

**POTENSI EKSTRAK BIJI JUWET (*Syzygium cumini*) SEBAGAI
AGEN SITOTOKSIK TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA 4T1**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

Gita Kurnia Ardiani

NIM 175070501111020

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2021



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

POTENSI EKSTRAK BIJI JUWET (*Syzygium cumini*) SEBAGAI
AGEN SITOTOKSIK TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA 4T1

Oleh:

Gita Kurnia Ardiani

NIM 175070501111020

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 7 Mei 2021

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

Dr. apt. Valentina Yurina, 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. 2011068502181001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,



apt. Alvar Febrian Shalas, M.Farm.

NIP. 198502182019031007



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Gita Kurnia Ardiani

NIM : 175070501111020

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, 7 Mei 2021

Yang membuat pernyataan,



Gita Kurnia Ardiani

NIM. 175070501111020



ABSTRAK

Ardiani, Gita Kurnia. 2021. *Potensi Ekstrak Biji Juwet (Syzygium cumini) 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 kanker yang paling sering menyebabkan kematian pada wanita di seluruh dunia. Menurut World Health Organization tahun 2018, terdapat lebih dari 300.000 kasus kanker dengan 16,7% dari total kasus merupakan kanker payudara di Indonesia. Pengobatan kanker payudara dirasa memiliki banyak efek samping yang tidak nyaman, sehingga banyak dikembangkan obat dari tanaman yang dapat digunakan sebagai terapi penunjang kanker payudara, dengan harapan efek samping yang ditimbulkan relatif lebih rendah. Juwet (*Syzygium cumini*) diketahui mengandung metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak biji *Syzygium cumini* sebagai agen sitotoksik dalam menghambat proliferasi sel 4T1 dan mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak biji *Syzygium cumini*. Metode ekstraksi senyawa dilakukan secara maserasi dengan pelarut etanol 96%. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode *MTT assay* pada konsentrasi 400, 500, 600, 700, dan 800 $\mu\text{g/ml}$ dengan tiga kali replikasi sehingga diperoleh persen viabilitas sel dan IC_{50} . Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung metabolit sekunder yaitu fenol, flavonoid, antrakuinon, dan tanin. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* memiliki nilai IC_{50} sebanyak 613,924 $\mu\text{g/ml}$ yang termasuk dalam kategori tidak ada aktivitas sitotoksik menurut kriteria Sajjadi *et al.* (2015). Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* memiliki nilai IC_{50} yang besar sehingga membutuhkan dosis yang tinggi dan tidak potensial untuk dikembangkan sebagai obat kanker payudara stadium IV.

Kata kunci: *Syzygium cumini*, 4T1, sitotoksik, metabolit sekunder.



ABSTRACT

Ardiani, Gita Kurnia. 2021. *Potential of Java Plum Seed Extract (Syzygium cumini) 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 the most common leading cause of death in women worldwide. According to the World Health Organization data in 2018, there are more than 300.000 cancer cases with 16.7% of the total cases are breast cancer in Indonesia. The treatment of breast cancer has many uncomfortable side effects; thus, numerous natural medicines have been developed as supporting therapies for breast cancer, in hope of one with relatively lower side effects. Java plum (*Syzygium cumini*) contains secondary metabolites and known for their efficacy as anticancer. The aim of this research to identify the potential of *Syzygium cumini* seed extract as a cytotoxic agent in inhibiting 4T1 cell proliferation and to identify secondary metabolites contained in the extract. The compound extraction method was done by maceration with 96% ethanol. The cytotoxic test was carried out by the MTT assay method at concentrations of 400, 500, 600, 700, and 800 $\mu\text{g/ml}$ with three replications to obtain percent viability cells and IC_{50} . Based on the research, secondary metabolites were identified to be phenol, flavonoids, anthraquinones, and tannins. The results of the cytotoxic test showed that the *Syzygium cumini* seed extract had an IC_{50} value of 613.924 $\mu\text{g/ml}$ which included in the category of no cytotoxic activity according to Sajjadi et al. (2015). Based on those results, it can be concluded that the *Syzygium cumini* seed extract has a high IC_{50} value so that it requires high doses and not potential to be developed as a treatment for stage 4 breast cancer.

Keywords: cytotoxic activity, *Syzygium cumini*, 4T1 cells, MTT assay.

DAFTAR ISI

JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kanker Payudara.....	6
2.1.1 Epidemiologi.....	6
2.1.2 Etiologi.....	7





2.1.3	Patofisiologi	8
2.1.4	Terapi Farmakologi	9
2.2	Juwet (<i>Syzygium cumini</i>)	10
2.2.1	Taksonomi Tumbuhan	10
2.2.2	Morfologi Tumbuhan	11
2.2.3	Kandungan Senyawa Kimia	11
2.2.4	Aktivitas Antikanker	12
2.3	Metode Maserasi	13
2.4	Skrining Fitokimia	14
2.5	Lini Sel 4T1	17
2.6	MTT Assay	18
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		20
3.1	Kerangka Konsep	20
3.2	Penjelasan Kerangka Konsep	20
3.3	Hipotesis Penelitian	21
BAB IV. METODE PENELITIAN		22
4.1	Rancangan Penelitian	22
4.2	Subyek Penelitian	22
4.3	Variabel Penelitian	22
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian	22
4.5	Bahan dan Alat Penelitian	23
4.5.1	Ekstraksi <i>Syzygium cumini</i>	23
4.5.2	Skrining Fitokimia	23
4.5.3	Kultur Sel 4T1	23

4.5.4	Uji Sitotoksik dengan MTT Assay.....	24
4.6	Definisi Operasional.....	24
4.7	Prosedur Penelitian.....	26
4.7.1	Alur Penelitian.....	26
4.7.2	Ekstraksi <i>Syzygium cumini</i>	26
4.7.3	Skrining Fitokimia.....	27
4.7.3.1	Identifikasi Senyawa Fenol.....	27
4.7.3.2	Identifikasi Senyawa Tanin.....	28
4.7.3.3	Identifikasi Senyawa Antrakuinon.....	28
4.7.3.4	Identifikasi Senyawa Flavonoid.....	28
4.7.3.5	Identifikasi Senyawa Alkaloid.....	29
4.7.3.6	Identifikasi Senyawa Terpenoid.....	29
4.7.3.7	Identifikasi Senyawa Steroid.....	30
4.7.3.8	Identifikasi Senyawa Saponin.....	31
4.7.4	Kultur Sel 4T1.....	31
4.7.4.1	Preparasi Media Kultur DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>) High Glucose.....	31
4.7.4.2	Preparasi Media Kultur Lengkap (MK).....	31
4.7.4.3	Penggantian Media.....	32
4.7.4.4	Panen Kultur Sel.....	33
4.7.4.5	Perhitungan Sel.....	34
4.7.4.6	Cryopreservation.....	35
4.7.4.7	Thawing Cell.....	36
4.7.4.8	Preparasi Sel.....	37

4.7.5	Uji Sitotoksik Metode MTT Assay.....	38
4.7.6	Pengukuran dengan ELISA Reader.....	41
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....		42
5.1	Hasil Ekstraksi <i>Syzygium cumini</i>	42
5.2	Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Biji <i>Syzygium cumini</i>	42
5.2.1	Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Fenol.....	42
5.2.2	Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Tanin.....	43
5.2.3	Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid.....	44
5.2.4	Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid.....	45
5.2.5	Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid.....	46
5.2.6	Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Steroid.....	47
5.2.7	Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Antrakuinon.....	48
5.2.8	Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Saponin.....	49
5.3	Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak Biji <i>Syzygium cumini</i>	50
BAB VI. PEMBAHASAN.....		58
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian.....	58
6.2	Implikasi di Bidang Farmasi.....	63
6.3	Keterbatasan Penelitian.....	63
BAB VII. PENUTUP.....		64
7.1	Kesimpulan.....	64
7.2	Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA.....		66
LAMPIRAN.....		71



DAFTAR GAMBAR

2.1 Tanaman Juwet 10

2.2 Penampakan Plat KLT di Bawah Sinar UV 366 nm Setelah Eluasi Ekstrak Metanol dan Etanol Biji Juwet (*Syzygium cumini*) 16

2.3 Sel Kanker Payudara 4T1 16

2.4 Reaksi MTT 18

3.1 Kerangka Konsep 20

4.1 Alur Penelitian 26

4.2 Desain *Plate* Uji Sitotoksik 40

5.1 Ekstrak Biji *Syzygium cumini* 42

5.2 Plat KLT pada Uji Senyawa Fitokimia Senyawa Fenol 43

5.3 Uji Senyawa Fitokimia Senyawa Tanin 44

5.4 Plat KLT pada Uji Senyawa Fitokimia Senyawa Alkaloid 45

5.5 Plat KLT pada Uji Senyawa Fitokimia Senyawa Terpenoid 46

5.6 Plat KLT pada Uji Senyawa Fitokimia Senyawa Flavonoid 47

5.7 Plat KLT pada Uji Senyawa Fitokimia Senyawa Steroid 48

5.8 Plat KLT pada Uji Senyawa Fitokimia Senyawa Antrakuinon 49

5.9 Uji Senyawa Fitokimia Senyawa Saponin 50

5.10 Hasil Foto Sel 4T1 Kelompok Kontrol dan Kelompok Serial Konsentrasi Sebelum Diberi Sampel pada Perbesaran 100x 52

5.11 Hasil Foto Sel 4T1 Kelompok Kontrol dan Kelompok Serial Konsentrasi Setelah Diberi Sampel pada Perbesaran 100x 53

5.12 Hasil Foto Sel 4T1 Kelompok Kontrol dan Kelompok Serial Konsentrasi Setelah Diberi MTT pada Perbesaran 100x 54

5.13 Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji *Syzygium cumini* terhadap %Viabilitas Sel 4T1 57

DAFTAR TABEL

5.1 Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Fenol	43
5.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid	47
5.3 Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Antrakuinon	49
5.4 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Biji <i>Syzygium cumini</i>	50
5.5 Hasil % Viabilitas	55
5.6 Hasil Perhitungan IC ₅₀	55



DAFTAR SINGKATAN

ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1 dan 2	<i>Breast cancer associated gene 1 dan 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>
DMSO	Dimetil Sulfoksida
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRT	<i>Hormonal Replacement Therapy</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i>
IV	<i>Intravenous</i>
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>
MCF7	<i>Michigan Cancer Foundation 7</i>
MK	Media Kultur
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromida
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>

Rf

Retardaction Factor

SD

Standard Deviation

SPSS

Statistical Product and Service Solutions

UV

Ultra Violet

WFI

Water For Injection





BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyakit dengan angka kematian yang cukup tinggi di Indonesia. Terdapat 348.809 kasus kanker pada tahun 2018 dengan 16,7% dari total kasus merupakan kanker payudara. Di Indonesia, kejadian kanker yang paling sering adalah kanker payudara dan serviks (*World Health Organization*, 2020). Kanker merupakan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol pada bagian manapun dalam tubuh, menyebabkan penurunan fungsi baik organ, sistem organ, maupun tubuh itu sendiri (*American Cancer Society*, 2019).

Kanker payudara merupakan kanker paling umum yang terjadi dan angka kejadian semakin meningkat mulai dari tahun 1980. Banyak kasus kanker payudara terdiagnosa pada stadium awal saat tumor masih kecil dan belum menyebar. Dua variabel yang berkaitan erat dengan terjadinya kanker payudara adalah jenis kelamin dan usia. Kanker payudara lebih umum terjadi pada wanita dan risiko meningkat seiring bertambahnya usia. Selain itu, terdapat beberapa faktor yang meningkatkan risiko kanker payudara, yaitu *menarche* dini, menopause pada usia lanjut, melahirkan pada usia 30 tahun atau lebih, dan faktor genetik di mana riwayat keluarga dengan kanker juga berpengaruh pada peningkatan risiko kanker payudara pada individu (DiPiro *et al.*, 2020). Terdapat pula beberapa gen yang berperan penting dalam inisiasi dan progresivitas tumor, seperti *breast cancer associated gene 1 dan 2 (BRCA1 dan 2)*, *ataxia-telangiectasia mutated (ATM)*, *human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)*,

epidermal growth factor receptor (EGFR), *B-cell lymphoma 2* (*Bcl-2*), dan p53.

Gen-gen tersebut apabila bermutasi menyebabkan tingginya proses proliferasi sel kanker (Sun *et al.*, 2017).

Pengobatan kanker payudara paling umum adalah kemoterapi.

Kemoterapi merupakan terapi dengan menggunakan obat-obatan untuk membunuh atau menekan pertumbuhan sel kanker (*American Cancer Society*, 2015). Tujuan dari pengobatan kanker payudara adalah mencegah tumor

bermetastase. Namun, penggunaan obat kemoterapi jangka panjang menimbulkan efek samping seperti mual, muntah, neuropati perifer, mielosupresi atau supresi sumsum tulang belakang, dan alopecia atau kebotakan (DiPiro *et al.*, 2020).

Oleh karena efek samping obat kemoterapi yang cukup banyak dan membuat pasien tidak nyaman, banyak dikembangkan obat dari tanaman yang dapat digunakan sebagai terapi penunjang untuk kanker payudara dengan

harapan minim efek samping dibandingkan obat konvensional. Beberapa obat antikanker didapat dari tanaman obat, salah satunya adalah alkaloid *vincristine* dan *vinblastine*. Kedua obat tersebut dapat secara efektif menghambat

pertumbuhan sel kanker pada kanker payudara (Dowd *et al.*, 2017). Pemahaman ilmiah mengenai mekanisme kerja tanaman obat sebagai antikanker sangat diperlukan untuk pengembangan obat antikanker yang efektif.

Salah satu tanaman yang diyakini memiliki efek antikanker adalah juwet (*Syzygium cumini*). Tanaman juwet telah lama digunakan sebagai obat tradisional untuk berbagai macam penyakit dan telah banyak diteliti. Potensi biji

juwet terhadap aktivitas antikanker perlu untuk diteliti lebih lanjut. Pada penelitian yang dilakukan Yadav *et al* (2011), ekstrak biji juwet memiliki sifat sitotoksik dan dapat menghambat proliferasi hingga 50% dibandingkan kontrol negatif pada

beberapa sel kanker termasuk sel kanker payudara MCF7, dengan nilai IC_{50} sebesar 110 $\mu\text{g/ml}$ pada lini sel MCF7. MCF7 merupakan lini sel yang mengekspresikan reseptor estrogen (ER+) dan memiliki prognosis yang lebih baik dibandingkan dengan 4T1 yang lebih agresif dan memiliki potensi metastasis lebih tinggi (Eun *et al.*, 2015). Oleh karena itu, perlu untuk meneliti efek antikanker ekstrak biji juwet pada lini sel 4T1 yang cenderung lebih agresif dan memiliki potensi metastasis lebih tinggi serta prognosis yang buruk. Tetapi belum ada yang meneliti potensi ekstrak biji juwet terhadap sel kanker payudara 4T1. Pada penelitian ini, digunakan pengujian sitotoksik MTT assay dikarenakan metode tersebut merupakan metode yang cepat, sederhana, dan mampu mengukur viabilitas sel dan sitotoksitas, sehingga cocok digunakan untuk pengujian pada lini sel 4T1 yang mampu berproliferasi dengan cepat (Aslanturk, 2017).

Berdasarkan latar belakang di atas, sifat sitotoksik sel kanker payudara 4T1 oleh ekstrak biji juwet perlu untuk dipelajari lebih lanjut. Penelitian ini digunakan sebagai data awal dalam mengembangkan potensi ekstrak biji juwet sebagai antikanker yang aman. Setiap tahun, jumlah juwet yang dipanen cukup banyak, sebagai contoh panen buah juwet di Lamongan mencapai 200 kg per tahun. Hal tersebut menyebabkan banyak pula biji juwet yang terbuang sia-sia, selain itu manfaat biji juwet sebagai obat tradisional juga belum banyak dikenal masyarakat, sehingga dengan penelitian ini diharapkan dapat memperkaya penggunaan obat tradisional sebagai penunjang terapi kanker dan meningkatkan nilai ekonomis biji juwet.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak biji juwet (*Syzygium cumini*) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara 4T1?
2. Apa kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak biji juwet (*Syzygium cumini*)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui potensi ekstrak biji juwet (*Syzygium cumini*) sebagai agen sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara 4T1.
2. Mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak biji juwet (*Syzygium cumini*).

