

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL  
ASETAT KULIT BUAH PINANG (*Areca catechu* L.)  
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**



Oleh :

**Nabila Karsan**

**18144360A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA**

**2016**

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL  
ASETAT KULIT BUAH PINANG (*Areca catechu* L.)  
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 :

**Nabila Karsan**

**18144360A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA**

**2016**

PENGESAHAN SKRIPSI  
berjudul

UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL  
ASETAT KULIT BUAH PINANG (*Areca catechu* L.)  
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

Oleh  
Nabila Karsan  
18144360A

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. Drs. Mardiyono, M.Si.
2. Yane Dila Keswara, M.Sc., Apt.
3. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si.
4. Nur Aini Dewi P., M.Sc., Apt.

1. ....

2. ....

3. ....

4. ....

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penulisan/ karya ilmiah/ skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 17 Oktober 2016



Nabila Karsan

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*"Seberat apapun beban masalah yang kamu hadapi saat ini, percayalah bahwa semua itu tak pernah melebihi batas kemampuan kamu"*

*"Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan"  
(Al - Inshirah : 5)*

*Kupersembahkan karya ini kepada :*

- *Ayahandaku, Ibundaku, Kakakku (Ucheng, Yaya, Kamal, Yanti & Farid) serta Keponakanku (Inaz dan Ali) tercinta, terimakasih atas pengorbanan, kasih sayang yang tulus, perhatian, dukungan dan do'a yang telah diberikan selama ini.*
- *Calon pendamping hidupku Ichal terima kasih atas semuanya dan sudah menunggu selama ini*
- *Sahabat seperjuangan Nuratikah, Pristovia, dan Anis yang sudah banyak membantu dan berkorban dalam suka maupun duka.*
- *Team skripsiku (Areca dan Morning glory), teman-teman transfer 2014 (Alfiah, Deni, Desi, Indah, Kuni, Merisa, Luna, Nura, A'yun, Santi, Sari, Uswah, Nina, Yuna) terima atas kebersamaan, bantuan serta dukungan kalian. Semoga kesuksesan selalu bersama kita. Aamiin.*
- *Agama, Bangsa, Negara, dan Almamaterku Universitas Setia Budi.*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas berkat, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT KULIT BUAH PINANG (*Areca catechu* L.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D ”**. Skripsi ini disusun dalam rangka melengkapi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, M.BA. selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dwi Ningsih, M.Farm., Apt. selaku Kepala Progam Studi S1 Farmasi Universitas Setia Budi
4. Ibu Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt. selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, memberikan bimbingan, pengarahan, saran, motivasi dan petunjuk dalam penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Fransiska Leviana, M.Sc., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu, memberikan bimbingan, pengarahan, saran, motivasi dan petunjuk dalam penyusunan skripsi ini.
6. Tim penguji Bapak Drs. Mardiyono, M.Si., Ibu Yane Dila Keswara, M.Sc.,Apt., Bapak D. Andang Arif W., SP.,M.Si., Nur Aini Dewi P., M.Sc., Apt. yang telah menyediakan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk penyempurnaan skripsi ini.
7. Segenap Dosen, Karyawan dan Staff Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah banyak membantu kelancaran skripsi ini.

8. Orang tua, Kakak, Inaz, Ali, dan Kekasihku Ichal yang selalu ku cintai terima kasih atas doa, kasih sayang, dukungannya baik dalam hal moril dan material untuk membantu menyelesaikan skripsi ini.
9. Teman - teman Transfer S1 Farmasi angkatan 2014 yang banyak membantu dan kerja sama yang baik untuk selalu dikenang selama ini baik suka maupun duka di bangku perkuliahan.
10. Seluruh pihak satu persatu yang tidak bisa penulis sebutkan dalam penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari kesempurnaan. Kritik dan Saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang membacanya.

Surakarta, 17 Oktober 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
DAFTAR SINGKATAN .....	xv
INTISARI .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
<b>BAB I    PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
<b>BAB II    TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Tanaman Pinang	
1. Klasifikasi tanaman.....	5
2. Nama daerah.....	5
3. Morfologi tanaman.....	5
4. Kandungan kimia .....	6
5. Kegunaan tanaman .....	6
B. Simplisia	
1. Pengertian.....	7
2. Pengumpulan .....	8
3. Sortasi basah .....	8

4. Perajangan .....	8
5. Pengeringan .....	9
C. Ekstraksi	
1. Pengertian .....	9
2. Ekstrak.....	10
3. Maserasi .....	10
4. Fraksinasi .....	10
5. Pelarut .....	11
D. Penyakit Kanker	
1. Pengertian.....	12
2. Sifat kanker .....	13
3. Pengobatan kanker	
3.1. Kemoterapi.....	15
3.2. Radioterapi .....	15
3.3. Pembedahan .....	15
3.4. Imunoterapi / bioterapi.....	15
4. Golongan senyawa kimia yang digunakan dalam terapi kanker .....	16
E. Siklus Sel	
1. Tinjauan siklus sel.....	17
2. Fase siklus sel	
2.1. Fase pasca mitosis ( $G_1$ ).....	18
2.2. Fase sintesis DNA (S).....	18
2.3. Fase pra mitosis ( $G_2$ ).....	18
2.4. Fase mitosis (M).....	18
F. Kanker Payudara	
1. Tinjauan sel kanker payudara.....	19
2. Sel T47D .....	19
3. Sel vero.....	20
G. Uji Sitotoksisitas	
1. Tinjauan uji sitotoksisitas.....	21
2. Uji indeks selektivitas .....	22
3. Metode MTT <i>assay</i> .....	22
H. Landasan Teori.....	24
I. Hipotesis.....	26

### BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel .....	28
B. Variabel Penelitian	
1. Identifikasi variabel utama.....	28
2. Klasifikasi variabel utama.....	28
3. Definisi operasional variabel utama .....	29
C. Alat dan Bahan	
1. Alat.....	30
2. Bahan.....	31

D. Jalannya Penelitian	
1. Determinasi dan identifikasi tanaman kulit buah pinang...	31
2. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk	31
3. Penetapan susut pengeringan .....	32
4. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang .....	32
5. Pemeriksaan organoleptis ekstrak kulit buah pinang .....	34
6. Uji bebas alkohol.....	34
7. Identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak etanol kulit buah pinang	
7.1. Identifikasi fenolik .....	35
7.2. Identifikasi tanin.....	35
7.3. Identifikasi flavonoid .....	35
7.4. Identifikasi alkaloid.....	35
7.5. Identifikasi terpenoid .....	35
8. Identifikasi kandungan senyawa secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	36
9. Uji sitotoksik	
9.1. Sreilisasi alat .....	37
9.2. Pembuatan media stok RPMI 1640 dan media komplit RPMI 1640 .....	37
9.3. Pembuatan larutan uji .....	38
9.4. Pengaktifan sel kanker payudara T47D .....	38
9.5. Panen dan perhitungan sel.....	38
9.6. <i>Treatment</i> sel (pemberian larutan uji dan MTT).....	40
10. Uji selektivitas	
10.1. Pembuatan media komplit untuk sel vero .....	41
10.2. Pembuatan larutan uji .....	41
10.3. Pengaktifan sel vero .....	41
10.4. Uji indeks selektivitas .....	42
E. Analisis Hasil	
1. Uji sitotoksitas .....	43
2. Indeks selektivitas .....	43

## BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian	
1. Determinasi tanaman .....	45
2. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk	45
3. Hasil penetapan susut pengeringan .....	46
4. Hasil pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang .....	47
5. Hasil uji bebas etanol .....	48
6. Hasil identifikasi kandungan senyawa .....	48
7. Hasil identifikasi kandungan senyawa secara KLT .....	49
8. Hasil uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D ....	52
9. Hasil uji selektivitas ekstrak etanol kulit buah pinang .....	60

BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	
	A. Kesimpulan .....	61
	B. Saran .....	61
DAFTAR PUSTAKA .....		62
LAMPIRAN .....		66

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Tanaman pinang ( <i>Areca catechu</i> L.) .....	6
Gambar 2. Reaksi reduksi MTT <i>assay</i> .....	23
Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang .....	34
Gambar 4. Skema bilik hitung <i>Haemocytometer</i> .....	39
Gambar 5. Skema uji sitotoksik .....	44
Gambar 6. Hasil KLT .....	50
Gambar 7. Morfologi sel T47D setelah pemberian tripsin .....	53
Gambar 8. Grafik hubungan % viabilitas hidup dengan konsentrasi .....	55
Gambar 9. Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian larutan uji .....	57

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Hasil rendemen berat kulit buah pinang basah .....	46
Tabel 2. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk kulit buah pinang .....	46
Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kulit buah pinang .....	47
Tabel 4. Hasil perhitungan rendemen ekstrak kulit buah pinang .....	48
Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak kulit buah pinang .....	48
Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak kulit buah pinang .....	49
Tabel 7. Hasil identifikasi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat secara KLT ...	51
Tabel 8. Nilai IC <sub>50</sub> ekstrak dan fraksi etil asetat kulit buah pinang terhadap sel T47D .....	56

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Surat keterangan hasil identifikasi tanaman .....	66
Lampiran 2. Surat <i>ethical clearance</i> pengujian sitotoksik .....	69
Lampiran 3. Surat ijin penelitian .....	70
Lampiran 4. Bahan dan alat penelitian .....	71
Lampiran 5. Perhitungan rendemen serbuk, ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang .....	75
Lampiran 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa .....	76
Lampiran 7. Pola <i>micro plate</i> uji MTT .....	79
Lampiran 8. Perhitungan volume pemanenan sel .....	80
Lampiran 9. Perhitungan pembuatan larutan stok dan larutan seri .....	81
Lampiran 10. Degradasi warna saat sebelum pemberian sampel, sesudah pemberian MTT, dan sesudah pemberian SDS .....	84
Lampiran 11. Gambar kristal formazan pada sel vero .....	86
Lampiran 12. Gambar kristal formazan pada sel T47D .....	87
Lampiran 13. Perhitungan $IC_{50}$ .....	89
Lampiran 14. Perhitungan nilai indeks selektivitas .....	92
Lampiran 15. Hasil analisis uji <i>Independent T-test</i> .....	93
Lampiran 16. Surat keterangan selesai penelitian .....	95

## DAFTAR SINGKATAN

BCS	: <i>Breast Conserving Surgery</i>
CDK	: <i>Cyclin Dependent Kinase</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
DMSO	: <i>Dimetil sulfoksida</i>
DNA	: <i>Deoxiribo Nukleid Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	: <i>Estrogen Reseptor</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FIF	: <i>Field in field</i>
HEPES	: <i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid)</i>
IARC	: <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC <sub>50</sub>	: <i>Inhibitory Concentration 50%</i>
MDR	: <i>Multi Drug Resistance</i>
MTT	: <i>Microculture tetrazolium technique</i>
PBS	: <i>Phospate Buffered Saline</i>
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	: <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
THFA	: <i>Tetrahydo Folic Acid</i>

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Kanker adalah suatu penyakit akibat pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh tidak normal. Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan akan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan sekitarnya (invasif) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah, dan menyerang organ-organ penting serta syaraf tulang belakang (Katzung 1997). Kanker merupakan salah satu jenis penyakit yang menjadi perhatian serius di bidang kedokteran, karena banyak terjadi di negara berkembang seperti Indonesia dan termasuk penyakit penyebab kematian terbesar kedua setelah penyakit kardiovaskular (Sukardiman *et al.* 2004). Kanker payudara merupakan salah satu keganasan pada wanita yang menyebabkan angka kematian yang tinggi, sehingga kanker payudara dianggap sebagai penyakit yang menakutkan dikalangan wanita (Ellis *et al.* 2003). Menurut data WHO (*World Health Organization*) pada tahun 2014, di Indonesia jumlah kasus kanker payudara pada wanita sebanyak 48.998 kasus.

Sel kanker pada awalnya adalah sel normal, karena adanya kerusakan komponen berubah menjadi sel ganas yang tumbuh tidak terkendali (Ruddon 2007). Kerusakan sel dapat disebabkan oleh infeksi virus, paparan senyawa karsinogenik, radiasi sinar radioaktif, faktor genetik dan gaya hidup (Mangan 2003). Pengobatan kanker dapat dilakukan melalui pembedahan, radiasi, dan kemoterapi. Obat kanker pada umumnya bekerja tidak selektif karena bekerja

dengan merusak sel baik pada sel normal maupun sel kanker, serta adanya resistensi dari sel kanker terhadap obat-obat antikanker yang membuat antikanker tersebut tidak sensitif lagi terhadap sel kanker. Keadaan ini mendorong dilakukannya berbagai penelitian untuk menemukan antikanker yang diharapkan memiliki toksisitas selektif yaitu menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel normal dengan cara pemanfaatan tanaman obat tradisional. Salah satu tanaman tradisional yang diduga memiliki khasiat sebagai antikanker adalah tanaman pinang (*Areca cathecu* L). Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada pinang yaitu berupa senyawa flavonoid, alkaloid, fenolik, terpenoid, dan tanin (IARC 2004).

Beberapa penelitian yang dilakukan sebagian besar menggunakan biji pinang dalam pengobatan antikanker, diantaranya penelitian oleh A'yun (2010), uji aktivitas sitotoksik secara *in vitro* terhadap sel leukemia L1210 dari ekstrak etanol biji pinang diperoleh nilai  $IC_{50}$  24,7279  $\mu\text{g/mL}$ . Penelitian Filbert *et al.* (2014), aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit buah pinang memberikan nilai  $IC_{50}$  sebesar 8,3  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan penelitian oleh Mamonto *et al* (2014), uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol kulit buah pinang mengandung flavonoid. Sebagian besar flavonoid diduga mampu menghambat proliferasi pada berbagai sel kanker pada manusia, namun tidak toksik terhadap sel normal manusia (Ren *et al.* 2003). Ismail *et al.* (2012), kulit buah pinang memiliki aktivitas antioksidan 54,11% .

Melihat adanya potensi aktivitas antioksidan dari kulit buah pinang namun kurangnya pemanfaatannya di masyarakat, maka perlu dilakukan penelitian

tentang efek ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dari kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) sebagai antikanker dan selektivitas terhadap sel vero (sel normal). Antioksidan berfungsi melindungi tubuh terhadap radikal-radikal bebas sehingga antioksidan penting dalam memelihara kesehatan (Sunarmi 2004). Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan metode penelitian menggunakan MTT (*Microculture Tetrazolium*) pada kultur sel kanker payudara T47D dan sel vero yang ditunjukkan dengan parameter  $IC_{50}$  dan indeks selektivitas.

### **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perumusan masalah penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak etanol kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) mempunyai efek sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan berapakah nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanol kulit buah pinang ?
2. Apakah fraksi etil asetat kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) mempunyai efek sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan berapakah nilai  $IC_{50}$  dari fraksi etil asetat kulit buah pinang ?
3. Berapa nilai indeks selektivitas ekstrak etanol kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) dari kultur sel kanker payudara T47D terhadap sel vero ?
4. Manakah di antara ekstrak etanol dan fraksi etil asetat yang memiliki efek sitotoksik lebih baik terhadap sel kanker payudara T47D ?

### **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui efek sitotoksik dari ekstrak etanol kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanol kulit buah pinang.
2. Mengetahui efek sitotoksik dari fraksi etil asetat kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan nilai  $IC_{50}$  dari fraksi etil asetat kulit buah pinang.
3. Mengetahui nilai indeks selektivitas ekstrak etanol kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) dari kultur sel kanker payudara T47D terhadap sel vero.
4. Mengetahui efek sitotoksik yang lebih baik di antara ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) terhadap sel kanker payudara T47D.

### **D. Kegunaan Penelitian**

Hasil penelitian diharapkan dapat memberi informasi ilmiah tentang kemampuan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dari kulit buah pinang dalam aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara, meningkatkan budidaya tanaman pinang sebagai obat alternatif dalam pengobatan antikanker serta memberikan kontribusi ilmiah terhadap penelitian-penelitian kanker selanjutnya.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tanaman Pinang**

##### **1. Klasifikasi tanaman**

Klasifikasi tanaman biji pinang menurut Depkes (2001), sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae (tanaman)
Sub kingdom	: Tracheobionta (tumbuhan berpembuluh)
Divisi	: Magnoliophyta (tumbuhan berbunga)
Sub divisi	: Angiospermae
Class	: Liliopsida (berkeping satu / monokotil)
Sub class	: Arecidae
Ordo	: Arecales
Famili	: Arecaceae (suku pinang-pinangan)
Genus	: <i>Areca</i>
Spesies	: <i>Areca catechu</i> L.

##### **2. Nama daerah**

Nama daerahnya yaitu pinang (Aceh), pingan (Toba), pako rapo (Makasar), hua (Ambon), wohan (Jawa), winu (Sumba), buah (Lampung), penang (Madura), umate (Mimika) (Herlina *et al.* 2011).

##### **3. Morfologi tanaman**

Tanaman pinang tinggi biasanya mencapai 25 m. Batang berkayu, tegak, berwarna hijau kecoklatan. Daun majemuk, berupa roset batang, berpelelah,

bergerigi, berwarna hijau muda, hijau. Buah buni, bulat telur, merah jingga. Biji satu, bulat telur, kuning kecoklatan serta akar serabut (Dalimartha 2007).



**Gambar 1. Tanaman pinang (*Areca catechu* L.) (Dalimartha 2007)**

#### **4. Kandungan kimia**

Buah pinang mengandung 0,3-0,6% alkaloid seperti arekolin, arekolidine, arekain, guvakolin, guvasine dan isoguvasine. Selain itu juga mengandung tanin 15%, lemak 14% (palmitat, oleat, stearat, kaproat, caprilat, laurat, asam meristat), kanji, kumarin dan resin. Biji segar mengandung kira-kira 50% lebih banyak alkaloid, dibandingkan biji yang telah mengalami perlakuan, selain itu konsentrasi flavonoid dalam biji pinang menurun seiring dengan bertambahnya kematangan buah (BPOM RI 2010). Biji pinang juga mengandung katekin yang termasuk dalam golongan fenolik (Xing *et al.* 2010). Ismail *et al.* (2012) kulit buah pinang mengandung senyawa fenolik.

#### **5. Kegunaan tanaman**

Tumbuhan pinang berpotensi antikanker karena memiliki efek antioksidan dan antimutagenik (Meiyanto *et al.* 2008). Biji pinang berkhasiat sebagai obat cacing, peluruh kentut (*antiflatulent*), peluruh haid, peluruh kencing (diuretik), peluruh dahak, memperbaiki pencernaan, pengelat (astringen), pencahar (laksan).

Daun sebagai penambah nafsu makan. Sabut melancarkan sirkulasi tenaga, peluruh kencing, dan pencahar. Senyawa *catechin* dan turunannya memiliki aktivitas biologis dalam menghilangkan radikal bebas, antikarsinogenik, anti-inflamasi, antialergi (Xing *et al.* 2010).

Zat fenolik yang terdapat pada biji pinang diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan bagian lainnya dari tanaman tersebut (daun, ujung batang, kulit buah). Aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga berpotensi sebagai antikanker (Meiyanto *et al.* 2008).

## **B. Simplisia**

### **1. Pengertian**

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga, kecuali dinyatakan lain simplisia merupakan bahan yang dikeringkan. Simplisia dibagi menjadi 3 macam yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia mineral.

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh bagian tanaman dan eksudat tanaman. Eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau dengan cara tertentu sengaja dikeluarkan dari selnya. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat yang dihasilkan hewan yang masih belum berupa zat kimia murni. Simplisia mineral adalah simplisia yang berasal dari bumi, baik telah diolah ataupun belum tidak berupa zat kimia murni (Depkes 1986).

