

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN EKSPRESI PROTEIN Bcl-2 dan p53
EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis*)
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

TESIS

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Strata-2
Program Pascasarjana Ilmu Farmasi
Minat Sains Farmasi*



Oleh:

**Priscila Wahyu Christiana
SBF 141810199**

**PROGRAM PASCA SARJANA ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2020**

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN EKSPRESIPROTEIN Bcl-2 dan p53
EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis*)
TERHADAPSEL KANKER PAYUDARA T47D**

TESIS

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Strata-2
Program Pascasarjana Ilmu Farmasi
Minat Sains Farmasi*



Oleh:

**Priscila Wahyu Christiana
SBF 141810199**

**PROGRAM PASCA SARJANA ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2020**

PENGESAHAN TESIS

berjudul

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN JUMLAH PROTEIN Bcl-2 dan p53
EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis*)
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

Oleh :

Priscila Wahyu Christiana
SBF 141810199

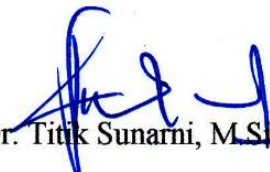
**Dipertahankan di hadapan Dewan Penguji Tesis
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal :**

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan




Prof. Dr. RA Oetari, SU, MM, M.Sc., Apt

Pembimbing utama,


Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt

Pembimbing Pendamping,


Dr. Wiwin Herdwiani, M. Sc., Apt

Dewan Penguji :

1. Dr. Ana Indrayati, M. Si
2. Dr. Rina Herowati, M. Si., Apt
3. Dr. Wiwin Herdwiani, M. Sc., Apt
4. Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt

1. 

2. 

3. 

4. 

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka. Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 29 Januari 2020

Penulis

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'P' followed by a smaller 'W' and 'C'.

Priscila Wahyu Christiana

HALAMAN PERSEMBAHAN

“Sebab Aku ini mengetahui rancangan-rancangan apa yang ada pada-Ku mengenai kamu, demikianlah firman TUHAN, yaitu rancangan damai sejahtera dan bukan rancangan kecelakaan, untuk memberikan kepadamu hari depan yang penuh harapan”

Yeremia 29 : 11

“orang-orang yang menabur dengan mencururkan air mata, akan menuai dengan bersorak-sorai. Orang yang berjalan maju dengan menangis sambil menabur benih, pasti pulang dengan sorak-sorai sambil membawa berkas-berkasnya.”

Mazmur 126 : 5-6

Karya ini aku persembahkan untuk

- ♥ *Tuhan Yesus Kristus*
- ♥ *Suami, Orangtua dan keluarga besar*
- ♥ *Almamaterku*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan yang Maha Esa atas segala berkat, rahmat, dan tuntunan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul **“UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN EKSPRESI PROTEIN Bcl-2 dan p53 EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis*) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D”**. Penyusunan tesis ini bertujuan untuk memenuhi syarat memperoleh gelar Magister Farmasi Sains di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Banyak hal yang penulis dapatkan dalam proses pembuatan tesis ini baik berupa bimbingan, petunjuk dan saran-saran yang berguna dari berbagai pihak, maka pada kesempatan ini dengan tulus penulis mengucapkan terimah kasih kepada:

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi di Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU.,MM., M.Sc.,Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi di Surakarta.
3. Dr. Titik Sunarni, M.Si.,Apt. selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, perhatian dan keikhlasannya dalam memberikan ilmu dan bimbingan dalam penyusunan tesis ini.
4. Dr. Wiwin Herdwiani, M.Sc.,Apt selaku pembimbing pendamping yang telah banyak membantu penulis dalam memberikan masukan dan bimbingan dalam menyelesaikan tesis ini.
5. Dr. Ana Indrayati, M. Si dan Dr. Rina Herowati, M. Si., Apt selaku tim penguji yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk penyempurnaan tesis ini.
6. Dosen, asisten dosen dan staf laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi terimakasih buat bantuan dan kerjasamanya.
7. Kedua orang tua yang tak pernah berhenti mendoakan dan memberikan dukungan.

