

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI *n*-HEKSANA
UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.)
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**



Oleh :

**Merisa Setyara
18144359A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016**

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI *n*-HEKSANA
UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller.f.)
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
Derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh:

Merisa Setyara

18144359A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016**

PENGESAHAN SKRIPSI

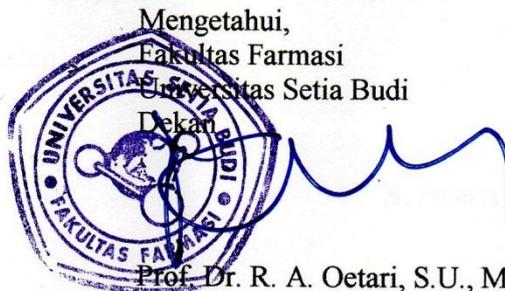
berjudul

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI *n*-HEKSANA
UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller.f.)
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

Oleh
Merisa Setyara
18144359A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 17 Oktober 2016

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan



Prof. Dr. R. A. Oetari, S.U., M.M., M.Sc., Apt.

Pembimbing Utama



Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt.

Pembimbing Pendamping



Fransiska Leviana, M.Sc., Apt.

Penguji :

1. Dr. Gunawan Pamudji Widodo, M.Si., Apt

2. Titik Sunarni, M.Si., Apt

3. Iswandi, M.Farm., Apt

4. Drs. Widodo Priyanto., Apt



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar apapun di suatu perguruan tinggi, serta 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 di kemudian hari dapat ditemukan adanya unsur penjiplakan maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 17 Oktober 2016



Merisa Setyara
18144359A

PERSEMBAHAN

“Manusia yang sukses memiliki rutinitas melakukan hal yang tak senang dilakukan oleh manusia malas. Manusia sukses itu sendiri sebenarnya juga tak senang melakukannya, tetapi ketidaksukaan mereka dapat ditaklukkan oleh kemampuan dan tujuan mereka.”

(Mario Teguh)

”Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning.

(Belajar dari hari kemarin, hidup untuk hari ini, berharap untuk hari esok.

Yang terpenting tidak berhenti bertanya)”

“Jika A adalah sukses dalam hidup, maka $A = X + Y + Z$. X adalah bekerja, Y adalah bermain, dan Z adalah menjaga lisan.”

(Albert Einstein)

Skripsi ini kupersembahkan kepada:

Almarhum Ayah & Ibu tercinta atas dukungan dan doanya

Kakak-kakakku dan seluruh keluargaku tersayang

Calon pendamping hidupku terkasih atas penantian dan doanya

Sahabat seperjuangan Morning Glory dan Areca Crew

Sahabat transfer dan teman-teman yang selalu mendukung

Bangsa dan negara

Almamaterku

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah memberikan kasih, berkat dan penyertaan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini guna memenuhi persyaratan untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm.) dari Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Skripsi ini berjudul **“Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Dan Fraksi *n*-Heksana Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D”** dengan harapan dapat memberikan sumbangan terhadap kemajuan dunia pendidikan, khususnya di bidang farmasi.

Berkat dorongan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bpk. Dr. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Ibu Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Ibu Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt., selaku pembimbing utama yang telah menuntun dan memberi pengarahan serta semangat dalam penyusunan skripsi.
4. Ibu Fransiska Leviana, M.Sc., Apt., selaku pembimbing pendamping yang telah menuntun dan memberi pengarahan serta semangat dalam penyusunan skripsi.

5. Tim penguji bapak Dr. Gunawan Pamudji Widodo, M.Si., Apt, ibu Titik Sunarni, M.Si., Apt, bapak Iswandi, M.Farm., Apt, dan bapak Drs. Widodo Priyanto., Apt yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk penyempurnaan skripsi ini.
6. Ibu Rumbiwati dan segenap staf karyawan di Laboratorium Parasitologi UGM, terima kasih atas kesediaannya menerima, menasehati, dan membantu dalam praktikum guna penyelesaian skripsi.
7. Keluarga kecil ku, almarhum ayah, ibu, dan kedua kakak ku, terima kasih atas dukungan yang tiada henti.
8. Sahabat-sahabat pejuang S.Farm transfer (Alfiah, Deni, Desi, Indah, Kuni, Nabila, Ni Luh, Nur atik, Ayun, Santi, Sari, Nina, Uswa, dan Yuna) terimakasih dukugan dan semangat dari kalian.
9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu. Semua ini merupakan anugerah dan pengalaman yang tidak dapat terlupakan.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas semua bantuan yang telah diberikan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu farmasi dan almamater tercinta.

Surakarta, 17 Oktober 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
INTISARI.....	xiv
ABSTRAK	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Tanaman Bidara Upas	5
1. Klasifikasi	5
2. Nama daerah dan sinonim.....	5
3. Morfologi tanaman.....	5
4. Kandungan kimia	6
5. Manfaat tanaman.....	6
B. Ekstraksi.....	7
1. Pembuatan serbuk simplisia	7
2. Cairan pelarut	8
3. Separasi dan pemurnian	8
C. Metode Ekstraksi.....	9
1. Cara dingin.....	9
2. Cara panas	10
D. Fraksinasi	12
E. Pelarut	13

F.	Kanker	15
1.	Pengertian kanker.....	15
2.	Sifat kanker	16
3.	Pengobatan kanker	17
G.	Kanker Payudara	19
H.	Sel Vero.....	20
I.	Sel T47D	21
J.	Kultur Sel	22
K.	Uji Sitotoksik	23
L.	Metode Pengujian Sitotoksik (MTT <i>assay</i>)	24
M.	Uji Indeks Selektivitas	25
N.	Landasan Teori.....	26
O.	Hipotesis	29
BAB III	METODE PENELITIAN	30
A.	Populasi dan Sampel	30
B.	Variable Penelitian	30
1.	Identifikasi variabel utama.....	30
2.	Klasifikasi variabel utama	31
3.	Definisi operasional variabel utama.....	31
C.	Alat dan Bahan	33
1.	Alat.....	33
2.	Bahan	33
D.	Jalannya Penelitian.....	34
1.	Determinasi tanaman bidara upas	34
2.	Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk	34
3.	Penetapan susut pengeringan	35
4.	Pembuatan fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas	35
5.	Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol umbi bidara upas	36
6.	Identifikasi kandungan kimia fraksi <i>n</i> -heksana secara KLT	37
7.	Pembuatan reagen	38
8.	Pembuatan sampel uji	40
9.	Persiapan kultur sel T47D.....	41
10.	Uji sitotoksik fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas (<i>treatment cell</i>)	42
11.	Uji indeks selektivitas	43
E.	Analisis Hasil	44
BAB IV	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	47
1.	Determinasi tanaman bidara upas	47
2.	Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk	47
3.	Hasil penetapan susut pengeringan	48
4.	Pembuatan ekstrak dan fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas.....	48

5.	Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol Umbi bidara upas	50
6.	Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol dan fraksi <i>n</i> -heksana secara KLT	51
7.	Uji sitotoksik ekstrak dan fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas terhadap sel T47D	54
8.	Uji indeks selektivitas ekstrak umbi bidara upas	60
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	62
A.	Kesimpulan	62
B.	Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tanaman bidara upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.) Haller f.).....	5
2. Pembuatan fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.) Haller f.).....	45
3. Uji sitotoksik fraksi ekstrak etanol dan <i>n</i> -heksana umbi bidara upas (<i>Merremia mammosa</i> (Lour.) Haller f.).....	46
4. Profil KLT ekstrak dan fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas.....	52
5. Morfologi sel T47D sebelum dan sesudah pemberian tripsin.....	54
6. Grafik hasil interpretasi log konsentrasi terhadap % viabilitas sel	57
7. Morfologi sel T47D setelah pemberian fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara Upas	60

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Indeks polaritas beberapa jenis pelarut	15
2. Hasil rendemen bobot basah terhadap bobot kering umbi bidara upas	48
3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk umbi bidara upas.....	48
4. Hasil ekstrak etanol umbi bidara upas	49
5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak umbi bidara upas	49
6. Hasil fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas	50
7. Hasil pemeriksaan organoleptis fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas	50
8. Hasil identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak umbi bidara upas.....	51
9. Hasil identifikasi ekstrak dan fraksi <i>n</i> -heksana secara KLT.....	53

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Surat keterangan determinasi tanaman bidara upas	68
2. <i>Etichal clearance</i> uji sitotoksik	69
3. Gambar alat dan bahan.....	70
4. Perhitungan rendemen simplisia umbi bidara upas.....	73
5. Perhitungan susut pengeringan umbi bidara upas.....	74
6. Hasi identifikasi senyawa umbi bidara upas	74
7. Hasil pengamatan bercak KLT UV 254 nm dan UV 366 nm.....	76
8. Pola <i>microplate</i> uji sitotoksik	76
9. Perhitungan volume panen sel	77
10. Perhitungan pembuatan larutan stok dan larutan seri uji	77
11. Perhitungan IC ₅₀ ekstrak umbi bidara upas	79
12. Perhitungan IC ₅₀ fraksi <i>n</i> -heksana umbi bidara upas.....	80
13. Perhitungan indeks selektivitas.....	81

DAFTAR SINGKATAN

DMSO	: <i>Dimetil sulfoksida</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
IC ₅₀	: <i>Inhibitory Concentration 50%</i>
MTT	: <i>Microculture Tretazolium Technique</i>
PBS	: <i>Phospate Buffered Saline</i>
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	: <i>Sodium Dedocyl Sulphate</i>
UV	: <i>Ultra Violet</i>

INTISARI

SETYARA, M., 2016, UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI *n*-HEKSANA UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller.f.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D.

Kanker payudara pada wanita merupakan peringkat pertama dibandingkan kasus kanker lainnya. Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) secara empiris umbi digunakan untuk mengobati tumor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas terhadap sel kanker payudara T47D dan untuk mengetahui indeks selektivitas ekstrak etanol terhadap sel vero.

Umbi bidara upas diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 % dan difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana. Uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas dilakukan dengan metode *Microculture Tetrazolium Technique* (MTT) dengan seri konsentrasi pada ekstrak 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 µg/ml dan pada fraksi *n*-heksana 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 µg/ml. Persamaan regresi linier dibuat antara log konsentrasi dengan % viabilitas, kemudian digunakan untuk menghitung IC₅₀. Selektivitas aktivitas sitotoksik diketahui dengan persamaan indeks selektivitas, yaitu nilai IC₅₀ sel vero berbanding IC₅₀ sel T47D.

Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol umbi bidara upas memiliki nilai IC₅₀ sebesar 165,163 µg/ml (> 100 µg/ml) dimana tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik dan IC₅₀ fraksi *n*-heksana sebesar 28,567 µg/ml (< 100 µg/ml) menunjukkan aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel kanker payudara T47D. Indeks selektivitas ekstrak etanol terhadap sel vero didapatkan nilai sebesar 4,473.

Kata kunci : umbi bidara upas, sel T47D, sitotoksik, indeks selektivitas

ABSTRACT

SETYARA, M., 2016, CYTOTOXIC ASSAY of BIDARA UPAS TUBER (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) ETANOL EXTRACT AND *n*-HEKSANA FRACTION AGAINST BREAST CANCER T47D CELLS.

Breast cancer in women is the first rank compared to other cancer cases. Bidara upas tuber (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) was empirically used to treat tumors. This study aimed to determine the cytotoxic activity of ethanol extract and *n*-hexane fraction bidara upas tuber against breast cancer T47D cells and determine the selectivity index of ethanol extract against vero cells.

Bidara upas tuber was macerated by 96% ethanol and was fractionated by *n*-hexane. The cytotoxic activity test of ethanol extract and *n*-hexane fraction of bidara upas tuber was done using Microculture Tetrazolium Technique (MTT) method with a series for extract concentration 1000; 500; 250; 125; 62.5; 31.2; 15.6 µg/ml and for fraction of *n*-hexane of 500; 250; 125; 62.5; 31.2; 15.6; 7.8 µg/ml. Cell death was calculated determine used linear regression equation between log concentration cell with % viability. The selectivity of cytotoxic activity was known by selectivity index equation, which was IC₅₀ of vero cells proportionate with IC₅₀ of T47D cells.

The results of cytotoxic activity of ethanol extract of bidara upas tuber have IC₅₀ value of 165,163 µg/ml (> 100 µg/ml), it was not showed potent activities and IC₅₀ value was showed fraction of *n*-hexane bidara upas of 28.567 µg/ml(< 100 µg/ml), it was showed potent active against breast cancer cells T47D. Selectivity index of ethanol extract in against vero cells was gotten value of 4.473.

Key words : bidara upas tuber, T47D cells, cytotoxic, selectivity index

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan suatu penyakit yang mengalami pertumbuhan tidak normal dan cepat, yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan memiliki kemampuan untuk menyerang jaringan biologis lainnya (Dianda 2009; Hawari 2004). Menurut WHO, kanker merupakan penyebab utama kematian diseluruh dunia dan menyumbang 8,2 juta kematian (22% dari semua kematian NCD) pada tahun 2012.

Kanker payudara adalah malignan yang berasal dari jaringan payudara (Dipiro *et al.* 2009). Kanker payudara merupakan penyakit kanker jenis sarkoma yang sering ditemui pada wanita. *National Cancer Institute* (NCI) memperkirakan akan ada kasus baru kanker payudara pada wanita sebanyak 232.340 kasus dengan jumlah kematian 39.620 kematian dan sebanyak 22.240 kasus pada laki-laki dengan jumlah kematian 410 kematian pada tahun 2013 di Amerika Serikat (NCI, 2014). Hal ini terjadi hampir di seluruh dunia termasuk di Indonesia. Di Indonesia menurut data dari WHO pada tahun 2014, jumlah kasus kanker payudara pada wanita merupakan peringkat pertama dibandingkan kasus kanker lainnya dengan jumlah sebanyak 48.998 kasus.

Pengobatan kanker payudara secara medis dapat dilakukan dengan cara pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, terapi radiasi, dan yang terbaru terapi

imunologi. Pengobatan-pengobatan ini bertujuan untuk memusnahkan kanker atau membatasi perkembangan penyakit serta menghilangkan gejala-gejala. Antikanker yang ada sekarang umumnya menekan pertumbuhan atau proliferasi sel tetapi menimbulkan toksisitas karena menghambat pembelahan sel normal yang proliferasinya cepat antara lain sumsum tulang, mukosa saluran cerna, folikel rambut dan jaringan limfosit (Kurnijasanti 2008). Hal tersebut menjadi sebuah tantangan untuk terus melakukan studi dan pencarian terhadap obat antikanker, terutama yang berasal dari bahan alam khususnya tumbuh-tumbuhan, dengan harapan dapat menemukan antikanker yang efektif dan dapat mengurangi efek samping yang berbahaya.

Salah satu tanaman obat yang bermanfaat untuk menjaga dan mengobati gangguan kesehatan adalah bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.). Bidara upas termasuk dalam golongan *Convolvulaceae*. Beberapa jenis tumbuhan dengan genus dan family yang sama dengan bidara upas telah terbukti memiliki aktivitas sitotoksik. Berdasarkan penelitian Prabhu *et al.* (2012), pada fraksi etil asetat *Merremia emarginata* Burm. F. menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} 51,57 $\mu\text{g/ml}$ pada sel kanker serviks Hela dan 39,6 $\mu\text{g/ml}$ pada sel kanker payudara MCF-7. Adapun penelitian Jian *et al.* (2010), berhasil mengisolasi 8 senyawa-senyawa fenolik pada *Merremia umbellata* subsp. *orientalis* (Hall. f.) yang memiliki aktivitas kemopreventif.

Secara empiris, umbi bidara upas digunakan untuk mengobati tumor, radang tenggorokan, demam tifoid, dan batuk rejan (Widyaningrum 2011). Bidara upas merupakan salah satu tanaman yang dikembangkan oleh Rumah Riset Jamu

(RRJ) “Hortus Medicus” Tawangmangu untuk terapi kanker dan tumor (Zulkarniah 2015). Hasil skrining fitokimia pada ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas, berhasil ditemukan senyawa terpenoid dengan menggunakan kromatografi kolom (Pristianti 2011). Senyawa golongan terpenoid menunjukkan aktivitas farmakologi yang menarik sebagai antiviral, antibakteri, antiinflamasi, antikanker, dan sebagai inhibisi terhadap sintesis kolesterol (Mahato *et al.* 1997 & Ismarti 2011). Hasil isolasi pada umbi segar bidara upas ditemukan 13 senyawa baru glikosida resin yaitu: *merremoside* (a, b, c, d, e, f, g, h₁ dan h₂) dan *mammoside* (A, B, H₁ dan H₂) (Kitagawa 1996). Senyawa glikosida resin pada *Ipomoea tricolor* Cav. dapat menghambat aktivitas sitotoksik sel kanker ovarium A2780 dengan nilai 0,30 µg/ml (Pereda-Miranda 2009).

Melihat adanya potensi aktivitas sitotoksik yang besar dari umbi bidara upas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker khususnya kanker payudara. Penelitian kali ini ingin menguji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas terhadap sel kanker payudara T47D dan untuk mengetahui indeks selektivitas ekstrak etanol terhadap sel vero dengan menggunakan metode MTT.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D?