## **2. Pengumpulan**

Simplisia berdasarkan bahan bakunya dapat diperoleh dari tanaman liar atau dari tanaman yang dibudidayakan. Jika simplisia diambil dari tanaman budidaya maka keseragaman umur, masa panen, dan galur (asal-usul, garis keturunan) tanaman dapat dipantau. Tetapi jika pengambilan simplisia dari tanaman liar akan banyak kendala dan variabilitas yang tidak bisa dikendalikan seperti asal tanaman, umur, dan tempat tumbuh (Depkes 1985).

Waktu panen sangat erat hubungannya dengan pembentukan senyawa aktif di dalam bagian tanaman yang akan dipanen. Waktu panen yang tepat adalah pada saat bagian tanaman tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah besar. Senyawa aktif terbentuk secara maksimal di dalam bagian tanaman pada umur tertentu (Depkes 1985).

## **3. Sortasi basah**

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan cecairan dan kotoran dari simplisia yang baru dipanen. Sortasi ini dapat mengurangi jumlah kontaminasi mikroba (Depkes 1985).

## **4. Perajangan**

Perajangan bahan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Perajangan dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajang khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki. Semakin tipis bahan yang akan dikeringkan, semakin cepat penguapan air, sehingga mempercepat waktu

pengeringan. Akan tetapi irisan yang terlalu tipis juga dapat menyebabkan berkurangnya atau hilangnya zat berkhasiat yang mudah menguap (Depkes 1985).

## **5. Pengerinan**

Pengerinan simplisia bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Pengerinan simplisia untuk mengurangi kadar air dan menghentikan kerja enzimatik. Cara pengerinan simplisia dibedakan menjadi 2 metode yaitu pengerinan alamiah dengan panas matahari langsung atau diangin-anginkan. Pengerinan buatan dengan menggunakan suatu alat atau mesin pengering yang suhu kelembaban, tekanan, dan aliran udaranya dapat diatur. Beberapa hal yang perlu diperhatikan selama proses pengerinan adalah suhu pengerinan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengerinan, dan luas permukaan bahan (Depkes 1985).

## **C. Ekstraksi**

### **1. Pengertian**

Ekstraksi atau penyarian adalah perpindahan zat aktif yang semula berada di sel ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan hayati. Metode ekstraksi dilakukan berdasarkan persamaan faktor sifat dari suatu bahan mentah atau simplisia yang disesuaikan dengan metode ekstraksi yang digunakan untuk memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna. Pemilihan sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimal mungkin zat yang tidak diinginkan (Ansel 1989).

## **2. Ekstrak**

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau pelarut yang tersisa diberlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Simanjuntak 2008).

## **3. Maserasi**

Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Pembuatan maserasi kecuali dinyatakan lain, dilakukan dengan dimasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok ke dalam sebuah bejana kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, tutup dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil sering diaduk, serkai, peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Pindahkan ke dalam bejana tertutup, biarkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Enap dituangkan atau disaring (Depkes 1979). Keuntungannya adalah maserasi pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana.

## **4. Fraksinasi**

Fraksinasi merupakan proses pemisahan golongan utama kandungan satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar, begitu pula senyawa-senyawa non polar akan terlarut dalam pelarut non polar (Harborne 1987). Fraksinasi merupakan ekstraksi cair-cair yaitu pemisahan suatu komponen kimia yang tidak saling campur diantar dua fase pelarut, dimana sebagian

komponen larut pada fase pertama, dan sebagian larut dalam fase kedua. Kedua fase yang mengandung zat terdispersi dikocok, kemudian dibiarkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair. Tujuan dari fraksinasi yaitu untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lainnya.

## **5. Pelarut**

Pelarut adalah suatu zat untuk melarutkan zat lain dalam preparat larutan. Pada penelitian pemilihan larutan penyari harus memperhatikan banyak faktor. Larutan penyari harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat, diperbolehkan oleh peraturan. Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Depkes 1979).

Etanol merupakan pelarut serbaguna yang baik digunakan pada ekstraksi pendahuluan, selain etanol dapat juga digunakan metanol, air, dan lain-lain. Etanol merupakan pelarut serba guna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan (Harborne 1987). Etanol sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinon, flavonoid, steroid, damar, klorofil, lemak, tanin, dan saponin hanya sedikit yang larut (Depkes 1986). Keuntungan etanol adalah tidak menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut, etanol juga mempunyai sifat yang mampu mengendapkan

albumin dan menghambat kerja enzim termasuk peragian serta menghalangi pertumbuhan jamur dan sebagian besar bakteri, sehingga disamping sebagai cairan penyari juga berguna sebagai pengawet (Voigt 1994).

Etil asetat merupakan pelarut semipolar, mudah terbakar, dan mudah menguap, maka penyimpanan dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari panas. Etil asetat merupakan cairan jernih, tidak berwarna, bau khas seperti buah, larut 15 bagian air, dapat bercampur dalam eter, etanol dan kloroform (Depkes 1979). Senyawa yang larut ke dalam pelarut ini adalah flavonoid dan dapat melarutkan air hingga 3% (Harborne 1987).

Air merupakan pelarut polar, cairan penyari yang murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun. Air melarutkan senyawa-senyawa polar seperti saponin, glikosida flavonoid, garam alkaloid, tanin dan gula (Depkes 1986).

## **D. Penyakit Kanker**

### **1. Pengertian**

Kanker adalah pertumbuhan sel-sel baru secara abnormal yang tumbuh melampaui batas normal, dan yang kemudian dapat menyerang dan menyebar ke jaringan lain (WHO 2009). Pembelahan sel pada kanker mengarah pada invasi jaringan di sekitarnya serta menyebar ke bagian lain dalam tubuh. Akitivitas proliferasi (pembelahan) yang tidak terkontrol akan membentuk jaringan abnormal yang disebut neoplasma. Namun, infeksi virus yang hanya sekali tidak dapat menginisiasi munculnya sel kanker. Sel normal akan berjalan sesuai

siklusnya dengan pertumbuhan terkendali sedangkan sel kanker akan mengalami pertumbuhan yang tidak terkendali pada mekanisme kontrol atau pengaturan pertumbuhan (King 2000).

Apoptosis merupakan program bunuh diri sel ketika sel tersebut mengalami kerusakan, baik struktural maupun fungsional, yang tidak dapat ditolerir lagi. Namun sel kanker dapat menghindari dari kematian dengan memblok jalur terjadinya apoptosis di dalam sel. Pada sel-sel kanker program apoptosis ini telah mengalami gangguan sehingga sel akan mengalami metastasis. Antioksidan sangat penting dalam menetralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan juga merusak biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat memicu terjadinya penyakit degeneratif seperti kanker (Soeksmanto *et al.* 2007).

## **2. Sifat kanker**

Sel kanker memiliki perbedaan yang sangat signifikan dengan sel normal dalam tubuh. Sifat umum dari kanker ialah sebagai berikut : sel kanker tidak mengenal program kematian sel (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 (Ramli 2000).

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 mempedulikan 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 (*invasive*), 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.** Obat-obat sitotoksik menimbulkan efek samping yang umum seperti anemia, anoreksia, ansietas, perdarahan, demam, infeksi, insomnia, nyeri, alopesia (rambut rontok). Sehingga penggunaan obat-obat ini seringkali dikombinasi dengan obat-obat lain dengan maksud untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan (Indrawati 2009). Contoh golongan obat kemoterapi yang sering digunakan yaitu Metotreksat (MTX), Fluorurasil, dan Doksorubisin (Tjay & Rahardja 2007).

**3.2. Radioterapi.** Efek samping radioterapi berkaitan dengan beberapa hal: dosis total (*centingray*), lamanya 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 dilakukan untuk mengurangi ukuran tumor, meredakan nyeri, dan mencegah metastasis jika dilakukan sejak dini (Indrawati 2009).

**3.4. Imunoterapi/bioterapi.** Terapi jenis ini bekerja dengan mengaktifkan sistem imun untuk mengenali dan menghancurkan sel tumor secara spesifik,

memblok enzim dan faktor pertumbuhan yang diperlukan untuk metastasis (Corwin 2009).

#### **4. Golongan senyawa kimia pada tanaman yang digunakan dalam terapi kanker**

Senyawa organik bahan alam umumnya terdiri atas metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer merupakan senyawa metabolit yang tersebar luas dan merata pada organ tanaman. Umumnya metabolit primer dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman, seperti karbohidrat, lipid, asam amino, nukleotida. Metabolit sekunder merupakan senyawa metabolit yang dibutuhkan untuk proses metabolisme, regulasi pertumbuhan, memberikan warna pada tanaman, dan sebagai pertahanan tanaman dari gangguan patogen (serangga, jamur, dan bakteri). Metabolit sekunder merupakan hasil produk tanaman dimana kandungan senyawanya digunakan dalam bidang farmasi. Adanya fungsi-fungsi fisiologis ini, metabolit sekunder berpotensi sebagai obat antikanker yang bekerja langsung pada sel kanker dengan memodulasi sehingga akan menghambat pertumbuhan sel kanker. Beberapa komponen metabolit sekunder pada tanaman diantaranya aldehid, alkaloid, glikosida, polifenol, flavonoid, tanin, lignin, fenol, polisakarida, dan terpenoid (Kintzios & Barberaki 2003).

Tanin merupakan salah satu metabolit sekunder yang memiliki aktivitas sebagai antiproliferasi pada sel kanker yang bekerja pada tingkat sel dengan menghambat pada siklus fase "S". Flavonoid memiliki bermacam-macam bioaktivitas seperti antiinflamasi, antidiabetes, antikanker, dan diuretik. Mekanisme kerja flavonoid sebagai senyawa antikanker yaitu efek proliferasi

dengan cara meningkatkan *susceptibility* berupa penghambatan, pengembalian dan menunda hiperproliferasi pada sel kanker. Mekanisme lainnya yaitu dengan penghambatan pada siklus sel terutama pada fase M dan S yang berkaitan dengan proses DNA duplikasi (Rahmawati 2006).

Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang mengandung zat berwarna merah, ungu, biru, dan kuning yang banyak ditemukan dalam tanaman. Flavonoid mempunyai kerangka dasar atom karbon yang terdiri dari 15 atom C, dimana dua cincin benzen ( $C_6$ ) terikat pada suatu rantai propana ( $C_3$ ) sehingga membentuk suatu susunan  $C_6-C_3-C_6$  (Lenny 2006).

## **E. Siklus Sel**

### **1. Tinjauan siklus sel**

Siklus sel merupakan proses perkembangbiakan sel yang memperantarai pertumbuhan dan perkembangan makhluk hidup. Pertumbuhan sel menunjukkan adanya perubahan ukuran sel dan merupakan hasil akhir dari proses-proses yang berpengaruh terhadap kehidupan sel tersebut seperti poliferasi, diferensiasi, dan kematian sel. Sel kanker seringkali dikatakan sebagai sel yang berpoliferasi lebih cepat dibandingkan dengan keadaan normalnya (King 2000). Sel kanker dapat berada dalam tiga keadaan yaitu membelah (siklus proliferasi), dalam keadaan istirahat (tidak membelah), dan secara permanen tidak membelah (Nefrialdi & Gan 2007).

### **2. Fase siklus sel**

Sel kanker yang sedang membelah terdapat dalam 4 fase yaitu :

**2.1. Fase pasca mitosis ( $G_1$ ).** Fase ini dipersiapkan suatu interval dalam proses pembelahan sel dan dimulai dengan sintesis asam deoksiribonukleat (DNA). Pada fase  $G_1$ , sel anak baru berupa untai tunggal DNA yang terbentuk setelah mitosis akan tumbuh menjadi sel dewasa membentuk protein, enzim, dan sebagainya. Sel yang berhenti tumbuh akan masuk ke fase  $G_0$  (Sukardja 2000).

**2.2. Fase sintesis DNA (S).** Fase ini merupakan saat terjadinya replikasi DNA. Dalam fase “S” berlangsung perbaikan DNA yang dapat mencegah berkembangnya generasi kanker. Fase ini berlangsung kira-kira 6-8 jam (Sukardja 2000).

**2.3. Fase pra mitosis ( $G_2$ ).** Sel yang telah masuk dalam fase pra mitosis ini memiliki ciri sel berbentuk tetraploid, mengandung DNA dua kali lebih banyak daripada fase lain dan masih berlangsung sintesis RNA dan protein (Nefrialdi & Gan 2007).

**2.4. Fase mitosis (M).** Saat mitosis berlangsung, sintesis protein dan RNA berkurang secara tiba-tiba, berlangsung pemisahan sel menjadi dua sel anakan dengan sifat dan karakteristik yang sama dengan induknya (Nefrialdi & Gan 2007). Berdasarkan morfologinya proses ini dapat dibagi menjadi 4 subfase yaitu profase, metafase, anafase, dan telofase. Fase ini berlangsung sekitar 30-60 menit (Sukardja 2000).

## F. Kanker Payudara

### 1. Tinjauan sel kanker payudara

Kanker payudara adalah suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali. Kanker payudara merujuk pada pertumbuhan serta perkembangbiakan sel abnormal yang muncul pada jaringan payudara (Shadine 2012). Satu kelompok sel akan membelah secara cepat dan membentuk benjolan atau massa jaringan ekstra, massa ini disebut tumor. Tumor yang bersifat ganas (maligna) atau jinak (benigna). Tumor yang bersifat ganas akan menyusup dan menghancurkan jaringan tubuh yang sehat. Satu kelompok sel dalam sebuah tumor juga dapat pecah dan menyebar ke bagian tubuh lainnya. Sel yang menyebar dari satu bagian tubuh ke bagian tubuh yang lain disebut metastase (Shadine 2012).

Kanker payudara memperlihatkan proliferasi keganasan sel epitel yang membatasi *duktus* dan *lobus* payudara. Sel-sel ini kemudian berlanjut menjadi karsinoma *in situ* dan menginvasi stroma. Kanker membutuhkan waktu 7 tahun untuk tumbuh dari satu sel menjadi massa yang cukup besar untuk dapat dipalpasi (kira-kira berdiameter 1 cm). Pada ukuran itu, sekitar 25% kanker payudara sudah mengalami metastasis (Prince & Wilson 2003).

### 2. Sel T47D

Sel T47D merupakan sel kanker yang mengekspresikan reseptor estrogen (ER) positif serta mengekspresikan *p53* yang telah termutasi sehingga resisten terhadap mekanisme apoptosis (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 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. Sel T47D memiliki mekanisme antiapoptosis dan karsinogenesis lebih kuat daripada sel MCF-7 (Abcam 2007).

### **3. Sel vero**

Sel vero adalah sel epitel non kanker (sel normal). Sel ini diisolasi dari sel ginjal monyet hijau Afrika. Sel vero merupakan sel monolayer yang memiliki bentuk poligonal dan pipih. Tipe sel ini yaitu *immortal, non-tumorigenic fibroblastic cell*. Sel vero juga digunakan untuk mengetahui pengaruh suatu zat, toksin maupun bahan kimia terhadap sel mamalia secara molekular.

Penggunaan sel vero salah satunya untuk pembuatan vaksin dan virus seperti virus rabies dan Reovirus. Kultur sel vero umumnya menggunakan media M199 dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C pada inkubator CO<sub>2</sub> 5%. Sel vero yang merupakan sel normal dapat digunakan sebagai pembanding dalam uji sitotoksik.

Adanya sel vero memudahkan dalam mempelajari perubahan sel yang meliputi pertumbuhan dan morfologinya akibat induksi berbagai senyawa kimia dan sel vero biasa direkomendasikan sebagai sel model dalam mempelajari karsinogenesis secara *in vitro* (Goncalves *et al.* 2006).

## G. Uji Sitotoksisitas

### 1. Tinjauan uji sitotoksisitas

Uji sitotoksisitas merupakan uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi tingkat ketoksikan suatu senyawa. Uji tersebut merupakan uji kuantitatif dengan menetapkan kematian sel. Dasar dari percobaan tersebut antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel (Anggraini 2008).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksik dapat memberikan informasi % sel yang mampu bertahan hidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Meiyanto *et al.* 2003). Rentang nilai  $IC_{50}$  suatu senyawa bila  $< 10 \mu\text{g/mL}$  sangat aktif,  $10\text{-}20 \mu\text{g/mL}$  aktif,  $> 20 \mu\text{g/mL}$  dinyatakan kurang aktif, namun nilai  $IC_{50}$   $50\text{-}100 \mu\text{g/mL}$  tetap memiliki kompensasi terhadap sel kanker (Freshney 2000).

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.

## **2. Uji indeks selektivitas**

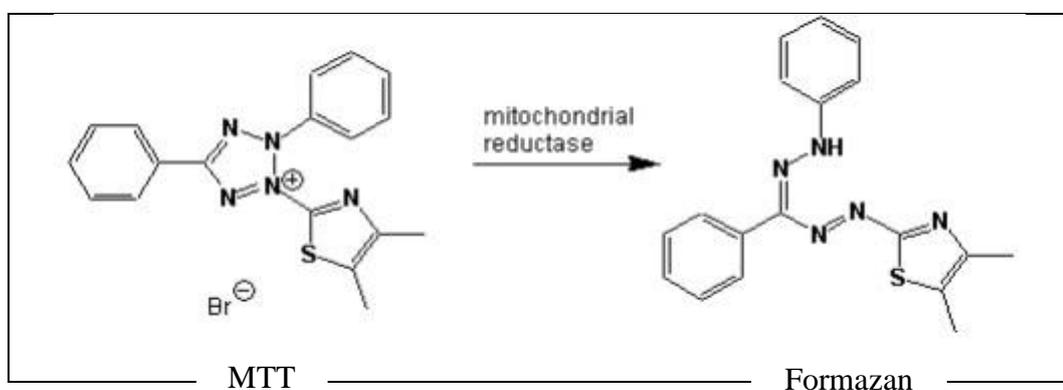
Uji indeks selektivitas digunakan sebagai indikasi selektivitas sitotoksik (tingkat keamanan) dari ekstrak terhadap sel normal (vero), yakni toksik terhadap sel kanker namun tidak toksik terhadap sel normal (Furqan 2014). Nilai indeks selektivitas diperoleh dengan menggunakan metode MTT dari nilai  $IC_{50}$  sampel pada sel normal terhadap  $IC_{50}$  sel kanker. Nilai  $SI \geq 3$  menunjukkan bahwa ekstrak memiliki selektivitas yang tinggi.

## **3. Metode MTT assay**

MTT assay merupakan salah satu metode analisa kolorimetri (pewarnaan) menggunakan pewarna MTT dengan mengukur konsentrasi warna (nilai absorbansi) produk akhir yang terbentuk menggunakan spektrofotometri. Kelebihan metode ini yakni relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Doyle & Griffiths 2000).

Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan (Basmal *et al.* 2009). Metode perubahan warna tersebut digunakan untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Sel yang mengalami proliferasi, mitokondria akan menyerap MTT sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu akibatnya berbentuk kristal tetrazolium (formazan) (Depamede *et al.* 2009).

Prinsip uji MTT adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan kemampuan enzim mitokondria reduktase pada mitokondria dalam mereduksi garam MTT. Ketika bermetabolisme, sel-sel hidup akan menghasilkan enzim mitokondria reduktase. Enzim ini bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel yang hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka jumlah sel yang hidup semakin banyak (Junedi *et al.* 2010). Kristal formazan bersifat *impermeable* pada membran sel dan tidak larut dalam air, sehingga perlu suatu zat tambahan sebagai pelarut seperti isopropanol, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) atau larutan *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% yang diencerkan dalam asam hidroklorida (HCl) untuk melarutkan kristal formazan ungu.



Gambar 2. Reaksi reduksi MTT assay (Wijaya *et al.* 2013)

Kristal formazan yang memberi warna ungu ini kemudian dibaca absorbansinya dengan menggunakan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *Reader* dengan panjang gelombang 500-600 nm (Heti 2008). Penetapan jumlah sel yang hidup pada uji sitotoksik dapat dilakukan berdasarkan adanya

kerusakan membran dengan perhitungan sel, sedangkan perubahan morfologi diketahui dengan menggunakan mikroskop elektron.