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui potensi ekstrak biji juwet sebagai agen sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara 4T1 berdasarkan nilai IC₅₀.
2. Mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak biji juwet (*Syzygium cumini*) berdasarkan uji kromatografi lapis tipis (KLT).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Manfaat akademik dari penelitian ini adalah mengetahui kandungan metabolit sekunder ekstrak biji juwet (*Syzygium cumini*) dan pengaruh ekstrak biji juwet (*Syzygium cumini*) dalam menghambat proliferasi pada sel kanker payudara 4T1, yang hasilnya dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan potensi biji juwet sebagai agen sitotoksik.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Bagi masyarakat umum, penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan informasi mengenai manfaat biji juwet sebagai agen sitotoksik.
2. Bagi praktisi, penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai pertimbangan untuk menggunakan biji juwet sebagai agen sitotoksik.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

2.1.1 Epidemiologi

Di Indonesia, terdapat 348.809 kasus kanker pada tahun 2018 dengan 16,7% dari total kasus merupakan kanker payudara. Dari angka tersebut, kejadian kanker yang paling sering adalah kanker payudara dan serviks (World Health Organization, 2020). Di Amerika Serikat, kanker payudara merupakan penyebab kematian pertama karena kanker, diikuti oleh kanker paru. Angka kejadian kanker payudara di Amerika Serikat sekitar 271,270 dan kematian karena kanker payudara adalah sekitar 42.260 orang pada tahun 2019 (DiPiro *et al.*, 2020).

Angka kejadian kanker payudara meningkat sejak tahun 1980, kemudian laju peningkatan menurun sekitar tahun 1990 dan angka kejadian mulai menurun pada tahun 2000. Penurunan tersebut disebabkan karena berkurangnya penggunaan terapi hormon menopause atau *hormonal replacement therapy* (HRT) pada wanita post-menopause (DiPiro *et al.*, 2020). Insiden kanker payudara terjadi pada berbagai kelompok ras dan etnik. Berdasarkan data statistik pada tahun 2010 hingga 2014, sebanyak kira-kira 91 dari 100.000 kasus merupakan Asia-Amerika (Siegel *et al.*, 2019). Untuk semua kelompok ras dan etnik, insiden kanker payudara banyak terdiagnosa pada stadium awal ketika tumor masih berukuran kecil dan terlokalisasi pada satu tempat. Namun begitu, kanker payudara merupakan penyebab pertama kematian karena kanker pada wanita dengan usia 20 hingga 59 tahun (DiPiro *et al.*, 2020).

2.1.2 Etiologi

Beberapa faktor yang dapat meningkatkan risiko kanker payudara, antara lain:

1. **Usia.** Risiko insiden kanker payudara meningkat seiring bertambahnya usia. Berdasarkan statistik, 1 dari 8 wanita memiliki kemungkinan mengidap kanker payudara dan progresivitas meningkat selama hidupnya (DiPiro *et al.*, 2020).
2. **Menarche dini.** Menarche dini atau menstruasi pertama yang terjadi sebelum umur 12 tahun, meningkatkan risiko perkembangan kanker payudara. Hal tersebut dikarenakan wanita tersebut terekspos hormon estrogen dan semakin lama, di mana hormon tersebut dapat meningkatkan perkembangan tumor (Rianti *et al.*, 2012).
3. **Menopause di usia lanjut (55 tahun atau lebih).** Menopause di usia yang lebih tua juga dapat meningkatkan risiko terkena kanker payudara (DiPiro *et al.*, 2020).
4. **Usia kehamilan pertama 30 tahun atau lebih.** Kehamilan pertama di usia yang lebih tua meningkatkan risiko kanker payudara, yang mungkin disebabkan karena kehamilan memiliki efek perlindungan terhadap terjadinya kanker payudara (Rianti *et al.*, 2012).
5. **Riwayat keluarga.** Wanita dengan riwayat keluarga dengan kanker payudara berisiko 6,44 kali lebih tinggi terkena kanker payudara dibandingkan dengan wanita tanpa riwayat keluarga dengan kanker payudara. Risiko akan semakin meningkat apabila keluarga yang menderita adalah saudara seibu tingkat pertama, seperti ibu, kakak atau adik perempuan, atau anak perempuan. Gen *BRCA* berperan

dalam mengontrol pertumbuhan sel, dan apabila bermutasi menjadi *BRCA1* dan *BRCA2*, fungsi pengontrol pertumbuhan hilang dan memberi kemungkinan pertumbuhan sel menjadi tidak terkontrol. Mutasi gen tersebut dapat diwariskan kepada keluarga (Rianti *et al.*, 2012).

6. Riwayat tumor jinak. Adanya riwayat tumor jinak meningkatkan risiko terkena kanker payudara 2,54 lebih tinggi daripada tanda adanya riwayat tumor jinak (Rianti *et al.*, 2012).

2.1.3 Patofisiologi

Perkembangan kanker payudara dimulai dari perubahan ekspresi gen yang terjadi karena interaksi faktor lingkungan dan faktor genetik. Faktor genetik paling utama penyebab kanker payudara adalah *BRCA1* dan *BRCA2*. Pada sel normal, gen tersebut membantu pembentukan protein dalam rangka memperbaiki DNA yang rusak. Akan tetapi apabila gen tersebut bermutasi, maka menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak normal dan berujung pada kanker. Rata-rata wanita dengan mutasi gen *BRCA1* atau *BRCA2* memiliki risiko terkena kanker payudara lebih tinggi pada usia yang lebih muda, baik salah satu payudara maupun keduanya. Mutasi gen tersebut juga menyebabkan peningkatan risiko kanker ovarium dan kanker lainnya (American Cancer Society, 2019).

Gen-gen lain yang turut berperan dalam perkembangan penyakit kanker payudara adalah *EGFR*. Overekspresi *EGFR* merupakan salah satu penanda adanya kanker. Overekspresi *EGFR* pada kanker payudara ditandai dengan perbesaran ukuran tumor dan prognosis yang buruk (Masuda *et al.*, 2012).

Perkembangan penyakit kanker payudara juga ditandai dengan adanya agregasi dari protein p53 yang bermutasi sehingga menginaktivasi p53. p53 sendiri

merupakan protein yang berperan dalam mencegah perkembangan kanker dengan meregulasi siklus sel dan apoptosis sel akibat stres genotoksik. Mutasi gen p53 menyebabkan individu mudah terkena kanker dan 50% wanita dengan kanker payudara mengalami inaktivasi jalur regulasi p53 (Costa *et al.*, 2018). Protein lain yang juga turut berperan dalam perkembangan kanker payudara adalah *Bcl-2*. Fungsi dari *Bcl-2* adalah berperan sebagai anti-apoptosis, sehingga peningkatan *Bcl-2* dapat menghambat Bax yang adalah pro-apoptosis. Apabila terjadi overekspresi *Bcl-2*, maka dapat terjadi penurunan apoptosis dari sel kanker (Hernawati, 2013).

2.1.4 Terapi Farmakologi

Terapi farmakologi pada kanker payudara meliputi terapi lokal meliputi operasi atau radiasi, terapi sistemik dengan kemoterapi, terapi endokrin atau tertarget, dan kombinasi antara ketiganya. Pemilihan terapi ditentukan dari faktor prognostik dan prediktif, termasuk histologi tumor, karakteristik klinis dan patologi tumor, status biomarker, adanya metastasis, dan status pasien. Terapi sistemik ditentukan terutama dari biomarker seperti status reseptor estrogen, reseptor progesteron, dan *HER2* (Chan, 2018).

Terapi kanker payudara yang umum dilakukan adalah operasi (lumpektomi atau mastektomi) dengan atau tanpa terapi radiasi. Setelah operasi, dapat diberikan terapi sistemik untuk mencegah risiko relaps. Terapi sistemik yang biasa diberikan yaitu tamoksifen atau golongan aromatase *inhibitor* seperti anastrozole, letrozole, dan exemestane. Namun penggunaan tamoksifen dan aromatase *inhibitor* jangka panjang dapat menimbulkan efek samping yang cukup serius. Berdasarkan studi, pasien yang menerima terapi tamoksifen selama 10 tahun akan mengalami peningkatan risiko terkena kanker

endometrium. Pasien yang menjalani terapi aromatase *inhibitor* jangka panjang juga dapat mengalami toksisitas pada tulang yang menyebabkan nyeri tulang, patah tulang, dan osteoporosis (Chan, 2018).

Ada pula agen antikanker berupa antibodi monoklonal, seperti trastuzumab dan pertuzumab, di mana memiliki efek antikanker yang signifikan dan tertarget. Namun agen ini diindikasikan hanya untuk pasien dengan *HER2*-positif dan penggunaan jangka panjang dapat menyebabkan kardiotoxikisitas. Agen antikanker yang lain adalah antrasiklin yang merupakan kemoterapi lini pertama pada kanker payudara bermetastasis. Tetapi antrasiklin memiliki efek samping yaitu dapat menyebabkan kerusakan jantung dan pigmentasi kuku (Chan, 2018).

2.2 Juwet (*Syzygium cumini*)

2.2.1 Taksonomi Tumbuhan

Syzygium cumini (L.) Skeels atau biasa disebut juwet, seperti yang terlihat pada **Gambar 2.1**, merupakan tanaman obat yang banyak ditemukan di negara tropis seperti Indonesia dan Malaysia. Tanaman ini berasal dari India, Bangladesh, Nepal, Sri Lanka, Indonesia, dan Malaysia (Bandioli *et al.*, 2017).

Berikut taksonomi dari juwet (ITIS Report, 2011):



Gambar 2.1 Tanaman Juwet (Sumber: plantsoftheworldonline.org).

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Superdivisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Superbangsa	: Rosanae
Bangsa	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae
Marga	: <i>Syzygium</i>
Jenis	: <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels

2.2.2 Morfologi Tumbuhan

Tumbuhan juwet dapat mencapai tinggi hingga 12-30 meter dengan diameter batang pohon sekitar 0,6-0,9 meter dan memiliki banyak cabang. Biji juwet terdapat di dalam buahnya, berbentuk lonjong dengan warna hijau atau cokelat, memiliki panjang hingga 4 cm (Bijauliya *et al.*, 2016).

2.2.3 Kandungan Senyawa Kimia

Juwet banyak mengandung antosianin, asam elagat, isokuersetin, kaemferol, myricetin, β -sitosterol, dan resveratrol (Ayyanar & Subash-Babu, 2012; Shrikanta *et al.*, 2015). Biji juwet diklaim mengandung alkaloid, jambosine, glikosida jambolin, flavonoid, protein, dan kalsium (Ayyanar & Subash-Babu, 2012). Selain itu, biji juwet mengandung tanin, terpen seperti α -terpineol, eugenol, asam betulinat, serta asam fenolat (Chagas *et al.*, 2015).

2.2.4 Aktivitas Antikanker

Biji juwet dilaporkan memiliki efek antioksidan yang dapat mengikat radikal bebas karena kaya akan kandungan flavonoid dan fenol. Secara tradisional, biji juwet digunakan sebagai antidiabetes. Pada Ayurveda, jus biji juwet digunakan untuk membantu mengobati luka dan simplisia biji digunakan untuk mengobati disentri (Ayyanar & Subash-Babu, 2012). Selain itu, biji juwet juga memiliki efek antibakteri dan antikanker. Menurut penelitian Yadav *et al.* (2011), mekanisme antikanker pada biji juwet adalah penghambatan proliferasi beberapa sel kanker seperti A2780 (sel kanker ovarium), MCF7 (sel kanker payudara), PC-3 (sel kanker prostat, dan H460 (sel kanker paru). Penelitian tersebut juga menyatakan ekstrak biji juwet memiliki efek sitotoksik pada sel-sel kanker dengan nilai IC_{50} sebesar 110 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel MCF7. Menurut Sajjadi *et al.* (2015), nilai IC_{50} dikategorikan menjadi aktivitas sitotoksik tinggi ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$), aktivitas sitotoksik sedang ($IC_{50} 20-200 \mu\text{g/ml}$), aktivitas sitotoksik lemah ($IC_{50} 201-500 \mu\text{g/ml}$), dan tidak ada aktivitas sitotoksik ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$). Berdasarkan kategori tersebut, nilai IC_{50} ekstrak biji juwet terhadap sel kanker payudara MCF7 termasuk dalam aktivitas sitotoksik sedang.

Biji juwet mengandung kuersetin yang mana dapat menghambat proliferasi sel. Kuersetin mampu meningkatkan ekspresi p53 sehingga menekan pertumbuhan sel kanker payudara (Seo *et al.*, 2016). Selain kuersetin, biji juwet juga mengandung resveratrol yang mampu menghambat agregasi p53 secara *in vitro*, sehingga regulasi siklus sel dapat kembali normal (Costa *et al.*, 2018). Resveratrol juga mampu mengaktivasi ATM yang akan menarget p53 dalam regulasi perbaikan DNA (Gatz *et al.*, 2008). Selain itu, resveratrol juga dapat memodulasi ekspresi *BRCA1* dan *BRCA2* berdasarkan uji *in vitro* dengan

mengubah jalur ekspresi gen dari jalur reseptor estrogen menjadi jalur yang belum diketahui, sehingga mampu menekan overekspresi *BRCA1* dan *BRCA2* (Corre *et al.*, 2004). Kandungan lain pada biji juwet yang lain yaitu myricetin dan asam betulinat dapat berperan sebagai penghambat proliferasi sel dan sitotoksik pada sel kanker (Batra & Sharma, 2013). Selain itu, kandungan biji juwet yang lain adalah β -sitosterol. β -sitosterol mampu menghambat *EGFR* dengan berikatan pada sisi aktif dari *EGFR* dengan afinitas ikatan yang tinggi, sehingga dapat memperbaiki prognosis kanker payudara (Sundari & Sen, 2013). Selain itu, biji juwet juga mengandung asam elagat yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker, anti-proliferasi, dan menginduksi apoptosis dengan menurunkan overekspresi dari *Bcl-2* (Hernawati, 2013).

2.3 Metode Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara sederhana. Kelebihan dari metode ini adalah perlakuannya sederhana, sedangkan kekurangannya adalah membutuhkan banyak volume pelarut dan waktu yang lama dalam ekstraksi. Maserasi pada umumnya menggunakan pelarut air, pelarut yang dapat larut dalam air, ataupun pelarut yang tidak dapat larut dalam air. Kemudian, suhu yang diperlukan saat proses maserasi adalah suhu ruang dan tekanan yang diperlukan adalah tekanan atmosfer. Beberapa studi menyatakan bahwa ekstraksi dengan metode maserasi cocok untuk menarik senyawa flavonoid (Zhang *et al.*, 2018).

Prinsip dari maserasi adalah merendam bahan tanaman (dapat berupa bagian tanaman yang telah dihancurkan atau berbentuk serbuk) dengan pelarut dalam wadah tertutup, lalu disimpan pada suhu ruang selama minimal 3 hari

dengan pengadukan yang sering. Proses tersebut diharapkan dapat memecah dinding sel tanaman dan senyawa fitokimia akan ditarik oleh pelarut. Kemudian, hasil maserasi dilakukan filtrasi (Azwanida, 2015).

2.4. Skrining Fitokimia

Senyawa fitokimia merupakan senyawa yang memiliki aktivitas farmakologi yang ditemukan pada bagian tanaman, seperti akar, batang, daun, buah, atau biji. Skrining fitokimia merupakan analisis kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa fitokimia apa saja yang terdapat dalam suatu ekstrak tanaman. Skrining fitokimia dilakukan menggunakan metode sederhana yang dilakukan sesuai golongan senyawa yang diinginkan (Bandiola, 2018).