2. Apakah fraksi *n*-heksana umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D?
3. Berapa nilai indeks selektivitas ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) dari sel kanker payudara T47D terhadap sel vero?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) terhadap sel kanker payudara T47D.
2. Untuk mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) terhadap sel kanker payudara T47D.
3. Mengetahui nilai indeks selektivitas ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) dari sel kanker payudara T47D terhadap sel vero.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai aktivitas daya sitotoksitas ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas terhadap sel kanker dan semakin bertambahnya alternatif pengobatan kanker yang bersumber dari tanaman obat Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Bidara Upas



Gambar 1. Tanaman bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.)
(Sumber : CCRC UGM Farmasi)

1. Klasifikasi

Dalam dunia tumbuhan kedudukan tanaman bidara upas dapat dilihat pada sistematika sebagai berikut:

Kingdom : Plantae (tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionta (berpembuluh)

Superdivisio : Spermatophyta (menghasilkan biji)

Divisio : Magnoliophyta (berbunga)

Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)

Sub-kelas : Asteridae

Ordo : Solanales

Familia : Convolvulaceae (suku kangkung-kangkungan)

Genus : *Merremia*

Spesies : (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) (Dalimarta 2009).

2. Nama daerah dan sinonim

Blanar, widara upas (Jawa), hailale (Ambon) (Dalimarta 2009).

3. Morfologi tanaman

Tumbuh liar di hutan, kadang di tanam di halaman dekat pagar sebagai tanaman obat atau karena umbinya dapat dimakan. Tumbuh dengan baik di daerah tropik dari dataran rendah sampai ketinggian 250 m dpl. Merupakan tanaman merayap atau membelit yang panjangnya 3-6 m, batangnya kecil bila dipegang agak licin dan warnanya agak gelap. Daun tunggal, bertangkai panjang, berbentuk jantung, tepi rata, ujung meruncing, panjang 5-12 cm, lebar 4-15 cm, warnanya hijau tua. Perbungaan berbentuk payung menggarpu berkumpul 1-4 bunga, bentuknya seperti lonceng berwarna putih, panjang 7-8 cm, dengan 4 helai kelopak. Umbi berkumpul di dalam tanah, mirip ubi jalar. Bila tanahnya kering dan tidak tergenang air serta gembur, beratnya dapat mencapai 5 kg atau lebih. Warna kulit umbinya kuning kecoklatan, kulitnya tebal bergetah warna putih, bila kering warnanya menjadi coklat. Perbanyakkan dengan stek batang atau menanam umbinya (Dalimarta 2009).

4. Kandungan kimia

Dalam umbi bidara upas terkandung senyawa damar, resin, pati, zat pahit (Dalimarta 2009). Secara kimia biasanya diyakini bahwa alkaloid yang menjadi penyebab rasa pahit pada tumbuhan, tetapi dalam banyak kasus ternyata penyebabnya terpenoid (Robinson 1995). Getah segar mengandung zat oksidase (Dalimarta 2009). Menurut Farizal (2012), di dalam bidara upas mengandung 4

senyawa penting yaitu: alkaloid, tanin, flavonoid dan polifenol. Hasil isolasi pada umbi segar bidara upas ditemukan 13 senyawa baru glikosida resin yaitu *merremoside* (a, b, c, d, e, f, g, h₁ dan h₂) dan *mammoside* (A, B, H₁ dan H₂) (Kitagawa 1996).

5. Manfaat tanaman

Bidara upas bermanfaat untuk mengobati difteri, radang tenggorokan, radang paru, radang usus buntu, tipus, sembelit, buang air besar darah, muntah darah, kencing manis (DM), batu kandung kencing, keracunan makanan, gigitan ular, kanker, kusta, sipilis (Lues) (Dalimarta 2009).

B. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI 1995)

Ekstrak cair adalah sediaan cair simplisia nabati, yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet atau sebagai pelarut dan pengawet. Ekstrak cair yang cenderung memebentuk endapan dapat didiamkan dan disaring atau bagian yang bening dienaptuangkan (Depkes RI 1995).

1. Pembuatan serbuk simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering (penyerbukan). Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan dasar beberapa hal. Seperti semakin luas serbuk simplisia, maka proses ekstraksi makin efektif dan efisien, namun makin halus serbuk, maka makin rumit secara teknologi peralatan untuk tahap filtrasi (Depkes RI 2000).

2. Cairan pelarut

Cairan pelarut dalam pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam ekstrak total, maka cairan pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung (Depkes RI 2000).

3. Separasi dan pemurnian

Tujuan dari tahap ini adalah menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses-proses pada tahap ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tak campur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi serta proses adsorpsi dan penukar ion (Depkes RI 2000).

3.1 Pemekatan/penguapan (vaporasi dan evaporasi). Pemekatan berarti peningkatan jumlah parsial solut (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering, ekstrak hanya menjadi kental / pekat (Depkes RI 2000). Vaporisasi atau *boiling down* digunakan untuk menggambarkan pemekatan suatu ekstrak dibandingkan dengan evaporasi. Evaporasi didefinisikan sebagai proses perubahan keadaan cair menjadi gas dengan kehadiran gas lain, seperti udara, pada wadah atau tempat evaporasi. Pada vaporisasi, hanya molekul dari pelarut yang hadir dalam wadah atau tempat vaporisasi. Istilah *boiling down* digunakan ketika objek yang ingin diperoleh kembali adalah zat padat atau konsentrat dengan kepadatan tinggi, istilah vaporisasi digunakan ketika objek yang ingin diperoleh kembali adalah pelarutnya (Handa *et al.* 2008).

3.2 Pengerinan ekstrak. Pengerinan berarti menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan serbuk, masa kering-rapuh, tergantung proses dan peralatan yang digunakan (DepKes RI 2000). Pengerinan merupakan salah satu proses yang dapat menentukan baik buruknya mutu produk yang dihasilkan. Proses pengerinan harus memperhatikan sifat-sifat zat aktif, cara pemanasan, tinggi suhu dan lamanya pemanasan. Pengerinan yang baik adalah yang dapat menghasilkan produk zat aktif yang maksimal yang dapat mencegah kerusakan, menghasilkan butiran yang mudah dihaluskan, mudah larut, dan warna serbuk yang dihasilkan tidak terlalu gelap (Depkes RI 1986).

C. Metode Ekstraksi

Ekstraksi dengan menggunakan pelarut dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu:

1. Cara dingin

1.1 Maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut beberapa kali pengocokan dan pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (DepKes RI 2000).

1.2 Perkolasi. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses perkolasi terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/ penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI 2000).

2. Cara panas

2.1 Refluks. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut dengan temperature titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relative konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali (Depkes RI 2000). Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan.

Metode ini umumnya digunakan untuk mensistesis senyawa-senyawa yang mudah menguap atau volatil. Pada kondisi ini jika dilakukan pemanasan biasa maka pelarut akan menguap sebelum reaksi berjalan sampai selesai. Prinsip dari metode refluks adalah pelarut volatil yang digunakan akan menguap pada suhu tinggi, namun akan didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut yang tadinya dalam bentuk uap akan mengembun pada kondensor dan turun lagi ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung (Depkes RI 1986).

2.2 Soxhlet. Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilaksanakan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI 2000). Keuntungan dari metode ini antara lain: cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit dan secara langsung diperoleh hasil yang lebih pekat, serbuk simplisia disari oleh cairan penyari yang murni sehingga dapat menyari zat aktif lebih banyak, penyarian dapat diteruskan sesuai dengan keperluan tanpa menambah volume cairan penyari (Depkes RI 1986).

2.3 Digesti. Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (Depkes RI 2000). Cara maserasi ini hanya dapat dilakukan untuk simplisia yang aktif tahan terhadap pemanasan. Jika cairan penyari mudah menguap pada suhu yang digunakan, maka perlu dilengkapi dengan pendingin balik, sehingga cairan penyari yang menguap akan kembali ke dalam bejana (Depkes RI 1986).

2.4 Infus. Infus adalah ekstraksi dengan pelarut cair pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih), temperatur terukur 96-98°C selama waktu tertentu (15-20 menit) (Depkes RI 2000). Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dar bahan-bahan nabati. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan kapang. Oleh sebab itu sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam (Depkes RI 1986)

2.5 Dekok. Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (\pm 30 menit) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI 2000). Perbedaan dekokta dengan infus adalah dekok penyariannya selama 30 menit sedangkan infuse hanya sekitar 15 menit dengan suhu yang sama. Pembuatan infus dan dekok ditentukan oleh sifat dari bahan/ sampel, yang pada bahan-bahan tidak terdapat minyak atsiri, dan pada bahan bahan dimana bagian-bagiannya tahan terhadap penghangatan (Anonim 2013).

D. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain. Senyawa bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, dan senyawa nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar (Harborne 1987). Ekstraksi cair-cair dengan menggunakan corong pisah merupakan pemisahan komponen kimia diantara dua fase pelarut yang tidak saling bercampur, dimana sebagian komponen larut pada

fase pertama, dan sebagian larut pada fase kedua. Kedua fase yang mengandung pelarut terdispersi dikocok, kemudian dibiarkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair. Komponen-komponen kimia akan terpisah dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi yang tetap (Adijuwana & Nur 1989).

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran (padat, cair, terlarut, suspensi, atau isotop) dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) komposisi perubahan menurut kelandaian. Pembagian atau pemisahan ini didasarkan pada bobot dari tiap fraksi, fraksi yang lebih berat akan berada paling dasar sedang fraksi yang lebih ringan akan berada di atas. Fraksi bertingkat biasanya menggunakan pelarut organik seperti eter, aseton, benzen, metanol, etanol, diklorometan, atau campuran pelarut tersebut. Asam lemak, asam resin, lilin, tannin, dan zat warna adalah bahan yang penting dan dapat diekstraksi dengan pelarut organik (Adijuwana & Nur 1989).

E. Pelarut

Beberapa pertimbangan yang penting dalam memilih pelarut adalah daya larutnya tinggi sehingga diperoleh senyawa yang diinginkan semaksimal mungkin dan pelarut tersebut tidak berbahaya atau tidak beracun. Pelarut yang digunakan sebaiknya tidak memiliki titik didih yang terlalu tinggi karena akan mempersulit pengambilan kembali pelarut. Aspek lain yang menjadi pertimbangan jenis pelarut yang digunakan dalam pemisahan adalah tingkat kepolaran pelarut. Pelarut yang bersifat polar dapat melarutkan senyawa polar sedangkan senyawa nonpolar akan

melarutkan senyawa yang nonpolar juga. Seleksi pelarut dalam penelitian ini didasarkan pada tingkat kepolaran pelarut (Depkes RI 1995).

Pelarut yang serba guna, dan pemakaiannya paling luas untuk ekstraksi adalah campuran hidroalkohol. Hidroalkohol merupakan gabungan dari pelarut air dan alkohol yang dapat bercampur dengan baik, sehingga memungkinkan kombinasi yang fleksibel dari kedua bahan tersebut membentuk campuran pelarut yang paling sesuai untuk ekstraksi bahan aktif dari obat khusus. Pelarut hidroalkohol pada umumnya memberikan perlindungan yang terpadu terhadap kontaminasi mikroba, dan membantu mencegah pemisahan bahan yang diekstraksi bila didiamkan (Ansel 1989). Polaritas beberapa macam pelarut disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 1. Indeks polaritas beberapa jenis pelarut

Pelarut	Indeks polaritas
<i>n</i> -heksana	0
Toluene	2,4
Dietieter	2,8
Diklormetan	3,1
Butanol	3,9
Kloroform	4,1
Etil asetat	4,4
Aseton	5,1
Methanol	5,1
Etanol	5,2
Asetonitril	5,8
Asam asetat	6,2
Air	9,0

(Sumber: Hazimah 2013)

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96% dan *n*-heksana. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida,

kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, tanin dan saponin. Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel, memperbaiki stabilitas bahan obat pelarut (Voigt 1994).

Pelarut *n*-heksana adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih terdiri atas suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna atau pucat, transparan, bersifat volatil, mudah terbakar, bau karakteristik, tidak dapat larut dengan air, dapat larut dengan alkohol, benzen, kloroform, eter (Martindale 1993). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat nonpolar seperti minyak atsiri, minyak lemak dan asam lemak tinggi, steroid, triterpenoid, karotenoid (Harborne 1987).

F. Kanker

1. Pengertian kanker

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan sebelahnya (invasi) atau dengan migrasi sel lainnya (metastasis) (Amalina 2008). Pertumbuhan tidak terkendali tersebut disebabkan karena adanya kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi di gen pengatur pembelahan sel. Beberapa mutasi tersebut akan menyebabkan perubahan sel normal menjadi sel kanker. Mutasi-mutasi tersebut sering diakibatkan oleh gen kimia maupun fisik yang disebut karsinogen. Mutasi dapat terjadi secara spontan ataupun diwariskan (mutasi *germline*) (Heti 2008).

Kanker merupakan suatu neoplasma yang terdiri dari tumor jinak (*benign*) dan tumor ganas (*malignant*) (Kennia 2008). Tumor ganas bermetastasis dan tumor jinak tidak bermetastasis. Perbandingan antara intisel dengan sitoplasma tumor ganas 1:1, sedangkan tumor jinak 1:4 (sama dengan sel normal). Pada tumor ganas terdapat pleomorfi yaitu bentuk dan ukuran inti sel yang berbeda-beda, terdapat pula etia yaitu sel yang mempunyai inti lebih dari satu. Pada tumor ganas tidak terdapat anaplasia (dediferensiasi) yang berarti kehilangan kemampuan untuk berdeferensiasi sel (Amalina 2008; Rostika 2010).

2. Sifat kanker

Sel kanker memiliki perbedaan yang sangat signifikan dengan sel normal dalam tubuh. Sifat umum dari kanker ialah sebagai berikut (Ramli 2000): Sel kanker tidak mengenal program kematian sel yang dikenal dengan nama apoptosis. Protein *p53* mampu mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong penghancuran sendiri dari sel yang mengandung DNA yang tidak normal. Apoptosis sangat dibutuhkan untuk mengatur berapa jumlah sel yang dibutuhkan dalam tubuh, secara fungsional dan menempati tempat yang tepat dengan umur tertentu. Apabila telah melewati masa hidupnya, sel-sel normal akan mati dengan sendirinya tanpa ada efek inflamasi, namun sel kanker berbeda karakteristik tersebut. Sel kanker akan terus hidup meski seharusnya mati. Mutasi dari gen *p53* menyebabkan proliferasi dan transformasi sel menjadi kehilangan kendali.

Sel kanker tidak mengenal komunikasi ekstraseluler atau asosial. Komunikasi ekstraseluler diperlukan untuk menjalin koordinasi sel sehingga

mereka dapat saling menunjang fungsi masing-masing. Berdasarkan sifatnya yang asosial, sel kanker bertindak semaunya sendiri tanpa memedulikan kebutuhan lingkungannya. Sel kanker dapat memproduksi *growth factor* sendiri sehingga tidak bergantung pada rangsangan sinyal pertumbuhan dari luar untuk melakukan proliferasi. Sel kanker dapat tumbuh menjadi tidak terkendali.

Sel kanker mampu menyerang jaringan lain (invasif), merusak jaringan tersebut dan tumbuh subur di atas jaringan lain membentuk anak sebar (metastasis). Semakin besar jangkauan metastasis tumor, kanker semakin sulit untuk disembuhkan. Kanker pada stadium metastasis merupakan penyebab 90% kematian penderita kanker.

Sel kanker mampu membentuk pembuluh darah baru (neoangiogenesis) untuk mencukupi kebutuhan pangan dirinya sendiri, pembuluh darah baru ini dapat mengganggu kestabilan jaringan tempat sel kanker tumbuh dan sel kanker memiliki kemampuan yang tidak terbatas dalam memperbanyak dirinya sendiri (proliferasi), meski seharusnya sel kanker sudah tidak dibutuhkan dan jumlahnya sudah melebihi kebutuhan yang seharusnya. Berdasarkan kemampuannya untuk memenuhi kebutuhan sinyal pertumbuhan dan kemampuan menghindari mekanisme apoptosis, sel kanker memiliki kemampuan tidak terbatas untuk bereplikasi. Sel-sel yang mengalami kerusakan genetik tidak peka lagi terhadap mekanisme regulasi siklus sel akan menyebabkan penyimpangan siklus sel dan salah satu akibatnya adalah pembentukan kanker atau karsinogenesis.

3. Pengobatan kanker

3.1 Kemoterapi. Pemberian obat-obat sitotoksik menimbulkan efek samping yang umum seperti anemia, anoreksia, ansietas, perdarahan, demam, infeksi, insomnia, nyeri, alopesia (rambut rontok) dan *herpez zoster*. Sehingga penggunaan obat-obat ini seringkali dikombinasi dengan obat-obat lain dengan maksud untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan (Indrawati 2009). Jenis kemoterapi yang ada meliputi penggunaan antagonis hormone reproduksi untuk melawan kanker reproduksi. Contoh agen terbaik dari obat jenis ini adalah tamoksifen, yang digunakan secara klinis untuk melawan kanker payudara yang bergantung esterogen (Corwin 2009).