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai  $IC_{50}$ , yang menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel dengan nilai standar  $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ . Semakin besar  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin kecil aktivitas sitotoksiknya atau tidak poten.

## **H. Landasan Teori**

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan lainnya. Pertumbuhan tidak terkendali tersebut disebabkan karena adanya kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi di gen pengatur pembelahan sel (Amalina 2008). Kanker payudara merupakan kanker yang menyerang jaringan epitel payudara, yaitu membran mukosa dan kelenjar, sebagian besar terjadi pada wanita.

Metabolit sekunder merupakan senyawa metabolit yang dibutuhkan untuk proses metabolisme, regulasi pertumbuhan, memberikan warna pada tanaman, dan sebagai pertahanan tanaman dari gangguan patogen (serangga, jamur, dan bakteri). Metabolit sekunder merupakan hasil produk tanaman dimana kandungan senyawanya digunakan dalam bidang farmasi. Adanya fungsi-fungsi fisiologis ini, metabolit sekunder berpotensi sebagai obat antikanker yang bekerja langsung pada sel kanker dengan memodulasi sehingga akan menghambat pertumbuhan sel

kanker. Beberapa komponen metabolit sekunder pada tanaman diantaranya aldehid, alkaloid, glikosida, polifenol, flavonoid, lignin, fenol, polisakarida, dan terpenoid (Kintzios & Barberaki 2003).

Penelitian Filbert *et al.* (2014), aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit buah pinang sebesar 8,3  $\mu\text{g/mL}$ , sebagian besar flavonoid diduga mampu menghambat proliferasi pada berbagai sel kanker pada manusia, namun tidak toksik terhadap sel normal manusia (Ren *et al.* 2003). Antioksidan sangat penting dalam menetralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan juga merusak biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat memicu terjadinya penyakit degeneratif seperti kanker. Mekanisme kerja flavonoid sebagai senyawa antikanker yaitu efek proliferasi dengan cara meningkatkan *susceptibility* berupa penghambatan, pengembalian dan menunda hiperproliferasi pada sel kanker. Mekanisme lainnya yaitu dengan penghambatan pada siklus sel terutama pada fase M dan S yang berkaitan dengan proses DNA duplikasi (Rahmawati 2006).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang terhadap sel kanker payudara T47D, serta mengetahui indeks selektivitas ekstrak etanol kulit buah pinang terhadap sel vero. Ekstrak yang digunakan kali ini adalah larutan etanol 96%, yang diharapkan dapat dengan maksimal menyari kandungan aktif dalam kulit buah pinang. Uji MTT dalam penelitian ini dipilih sebagai metode uji sitotoksik dengan parameter yang diukur adalah persen kehidupan sel dan pembentukan kristal formazan.

Sel vero adalah sel epitel non kanker (sel normal). Sel ini diisolasi dari sel ginjal monyet hijau Afrika. Sel vero pada penelitian dapat digunakan untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksisitas dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia. Indeks selektivitas atau *Selectivity Indeks* (SI) menunjukkan selektivitas sitotoksik dari ekstrak terhadap sel normal (sel vero) dibandingkan dengan sel kanker, dihitung dari nilai  $IC_{50}$  sampel pada sel normal terhadap sel kanker. Nilai  $SI \geq 3$  menunjukkan ekstrak atau obat memiliki selektivitas yang tinggi (Prayong *et al.* 2008). Nilai SI menunjukkan selektivitas sampel terhadap sel kanker yang di uji.

Nilai parameter uji sitotoksik ditentukan dengan menghitung nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Rentang nilai  $IC_{50}$  suatu senyawa bila  $> 100 \mu\text{g/mL}$  terhadap sel kanker (Freshney 2000).

## I. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini, yaitu :

1. Ekstrak etanol kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan memiliki nilai  $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ .
2. Fraksi etil asetat kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan memiliki nilai  $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ .

3. Ekstrak etanol kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) memiliki nilai indeks selektivitas terhadap sel kanker dengan sel vero  $\geq 3,00$ .
4. Adanya perbedaan aktivitas sitotoksik antara ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman pinang yang ditanam di Desa Topobali Flores Timur - NTT, dipanen pada bulan Juni 2016.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah pinang yang matang diperoleh dalam kondisi segar, bersih, dan tidak busuk.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan sel vero.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang yang diujikan pada kultur sel kanker payudara T47D dan sel vero dalam berbagai konsentrasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas

sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan sel vero dengan menghitung jumlah sel yang mati.

Variabel terkontrol yaitu variabel yang dianggap berpengaruh, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah sel kanker payudara T47D, kerapatan T47D, suhu, tekanan inkubator, lama inkubasi, kondisi laboratorium, dan peneliti sendiri.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, serbuk kulit buah pinang adalah kulit yang dipisahkan dari daging buahnya, lalu dibersihkan dengan air mengalir sampai terbebas dari kotoran kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40<sup>0</sup>C, lalu digiling dan diayak dengan ayakan *mesh* 40.

Kedua, ekstrak etanol kulit buah pinang adalah ekstrak yang dihasilkan dari penyarian maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dipekatkan di atas *rotary evaporator* pada suhu 50<sup>0</sup>C.

Ketiga, fraksi etil asetat kulit buah pinang adalah hasil fraksinasi dari residu partisi *n*-heksana dan air dengan menggunakan pelarut etil asetat kemudian dipekatkan di atas *rotary evaporator* sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keempat, sel kanker payudara T47D adalah sel kanker payudara T47D yang dikoleksi dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang ditumbuhkan dalam media penumbuh RPMI yang mengandung FBS 10% v/v, penisilin-streptomisin 2% v/v, dan *fungizone* 0,5%.

Kelima, uji sitotoksik merupakan uji *in vitro* dengan kultur sel yang digunakan untuk mengetahui kemampuan suatu senyawa dalam membunuh sel kanker dan metode yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah metode MTT *assay*.

Keenam,  $IC_{50}$  adalah nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Suatu senyawa memiliki aktivitas sitotoksik apabila nilai  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ .

Ketujuh, uji selektivitas dilakukan dengan cara membandingkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol kulit buah pinang dari sel kanker payudara T47D dan nilai  $IC_{50}$  sel vero (normal).

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat untuk pembuatan sampel terdiri dari blender, timbangan digital, oven, ayakan no. 40, bejana maserasi, kertas saring, kain flanel, *beaker glass* 250 mL (pyrex), *beaker glass* 500 mL (pyrex), tabung reaksi (pyrex), evaporator, corong pisah, dan batang pengaduk.

Alat uji sitotoksik meliputi tangki nitrogen cair, *sentrifuge*, autoklaf, incubator  $37^{\circ}\text{C}$  aliran  $\text{CO}_2$  5% model 6200 (Napco), *Laminar air flow class II / biological safety cabinet* (Labconco), spektrokolorimeter pada alat ELISA *reader* (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), tabung konikal steril (Nunclone), *dish* (Nunclone), mikrolate 96 sumuran (Nunclone), lampu ultraviolet, mikropipet 20-200  $\mu\text{L}$  dan 200-1000  $\mu\text{L}$  (Pipetman), *ependrof*, mesin

vortex, neraca elektrik (Sartorius), mikroskop *inverted* (Axiovert-25), *magnetic stirrer*, kamera digital, dan *counter*.

## **2. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan meliputi serbuk kulit buah pinang, etanol 96% (BRATACO), etil asetat, kertas saring, *aquadest*.

Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker payudara: *cell line* T47D; sel vero; media stok: RPMI 1640 (Gibco); media kultur sel: media RPMI 1640 (Gibco), media M199 (Gibson), penisillin-streptomisin (Penstrep) 2% v/v (Gibco), *Fungizone* (Amphoterasin B) 0,5% v/v (Gibco), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco); media pencuci sel: larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,2; sebagai *stopper* *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N; dimetil sulfoksida (DMSO), tripsin 0,5%, MTT 5 mg/mL dalam PBS.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Identifikasi tanaman kulit buah pinang**

Tahap pertama penelitian adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopisnya. Hal ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

### **2. Pengumpulan, pengeringan bahan, dan pembuatan serbuk**

Buah pinang diperoleh dari Desa Topobali Flores Timur - NTT pada bulan Juni 2016. Buah pinang yang digunakan yaitu sudah matang, segar, bersih, dan tidak busuk. Buah pinang yang sudah dipanen, dibelah lalu dipisahkan dari daging

buah, kemudian diambil kulitnya. Kulit buah pinang dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan cemaran.

Kulit buah pinang yang sudah dibersihkan, kemudian dirajang dan dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 40<sup>0</sup>C. Pembuatan serbuk digiling dengan menggunakan mesin penggiling dan diayak dengan menggunakan ayakan *mesh* 40. Serbuk yang diperoleh di simpan dalam wadah kering tertutup rapat dan dilakukan pemeriksaan organoleptis.

### **3. Penetapan susut pengeringan**

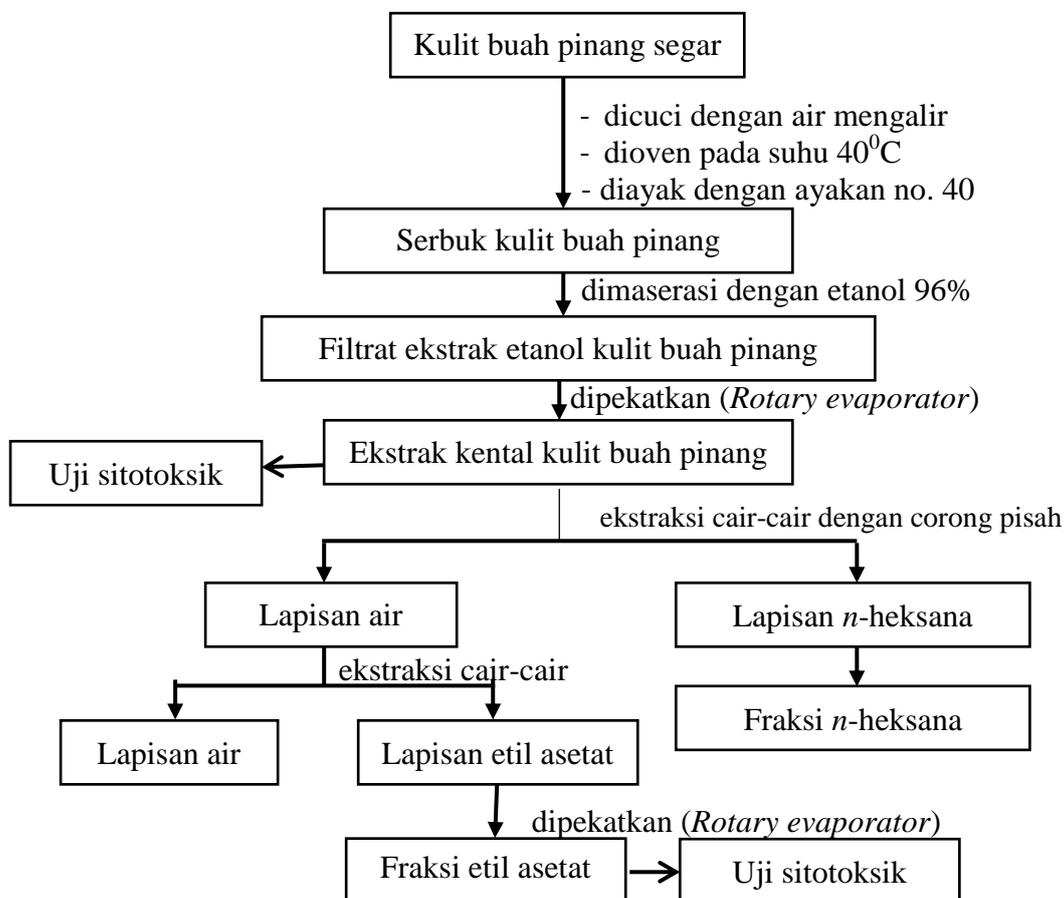
Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan cara serbuk dari kulit buah pinang ditimbang 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan alat *moisture balance* O'haus MB23 pada suhu 105<sup>0</sup>C, waktu yang diperlukan dalam pengukuran adalah selama 30 menit untuk setiap pengukuran sampel, kemudian ditunggu hingga muncul angka dalam persen. Susut pengeringan memenuhi syarat bila kadar air suatu serbuk simplisia <10% (Anonim 1985). Penetapan susut pengeringan dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

### **4. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang**

Serbuk kulit buah pinang ditimbang 500 gram, dimasukkan dalam sebuah bejana kemudian dituangi dengan etanol 96% sebanyak 3750 mL, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil sering diaduk. Maserat disaring dengan kertas saring dan ampasnya dibilas dengan sisa cairan penyari etanol 96% hingga diperoleh 5000 mL. Kemudian dipindahkan ke dalam bejana tertutup, biarkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Disaring

dan filtrat ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, hasilnya disebut ekstrak etanol kulit buah biji pinang. Ekstrak etanol kulit buah pinang selanjutnya dilakukan pemeriksaan organoleptis pada ekstrak.

Ekstrak etanol kulit buah pinang yang sudah dikentalkan dilakukan ekstraksi cair-cair dengan menimbang 20 gram, ditambah dengan pelarut *aquadest* panas 200 mL, kemudian campuran dimasukkan ke dalam corong pisah dan dipartisi dengan pelarut *n*-heksana sebanyak 200 mL dan dikocok dalam corong pisah secara perlahan-lahan sehingga menghindari proses penyabunan. Campuran didiamkan dan ditunggu hingga terjadi pemisahan yang sempurna. Lapisan *n*-heksana dan lapisan air dipisahkan, ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Selanjutnya lapisan air dipartisi lagi dengan pelarut etil asetat sebanyak 200 mL. Lapisan etil asetat dipisahkan dari lapisan air. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Lapisan etil asetat dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh fraksi etil asetat kental. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang (*Areca catechu L.*)

## 5. Pemeriksaan organoleptis ekstrak kulit buah pinang

Pemeriksaan organoleptis pada ekstrak kulit buah pinang meliputi pemeriksaan bentuk serbuk, warna, bau dan rasa. Pemeriksaan ini dilakukan untuk memastikan ekstrak kulit buah pinang.

## 6. Uji bebas alkohol

Tes bebas alkohol ekstrak etanol kulit buah pinang dilakukan dengan cara ekstrak kulit buah pinang ditambah asam asetat encer dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Bila tidak ada bau ester (etil asetat) berarti sudah tidak ada etanol (Depkes 1979).

## **7. Identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak etanol kulit buah pinang**

Identifikasi kandungan senyawa yang terdapat pada serbuk dan ekstrak etanol kulit buah pinang dengan menggunakan pereaksi warna.

**7.1. Identifikasi fenolik.** Sampel dilarutkan dengan pelarut secukupnya lalu ditambahkan dengan beberapa tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau, biru atau ungu (Harborne 1987).

**7.2. Identifikasi tanin.** Sampel secukupnya ditambahkan dengan larutan gelatin yang mengandung NaCl. Hasil positif jika terbentuk endapan (Trease & Evan's 1996).

**7.3. Identifikasi flavonoid.** Sampel dilarutkan dengan pelarut secukupnya, diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1979).

**7.4. Identifikasi alkaloid.** Sampel dilarutkan dengan HCl encer, lalu disaring. Pada pengujian dengan reagen Mayer, hasil positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan kuning, sedangkan dengan menggunakan reagen Dragendorff, hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan warna merah (Tiwari *et al.* 2011).

**7.5. Identifikasi terpenoid.** Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan porselen. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat sebanyak 2 mL kemudian

ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya terpenoid dan bila terbentuk cincin biru kehijauan pada perbatasan larutan menunjukkan adanya steroid (Ciulei 1984).

#### **8. Identifikasi kandungan senyawa secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Untuk mengetahui profil adanya senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid dilakukan identifikasi secara KLT. Prinsip dari KLT yaitu memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi komponen atau senyawa-senyawa yang dibawa oleh fase gerak dan ditahan secara selektif oleh fase diam. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF<sub>254</sub>. Identifikasi kandungan senyawa dengan KLT, dilakukan orientasi fase gerak terlebih dahulu. Fase gerak yang dipilih adalah fase gerak yang dapat memisahkan senyawa dan teramati pada UV 254 nm dan UV 366 nm yaitu fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1) dan fase gerak etil asetat : aseton (2 : 1). Sampel dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya masing-masing, kemudian ditotolkan pada plat silika gel GF<sub>254</sub>. Plat dimasukkan di dalam *chamber* yang berisi fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1). Pengamatan dilakukan pada UV 254 nm dan UV 366 nm untuk mendeteksi bercak komponen senyawa dan dilanjutkan dengan penyemprotan.

Deteksi adanya senyawa flavonoid dilakukan dengan penyemprotan sitroborat dan memberikan hasil positif bila bercak berwarna kuning yang cepat pudar (Depkes 1987). Deteksi alkaloid dengan penyemprotan Dragendorff memberikan hasil positif apabila muncul bercak merah bata (Meiyanto *et al.* 2008). Deteksi adanya senyawa fenolik dilakukan dengan penyemprotan FeCl<sub>3</sub>

dan memberikan hasil positif bila terbentuk warna hitam (Marliana 2007). Deteksi senyawa terpenoid dilakukan dengan menggunakan Lieberman-Burchard dan memberikan hasil positif ditunjukkan terbentuknya warna ungu kemerahan (Harborne 2006).

## 9. Uji sitotoksik

**9.1. Sterilisasi alat.** Alat gelas yang digunakan harus dalam keadaan steril. Alat dicuci dan dikeringkan. Alat-alat kering tersebut dibungkus dengan kertas, kemudian disterilisasi di dalam autoklaf selama 15-30 menit pada suhu 121<sup>0</sup>C.

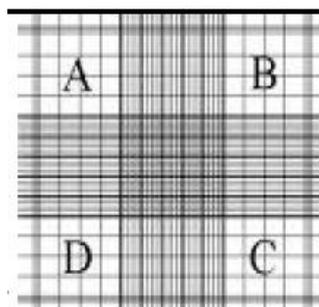
**9.2. Pembuatan media stok RPMI 1640 dan media komplit RPMI 1640.** Media padat RPMI dan 950 mL *aquabidest* disiapkan dalam *beaker glass* 1 L dalam LAF. Media bubuk dituang ke dalam *aquabidest* steril ke dalam *beaker glass* dan diaduk hingga rata. Bagian dalam pembungkus media bubuk dibilas dengan *aquabidest*, cairannya dituang ke dalam *beaker glass* di atas. Sebanyak 2,2 gram NaHCO<sub>3</sub> ditambahkan untuk setiap liter media yang dibuat, dan diaduk rata. *Aquabidest* ditambahkan hingga volume 1 L. Media padat dan NaHCO<sub>3</sub> diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga semua larut. Kemudian dilakukan *adjusting* pH (seharga 0,2-0,3 di bawah pH yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N, lakukan filtrasi media dengan filter 0,2 mikron, tampung ke dalam botol Duran 500 mL, diberi penanda dan disimpan media di kulkas dengan suhu 4<sup>0</sup>C. Pembuatan media komplit RPMI 1640 dibuat dari 100 mL RPMI 1640 *stock* ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak 10%, antibiotika penisillin-streptomisin 2% dan *fungizone* (Amphoteresin) 0,5%.

**9.3. Pembuatan larutan uji.** Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang ditimbang masing-masing 10 mg selanjutnya dilarutkan dengan 100  $\mu$ L DMSO dalam *ependrof*, kemudian disimpan sebagai larutan stok untuk digunakan dalam pengujian. Pembuatan larutan stok maupun seri kadar larutan untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF. Selanjutnya ekstrak etanol kulit buah pinang dibuat dalam variasi konsentrasi (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81)  $\mu$ g/mL. Fraksi etil asetat dibuat dalam variasi konsentrasi (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81)  $\mu$ g/mL. Ekstrak dan fraksi etil asetat masing-masing dipipet sebanyak 100  $\mu$ L ke dalam tiap sumuran dengan 3 kali replikasi untuk tiap variasi konsentrasi.

