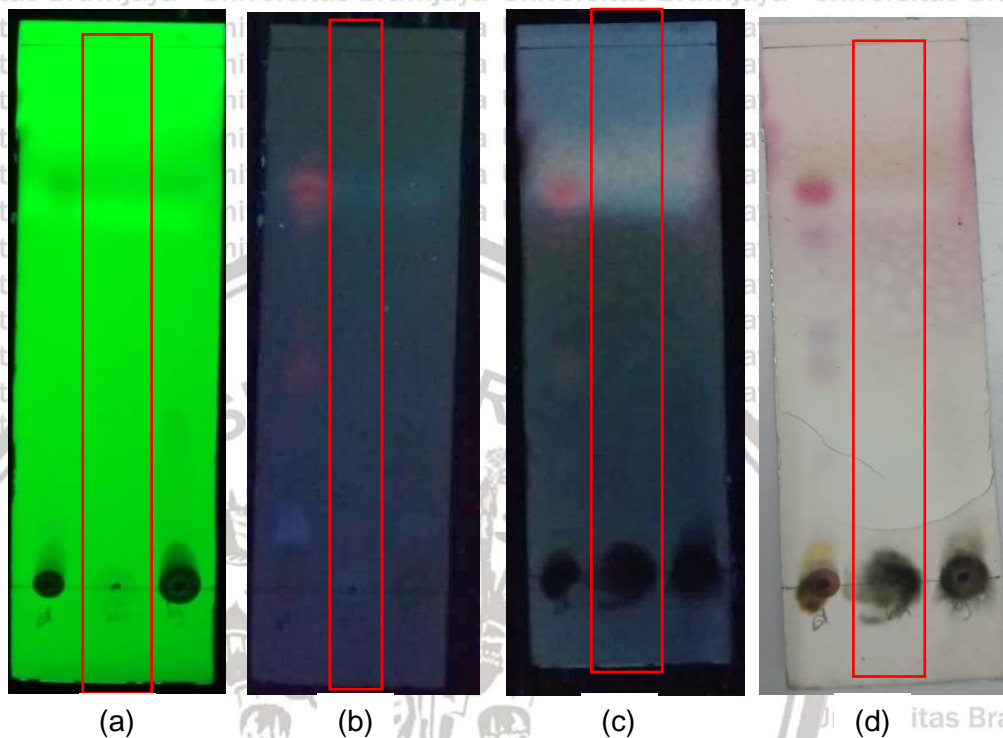


Gambar 1. Hasil ekstraksi daging buah juwet

Lampiran 2. Skrining Fitokimia

3.1. Optimasi fase gerak

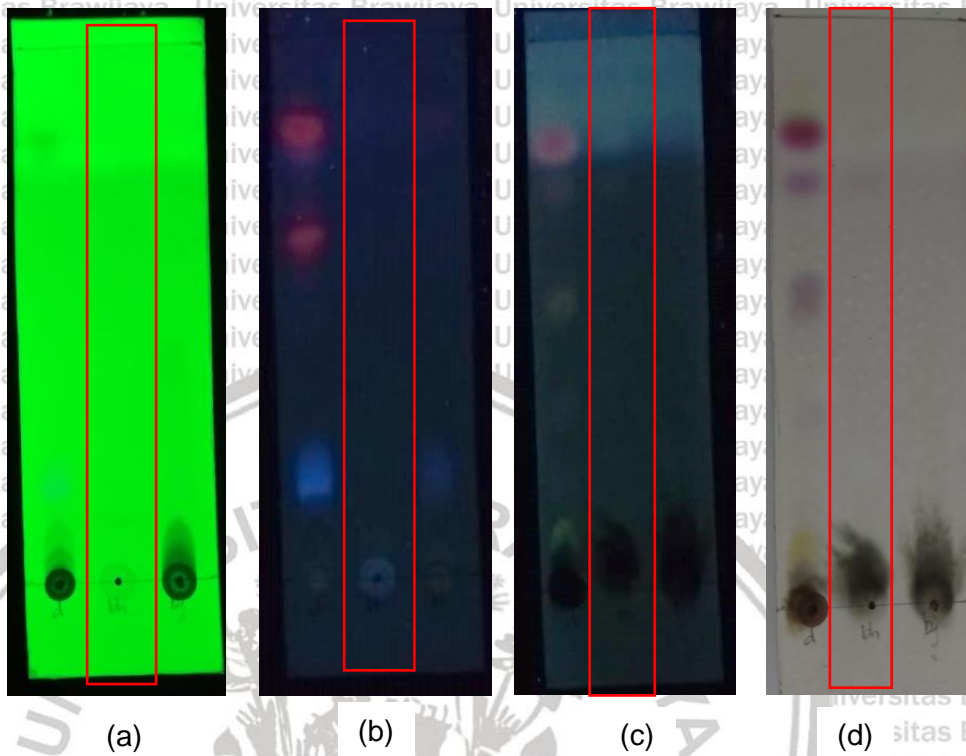
- Fase gerak etil asetat : aseton = 7 : 3 (10ml)