8. Untuk sahabat-sahabat terbaikku terima kasih untuk waktu, semangat dan dukungan yang kalian berikan. Teman – teman S2 Manajemen dan S2 Sains sukses terus
9. Semua pihak yang telah membantu sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini masih banyak kekurangan dan kelamahan karena keterbatasan penulis untuk itu kritik dan saran dari pembaca sangat penulis harapkan dalam penyempurnaan penulisan skripsi ini. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi penulis, pembaca untuk perkembangan dunia farmasi yang lebih baik.

Surakarta, 29 Januari 2020

Penulis



Priscila Wahyu Christiana

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN TESIS	ii
PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
Halaman	xii
INTISARI.....	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Kegunaan Penelitian	4
E. Keaslian Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
A. Tinjauan Tanaman Rosemary	7
1. Sistematika Tanaman Rosemary.....	7
2. Kandungan Kimia	7
3. Aktivitas Farmakologi	8
B. Tinjauan Kanker Payudara.....	9
1. Pengertian kanker payudara.....	9
2. Epidemiologi Kanker Payudara	10
2.1. Distribusi dan Frekuensi Kanker Payudara.	10
2.2. Angka Kejadian Kanker Payudara.....	10
3. Faktor Risiko Kanker Payudara	11
3.1 Faktor Usia.	11
3.2 Menopause Usia Lanjut.	11
3.3 Riwayat Adanya Penyakit Tumor Jinak.	11
4. Tanda dan Gejala Kanker Payudara.....	11

5.	Stadium kanker payudara.....	12
6.	Penatalaksanaan Medis yang Tepat	13
6.1	Operasi (Pembedahan).....	13
6.2	Radioterapi.....	13
6.3	Kemoterapi.	13
6.4	Terapi Hormon.	13
7.	Sel T47D	14
C.	Sel Vero	15
D.	Protein p53	15
E.	Protein Bcl-2 (B-cell lymphoma-2)	16
F.	Uji Sitotoksitas	16
1.	Tinjauan uji sitotoksitas	16
1.1	Perhitungan secara langsung.....	17
1.2	Metode MTT assay.....	18
G.	Uji indeks selektivitas	19
H.	Ekstraksi.....	19
1.	Pengertian	19
2.	Ekstrak	20
3.	Sokletasi.....	20
4.	Fraksinasi	20
I.	Imunositokimia	21
J.	Landasan Teori	21
K.	Hipotesis	23
L.	Kerangka Pikir	24
BAB III METODE PENELITIAN.....		25
A.	Populasi dan Sampel	25
B.	Variabel Penelitian.....	25
1.	Identifikasi variabel utama.....	25
2.	Klasifikasi variabel utama	25
3.	Definisi operasional variabel utama	25
C.	Alat dan Bahan.....	26
1.	Alat.....	26
2.	Bahan	27
D.	Jalannya Penelitian	27
1.	Identifikasi tanaman.....	27
2.	Pembuatan serbuk daun rosemary	27
3.	Identifikasi organoleptis serbuk daun rosemary	28
4.	Pembuatan ekstrak dan fraksi daun rosemary.....	28
5.	Standarisasi ekstrak.....	29
5.1	Penetapan susut pengeringan.....	29
5.2	Penetapan kadar air.....	29
5.3	Penentuan bobot jenis.....	30
6.	Identifikasi kandungan ekstrak rosemary	30
6.1	Identifikasi alkaloid.....	30
6.2	Identifikasi flavonoid.....	30