**9.4. Pengaktifan sel kanker payudara T47D.** Sel yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dalam *water bath* (suhu 37<sup>0</sup>C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Di dalam LAF, sel kanker payudara T47D dimasukkan dalam tabung *sentrifuge* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah media komplet RPMI 1640 dengan FBS 10%. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *dish* kecil (2-3 buah) dan diamati di bawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel. Sel hidup kelihatan bulat, jernih, dan bersinar. Kemudian *dish* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37<sup>0</sup>C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian.

**9.5. Panen dan perhitungan sel.** Media dalam *tissue culture flask* dibuang lalu dicuci dengan PBS kurang lebih 7 mL sebanyak 2 kali. Tripsin ditambahkan

½ dari jumlah PBS. Inkubasi selama 3-5 menit, lalu diamati pelepasan sel dari dasar *dish* dengan mikroskop. Sel dipipet masuk ke *conical* steril, ditambah media penumbuh sebanyak 2-3 mL untuk menghentikan kerja tripsin. Resuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol). Amati keadaan sel di mikroskop. Transfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru, disisakan sedikit di dalam *dish* yang kemudian media kultur ditambahkan 2-3 mL. Sel diambil 10 µL dan dipipetkan ke *haemocytometer*, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted* (mikroskop cahaya) dengan *counter*.



**Gambar 4.** Skema bilik hitung *haemocytometer*

*Haemocytometer* terdiri dari 4 bilik hitung (A, B, C, dan D), tiap bilik hitung terdiri dari 16 kotak. Sel dihitung pada 4 bilik *haemocytometer*, sel yang gelap (mati) dan sel yang berada di batas luar di sebelah kiri dan atas tidak ikut dihitung. Sel di batas kanan dan bawah ikut dihitung. Dihitung jumlah sel per mL dengan rumus :

$$\sum \text{sel/mL} = \frac{\sum \text{sel A} + \sum \text{sel B} + \sum \text{sel C} + \sum \text{sel D}}{4} \times 10^4 \quad (1)$$

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

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung / mL}} \quad (2)$$

Volume panen sel diambil kemudian ditransfer ke konikel baru dan ditambahkan medium sampai total volume yang diperlukan. Jumlah suspensi sel

yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan dihitung untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar  $10^4$  tiap sumuran. Sel didistribusikan ke dalam *microplate* 96 sumuran, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% (37<sup>0</sup>C) selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan.

#### **9.6. Treatment sel kanker T47D (pemberian larutan uji dan MTT).**

Sumuran-sumuran yang berisi sel tersebut ditambahkan 100  $\mu$ L larutan uji yaitu ekstrak etanol kulit buah pinang dan fraksi etil asetat kulit buah pinang yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,90)  $\mu$ g/mL tiap sumuran. Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media komplet RPMI untuk sel kanker T47D. Sebagai kontrol media digunakan hanya larutan uji media komplet RPMI. Kemudian sel tersebut diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media masing-masing sumuran dibuang yaitu dengan cara *plate* dibalikkan 180<sup>0</sup>C di atas tempat buangan kemudian *plate* ditekan untuk meniriskan sisa cairan. Kemudian, ditambahkan 100  $\mu$ L MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37<sup>0</sup>C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu, sedangkan sel yang mati akan memberikan warna kuning. Untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100  $\mu$ L SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasikan semalam pada suhu kamar, kemudian sel dikocok dengan *shaker*

selama 10 menit. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

## 10. Uji selektivitas

**10.1. Pembuatan media komplit untuk sel vero.** Serbuk media M199 dilarutkan dengan *aquabidest* steril kurang lebih 950 mL dalam *beaker glass* 1 L, tambahkan 2,2 gram natrium bikarbonat. Larutan tersebut diaduk dengan *stirrer* sampai larut. Lalu ditambahkan *aquabidest* hingga volume larutan menjadi 1 L. Larutan dapar (1 M NaOH atau 1 M HCl) ditambahkan kedalamnya untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Larutan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon 0,22  $\mu$ m ke dalam botol steril (lakukan di dalam LAF), disimpan dalam lemari es suhu 4<sup>0</sup>C dan diberi label. Hasil ini disebut media M199 *stock*. Pembuatan media penumbuh (M199) dibuat dengan dimasukkan 10 mL FBS, 2 mL antibiotika penisillin-streptomisin dan 0,5 ml *Fungizone* ke dalam botol duran volume 100 mL, kemudian ditambahkan media M199 *stock* sampai 100 mL.

**10.2. Pembuatan larutan uji.** Ekstrak etanol kulit buah pinang ditimbang 10 mg selanjutnya dilarutkan dengan 100  $\mu$ L DMSO dalam *ependrof*, kemudian disimpan sebagai larutan stok untuk digunakan dalam pengujian. Pembuatan larutan stok maupun seri kadar larutan untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF. Selanjutnya ekstrak etanol kulit buah pinang dibuat dalam variasi konsentrasi (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81)  $\mu$ g/mL.

**10.3. Pengaktifan sel vero.** Persiapkan alat dan kondisikan bahan pada suhu ruangan, diambil 10 mL PBS 1x *Room Temperature* (RT) pada tabung

konikel, diambil ampul dari freezer  $-85^{\circ}\text{C}$  (sel vero) atau tangki nitrogen dan dicairkan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , suspensi sel diambil dalam ampul dan dimasukkan tetes demi tetes ke dalam PBS 1x RT yang telah disiapkan. Sentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit, dibuang supernatan dan ditambahkan media M199 dan resuspensi hingga homogen, dipindahkan ke dalam wadah *flask* atau *dish* kultur dan ditambahkan media penumbuh M199 sebanyak 5 mL.

**10.4. Uji indeks selektivitas.** Sel vero ditanam pada *microplate* dengan konsentrasi  $50 \times 10^4$  sel/100  $\mu\text{L}$  dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% agar sel beradaptasi dan menempel di sumuran. Setelah itu medium diganti dengan yang baru kemudian ditambahkan ekstrak pada konsentrasi (2000, 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81)  $\mu\text{g/mL}$  tiap sumuran dengan pelarut DMSO dan diinkubasi pada  $37^{\circ}\text{C}$  di dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS 100  $\mu\text{L}$ . Pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  media kultur M199 dan 10  $\mu\text{L}$  MTT 5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formaan yang berwarna ungu-biru tua. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* (SDS 10% dalam HCl 0,1 N), *plate* dibungkus agar tidak tembus cahaya dan diinkubasi pada suhu kamar dalam ruangan gelap selama semalam. Selanjutnya, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

## E. Analisa Hasil

### 1. Uji sitotoksitas dengan MTT assay

Data yang diperoleh dengan metode MTT adalah hasil absorbansi masing-masing sumuran, kemudian dikonversikan dalam persen viabilitas sel menggunakan persamaan :

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{(\text{absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (3)$$

Kemudian dilakukan perhitungan  $IC_{50}$  dengan menggunakan persamaan regresi linear yang menggambarkan hubungan antara persen (%) viabilitas sel dengan log konsentrasi sampel uji.

$$Y = a + bx \quad (4)$$

Antilog nilai yang diperoleh disebut dengan  $IC_{50}$ .

Keterangan:

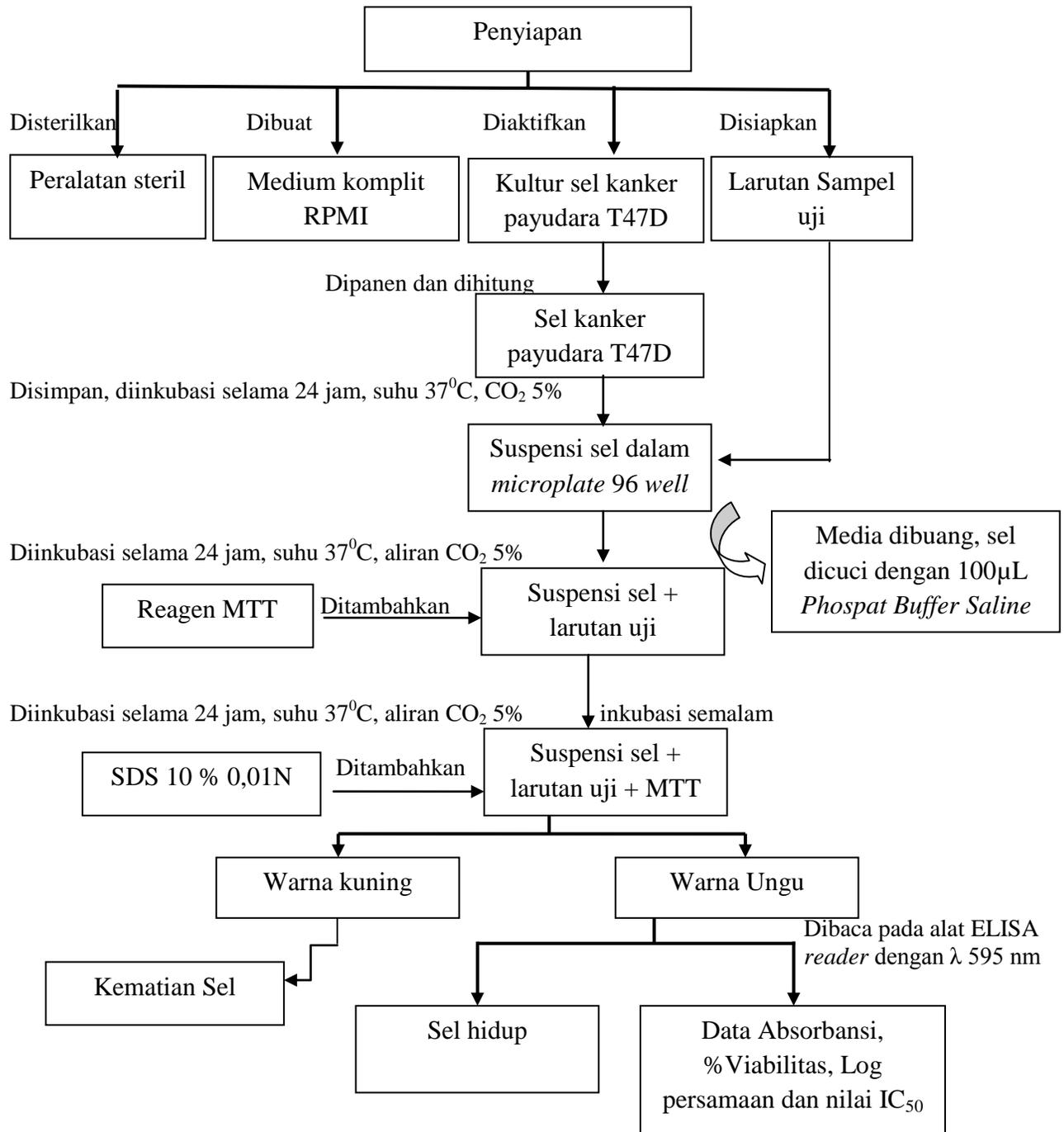
Y : Log konsentrasi sampel uji

X : % viabilitas sel

### 2. Indeks selektivitas

Penentuan selektivitas dilakukan dengan uji sitotoksik terhadap sel kanker T47D dan sel vero dengan metode MTT. Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan di bawah ini:

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ sel vero}}{IC_{50} \text{ sel kanker}} \quad (5)$$



**Gambar 5.** Skema uji sitotoksik ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang (*Areca catechu L.*) terhadap sel kanker payudara T47D

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil Penelitian**

##### **1. Identifikasi tanaman kulit buah pinang**

Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Berdasarkan hasil identifikasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pinang (*Areca catechu* L.). Deskripsi lengkap dari tanaman pinang dapat dilihat pada Lampiran 1.

##### **2. Pengumpulan, pengeringan bahan, dan pembuatan serbuk**

Buah pinang diperoleh dari Desa Topobali Kabupaten Flores Timur – NTT pada bulan Juli 2016 adalah buah pinang yang sudah matang berwarna kuning, segar, bersih, dan tidak busuk. Buah pinang yang sudah dipanen dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan cemaran, kemudian dipisahkan dari daging buah, dan diambil kulitnya. Kemudian dilakukan perajangan untuk memperkecil ukuran sampel yang bertujuan memudahkan dalam proses pengeringan. Proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 40<sup>0</sup>C sampai simplisia kering. Tujuan dari proses pengeringan adalah untuk mencegah terjadinya proses kimiawi yang terjadi dan mencegah kerusakan yang dapat disebabkan adanya bakteri dan jamur pada simplisia.

Data rendemen berat kulit buah pinang kering terhadap kulit buah pinang basah dapat dilihat pada Tabel 1 dan perhitungan lengkap rendemen kulit buah pinang kering dapat dilihat pada Lampiran 3.

**Tabel 1. Hasil rendemen berat kulit buah pinang kering terhadap kulit buah pinang basah.**

<b>Berat basah (g)</b>	<b>Berat kering (g)</b>	<b>Rendemen (%)</b>
1200	650	54,17

Berdasarkan Tabel 1, berat kulit buah pinang basah 1200 gram setelah dikeringkan diperoleh berat kulit buah pinang kering sebanyak 650 gram dan rendemennya 54,17 %. Kulit buah pinang kering yang didapat dilanjutkan proses pembuatan serbuk dengan menggunakan mesin penggiling. Tujuannya adalah untuk memperkecil ukuran partikel sampel dan memperluas permukaan sehingga pada saat proses ekstraksi dapat meningkatkan kontak antara sampel serbuk dengan pelarut. Sehingga zat aktif pada serbuk dapat tertarik dengan maksimal. Serbuk kulit buah pinang yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemeriksaan organoleptis.

**Tabel 2. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk kulit buah pinang**

<b>Organoleptis</b>	<b>Hasil</b>
Bentuk	Serbuk serabut kasar
Warna	Kuning kecoklatan
Bau	Khas pinang
Rasa	Agak sepat

### 3. Hasil penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan pada serbuk kulit buah pinang dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kulit buah pinang dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kulit buah pinang**

<b>Berat awal (g)</b>	<b>Berat akhir (g)</b>	<b>Kadar susut pengeringan (%)</b>
<b>2,02</b>	1,84	8,9
<b>2,03</b>	1,86	8,4
<b>2,03</b>	1,84	9,4
Rata-rata ± SD		8,9± 0,5

Berdasarkan Tabel 3, rata-rata susut pengeringan serbuk kulit buah pinang sebesar 8,9% yang menunjukkan bahwa serbuk kulit buah pinang memenuhi syarat susut pengeringan yaitu kadar air <10% yang berarti telah berkurang atau berhentinya suatu proses enzimatis dalam suatu sampel sehingga tidak memungkinkan terjadi proses pembusukan yang dapat merusak simplisia (Anonim 1985).

#### **4. Hasil pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang**

Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi. Pembuatan ekstrak etanol kulit buah pinang menggunakan metode maserasi. Serbuk yang digunakan sebanyak 500 gram dan pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Dengan menggunakan pelarut etanol yang bersifat *universal* dalam proses maserasi diharapkan dapat menarik sebagian besar senyawa aktif dari simplisia kulit buah pinang. Berdasarkan penelitian Mokoginta (2013), pada ekstraksi kulit biji pinang dengan metode sokletasi kandungan flavonoidnya sangat rendah, hal ini dikarenakan proses pemanasan. Pengurangan kadar flavonoid ini disebabkan karena adanya proses oksidasi, sehingga metode maserasi ini diharapkan dapat menarik senyawa aktif yang lebih banyak. Data rendemen ekstrak kulit buah pinang dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Hasil perhitungan rendemen ekstrak kulit buah pinang**

<b>Berat serbuk (g)</b>	<b>Berat ekstrak (g)</b>	<b>Rendemen (%)</b>
500	31,74	6,35

Ekstrak kental kulit buah pinang yang diperoleh sebanyak 31,74 gram dan rendemen ekstrak yang didapat sebesar 6,35%. Perhitungan rendemen ekstrak kulit buah pinang dapat dilihat pada Lampiran 3. Data hasil pemeriksaan organoleptis dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol kulit buah pinang**

<b>Organoleptis</b>	<b>Hasil</b>
Bentuk	Ekstrak kental
Warna	Hijau pekat, kecoklatan
Bau	Khas pinang

Ekstrak kental kulit buah pinang yang didapat kemudian dilakukan ekstraksi cair-cair dengan menggunakan corong pisah. Hasil fraksinasi etil asetat yaitu sebanyak 3,28 gram dan rendemen sebesar 10,32 %.

### **5. Hasil uji bebas etanol**

Ekstrak etanol kulit buah pinang dilakukan tes bebas etanol dengan menggunakan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat kemudian dipanaskan. Hasil uji bebas etanol yang dilakukan menunjukkan tidak adanya bau ester (etil asetat), yang berarti sudah tidak ada pelarut etanol dalam ekstrak (Depkes 1979).

### **6. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak etanol kulit buah pinang**

Hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak kulit buah pinang dengan menggunakan pereaksi warna dengan melihatnya adanya

perubahan warna atau terbentuknya endapan. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak kulit buah pinang**

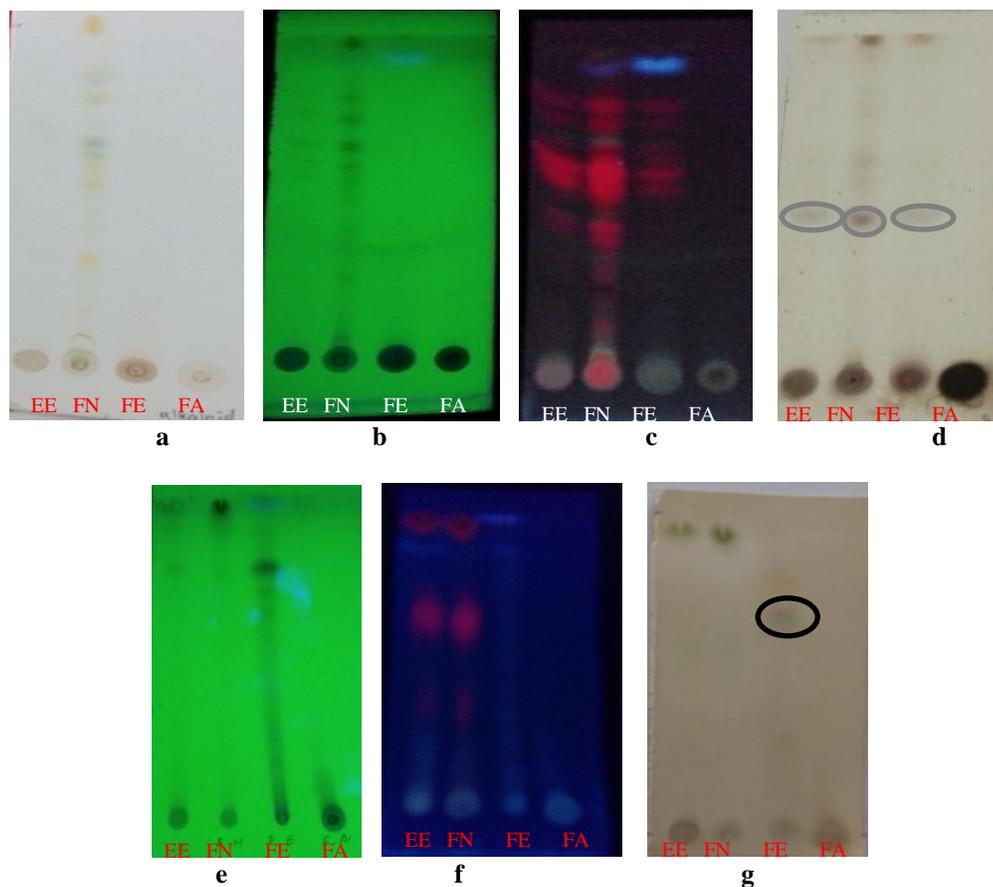
<b>Senyawa</b>	<b>Hasil identifikasi</b>	<b>Pustaka</b>	<b>Interpretasi hasil</b>
Fenolik	Warna hijau	Warna hijau, biru atau ungu (Harborne 1987)	+
Tanin	Terbentuk endapan	Terbentuk endapan (Trease & Evan 1996)	+
Flavonoid	Warna merah	Warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1979)	+
Alkaloid (Reagen Mayer) (Dragendorff)	Larutan kuning Endapan merah	Endapan kuning Endapan warna merah (Tiwari <i>et al.</i> 2011)	+
Terpenoid	Cincin coklat	Cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan (terpenoid)	+

Berdasarkan Tabel 6, hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak kulit buah pinang menunjukkan positif mengandung fenolik, tanin, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan steroid. Hasil identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak kulit buah pinang dapat dilihat pada Lampiran 4.