3.2 Radioterapi. Efek samping radioterapi berkaitan dengan beberapa hal: dosis total (*centingray*), lama pemberian fraksi dari dosis tersebut yaitu dosis harian, luas atau volume bagian tubuh yang diterai dan bagian tubuh yang diradiasi. Sel-sel yang lewat pada daerah yang diradiasi mungkin dapat mengalami perubahan dan mempengaruhi fungsi di tempat lain, misalnya efek samping umum anoreksia, sariawan atau faringitis, nyeri, dan kulit menjadi terbakar. Efek samping merupakan hal paling umum yang terjadi pada pemberian radioterapi dan akan mereda dalam waktu 2 minggu pengobatan (Indrawati 2009).

3.3 Pembedahan. Tindakan pembedahan dimaksudkan untuk mengurangi ukuran tumor, meredakan nyeri, dan mencegah metastasis jika dilakukan sejak dini (Indrawati 2009). Pembedahan juga digunakan untuk mengeksis bagian mayor dari tumor, yang mengurangi beban tumor dan meningkatkan respon terhadap kemoterapi atau radiasi (Corwin 2009).

3.4 Imunoterapi/bioterapi. Terapi jenis ini bekerja dengan mengaktifkan sistem imun untuk mengenali dan menghancurkan sel tumor secara spesifik, memblokir enzim dan faktor pertumbuhan yang diperlukan untuk metastasis (Corwin 2009). Imunoterapi yang saat ini sedang dikembangkan meliputi: stimulan imun, antibodi berlabel fluoresen, antibody penyerang dan terapi gen (Corwin 2009).

G. Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan kanker yang menyerang jaringan epitelial payudara, yaitu membran mukosa dan kelenjar sehingga kanker payudara tergolong pada karsinoma. Kanker payudara merupakan kanker yang paling umum diderita oleh wanita selain kanker serviks. Penyebab kanker payudara sangat beragam, antara lain kerusakan pada DNA yang menyebabkan mutasi genetik. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh radiasi yang berlebihan. Kegagalan *immune surveillance* dalam pencegahan proses malignan pada fase awal, faktor pertumbuhan yang abnormal, dan malfungsi DNA *repairs* seperti BRCA1, BRCA2, dan p53 (Torosian 2002).

Kanker payudara terjadi ketika sel pada payudara tumbuh tidak terkendali dan dapat menginvasi jaringan tubuh yang lain baik yang dekat dengan organ tersebut maupun bermetastasis ke jaringan tubuh yang letaknya berjauhan. Semua tipe jaringan pada payudara dapat berkembang menjadi kanker, namun pada umumnya kanker muncul baik dari saluran (*ducts*) maupun kelenjar (*glands*). Perkembangannya memerlukan waktu berbulan-bulan atau bertahun-tahun sampai

tumor tersebut cukup besar untuk dirasakan pada payudara. Deteksi dapat dilakukan dengan *mammogram* yang kadang-kadang dapat mendeteksi tumor sejak dini (Elwood *et al.* 1993).

Beberapa jenis sel kanker payudara yang dapat dikultur adalah MCF-7, Ia-270, BT 20, BT-474, BT-549, Colo-824, HBL-100, MA-CLS-2, MDA-MB-231, MDA-MB 435S, MDA-MB-436, MB-MDA-468, MX-1, SK-BR-3, ZR-75-1, dan T47D (Holliday 2011). Banyaknya jenis sel kanker payudara ini akan memberikan hasil yang berbeda pada setiap selnya. Perbedaan hasil ini akan memberikan peluang baru untuk menyelidiki perkembangan yang terjadi pada resistensi obat pada pasien dengan tumor payudara yang memiliki *p53* termutasi (Schafer *et al.* 2000).

H. Sel Vero

Kultur sel vero merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel monyet hijau dari Afrika. Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat dan digunakan sebagai model sel untuk mempelajari sinyal transduksi seluler. Sel ini cukup aman dan merupakan sel dari monyet yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (Desaintes *et al.* 1999).

Sel ini diketahui dapat hidup dan berkembang dengan sangat baik dalam kultur buatan di laboratorium sehingga sel vero banyak digunakan dalam laboratorium untuk penelitian di seluruh dunia. Kultur sel ini tumbuh dengan sangat agresif dan dapat dengan mudah menginvasi kultur sel lain. Sel ini cukup aman digunakan untuk kepentingan kultur sel (Desaintes *et al.* 1999). Sel Vero

dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media DMEM 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney 1986)

I. Sel T47D

Sel T47D merupakan sel kanker yang mengekspresikan reseptor estrogen atau yang biasa disebut ER positif serta mengekspresikan *p53* yang telah termutasi sehingga resisten terhadap mekanisme apoptosis (Ruddon 2007; Junedi *et al.* 2010). Pada sel ini, *p53* mengalami *missense mutation* pada residu 194 (dalam *zinc-binding domain L2*) sehingga *p53* kehilangan fungsinya. Jika *p53* tidak dapat mengikat *response element* pada DNA, maka akan mengurangi atau menghilangkan kemampuannya dalam meregulasi siklus sel dan memacu apoptosis. Sel ini dapat kehilangan estrogen reseptor (ER) apabila kekurangan estrogen pada jangka waktu lama selama percobaan *in vitro*. Oleh karena itu, sel ini digunakan pada model untuk penelitian resistensi obat pada pasien dengan tumor payudara yang memiliki *p53* termutasi (Abcam 2007).

Sel T47D sering digunakan dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas atau cepat pertumbuhannya, memiliki homogenitas yang tinggi dan mudah diganti sel baru yang telah dibekukan jika terjadi kontaminasi (Abcam 2007). Sel T47D

memiliki mekanisme antiapoptosis dan karsinogenesis lebih kuat daripada sel MCF-7. Beberapa protein yang terlibat dalam stimulasi pertumbuhan sel ini termasuk caspase-3 subunit p12, protein nuklir Hcc-1, G1/S-specific cyclin-D3, cathepsin B, protein CDV3 homolog, N (G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2, dan prohibitin (Aka *et al.* 2012).

J. Kultur Sel

Kultur sel merupakan teknik yang biasa digunakan untuk perkembangbiakan sel yang berasal dari *cell line* di luar tubuh (*in vitro*). Sedangkan kultur jaringan merupakan kultur tiga dimensi dari jaringan utuh atau sama seperti halnya *in vivo* (Mahardika 2004).

Kultur sel ditempatkan dalam wadah khusus yang steril (*Flask*), kebutuhan akan O₂ 95% harus dijaga dan menginkubasikannya pada inkubator sel yang mengandung kadar CO₂ 5%. Umumnya *cell line* tumbuh pada pH 7,4 sehingga kestabilannya harus dijaga dengan menambahkan buffer ke dalam medium kultur. Sel turunan disimpan pada temperatur -120 sampai -180°C agar sel tersebut tidak berproliferasi (Mahardika 2004).

Medium kultur yang sering dipakai dalam kultur sel *myeloma* atau *hibridoma* ialah RPMI 1640. Media ini mengandung garam-garam, asam amino, dan vitamin yang diperlukan sel untuk tumbuh. Serum juga diperlukan dalam pertumbuhan sel dan biasanya digunakan ialah *Fetal Calf Serum* (FCS) dan *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Mahardika 2004).

Uji proliferasi dapat dilakukan dengan menggunakan MTT yang diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase menjadi *formazan* yang berwarna ungu, selanjutnya diukur dengan spektrofotometri menggunakan ELISA *Plate Reader* (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Freshney 2000).

K. Uji Sitotoksik

Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksitas adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Technique*) assay. Uji sitotoksitas adalah uji *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetik, zat tambahan makanan, pestisida, dan juga untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari senyawa (Burdall *et al.* 2003).

Sitotoksitas adalah sejauh mana agen memiliki tindakan destruktif spesifik pada sel-sel tertentu. Kerusakan sel yang disebabkan oleh xenobiotik pada umumnya mengakibatkan perubahan pada permeabilitas maupun integritas membran sel, akibatnya enzim sitolitik akan keluar ke dalam media. Adanya kebocoran enzim ini merupakan parameter utama dalam penentuan sitotoksitas suatu xenobiotik secara *in vitro*. Enzim ini sangat stabil sehingga dikembangkan metode untuk mengestimasi aktivitas seluler sel yang masih hidup. Sel yang terkena pengaruh dari xenobiotik meskipun belum mati, akan menunjukkan aktivitas yang lebih rendah. *Biological endpoint parameters* yang dapat dipakai

untuk mengetahui efek sitotoksitas selain viabilitas sel adalah dengan menggunakan evaluasi aktivitas sel, morfologi sel, adhesi sel, proliferasi sel, kerusakan membran sel maupun efek metabolik sel.

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto *et al.* 2003). Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar nilai IC_{50} senyawa tersebut semakin tidak toksik (Levrero *et al.* 2000). Menurut Ueda *et al.* (2002) ekstrak yang memiliki nilai IC_{50} di bawah 100 $\mu\text{g/ml}$ memiliki efek sitotoksik yang poten. Akhir dari uji sitotoksitas dapat memberikan informasi berapa persen sel yang mampu bertahan hidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle & Griffiths 2000).

L. Metode Pengujian Sitotoksik (MTT Assay)

MTT *assay* adalah teknik yang sering dipakai pada umumnya, teknik ini menggunakan tetrazolium atau MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolium bromida) yang berwarna kuning dimana akan dimetabolisme oleh enzim *suksinat dihidrogenase* yang terdapat pada mitokondria sel menjadi kristal *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 5 mg/ml dan disaring untuk menghilangkan residu yang tidak larut. MTT ditambahkan secara langsung pada plate yang berisi

medium kultur sebanyak 10-100 μ l dan diinkubasi selama kurang lebih 4 jam pada 37° C. Kristal formazan yang berwarna ungu yang terbentuk akan terlarut dengan penambahan 100 μ l isopropanolol asam (HCl 0,04 N dalam isopropanolol) atau SDS 10% dalam HCl 0,01 N.

Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup. MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam PBS (*Phosphate Buffer Saline*) berwarna biru (Doyle & Griffiths 2000). Konsentrasi formazan yang berwarna biru atau ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosmann 2000).

M. Uji Indeks Selektivitas

Uji pada penelitian ini digunakan sebagai indikasi selektivitas sitotoksik (tingkat keamanan) dari ekstrak terhadap sel normal, yakni toksik terhadap sel kanker namun tidak toksik terhadap sel normal (Furqan 2014).

Tingkat selektivitas senyawa dapat dinyatakan dengan nilai Indeks Selektivitas (SI) (Badisa *et al.* 2009). Apabila nilai SI tinggi ($> 2,00$), menunjukkan senyawa memberikan toksisitas selektif terhadap sel-sel kanker. Sedangkan senyawa dengan nilai SI $< 2,00$ dianggap dapat memberi toksisitas

umum dan juga menyebabkan sitotoksitas pada sel normal (Awang *et al.* & Masriani 2014).

N. Landasan Teori

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan sebelahnya (*invasi*) atau dengan migrasi sel lainnya (*metastasis*) (Amalina 2008). Perkembangan sel kanker dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya sehingga dapat menyebabkan kematian. Para peneliti kanker menyimpulkan bahwa 70-90% kanker pada manusia dapat pula disebabkan oleh faktor-faktor lingkungan, makanan, konsumsi alkohol, rokok, polusi udara, air, bahkan kimia di tempat kerja (misal: pabrik), radiasi, dan sinar ultraviolet (Djajanegara dan Wahyudi 2009).

Kanker payudara adalah malignan yang berasal dari jaringan payudara (Dipiro *et al.* 2009). Kanker payudara merupakan penyakit kanker jenis sarkoma yang sering ditemui pada wanita. Penyebab kanker payudara sangat beragam, antara lain kerusakan pada DNA yang menyebabkan mutasi genetik. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh radiasi yang berlebihan, kegagalan *immune surveillance* dalam pencegahan proses malignan pada fase awal, faktor pertumbuhan yang abnormal, dan malfungsi DNA *repairs* seperti BRCA1, BRCA2, dan p53 (Torosian 2002).

Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan cara operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi dan kemoterapi, yang sekarang berkembang

menjadi imunoterapi. Pengobatan ini ditujukan untuk membunuh sel-sel kanker sehingga tidak dapat berkembang dan membahayakan bagi tubuh (Diyah 2000). Pengobatan secara modern ini membutuhkan biaya yang tinggi, namun pengobatannya tidak spesifik dan menimbulkan efek samping yang cukup besar.

Umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) mengandung senyawa damar, resin, pati, zat pahit (Dalimarta 2009). Pada tanaman bidara upas mengandung 4 senyawa penting yaitu: alkaloid, tanin, flavonoid dan polifenol (Farizal 2012). Menurut penelitian Ren dan Qiao *et al.* (2003), senyawa flavonoid dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker. Senyawa alkaloid bersifat antineoplastik sehingga ampuh menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Agoes 2010). Senyawa tanin mempunyai aktifitas sebagai antiproliferatif pada sel kanker yang bekerja pada tingkat sel yang dengan menghambat fase “S” dari siklus sel (Khanbabaee & Ree 2011). Adapaun penelitian Pristianti (2011), telah menemukan senyawa terpenoid pada ekstrak *n*-heksana umbi bidara upas dengan menggunakan kromatografi kolom. Senyawa golongan terpenoid menunjukkan aktivitas farmakologi yang menarik sebagai antiviral, antibakteri, antiinflamasi, antikanker, dan sebagai inhibisi terhadap sintesis kolesterol (Mahato *et al.* 1997). Hasil isolasi pada umbi segar bidara upas ditemukan 13 senyawa baru glikosida resin yaitu *merremoside* (a, b, c, d, e, f, g, h₁ dan h₂) dan *mammoside* (A, B, H₁ dan H₂) (Kitagawa 1996). Senyawa glikosida resin pada *Ipomoea tricolor* Cav. dapat menghambat aktivitas sitotoksik sel kanker ovarium A2780 dengan nilai 0,30 µg/ml (Pereda-Miranda 2009).

Sitotoksisitas merupakan sejauh mana agen memiliki tindakan destruktif spesifik pada sel-sel tertentu. Kerusakan sel yang disebabkan oleh xenobiotik pada umumnya mengakibatkan perubahan pada permeabilitas maupun integritas membran sel, akibatnya enzim sitolitik akan keluar ke dalam media. Adanya kebocoran enzim ini merupakan parameter utama dalam penentuan sitotoksisitas suatu xenobiotik secara *in vitro*. Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar nilai IC_{50} senyawa tersebut semakin tidak toksik (Levrero *et al.* 2000). Menurut Ueda *et al.* (2002) ekstrak yang memiliki nilai IC_{50} di bawah 100 $\mu\text{g/ml}$ memiliki efek sitotoksik yang poten. Tingkat selektivitas senyawa dapat dinyatakan dengan nilai Indeks Selektivitas (SI) (Badisa *et al.* 2009). Apabila nilai SI tinggi ($> 2,00$), menunjukkan senyawa memberikan toksisitas selektif terhadap sel-sel kanker. Sedangkan senyawa dengan nilai $SI < 2,00$ dianggap dapat memberi toksisitas umum dan juga menyebabkan sitotoksisitas pada sel normal (Awang *et al.* 2014 & Masriani 2014).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana dari umbi bidara upas terhadap sel kanker payudara T47D dan untuk mengetahui indeks selektivitas aktivitas sitotoksik ekstrak etanol umbi bidara upas terhadap sel kanker payudara T47D dibandingkan dengan sel vero. Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi umbi bidara upas adalah etanol 96%, kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana yang diharapkan dapat dengan maksimal menyari senyawa nonpolar yang aktif dalam umbi bidara upas. Uji

MTT dalam penelitian ini dipilih sebagai metode uji sitotoksik dengan parameter yang diukur adalah (%) kehidupan sel dan pembentukan kristal formazan.

O. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori yang ada, dapat disusun hipotesis dalam penelitian ini yaitu:

1. Ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$.
2. Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$.
3. Nilai indeks selektivitas ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) dari sel kanker payudara T47D terhadap sel vero lebih besar dari 2,00.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti (Notoatmojo 2002). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bidara upas yang diperoleh dari daerah Kebumen, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili keluruh populasi dalam penelitian (Notoatmojo 2002). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi bidara upas yang berumur 9-12 bulan dan diperoleh dalam kondisi segar, bersih, dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas

Variabel utama kedua adalah aktivitas sitotosik ekstrak etanol umbi bidara upas terhadap sel kanker payudara T47D

Variabel utama kedua adalah aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksan umbi bidara upas terhadap sel kanker payudara T47D.

Variabel utama ketiga adalah indeks selektivitas ekstrak etanol umbi bidara upas terhadap sel vero.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu: variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol dan konsentrasi fraksi *n*-heksana umbi bidara upas yang diujikan pada sel kanker payudara T47D serta selektivitas ekstrak etanol terhadap sel vero.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian, variabel tergantung dari penelitian ini yaitu aktivitas sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas terhadap sel T47D dengan menghitung jumlah sel yang mati pada masing-masing seri konsentrasi serta indeks selektivitas ekstrak etanol umbi bidara upas terhadap sel vero.