1. Alkaloid. Golongan senyawa alkaloid dapat diuji menggunakan uji Dragendroff, Mayer, Valser, Wagner, dan Hager. Uji Dragendroff dilakukan dengan menggunakan reagen Dragendroff (larutan kalium bismuth iodida) yang akan terbentuk endapan berwarna merah apabila terdapat alkaloid. Uji Mayer dilakukan dengan menggunakan 2 tetes reagen Mayer (larutan kalium merkuri iodida) yang akan terbentuk endapan berwarna putih apabila terdapat alkaloid. Uji Valser dilakukan dengan menggunakan reagen Valser (larutan kalium iodida dalam merkuri iodida) yang akan terbentuk endapan berwarna coklat kemerahan apabila terdapat alkaloid. Uji Wagner dilakukan dengan menggunakan reagen Wagner (larutan iodin dalam kalium iodida) yang akan terbentuk endapan berwarna coklat kemerahan apabila terdapat alkaloid. Uji Hager dilakukan dengan menggunakan reagen Hager

(larutan asam pikrat jenuh) yang akan terbentuk endapan berwarna kuning apabila terdapat alkaloid.

2. Flavonoid. Golongan senyawa flavonoid dapat diuji menggunakan uji alkali, Shinoda, serta Bate-Smith dan Metcalf. Uji alkali dilakukan dengan menggunakan larutan NaOH yang akan berubah warna menjadi kuning pekat dan akan berubah lagi menjadi tidak berwarna setelah penambahan asam apabila terdapat flavonoid. Uji Shinoda dilakukan dengan menggunakan 0,5 ml HCl dan logam magnesium yang akan berubah warna menjadi kemerahan apabila terdapat flavonoid. Uji Bate-Smith dan Metcalf dilakukan dengan menggunakan 0,5 ml HCl pekat, lalu dipanaskan dalam *water bath* selama 15 menit, dan diamati selama 1 jam. Akan terbentuk warna merah atau violet apabila terdapat flavonoid.

3. Tanin. Golongan senyawa tanin dapat diuji menggunakan uji ferri klorida dan gelatin. Uji ferri klorida dilakukan dengan menggunakan larutan ferri klorida 5%. Akan terjadi perubahan warna menjadi hijau gelap atau biru gelap apabila terdapat tanin. Uji gelatin dilakukan dengan menggunakan larutan gelatin 1% yang akan terbentuk endapan berwarna putih apabila terdapat tanin.

4. Terpenoid dan steroid. Golongan senyawa terpenoid dan steroid dapat diuji menggunakan uji Salkowski dan Libermann-Burchard. Uji Salkowski dilakukan dengan menggunakan H_2SO_4 pekat yang akan berubah warna menjadi kuning atau coklat kemerahan apabila terdapat terpenoid dan steroid. Uji Libermann-Burchard dilakukan dengan menggunakan asetat anhidrida, lalu dididihkan dan didinginkan, kemudian ditambah asam

sulfat pekat. Akan terbentuk cincin coklat yang menandakan adanya steroid.

Skrining fitokimia juga dapat dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Pada penelitian Kothari *et al* (2011), dilakukan skrining fitokimia menggunakan metode KLT dan pereaksi warna. Metode KLT dilakukan pada ekstrak etanol dan metanol biji juwet (*Syzygium cumini*) menggunakan plat silika gel 60 F₂₅₄ dan eluen n-butanol:air (1:1), kemudian hasilnya diobservasi menggunakan sinar UV 254 serta 366 nm yang ditunjukkan pada **Gambar 2.2**.

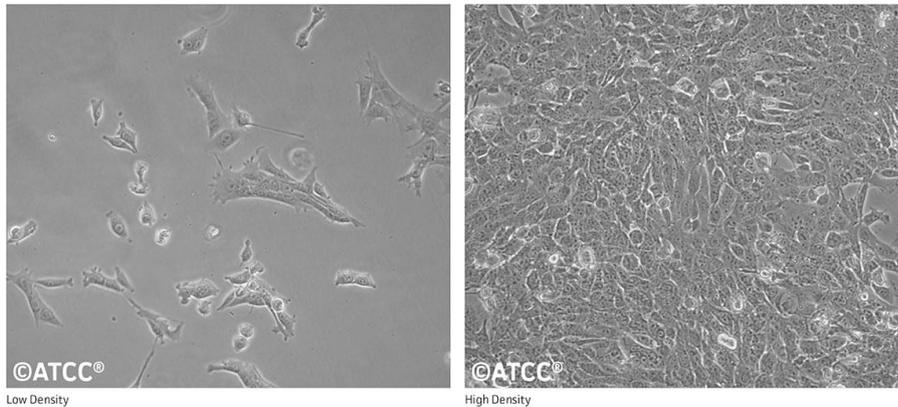
Hasil menunjukkan adanya senyawa kuersetin dan asam ellagat dalam ekstrak etanol dan metanol biji juwet (*Syzygium cumini*). Sedangkan pengujian menggunakan metode pereaksi warna, pada ekstrak etanol dan metanol biji juwet terdapat fenol, alkaloid, dan flavonoid.



Gambar 2.2 Penampakan Plat KLT di Bawah Sinar UV 366 nm Setelah Eluasi Ekstrak Metanol Biji Juwet (*Syzygium cumini*) (Sumber: Kothari *et al.*, 2011).

2.5 Lini Sel 4T1

ATCC Number: CRL-2539
Designation: 4T1



Gambar 2.3 Sel Kanker Payudara 4T1 (Sumber: ATCC, 2008). Keterangan: pengamatan menggunakan mikroskop *inverted*. Kiri: sel belum konfluen. Kanan: sel sudah konfluen.

Sel 4T1, yang ditunjukkan pada **Gambar 2.3**, merupakan suatu model sel kanker payudara yang didapat dari jaringan payudara mencit (*Mus musculus*).

Model sel ini menyerupai sel kanker payudara stadium IV pada manusia yang berproliferasi dan bermetastasis secara cepat. Sel 4T1 selain berproliferasi di payudara juga dapat bermetastasis ke jaringan paru, hati, nodus limfa, dan otak.

Model sel ini umumnya digunakan untuk menguji efektivitas agen kemoterapi yang relevan terhadap manusia. Morfologi sel 4T1 berbentuk pipih dengan ujung meruncing seperti pada **Gambar 2.3**. Pada proses kultur, sel 4T1 melekat pada dasar namun tidak diperbolehkan hingga konfluen dan perlu dilakukan subkultur ketika mencapai 80% konfluensi. Untuk melepas sel dari dasar, digunakan larutan tripsin-EDTA dan didiamkan sejenak pada suhu ruang atau pada 37°C hingga sel terlepas. Kultur sel dikondisikan dalam penyimpanan dengan suhu 37°C dan media harus diganti setiap 2 atau 3 hari (ATCC, 2008).

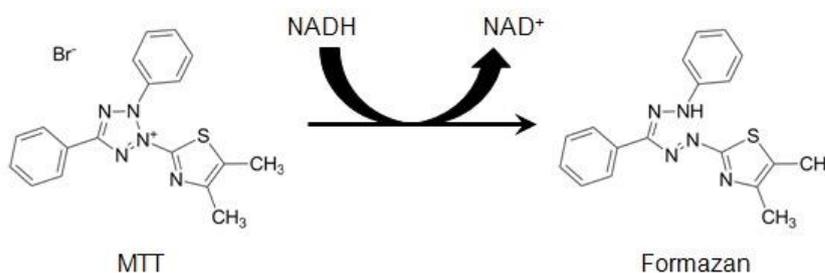
2.6 MTT Assay

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromida) assay

merupakan pengujian yang berdasarkan pada perubahan *MTT* menjadi kristal formazan oleh sel hidup, yang menandakan adanya aktivitas mitokondria.

Formazan adalah zat berwarna ungu yang tidak larut air. *MTT* assay banyak digunakan untuk menguji efektivitas obat sitotoksik pada lini sel. Pengujian ini dilakukan pada 96 *well plate*. Prinsip dari *MTT* assay adalah aktivitas mitokondria pada sel hidup adalah konstan dan adanya peningkatan atau penurunan jumlah

sel hidup secara linier berhubungan dengan aktivitas mitokondria. Konsentrasi formazan yang terbentuk diukur dengan *plate reader* pada panjang gelombang 540 dan 720 nm. Semakin ungu warna formazan yang terbentuk yang ditunjukkan dalam nilai absorbansi menunjukkan aktivitas mitokondria yang semakin banyak, yang berarti jumlah sel hidup semakin banyak (Meerloo *et al.*, 2011). Sel hidup dengan metabolisme yang aktif akan mengubah *MTT* menjadi kristal formazan berwarna ungu dengan melibatkan NADH seperti yang tergambar pada **Gambar 2.4** (Riss *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Reaksi MTT (Sumber: Riss *et al.*, 2013)

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan *ELISA reader*.

ELISA merupakan metode analitik kuantitatif yang mengukur kerapatan cahaya

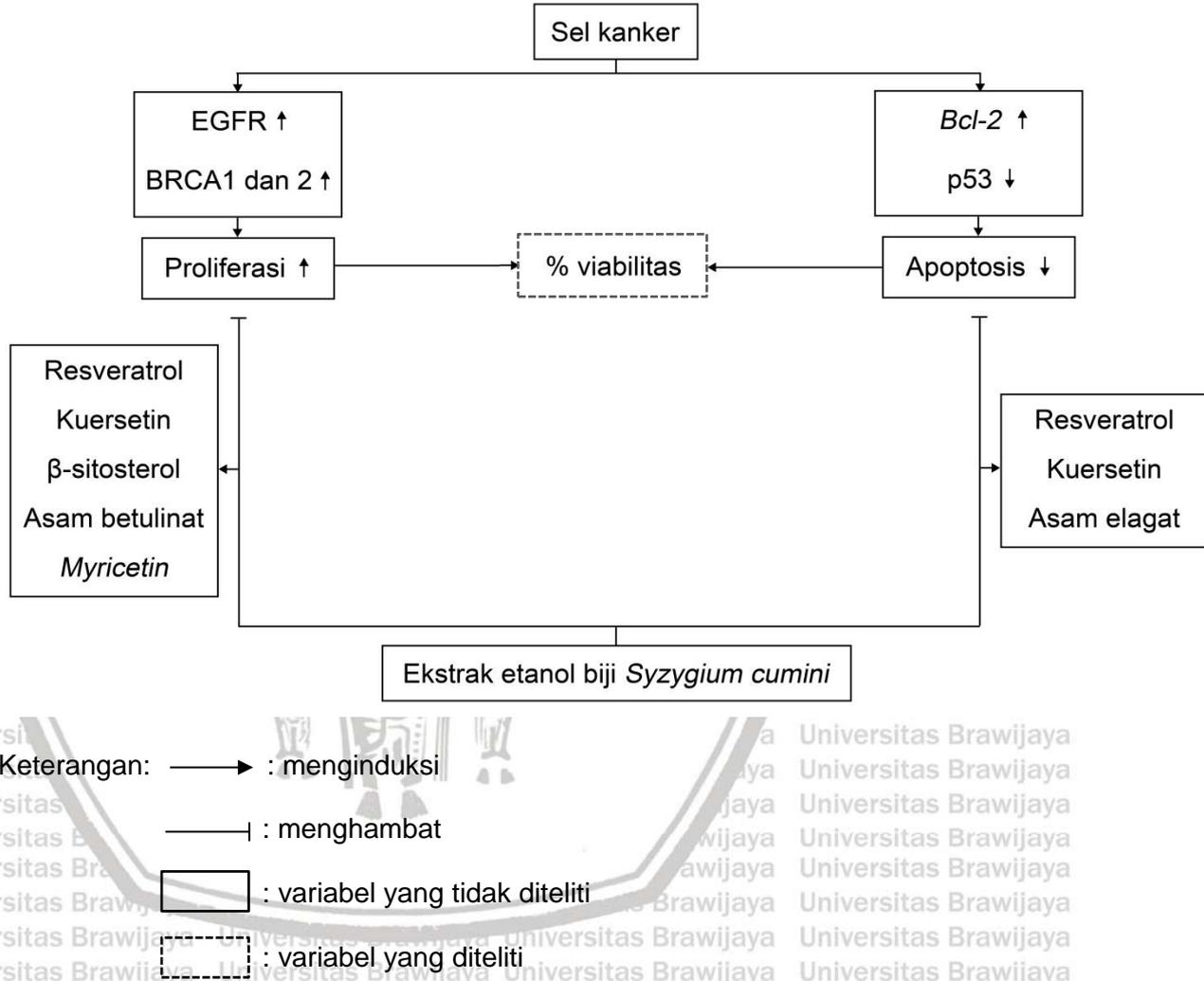
hasil dari interaksi antara materi dan cahaya yang dinyatakan dalam nilai absorbansi. Setelah reagen MTT diberikan pada sel dan diinkubasi dalam waktu tertentu, nilai absorbansi sampel diukur menggunakan ELISA reader, lalu kerapatan cahaya antara sel yang diberi perlakuan dibandingkan dengan sel kontrol, yang kemudian hasilnya dinyatakan sebagai % viabilitas (Winikoff *et al.*, 2005).

MTT assay yang digunakan untuk menguji lini sel biasanya digunakan untuk mengukur sensitivitas obat terhadap pembelahan sel. Obat yang sensitif terhadap pembelahan sel akan menunjukkan hasil penurunan dari jumlah lini sel. Apabila suatu konsentrasi obat diujikan pada lini sel dan menyebabkan 50% penghambatan pada lini sel bila dibandingkan dengan kontrol, maka konsentrasi tersebut adalah IC_{50} (Meerlo *et al.*, 2011).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Perkembangan sel kanker payudara terjadi karena adanya mutasi gen. Gen-gen yang turut berperan dalam perkembangan penyakit adalah *BRCA1* dan *BRCA2*, *EGFR*, *Bcl-2* dan *p53*. Pada wanita dengan kanker payudara, terjadi

overekspresi *Bcl-2*, *BRCA 1* dan *2*, dan *EGFR*, sedangkan *p53* terinaktivasi. Hal tersebut menyebabkan peningkatan proliferasi sel dan menurunkan apoptosis sel kanker.

Salah satu tanaman yang dapat mengatasi kanker payudara adalah juwet (*Syzygium cumini*). Biji juwet mengandung resveratrol, kuersetin, β -sitosterol, asam betulinat, dan myricetin yang dapat menghambat proliferasi dari sel kanker.

Kuersetin mampu menghambat pertumbuhan sel dan menginduksi apoptosis sel kanker payudara dengan meningkatkan ekspresi *p53*, berujung pada penekanan pertumbuhan sel kanker payudara. Resveratrol mampu menghambat agregasi *p53*, sehingga regulasi siklus sel dapat kembali normal, serta mampu mengaktifasi *ATM* yang akan menarget *p53* dalam regulasi perbaikan DNA dan memodulasi ekspresi *BRCA1* dan *BRCA2*. Myricetin dan asam betulinat dapat berperan sebagai penghambat proliferasi sel dan sitotoksik pada sel kanker. β -sitosterol mampu menghambat *EGFR* sehingga dapat memperbaiki prognosis kanker payudara. Asam elagat mampu menurunkan ekspresi *Bcl-2* sehingga dapat meningkatkan apoptosis dari sel kanker.

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah:

1. Ekstrak etanol biji juwet (*Syzygium cumini*) bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara 4T1.

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 jenis interaksi dari kombinasi ekstrak *Syzygium cumini* pada kultur sel 4T1.

4.2 Subjek Penelitian

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

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian adalah konsentrasi ekstrak *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 *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 dilakukan selama bulan September 2019-November 2020.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Ekstraksi *Syzygium cumini*

Bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah biji *Syzygium cumini*, etanol pa (EMSURE®), dan kain penyaring. Alat yang digunakan adalah *stirrer* (IKA®), *rotary evaporator* (IKA®), oven (Memmert®), corong kaca, toples, neraca analitik (Ohaus®), dan batang pengaduk.

4.5.2 Skrining Fitokimia

Bahan yang digunakan untuk skrining fitokimia adalah ekstrak etanol biji *Syzygium cumini*, etanol pa (EMSURE®), etil asetat pa (#928003, J.T.BAKER®, USA), aseton pa (#A-1005, SMART-LAB®, Indonesia), asam formiat (EMSURE®), asam asetat glasial pa (EMSURE®), toluene pa (EMSURE®), vanillin asam sulfat pa (EMSURE®), aquades (Amidis), n-butanol pa (EMSURE®), AlCl_3 pa (EMSURE®), reagen Dragendroff (EMSURE®), asam sulfat konsentrat pa (#A01092, SMART-LAB®, Indonesia), FeCl_3 pa (EMSURE®), gelatin 1% (EMSURE®), KOH (EMSURE®), reagen Libermann-Burchard (EMSURE®). Alat yang digunakan adalah plat KLT silika GF 254 nm, vial, kertas saring, pinset, pipet volume 0,5; 1; 2; 5, pipa kapiler, kaca persegi, *hot plate* (Cimarec®), dan *chamber*.