## **7. Hasil identifikasi kandungan senyawa secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Identifikasi kandungan senyawa pada ekstrak dan fraksi dilakukan pengujian secara (KLT). Berdasarkan hasil optimasi, fase gerak yang digunakan adalah toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1) dan etil asetat : aseton (2 : 1), fase diam adalah silika gel GF<sub>254</sub>. Setelah dideteksi di bawah sinar UV 254 dan UV 366 dilakukan penyemprotan dengan masing-masing pereaksi. Deteksi komponen

senyawa dilakukan dengan pengamatan pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm serta dengan menggunakan pereaksi semprot secara khusus untuk senyawa tertentu dilihat warna pada bercak yang muncul. Hasil identifikasi KLT dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6.** a) Sebelum penyemprotan, b) Deteksi pada sinar UV 254 nm, c) Deteksi pada sinar UV 366 nm, d) Setelah penyemprotan Lieberman-Burchard, e) Deteksi pada sinar UV 254 nm (etil : aseton = 2 : 1), f) Setelah penyemprotan  $\text{FeCl}_3$

Keterangan : EE : ekstrak etanol kulit buah pinang

FN : fraksi *n*-heksana kulit buah pinang

FE : fraksi etil asetat kulit buah pinang

FA : fraksi air kulit buah pinang

**Tabel 7. Hasil identifikasi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat secara KLT**

Kandungan senyawa	Fase gerak	Rf		Setelah penyemprotan	
		Ekstrak	Fraksi etil asetat	Ekstrak	Fraksi etil asetat
Fenolik		-	-	-	-
Flavonoid	Toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1)	-	-	-	-
Alkaloid		-	-	-	-
Terpenoid		0,50	0,45	Ungu	Ungu
Fenolik		-	0,72	Hitam	Hitam
Flavonoid	etil asetat : aseton (2 : 1)	-	-	-	-
Alkaloid		-	-	-	-
Terpenoid		-	-	-	-

Berdasarkan Gambar 6, hasil yang didapatkan untuk fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1) setelah penyemprotan dengan Lieberman-Buarchard menunjukkan hasil positif mengandung senyawa terpenoid, karena bercak yang muncul berwarna ungu kemerahan baik pada ekstrak, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat. Pada ekstrak terdapat senyawa terpenoid dikarenakan sifat dari terpenoid yaitu non polar sehingga lebih mudah larut pada pelarut etanol, sedangkan pada fraksi etil asetat diduga ada sisa senyawa terpenoid dari fraksi sebelumnya dengan pelarut nonpolar (*n*-heksana) yang ikut tertarik oleh pelarut etil asetat. Pada penyemprotan dengan pereaksi sitroborat, Dragendorff, dan FeCl<sub>3</sub> warna pada bercak tidak terlihat dengan jelas. Pengamatan dengan UV 254 nm tidak terlihat dengan jelas bercak yang nampak pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, sedangkan pada UV 366 nm terlihat bercak yang berpendar berwarna merah yang diduga kemungkinan adanya klorofil yang terdapat pada kulit buah pinang larut dalam etanol, *n*-heksana, dan etil asetat. Pemeriksaan kandungan senyawa

fenolik menggunakan fase gerak etil asetat : aseton (2 : 1) dan fase diam silika gel GF254, pereaksi untuk deteksi bercak yang dipakai adalah  $\text{FeCl}_3$  terdapat bercak berwarna hitam pada fraksi etil asetat yang menunjukkan positif mengandung senyawa fenolik, hal ini diduga karena senyawa fenolik yang bersifat semi polar cenderung larut dalam pelarut semi polar yaitu etil asetat. Bercak yang terbentuk setelah penyemprotan kemudian dihitung nilai Rf. Perhitungan Rf adalah perbandingan antara Rf senyawa dibagi dengan Rf eluen.

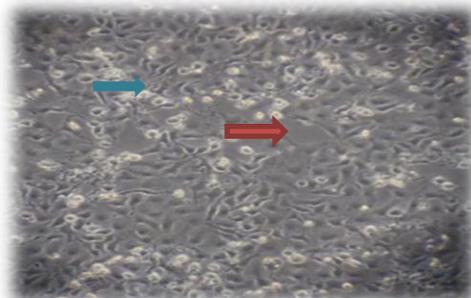
Berdasarkan Tabel 7, hasil identifikasi ekstrak dan fraksi etil asetat untuk fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1) nilai Rf dari ekstrak sebesar 0,50 cm dan fraksi etil asetat sebesar 0,45 cm. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak dan fraksi etil asetat kemungkinan memiliki kandungan senyawa yang sama yaitu terpenoid. Pemeriksaan kandungan senyawa fenolik menggunakan fase gerak etil asetat : aseton (2 : 1) dilihat pada  $\text{UV}_{254}$  menunjukkan adanya peredaman, kemudian setelah di semprot dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  muncul bercak berwarna hitam dan didapatkan nilai Rf 0,72. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa fenolik dinyatakan positif.

#### **8. Hasil uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D**

Uji sitotoksik pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ketoksikan ekstrak dan fraksi etil asetat kulit buah pinang terhadap kultur sel kanker payudara. Kultur sel kanker payudara yang dipakai dalam penelitian ini adalah sel T47D koleksi dari Laboraturium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan

parameter nilai  $IC_{50}$  yang dilakukan dengan metode *MTT assay*, dimana nilai  $IC_{50}$  ditunjukkan dengan nilai konsentrasi yang dihasilkan dari hambatan 50% sel dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

Sebelum perlakuan, dilakukan persiapan terhadap kultur sel. Sel T47D ditumbuhkan dalam medium RPMI. Jumlah sel yang telah konfluen terlihat menempel rapat di dasar *flask*. Media kultur sel dibuang untuk memudahkan pemanenan dan perhitungan sel, kemudian ditambahkan dengan 100  $\mu$ L tripsin agar sel lepas dari *flask*. Morfologi sel T47D yang lepas dari dasar *flask* akan terlihat berbentuk bulat (Gambar 7).



**Gambar 7. Morfologi sel T47D setelah pemberian tripsin (→ sel T47D normal, → sel T47D mengalami perubahan morfologi)**

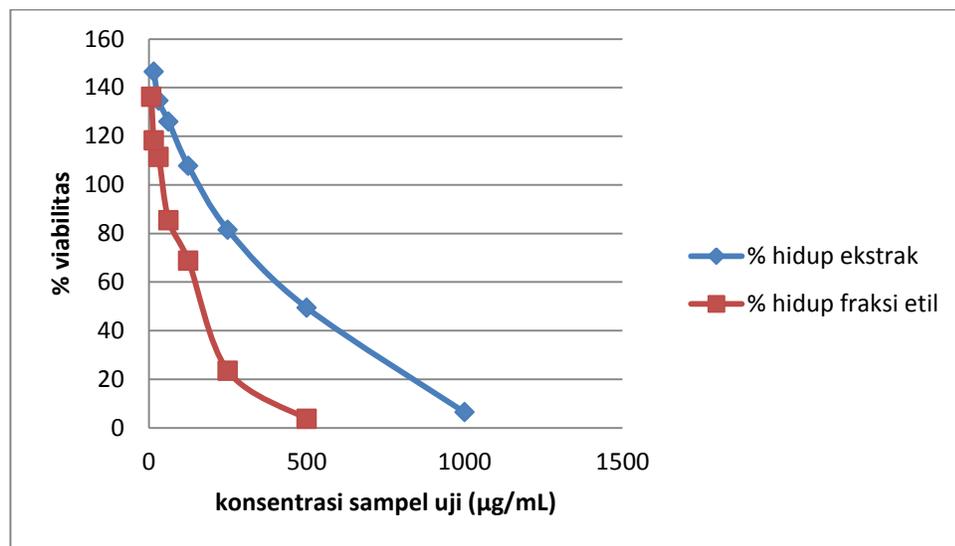
Sebelum pemberian tripsin pada sel terlebih dahulu dilakukan pencucian dengan PBS yang berfungsi untuk menghilangkan kandungan zat dalam media RPMI yang tertinggal, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin (Maulana 2010). Pemberian tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi 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). Pada penelitian ini jumlah sel

kanker hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur adalah  $101,75 \times 10^4$  sel. Selanjutnya dilakukan pengenceran suspensi untuk mendapatkan konsentrasi sel kanker payudara T47D untuk 96 sumuran dimana tiap sumuran sebanyak 100  $\mu\text{L}$ /sumuran, sehingga total suspensi yang digunakan adalah 0,98 mL.

Sebanyak 10 mg ekstrak kental dilarutkan dengan 100  $\mu\text{L}$  DMSO dalam ependrof. DMSO berfungsi sebagai *buffer* agar ekstrak dapat larut dengan baik. Pelarut DMSO (dimetil sulfoksida) dengan rumus kimia  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  digunakan untuk membuat larutan uji sampel karena DMSO telah digunakan secara luas untuk melarutkan senyawa polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik. Selanjutnya ekstrak dan fraksi etil asetat dibuat seri konsentrasi (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81)  $\mu\text{g/mL}$ . Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui signifikansi peningkatan konsentrasi dengan efek proliferasi sel yang dihasilkan. MTT dengan enzim mitokondria reduktase yang terdapat pada sel dihentikan dengan penambahan SDS karena reaksi antara MTT dengan enzim reduktase suksinat tetrazolium merupakan reaksi enzimatik yang berlangsung berkelanjutan sehingga diperlukan *stopper*. SDS berfungsi sebagai detergen yang dapat melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein (Maulana *et al.* 2010). Kristal formazan yang terbentuk pada sel yang hidup akan memberikan warna ungu yang dimana warna ungu tersebut akan bertambah pekat dengan menurunnya konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi tertinggi menunjukkan warna kuning, hal ini mengindikasikan tidak adanya sel kanker yang hidup pada konsentrasi 1000

$\mu\text{g/mL}$ . Namun konsentrasi selanjutnya yang lebih rendah menunjukkan peningkatan intensitas warna ungu.

Kristal formazan ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya dan disajikan dalam bentuk grafik % viabilitas sel dengan konsentrasi sampel uji (Gambar 8).



**Gambar 8. Grafik hubungan % viabilitas hidup dengan konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang**

Berdasarkan Gambar 8, grafik di atas dapat dilihat semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang maka semakin kecil persen kehidupan sel (% viabilitas). Hal ini menunjukkan pada konsentrasi tinggi ekstrak dan fraksi etil asetat mampu menghambat pertumbuhan sel kanker T47D. Perhitungan nilai  $IC_{50}$  dengan menggunakan persamaan regresi linear  $y = a + bx$ . Kemudian nilai  $IC_{50}$  dihitung dimana antilog  $x$  adalah nilai  $IC_{50}$ .

**Tabel 8. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang terhadap sel T47D**

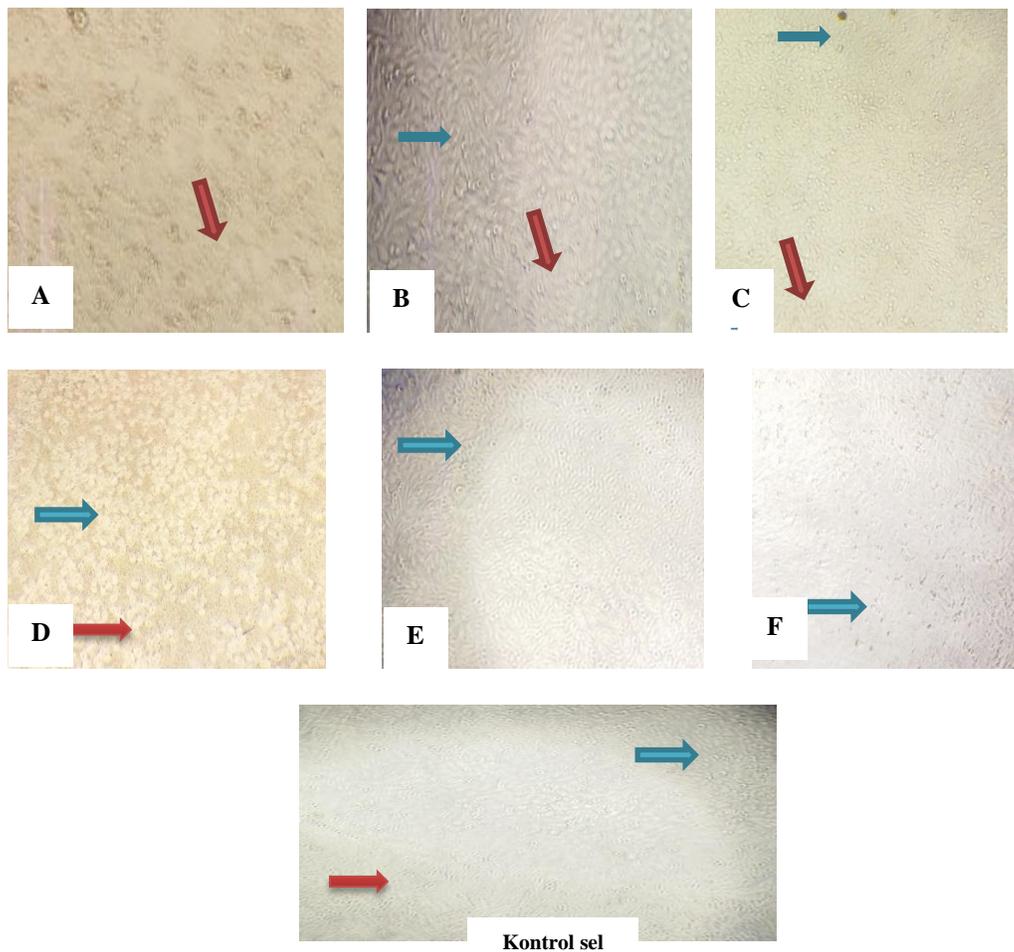
Perlakuan	Persamaan garis	R	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Ekstrak etanol	$y = -75,381x + 251,24$	0,934	467,346
Etil asetat	$y = -74,673x + 234,73$	0,960	297,751

Pada Tabel 8, diketahui persamaan linear yang didapatkan dari ekstrak etanol kulit buah pinang  $y = -75.381x + 251.24$  dan nilai  $r = 0.934$ . Nilai IC<sub>50</sub> dihitung dengan memasukkan nilai  $y$  sebesar 50% sehingga diperoleh nilai IC<sub>50</sub> 467,346 µg/mL. Pada perlakuan fraksi etil asetat didapatkan persamaan  $y = -74.673x + 234.73$  dan nilai  $r = 0.960$ . Nilai IC<sub>50</sub> dari fraksi etil asetat adalah 297,751 µg/mL.

Semakin besar nilai IC<sub>50</sub> maka senyawa tersebut semakin kecil aktivitas sitotoksiknya atau tidak poten. Suatu senyawa dikatakan poten jika nilai IC<sub>50</sub> < 100 µg/mL (Freshney 2000). Berdasarkan kriteria tersebut kelompok perlakuan ekstrak dan fraksi etil asetat tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel kanker payudara T47D. Pada penelitian sebelumnya oleh Meiyanto (2007) pengujian sitotoksik ekstrak etanol biji pinang terhadap sel kanker T47D didapatkan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 50 µg/mL yang berarti ekstrak tersebut memiliki aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel kanker. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan biji pinang lebih baik dibandingkan kulit buah pinang dalam penghambatan sitotoksik terhadap sel kanker.

Berdasarkan pengamatan pada *microplate* terlihat hasil yang memberikan warna kuning (sel mati) adanya penghambatan pertumbuhan sel setelah pemberian

MTT untuk ekstrak etanol kulit buah pinang hanya terdapat pada konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dan 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Warna ungu menunjukkan terbentuknya kristal formazan akibat adanya reaksi antara enzim *mitokondria reduktase* yang dihasilkan oleh sel yang hidup dengan garam MTT.



**Gambar 9.** Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian sampel uji. Keterangan: (A) Ekstrak etanol konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (B) Ekstrak etanol konsentrasi 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (C) Ekstrak etanol konsentrasi 15,63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (D) Fraksi etil asetat konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (E) Fraksi etil asetat konsentrasi 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (F) Fraksi etil asetat konsentrasi 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . ( $\Rightarrow$  sel hidup,  $\Rightarrow$  sel mati).

Berdasarkan Gambar 9, dapat dilihat gambaran morfologi pola penyebaran sel kanker payudara T47D. Pada perlakuan dengan konsentrasi tinggi menunjukkan bahwa penyebaran sel kanker yang hidup lebih sedikit dibandingkan dengan konsentrasi yang rendah. Hal ini menunjukkan ekstrak dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas terhadap penghambatan sel kanker. Adanya penghambatan terhadap sel kanker ini membuktikan bahwa ada kandungan senyawa tertentu yang terdapat dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang yang memiliki aktivitas sitotoksik. Penelitian Yenjit (2010), kandungan senyawa yang terdapat pada kulit buah pinang dari hasil ekstraksi menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan metanol pada pengujian secara *in vitro*, kulit buah pinang mengandung senyawa terpenoid. Mekanisme kerja dari senyawa terpenoid terhadap sel kanker dapat memblok siklus sel pada fase G<sub>2</sub> dengan menstabilkan benang-benang spindel pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat dan mampu menghambat enzim topoisomerase pada sel mamalia. Enzim topoisomerase tipe I dan tipe II pada sel berperan dalam memotong dan memecahkan untai tunggal dan ganda dari DNA sehingga terjadi kerusakan DNA dan menyebabkan terekspresinya protein proapoptosis yang dapat memacu terjadinya apoptosis (Miranti 2014).

Selain senyawa terpenoid yang terkandung dalam kulit buah pinang, terdapat pula senyawa lain seperti flavonoid dan fenolik. Hal ini dibuktikan pada pengujian identifikasi kualitatif memberikan hasil positif pada kandungan senyawa flavonoid, fenolik, alkaloid, tanin, dan terpenoid. Pada identifikasi fraksi etil asetat

dengan metode KLT ditemukan adanya senyawa flavonoid, fenolik dalam jumlah yang kecil. Berdasarkan penelitian Iqroma (2014) senyawa flavonoid yang terkandung pada kulit buah pinang sebesar 2,57 mg/kg dan total kandungan fenolik yang terdapat pada ekstrak kulit buah pinang yaitu 3,16 mg/kg (Ismail 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Mamonto *et al.* (2014), kulit buah pinang mengandung senyawa flavonoid. Sebagian besar senyawa flavonoid dan fenolik diduga mampu menghambat proliferasi pada berbagai sel kanker pada manusia (Ren *et al.* 2003), selain itu flavonoid berperan dalam proliferasi dengan cara meningkatkan *susceptibility* berupa penghambatan, pengembalian dan menunda hiperproliferasi pada sel kanker. Pada penelitian Sobia *et al.* (2013) flavonoid berperan sebagai inhibitor enzim DNA topoisomerase yang berfungsi sebagai pengontrol topologi DNA, dengan adanya inhibitor mengakibatkan kerusakan DNA sel kanker, selanjutnya berpengaruh terhadap proses dalam sel khususnya proses replikasi, serta diakhiri dengan proses kematian sel.