Gambar 2. Hasil optimasi fase gerak etil asetat : aseton = 7 : 3.

Keterangan : (a) plat KLT pada sinar UV 254 nm tanpa diberi reagen; (b) plat KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (c) plat KLT pada sinar UV 366 nm setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (d) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%.

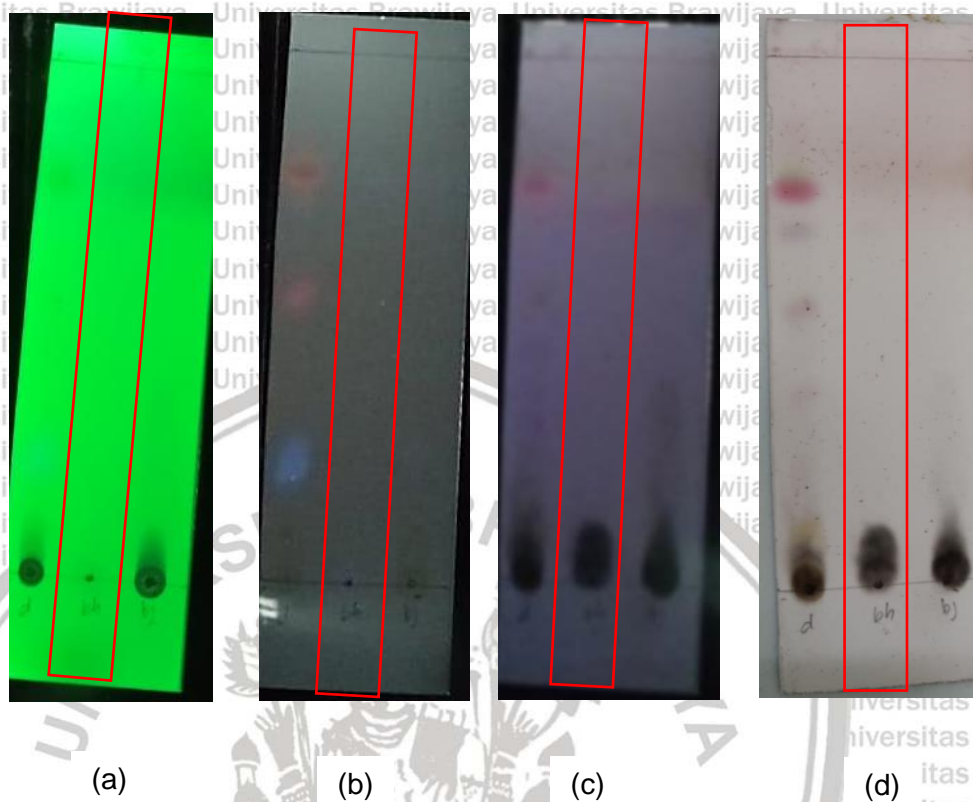
- Fase gerak etil asetat : aseton = 5 : 5 (10 ml)



Gambar 3. Hasil optimasi fase gerak etil asetat : aseton = 5 : 5.

Keterangan : (a) plat KLT pada sinar UV 254 nm tanpa diberi reagen; (b) plat KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (c) plat KLT pada sinar UV 366 nm setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (d) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%.