4.5.3 Kultur Sel 4T1

Bahan yang digunakan dalam proses kultur sel 4T1 adalah media padat DMEM *High Glucose* (#12800017, Gibco®, USA), aquabidest 1000ml (WIDA WI™ Unicap), NaHCO_3 , HCl, dan NaOH, penisilin-streptomisin, hepes (Gibco®), FBS (*Fetal Bovine Serum*) *qualified* (#BCBW5652, Sigma®, USA), tripsin-EDTA (#25200056, Gibco®, Canada), DMSO, dan PBS. Alat yang digunakan dalam proses kultur sel 4T1 adalah beaker glass volume 1000 ml (IWAKI), *magnetic*

stirrer (IKA®), pH-meter (LAQUA®), conical tube 15 ml (FALCON), conical tube 50 ml (FALCON), mikropipet 100-1000 µl (Dragon-med®), mikropipet 20-200 µl (Dragon-med®), membran filter 0,22 mikron (#16534-K, Minisart®, Germany), spuit 10 ml (OneMed), cell scraper (costar®), sentrifuge, mikroskop inverted (Olympus), hemasitometer (ASSISTENT), flask (Sorfa®), 96-well plate (costar®), tabung reaksi kecil atau microtube, rak tabung kecil, sonikator, timbangan analitik, dan counter.

4.5.4 Uji Sitotoksik dengan MTT assay

Bahan yang digunakan dalam proses uji sitotoksik dengan MTT assay adalah PBS, media kultur DMEM, DMSO, MTT 5 ml/ml dalam PBS (50 mg MTT dan 10 ml PBS), dan aluminium foil. Alat yang digunakan dalam proses uji sitotoksik dengan MTT assay adalah mikropipet 200µl, mikropipet 1000µl, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, 96-well plate, conical tube, dan ELISA reader.

4.6 Definisi Operasional

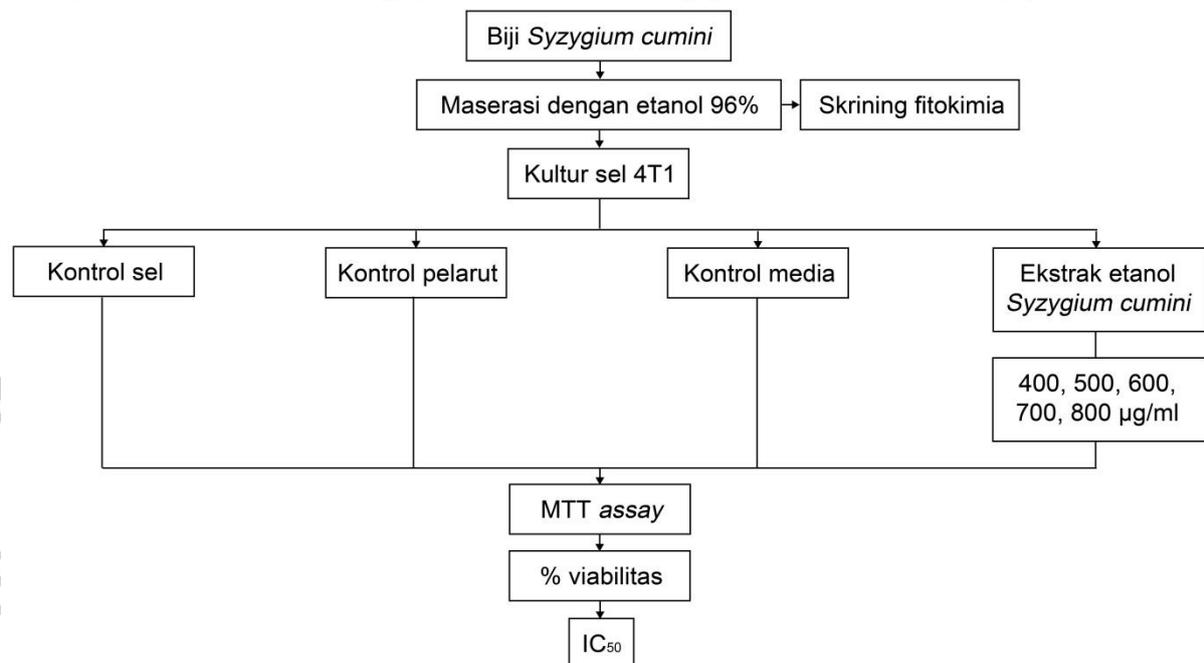
Definisi operasional pada penelitian ini adalah

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 dengan morfologi berbentuk pipih dengan ujung meruncing.
2. Ekstrak biji *Syzygium cumini* diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 80%.
3. Maserasi adalah metode perendaman sampel pada temperatur kamar menggunakan pelarut yang sesuai, menggunakan pengadukan, dan penyaringan berulang kali dalam suhu ruang.

4. Prinsip MTT assay adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen *stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka menandakan jumlah sel hidup semakin banyak.
5. IC_{50} adalah dosis ekstrak biji juwet dari pengujian MTT yang mampu menghambat proliferasi sel 4T1 sebesar 50%.
6. Persentase viabilitas sel adalah persen jumlah sel hidup dibandingkan jumlah keseluruhan sel. Persentase viabilitas diperoleh dari pembacaan absorbansi oleh *ELISA reader* yang kemudian dimasukkan ke dalam rumus hingga diperoleh hasil berupa persentase.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.7.2 Ekstraksi *Syzygium cumini*

Prosedur ekstraksi *Syzygium cumini* dengan metode maserasi dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Biji *Syzygium cumini* dipisahkan dari daging buah.
2. Ditimbang 180 g biji *Syzygium cumini*.
3. Disiapkan etanol 96% sebanyak 1800 mL.
4. Etanol 96% dibagi untuk tiga kali tahap maserasi.
5. Biji juwet dihancurkan dengan diblender menggunakan sedikit dari pelarut maserasi I.
6. Bubur biji juwet ditambahkan sisa pelarut maserasi I dan dimasukkan ke toples kaca.

7. Diaduk dengan menggunakan *overhead stirrer* dengan kecepatan 100 rpm selama 30 menit kemudian didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang.
8. Hasil rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring.
9. Proses diulang sebanyak 2x (prosedur 2 dan 4).
10. Hasil saringan (filtrat) diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan kecepatan 80 rpm.
11. Diperoleh ekstrak kental *Syzygium cumini*.
12. Ekstrak dimasukkan oven pada suhu 40°C agar didapatkan ekstrak kering biji *Syzygium cumini*.

4.7.3 Skrining Fitokimia

4.7.3.1 Identifikasi Senyawa Fenol

1. Disiapkan plat KLT silika GF 254 nm dengan ukuran 2x10 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. Sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml.
5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (4 µl).
6. Plat KLT yang telah dieluasi dikeringkan, kemudian diamati di bawah sinar UV 254 nm.
7. Disemprot dengan penampak noda FeCl₃.
8. Diamati kembali pada sinar tampak.
9. Dihitung R_f masing-masing noda.

4.7.3.2 Identifikasi Senyawa Tanin

1. Disiapkan tabung reaksi.
2. Sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml.
3. Ditetaskan gelatin 1% hingga terbentuk endapan berwarna putih.

4.7.3.3 Identifikasi Senyawa Antrakuinon

1. Disiapkan plat KLT silika GF 254 nm dengan ukuran 2x10 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. Sampel dilarutkan dalam etanol 0,5 ml.
5. Ditotolkan sampel pada plat KLT yang telah dibuat sebanyak 2 totolan (4 µl).
6. Plat KLT dieluasi dengan menggunakan fase gerak yang telah dibuat.
7. Plat KLT yang telah dieluasi dikeringkan, kemudian disemprot dengan penampak noda KOH 10% dan diamati di bawah sinar sinar tampak.
8. Dihitung Rf masing-masing noda.

4.7.3.4 Identifikasi Senyawa Flavonoid

1. Disiapkan plat KLT silika GF 254 nm dengan ukuran 2x10 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. 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, lalu dilihat di bawah sinar UV 366 nm.
8. Disemprot dengan penampak noda $AlCl_3$.
9. Diamati kembali pada sinar tampak.
10. Dihitung R_f masing-masing noda.

4.7.3.5 Identifikasi Senyawa Alkaloid

1. Disiapkan plat KLT silika GF 254 nm dengan ukuran 2x10 cm serta kertas saring 3x10 cm.
2. Dibuat fase gerak sebanyak 10 ml dengan perbandingan etil asetat : aseton : asam format = 4 : 5,75 : 0,25.
3. Fase gerak dijenuhkan dengan menggunakan kertas saring.
4. 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. Plat KLT yang telah dieluasi dikeringkan, kemudian disemprot dengan penampak noda Dragendorff dan diamati di bawah sinar tampak.
8. Dihitung R_f masing-masing noda.

4.7.3.6 Identifikasi Senyawa Terpenoid

1. Disiapkan plat KLT silika GF 254 nm dengan ukuran 2x10 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. 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.
8. Disemprot dengan penampak noda H_2SO_4 , lalu dipanaskan di atas *hotplate* pada suhu 120°C.
9. Diamati kembali pada sinar tampak.
10. Dihitung Rf masing-masing noda.

4.7.3.7 Identifikasi Senyawa Steroid

1. Disiapkan plat KLT silika GF 254 nm dengan ukuran 2x10 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. 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.
8. Disemprot dengan penampak noda Libermann-Burchard.
9. Diamati kembali pada sinar tampak.

10. Dihitung Rf masing-masing noda.

4.7.3.8 Identifikasi Senyawa Saponin

1. Disiapkan tabung reaksi.
2. Sampel dilarutkan dalam aquades.
3. Sampel dikocok kuat hingga terbentuk buih yang stabil dalam 5-10 menit.

4.7.4 Kultur Sel 4T1

4.7.4.1 Preparasi Media Kultur DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*)

High Glucose

Prosedur preparasi media kultur DMEM *high glucose* dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Disiapkan 95 mL aquadest steril (WFI) dalam beaker glass dan tuangkan media bubuk 1,35 gram lalu aduk hingga merata.
2. Ditambahkan 0,37 gram NaHCO_3 pada tiap liter media yang dibuat, kemudian diaduk rata.
3. Ditambahkan hepes 1M sebanyak 1 mL.
4. Ditambahkan aquadest steril hingga volume 100 mL.
5. Diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga semua media padat dan NaHCO_3 dapat larut.
6. *Adjust* pH dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N.
7. Dilakukan sterilisasi media dengan metode filtrasi dengan menggunakan filter 0,2 mikron dan ditampung dalam *conical tube* 50 mL dan disimpan di suhu 4°C.

4.7.4.2 Preparasi Media Kultur Lengkap (MK)

Komposisi media yang digunakan adalah:

Penisilin-Streptomisin 0,75 ml (1,5%)

FBS (Fetal Bovine Serum) 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. Disiapkan *conical tube* volume 50 ml, spuit, dan membran filter 0,22µm.
3. Disemprot (1) dan (2) dengan alkohol 70% dan dimasukkan ke dalam *Laminar Air Flow* (LAF).
4. Diambil 5 ml FBS dengan spuit, difilter dengan membrane filter 0,22µm, dan dituang ke dalam *conical tube*.
5. Diambil 0,75 ml Penisilin-Streptomisin, dengan spuit, difilter dengan membran filter 0,22µm, dan dituang ke dalam *conical tube*.
6. Ditambahkan media cair sampai 50 ml dengan spuit dan difilter dengan membran filter 0,22µm, dan dituang ke dalam *conical tube* 50 ml.
7. Diberi penandaan pada botol (nama media, tanggal pembuatan, dan nama peneliti).
8. Disimpan pada suhu 4°C.

4.7.4.3 Penggantian Media

Prosedur penggantian sel dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Dialiquot PBS dan MK di dalam *conical tube*.
2. Dihisap dan dibuang media lama secara perlahan dengan mikropipet atau pipet pasteur.

3. Dituang 4 ml PBS ke dalam *dish*, digoyang-goyangkan *dish* ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel.
4. Dibuang PBS dengan mikropipet atau pipet pasteur.
5. Dituang 5-7 ml MK ke dalam *dish* yang berisi sel. Homogenkan dan amati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif pada mikroskop *inverted*.
6. Diinkubasi semalam dan ganti MK jika sudah berwarna merah pucat.
7. Diamati keadaan sel sebelum dan setelah diganti media, jika perlu dilakukan pendokumentasian dengan pemotretan.

4.7.4.4 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. Diulang cuci sel 2x dengan PBS sebanyak 4 ml.
4. Ditambahkan 1000µl tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. 1 menit terakhir di-*scrap*.
5. Ditambahkan media ±4 ml untuk menginaktifkan tripsin.
6. Sel diresuspendi dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol).
7. Diamati keadan sel di mikroskop, diresuspendikan kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
8. Ditransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical tube* steril baru.

9. Disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit.
10. Supernatan dibuang dan disisakan ± 1 ml.
11. Diresuspensi sel di dalam *conical tube*.
12. Ditambahkan ± 4 ml MK resuspensi kembali.
13. Dituang sel ke dalam *flask* baru yang telah disiapkan sebanyak 2 *flask* dan ditambah 4 ml MK baru tiap *flask*.
14. Diinkubasi semalam dan ganti MK jika medium sudah berubah warna.

4.7.4.5 Perhitungan Sel

Prosedur perhitungan sel dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Diresuspensi sel di conical tube dari hasil panen sel.
2. Diambil 10 μ l panen sel dan ditambahkan 10 μ l *tripan blue* lalu dihomogenkan dan dipipetkan ke hemasitometer.
3. Dihitung sel di bawah mikroskop inverted dengan *counter*. Cara perhitungan sel dijelaskan dengan ketentuan berikut:

- Dihitung sel pada 4 kamar hemasitometer (16 kotak @kamar).
- Dihitung sel yang berada di batas kiri dan batas bawah.
- Sedangkan sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar di sebelah atas dan disebelah kanan tidak ikut dihitung.

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

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

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

4. Dilakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam conical yang lain (sudah diberi tanda nama sel dan tanggal pembuatan sel) dan ditambah 5-7 ml MK.

5. Sisa suspensi sel dilakukan cryopreservation atau sub kultur sel.

4.7.4.6 Cryopreservation

Prosedur *cryopreservation* dijelaskan dalam tahap-tahap berikut:

1. Disiapkan kultur sel yang 80% konfluen untuk di-cryo, dapat diamati dengan mikroskop *inverted*.
2. Disiapkan *cryo tube*.
3. Dibuat media baru (0,5 ml FBS + 0,5 ml DMSO + 4 ml MK).
4. Dilakukan panen sel sesuai protokol panen sel.
5. Dilakukan perhitungan sel sesuai protokol perhitungan sel.
6. Diresuspensi sel dalam *conical tube* steril.
7. Ditutup *conical tube* dengan rapat. Disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit.
8. Dibuka *conical tube*, dibuang supernatan ke dalam pembuangan.
9. Ditambahkan campuran (3), diresuspensi kembali hingga homogen.
10. Ditransfer suspensi sel dari *conical tube* ke dalam *cryo tube*.
11. Diberi label pada *cryo tube* berupa nama sel dan tanggal penyimpanan.
12. Disimpan di dalam *freezer* -20°C selama 10 menit.
13. Disimpan di dalam *freezer* -80°C, diberi tanda nama sel dan tanggal pembuatan.
14. Dipindah ke dalam tangka nitrogen cair sebelum 1 minggu.