Pada penelitian ini selain untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat juga mencari keefektivitas yang paling baik diantara keduanya. Untuk itu perlu dilakukan analisis menggunakan SPSS dengan uji *Independent T-Test* yang bertujuan untuk membandingkan rata-rata dari dua grup yang tidak berhubungan satu dengan yang lainnya dengan melihat parameter nilai signifikannya. Hasil analisa yang diperoleh nilai signifikansi  $0,939 > 0,05$  yang artinya tidak ada perbedaan yang signifikan diantara keduanya. Hasil uji analisis *Independent T-test* dapat dilihat pada Lampiran 15.

## 9. Uji indeks selektivitas ekstrak etanol kulit buah pinang

Pengujian ekstrak etanol kulit buah pinang pada sel vero dilakukan untuk menghitung indeks selektivitas. Indeks selektivitas mengindikasikan selektivitas sitotoksik (keamanan) dari ekstrak terhadap sel kanker *versus* sel normal, yang dihitung dengan membandingkan  $IC_{50}$  ekstrak terhadap sel vero (normal) dan  $IC_{50}$  ekstrak terhadap sel kanker T47D). Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol terhadap sel vero adalah 204,215  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak terhadap sel T47D adalah 467,346  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai indeks selektivitas ekstrak terhadap sel vero dan sel T47D adalah 0,437. Suatu ekstrak dikatakan bersifat selektif apabila memiliki indeks selektivitas  $\geq 3$  (Rahmawati *et al.* 2016). Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang tidak selektif karena menyerang sel normal. Hal ini dapat disebabkan karena pada sampel yang diujikan masih dalam bentuk ekstrak dimana masih terkandung senyawa yang kompleks, sehingga kemungkinan ada senyawa yang bekerja tidak selektif terhadap sel normal.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

1. Ekstrak etanol kulit buah pinang menunjukkan efek sitotoksik yang kurang poten terhadap sel kanker payudara T47D, dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 467,346  $\mu\text{g/mL}$ .
2. Fraksi etil asetat kulit buah pinang tidak menunjukkan efek sitotoksik yang kurang poten terhadap sel kanker payudara T47D, dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 297,751  $\mu\text{g/mL}$ .
3. Nilai indeks selektivitas ekstrak etanol kulit buah pinang terhadap sel kanker T47D dengan sel vero sebesar 0,437.
4. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit buah pinang keduanya menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan dalam menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel kanker T47D.

#### **B. Saran**

1. Perlu dilakukan pemisahan senyawa dengan metode ekstraksi yang lain untuk menemukan senyawa atau isolat yang memiliki aktivitas sitotoksik.
2. Perlu dilakukan pengujian aktivitas farmakologi yang lain dengan menggunakan kulit buah pinang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abcam. 2007. T47D (human ductal breast epithelial tumor cell line) whole cell lysate. <http://www.abcam.com/T47D-Human-ductal-breast-epithelial-tumor-cell-line-Whole-Cell-Lysate-ab14899.html>. [28 Februari 2016].
- Agoes A. 2010. *Tanaman Obat Indonesia*. Buku 1. Jakarta: Salemba Medica.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Ed ke-4. Farida Ibrahim, penerjemah. Jakarta: UI Press.
- A'yun Q. 2010. Uji sitotoksitas ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap sel leukimia (L1210) secara *in vitro*. [Abstrak]. Jakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- CCRC. 2009. *Protokol Uji sitotoksik*. CCRC Fakultas Farmasi UGM. <http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/protokol>. [26 Februari 2016]
- CCRC. 2009. *Protokol Pembuatan Media Kultur*. CCRC Fakultas Farmasi UGM. <http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/protokol>. [26 Februari 2016].
- Corwin JE. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Jakarta : EGC. hlm 636-637
- Da'i M, Meiyanto E, Supardjan AM. 2004. Efek antiproliferatif *pentagamavunon-0* terhadap sel myeloma. Yogyakarta: Program Studi Farmasi. Universitas Gadjah Mada.
- Dalimartha S. 2007. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Kanker*. Jakarta: Penebar Swadaya
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Materia Medika Jilid III*. Jakarta: Depkes RI.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Depkes RI.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Depkes RI.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*. Jilid II. Jakarta: Depkes RI. hlm 311-312.
- Djajanegara I, Prio W. 2009. Pemakaian sel HeLa dalam uji sitotoksitas fraksi kloroform dan ekstrak etanol daun *Annona squamosa*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*
- Depamede SN, Rosyidi A. 2009. Penghambatan proliferasi limfosit mencit Balb/C oleh ekstrak testis sapi. Bali: Peran TGF- $\beta$ . Media peternakan..
- Dipiro TJ, Wells GB, Schwinghammer LT, Dipiro VC. 2012. *Pharmacotherapy Handbook*. Ed ke-9. United States of America: The McGraw-Hill Companies.

- Doyle A, Griffiths JB. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York: John Willey and Sons Ltd.
- Filbert, Koleangana SJ, Runtuwenea RJ, Kamu VS. 2014. Penentuan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak metanol dan fraksi hasil partisinya pada kulit biji pinang yaki (*Areca vestiaria* Giseke). *Jurnal Mipa Unsrat*. (3) 2: 149-154.
- Franks LM dan Teich N.M. 1998. *Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Third edition. New York: *Oxford University Press Inc*. hlm 4-19.
- Freshney, R. 2000. *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique*. New York : John Willey & sonc. Inc Publication.
- Furqan M. 2014. Uji antikanker kombinasi ekstrak etil asetat daun pugontano (*Picria fel-terrae* Lour.) dengan doksorubisin terhadap sel kanker payudara secara *in vitro* [Tesis]. Medan: Fakultas Farmasi, Universitas Sumatra Utara.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokomia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Ed ke-2. Padmawinata K dan Soediro I, penerjemah; Bandung: Penerbit ITB.
- Herlina W *et al*. 2011. *Kitab Tanaman Obat Nusantara*. Yogyakarta: Medperss. hlm 271-276.
- Heti D. 2008. Uji sitotoksik ekstrak etanol 70% herba Sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* P.) terhadap sel T47D [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [IARC] International agency for research on cancer, WHO. 2012. *GLOBOCAN: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*.
- Indrawati, M., 2009. *Bahaya Kanker bagi Wanita dan Pria*. Cetakan pertama. Jakarta: Pendidikan untuk Kehidupan.
- Ismail J, Runtuwene M.R.J, Fatimah F. 2012. Penentuan total fenolik dan uji aktivitas antioksidan pada biji dan kulit buah pinang yaki (*Areca vestiaria* Giseke). *Jurnal Ilmiah Sains*. 12 (2): 84-88.
- Junedi S, Susidarti RA, Meiyanto E. 2010. Naringenin meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada sel kanker payudara T47D melalui induksi apoptosis. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Volume 8: hlm 87-92.
- Katzung BG. 1997. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Ed ke-6. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: hlm 737-741.
- Khanbabae K, Ree TV. 2001. *Tannins Classification And Definition*. *Nat Prod Rep*. 18: 641.
- King JB. 2000. *Cancer Biology*. 2<sup>nd</sup> edition. London: Pearson Educated Limited

- Mokoginta E., Runtuwene M., Frenly. 2013. Pengaruh metode ekstraksi terhadap aktivitas penangkal radikal bebas ekstrak methanol kulit biji pinang yaki. *Pharmacon. Jurnal Ilmiah Farmasi* Volume 2; Nomor 04. UNSRAT.
- Kintzios SE dan Barberaki MG. 2005. *Plant That Fight Cancer*. United States of America : CRC Press LLC.
- Mamonto SI, Runtuwene MR, Wehantouw F. 2014. Aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji buah pinang yaki (*Areca vestiaria* Giseke) yang di ekstraksi secara soklet. *Pharmacon: Jurnal Ilmiah Farmasi*. UNSRAT.
- Meiyanto E. 2008. Ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca cathecu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*. Volume 3; hlm 263-272.
- Nefrialdi, Sulistia G. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Ed ke-5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. Jakarta: Badan Penerbit FKUI. hlm 732-739.
- Prince SA, Wilson LM. 2003. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Volume ke-2. Hartono H, Susi N, Wulansari P, Mahanani DA, penerjemah; Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Pathophysiology Clinical Concepts of Disease Processes*.
- Ramli M. 2000. *Kanker Tiroid Penatalaksanaan Diagnosis dan Terapi*. Dalam: Ramli H., Umbas R., & Danogoro S. 2000. *Deteksi Dini Kanker*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jilid III. hlm 149.
- Ren Q *et al.* 2003. Flavonoid: Promising anticancer agent. *Med Research Rev* 23: 519-532.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Padmawinata K, penerjemah; Bandung: ITB Bandung. Terjemahan dari : *The Organic Constituen of Higher Plant*. hlm 157.
- Satolom C, Runtuwene M, Abidjulu J. 2015. Isolasi senyawa flavonoid pada biji pinang yaki (*Areca vestiaria* giseke). Manado: Jurusan Kimia. Unstrat.
- Shadine M. 2012. *Penyakit Wanita Pencegahan, Deteksi Dini & Pengobatan*. Yogyakarta: Citra Pustaka.
- Simanjuntak. 2008. Ekstraksi dan fraksinasi komponen ekstrak daun tumbuhan senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) [Skripsi]. Medan: Fakultas Farmasi, Universitas Sumatra Utara.
- Sobia N, Yamin B, Muhammad Z, Waheed A. 2013. Anticancer investigation on *Carissa opaca* and *Toona ciliate* extrac against human breast carcinoma cell lines. Volume 26. hlm 1009-1012.
- Soeksmanto AY, Hapsari, Simanjuntak P. 2007. Kandungan antioksidan pada beberapa bagian tanaman mahkota dewa. *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. (Thymelaceae). *Biodiversitas*.

- Sukardja DG. 2000. *Onkologi Klinik*. Ed ke-2. Surabaya: Airlangga University Press.
- Sutio R. 2015. Aktivitas fraksi *n*-heksan buah takokak (*Solanum torvum* Swartz) terhadap gambaran histopatologi dan jumlah mikroglia otak tikus model *multiple Sclerosis* [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta.
- Tan H, Rahardja K. 2006. *Obat-Obat Penting*. Ed ke-6. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Trease GE, Evan WC. 1996. *Pharmacognosy*. 14<sup>th</sup> edition. London: Sauders, Company.
- Ueda JY *et al.* 2002. Atiproliferative activity of Vietnamese medical plants. *Biology pharm.*
- Voigt R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Ed ke-5. Soewandhi SN, Widiyanto MB, penerjemah; Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. Terjemahan dari : *Lehrbuchder Pharmazeutischen Technologie*.
- Xing Z, Jiao W, Zhuang H, Wenli M. 2010. Antioxidant and cytotoxic phenolic compounds of areca nut (*Areca catechu* L.). *Chem. Res Chinese universities* 2010, 26(1), 161—164. China: *Academy of tropical Agricultural Sciences*.

## Lampiran 1. Surat keterangan hasil identifikasi tanaman



**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: 563/A.E-I/LAB.BIO/VI/2016

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

Nama : Nabila Karsan  
 NIM : 18144360 A  
 Fakultas : Farmasi  
 Perguruan Tinggi : Universitas Setia Budi  
 Menyatakan bahwa mahasiswa tersebut telah mendeterminasikan Tanaman **Pinang (*Areca catechu L.*)**. 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



Kepala Laboratorium Biologi,

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

Mengetahui,

Penanggung jawab determinasi,

Siti Kartika Sari, M.Pd

**Pinang (*Areca catechu* L.)**

**Kunci Determinasi :**

- 1b, 2b, 3b, 4b, 6b, 7a, 8b, .... → Familia : Palmae  
 1b, 3b, 4b, 6b, 7b, 9b, .... → Genus : *Areca*  
 1b,.... → Species : *Areca catechu* L.

**Klasifikasi :**

- Divisio : Spermatophyta  
 Sub Divisio : Angiospermae  
 Classis : Monocotyledoneae  
 Ordo : Arecales (Spadiciflorae)  
 Familia : Arecaceae/ Palmae  
 Genus : *Areca*  
 Species : *Areca catechu* L.

**Tabel Deskripsi tanaman *Areca catechu* L.:**

Keterangan	Deskripsi
Akar	Merupakan tanaman sejenis palem dengan perakaran serabut.
Batang	Batang langsing, bentuk silindris, tinggi sampai 25m, warna kecoklatan, keras.
Daun	Daun majemuk menyirip, pelepah daun berbentuk tabung, panjang $\pm$ 80 cm, tangkai daun pendek, helaian daun panjangnya sampai $\pm$ 80 cm, anak daun 85 x 5 cm dengan ujung sobek dan bergigi. Susunan daun roset batang (daun berkumpul pada bagian atas/ujung batang), warna hijau, memiliki lapisan kutikula.
Bunga	Bunga majemuk dengan seludang yang gampang rontok, muncul di bawah daun, panjang $\pm$ 75 cm, tangkai bunga majemuk pendek dan bercabang rangkap, panjang sumbu $\pm$ 35 cm, bunga betina pada

	<p>pangkal dan bunga jantan di bagian atasnya sampai ke ujung.</p> <p>♀ panjang ± 1,5 cm, berwarna hijau, bakal buah beruang 1.</p> <p>♂ panjang ± 4 mm, berwarna putih kekuningan, stamen atau benang sari 6.</p>
Buah	Buah buni, bentuk bulat telur, bila masak berwarna merah orange, panjang ± 3,5 – 7 cm, dinding buah berserabut.
Biji	Biji tiap buah berjumlah satu, bentuk telur, ada carak seperti jala, warna biji kecoklatan.
Manfaat	Buah sering dimanfaatkan untuk nginang yang dipercaya dapat memperkuat gigi.

**Sumber :**

Becker, D.Sc , C.A. and Van den Brink Jr, PH.D., R.C. Bakhuizen. 1968. *Flora of Java (Spermatophytes only) Vol III*. Groningen-The Netherlands:Wolters-Noordhoff N.V.

Tjitrosoepomo, G. 2007. *Taksonomi Tumbuhan Spermatophyta*. Yogyakarta : UGM Press.

Van Steenis, C.G.G.J. 2005. *Flora*. Jakarta : PT. Pradnya Paramita.

## Lampiran 2. Surat *ethical clearance* pengujian 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 : 395/ 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 EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT KULIT BUAH PINANG  
 (ARECA CATECHU L.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

Principal investigator : Nabila Karsan  
 Peneliti Utama 18144360A

Location Of Research : FK UGM  
 Lokasi Tempat Penelitian

**Is ethically approved**  
**Dinyatakan laik etik**

Issued on : 04 Mei 2016



**Chairman**  
**Ketua**  
**KOMISI**  
**ETIK PENELITIAN KESEHATAN**

Dr. Hari Wujoso, dr.,Sp.F,MM  
 NIP. 19621622-199503 1 001

### Lampiran 3. Surat ijin penelitian



#### DEPARTEMEN PARASITOLOGI

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

Gedung Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.

Telp. (0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitfkugm@yahoo.com

Nomor : UGM/KU/Prst/274/M/05/07  
Hal : Ijin Penelitian. 13 Juli 2016

Kepada Yth. : NABILA KARSAN  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi Surakarta

Dengan hormat,  
Menanggapi surat saudara tertanggal 13 Mei 2016 tentang ijin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi yang berjudul:

“UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT KULIT BUAH PINANG (*Areca catechu* L.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D”

Kami dapat mengijinkan penelitian tersebut dilakukan di Departemen Parasitologi FK. UGM., dengan catatan :

1. Mentaati peraturan yang berlaku di FK. UGM. dan Departemen Parasitologi FK. UGM.
2. Sebagai supervisor dalam pelaksanaan penelitian ini adalah Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK., dengan Teknisi: Rumbiwati.
3. Menulis semua kegiatan dan hasil penelitian yang dilakukan di laboratorium dalam buku Log Penelitian; buku Log ditinggal di Laboratorium.
4. Menerapkan prinsip **Good Clinical Laboratory Practice** pada saat bekerja di laboratorium.
5. Setelah selesai melaporkan hasilnya kepada Kepala Departemen.

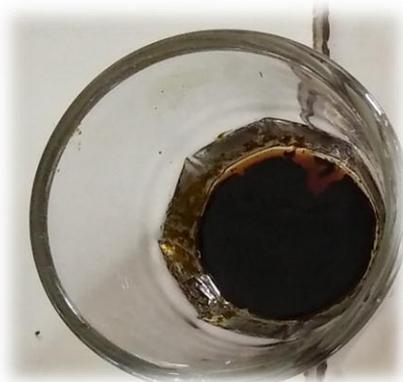
Atas perhatian dalam hal ini kami ucapkan terima kasih.

Kepala,



dr. Tri Baskoro T. Satoto, MSc., PhD.  
NIP. 19580412 198601 1 001.

Tembusan Yth. : 1. Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK.  
2. Rumbiwati  
3. Arsip

**Lampiran 4. Bahan dan alat penelitian****Buah pinang****Kulit buah pinang kering****Serbuk kulit buah pinang****Ekstrak kulit buah pinang****Fraksi etil asetat**



**Rotary evaporator**



**Vortex**



**Moisture balance**



**Corong pisah**



**Haemocytometer**



**Botol maserasi**



**Incubator**



**Mikroskop**



**ELISA reader**



**Microplate**



**(Fungizone, Amphoteresin,  
Penicilin-Streptomycin)**



**Mikropipet**



**Sampel uji**  
(ekstrak dan fraksi etil asetat)



*Laminar Air Flow*



**Media kultur**

**Lampiran 5. Perhitungan rendemen serbuk kering, ekstrak etanol, fraksi etil asetat kulit buah pinang**

A. Rendemen berat kulit buah pinang kering terhadap kulit buah pinang basah

$$\text{Rendemen } \left( \% \text{ b/b} \right) = \frac{\text{berat kering}}{\text{berat basah}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen } \left( \% \text{ b/b} \right) = \frac{500 \text{ g}}{1200 \text{ g}} \times 100\% = 41,67\%$$

B. Rendemen ekstrak etanol kulit buah pinang

$$\text{Rendemen } \left( \% \text{ b/b} \right) = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen } \left( \% \text{ b/b} \right) = \frac{31,7406 \text{ g}}{500 \text{ g}} \times 100\% = 6,35\%$$

C. Rendemen fraksi etil asetat kulit buah pinang

$$\text{Rendemen } \left( \% \text{ b/b} \right) = \frac{\text{berat fraksi etil asetat}}{\text{berat ekstrak etanol}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen } \left( \% \text{ b/b} \right) = \frac{3,278 \text{ g}}{31,7406 \text{ g}} \times 100\% = 10,32\%$$

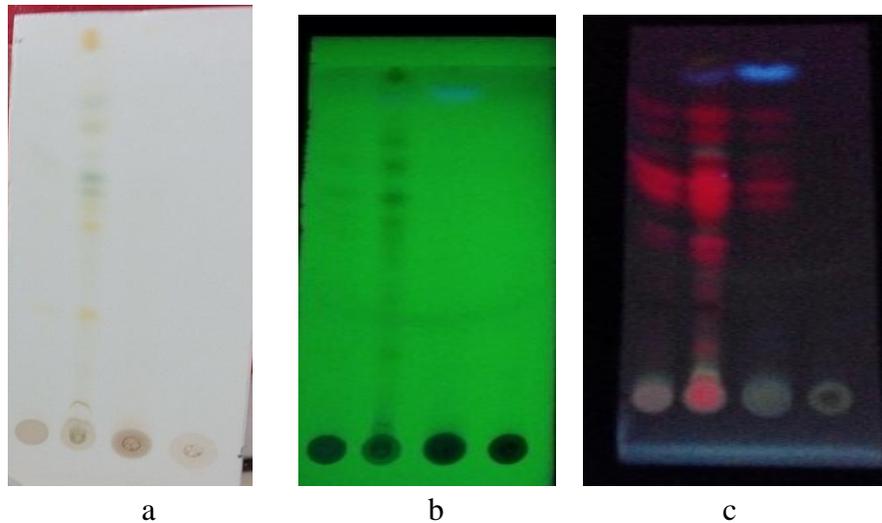
**Lampiran 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk, ekstrak etanol, kulit buah pinang**