Variabel terkendali yaitu variabel yang mempengaruhi, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi inkubator, lama perlakuan, kondisi laboratorium, alat, konsentrasi sampel uji, keadaan sel T47D, keadaan sel vero, dan peneliti sendiri.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, umbi bidara upas dari tanaman bidara upas yang berumur 9-12 bulan yang diperoleh dari Kebumen Jawa Tengah.

Kedua, Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas adalah hasil fraksinasi ekstrak etanol 96% yang kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, hingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air, hasil fraksi dari *n*-heksana yang terpisah dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50⁰C sampai diperoleh fraksi *n*-heksana kental.

Ketiga, aktivitas sitotoksik adalah kemampuan senyawa dalam membunuh sel kanker setengah dari jumlah populasi yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀ <100 µg/ml.

Keempat, indeks selektivitas adalah indikasi selektivitas sitotoksik yakni toksik terhadap sel kanker namun tidak toksik terhadap sel normal yang dinyatakan dengan nilai >2,00.

Kelima, sel kanker payudara T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara, kemudian kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh RPMI 1640 yang mengandung FBS 10% dan penisillin-streptomisin 2%, *fungizone* 0,5% dan diperoleh dari laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Keenam, sel vero merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel monyet hijau dari Afrika, kemudian kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh M-199 yang mengandung FBS 10% dan penisillin-streptomisin 2%, *fungizone* 0,5% dan diperoleh dari laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan meliputi: corong pisah, vial, sudip, batang pengaduk, corong gelas, erlenmeyer, almari es, beker glass, oven, evaporator, chamber KLT, mikropipet, penggaris, gunting, kamera, lampu sinar UV 254 nm dan 366 nm, pipet tetes, pipet ukur, ayakan no 40, timbangan analitik (Metler AT-200).

Alat uji sitotoksik meliputi tangki nitrogen cair, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), autoklaf, inkubator 37⁰C aliran CO₂ 5% model 6200 (Napco), *laminar air flow class II* (Labconco), spektrokolorimeter pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), *ependrof*, tabung konikal steril (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), mikropate 96 sumuran (Nunclone), lampu ultraviolet, neraca elektrik (Sartorius), mikropipet 20-200 µl dan 200-1000 µl (Pipetman), mesin vortex, mikroskop inverted (Axiovert-25), *magnetic stirrer* dan kamera digital.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah serbuk kering umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.), etanol 96% (Bratacem), akuadest, *plate* aluminium TLC silika gel 60 GF₂₅₄ (E. Merck), kloroform, etil asetat, toluene, xylene, diethylamin, quinine, *n*-heksana, timol, anisaldehyd asam sulfat, FeCl₃, Liberman-Bourchat, Dragendroff (E. Merck), Mayer (E. Merck), sitroborat (E. Merck).

Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker payudara T47D, sel vero, media stok: RPMI 1640 (Gibco), M-199, media kultur sel: media komplet RPMI

1640 (Gibco), media komplet M-199, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin 2% v/v (Gibco), Fungizon (Amphoterasin B) 0,5% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, MTT 10 mg/ml dalam PBS; media pencuci sel: larutan PBS pH 7,2; *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penghenti (*stopper*).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman bidara upas

Tahap awal penelitian ini mencakup pengadaan dan penyimpanan bahan uji, kemudian melakukan determinasi untuk memastikan kebenaran sampel tanaman umbi bidara upas berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada dalam pustaka dan dibuktikan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Tanaman bidara upas diperoleh dari Kebumen Jawa Tengah. Umur tanaman bidara upas yang akan digunakan adalah 9 bulan-1 tahun. Umbi bidara upas dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir.

Umbi bidara upas yang sudah dibersihkan, kemudian dirajang dan dikeringkan menggunakan oven suhu 40°C. Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan nomor *mesh* 40. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah kering tertutup rapat dan dilakukan pemeriksaan secara organoleptis.

3. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan cara serbuk dari umbi bidara upas ditimbang 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan alat *moisture balance* O'haus MB23 pada suhu 105⁰C, setelah itu dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Sebanyak 5 gram serbuk kering ditimbang seksama dalam cawan dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105⁰C selama 30 menit. Simplisia diratakan dalam cawan hingga merupakan lapisan setebal 5-10 mm, dimasukkan kedalam oven, dibuka tutupnya, dikeringkan hingga bobot tetap, susut pengeringan dihitung terhadap bahan awal. Tahap ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

4. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas

Sebanyak 10 bagian serbuk umbi bidara upas dimasukkan dalam wadah gelap ditambah dengan 75 bagian etanol 96%. Wadah ditutup kemudian disimpan selama 5 hari dan sering dilakukan pengadukan. Setelah 5 hari, maserat dipisahkan sari dan ampasnya. Ampas ditambahkan etanol 96% secukupnya diaduk dan disaring, hingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Wadah ditutup, disimpan ditempat yang terlindung dari cahaya selama 2 hari, kemudian endapan dipisahkan. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* suhu 50⁰C sampai terbentuk ekstrak kental.

Ekstrak kental kemudian dipartisi dengan pelarut *n*-heksana. Sebanyak 10 gram ekstrak kental ditambahkan 100 ml aquadest (1:10) dalam corong pisah, kemudian dipartisi sebanyak 3 kali dengan 100 ml pelarut *n*-heksana. Proses

tersebut dilakukan terhadap 40 gram ekstrak kental umbi bidara upas hingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi dari *n*-heksana dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 30°C sampai dihasilkan fraksi kental.

5. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol umbi bidara upas

Kandungan senyawa yang terdapat di dalam serbuk dan ekstrak etanol umbi bidara upas diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing.

5.1. Identifikasi flavonoid. Serbuk dan Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan pelarut, ditambahkan serbuk Mg secukupnya, 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol. Dikocok kuat dan dibiarkan terpisah. Terbentuk warna merah, jingga pada lapisan atas menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Depkes RI 1979).

5.2. Identifikasi alkaloid. Pada tes Mayer, ekstark dilarutkan dalam HCl encer, filtrat ditambahkan reagen Mayer, terjadinya endapan warna kuning mengindikasikan adanya senyawa alkaloid. Pada tes Dragendorf, filtrat ditambahkan reagen Dragendorff terjadinya endapan warna merah mengindikasikan adanya senyawa alkaloid (Tiwari *et al.* 2011)

5.3. Identifikasi tanin. Sejumlah serbuk dan ekstrak ditambahkan larutan gelatin 1% yang mengandung NaCl. Dan adanya endapan menunjukkan kandungan tannin (Evans 2009).

5.4. Identifikasi fenolik. Sampel serbuk dan ekstrak dilarutkan dengan akuades, ditambahkan dengan larutan FeCl₃ 1% uji positif ditunjukkan oleh

terbentuknya warna hijau, biru, merah ungu atau hitam yang kuat (Harborne 1987).

5.5. Identifikasi terpenoid. Serbuk dan Ekstrak diuapkan sampai kering ditambahkan CH_3COOH anhidrat, di tambahkan CHCl_3 ditambah $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{p})$ melalui dinding tabung, terpenoid positif jika terdapat cincin warna ungu-merah (Tiwari *et al.* 2011).

6. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana secara KLT

6.1. Identifikasi flavonoid. Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄ diuji kromatografi lapis tipis dengan fase gerak kloroform : etil asetat : asam formiat (0,5:9:0,5), reagen untuk deteksi bercak menggunakan sitroborat, kemudian dibaca UV 254 nm dan 366 nm. Hasil warna kuning pudar menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Depkes RI 1987).

6.2. Identifikasi alkaloid. Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan cara menotolkan fraksi *n*-heksana cair pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya adalah kloroform : etil asetat : asam formiat (0,5:9:0,5). Disemprotkan dengan pereaksi Dragendrof dan Meyer kemudian di deteksi UV 254 nm terdapat warna coklat, sedangkan pada sinar UV 366 nm berwarna coklat jingga. Dengan pereaksi semprot Dragendrof berwarna coklat (Lutfillah 2008).

6.3. Identifikasi fenolik. Fraksi *n*-heksana ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄. Elusi dilakukan dengan fase gerak kloroform : etil asetat : asam formiat (0,5:9:0,5), kemudian disemprotkan dengan pereaksi FeCl_3 10%. Jika timbul

warna hitam setelah penyemprotan pereaksi FeCl_3 10% menunjukkan adanya senyawa fenolik dalam fraksi (Marliana 2007).

6.4. Identifikasi terpenoid. Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan cara menotolkan fraksi *n*-heksana cair pada fase diam silka gel GF₂₅₄ dan fase geraknya kloroform : etil asetat : asam formiat (0,5:9:0,5). Disemprotkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard kemudian diperiksa pada UV 254 nm dan 366 nm akan muncul warna biru atau ungu, keabu-abuan merah ungu (Mursyidi 1990).

7. Pembuatan reagen

7.1. Pembuatan media RPMI (*Roswell Park Memori Institute*). Sebanyak 10,4 gram/L serbuk media RPMI dilarutkan dengan *aquadestilata* kurang lebih 950 ml dalam *beaker glass* 1 L, tambahkan 2,2 gram natrium bikarbonat dan 2 gram. Larutan tersebut diaduk dengan *stirrer* sampai larut. Diberikan larutan dapar (1 N NaOH atau 1 N HCl) untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Ditambahkan lagi *aquadestilata* hingga volume larutan menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter 0,22 μm ke dalam botol steril (dilakukan di dalam LAF), disimpan dalam lemari es suhu 4°C dan diberi label.

Pembuat media RPMI penumbuh (media kultur RPMI) dibuat dari 500ml media RPMI ditambahkan 10% FBS yaitu 50ml, Penstrep 2% (Penisilin-Streptomisin) sebanyak 10 ml dan *fungizone* 0,5% yaitu 2,5 ml.

7.2. Pembuatan media M-199. Pembuatan media M-199 untuk menumbuhkan sel vero, dilakukan dengan cara serbuk media M-199 untuk 1 L

dilarutkan dengan akuades kurang lebih 800 ml dalam gelas piala 1 L, selanjutnya ditambah 2,2 g sodium bikarbonat dan 2 g (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesul fonic acid). Semua bahan tersebut diaduk dengan stirer sampai semua bahan larut. Larutan diatur pHnya sampai 7,2 dengan menambahkan 1 M NaOH atau 1 M HCl. Larutan dibuat menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter 0,2 μm ke dalam botol tertutup yang steril. Medium disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C dan diberi label. Untuk membuat media tumbuhnya dengan cara media M199 ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 %, Penicillin Streptomycin (Penstrep) 2% dan fungizon 0,5 % hingga volume 100 ml.

7.3. Pembuatan larutan PBS (*Phosfat Buffer Saline*). Dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) ditimbang 2,16 g, kemudian ditambahkan 0,20 g Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), 8 g natrium klorida (KCl) larutkan dalam *aquadest* steril hingga 1 liter, kemudian disterilkan dengan autoklaf (Freshney 2000).

7.4. Pembuatan larutan tripsin. 25 gram tripsin ditimbang dan ditambahkan NaCl 0,14 M hingga 1 liter kemudian diaduk hingga larut menggunakan magnetik stirrer selama 1 jam pada suhu ruangan. Kemudian disterilisasi dengan filtrasi. Dibagi ke dalam 10-20 ml bagian dan disimpan pada suhu -20° C. Sebelum digunakan dilarutkan terlebih dahulu dengan PBS (perbandingan 1:10). Larutan tripsin yang disimpan pada suhu 4° C akan stabil maksimal 3 minggu (Freshney 2010).

7.5. Pembuatan larutan tripan blue 0,4 %. Tripan *Blue* ditimbang 0,2 g kemudian ditambahkan 50 ml *aquadest* aduk sampai larut (Freshney 2000).

7.6. Pembuatan larutan SDS 10% (*Sodium dodesil sulfat*). SDS ditimbang 1 g tambahkan HCl 0,01 N kemudian dilarutkan dalam 100 ml *aquadestilata* aduk sampai larut (Freshney 2000).

7.7. Pembuatan larutan MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5_difenil tetrazolium bromida). Dilarutkan MTT sebanyak 50 mg/ml dalam PBS. Kemudian disterilisasi dengan filtrasi dengan diameter pori sebesar 0,2 µm (Freshney 2010).

8. Pembuatan sampel uji

Ditimbang sebanyak masing-masing 10 mg ekstrak uji (ekstrak umbi bidara upas dan fraksi *n*-heksana), selanjutnya dilarutkan dengan 100 µl DMSO, lalu disentrifus sampai homogen dan disimpan dalam ependrof. Larutan ini dijadikan larutan induk dengan konsentrasi 100.000 µg/ml (larutan induk 1). Selanjutnya dari larutan induk 1 dibuat konsentrasi 500 µg/ml (larutan induk 2), lalu dibuat sampel uji dengan seri 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,625 µg/ml, 7,8125 µg/ml, 3,906 µg/ml dengan mengencerkan beberapa µl dari larutan induk 2. Pembuatan larutan stok maupun seri kadar sampel untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF.

9. Persiapan kultur sel T47D

9.1. Pengaktifan sel. Tabung yang berisi *cell line* T47D dikeluarkan dari tabung nitrogen cair, kemudian dicairkan dalam *waterbath* pada suhu 37° C sampai gumpalan di dalam vial mencair. Bagian luar dari ampul dibersihkan

dengan alkohol swab 70%. Di dalam LAF, cairan sel dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, ditambahkan 5 ml media RPMI disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 5 menit. Setelah itu supernatan dibuang dan *pellet* yang diperoleh disuspensikan dengan media kultur RPMI sebanyak 6 ml. Suspensi sel dipipet dan dimasukkan kedalam *culture flask*, lalu diinkubasi pada suhu 37° C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam.

9.2. Pemanenan dan perhitungan sel. Media dalam *culture flask* dibuang lalu dicuci dengan PBS (*phosphat buffer saline*) sebanyak 7 ml (\pm 0,5 volume media awal), pencucian minimal 2 kali. Kemudian ditambah 3,5 ml tripsin secara merata. Selanjutnya diinkubasi selama 3-5 menit, lalu diamati pelepasan sel dari dasar *flask* dengan mikroskop. *Culture flask* dipindahkan ke dalam LAF ditambahkan media kultur RPMI kedalam *culture flask* sebanyak 2-3 ml untuk menghentikan kerja tripsin. Diambil 10 μ l dan dipipetkan ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted* dengan *counter*.

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung (A, B, C, dan D), setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Dihitung sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri dan bawah. Sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan dan atas tidak dihitung. Jumlah sel yang diperoleh dari keempat bidang diambil nilai rata-ratanya, kemudian dikalikan dengan pengenceran sebesar 10 kali dan faktor koreksi dari *hemacytometer* 10⁴. Dihitung jumlah sel per ml dengan rumus (Nugroho *et al.* 2012):

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

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

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung tiap ml}}$$

Diambil volume panen sel, ditransfer ke konikel baru dan ditambahkan medium sampai total volume yang diperlukan.

Setelah itu jumlah suspensi sel yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan dihitung untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar 40×10^4 sel/100 μl . Sel didistribusikan ke dalam *microplate* 96 sumuran, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% (37⁰C) selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas.

10. Uji sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas (*treatment cell*)

Uji sitotoksik menggunakan plat kultur jaringan 96 sumuran sebagai media uji. Sebanyak 100 μl suspensi sel dalam media kultur RPMI (sel T47D) dan M-199 (sel vero) dimasukkan kedalam setiap sumuran, satu kolom terakhir dibiarkan kosong untuk diisi kontrol media. Kemudian sel tersebut diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Setelah 24 jam, media dibuang dengan cara *microplate* yang berisi sel dikeluarkan dari inkubator CO₂ kemudian *microplate* dibalik 180^o untuk membuang sisa media. *Microplate* ditekan diatas tisu untuk meniriskan sisa cairan media. Sebanyak 100 μl PBS dimasukkan kedalam semua sumuran berisi sel. PBS selanjutnya dibuang dengan cara membalikkan *microplate* kemudian ditekan diatas tisu untuk meniriskan sisa cairan PBS.

Sebanyak 100 µl media mengandung ekstrak etanol dengan seri konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 µg/ml dan fraksi *n*-heksana dengan seri konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 µg/ml dimasukkan ke dalam sumuran *microplate* sebanyak 3 kali ulangan. *Microplate* kemudian diinkubasi didalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Selanjutnya menyiapkan MTT (1 mg/ml) dengan cara mengambil 1 ml stok MTT dalam PBS (10 mg/ml) kemudian diencerkan dengan menambahkan media kultur RPMI sebanyak 10 ml untuk satu buah 96 *well plate*.