6.3	Identifikasi saponin.....	31
6.4	Identifikasi fenol.....	31
6.5	Identifikasi terpenoid.....	31
7.	Identifikasi kandungan ekstrak daun rosemary dengan KLT	31
7.1.	Uji terpenoid.....	31
7.2.	Uji alkaloid.....	32
7.3.	Uji flavonoid.....	32
8.	Pembuatan medium kultur.....	32
9.	Panen sel.....	32
10.	Pembuatan larutan uji.....	33
11.	Pengujian viabilitas sel dengan metode MTT.....	33
12.	Uji selektivitas.....	34
13.	Penetapan jumlah sel p53 dan Bcl-2 dengan metode imunositokimia.....	34
E.	Analisa Data.....	35
1.	Analisis nilai IC ₅₀	35
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		37
A.	Identifikasi tanaman dan ekstraksi daun rosemary	37
1.	Identifikasi Tanaman	37
2.	Pembuatan serbuk daun rosemary	37
3.	Pembuatan ekstrak dan fraksi daun rosemary.....	38
4.	Identifikasi organoleptis serbuk dan ekstrak daun rosemary	38
B.	Standarisasi Ekstrak.....	39
1.	Standarisasi Ekstrak.....	39
1.1	Penetapan susut pengeringan.....	39
1.2	Penetapan kadar air.....	39
1.3	Penetapan bobot jenis.....	39
2.	Identifikasi kualitatif kandungan ekstrak daun rosemary	39
3.	Identifikasi kualitatif kandungan ekstrak daun rosemary dengan KLT.....	40
C.	Uji sitotoksik.....	41
D.	Uji Ekspresi p53 dan Bcl-2.....	48
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		53
A.	Kesimpulan	53
B.	Saran	53
BAB VI RINGKASAN.....		54
A.	Latar belakang.....	54
B.	Metode Penelitian	55
C.	Hasil dan Pembahasan	56
DAFTAR PUSTAKA		61
LAMPIRAN.....		64

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Reaksi yang terjadi pada MTT assay (Riss et al.,)2013).....	19
Gambar 2. Kerangka pikir penelitian	24
Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi	29
Gambar 4. Sel T47D normal tanpa perlakuan (A), sel T47D setelah perlakuan dengan ekstrak rosemary (B), sel T47D setelah pemberian MTT membentuk kristal formazan (C).....	43
Gambar 5. Perbandingan log konsentrasi dengan persen viabilitas	43
Gambar 6. Hasil pengamatan ekspresi gen p53. (a)konsentrasi ekstrak 60,359 µg/ml. (b) konsentrasi n-heksan 34,801 µg/ml (c) kontrol positif (d) kontrol sel tanpa perlakuan. Pengamatan di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400x.....	49
Gambar 7. Hasil pengamatan ekspresi gen Bcl-2. (a)konsentrasi ekstrak 60,359 µg/ml. (b) konsentrasi n-heksan 34,801 µg/ml (c) kontrol positif (d) kontrol sel tanpa perlakuan. Pengamatan di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400x.....	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Tahapan Stadium Kanker.....	12
Tabel 2. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun rosemary.....	37
Tabel 3. Persentase rendemen ekstrak dan fraksi.....	38
Tabel 4. Hasil uji organoleptis serbuk dan ekstrak	38
Tabel 5. Hasil penetapan kadar air ekstrak daun rosemary.....	39
Tabel 6. Hasil reaksi warna ekstrak daun rosemary.....	40
Tabel 7. Hasil KLT senyawa alkaloid.....	40
Tabel 8. Hasil KLT senyawa triterpenoid	41
Tabel 9. Hasil KLT senyawa flavonoid	41
Tabel 10. Hasil IC50 sel T47D	44
Tabel 11. Hasil IC50 sel vero.....	47
Tabel 12. Nilai indeks selektivitas	47
Tabel 13. hasil ekspresi P53 dan Bcl-2	50

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil determinasi	65
Lampiran 2. Perhitungan rendemen ekstrak dan fraksi.....	66
Lampiran 3. Hasil penetapan susut pengeringan	67
Lampiran 4. Penetapan kadar air daun rosemary	67
Lampiran 5. Perhitungan Berat Jenis	68
Lampiran 6. Hasil identifikasi golongan senyawa dengan reaksi warna dari ekstrak daun rosemary	68
Lampiran 7. Hasil identifikasi golongan senyawa dengan KLT	69
Lampiran 8. Gambar uji sitotoksik	72
Lampiran 9. Perhitungan konsentrasi sampel	73
Lampiran 10. Perhitungan volume panen sel yang diperlukan	75
Lampiran 11. Persen viabilitas dan IC50 ekstrak dan fraksi-fraksi daun rosemary pada sel T47D.....	76
Lampiran 12. Persen viabilitas dan IC50 ekstrak dan fraksi-fraksi daun rosemary pada sel Vero.	84
Lampiran 13. Perhitungan indeks selektivitas ekstrak dan fraksi-fraksi daun rosemary	92
Lampiran 14. Gambar hasil Imunositokimia P53	93
Lampiran 15. Gambar hasil Imunositokimia Bcl-2.....	94
Lampiran 16. Hasil analisis Ekspresi P53 dengan Image J.....	95
Lampiran 17. Hasil ekspresi Bcl-2 dengan Image J.....	96
Lampiran 18. Hasil uji statistik	97

INTISARI

CHRISTIANA, PW., 2020. UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN JUMLAH PROTEIN Bcl-2 dan p53 EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis*) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D, THESIS, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIABUDI, SURAKARTA.