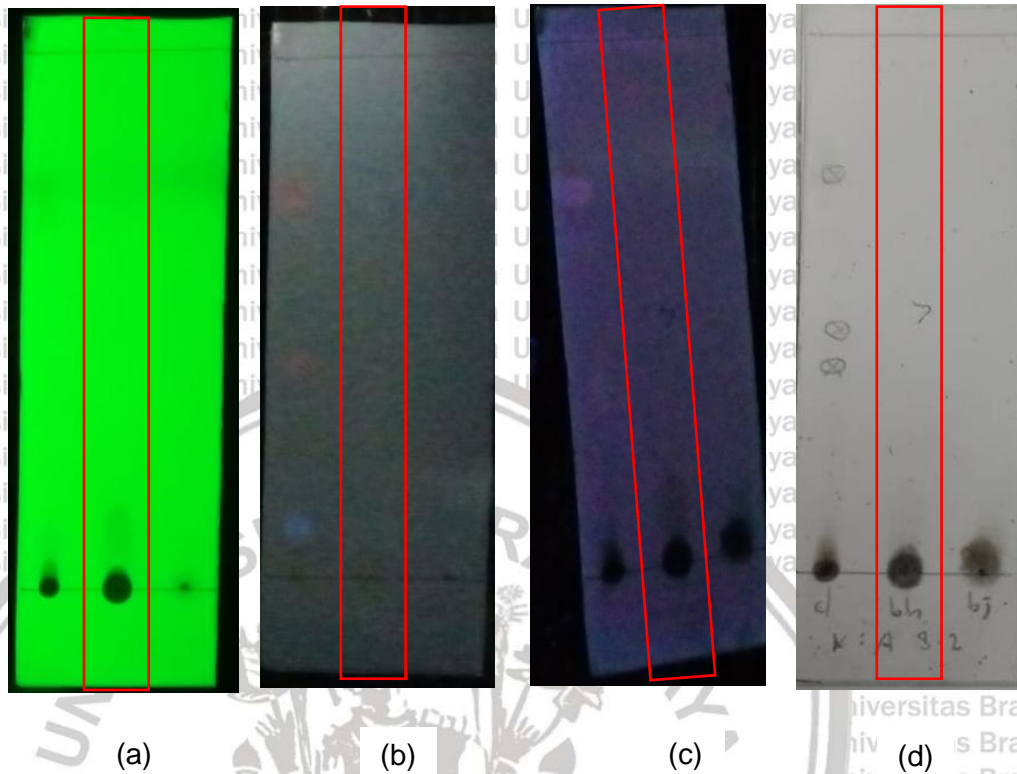
- Fase gerak kloroform : aseton = 2 : 8 (10 cm)



Gambar 4. Hasil optimasi fase gerak kloroform : aseton = 2 : 8.

Keterangan : (a) plat KLT pada sinar UV 254 nm tanpa diberi reagen; (b) plat KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (c) plat KLT pada sinar UV 366 nm setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (d) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%.

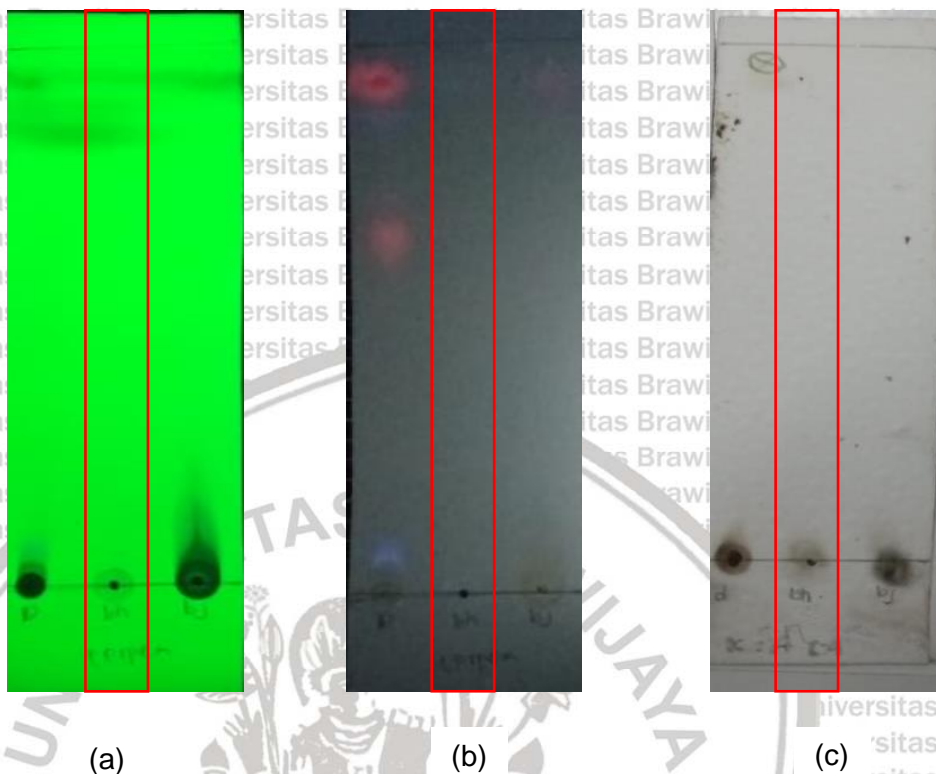
- Fase gerak kloroform : aseton = 8 : 2 (10 ml)