Microplate dikeluarkan dari inkubator CO₂ dan media kultur dibuang kembali dan kemudian ditambahkan 100 µl MTT kedalam setiap sumuran termasuk kontrol media. Sel kemudian diinkubasi di inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 4 jam. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100 µl SDS 10% dalam 0,01 N HCl. *Microplate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasikan semalaman pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

11. Uji indeks selektivitas

Sel vero dalam media M-199 sebanyak 100 µl didistribusikan ke dalam 96 *well plate*, pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi dan diinkubasi selama 24 jam. Media dibuang dan setelah itu ditambahkan 100 µl larutan sampel uji (ekstrak umbi bidara upas) dengan 8 seri konsentrasi. *Microplate* kemudian diinkubasi didalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pada akhir

inkubasi, senyawa uji dalam *plate* dibuang dan digantikan dengan 100 μ l media kultur (M-199) yang mengandung MTT 1 mg/ml, dan diinkubasi lagi selama 4 jam pada 37⁰C inkubator CO₂ 5 %. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambahkan reagen *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100 μ l, kemudian *plate* dibungkus dengan aluminium *foil* inkubasikan dalam tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Keesokan harinya dibaca serapannya dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

E. Analisis Hasil

1. Uji sitotoksik

Hasil uji sitotoksik yang dilakukan yaitu berupa serapan yang kemudian dikonversikan ke dalam persen kehidupan sel dengan persamaan sebagai berikut:

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

Analisis selanjutnya untuk menentukan hasil regresi linear antara log konsentrasi sampel uji (fraksi *n*-heksana umbi bidara upas) *versus* persen sel hidup dengan menggunakan *Microsoft Excel* 2010, didapatkan persamaan:

Keterangan:

$$y = bx + a$$

x = log konsentrasi sampel uji

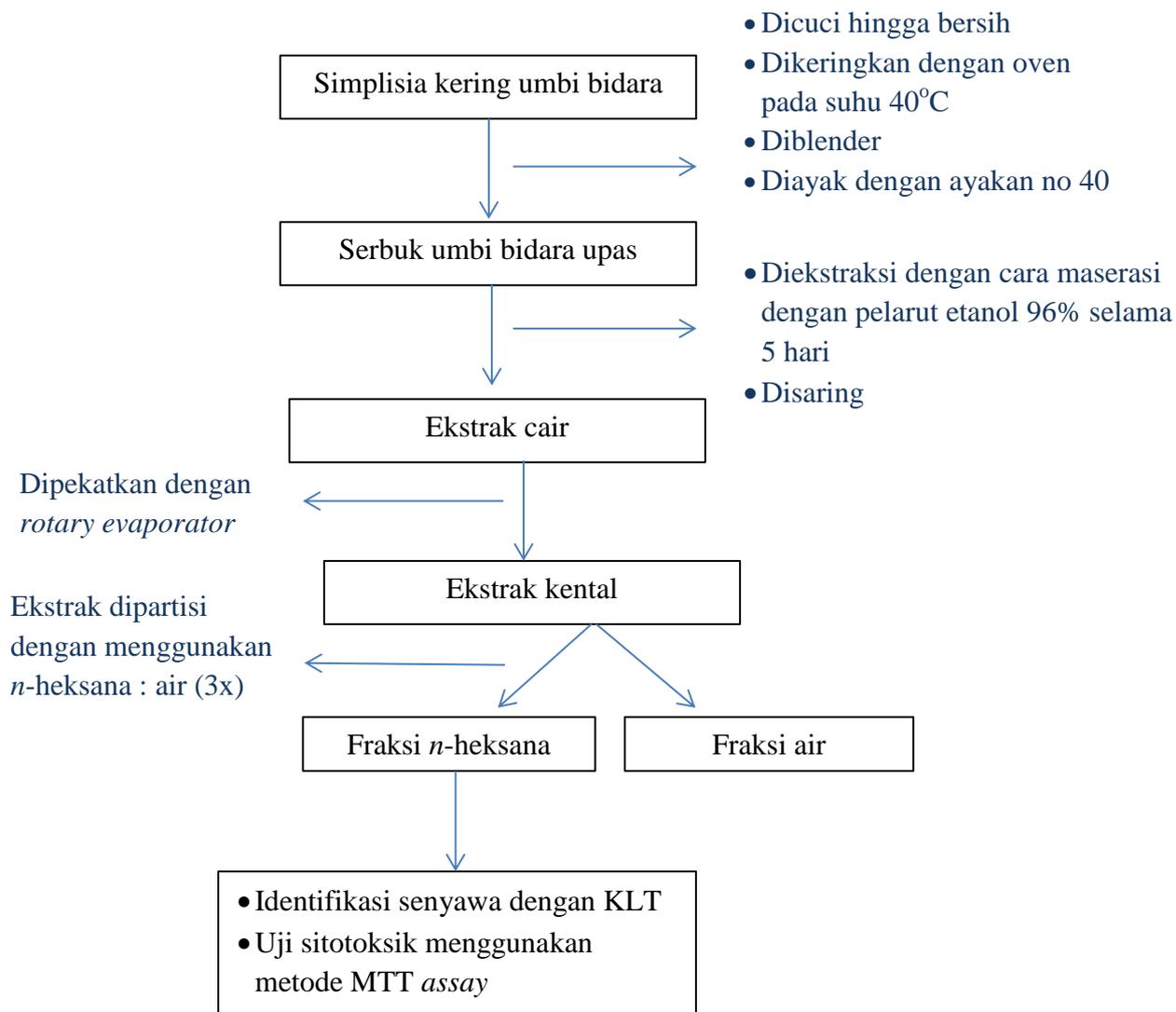
y = persen viabilitas sel

Hasil antilog x dari persamaan di atas, merupakan nilai IC₅₀.

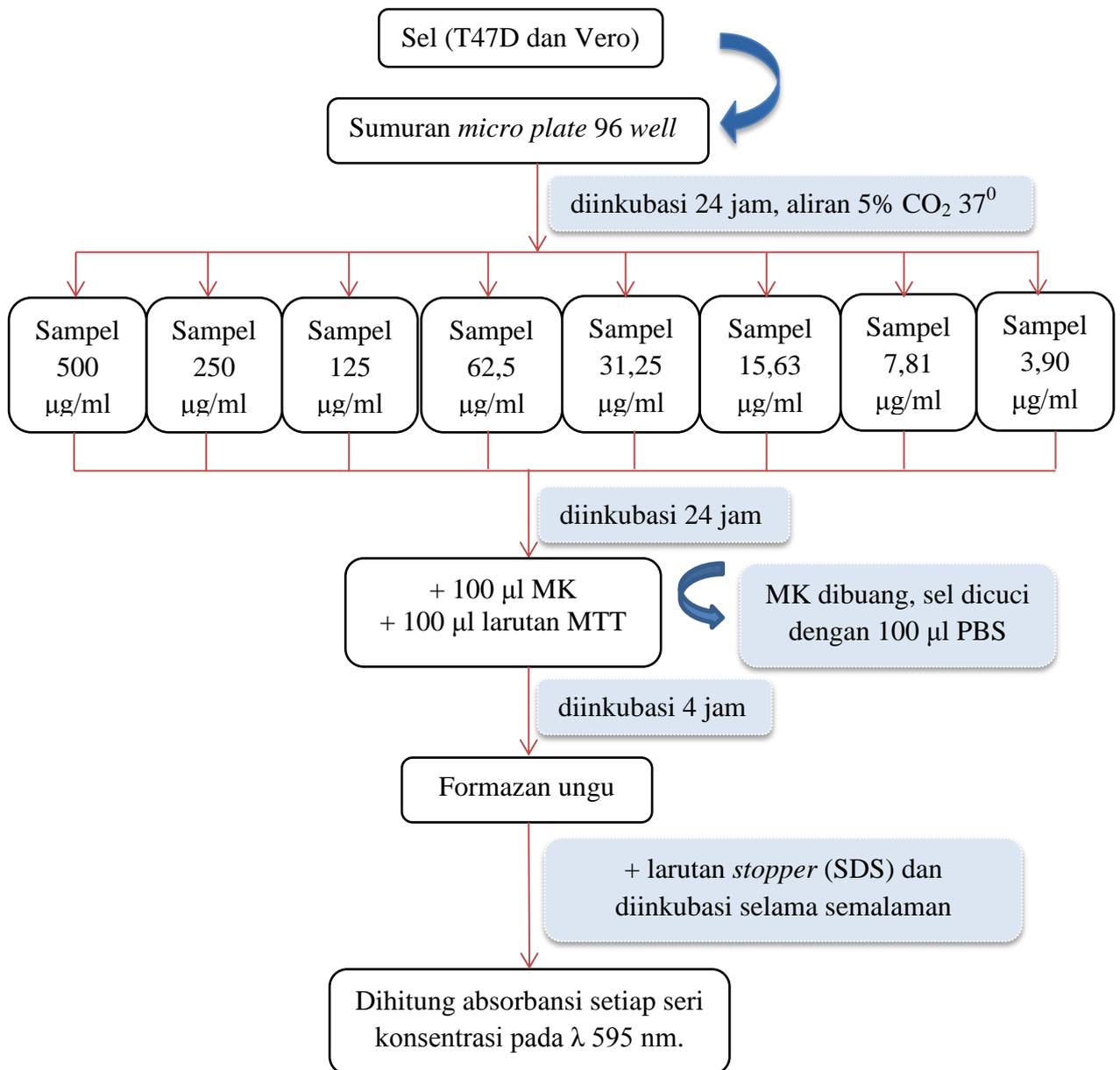
2. Uji selektivitas

Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan di bawah ini:

$$\text{Indeks Selektivitas (SI)} = \frac{\text{IC50 sel vero}}{\text{IC50 sel kanker}}$$



Gambar 1. Pembuatan fraksi n-heksana umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.)



Gambar 2. Uji sitotoksik ekstrak dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.)

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman bidara upas

Identifikasi tanaman bidara upas merupakan langkah awal yang dilakukan pada suatu penelitian. Identifikasi dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Identifikasi tanaman dilakukan untuk menghindari kesalahan terhadap tanaman yang digunakan dan untuk mengetahui kebenaran bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian adalah benar, serta menghindari tercampurnya bahan tanaman dengan tanaman lain. Hasil identifikasi tanaman bidara upas dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Umbi bidara upas yang diambil diusahakan memiliki umur yang sama sehingga kadar senyawa aktifnya tidak berbeda secara signifikan. Umbi bidara upas yang diperoleh seberat 5.100 gram. Selanjutnya, umbi bidara upas dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C hingga kering, sehingga kadar air dalam umbi bidara upas dapat berkurang untuk mencegah terjadinya perubahan kimiawi dan menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri. Umbi kering yang diperoleh sebanyak 1.200 gram. Data rendemen berat umbi bidara upas kering terhadap umbi bidara upas basah dapat dilihat pada Tabel 2 dan perhitungan lengkap rendemen daun kering dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 2. Hasil rendemen bobot basah terhadap bobot kering umbi bidara upas

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
5.100	1.200	23,53

3. Hasil penetapan susut pengeringan

Tujuan dari penetapan susut pengeringan adalah untuk mengetahui hasil dari serbuk umbi bidara upas yang diperoleh memenuhi persyaratan sesuai dengan standart yang telah ditetapkan dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Persentase rata-rata penetapan susut pengeringan serbuk umbi bidara upas yaitu 3,667%. Data hasil penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada Tabel 3 dan perhitungan lengkap penetapan susut pengeringan serbuk umbi bidara upas dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk umbi bidara upas

Bobot awal serbuk (gram)	Bobot akhir (gram)	% Susut pengeringan
2,02	1,94	4 %
2,01	1,91	5 %
2,03	1,96	2 %
Rata-rata ± SD		3,667 % ± 0,015

4. Pembuatan ekstrak dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas

Serbuk umbi bidara upas yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol sebanyak 400 gram. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi karena mudah dilakukan, alat yang digunakan sederhana dan untuk menghindari kerusakan senyawa aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan dan biasanya digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung bahan aktif yang mudah larut dalam pelarut dan tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari (Voigt 1994). Pelarut yang digunakan adalah etanol 96 %, karena etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin,

antrakuinon, flavonoid, steroid, tanin dan saponin. Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel, memperbaiki stabilitas bahan obat pelarut (Voigt 1994). Wadah maserasi yang digunakan berkaca gelap untuk menghindarkan dari sinar matahari langsung. Penguapan pelarut dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50⁰C. Dilakukan pada suhu tersebut bertujuan untuk tetap menjaga stabilitas senyawa aktif dari proses pemanasan yang dilakukan dalam jangka waktu lama. Data rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4 dan hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol umbi bidara upas

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
400	57,456	14,364

Ekstrak etanol umbi bidara upas menghasilkan rendemen 14,364 %. Untuk perhitungan rendemen secara rinci ada pada Lampiran 3. Ekstrak yang didapat kemudian di fraksinasi cair-cair.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak umbi bidara upas

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	Coklat
Bau	Khas

Ekstrak etanol umbi bidara upas yang didapat dari hasil maserasi, kemudian ditimbang sebanyak 40 gram dan difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat nonpolar seperti minyak atsiri, minyak lemak dan asam lemak tinggi, steroid, triterpenoid, karotenoid (Harborne 1987). Data hasil rendemen fraksi

n-heksana umbi bidara upas dapat dilihat pada Tabel 6 dan hasil pemeriksaan organoleptis fraksi *n*-heksana dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 6. Hasil fraksi *n*-heksana umbi bidara upas

Bobot fraksi (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
2,012	57,456	3,502

Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas menghasilkan rendemen 3,502 % artinya secara kuantitatif pada ekstrak umbi bidara upas terdapat senyawa non polar yang kecil. Hasil perhitungan terlampir pada Lampiran 4.

Tabel 7. Hasil pemeriksaan organoleptis fraksi *n*-heksana umbi bidara upas

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	Coklat
Bau	Khas

5. Hasil identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol umbi bidara upas

Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak etanol umbi bidara upas bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa di dalam serbuk dan ekstrak. Identifikasi dilakukan dengan menambahkan ekstrak dengan pereaksi yang sesuai dan diamati perubahannya. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil identifikasi senyawa serbuk dan ekstrak umbi bidara upas

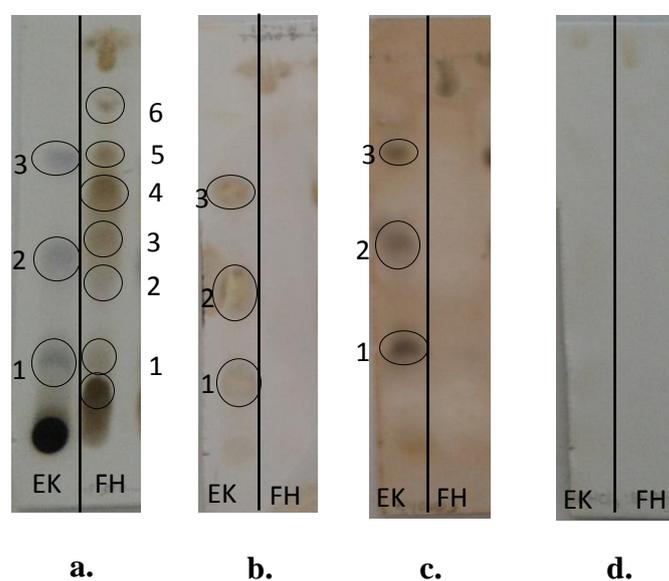
Senyawa	Pereaksi	Hasil identifikasi		Pustaka	Kesimpulan	
		Serbuk	Ekstrak		Serbuk	Ekstrak
Terpenoid	CH ₃ COOH + CHCl ₃ +H ₂ SO ₄ (p)	Cincin merah	Endapan hitam	Cincin warna ungu-merah	Positif	Positif
	Mayer	coklat tua	kuning	endapan warna kuning	Negatif	Negatif
Alkaloid	Dragendorff	endapan hitam	endapan warna merah	endapan warna merah	Negatif	Positif
Flavonoid	Serbuk Mg + HCL _(p) + amil alkohol	Kuning jernih	Kuning	Warna merah, jingga pada lapisan atas	Negatif	Negatif
Tannin	Gelatin 1%	Endapan kuning	Endapan kuning	Endapan	Positif	Positif
Fenolik	Larutan FeCl ₃ 1%	Warna hitam	Warna hitam	Warna hijau, biru, merah ungu atau hitam	Positif	Positif

6. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana secara KLT

Identifikasi kandungan kimia secara KLT bertujuan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas. Senyawa yang diidentifikasi adalah flavonoid, alkaloid, fenolik, dan terpenoid. Hasil penotolan pada lempeng KLT yang telah dielusikan kemudian dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm dan disemprot dengan pereaksi penampak bercak.

Identifikasi ekstrak dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas dilarutkan dengan pelarut yang sesuai kemudian ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄. Volume penotolan disamakan untuk memperoleh bercak dengan konsentrasi yang sama pada plat. Plat dielusikan menggunakan fase gerak kloroform : etil asetat : asam formiat (0,5 : 9 : 0,5) kemudian dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan UV

366 nm. Plat KLT disemprot dengan pereaksi penampak bercak yang sesuai untuk masing-masing senyawa. Deteksi adanya senyawa flavonoid dilakukan dengan penyemprot sitroborat dan memberikan hasil positif apabila terdapat bercak warna kuning pudar (Depkes 1987). Deteksi alkaloid dengan penyemprot Dragendorff memberikan hasil positif apabila muncul bercak merah bata (Meiyanto *et al.* 2008). Deteksi pada fenolik dilakukan dengan penyemprot FeCl_3 dan memberikan hasil positif bila terbentuk warna hitam (Marliana 2007). Deteksi senyawa terpenoid dilakukan dengan menggunakan penyemprot Liebermann-Burchard dan memberikan hasil positif bila membentuk bercak warna ungu kemerahan (Meiyanto *et al.* 2008). Hasil identifikasi ekstrak dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas dapat dilihat pada Gambar 4.