Daun Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) sering ditemukan dengan aktivitas antikankernya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak dan fraksi daun rosemary terhadap sel kanker payudara T47D, mengetahui indeks selektivitas sel kanker T47D terhadap sel Vero dan untuk mengetahui ekspresi protein gen Bcl-2 dan p53.

Metode penyarian yang digunakan adalah sokhletasi dengan pelarut metanol. Ekstrak yang dihasilkan kemudian difraksinasi dengan partisi cair-cair. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT *assay* dengan sel kanker payudara T47D terhadap sel vero dan hasilnya dibaca absorbansi dengan ELISA *Reader*. Pengaruhnya terhadap ekspresi protein gen Bcl-2 dan p53 dilihat dengan imunositokimia. Analisa data IC₅₀ dan ekspresi protein menggunakan uji statistik *Anova*.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak dan fraksi etil asetat daun rosemary memiliki efek sitotoksik lemah >50 µg/ml yaitu dengan IC₅₀ berturut-turut 60,359 µg/ml dan 58,433 µg/ml. Fraksi n-heksan menunjukkan efek sitotoksik sedang dengan nilai IC₅₀ sebesar 34,801 µg/ml. Indeks selektivitas ekstrak memiliki nilai 3,3. Ekstrak daun rosemary mampu meningkatkan ekspresi p53 dan mampu menghambat ekspresi Bcl-2 pada konsentrasi 30,179 – 120,718 µg/ml dan fraksi n-heksana mampu meningkatkan ekspresi p53 dan mampu menghambat ekspresi Bcl-2 pada konsentrasi 17,401- 69,602 µg/ml.

Kata Kunci : Daun rosemary (*Rosmarinus Officinalis*), sitotoksik, ekspresi Bcl-2 dan p53, sel kanker payudara T47D.

ABSTRACT

CHRISTIANA, PW., 2020. CYTOTOXIC ACTIVITY and PROTEIN EXPRESSION OF Bcl-2 and p53 ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis*) EXTRACT AND FRACTION IN BREAST CANCER CELLS T47D, THESIS, FACULTY OF PHARMACEUTICALS, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA

Rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis*) are often found with anticancer activity. This study aims to determine the cytotoxic activity of extracts and fractions of rosemary leaves against T47D breast cancer cells, determine the selectivity index of T47D cancer cells against Vero cells and to determine the protein expression of Bcl-2 and p53 genes.

The extraction method used was soxhletation with methanol as a solvent. The resulting extract is then fractionated with a liquid-liquid partition. Cytotoxic test using the MTT method assay with T47D breast cancer cells against vero cells and the results were read absorbance with ELISA Reader. Its effect on the expression of Bcl-2 and p53 gene proteins was seen with immunocytochemistry. IC50 data analysis and protein expression using the Anova statistical test.

The results showed extract and ethyl acetate fraction of rosemary leaves had a low cytotoxic effect $>50 \mu\text{g/ml}$ ie with IC50 respectively $60.359 \mu\text{g/ml}$ and $58.433 \mu\text{g} / \text{ml}$. N-hexsan fraction had a moderate cytotoxic effect $< 50\mu\text{g} / \text{ml}$ with IC₅₀ value $34,801 \mu\text{g/ml}$. The selectivity index of extracts and ethyl acetate fraction has a value 3.3. Rosemary leaf extract can increase the expression of p53 and can inhibit the expression of Bcl-2 at a concentration of $30.179 - 120.718 \mu\text{g/ml}$ and the n-hexane fraction can increase the expression of p53 and can inhibit the expression of Bcl-2 at concentrations of $17.401- 69.602 \mu\text{g/ml}$.