4.7.4.7 Thawing Cell

Prosedur *thawing cell* dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Diambil *cryo tube* yang berisi sel dari *freezer* -80°C .
2. Dicairkan suspensi sel dalam *cryotube* pada suhu kamar hingga tepat mencair.
3. Sambil menunggu mencair, diambil 3 ml media kultur lengkap dalam *conical tube* baru dengan menggunakan membran filter $0,22\ \mu\text{m}$.
4. Dimasukkan *flask* untuk subkultur dan beri penandaan (nama sel dan tanggal pembuatan).
5. Diambil suspensi sel dengan mikropipet $1000\ \mu\text{l}$, dimasukkan tetes demi tetes ke dalam media kultur lengkap yang telah disiapkan.
6. Tutup *conical tube* dengan rapat. Dilakukan sentrifugasi pada $2500\ \text{rpm}$ selama 5 menit.
7. *Conical tube* dimasukkan dalam LAF yang telah disemprot dengan alkohol 70%.
8. Dibuka *conical tube* dan dibuang supernatant ke dalam pembuangan.
9. Ditambahkan 4 ml media kultur lengkap baru dan disuspensikan kembali sel hingga homogeny.
10. Ditransfer masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 *flask*.
11. Ditambahkan masing-masing 5 ml media kultur lengkap ke dalam *flask*.
12. Diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*.
13. Sel disimpan dalam incubator CO_2 dengan suhu 37°C .

4.7.4.8 Preparasi Sel

Prosedur preparasi sel dijelaskan dalam tahap-tahap berikut ini:

1. Dibuat 5 seri konsentrasi dengan rentang 400-800 $\mu\text{g/ml}$, dengan seri konsentrasi 400, 500, 600, 700, dan 800 $\mu\text{g/ml}$. Volume akhir tiap seri konsentrasi untuk perlakuan dibuat minimal 1000 μl (100 μl /sumuran, 5x replikasi).
2. Ditimbang sampel kurang lebih 5 mg dengan seksama di dalam *conical tube*.
3. Dilarutkan dalam aquades 5 ml kemudian dilakukan sonikasi pada suhu 40°C selama 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 MK.
6. Prosedur pengenceran sampel (1000 $\mu\text{g/ml}$ = 1000 ppm = 1000 mg/L = 10 mg/10 ml).
 - a. Ditimbang 10 mg masing-masing sampel dalam botol timbang dan dilarutkan ke dalam pelarut campur sebanyak 10 mL dalam labu ukur sehingga di peroleh konsentrasi 1000 mg/L.
 - b. Diencerkan menjadi 400, 500, 600, 700, dan 800 $\mu\text{g/ml}$ dengan cara diambil sebanyak 400 μL untuk konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$, 500 μL untuk konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$, 600 μL untuk konsentrasi 600 $\mu\text{g/ml}$, dan 700 μL untuk konsentrasi 700 $\mu\text{g/ml}$, dan 800 μL untuk konsentrasi 800 $\mu\text{g/ml}$.
 - c. Perhitungan:

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

- Pengenceran 400 $\mu\text{g/ml}$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V1 = 400 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 400 \mu\text{L}$$

- Pengenceran 500 $\mu\text{g/ml}$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V1 = 500 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 500 \mu\text{L}$$

- Pengenceran 600 $\mu\text{g/ml}$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V1 = 600 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 600 \mu\text{L}$$

- Pengenceran 700 $\mu\text{g/ml}$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V1 = 700 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 700 \mu\text{L}$$

- Pengenceran 800 $\mu\text{g/ml}$

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V1 = 800 \text{ ppm} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 800 \mu\text{L}$$

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 CO_2 .

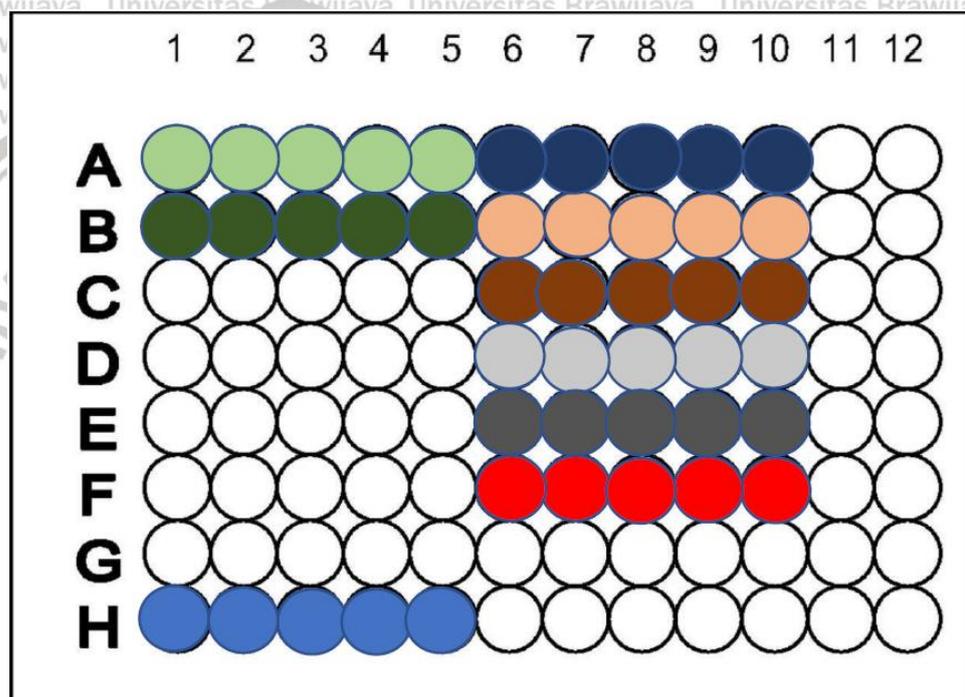
2. Ditransfer sel ke dalam sumuran 96 *well plate*, masing-masing 5×10^3 dengan cara:
 - a. Tiap ml kebutuhan sel ditambahkan MK ad 1,5 ml sebanyak 5 agar distribusi sel lebih homogen.
 - b. Tiap sumuran mengandung campuran sebanyak 100 μL .
3. Diresuspensi kembali sel setiap mengisi 6 sumuran agar tetap homogen.
4. Disisakan 10 sumuran kosong sebagai kontrol media dan blanko.
5. Diamati keadaan sel di mikroskop inverted untuk melihat distribusi sel dan didokumentasikan.
6. Diinkubasi sel di dalam inkubator selama minimal 4 jam.
7. Jika sel belum *attach* dapat diinkubasi kembali maksimal 24 jam.
8. Dibuang media sel di atas tempat buangan dengan mikropipet 100-1000 μL .
9. Dimasukkan 100 μL PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudain buang PBS seperti (8).
10. Dimasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran.
11. Diinkubasi sel didalam inkubator CO_2 selama 24-48 jam.
12. Didokumentasikan kondisi sel menjelang akhir waktu inkubasi.
13. Disiapkan reagen MTT untuk perlakuan (5 mg/ml) dengan cara:
 - Dibuat stok MTT dengan ditimbang 5 mg serbuk MTT, dilarutkan dalam PBS ad 1 ml. kemudian disimpan dalam *freezer* tertutup aluminium foil.
 - 1 ml stok MTT dalam PBS (5 mg/ml) diencerkan dengan MK ad 10 ml (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 formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* DMSO.

17. Berikut adalah desain *plate* yang digunakan:



Keterangan:

● = konsentrasi 400 ppm
 ● = konsentrasi 500 ppm
 ● = konsentrasi 600 ppm
 ● = konsentrasi 700 ppm
 ● = konsentrasi 800 ppm

● = kontrol sel
 ● = kontrol pelarut
 ● = kontrol media
 ● = blanko

Gambar 4.2 Desain *Plate* Uji Sitotoksik

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 persentase 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

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

7. Dianalisa harga IC_{50} dengan Microsoft Excel dengan memasukkan nilai absorbansi dan dihitung persentase sel hidup, serta dilakukan uji korelasi menggunakan SPSS untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi dan %viabilitas sel.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Ekstraksi *Syzygium cumini*

Ekstraksi 180 gram biji *Syzygium cumini* dengan etanol 96% menghasilkan ekstrak etanol biji *Syzygium cumini* dengan berat 16,02 gram dan rendemen sebesar 8,90% yang memiliki karakteristik kering, berwarna coklat, dan bau khas seperti yang terlihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Ekstrak Biji *Syzygium cumini* (Dokumentasi Pribadi).

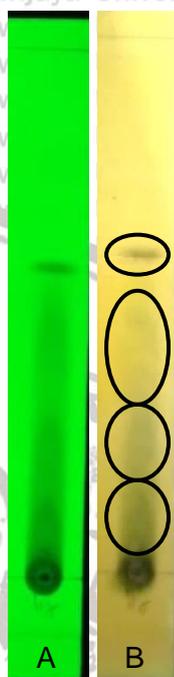
5.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Biji *Syzygium cumini*

Ekstrak biji *Syzygium cumini* kemudian dilakukan uji skrining fitokimia untuk memperoleh informasi terkait golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalamnya. Skrining fitokimia dilakukan menggunakan fase diam plat silika gel GF 254nm dan fase gerak etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25) meliputi skrining fitokimia senyawa fenol, alkaloid, terpenoid, flavonoid, tanin, steroid, antrakuinon, dan saponin.

5.2.1 Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Fenol

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung fenol dengan muncul 3 noda *tailing* berwarna hitam dan 1 noda

berwarna hitam pada sinar UV 254 nm sebelum diberikan penampak noda FeCl_3 dan sinar tampak setelah diberikan penampak noda FeCl_3 . Noda tersebut muncul pada Rf yang dijelaskan pada **Tabel 5.1** seperti pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 Plat KLT pada Uji Skrining Fitokimia Senyawa Fenol. Keterangan: (A) plat KLT pada sinar UV 254 nm sebelum disemprot penampak noda. (B) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot penampak noda FeCl_3 . Terdapat 3 noda *tailing* berwarna hitam dengan Rf 0,075, 0,2125, dan 0,475 dan 1 noda berwarna hitam dengan Rf 0,6. Fase gerak= etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25), fase diam= plat silika gel 254 nm, penampak noda= FeCl_3 dan diamati pada sinar tampak.

Tabel 5.1 Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Fenol

Noda ke-	Perhitungan	Hasil
1	0,6/8	0,075 (<i>tailing</i> , hitam)
2	1,7/8	0,2125 (<i>tailing</i> , hitam)
3	3,8/8	0,475 (<i>tailing</i> , hitam)
4	4,8/8	0,6 (hitam)

5.2.2 Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Tanin

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung tanin dengan muncul serabut berwarna putih melayang saat diberikan gelatin 1% seperti yang terlihat pada **Gambar 5.3**.



Gambar 5.3 Uji Skrining Fitokimia Senyawa Tanin. Keterangan: (A) ekstrak biji *Syzygium cumini* setelah diberi gelatin 1% sebanyak 20 tetes. (B) kontrol ekstrak biji *Syzygium cumini*. Reagen= gelatin 1%.

5.2.3 Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* tidak mengandung alkaloid setelah disemprot penampak noda Dragendroff seperti yang terlihat pada **Gambar 5.4**.

Gambar 5.4 Plat KLT pada Uji Skrining Fitokimia Senyawa Alkaloid.

Keterangan: plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot penampak noda Dragendroff. Fase gerak= etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25), fase diam= plat silika gel 254 nm, penampak noda= Dragendroff dan diamati pada sinar tampak.

5.2.4 Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* tidak mengandung terpenoid setelah diberikan penampak noda H_2SO_4 seperti yang terlihat pada **Gambar 5.5**.



Gambar 5.5 Plat KLT pada Uji Skrining Fitokimia Senyawa Terpenoid.

Keterangan: (A) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot penampak noda H_2SO_4 . (B) plat KLT pada sinar UV 366 nm setelah disemprot penampak noda H_2SO_4 . Fase gerak= etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25), fase diam= plat silika gel 254 nm, penampak noda= H_2SO_4 dan diamati pada sinar tampak.

5.2.5 Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung flavonoid dengan muncul 1 noda *tailing* berwarna kuning kecokelatan pada sinar tampak setelah diberikan penampak noda $AlCl_3$.

Noda tersebut muncul pada R_f yang dijelaskan pada **Tabel 5.2** seperti pada

Gambar 5.6.



Gambar 5.6 Plat KLT pada Uji Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid.

Keterangan: (A) plat KLT pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot penampak noda. (B) plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot penampak noda. Terdapat 1 noda *tailing* berwarna kuning kecokelatan dengan Rf 0,2875. Fase gerak= etil asetat : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25), fase diam= plat silika gel 254 nm, penampak noda= $AlCl_3$ dan diamati pada sinar tampak.

Tabel 5.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid

Noda ke-	Perhitungan	Hasil
1	2,3/8	0,2875 (<i>tailing</i> , kuning kecokelatan)

5.2.6 Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Steroid

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* tidak mengandung steroid setelah diberikan penampak noda Libermann-Burchard seperti yang terlihat pada Gambar 5.7.

Gambar 5.7 Plat KLT pada Uji Skrining Fitokimia Senyawa Steroid.

Keterangan: plat KLT pada sinar tampak setelah disemprot penampak noda Libermann-Burchard. Fase gerak= etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25), fase diam= plat silika gel 254 nm, penampak noda= Libermann-Burchard dan diamati pada sinar tampak.

5.2.7 Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Antrakuinon

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung antrakuinon dengan muncul 1 noda *tailing* berwarna cokelat dan 1 noda berwarna kuning kecokelatan pada sinar tampak setelah diberikan penampak noda KOH 10%. Noda tersebut muncul pada Rf yang dijelaskan pada

Tabel 5.3 seperti pada **Gambar 5.8**.



Gambar 5.8 Plat KLT pada Uji Skrining Fitokimia Senyawa Antrakuinon.

Keterangan: plat KLT pada sinar UV 366 nm setelah disemprot penampak noda. Terdapat 1 noda *tailing* berwarna kuning kecokelatan dengan Rf 0,5875 dan 1 noda berwarna cokelat dengan Rf 0,675. Fase gerak= etil asetat : aseton : asam formiat (4 : 5,75 : 0,25), fase diam= plat silika gel 254 nm, penampak noda= KOH 10% dan diamati pada sinar tampak.

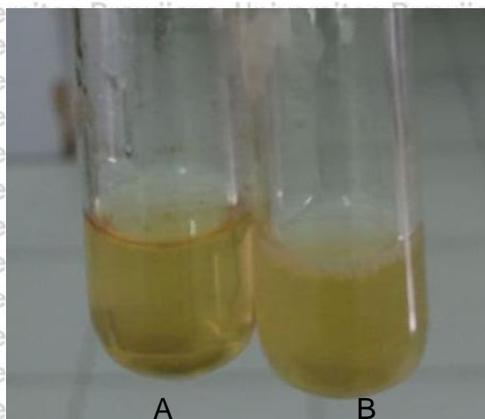
Tabel 5.3 Hasil Uji Skrining Fitokimia Senyawa Antrakuinon

Noda ke-	Perhitungan	Hasil
1	2,3/8	0,2875 (<i>tailing</i> , cokelat)
2	5,4/8	0,675 (kuning kecokelatan)

5.2.8 Hasil Skrining Fitokimia Senyawa Saponin

Skrining fitokimia senyawa saponin yang dilakukan pada ekstrak biji *Syzygium cumini* tidak menunjukkan adanya buih yang terbentuk konstan selama 10 menit setelah ditambahkan aquades dan dikocok seperti yang terlihat pada

Gambar 5.9, menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* tidak mengandung saponin.



Gambar 5.9 Uji Skrining Fitokimia Senyawa Saponin. Keterangan: (A) kontrol ekstrak biji *Syzygium cumini*. (B) Ekstrak biji *Syzygium cumini* setelah ditambahkan aquades dan dikocok lalu didiamkan 10 menit.