Gambar 5. Hasil optimasi fase gerak kloroform : aseton = 8 : 2.

Keterangan : (a) plat KLT pada sinar UV 254 nm tanpa diberi reagen; (b) plat KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (c) plat KLT pada sinar UV 366 nm setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (d) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%.

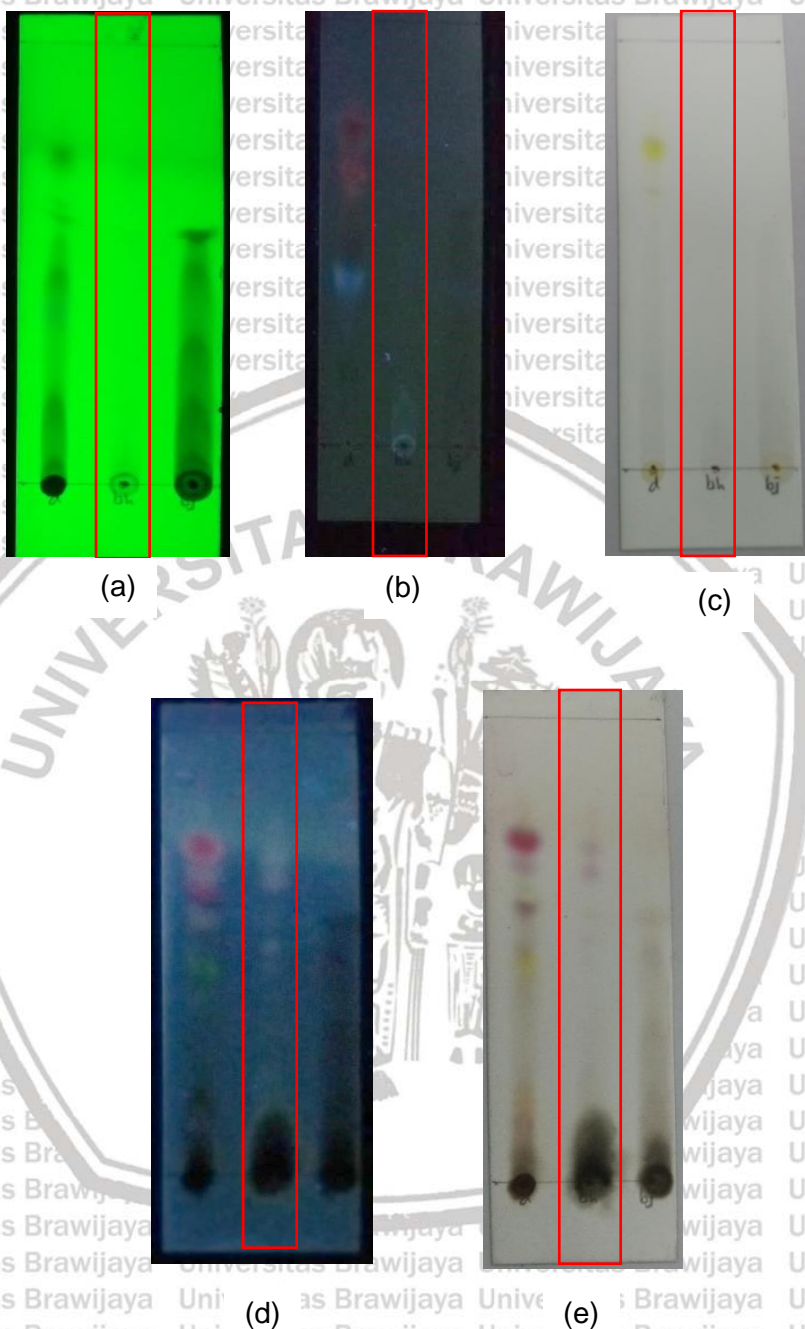
- Fase gerak kloroform : aseton = 6 : 4 (20ml)