Keywords: Rosemary leaf (*Rosmarinus Officinalis*), cytotoxic, expression of Bcl-2 and p53, T47D breast cancer cells.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker adalah penyebab kematian nomor dua di dunia, dan bertanggung jawab atas 9,6 juta kematian pada tahun 2018. Secara global, sekitar 1 dari 6 kematian disebabkan oleh kanker. Kanker adalah pertumbuhan cepat sel-sel abnormal dalam tubuh yang dapat menyebabkan penyakit, dapat menyerang jaringan di sekitarnya hingga organ yang lain. Kanker merupakan jaringan tumor destruktif yang menyerang jaringan sehat atau ketika sel-sel tumor metastasis di organ lain. Metastasis adalah penyebab utama kematian akibat kanker. Terapi yang dapat dilakukan yaitu memperlambat pertumbuhan tumor dan memperpanjang hidup pasien atau meningkatkan kualitas hidup (American Cancer Society, 2016).

Kanker payudara adalah kanker yang paling sering menyerang wanita. Penyakit ini menyumbang sekitar 1 dari 10 kanker di dunia dan didiagnosis pada satu juta wanita setiap tahun (Sasco, 2003). Kanker payudara adalah penyebab kematian kanker yang paling sering kedua pada wanita, setelah kanker paru-paru, dan penyebab utama kematian akibat kanker pada mereka yang berusia 20-59 tahun di Amerika (Jemal, 2008).

Banyak obat kanker yang menimbulkan efek samping dan resisten. Sampai sekarang belum ada obat kanker yang aman dan efektif, sehingga perlu dikembangkan obat baru dengan efek terapi yang baik (Heti, 2008). Salah satu upaya alternatif pengobatan kanker adalah pemanfaatan dari bahan alam yang potensi potensial untuk dikembangkan sebagai pengobatan kanker payudara.

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al*, 2003). Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM kemudian ditambahkan 10% FBS dan 2 mM L-Glutamin, diinkubasi

dalam CO₂ inkubator 5% dan suhu 37°C (Abcam, 2007). Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Missence mutation* terjadi pada residu 194 (dalam *zinc-binding* domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan response elemen pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi siklus sel.

Protein Bcl-2 dan p53 keduanya dikaitkan dengan kematian sel secara apoptosis. Bcl-2 dapat menghambat apoptosis. Pola penyimpangan ekspresi Bcl-2 telah ditemukan pada berbagai kanker manusia dan telah terbukti mengubah resistensi obat pada kanker. Protein Bcl-2 mengatur dan memediasi proses di mana mitokondria berkontribusi pada kematian sel yang dikenal sebagai jalur apoptosis intrinsik. Jalur ini diperlukan untuk perkembangan embrio normal dan untuk mencegah kanker. Di sisi lain, protein p53 berfungsi sebagai penekan tumor dengan menghentikan siklus sel pada fase G1 dan dengan memicu apoptosis. Ekspresi p53 yang berlebihan menginduksi apoptosis pada tumor kolon manusia dan sel leukemia. Sebaliknya, ketiadaan protein p53 fungsional dikaitkan dengan ketidakmampuan sel untuk menjalani apoptosis yang mengarah pada pengembangan berbagai keganasan (Michael, *et al*, 2015).

Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) adalah daun dari keluarga Lamiaceae, sering ditemukan di daerah pegunungan dan dibudidayakan secara lokal sebagai tanaman hias. Bagian tanaman yang sering digunakan untuk penelitian adalah daun. Polifenol utama yang ditemukan dalam ekstrak daun rosemary termasuk asam diterpenecarnosic dan asam rosmarin(Peng *et al*, 2007). Dalam beberapa penelitian, asam *carinosic* ditemukan menjadi senyawa yang paling efektif dalam kaitannya dengan aktivitas antikanker. Asam *carinosic* berpotensi menghambat proliferasi sel kanker payudara manusia ER-negatif dan menginduksi siklus sel G1. Selanjutnya, asam *carinosic* selektif untuk sel MCF7 (Einbond *et al*, 2012). Kandungan dalam asam fenolik rosemary adalah diterpenes *carinosic*, karnosol, dan *methyl carnosate*, serta asam fenolik rosmarinat dan asam caffeate (Yesil, 2010).