Hasil dari skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung beberapa golongan senyawa metabolit sekunder seperti pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Biji *Syzygium cumini*

Skrining Fitokimia	Hasil	Jumlah Noda
Fenol	+	4
Alkaloid	-	-
Terpenoid	-	-
Flavonoid	+	1
Steroid	-	-
Antrakuinon	+	2
Tanin	+	-
Saponin	-	-

Keterangan: (+) mengandung golongan senyawa

5.3 Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak Biji *Syzygium cumini*

Uji sitotoksik pada ekstrak etanol biji *Syzygium cumini* dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol biji *Syzygium cumini* dalam menghambat pertumbuhan sehingga dapat membunuh sel kanker payudara 4T1 dengan MTT assay yang dinyatakan dalam parameter IC_{50} . Hasil yang diperoleh dari metode ini adalah absorbansi yang terukur pada panjang gelombang 595 nm dengan

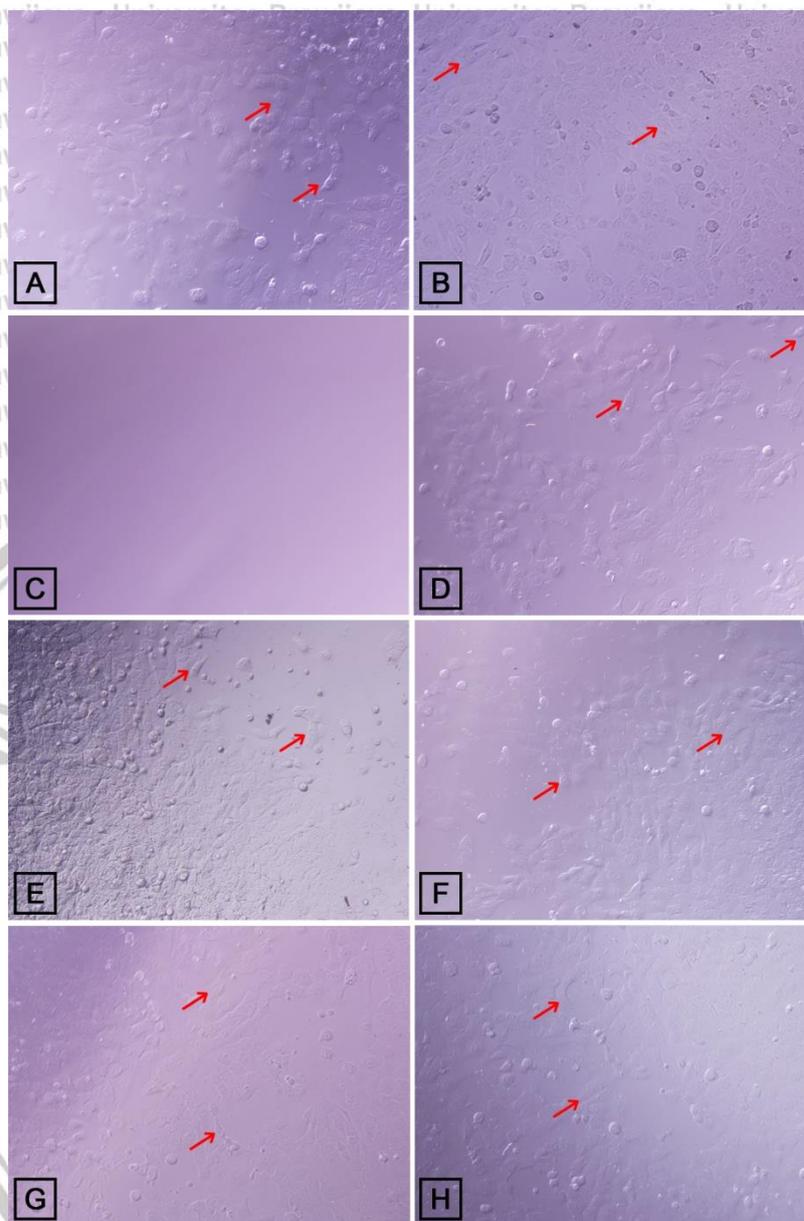
ELISA reader. Persentase viabilitas sel yang diperoleh digunakan untuk mencari regresi linier sehingga diperoleh nilai IC_{50} . Replikasi dilakukan sebanyak 5 kali dengan minimal replikasi 3 kali.

Morfologi sel 4T1 yang belum diberi sampel tampak normal dengan bentuk pipih, dengan ujung meruncing seperti yang tampak pada **Gambar 5.10**.

Morfologi sel 4T1 yang sudah diberi perlakuan sampel ekstrak biji *Syzygium cumini* dan diinkubasi 24 jam mati mengerut dengan bentuk bulat tak beraturan tanpa inti sel dan muncul banyak titik seperti yang tampak pada **Gambar 5.11**.

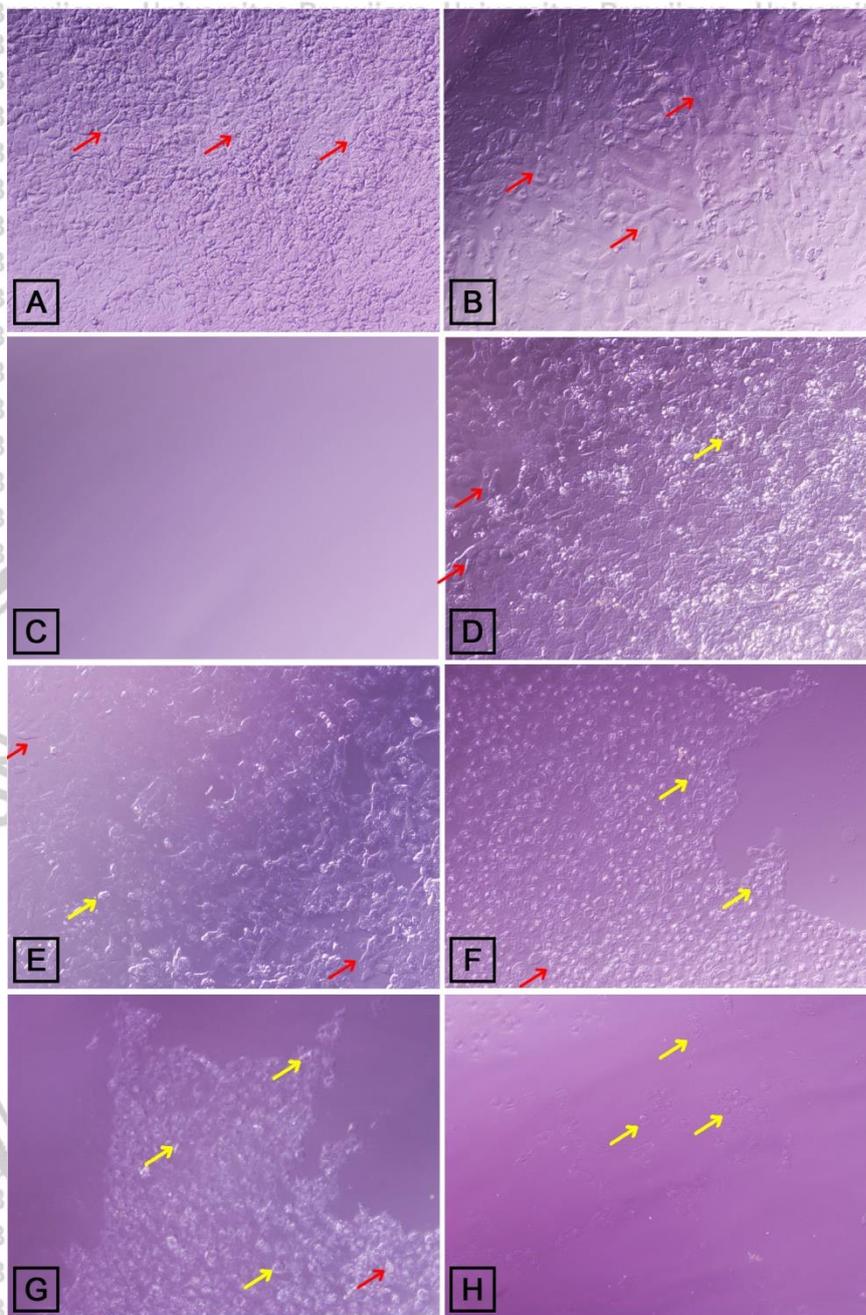
Morfologi sel 4T1 setelah diberikan MTT dan diinkubasi 4 jam akan menunjukkan adanya serabut formazan pada sel yang masih hidup, sedangkan sel yang sudah mati tidak terbentuk serabut formazan ungu dan berwarna transparan, yang menandakan bahwa sel telah lisis seperti tampak pada **Gambar 5.12**. Pada kontrol pelarut, diperoleh nilai absorbansi yang lebih rendah dari kontrol sel yaitu 0,274; 0,233; dan 0,232. Pada kontrol sel diperoleh nilai absorbansi 0,347; 0,311; dan 0,353. Pada kontrol media diperoleh nilai 0,068; 0,068; dan 0,065.

Berdasarkan ketiga kontrol, dapat dilakukan perhitungan untuk mencari persen viabilitas setiap seri konsentrasi sehingga dapat diketahui persentase jumlah sel kanker 4T1 yang masih hidup setelah dipapar dengan ekstrak biji *Syzygium cumini*.

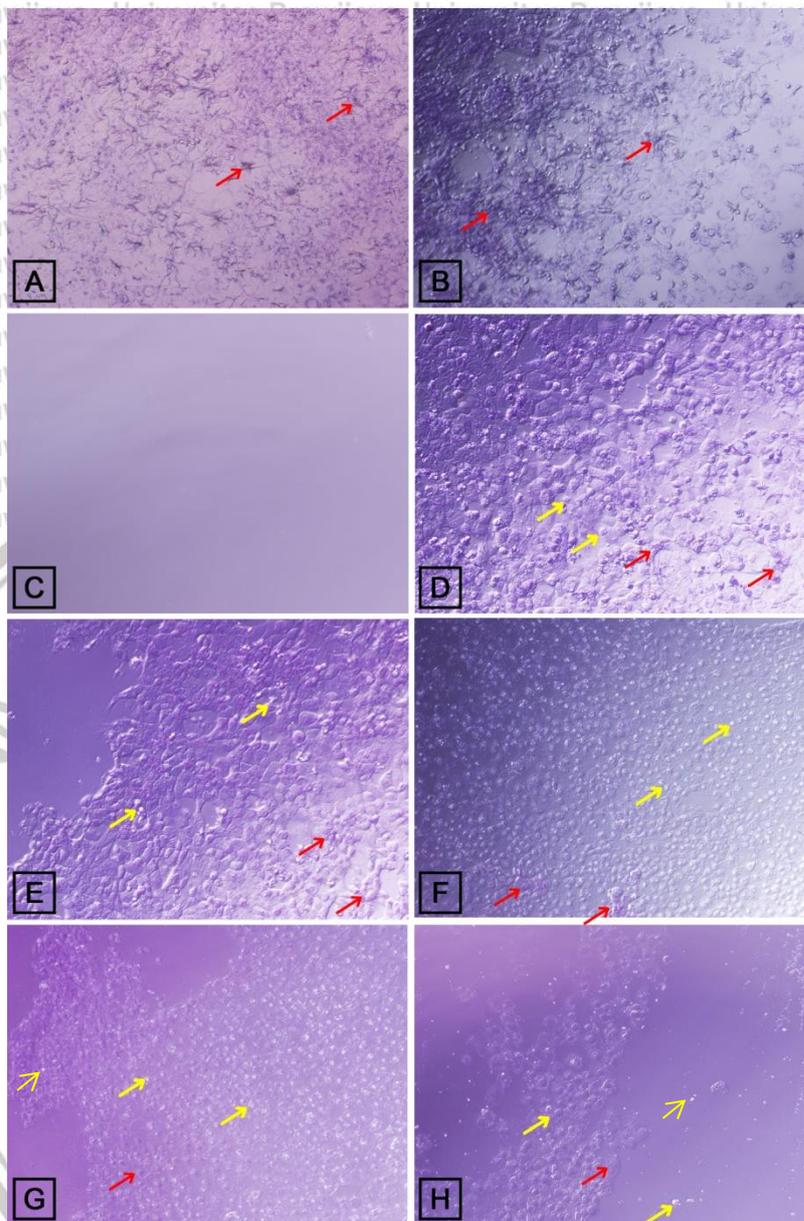


Gambar 5.10 Hasil Foto Sel 4T1 Kelompok Kontrol dan Kelompok Serial Konsentrasi Sebelum Diberi Sampel pada Perbesaran 100x. Keterangan: (A) sel

4T1 kelompok kontrol sel. (B) sel 4T1 kelompok kontrol pelarut. (C) sel 4T1 kelompok kontrol media. (D) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 400 µg/ml. (E) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 500 µg/ml. (F) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 600 µg/ml. (G) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 700 µg/ml. (H) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 800 µg/ml. → : sel yang hidup.



Gambar 5.11 Hasil Foto Sel 4T1 Kelompok Kontrol dan Kelompok Serial Konsentrasi Setelah Diberi Sampel pada Perbesaran 100x. Keterangan: (A) sel 4T1 kelompok kontrol sel. (B) sel 4T1 kelompok kontrol pelarut. (C) sel 4T1 kelompok kontrol media. (D) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 400 µg/ml. (E) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 500 µg/ml. (F) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 600 µg/ml. (G) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 700 µg/ml. (H) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 800 µg/ml. → : sel yang hidup, → : sel yang lisis.



Gambar 5.12 Hasil Foto Sel 4T1 Kelompok Kontrol dan Kelompok Serial Konsentrasi Setelah Diberi MTT pada Perbesaran 100x. Keterangan: (A) sel 4T1 kelompok kontrol sel. (B) sel 4T1 kelompok kontrol pelarut. (C) sel 4T1 kelompok kontrol media. (D) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 400 $\mu\text{g/ml}$. (E) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 500 $\mu\text{g/ml}$. (F) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 600 $\mu\text{g/ml}$. (G) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 700 $\mu\text{g/ml}$. (H) sel 4T1 kelompok eksperimen ekstrak 800 $\mu\text{g/ml}$.

\rightarrow : sel yang hidup, \rightarrow : sel yang lisis.

Tabel 5.5 Hasil % Viabilitas

	Replikasi	(1)	(2)	(3)	Rata-rata %viabilitas (%)	SD %viabilitas (%)
Sampel	400 ppm	87,864	81,212	98,203	89,093	8,562
	500 ppm	73,300	82,424	62,874	72,866	9,782
	600 ppm	14,563	18,787	59,281	30,877	24,689
	700 ppm	28,155	21,212	35,329	28,232	7,058
	800 ppm	21,844	55,151	35,329	37,441	16,753

Keterangan: hasil % viabilitas sel kanker payudara 4T1 dengan pemberian sampel ekstrak biji *Syzygium cumini* dengan berbagai konsentrasi.