Gambar 6. Hasil optimasi fase gerak kloroform : aseton = 6 : 4.

Keterangan : (a) plat KLT pada sinar UV 254 nm tanpa diberi reagen; (b) plat KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (c) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%.

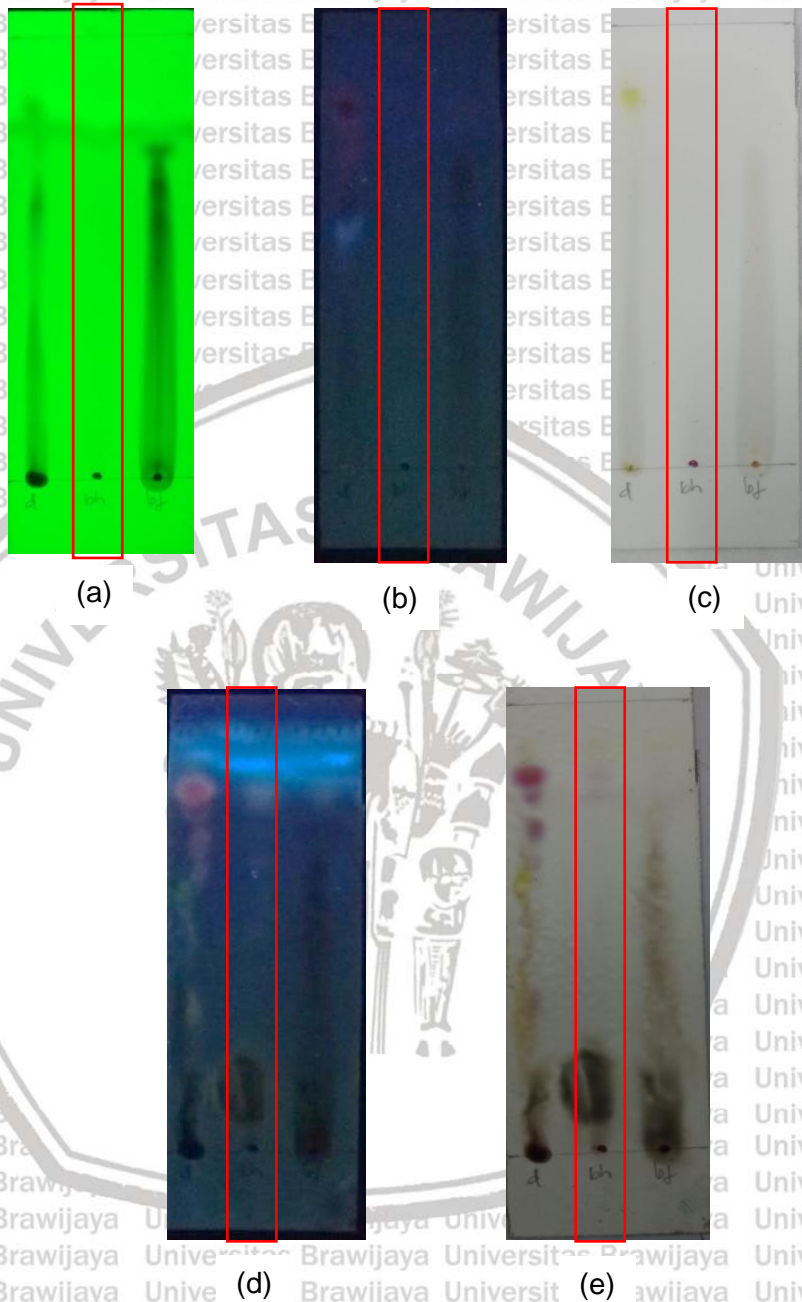
- Fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat = 4 : 5,75 : 0,25



Gambar 7. Hasil optimasi fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat = 4 : 5,75 : 0,25.