Daun rosemary di ekstraksi dengan metode sokhletasi menggunakan pelarut metanol. Metanol merupakan pelarut yang mampu menyari senyawa

bersifat polar maupun nonpolar. Penelitian yang dahulu diketahui bahwa daun rosemary yang di ekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol mampu menyari senyawa aktif seperti asam betulinat, asam oleanolat, dan asam ursolat (Abe *et al*, 2002). Ekstrak metanol daun rosemary telah ditemukan untuk menghambat proliferasi sel kanker seperti kanker paru-paru dengan nilai IC_{50} sebesar 24,08 $\mu\text{g/mL}$. Efek sitotoksik ekstrak metanol daun rosemary pada sel kanker payudara T47D menunjukkan nilai IC_{50} 13,95 $\mu\text{g/mL}$ dan mampu menginduksi apoptosis 19,68%. Asam betulinat pada sel kanker serviks HeLa juga memiliki aktivitas antiproliferatif sel dengan nilai IC_{50} sebesar 30,43 μM dan mampu menginduksi apoptosis (Xu *et al*, 2014).

Metode yang digunakan untuk uji sitotoksitas adalah uji *MTT assay*. Uji *MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5 diphenyl tetrazolium bromide)* merupakan uji yang digunakan untuk mengukur viabilitas sel. MTT masuk ke dalam sel dan direduksi oleh enzim suksinat dehidrogenase menjadi formazan berwarna ungu yang tidak larut dan pada mitokondria (Riss *et al*, 2013). Sel T47D yang hidup ditandai dengan terbentuknya kristal formazan berwarna ungu.

Pada penelitian sebelumnya, pemberian ekstrak metanol daun rosemary terhadap model sel kanker payudara T47D yang dapat mengekspresikan *Era*. Pengujian yang dilakukan untuk melihat viabilitas sel yaitu dengan metode *MTT assay* dan menunjukkan efek sitotoksik dengan nilai IC_{50} 13,95 $\mu\text{g/ml}$ (Anggraeni, 2015). Penelitian yang lain yaitu pemberian ekstrak metanol rosemary terhadap sel kanker serviks HeLa. Metode yang digunakan adalah *MTT assay* dan uji imunositokimia untuk melihat ekspresi gen Bcl-2. Hasil uji viabilitas sel menunjukkan ekstrak metanol daun rosemary memiliki nilai IC_{50} sebesar 320 $\mu\text{g/mL}$ dan menginduksi apoptosis sebesar 27%.

Berdasarkan latar belakang diatas dapat disimpulkan bahwa perlu dilakukan penelitian tentang pengujian ekstrak dan fraksi polar, semipolar, dan non polar daun rosemary terhadap sel kanker payudara T47D. Proses ekstraksi dilakukan dengan pelarut yang sesuai agar zat aktif yang terkandung di dalam daun bisa ditarik keluar, dan fraksinasi diperlukan agar mendapatkan senyawa-senyawa yang aktif sebagai antikanker. Pengujian sitotoksitas menggunakan

metode MTT assay untuk melihat viabilitas sel, kemudian dilanjutkan dengan metode imunositokimia untuk melihat ekspresi gen p53 dan Bcl-2.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, permasalahan yang diteliti dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah ekstrak dan fraksi daun rosemary (*Rosmarinus officinalis*) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker T47D dan berapa nilai IC₅₀nya?
2. Apakah fraksi hasil ekstraksi cair-cair daun rosemary (*Rosmarinus officinalis*) menunjukkan aktifitas sitotoksik paling kuat dibanding ekstraknya?
3. Bagaimana indeks selektivitas ekstrak dan fraksi daun rosemary (*Rosmarinus officinalis*) pada sel T47D terhadap sel Vero?
4. Apakah ekstrak dan fraksi daun rosemary (*Rosmarinus officinalis*) mempengaruhi jumlah protein Bcl-2 dan p53 pada sel kanker payudara ?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah ekstrak dan fraksi daun Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker T47D dan nilai IC₅₀.
2. Untuk mengetahui ekstrak atau fraksi yang lebih baik aktivitasnya
3. Untuk mengetahui indeks selektivitas ekstrak dan fraksi daun rosemary (*Rosmarinus officinalis*) pada sel T47D terhadap sel Vero
4. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak dan fraksi daun rosemary (*Rosmarinus officinalis*) terhadap jumlah protein Bcl-2 dan p53.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan tambahan data ilmiah sebagai sumber acuan pemanfaatan daun Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) baik untuk penelitian lebih lanjut maupun dalam pengobatan tradisional guna pengobatan alternatif kanker payudara.