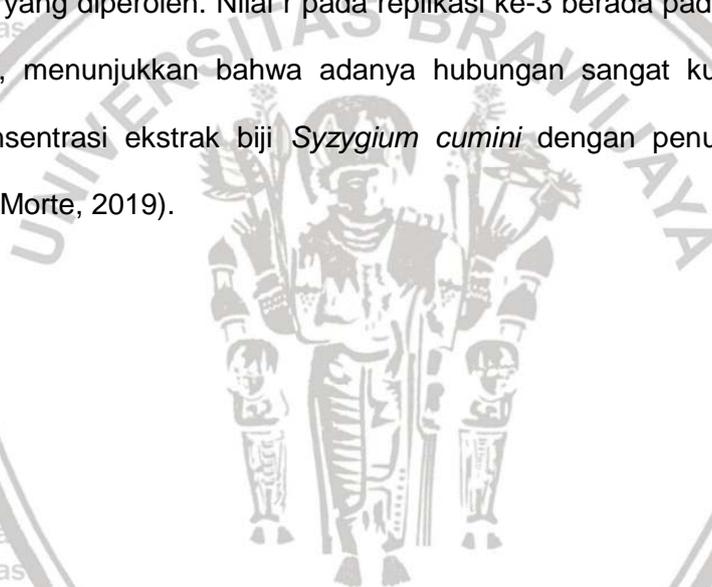
Tabel 5.6 Hasil Perhitungan IC₅₀

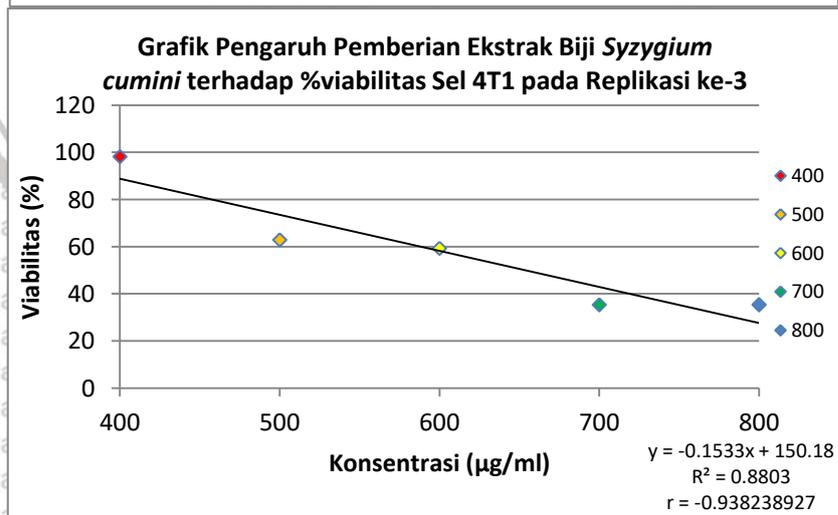
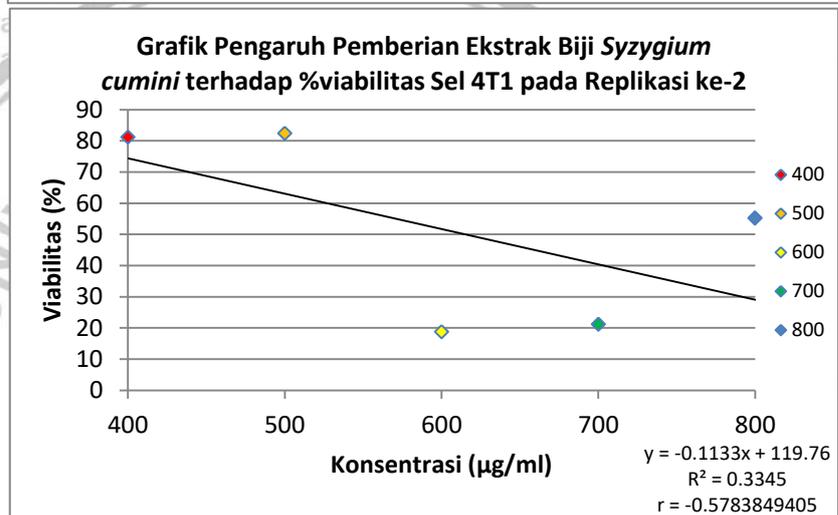
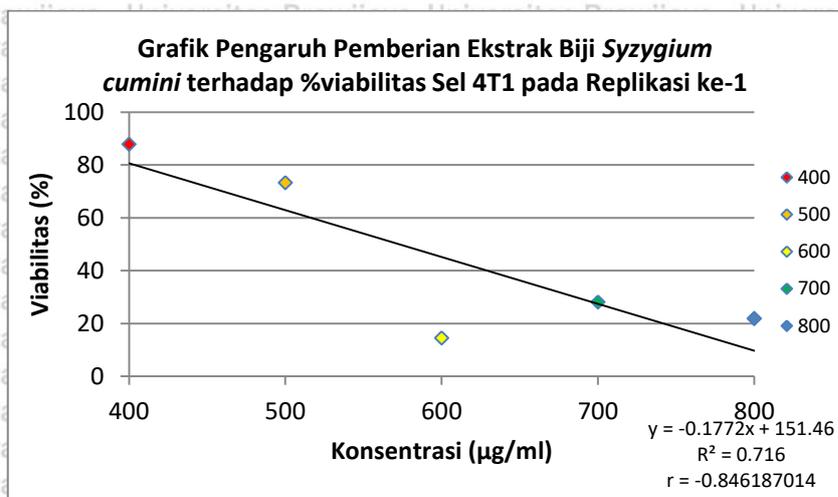
Replikasi ke-	Persamaan regresi	Koefisien korelasi r	IC ₅₀ (µg/ml)	Rata-rata IC ₅₀ (µg/ml)
1	$y = -0,1772x + 151,46$	-0,846	572,573	613,924 ± 40,487
2	$y = -0,1133x + 119,76$	-0,578	615,710	
3	$y = -0,1533x + 150,18$	-0,938	653,489	

Keterangan: hasil perhitungan IC₅₀ ekstrak biji *Syzygium cumini* terhadap sel kanker payudara 4T1 tiap replikasi.

Berdasarkan uji normalitas yang dilakukan pada tiap replikasi menggunakan SPSS, diperoleh hasil bahwa replikasi ke-1 berdistribusi normal dengan nilai signifikansi 0,114, replikasi ke-2 berdistribusi normal dengan nilai signifikansi 0,2, dan replikasi ke-3 berdistribusi normal dengan nilai signifikansi 0,2 (data dikatakan berdistribusi normal apabila nilai signifikansi > 0,05). Kemudian dilakukan uji analisis korelasi Pearson, diperoleh hasil bahwa replikasi ke-1 tidak berkorelasi karena nilai signifikansi 0,071 (>0,05), replikasi ke-2 tidak berkorelasi karena nilai signifikansi 0,307 (>0,05), dan replikasi ke-3 berkorelasi dengan nilai signifikansi 0,018 (<0,05) dan berkorelasi sempurna dengan r -0,938. Kemudian diperoleh nilai persamaan regresi pada replikasi ke-1, 2, dan 3, berturut-turut yaitu $y = -0,1772x + 151,46$; $y = -0,1133x + 119,76$; dan $y = -0,1533x + 150,18$ dengan nilai koefisien korelasi r berturut-turut adalah -0,846; -0,578; dan -0,938, sehingga diperoleh nilai IC₅₀ berturut-turut yaitu 572,573; 615,710; 653,489 µg/ml

dengan rata-rata IC_{50} 613,924 $\mu\text{g/ml} \pm 40,487 \mu\text{g/ml}$. Sel 4T1 ketika diamati dengan mikroskop *inverted* mengalami perubahan morfologi setelah dipapar dengan ekstrak biji *Syzygium cumini* yaitu sel mengalami lisis, terlepas dari dasar *well-plate*, dan formazan ungu yang terbentuk semakin berkurang seiring peningkatan konsentrasi sampel yang diberikan pada sel 4T1 seperti pada **Gambar 5.11** dan **Gambar 5.12**. Berdasarkan penelitian diperoleh nilai koefisien korelasi r yang negatif pada replikasi ke-3, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak biji *Syzygium cumini* berbanding terbalik dengan % viabilitas sel yang diperoleh. Nilai r pada replikasi ke-3 berada pada rentang -0,8 sampai -1,0, menunjukkan bahwa adanya hubungan sangat kuat antara peningkatan konsentrasi ekstrak biji *Syzygium cumini* dengan penurunan % viabilitas sel (LaMorte, 2019).





Gambar 5.13 Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji *Syzygium cumini* terhadap %viabilitas Sel 4T1 pada Berbagai Replikasi. Keterangan: pengaruh pemberian ekstrak biji *Syzygium cumini* terhadap %viabilitas sel 4T1 setelah sel diinkubasi dan diberikan seri konsentrasi ekstrak biji *Syzygium cumini* selama 24 jam, kemudian diukur absorbansi dengan ELISA reader.



BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak yang diperoleh yaitu 16,02 gram dengan persen rendemen 8,90%. Pada penelitian yang dilakukan Rohardi *et al* (2016), didapatkan ekstrak etanol tepung biji juwet dengan persen rendemen 14,2±0,56%. Pada penelitian yang dilakukan Haerani *et al* (2019), didapatkan ekstrak etanol daun juwet dengan persen rendemen 28,49%. Perbedaan nilai dengan hasil di atas dimungkinkan karena perbedaan bagian tanaman dan pelarut yang digunakan, di mana pada salah satu literatur digunakan pelarut etanol 50% dan literatur lainnya digunakan bagian tanaman daun dan pelarut etanol 70%, sedangkan pada penelitian ini digunakan etanol 96%. Rendemen sendiri merupakan perbandingan antara berat hasil ekstrak tanaman yang didapat dengan berat tanaman sebelum diekstrak.

Skrining fitokimia pada penelitian ini menggunakan KLT dan pereaksi warna.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia, diketahui bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung fenol yang ditunjukkan dengan muncul 3 noda *tailing* berwarna hitam dengan Rf 0,075, 0,2125, dan 0,475 dan 1 noda berwarna hitam dengan Rf 0,6 setelah disemprot dengan penampak noda FeCl₃ dan diamati pada sinar tampak. Noda yang terbentuk *tailing* atau berekor dapat disebabkan karena pH eluen yang belum optimal sehingga perlu dimodifikasi dengan penambahan sedikit asam atau basa agar diperoleh eluen yang optimal (Wulandari, 2011). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kothari *et al* (2011), biji *Syzygium cumini* mengandung fenol pada pengujian menggunakan metode

Folin-Ciocalteu. Berdasarkan hasil skrining fitokimia, diketahui bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* juga mengandung tanin yang ditunjukkan dengan muncul serabut berwarna putih yang melayang saat diberikan gelatin 1%. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kothari *et al* (2011), biji *Syzygium cumini* mengandung tanin yaitu asam elagat pada pengujian menggunakan metode HPLC. Sedangkan menurut penelitian yang dilakukan Shrikanta *et al* (2015), ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung senyawa golongan fenol yaitu asam galat dan epikatekin yang merupakan golongan tanin, serta asam kumarat dan resveratrol.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia, diketahui bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung flavonoid yang ditunjukkan dengan muncul 1 noda *tailing* berwarna kuning kecokelatan dengan Rf 0,2875 setelah disemprot dengan penampak noda AlCl₃ dan diamati pada sinar tampak. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kothari *et al* (2011), biji *Syzygium cumini* mengandung flavonoid yaitu kuersetin pada pengujian menggunakan metode reaksi warna dan KLT. Menurut penelitian yang dilakukan Priya *et al* (2017), ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu kuersetin dan myricetin.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia, diketahui bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* mengandung antrakuinon yang ditunjukkan dengan muncul 1 noda *tailing* berwarna coklat dengan Rf 0,5875 dan 1 noda berwarna kuning kecokelatan dengan Rf 0,675 setelah disemprot dengan penampak noda KOH 10% dan diamati pada sinar tampak. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Ruthurusamy *et al* (2015), daun *Syzygium cumini* mengandung senyawa golongan antrakuinon, namun belum ditemukan penelitian yang membahas adanya kandungan antrakuinon pada biji *Syzygium cumini*.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan, diketahui bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* tidak mengandung alkaloid, terpenoid, steroid, dan saponin. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Murti *et al* (2012), biji *Syzygium cumini* mengandung alkaloid pada pengujian menggunakan metode reaksi warna dan mengandung saponin pada pengujian menggunakan metode uji buih. Berdasarkan penelitian Prabakaran dan Shanmugavel (2017), biji *Syzygium cumini* mengandung steroid pada pengujian menggunakan metode uji Salkowski dan mengandung terpenoid pada pengujian menggunakan metode reaksi warna.

Hasil yang didapat dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Murti *et al* (2012) serta Prabakaran dan Shanmugavel (2017) dapat disebabkan karena menggunakan metode ekstraksi yang berbeda di mana pada penelitian sebelumnya menggunakan pelarut metanol, juga dapat disebabkan karena menggunakan metode pengujian yang berbeda di mana pada penelitian sebelumnya pengujian senyawa fitokimia steroid pada biji *Syzygium cumini* menggunakan tes Salkowski.

Uji sitotoksik digunakan untuk mengetahui efek sitotoksik senyawa yang diuji terhadap lini sel yang digunakan. Dalam penelitian ini, senyawa yang diuji adalah ekstrak biji *Syzygium cumini* dan lini sel yang digunakan adalah sel kanker payudara 4T1. Uji sitotoksik yang digunakan pada penelitian ini adalah MTT assay. Pada penelitian ini, digunakan kontrol sel, kontrol pelarut, dan kontrol media. Kontrol sel terdiri dari sel 4T1 dan media kultur yang bertujuan sebagai kontrol bahwa media kultur yang digunakan tidak bersifat toksik pada sel dan sebagai pembanding untuk kelompok kontrol pelarut. Kontrol pelarut terdiri dari sel 4T1, media kultur, dan pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak biji juwet, bertujuan sebagai kontrol bahwa pelarut yang digunakan tidak bersifat

toksik pada sel sehingga tidak mempengaruhi hasil pembacaan ELISA reader.

Kontrol media terdiri dari media kultur yang bertujuan untuk mengetahui apakah media yang digunakan mengandung kontaminan atau tidak dan sebagai faktor koreksi pada pembacaan absorbansi menggunakan ELISA reader. Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah nilai IC_{50} yang menunjukkan besar konsentrasi yang dapat menyebabkan 50% penghambatan pembelahan sel. Apabila nilai IC_{50} semakin besar, maka efek sitotoksik senyawa semakin rendah atau semakin tidak toksik.

Hasil uji sitotoksik ekstrak biji *Syzygium cumini* menggunakan MTT assay menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* memiliki efek sitotoksik dengan nilai IC_{50} pada replikasi ke-1, 2, dan 3 berturut-turut sebesar 572,573; 615,710; 653,489 $\mu\text{g/ml}$ dengan rata-rata IC_{50} 613,924 $\mu\text{g/ml} \pm 40,487 \mu\text{g/ml}$. Menurut Sajjadi *et al.* (2015), nilai IC_{50} dikategorikan menjadi aktivitas sitotoksik tinggi ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$), aktivitas sitotoksik sedang ($IC_{50} 20-200 \mu\text{g/ml}$), aktivitas sitotoksik lemah ($IC_{50} 201-500 \mu\text{g/ml}$), dan tidak ada aktivitas sitotoksik ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$). Berdasarkan kategori tersebut, hasil penelitian uji sitotoksik ekstrak biji *Syzygium cumini* terhadap lini sel 4T1 menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* tidak ada aktivitas sitotoksik. Nilai IC_{50} yang besar tersebut menunjukkan bahwa dibutuhkan dosis ekstrak biji juwet yang tinggi untuk menyebabkan 50% penghambatan pembelahan sel. Hasil yang diperoleh bahwa replikasi ke-3 menunjukkan adanya *dose dependent manner* yang berarti peningkatan konsentrasi sebanding dengan penurunan %viabilitas sel, dengan nilai koefisien korelasi $r -0,938$ yang berarti adanya hubungan korelasi yang sangat kuat.

Namun pada replikasi ke-1 dan ke-2 tidak menunjukkan adanya *dose dependent manner* karena nilai signifikansi yang didapat menunjukkan data tidak

berkorelasi. Berdasarkan penelitian diperoleh nilai koefisien korelasi r yang negatif pada replikasi ke-3, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak biji *Syzygium cumini* berbanding terbalik dengan %viabilitas sel yang diperoleh. Nilai r pada replikasi ke-3 berada pada rentang -0,8 sampai -1,0, menunjukkan bahwa adanya hubungan sangat kuat antara peningkatan konsentrasi ekstrak biji *Syzygium cumini* dengan penurunan %viabilitas sel.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Yadav *et al* (2011), ekstrak biji juwet memiliki sifat sitotoksik dan dapat menghambat proliferasi hingga 50% dibandingkan kontrol negatif pada sel kanker payudara MCF7, dengan nilai IC_{50} sebesar 110 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Tripathy dan Pradhan (2015), ekstrak buah juwet memiliki sifat sitotoksik dengan menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF7 dengan nilai IC_{50} sebesar 266,8 $\mu\text{g/ml}$. Sebelumnya belum terdapat uji terkait efek sitotoksik ekstrak biji juwet pada kultur sel kanker 4T1. Hasil yang didapat dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya, baik oleh Yadav *et al* (2011) maupun oleh Tripathy dan Pradhan (2015) dikarenakan lini sel yang digunakan berbeda, di mana sel 4T1 memiliki sifat yang lebih agresif dan memiliki potensi metastasis lebih tinggi dibandingkan dengan MCF7. Nilai IC_{50} ekstrak biji juwet terhadap lini sel MCF7 menunjukkan efek sitotoksik sedang dan nilai IC_{50} ekstrak buah juwet terhadap lini sel MCF7 menunjukkan efek sitotoksik lemah, sedangkan nilai IC_{50} ekstrak biji juwet terhadap lini sel 4T1 pada penelitian ini menunjukkan tidak ada efek sitotoksik. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak biji juwet lebih potensial digunakan terhadap lini sel MCF7 yang menyerupai sel kanker payudara stadium awal (stadium I, IIA, dan IIB).