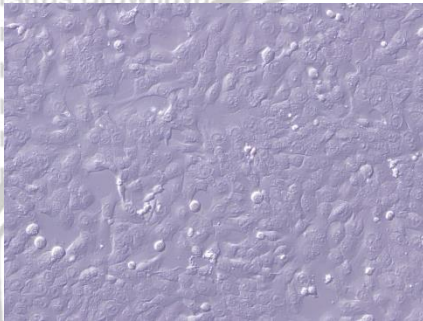
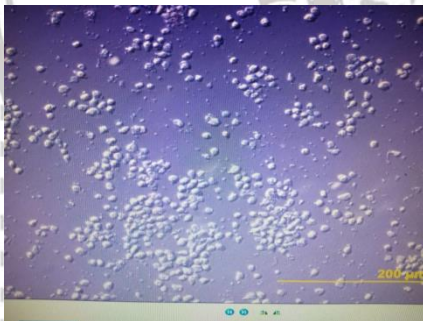
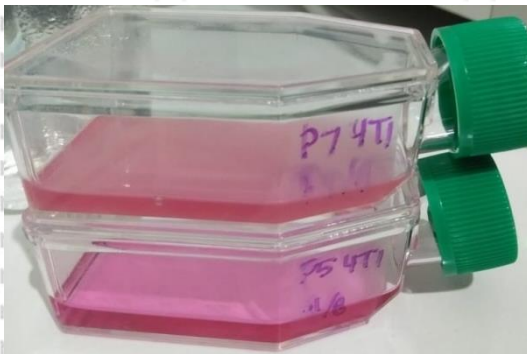
Keterangan : (a) plat KLT pada sinar UV 254 nm tanpa diberi reagen; (b) plat KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (c) plat KLT pada sinar tampak sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (d) plat KLT pada sinar UV 366 nm setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (e) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%.

- Fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat = 3 : 6,5 : 0,5



Gambar 8. Hasil optimasi fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat = 3 : 6,5 : 0,5.

Keterangan : (a) plat KLT pada sinar UV 254 nm tanpa diberi reagen; (b) plat KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (c) plat KLT pada sinar tampak sebelum disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (d) plat KLT pada sinar UV 366 nm setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%; (e) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot reagen H₂SO₄ 10%.

Lampiran 3. Foto Hasil Perlakuan Sel 4T1**Gambar 9. Sel belum attach****Gambar 10. Sel 80% konfluen****Gambar 11. Sel terkontaminasi****Gambar 12. Kultur Flask yang terkontaminasi**

Lampiran 4. Hasil Perhitungan SPSS dan Excel

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		15
Normal Parameters ^a	Mean	.0000000
	Std. Deviation	30.87559523
Most Extreme Differences	Absolute	.161
	Positive	.161
	Negative	-.112
Kolmogorov-Smirnov Z		.622
Asymp. Sig. (2-tailed)		.834

a. Test distribution is Normal.

Correlations

		KONSENTRASI	VIABILITAS
KONSENTRASI	Pearson Correlation	1	-.727**
	Sig. (2-tailed)		.002
	N	15	15
VIABILITAS	Pearson Correlation	-.727**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	

N	15	15
---	----	----

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Data absorbansi perlakuan

Nama parameter	Absorbansi	Rata-rata
Kontrol sel	0,347	0,346
	0,379	
	0,311	
Kontrol pelarut	0,274	0,274
	0,314	
	0,233	
Kontrol media	0,068	0,07
	0,074	
	0,068	
Buah 400 ppm	0,333	0,344
	0,284	
	0,418	
Buah 500 ppm	0,305	0,262
	0,246	
	0,235	
Buah 600 pmm	0,232	0,212
	0,2	
	0,204	
Buah 700 ppm	0,154	0,176
	0,169	
	0,204	
Buah 800 ppm	0,182	0,0,173
	0,16	
	0,176	