E. Keaslian Penelitian

Penelitian ini sepanjang penelusuran pustaka belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian serupa yang telah dilakukan oleh Anggraeni (2015) ekstrak rosemary menunjukkan efek sitotoksik dengan nilai IC_{50} 13,95 μ L/mL dan dapat menginduksi apoptosis 19,68%, nekrosis 77,33%, dan dapat menekan ekspresi $ER\alpha$ 91-93% pada sel T47D.

Penelitian yang lain, dilakukan oleh Lela (2017) ekstrak metanol daun rosemary menunjukkan efek sitotoksik lemah dengan nilai IC_{50} sebesar 320 μ g/mL, dan jalur kematian sel pada konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC_{50} menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun rosemary dapat menginduksi apoptosis sebesar 27% pada uji *flowcytometry* dengan waktu inkubasi 24 jam. Hasil uji imunositokimia daun rosemary dapat menekan kuat ekspresi protein Bcl-2 pada konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC_{50} pada sel kanker serviks.

Penelitian yang dilakukan oleh Margaritha (2014) rosemary diekstraksi dengan *supercritical fluid extraction*. Sel kanker yang di gunakan salah satunya adalah T47D. Viabilitas sel diuji dengan metode *MTT assay* menggunakan *24-well plate*. Hasil didapatkan nilai IC_{50} 80 μ g/mL. Efek penghambatan obat antitumor yang saat ini digunakan dalam terapi kanker payudara terhadap viabilitas sel tumor dinilai dengan uji MTT dan dibandingkan dengan efek obat yang dikombinasikan dengan SFRE. Setiap molekul kemoterapi diuji dalam subtype tumor di mana ia diterapkan dalam pengaturan klinis. Hasil menunjukkan bahwa setiap kombinasi yang diuji menghambat viabilitas sel tumor ke tingkat yang secara signifikan lebih tinggi daripada obat kemoterapi saja.

Penelitian Yesilet *al* (2010) menggunakan ekstrak metanolik dan superkritis rosemary dipanen dari tiga lokasi yang berbeda di Tukey. Selanjutnya, enam ekstrak dan senyawa aktif, asam carnosic dan asam rosmarinic yang ada fraksi n-heksan diaplikasikan pada berbagai lini sel kanker manusia termasuk NCI-H82 (manusia, paru-paru sel kecil, karsinoma), DU-145 (manusia, prostat, karsinoma), Hep- 3B (manusia, hitam, hati, karsinoma, hepatoseluler), K-562 (leukemia myeloid kronis manusia), MCF-7 (manusia, payudara, adenokarsinoma), PC-3 (manusia, prostat, adenokarsinoma) dan MDA-MB-231

(Manusia, payudara, adenokarsinoma) dengan uji MTT. Hasil menunjukkan ekstrak CO₂ superkritis memiliki efek antiproliferatif yang unggul dibandingkan dengan ekstrak sokhlet. Meskipun ekstrak menunjukkan berbagai efek sitotoksik terhadap garis sel yang berbeda, nilai IC₅₀ yang relatif rendah berkisar antara 12,50 dan 47,55 µg / ml dicapai terhadap K-562, menjadi garis sel yang paling sensitif. Selain itu, asam carnosic menyebabkan viabilitas sel terendah dengan nilai berkisar antara 13 hingga 30% pada konsentrasi 19µM setelah 48 jam perawatan, menghasilkan efek antiproliferatif yang unggul.

Penelitian yang dilakukan (Machado *et al*, 2012) ekstraksi daun rosemary dengan etanol dan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol. Hasil menunjukkan bahwa senyawa aktif asam rosmarinat dan carnosol berada pada fraksi n-heksan. Senyawa aktif asam betulinat, asam oleanolat dan asam ursolat berada pada fraksi etil asetat.