Efek sitotoksik yang dihasilkan oleh ekstrak biji *Syzygium cumini* disebabkan karena adanya kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak biji juwet seperti resveratrol, kuersetin, dan asam elagat melalui peningkatan apoptosis dan penurunan proliferasi sel kanker dengan menghambat *EGFR* sehingga memperbaiki prognosis kanker, menghambat agregasi p53 sehingga ekspresi gen p53 meningkat dan apoptosis sel meningkat, dan menurunkan overekspresi *Bcl-2* sehingga menginduksi apoptosis sel kanker (Seo *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2018; Hernawati, 2013). Pada hasil penelitian, biji *Syzygium cumini* juga didapati senyawa golongan antrakuinon, di mana antrakuinon memiliki efek sitotoksik dengan menginduksi apoptosis sel tumor, mengganggu proliferasi sel tumor, serta menghambat metabolisme sel tumor (Li & Jiang, 2018).

6.2 Implikasi di Bidang Farmasi

Ekstrak biji *Syzygium cumini* memiliki efek sebagai agen sitotoksik pada sel kanker payudara namun tidak berefek signifikan, sehingga dapat dijadikan sebagai ilmu pengetahuan dalam bidang farmasi mengenai obat bahan alam dan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan potensi biji juwet sebagai agen sitotoksik.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki keterbatasan, yaitu:

1. Tidak menggunakan obat konvensional sebagai kontrol positif, sehingga tidak ada pembandingan dengan kelompok perlakuan.
2. Tidak dilakukan pengujian terhadap sel payudara sehat, sehingga tidak diketahui toksisitas ekstrak terhadap sel payudara sehat.

3. Waktu penelitian yang terbatas, sehingga tidak dapat dilakukan uji lebih lanjut seperti *scratch wound healing assay*.
4. Hasil yang diperoleh masih kurang optimal seperti noda yang *tailing* pada uji KLT dan SD IC₅₀ pada uji sitotoksik yang nilainya besar, sehingga perlu mengulang uji, namun tidak dapat dilakukan karena waktu yang terbatas.
5. Nilai IC₅₀ ekstrak biji juwet terhadap sel 4T1 yang diperoleh besar dan masuk dalam kategori tidak ada efek sitotoksik.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





BAB VII PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa hasil ekstraksi biji *Syzygium cumini* menghasilkan ekstrak dengan massa 16,02 gram dan rendemen sebesar 8,90%. Terdapat kandungan senyawa golongan fenol, flavonoid, antrakuinon, dan tanin pada ekstrak biji *Syzygium cumini* yang berpotensi memiliki efek sitotoksik pada lini sel kanker payudara 4T1 dengan rata-rata IC_{50} pada tiap replikasi adalah 613,924 $\mu\text{g/ml}$, di mana menunjukkan bahwa ekstrak biji *Syzygium cumini* tidak potensial untuk dikembangkan sebagai obat kanker payudara stadium IV dan berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak biji *Syzygium cumini* lebih potensial untuk dikembangkan sebagai obat kanker payudara stadium awal.

7.2 Saran

Dari keterbatasan penelitian yang dilakukan, dapat disarankan untuk penelitian selanjutnya yakni:

1. Dapat digunakan obat doksorubisin sebagai kontrol positif atau kontrol pembandingan dengan kelompok perlakuan.
2. Dapat digunakan sel payudara sehat seperti MCF-10A untuk mengetahui toksisitas sampel terhadap sel payudara sehat.
3. Dapat dilakukan *scratch wound healing assay* untuk mengetahui kemampuan sampel dalam menghambat migrasi sel kanker payudara 4T1.

4. Dapat dilakukan optimasi lebih lanjut terkait fase gerak yang digunakan untuk mengeluasi sampel agar tidak terjadi *tailing* noda dan dapat dilakukan pengujian MTT assay dengan pemipetan sel yang lebih homogen agar diperoleh SD yang lebih sesuai.

5. Dapat dilakukan penggabungan ekstrak daun, buah, dan biji *Syzygium cumini* dan diujikan pada sel 4T1, sehingga diharapkan diperoleh efek sinergis yang ditandai dengan menurunnya nilai IC_{50} .



DAFTAR PUSTAKA

American Cancer Society. 2019. *Breast Cancer Risk and Prevention*. (Online), (cancer.org, diakses pada 3 Oktober pukul 09:00 WIB).

American Cancer Society. 2015. *cancer.org* | 1.800.227.2345. (Online), (cancer.org, diakses pada 30 Maret pukul 09:00 WIB).

Aslanturk, Ozlem Sultan. 2017. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity – A Predictable Risk to Our Actual World*, Marcelo L. Larramendy and Sonia Soloneski, IntechOpen.

ATCC. 2008. *4T1 (ATCC® CRL-2539™)*. (Online), (atcc.org, diakses pada 3 Oktober pukul 09:00 WIB).

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. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(12\)60050-1](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(12)60050-1)

Azwanida, N. N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>

Bandiola, TM, Ignacio GB, Yunson EG, Phil, and Bandiola DB. 2017. *Syzygium cumini (L.) Skeels: A Review of its Phytochemical Constituents, Toxicity Studies, and Traditional and Pharmacological Uses*. *International Journal of Applied Pharmaceutical and Biological Research*, 2(6): 15-23.

Bandiola, Teresa May B. 2018. Extraction and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants: A Brief Summary. *Int J Pharm*, 8(1): 137-143.

Batra, P., & Sharma, A. K. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *Biotech*, 3(6), 439–459. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0117-5>

Bijauliya, Rohit Kumar, Alok Shashi, Singh Man, and Mishra Shanti B. 2016. Morphology, Phytochemistry, and Pharmacology of *Syzygium cumini* (Linn.) – an Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(6): 2360-2371.

Cancer Treatment Centers of America. 2018. *Metastasis (metastatic cancer)*. (Online), (cancercenter.com, diakses pada 1 Mei pukul 21:00 WIB).

Chagas, V. T., França, L. M., Malik, S., & Paes, A. M. D. A. (2015). *Syzygium cumini* (L.) seeds: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00259>

Chan, Alexandre. 2018. Breast Cancer. *American College of Clinical Pharmacy*, 132-152.

Costa, Dainelly CF, Campos Nathali PC, Santos Ronimara A, Guedes-da-Silva Francisca, Martins-Dinis Mafalda, Zanphorlin Leticia, Ramos Carlos, Rangel Luciana P, and Silva Jerson L. 2018. Resveratrol prevents p53 aggregation *in vitro* and in breast cancer cells. *Oncotarget*, 9(49): 29112-29122.

Dowd, Frank J, Johnson Barton S, and Mariotti Angelo J. 2017. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry, 7th Edition*. Missouri: Elsevier, Inc.

Gatz, Susanne Andrea, Keimlin Marlen, Baumann Cindy, Dork Thilo, Debatin

Klaus-Michael, Fulda Simone, and Wiesmuller Lisa. 2008. Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and -Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis*, 29(3): 519-527.

Haerani, A., Chaerunisa A.Y., and Subarnas A. 2019. Antioxidant Activities of *Muntingia calabura*, *Syzygium cumini*, *Ocimum basilicum*, and *Eleutherine bulbosa* using DPPH Method. *Indonesian Journal of Pharmaceutics*, 1(2): 57-61.

Hernawati, Sri. 2013. The inhibition of malignant epithelial cells in mucosal injury in the oral cavity of strains by pomegranate fruit extract (*Punica granatum linn*) through Bcl-2 expression. *Dental Journal*, 46(1): 35-38.

ITIS Report. 2011. *Syzygium cumini* (L.) Skeels. (Online), (itis.gov, diakses pada 2 Mei pukul 23:14 WIB).

Kothari, Vijay, Seshadri S, and Mehta P. 2011. Fractionation of antibacterial extracts of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) seeds. *Research in Biotechnology*, 2(6): 53-63.

LaMorte, Wayne W. 2019. *PH717 Module 9 – Correlation and Regression*. (<https://sphweb.bumc.bu.edu/>, diakses pada 15 Januari 2021 pukul 10:32 WIB).

Le Corre, L., Fustier, P., Chalabi, N., Bignon, Y. J., & Bernard-Gallon, D. (2004). Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clinica Chimica Acta*, 344(1-2), 115-121.

<https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.02.024>

Li, Yu and Jian-Guo Jiang. 2018. Health functions and structure-activity relationships of natural anthraquinones from plants. *Food Funct*, 9: 6063-6080.

Masuda, Hiroko, Zhang Dongwei, Bartholomeusz Chandra, Doihara Hiroyoshi, Hortobagyi Gabriel N, Ueno Naoto T. 2012. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 136: 331-345.

Meerlo, Johan van, Kaspers Gertjan JL, and Cloos Jacqueline. 2011. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol Biol*, 731(20): 237-245.

Murti, K., Paliwal, D., Madan, S., Kundu, R., & Kaushik, M. (2012). Exploration of Preliminary Phytochemical Studies of Seed of *syzygium cumini*. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 7(1), 12-14.
<https://doi.org/10.3844/ajptsp.2012.12.14>

Prabakaran, K., & Shanmugave, G. (2017). Antidiabetic Activity and Phytochemical Constituents of *Syzygium cumini* Seeds in Puducherry Region, South India. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(07), 985-989.
<https://doi.org/10.25258/phyto.v9i07.11168>

Priya, S.H., Prakasan, N., and Purushothaman, J. 2017. Antioxidant activity, phenolic-flavonoid content and high-performance liquid chromatography profiling of three different variants of *Syzygium cumini* seeds: A comparative study. *J. Intercult Ethnopharmacol*, 6(1): 107-114.

Rianti, Emy, Tritawati Gusti Ayu, Novita Henny. 2012. Faktor-faktor yang Berhubungan ndengan Risiko Kanker Payudara Wanita. *Jurnal Health Quality*, 3(1): 10-23.

Riss, Terry L, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, and Minor L. 2013. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual (Online)*, (ncbi.nlm.nih.gov, diakses pada 22 Oktober 2020 pukul 01:02 WIB).

Rohardi, Raharjo S, Falah I.I, Santoso U. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Duwet (*Syzygium cumini* Linn.) pada Peroksidasi Lipida Secara In Vitro. *AGRITECH*, 36(1): 30-37.

Ruthurusamy, S.K., Dheeba, B., Hameed S.S., and Palanisamy S. 2015. Anti-cancer and anti-oxidative potential of *Syzygium cumini* against breast cancer cell lines. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(10): 449-460.

Sajjadi, Seyed Ebrahim, Mustafa Ghanadian, Mehrangiz Haghghi, and Leili Mouhebat. 2015. Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *J HerbMed Pharmacol*, 4(1): 15-19.

Seo, Hye-Sook, Ku Jin Mo, Choi Han-Seok, Choi Youn Kyung, Woo Jong-Kyu, Kim Minsoo, Kim Ilhwan, Na Chang Hyeok, Hur Hansol, Jang Bo-Hyoung, Shin Yong Cheol, and Ko Seong-Gyu. 2016. Quercetin induces caspase-dependent extrinsic apoptosis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells. *Oncol Rep*, 36(1): 31-42.

Shrikanta A, Kumar A, and Govindaswamy V. 2015. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *J Food Sci Technol*, 52(1): 383-390.

Sundari, I Shanmuga and Sen Shampa. 2013. Simultaneous inhibition of EGFR and MET receptors with phytochemical conjugated magnetic nanocarriers: *in silico* and *in vitro* study. *RSC Advances*, 6: 80121-80132.

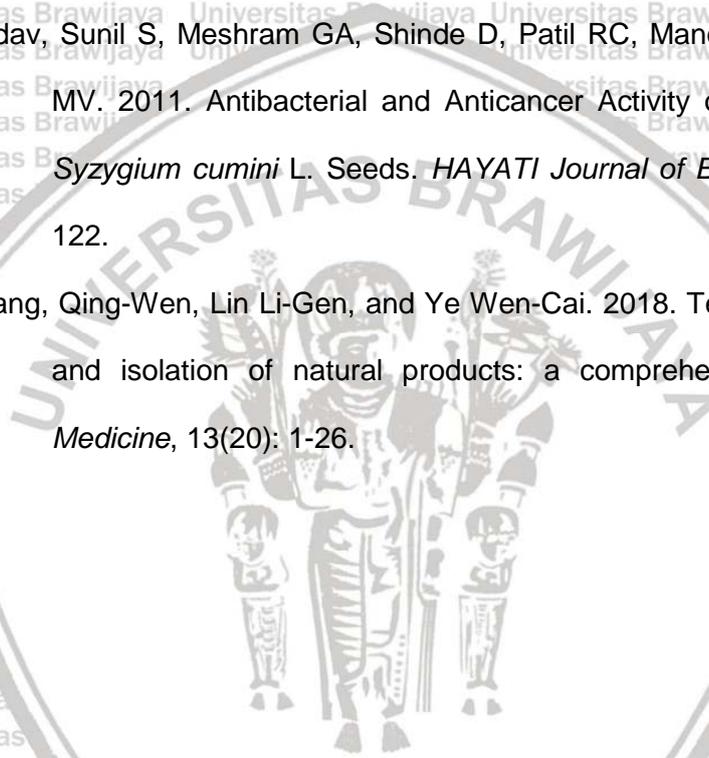
World Health Organization, 2020. *Cancer Country Profile: Indonesia*. (Online), (who.int, diakses pada 30 Maret 2020 pukul 09:00 WIB).

Winikoff, Stephen E, Zeh HJ, DeMarco R, and Lotze MT. 2005. Cytolytic Assays. *Measuring Immunity*, 29: 343-349.

Wulandari, Lestyo. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.

Yadav, Sunil S, Meshram GA, Shinde D, Patil RC, Manohar SM, and Upadhye MV. 2011. Antibacterial and Anticancer Activity of Bioactive Fraction of *Syzygium cumini* L. Seeds. *HAYATI Journal of Biosciences*, 18(3): 118-122.

Zhang, Qing-Wen, Lin Li-Gen, and Ye Wen-Cai. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(20): 1-26.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Nilai absorbansi hasil pembacaan ELISA pada uji sitotoksik metode MTT assay

Replikasi	(1)	(2)	(3)	Rata-rata Absorbansi
Kontrol sel	0,347	0,311	0,353	0,337
Kontrol pelarut	0,274	0,233	0,232	0,246
Kontrol media	0,068	0,068	0,065	0,067
400 ppm	0,249	0,202	0,229	0,226
500 ppm	0,219	0,204	0,17	0,197
Sampel 600 ppm	0,098	0,099	0,164	0,120
700 ppm	0,126	0,103	0,124	0,117
800 ppm	0,113	0,159	0,124	0,132

Lampiran 2. Hasil uji normalitas pada tiap replikasi perlakuan menggunakan SPSS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test (replikasi ke-1)

		Unstandardized Residual
N		5
Normal Parameters	Mean	.0000000
	Std. Deviation	17.64264274
Most Extreme Differences	Absolute	.316
	Positive	.246
	Negative	-.316
Test Statistic		.316
Asymp. Sig. (2-tailed)		.114

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test (replikasi ke-2)

		Unstandardized Residual
N		5
Normal Parameters	Mean	.0000000
	Std. Deviation	25.27407161
Most Extreme Differences	Absolute	.206
	Positive	.176
	Negative	-.206
Test Statistic		.206
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test (replikasi ke-3)

		Unstandardized Residual
N		5
Normal Parameters	Mean	.0000000
	Std. Deviation	8.93801588
Most Extreme Differences	Absolute	.208
	Positive	.201
	Negative	-.208
Test Statistic		.208
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200

Lampiran 2. Hasil uji analisis korelasi Pearson pada tiap replikasi perlakuan menggunakan SPSS

Correlations (replikasi ke-1)

		Konsentrasi	%viabilitas
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	-.846
	Sig. (2-tailed)		.071
	N	5	5
%viabilitas	Pearson Correlation	-.846	1
	Sig. (2-tailed)	.071	
	N	5	5

Correlations (replikasi ke-2)

		Konsentrasi	%viabilitas
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	-.578
	Sig. (2-tailed)		.307
	N	5	5
%viabilitas	Pearson Correlation	-.578	1
	Sig. (2-tailed)	.307	
	N	5	5

Correlations (replikasi ke-3)

		Konsentrasi	%viabilitas
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	-.938
	Sig. (2-tailed)		.018
	N	5	5
%viabilitas	Pearson Correlation	-.938*	1

Sig. (2-tailed)	.018	
N	5	5