Keterangan : EK : Ekstrak umbi bidara upas
FH : Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas

Gambar 4. Profil KLT ekstrak etanol dan fraksi *n*- heksana umbi bidara upas. Ekstrak dan fraksi *n*-heksana dengan: (a.) senyawa terpenoid dengan penyemprot Liebermann-Burchard (b.) senyawa alkaloid dengan penyemprot Dragendorff (c.) senyawa fenolik dengan penyemprot FeCl_3 (d.) senyawa flavonoid dengan penyemprot sitroborat

Tabel 9. Hasil identifikasi ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana secara KLT

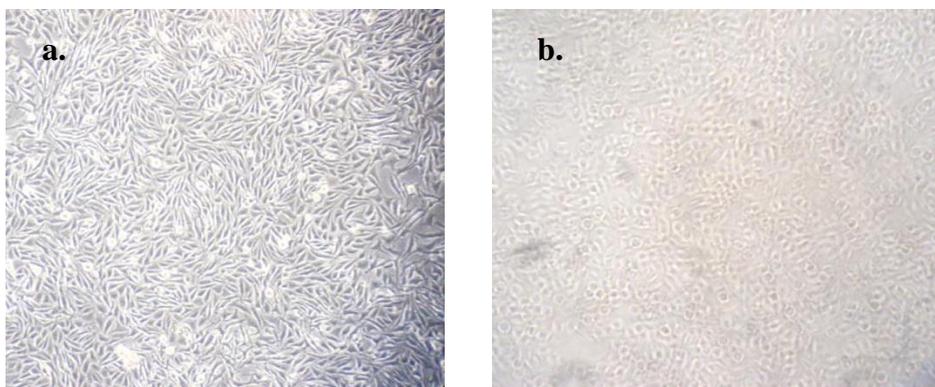
Kandungan senyawa	Rf		Setelah disemprot	
	Ekstrak	Fraksi <i>n</i> -heksana	Ekstrak	Fraksi <i>n</i> -heksana
Terpenoid	0,17	0,13	Ungu	Ungu kecoklatan
	0,42	0,23		
	0,67	0,33		
		0,46		
		0,58		
		0,6		
	0,83			
Alkaloid	0,17	-	Coklat jingga berlatar belakang kuning	-
	0,45			
	0,67			
Flavonoid	-	-	-	-
Fenolik	0,13	-	Hitam	-
	0,47			
	0,73			

Hasil identifikasi ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas secara KLT dapat dilihat pada Tabel 9. Identifikasi KLT pada ekstrak setelah disemprot dengan pereaksi penampak bercak menunjukkan bercak pada pereaksi Liebermann-Burchard, Dragendorff, dan FeCl₃, sehingga ekstrak umbi bidara upas dapat dinyatakan bahwa terdapat senyawa terpenoid, alkaloid, fenolik, dan memberikan hasil negatif pada flavonoid. Pada fraksi *n*-heksana umbi bidara upas bercak hanya nampak pada pereaksi Liebermann-Burchard dimana pereaksi semprot untuk terpenoid. Fraksi *n*-heksana tidak menampakkan bercak pada senyawa alkaloid, fenolik, dan flavonoid, hal ini dikarenakan senyawa terpenoid merupakan senyawa dalam tumbuhan yang bersifat non polar dan cenderung larut dalam pelarut non polar yaitu *n*-heksana, sehingga pada fraksi *n*-heksana umbi bidara upas didapatkan hasil negatif pada senyawa alkaloid, fenolik dan flavonoid yang cenderung bersifat semi polar.

7. Uji sitotoksik ekstrak dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas terhadap sel T47D

Uji sitotoksik bertujuan untuk mengetahui adanya sifat sitotoksik dari sampel terhadap sel kanker payudara T47D. Parameter ketoksikan yang digunakan dalam uji sitotoksik adalah nilai IC_{50} yang menunjukkan konsentrasi sampel yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50%. Nilai IC_{50} selanjutnya digunakan sebagai patokan untuk menentukan konsentrasi sampel yang akan digunakan untuk uji pengamatan.

Uji sitotoksik dimulai dengan menumbuhkan kultur sel T47D dalam medium RPMI 1640, medium RPMI 1640 mengandung streptomisin yang bertujuan menghindari adanya kontaminasi. Streptomisin adalah antibiotik yang tidak bersifat toksik, memiliki spektrum luas dan ekonomis (Zairisman 2006). Media kultur sel dibuang untuk memudahkan pemanenan dan perhitungan sel, kemudian ditambahkan dengan 100 μ l tripsin agar sel lepas dari *flask*. Morfologi sel T47D yang lepas dari dasar *flask* akan terlihat berbentuk bulat seperti kenampakan pada Gambar 5.



Gambar 5. Profil morfologi sel T47D pada perbesaran 40x sebelum pemberian (a) dan setelah pemberian tripsin (b)

Sel sebelum pemberian tripsin terlebih dahulu dilakukan pencucian dengan PBS yang berfungsi untuk menghilangkan serum dalam media RPMI yang tertinggal, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin (Freshney 2000). Pemberian tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara molekul glikoprotein dan proteoglikan dengan permukaan *flask*, akibatnya sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada permukaan *flask* dan terlihat mengapung (Doyle *et al.* 2000).

Sel yang telah dipanen kemudian dilakukan perhitungan sel dengan *hemocytometer* dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan. Pada penelitian ini jumlah sel kanker hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur adalah 101×10^4 sel/1000 μ l. Kemudian dilakukan pengenceran suspensi untuk mendapatkan konsentrasi sel T47D sebesar 100×10^4 sel/100 μ l/sumuran. Jumlah sel tersebut diharapkan sel T47D dapat bertahan hidup melewati siklus hidupnya dengan baik dalam waktu inkubasi 24 jam. Penentuan waktu inkubasi 24 jam adalah untuk mencegah berkurangnya ketersediaan nutrisi yang dikonsumsi oleh sel. Medium RPMI 1640 akan berfungsi maksimal dalam mengkultur sel T47D selama 24 jam. Larutan tersebut digunakan sebagai pelarut ekstrak dalam pembuatan stok sampel uji.

Sebanyak 10 mg ekstrak kental dilarutkan dengan 100 μ l DMSO dalam ependrof, selanjutnya ekstrak dibuat seri konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 μ g/ml dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas dibuat dengan seri konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 μ g/ml. Perlakuan uji digunakan

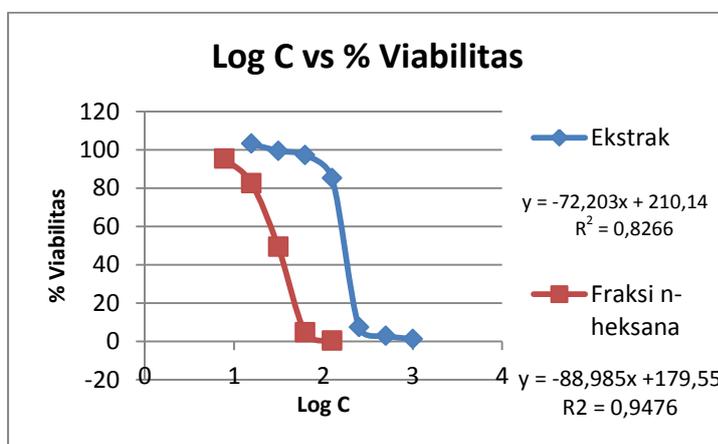
pula kontrol negatif berupa kontrol sel dan kontrol media RPMI untuk sel T47D dan media M199 untuk sel vero.

Dalam penelitian ini uji sitotoksik terhadap sel T47D dilakukan dengan metode MTT assay. Metode MTT assay merupakan metode kolorimetri untuk mengamati proliferasi dan pertumbuhan sel, yang dilakukan dengan prinsip perhitungan sel setelah pewarnaan. Metode MTT digunakan karena cepat, sensitif, akurat dan sampel yang ditetapkan dalam jumlah besar.

Sel hidup dapat mereduksi MTT, sedangkan sel mati tidak dapat mereduksi MTT. Pada ekstrak dengan konsentrasi 1000; 500; 250 $\mu\text{g/ml}$ dan pada fraksi *n*-heksana dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan warna kuning, hal ini mengindikasikan tidak adanya sel kanker yang hidup pada konsentrasi tersebut. Namun konsentrasi selanjutnya yang lebih rendah menunjukkan peningkatan intensitas warna ungu, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas tidak mempunyai potensi dalam penghambatan pertumbuhan sel T47D. Kristal formazan ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya dan disajikan dalam bentuk grafik % viabilitas sel dengan *Elisa Reader*. Serapan yang dihasilkan akan sebanding dengan jumlah sel hidup.

Perhitungan terhadap kematian sel dilakukan untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing perlakuan. IC_{50} merupakan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi sel. Analisa hasil dibuat dalam grafik persamaan regresi linier antara % kehidupan sel dengan log

konsentrasi. Persentase kehidupan sel untuk setiap perlakuan secara lengkap bisa dilihat pada Gambar 6, Lampiran 10 dan 11.



Gambar 6. Grafik hasil interpretasi log konsentrasi dengan % viabilitas sel

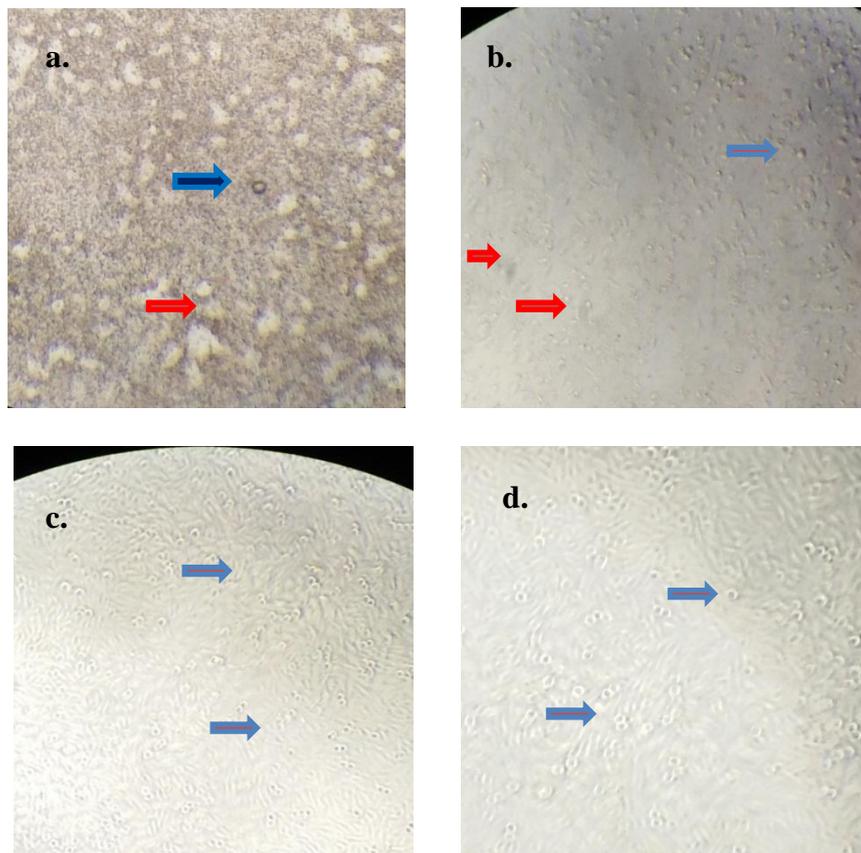
Penentuan nilai IC_{50} pada penelitian ekstrak dilakukan dengan regresi linear pada 7 titik konsentrasi yaitu 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 31,2 $\mu\text{g/ml}$ dan 15,6 $\mu\text{g/ml}$ sehingga didapatkan nilai $r = 0,8266$ dan pada fraksi *n*-heksana umbi bidara upas yaitu dengan regresi linear pada konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 31,2 $\mu\text{g/ml}$, 15,6 $\mu\text{g/ml}$ dan 7,8125 $\mu\text{g/ml}$, didapatkan nilai $r = 0,9476$. Nilai r merupakan koefisien korelasi yang menunjukkan linearitas atau tidaknya data absorbansi. Menurut Scheffler (1987) harga koefisien nilai r sebesar 0,61-0,80 tergolong interpretasi cukup sehingga data di atas ($r = 0,8266$ dan 0,9476) terinterpretasi cukup adanya hubungan variasi konsentrasi sampel uji dengan % viabilitas sel.

Senyawa dinyatakan memiliki aktivitas inhibisi apabila memiliki nilai $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/ml}$. Nilai $IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/ml}$ sangat aktif, 10-20 $\mu\text{g/ml}$ dinyatakan aktif, dan $> 20 \mu\text{g/ml}$ dinyatakan kurang aktif, namun nilai IC_{50} 50-100 $\mu\text{g/ml}$ tetap memiliki nilai penghambatan terhadap sel kanker (Freshney 2000). Berdasarkan

penelitian ini diketahui bahwa ekstrak umbi bidara upas memiliki nilai IC_{50} sebesar 165,163 $\mu\text{g/ml}$, sehingga menurut kriteria dari Freshney (2000) tersebut dapat dikatakan bahwa ekstrak umbi bidara upas tidak menunjukkan aktivitas penghambatan yang poten terhadap sel T47D. Nilai IC_{50} belum menjelaskan penyebab kematian sel, apakah sel mengalami kematian akibat apoptosis atau nekrosis. Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai 28,567 $\mu\text{g/ml}$. Nilai $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/ml}$ menunjukkan adanya potensi senyawa uji sebagai agen kemoprevensi (Meiyanto *et al* 2008). Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas memiliki aktivitas sitotoksik lebih baik daripada ekstrak umbi bidara upas karena pada fraksi *n*-heksana senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik sudah mengalami pemisahan dengan senyawa lain yang berada dalam ekstrak. Aktivitas fraksi *n*-heksana umbi bidara upas dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D merupakan hasil yang sangat menarik. Nilai IC_{50} fraksi *n*-heksana umbi bidara upas yang kurang dari 100 $\mu\text{g/ml}$ sehingga potensial untuk dikembangkan. Berdasarkan hasil tersebut maka fraksi *n*-heksana umbi bidara upas memiliki kemampuan dalam penghambatan pertumbuhan sel T47D dan berpotensi sebagai agen kemoprevensi, hal ini juga membuktikan bahwa fraksi *n*-heksana umbi bidara upas mampu memacu apoptosis sel T47D.

Nilai IC_{50} fraksi *n*-heksan umbi bidara upas yang kecil karena senyawa yang terkandung dalam fraksi tersebut poten dalam membunuh sel kanker T47D. Berdasarkan hasil identifikasi kandungan senyawa secara KLT pada fraksi *n*-heksana umbi bidara upas didapatkan hasil positif pada senyawa terpenoid,

sedangkan hasil negatif pada senyawa flavonoid, alkaloid dan fenolik. Menurut penelitian Hasanuddin *et al.* (2015), senyawa terpenoid dapat menginduksi apoptosis dan sebagai agen antiproliferasi pada sel kanker ovarium, melalui jalur intrinsik yang menghambat membran mitokondria dan menghasilkan pelepasan protein (seperti sitokrom-c) yang berada di dalam sitosol bersama Apaf-1 mengaktifkan caspase-9, caspase-3 dan kemudian menginduksi apoptosis. Hasil isolasi umbi bidara upas ditemukan 13 senyawa glikosida resin. Senyawa glikosida resin pada *Ipomoea tricolor* Cav. dapat menghambat aktivitas sitotoksik sel kanker ovarium A2780 dengan nilai 0,30 µg/ml (Pereda-Miranda 2009). Ekstrak heksana dari *Ipomoea pes-caprae* menghasilkan enam glikosida lipofilik, yaitu lima *pentasaccharides* baru, asam jalapinolic, pescaproside A, pescapreins I-IV, dan stoloniferin III, dimana memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah. (Escobedo & Pereda-Miranda 2007). Berdasarkan penelitian ini, fraksi *n*-heksana umbi bidara upas memiliki aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel kanker T47D. Perbedaan dari hasil penelitian ini diduga pada fraksi *n*-heksana umbi bidara upas terdapat senyawa aglikon lain dari glikosida resin yang bersifat non polar dan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker.



Keterangan  : Sel T47D hidup
  : Sel T47D mati

Gambar 7. Morfologi sel T47D pada perbesaran 40x setelah pemberian fraksi *n*-heksana. Keterangan: fraksi *n*-heksana umbi bidara upas dengan konsentrasi (A) 500 µg/ml, (B) 62,5 µg/ml, (C) 7,8 µg/ml, (D) kontrol sel.

Aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana umbi bidara upas terhadap sel T47D memberikan pengaruh pada morfologi sel setelah 24 jam perlakuan (Gambar 7). Gambar 7D menunjukkan populasi sel T47D pada kelompok kontrol yang berbentuk bulat, menempel satu dengan yang lain dan menempel di dasar *plate*, serta memiliki warna yang lebih cerah karena masih mengandung cairan sitoplasma yang dapat meneruskan cahaya dari mikroskop *inverted*. Pada kondisi ekstrak 500 µg/ml (Gambar 7A), morfologi sel T47D yang mati terlihat lebih gelap, kepadatan sel berkurang, dan sel terlihat mengambang, sedangkan pada

konsentrasi 7,8 µg/ml (Gambar 7C), kepadatan populasi sel mendekati kepadatan kontrol sel yang menandakan viabilitas sel masih tinggi.