**A. Identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak etanol kulit buah pinang**

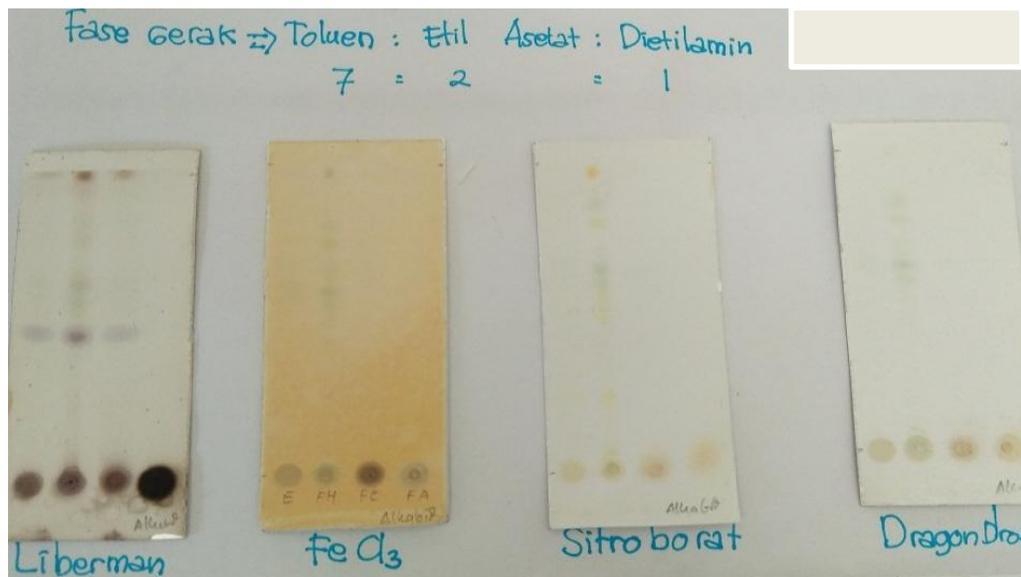
Kandungan senyawa	Serbuk	Ekstrak
Flavonoid		
Alkaloid		
Tanin		
Fenolik		
Terpenoid/steroid		

## B. Identifikasi kandungan senyawa secara KLT

### 1. Fase gerak (Fase gerak Toluena : Etil asetat : Dietilamin = 7 : 2 : 1)

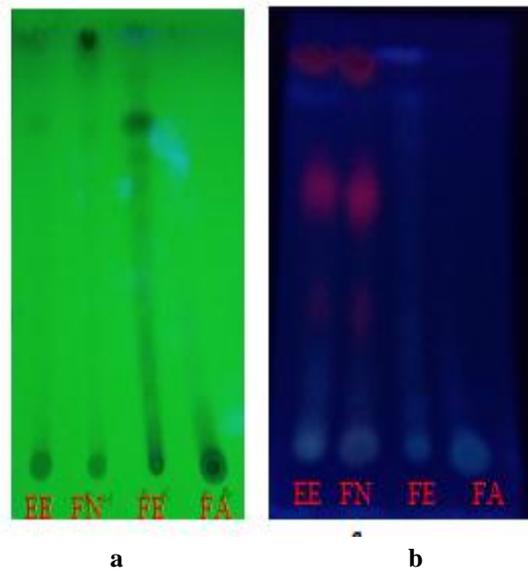


Gambar 10. a) sebelum penyemprotan, b) Deteksi sinar UV 254, c) Deteksi sinar UV 366

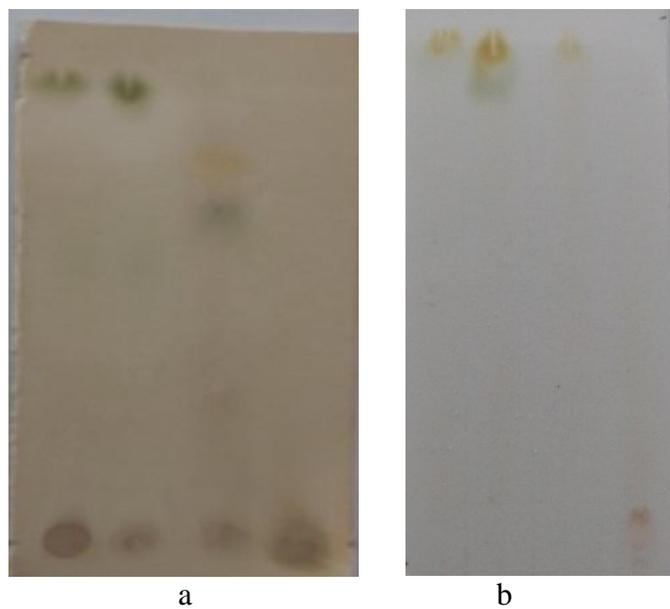


Gambar 11. Hasil deteksi penampang bercak

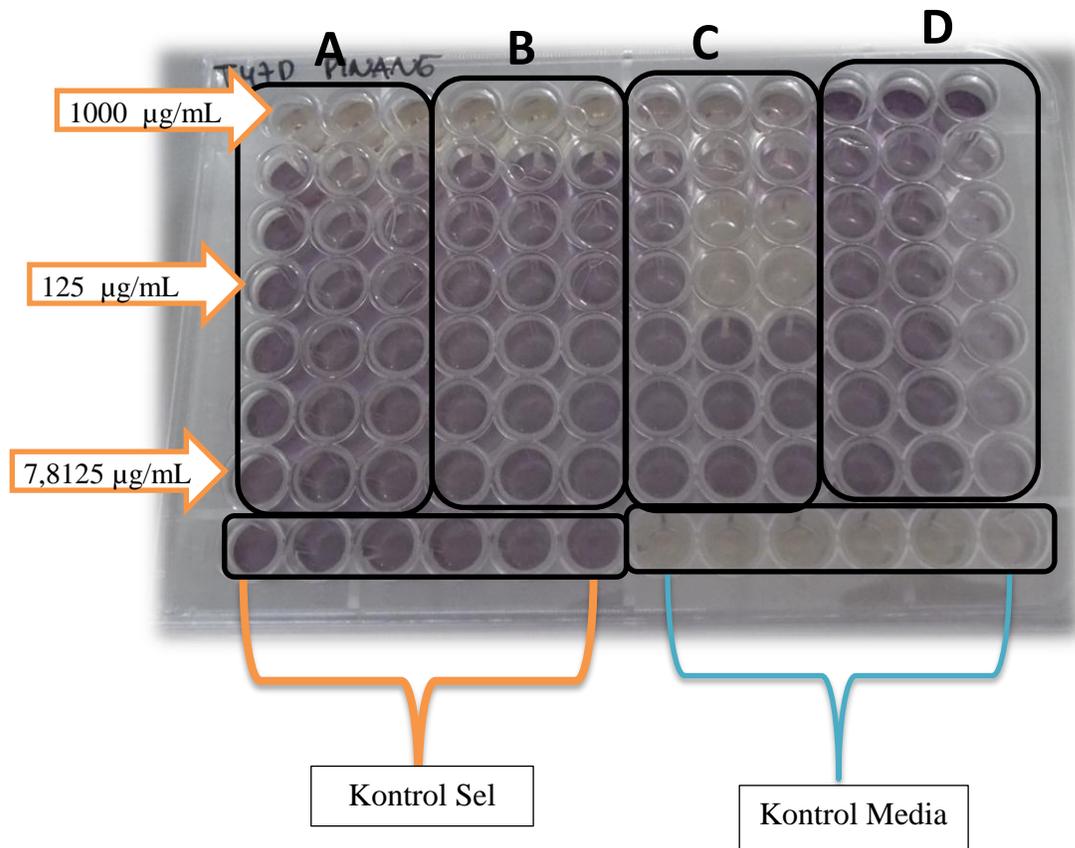
2. Fase gerak Etil asetat : Aseton (2 : 1)



Gambar 12. a) Deteksi sinar UV 254, b) Deteksi sinar UV 366



Gambar 13. Sesudah penyemprotan a) Dragendorff, b) FeCl<sub>3</sub>

**Lampiran 7. Pola *micro plate* uji MTT**

Keterangan :

A = Ekstrak etanol kulit buah pinang

B = Fraksi *n*-heksana kulit buah pinang

C = Fraksi etil asetat kulit buah pinang

D = Fraksi air kulit buah pinang

### Lampiran 8. Perhitungan volume pemanenan sel

A. Jumlah sel T47D terhitung dalam suspensi

$$\Sigma \text{ sel/mL} = \frac{\Sigma \text{ sel A} + \Sigma \text{ sel B} + \Sigma \text{ sel C} + \Sigma \text{ sel D}}{3} \times 10^4$$

$$\Sigma \text{ sel/mL} = \frac{98 + 112 + 104 + 93}{4} \times 10^4 = 101,75 \times 10^4$$

Volume jumlah panen yang ditransfer

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

$$\text{Volume panen sel} = \frac{100 \times 10^4}{101,75 \times 10^4} = 0,98 \text{ mL} \sim 1 \text{ mL}$$

B. Jumlah sel vero terhitung dalam suspensi

$$\Sigma \text{ sel/mL} = \frac{\Sigma \text{ sel A} + \Sigma \text{ sel B} + \Sigma \text{ sel C} + \Sigma \text{ sel D}}{3} \times 10^4$$

$$\Sigma \text{ sel/mL} = \frac{70 + 67 + 50 + 65}{4} \times 10^4 = 63 \times 10^4$$

Volume jumlah panen yang ditransfer

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

$$\text{Volume panen sel} = \frac{100 \times 10^4}{63 \times 10^4} = 1,59 \text{ mL} \sim 1,6 \text{ mL}$$

## Lampiran 9. Perhitungan pembuatan larutan stok dan larutan seri

### A. Pembuatan larutan stok

Dibuat larutan stok dengan konsentrasi = 10 mg/100  $\mu$ L

$$= 10.000\mu\text{g}/ 100 \mu\text{L}$$

$$= 100.000 \mu\text{g}/ \text{mL} \text{ atau } 100.000 \text{ ppm}$$

### B. Pembuatan seri konsentrasi

#### 1. Konsentrasi 1000 $\mu$ L

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

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

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

Dipipet 10  $\mu$ L dari larutan stok

+ 990  $\mu$ L media RPMI

#### 2. Konsentrasi 500 $\mu$ L

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$1 \text{ mL} \times 500 = V_2 \times 1000$$

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

Dipipet 500  $\mu$ L dari larutan

konsentrasi I + 500  $\mu$ L media

RPMI

#### 3. Konsentrasi 250 $\mu$ L

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

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

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

Dipipet 500  $\mu$ L dari larutan

konsentrasi II + 500  $\mu$ L media

RPMI

#### 4. Konsentrasi 125 $\mu$ L'

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$1 \text{ mL} \times 125 = V_2 \times 250$$

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

Dipipet 500  $\mu$ L dari larutan

konsentrasi III + 500  $\mu$ L

media RPMI

5. Konsentrasi 62,5  $\mu\text{L}$

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

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

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

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari larutan

konsentrasi IV + 500  $\mu\text{L}$  media

RPMI

6. Konsentrasi 31,25  $\mu\text{L}$

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$1 \text{ mL} \times 31,25 = V_2 \times 62,5$$

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

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari larutan

konsentrasi V + 500  $\mu\text{L}$  media

RPMI

7. Konsentrasi 15,625  $\mu\text{L}$

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$1 \text{ mL} \times 15,625 = V_2 \times 31,25$$

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

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari larutan

konsentrasi V I + 500  $\mu\text{L}$  media

RPMI

8. Konsentrasi 7,81  $\mu\text{L}$

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$1 \text{ mL} \times 7,81 = V_2 \times 15,63$$

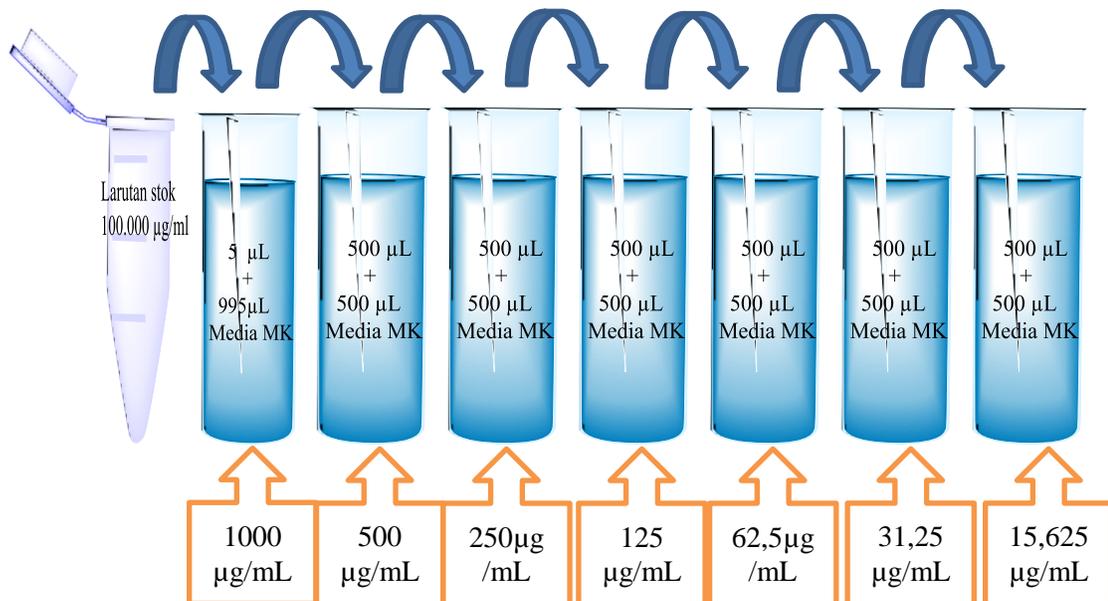
$$V_2 = 0,5 \mu\text{L}$$

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

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari konsentrasi 6

dan (+) 500  $\mu\text{L}$  media RPMI

## C. Ilustrasi

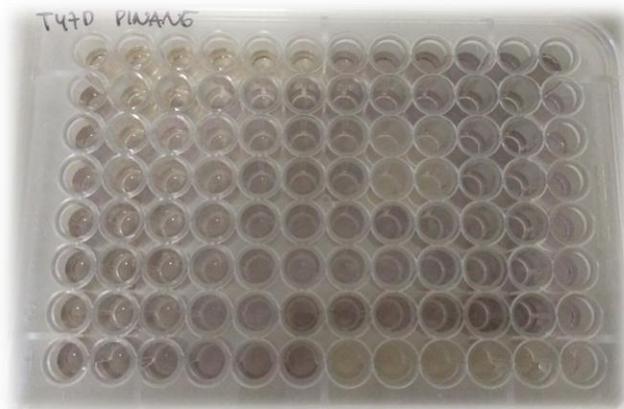


**Lampiran 10. Degradasi warna saat sebelum pemberian sampel, sesudah pemberian sampel dan sesudah pemberian MTT**

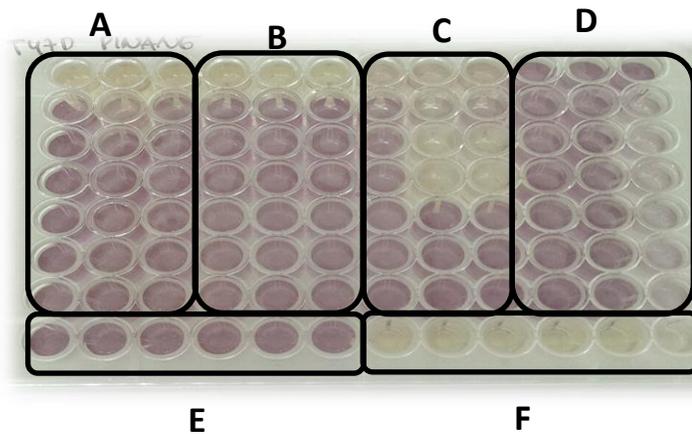
**A. Sel kanker payudara T47D**



Sebelum pemberian sampel uji

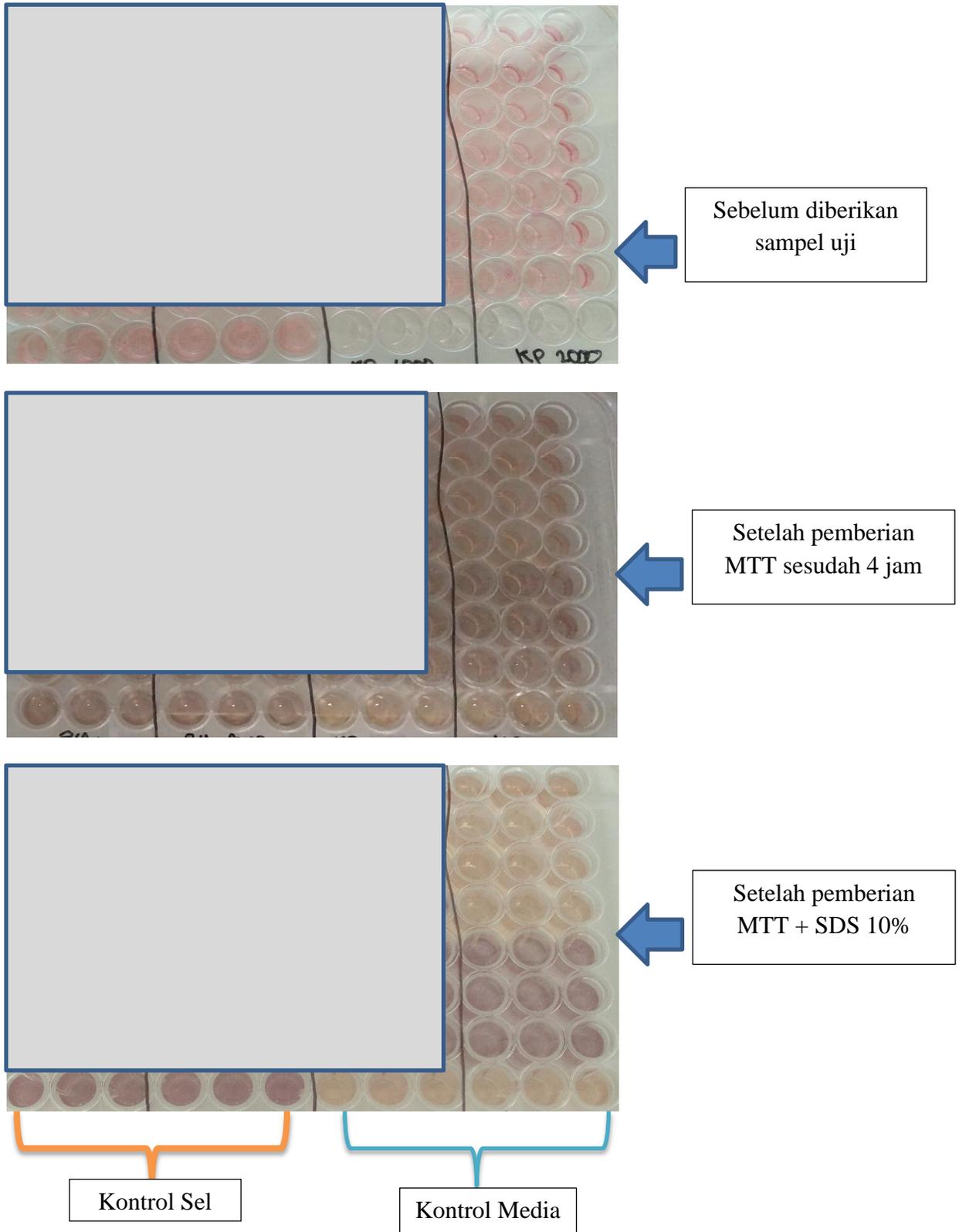


Setelah pemberian MTT selama 4 jam

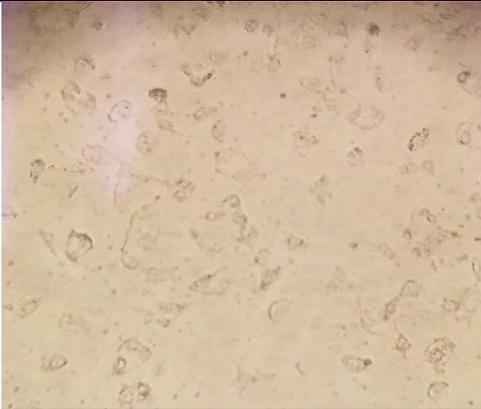
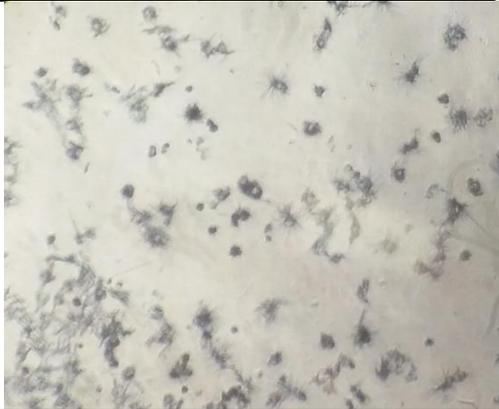
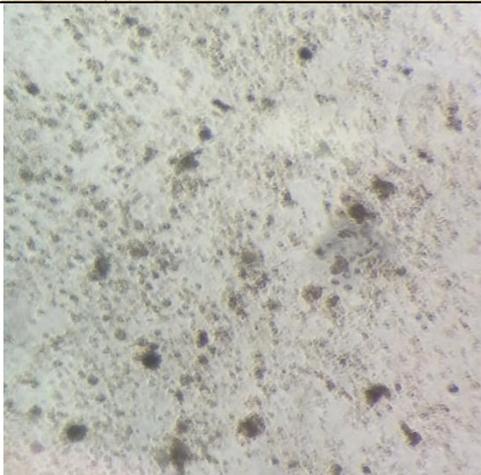