8. Uji indeks selektivitas ekstrak umbi bidara upas

Indeks selektivitas mengindikasikan selektivitas sitotoksik (keamanan) dari ekstrak terhadap sel kanker versus sel normal, yang dihitung dengan membandingkan IC_{50} ekstrak terhadap sel normal (sel vero) dan IC_{50} ekstrak terhadap sel kanker T47D. Nilai IC_{50} ekstrak umbi bidara upas terhadap sel vero adalah 738,791 µg/ml, sedangkan nilai IC_{50} ekstrak terhadap sel T47D adalah 165,163 µg/ml. Sehingga diperoleh nilai indeks selektivitas ekstrak dari sel T47D terhadap sel vero adalah 4,473. Apabila nilai SI tinggi ($> 2,00$), menunjukkan senyawa memberikan toksisitas selektif terhadap sel-sel kanker. Sedangkan senyawa dengan nilai $SI < 2,00$ dianggap dapat memberi toksisitas umum dan juga menyebabkan sitotoksitas di sel normal (Awang *et al.* & Masriani 2014). Ekstrak umbi bidara upas memiliki Indeks selektivitas $4,473 > 2,00$ dapat dinyatakan bahwa ekstrak umbi bidara upas memberikan toksisitas selektif pada sel T47D dan tidak menyebabkan efek sitotoksik pada sel normal.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian uji sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) terhadap sel kanker payudara T47D, maka dapat disimpulkan :

1. Ekstrak etanol umbi bidara upas tidak memiliki aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel T47D dengan nilai IC₅₀ sebesar 165,163 µg/ml
2. Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas memiliki aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel T47D dengan nilai IC₅₀ sebesar 28,567 µg/ml
3. Nilai indeks selektivitas ekstrak etanol umbi bidara upas dari sel kanker T47D terhadap sel vero sebesar 4,473

B. SARAN

Saran dari penelitian uji sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) terhadap sel kanker payudara T47D yaitu :

1. Perlu dilakukan isolasi senyawa aktif dari umbi bidara upas yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D.
2. Perlu dilakukan uji efek sitotoksik terhadap sel kanker yang lain.
3. Perlu dilakukan penelitian uji sitotoksik terhadap sel kanker dan proliferasi limfosit dari ekstrak dan fraksi *n*-heksana umbi bidara upas secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam. 2007. T47D (Human ductal breast epithelial tumor cell line) Whole Cell Lysate (ab14899). *Abcam*. <http://www.abcam.com/t47d-human-ductal-breast-epithelial-tumor-cell-line-whole-cell-lysate-ab14899.html> [10 Maret 2016]
- Adjuwana, Nur MA. 1989. *Teknik Spektroskopi Dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas IPB.
- Agoes A. 2010. *Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Salemba Medika
- Aka JA, Sheng-Xiang L. 2010. Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7. *Plos One* 7(2): 1-9
- Amalina N. 2008. Uji sitotoksik ekstrak etanol 70% buah merica hitam (*Piper nigrum* L) terhadap sel Hela [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi IV. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Awang N, Aziz ZA, Kamaludin NF, dan Chan KM. 2014. Cytotoxicity and mode of celldeath induced by Triphenyltin (IV) compounds *in vitro*. *J. Biol. Sci.* 14 (2): 84-93.
- Burdall ES, Hanby MA, Landsdown RJM., Speirs V. 2003. Breast Cancer Cell Line. *Breast Cancer Res* 5(2): 89-95.
- Corwin, Elizabeth J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi 3. Nike BS, penerjemah; Egi KY, editor. Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Handbook Of Pathophysiology*.
- Dalimartha S. 2009. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia* 6. Depok: Puspa Swara.
- [Depkes] Departemen Kesehatan RI. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes] Departemen Kesehatan RI. 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes] Departemen Kesehatan RI. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- [Depkes] Departemen Kesehatan RI. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes] Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Direktorat jendral Pengawasan Obat dan makanan*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Desaintes C, Goyat S, Garbay S, Yaniv M, dan Thierney F. 1999. Papillomavirus E2 Induces p53-Independent Apoptosis in HeLa Cells. *Oncogene* 18: 4583-4545
- Dianda, R. 2009. *Mengenal Seluk Beluk Kanker*. Cetakan ketiga. Yogyakarta: Katahati.
- Dipiro JT. 2009. *Pharmacoterpy Handbook 7th Edition*. New York: Mc Graw Hill.
- Doyle A, Griffiths JB. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York: John Wiley and Sons Ltd.
- Elwood JM, Cox B, Richardson AK. 1993. The effectiveness of breast cancer screening by mammography in younger women. *Online J Curr Clin Trials* 34: 295.
- Evan WC. 2009. *Trease and Evans: pharmacognosy*. Sixteenth edition. London: Elsevier health science
- Farizal J. 2012. Pengaruh pemberian ekstrak etanol umbi bidara upas (*Merremia mammosa*) terhadap proliferasi limfosit dan produksi roi makrofag studi eksperimental infeksi *Salmonella Typhimurium* pada mencit Balb [Tesis]. Semarang: Megister Ilmu Biomedik, Universitas Diponegoro.
- Freshney RI. 2000. *Culture Of Animal Cells: A manual of basic Technique*. New York: Wiley-Liss Inc.
- Gritter R, Bobbit J, Schwarting A. 1985. *Introduction To Chromatograp*. Padmawinata K, penerjemah; Bandung: ITB
- Handa SS *et al*. 2008. *Extraction Technology For Medicinal And Aromatic Plants*. Trieste: ICS-UNIDO.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Kosasih P, Iwang S, penerjemah; Bandung: ITB Pr. Terjemahan dari: *Phycochemical methods*.

- Hasanuddin *et al.* 2015. Potential of terpenoid bioactive compound isolated from Papua Ant Nest as an alternative ovarian cancer treatment. *Journal of Obstetric and Gynecology* 5: 406-411.
- Heti, Dany. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Herba Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* Presl.) terhadap Sel T47D [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Holliday DL, Valerie S. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Biomed Central* 13: 215.
- Hostettmann, K, Hostettmann, M. dan Marston A. 1995. *Cara Kromatografi Preparatif*. Kosasih P, penerjemah; Bandung: Penerbit ITB. Hlm 33.
- Indrawati M. 2009. *Bahaya Kanker bagi Wanita dan Pria*. Cetakan Pertama. Jakarta: Pendidikan untuk Kehidupan.
- Ismarti. 2011. Isolasi triterpenoid dan uji antioksidan dari fraksi etil asetat kulit batang meranti merah (*Shorea singkawang* (Miq).Miq) [Artikel]. Yogyakarta: Program Studi Kimia, Universitas Andalas.
- Jian Y *et al.* 2010. Phenolic compounds from *Merremia umbellata* subsp. orientalis and their allelopathic effects on Arabidopsis seed germination. *Molecules* 15: 8241-8250.
- Khanbababae K, Ree TV. 2011. Tannins classification and definition. *Nat Prod Rep*. halm 18 & 641.
- Kitagawa I *et al.* 1996. Indonesian medical plants. XV. Chemical structures of five new resin-glikosida, merremosides a, b, c, d and e, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem Pharm Bull* 44: 1680-1692.
- Kurnijasanti R, Hamid SI, Rahmawati K. 2008. Efek sitotoksik *in vitro* dari ekstrak buah mahkota dewa (*phaleria macrocarpa*) terhadap kultur sel kanker mieloma. *Media Eksakta* 7(1): 48-54.
- Levrero M *et al.* 2000. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *JCS* 113: 1661-1670
- Lutfillah M. 2008. Karakteristik senyawa alkaloid hasil isolasi dari kulit batang angset (*Spathoda campanulata* Beauv). Malang: Fakultas Universitas Brawijaya Malang.
- Mahardika AW. 2004. *Kursus Singkat Kultur Sel*. Yogyakarta: Laboratorium Ilmu Hayati, Universitas Gadjah Mada.

- Marliana E. 2007. Analisis senyawa metabolit sekunder dari batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Benth yang berfungsi sebagai antioksidan. *Jurnal Penelitian MIPA* 1: 23-29.
- Martindale, William. 1993. *The Extra Pharmacopeia 30th Edition*. Reynolds JEF, editor. New York: Amer Pharmaceutical Assn.
- Meiyanto *et al.* 2008. Ekstrak etanol biji buah pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *Jurnal Farmasi Indonesia* 19:12-19.
- Mursyidi A, editor. 1990. *Analisis Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada
- [NCI] National Cancer Institute. 2012. *Cancer Treatment*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment.html> [12 Maret 2016]
- [NCI] National Cancer Institute. 2013. *Breast Cancer*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast.html> [12 Maret 2016]
- Notoadmodjo S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Pereda-Miranda R, Escalante-Sánchez, E, Escobedo-Martínez C. 2005. Characterization of lipophilic pentasaccharides from beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae*). *Journal of Natural Products* **68**: 226–230.
- Pereda-Miranda R, Ricardo V, Moustapha B, Argelia L. 2009. Pore-forming activity of morning glory resin glucosides in model membranes. *Rev Latinoamer. Quim* 37(2): 144-154.
- Prabhu PT, Pannerselvam P, Selvakumari S, Udhumansha U, Shantha A. 2012. Anticancer activity of *Merremia emerginata* (Burm.F) against human cervical and breast carcinoma. *Int J Resch and Dev in Phramacy and Life Scienses* 1: 189-192
- Pristianti N. 2011. Pemisahan senyawa terpenoid dari ekstrak *n*-heksana umbi *Merremia Mammosa*, (Lour) Hallier f. [abstrak]. Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.
- Ramli M. 2000. *Kanker Tiroid Penatalaksanaan Diagnosis dan Terapi*. Dalam: Ramli H, Umbas R, Danigoro S. 2000. *Deteksi Dini Kanker*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Ren, Qiao *et al.* 2003. Flavonoid: promising anticancer agents. *Med Research Rev* 23(4): 519-534.

- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Edisi 6. Padwaminta, penerjemah; ITB Bandung. Terjemahan: *The Organic Constituent Of Higher Plants*.
- Ruddon W, Raymond. 2007. *Cancer Biology*. New York: Oxford University Press.
- Schafer JM, Lee ES, O'Regan RM, Yao K, Jordan, VC. 2000. Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice. *Clinical Cancer Research* 6: 4373-4380
- Scheffler W. 1987. Statistik untuk Biologi, Farmasi, Kedokteran dan Ilmu yang Bertautan. Terbitan kedua, Suroso. Penerjemah: Kokasih Padyamawinata, editor Buffalo: Addison-Wesley. Publishing Company, Inc. terjemahan dari: *Statistics for the Biological Sciences, second edition*.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and extraction [review]. *Int Pharm Scientia* 1: 98-106.
- Torosian MH. 2002. *Breast Cancer: a Guide to Detection and Multidisciplinary Therapy*. Totowa: Humana press
- Ueda *et al.* 2002. Antiproliferative Activity of Vietnamese Medicinal Plants. *Biol Pharm Bull* 25(6) 753—760
- Voigt R. 1994. *Teknologi Farmasi*. Edisi IV. Yogyakarta: Gadjah Mada University press.
- Widyaningrum H. 2011. *Kitab Tanaman Obat Nusantara*. Yogyakarta: Media Pressindo
- Zairisman S.Z. 2006. Potensi Ilmu Nomodulator bubuk kako bebas lemak sebagai produk substandard secara in vitro pada sel limfosit manusia. Fakultas Teknologi Pertanian Bogor. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Hal 28-29
- Zulkarniah Z. 2015. Dasar terapi tumor dan kanker di Rumah Riset Jamu “Hortus Medicus” Tawanmangu. *CDK* 24(11): 858-861.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat keterangan determinasi tanaman bidara upas



LABORATORIUM BIOLOGI
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
Jl. A. Yani Tromol Pos 1 Pabelan Kartasura Surakarta 57102. Telp. (0271) 717417 ext 171

SURAT KETERANGAN

No: 576/A.E-I/LAB.BIO/VI/2016

Yang bertanda tangan di bawah ini atas nama Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta menerangkan bahwa:

No.	Nama	NIM
1.	Qurrotul A'yun	18144363A
2.	Santi Nur Ermawati	18144364A
3.	Merisa Setyara	18144359A

Program Studi : S1 Farmasi

Fakultas : Farmasi

Perguruan Tinggi : Universitas Setia Budi

Menyatakan bahwa mahasiswa tersebut telah mendeterminasikan Tanaman Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour.) Haller f.) dengan Sinonim:

1. *Batatta mammosa* Rumph.
2. *Convolvulus mammosa* Hall.
3. *Ipomoea mammosa* Chois.

Pendeterminasian dilakukan pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 02 Juni 2016

Tempat : Laboratorium Biologi

Demikian surat keterangan ini kami buat, harap dipergunakan dengan semestinya.

Surakarta, 02 Juni 2016

Mengetahui,

Kepala Laboratorium Biologi,

Penanggung jawab determinasi,


Triastuti Rahayu, S.Si, M.Si
NIK: 920


Siti Kartika Sari, M.Pd

Lampiran 2. *Etichal clearance uji sitotoksik*



HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Dr. Moewardi General Hospital
 RSUD Dr. Moewardi
School of Medicine SebelasMaret University
 Fakultas Kedokteran Universitas sebelas Maret



ETHICAL CLEARANCE KELAIKAN ETIK

Nomor : 393/ V / HREC /2016

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas

Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

Maret University Of Surakarta, after reviewing the proposal design, herewith to certify
 Surakarta, setelah menilai rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan

That the research proposal with topic :
 Bahwa usulan penelitian dengan judul

UJI SITOTOKSIK FRAKSI N-HEKSANA UMBI BIDARA UPAS (MERREMIA MAMMOSA,
 (LOUR.) HALLIER F.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

Principal investigator : Merisa Setyara
 Peneliti Utama 18144359A

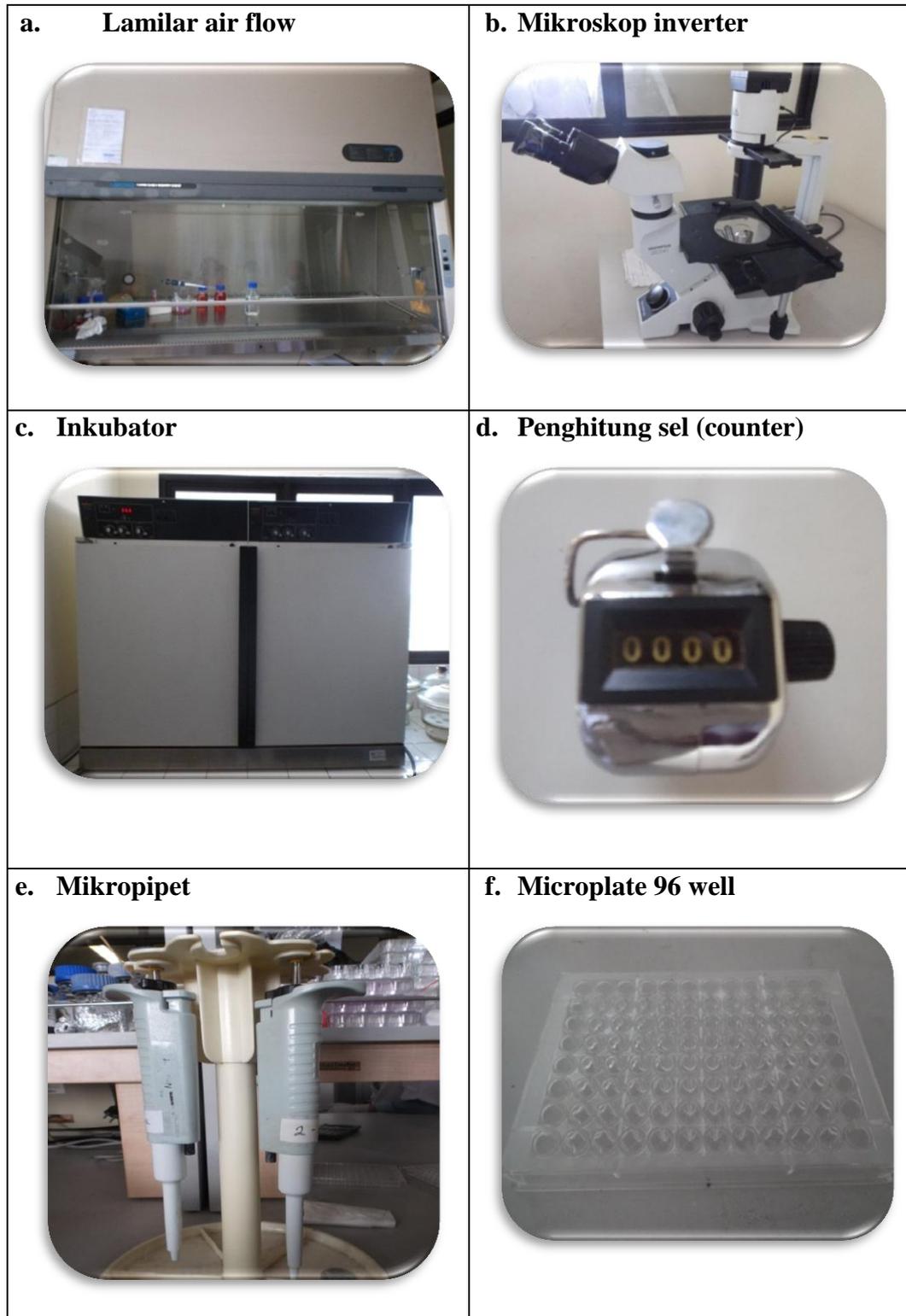
Location Of Research : FK UGM
 Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
Dinyatakan laik etik