Sesudah pemberian SDS 10%

B. Sel Vero

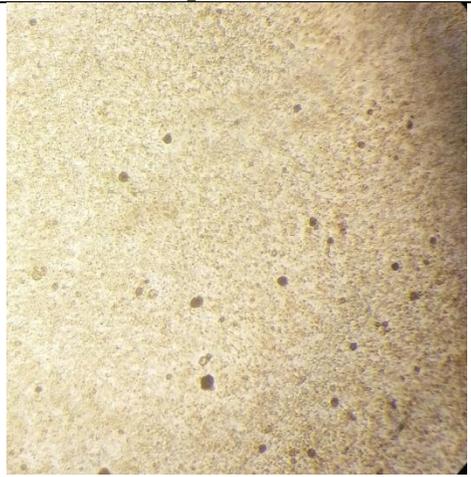
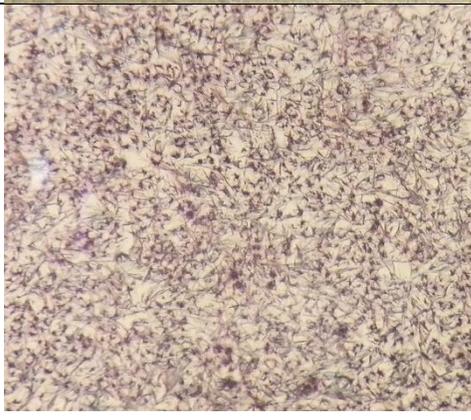
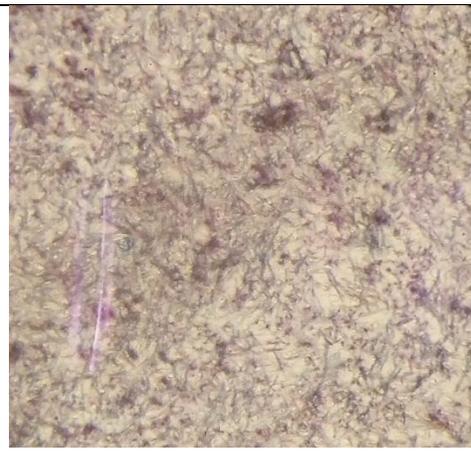


**Lampiran 11. Gambar kristal formazan pada sel Vero**

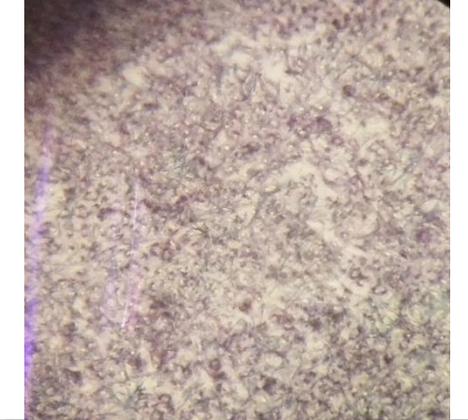
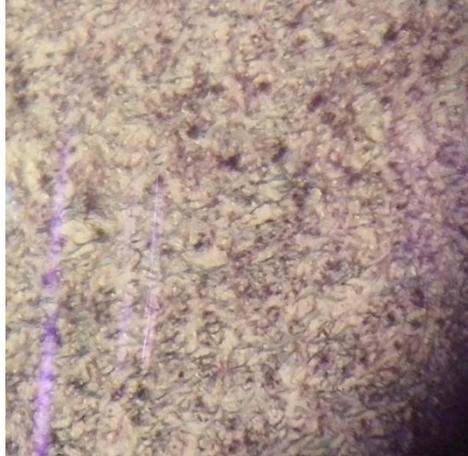
Perlakuan	Sebelum pemberian MTT	Sesudah pemberian MTT
Ekstrak etanol kulit buah pinang 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	 Micrograph showing Vero cells before MTT staining. The cells are mostly colorless and appear as a confluent monolayer.	 Micrograph showing Vero cells after MTT staining at 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The cells are stained blue, indicating the presence of formazan crystals.
Ekstrak etanol kulit buah pinang 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	 Micrograph showing Vero cells before MTT staining at 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The cells are mostly colorless and appear as a confluent monolayer.	 Micrograph showing Vero cells after MTT staining at 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The cells are stained blue, indicating the presence of formazan crystals.

**Lampiran 12. Gambar kristal formazan pada sel kanker payudara T47D**

**A. Kristal formazan pada sel kanker payudara T47D dengan ekstrak etanol**

Perlakuan	Sebelum pemberian MTT	Sesudah pemberian MTT
<p>Ekstrak etanol kulit buah pinang 1000 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></p>		
<p>Ekstrak etanol kulit buah pinang 125 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></p>		
<p>Ekstrak etanol kulit buah pinang 15,63 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></p>		

**B. Kristal formazan pada sel kanker payudara T47D dengan fraksi etil asetat**

Perlakuan	Sebelum pemberian MTT	Sesudah pemberian MTT
Fraksi etil asetat kulit buah pinang 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
Fraksi etil asetat kulit buah pinang 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$		
Fraksi <i>n</i> -heksana kulit buah pinang 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$		

### Lampiran 13. Perhitungan IC<sub>50</sub>

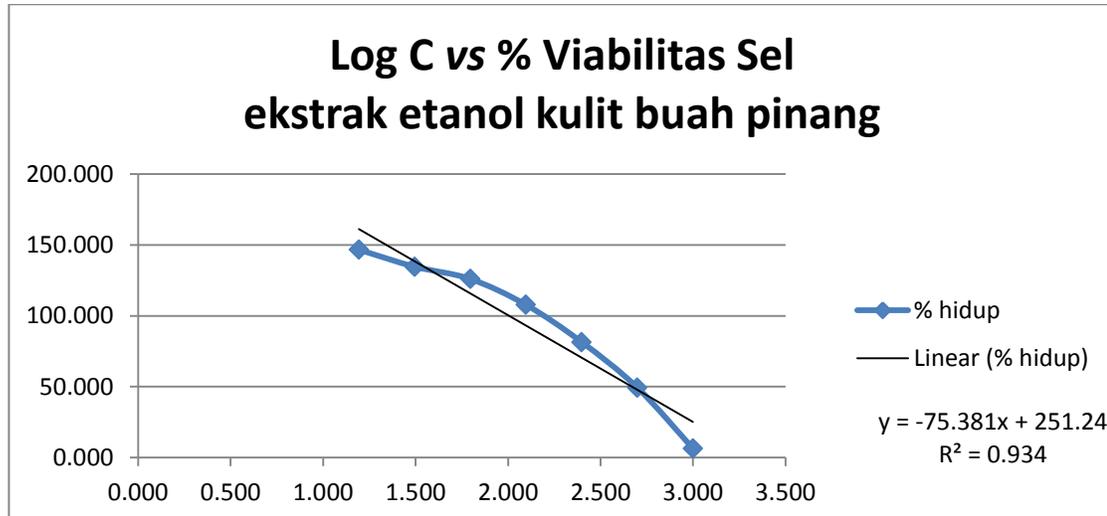
A. Perhitungan IC<sub>50</sub> ekstrak etanol kulit buah pinang terhadap sel kanker payudara T47D

C (µg/mL)	Absorbansi			Rata-rata	KM	KS	Log C	% hidup
	I	II	III					
1000	0.129	0.132	0.139	0.133	0,090	0,760	3.000	6.418
500	0.438	0.302	0.523	0.421			2.699	49.403
250	0.593	0.769	0.547	0.636			2.398	81.493
125	0.782	0.816	0.839	0.812			2.097	107.761
62.5	0.934	0.952	0.917	0.934			1.796	125.970
31.25	0.961	1.002	1.014	0.992			1.495	134.627
15.625	1.202	1.013	1.002	1.072			1.194	146.567

Keterangan: C : Konsentrasi sampel uji

KM : Kontrol media

KS : Kontrol sel



$$Y = -75,381x + 251,24$$

$$50 = -75,381x + 251,24$$

$$50 - 251,24 = -75,381x$$

$$X = 2,67$$

$$\text{Antilog } X (\text{IC}_{50}) = 467,346$$

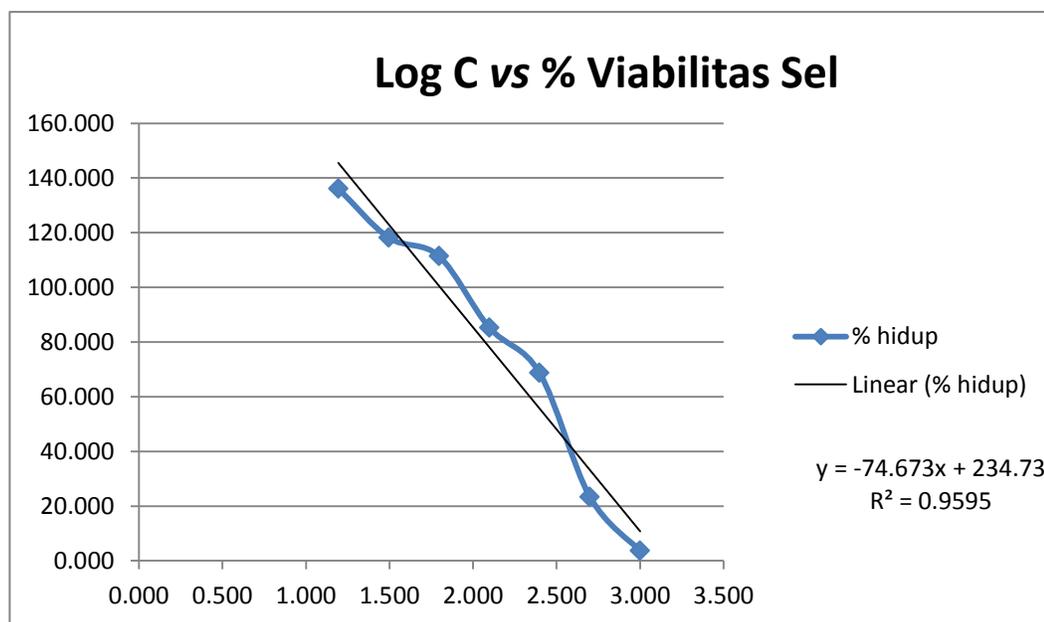
B. Perhitungan  $IC_{50}$  fraksi etil asetat kulit buah pinang

C ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi			Rata-rata	KM	KS	Log C	% hidup
	I	II	III					
500	0.123	0.112	0.110	0.115	0,090	0,760	3.000	3.731
250	0.306	0.232	0.203	0.247			2.699	23.433
125	0.492	0.611	0.549	0.551			2.398	68.756
62.5	0.671	0.668	0.646	0.662			2.097	85.323
31.25	0.814	0.802	0.894	0.837			1.796	111.443
15.625	0.921	0.843	0.882	0.882			1.495	118.209
7.8625	1.073	0.919	1.014	1.002			1.194	136.119

Keterangan: C : Konsentrasi sampel uji

KM : Kontrol media

KS : Kontrol sel



$$Y = -74.673x + 234.73$$

$$50 = -74.673x + 234.73$$

$$50 - 234.73 = -74.673x$$

$$x = 2.474$$

$$\text{Antilog } x (IC_{50}) = 297.751$$

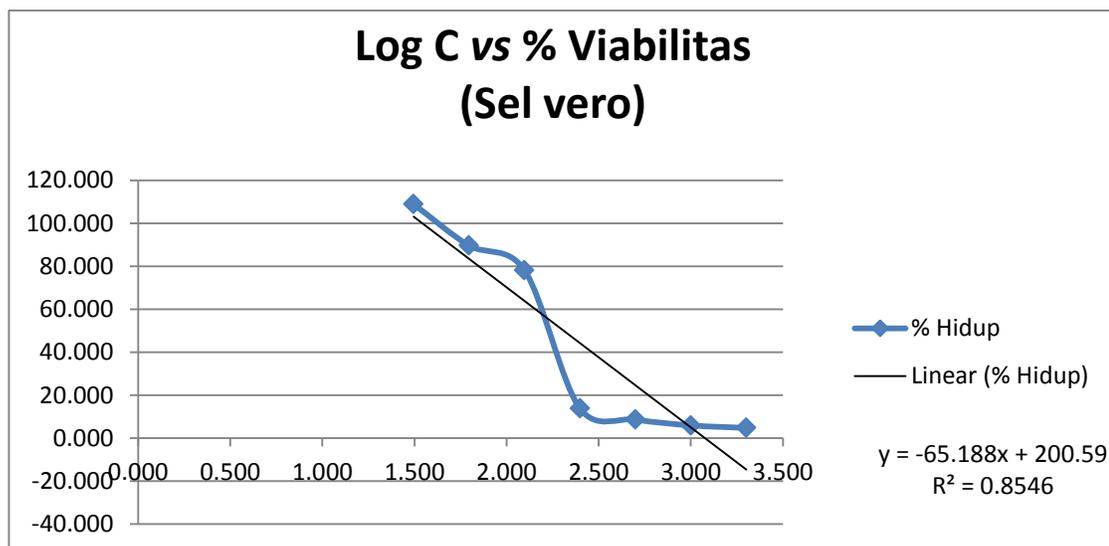
C. Perhitungan  $IC_{50}$  ekstrak etanol kulit buah pinang terhadap sel Vero

C ( $\mu\text{g/mL}$ )	log C	Absorbansi			Rata-rata	KS	KM	% Hidup
		R1	R2	R3				
2000	3.301	0.103	0.110	0.097	0.103	0,569	0,080	4.768
1000	3.000	0.113	0.106	0.108	0.109			5.926
500	2.699	0.115	0.121	0.131	0.122			8.651
250	2.398	0.145	0.164	0.134	0.148			13.828
125	2.097	0.566	0.425	0.397	0.463			78.202
62.5	1.796	0.649	0.441	0.466	0.519			89.646
31.25	1.495	0.597	0.665	0.577	0.613			108.924

Keterangan: C : Konsentrasi sampel uji

KM : Kontrol media

KS : Kontrol sel



$$Y = -65.188x + 200.59$$

$$50 = -65.188x + 200.59$$

$$50 - 200.59 = -65.188x$$

$$X = 2.310$$

$$\text{Antilog } X (IC_{50}) = 204.2151$$

**Lampiran 14. Perhitungan nilai indeks selektivitas ekstrak kulit buah pinang**

Nilai indeks selektivitas ekstrak pada sel vero terhadap sel T47D

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ sel Vero}}{\text{IC}_{50} \text{ sel kanker}}$$

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{204,2151 \mu\text{g/mL}}{467,346 \mu\text{g/mL}}$$

$$\text{Indeks selektivitas} = 0,437$$

## Lampiran 15. Data hasil uji Independent T-test

### NPar Tests

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ekstrak	fraksietil
N		7	7
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	93.17700	78.14486
	Std. Deviation	50.722236	49.573832
Most Extreme Differences	Absolute	.185	.178
	Positive	.146	.151
	Negative	-.185	-.178
Kolmogorov-Smirnov Z		.488	.470
Asymp. Sig. (2-tailed)		.971	.980

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### T-Test

#### Group Statistics

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Viabilitas	Ekstrak etanol	7	93.17700	50.722236	19.171203
	Fraksi Etil	7	78.14486	49.573832	18.737147

#### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Viabilitas	Equal variances assumed	.006	.939	.561	12	.585	15.032143	26.807009	-43.375312	73.439598
	Equal variances not assumed			.561	11.994	.585	15.032143	26.807009	-43.378708	73.442994

## NPar Tests

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		viabilitas
N		42
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	85.68226
	Std. Deviation	48.262777
Most Extreme Differences	Absolute	.151
	Positive	.104
	Negative	-.151
Kolmogorov-Smirnov Z		.979
Asymp. Sig. (2-tailed)		.293

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## Univariate Analysis of Variance

### Between-Subjects Factors

		Value Label	N
fraksi	1.000	ekstrak	21
	2.000	fraksi etil	21
konsentrasi	1.000	1000.000	3
	2.000	500.000	6
	3.000	250.000	6
	4.000	125.000	6
	5.000	62.500	6
	6.000	31.250	6
	7.000	15.630	6
	8.000	7.810	3

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:viabilitas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	92944.597 <sup>a</sup>	13	7149.584	78.305	.000
Intercept	293644.912	1	293644.912	3216.106	.000
fraksi	13826.663	1	13826.663	151.435	.000
konsentrasi	89398.860	7	12771.266	139.876	.000
fraksi * konsentrasi	1159.673	5	231.935	2.540	.051
Error	2556.525	28	91.304		
Total	403842.022	42			
Corrected Total	95501.122	41			

a. R Squared = .973 (Adjusted R Squared = .961)

## Lampiran 16. Surat keterangan selesai penelitian



**DEPARTEMEN PARASITOLOGI**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA**  
 Gedung Prof. Drs. R. Radiopetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.  
 Telp. (0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitkugm@yahoo.com

### SURAT KETERANGAN

No. UGM/KU/Prst/313/TL/04/03

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Kepala Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta,  
 menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

Nama : NABILA KARSAN  
 Instansi : Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta  
 NIM. : 18144360A

Telah melakukan penelitian di Departemen Parasitologi FK. UGM dengan judul :

“UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT KULIT BUAH  
 PINANG (*Areca catechu L.*) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D“

Dibawah supervisi laboratorium: Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK.  
 Waktu Penelitian: 18 Juli 2016 sampai dengan 28 Juli 2016

Urusan administrasi telah diselesaikan oleh yang bersangkutan dan fasilitas laboratorium  
 yang dipakai telah dikembalikan, dengan demikian dinyatakan **bebas laboratorium**.

Surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 28 Juli 2016



Kepala,

dr. Tri Baskoro T. Satoto, MSc, PhD.  
 NIP. 19580412 198601 1 001.