Issued on : 04 Mei 2016

Chairman
 Ketua

 Dr. Hari Wujoso, dr., Sp.F.MM
 NIP. 19621022 199503 1 001

Lampiran 3. Gambar alat dan bahan**1. Alat**

g. Timbangan**h. Moisture balance****i. Rotary evaporator****j. Corong pisah**

2. Bahan

a. Umbi bidara upas**b. Serbuk umbi bidara upas**

c. Ekstrak umbi bidara upas**d. Fraksi *n*-heksana umbi bidara upas****e. Media M199****f. Media RPMI****g. Penstrep****h. Fungizone**

Lampiran 4. Perhitungan rendemen simplisia umbi bidara upas

1. Rendemen bobot basah dan kering umbi bidara upas

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
5.100	1.200	23,53

Perhitungan rendemen

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \\ &= \frac{1.200 \text{ g}}{5.100 \text{ g}} \\ &= 23,53\% \end{aligned}$$

2. Rendemen ekstrak umbi bidara upas

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
400	57,456	14,364

Perhitungan rendemen

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \\ &= \frac{57,456 \text{ g}}{400 \text{ g}} \\ &= 14,354 \% \end{aligned}$$

3. Rendemen fraksi *n*-heksana umbi bidara upas

Bobot fraksi (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
2,012	57,456	3,502

Perhitungan rendemen

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \\ &= \frac{2,012 \text{ g}}{57,456 \text{ g}} \\ &= 3,502 \% \end{aligned}$$

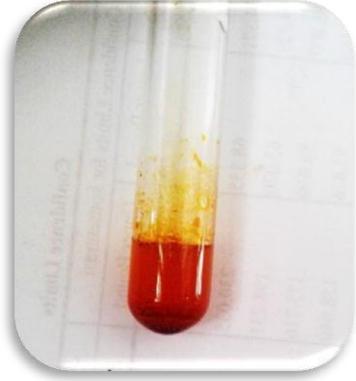
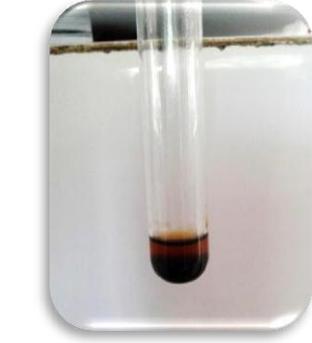
Lampiran 5. Perhitungan susut pengeringan umbi bidara upas

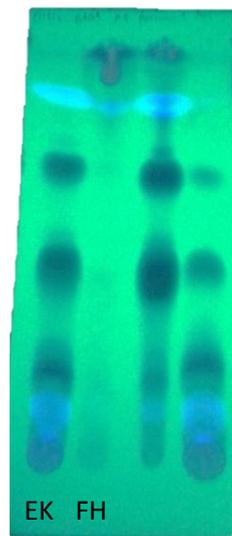
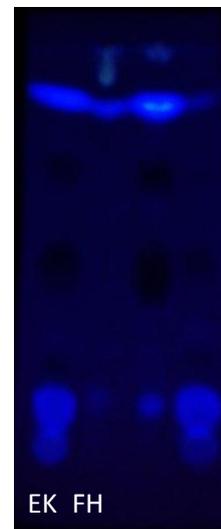
Bobot serbuk (g)	% Susut pengeringan
2,02	4 %
2,01	5 %
2,03	2 %

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata} &= \frac{4+5+2}{3} \\ &= 3,667 \% > 10 \% \end{aligned}$$

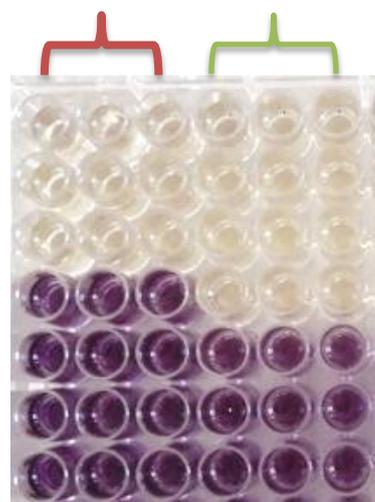
Lampiran 6. Hasil identifikasi senyawa umbi bidara upas

No	Senyawa	Serbuk	Ekstrak
1	Flavonoid		
2	Alkaloid - Mayer		

	- dragendroff		
3	Tannin		
4	Fenolik		
5	Terpenoid		

Lampiran 7. Hasil pengamatan bercak KLT UV 254 nm dan UV 366 nm**UV 254 nm****UV 366 nm****Lampiran 8. Pola *microplate* uji sitotoksik**

Kel. Perlakuan ekstrak Kel. Perlakuan fraksi n-heksana

**Kontrol sel T47d****Kontrol media RPMI**

Lampiran 9. Perhitungan volume panen sel

1. Jumlah sel T47D terhitung dalam suspensi

$$\begin{aligned}\sum \text{sel/ml} &= \frac{\sum \text{sel A} + \sum \text{sel B} + \sum \text{sel C} + \sum \text{sel D}}{4} \times 10^4 \\ &= 101,75 \times 10^4\end{aligned}$$

Volume jumlah pamem yang ditransfer

$$\begin{aligned}\text{Volume panen sel} &= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/ml}} \\ &= \frac{100 \times 10^4}{101,75 \times 10^4} \\ &= 0,98 \text{ ml} \sim 1 \text{ ml}\end{aligned}$$

2. jumlah sel vero terhitung dalam suspensi

$$\begin{aligned}\sum \text{sel/ml} &= \frac{\sum \text{sel A} + \sum \text{sel B} + \sum \text{sel C} + \sum \text{sel D}}{4} \times 10^4 \\ &= 63 \times 10^4\end{aligned}$$

Volume jumlah pamem yang ditransfer

$$\begin{aligned}\text{Volume panen sel} &= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/ml}} \\ &= \frac{100 \times 10^4}{63 \times 10^4} \\ &= 1,59 \text{ ml} \sim 1,6 \text{ ml}\end{aligned}$$

Lampiran 10. Perhitungan pembuatan larutan stok dan larutan seri

1. Pembuatan larutan stok

Dibuat larutan stok dengan konsentrasi 10 mg/100 μ l

$$10 \text{ mg}/100 \mu\text{l} = 100.000 \mu\text{g/ml}$$

2. Pembuatan seri konsentrasi

a. Konsentrasi 1000 μl

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \text{ ml} \times 1000 = V_2 \times 100.000$$

$$V_2 = 10 \mu\text{l}$$

*) Dipipet 10 μl dari larutan stok +
990 μl media penumbuh

c. Konsentrasi 250 μl

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \text{ ml} \times 250 = V_2 \times 500$$

$$V_2 = 500 \mu\text{l}$$

*) Dipipet 500 μl dari larutan
kons.(b) + 500 μl media penumbuh

e. Konsentrasi 62,5 μl

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \text{ ml} \times 62,5 = V_2 \times 125$$

$$V_2 = 500 \mu\text{l}$$

*) Dipipet 500 μl dari larutan
kons.(d) + 500 μl media penumbuh

g. Konsentrasi 15,6 μl

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \text{ ml} \times 15,6 = V_2 \times 31,2$$

b. Konsentrasi 500 μl

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \text{ ml} \times 500 = V_2 \times 1.000$$

$$V_2 = 500 \mu\text{l}$$

*) Dipipet 500 μl dari larutan
kons.(a) + 500 μl media
penumbuh

d. Konsentrasi 125 μl

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \text{ ml} \times 125 = V_2 \times 500$$

$$V_2 = 500 \mu\text{l}$$

*) Dipipet 500 μl dari larutan
kons.(c) + 500 μl media penumbuh

f. Konsentrasi 31,2 μl

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$1 \text{ ml} \times 31,2 = V_2 \times 62,5$$

$$V_2 = 500 \mu\text{l}$$

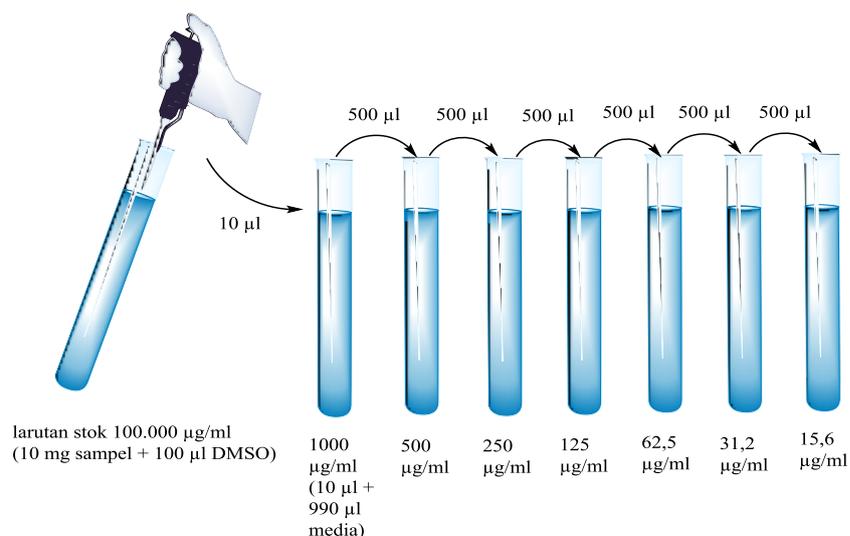
*) Dipipet 500 μl dari larutan
kons.(e) + 500 μl media penumbuh

$$V_2 = 500 \mu\text{l}$$

*) Dipipet 500 μl dari larutan kons.(f)

+ 500 μl media penumbuh

Ilustrasi



Lampiran 11. Perhitungan IC_{50} ekstrak umbi bidara upas

IC_{50} ekstrak umbi bidara upas terhadap sel T47D

C ($\mu\text{g/ml}$)	Log C	Kontrol media	Kontrol sel	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	\bar{x}	Persen Viabilitas
1000	3	0,089	1,089	0,104	0,102	0,099	0,102	1,3
500	2,699	0,090	1,042	0,119	0,123	0,115	0,119	3
250	2,398	0,094	1,027	0,175	0,164	0,152	0,164	7,5
125	2,097	x = 0,091	x = 1,053	0,976	0,910	0,938	0,941	85,2
62,5	1,796			1,036	1,107	1,066	1,070	97,2
31,25	1,495			1,082	1,097	1,108	1,096	99,5
15,625	1,194			1,021	1,134	1,175	1,070	103,2

Penentuan IC_{50}

$$y = -72,203x + 210,14$$

$$50 = -72,203x + 210,14$$

$$50 - 210,14 = -72,203x$$

$$x = 2,217913383$$

$$\text{Antilog } x (\text{IC}_{50}) = 165,163$$

Lampiran 12. Perhitungan IC₅₀ fraksi *n*-heksana umbi bidara upas

IC₅₀ fraksi *n*-heksana umbi bidara upas terhadap sel T47D

C (µg/ml)	Log C	Kontrol media	Kontrol sel	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	\bar{x}	Persen Viabilitas
125	2,097	0,089	1,024	0,094	0,096	0,094	0,095	0,426
62,5	1,796	0,090	1,042	0,137	0,140	0,129	0,135	4,787
31,25	1,495	0,094	1,027	0,553	0,564	0,549	0,555	49,362
15,625	1,194	x = 0,091	x = 1,031	0,901	0,842	0,863	0,868	82,66
7,8125	0,893			0,987	0,993	0,988	0,988	95,426

Penentuan IC₅₀

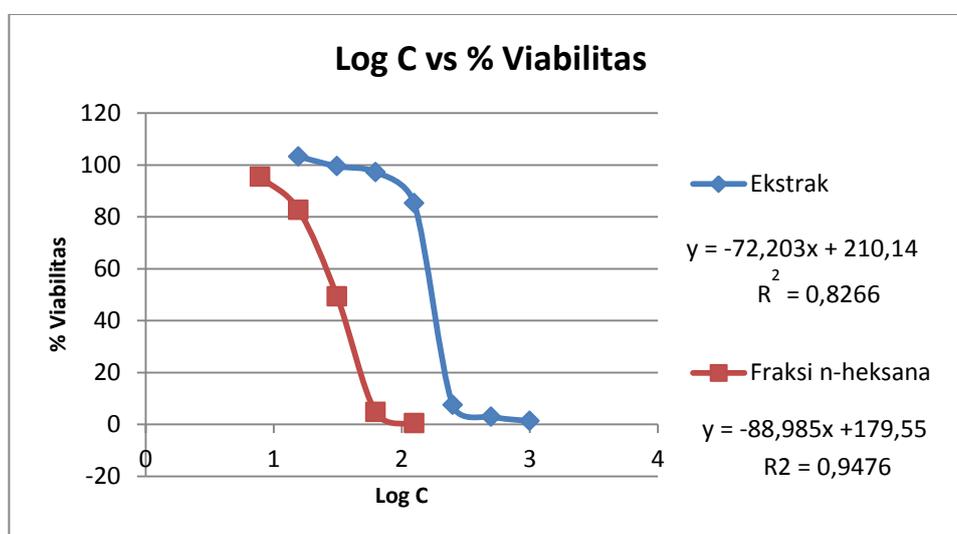
$$y = -88,985x + 179,55$$

$$50 = -88,985x + 179,55$$

$$50 - 179,55 = -88,985x$$

$$x = 1,455863348$$

$$\text{Antilog } x (\text{IC}_{50}) = 28,567$$



Lampiran 13. Perhitungan indeks selektivitas

a. IC₅₀ ekstrak terhadap sel vero

C (µg/ml)	Log C	Kontrol media	Kontrol sel	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	\bar{x}	Persen Viabilitas
2000	3,301	0,078	0,579	0,140	0,149	0,137	0,142	12,670
1000	3	0,079	0,571	0,220	0,237	0,268	0,242	33,038
500	2,699	0,083	0,558	0,455	0,436	0,51	0,467	79,087
250	2,398	x = 0,08	x = 0,569	0,489	0,476	0,617	0,527	91,417
125	2,097			0,475	0,531	0,631	0,546	95,163
62,5	1,796			0,530	0,519	0,642	0,564	98,842
31,25	1,495			0,516	0,577	0,649	0,581	102,316

Penentuan IC₅₀

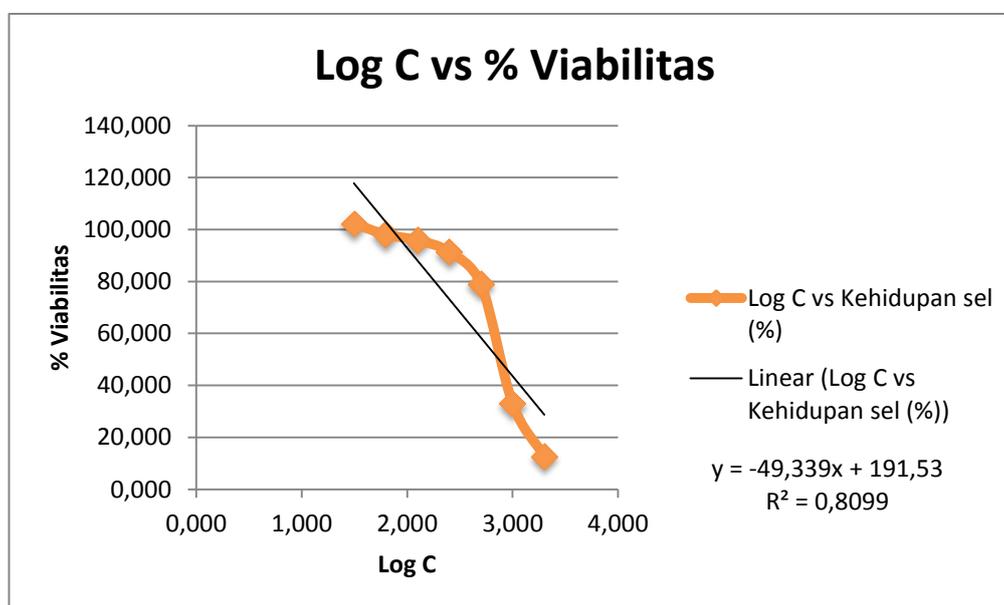
$$y = -49,339x + 191,53$$

$$50 = -49,339x + 191,53$$

$$50 - 191,53 = -49,339x$$

$$x = 2,868521859$$

$$\text{Antilog } x (\text{IC}_{50}) = 738,791$$



b. Nilai indeks selektivitas ekstrak terhadap sel T47D

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ sel Vero}}{IC_{50} \text{ sel kanker T47D}}$$

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{738,791 \mu\text{g/ml}}{165,163 \mu\text{g/ml}}$$

$$\text{Indeks selektivitas} = 4,473$$