

**UJI SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA DAN FRAKSI AIR
KULIT BUAH PINANG (*Areca catechu* L.) TERHADAP
SEL KANKER PAYUDARA T47D**



Oleh :

**Nur Atik Hidayah
18144362A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA**

2016

**UJI SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA DAN FRAKSI AIR
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 :

**Nur Atik Hidayah
18144362A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2016**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul

UJI SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA DAN FRAKSI AIR
KULIT BUAH PINANG (*Areca catechu* L.) TERHADAP
SEL KANKER PAYUDARA T47D

Oleh

Nur Atik Hidayah

18144362A

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. Tri Wijayanti, S.Farm., MPH., Apt.

2. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si.

3. Nuraini Harmastuti, S.Si., M.Si.

4. Drs. Widodo Priyanto, Apt.

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



Nur Atik Hidayah

HALAMAN PERSEMBAHAN

“... Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu. Allah Maha Mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.”

QS. Al-Baqarah:216.

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

- 1. Ummi dan Abi tercinta yang tak pernah lelah mendo'akan serta membimbing kami. Terima kasih atas limpahan cinta dan kasih sayang mu pada kami yang tak pernah henti dan belum mampu kami balas. Kasih sayang dan do'a dari Kalian merupakan energi yang sangat berharga untuk diriku agar terus berjuang...*
- 2. Teruntuk saudari-saudari ku tercinta dan tersayang : Kak Lily yang, dek Imah, dek Aisyah, yang selalu menyemangati jadi teman curhat dan berbagi.*
- 3. Teruntuk sahabat seperjuangan ku tercinta Nabila dan Pristovia yang selalu membantu dikala sakit, senang maupun susah. Sahabat permaisuri surga yang selalu memberikan motivasi dan semangat serta sahabat seperjuangan cancer crew (Nabila, A'yun, Santi, Merisa) menemani selama penelitian ini dalam susah, senang, hujan badai, panas menyengat, sahabat seperjuangan Transfer 2014 (A'yun, Santi, Sari, Yuna, Uswah, Mas Deni, Alfiah, Desi, Mba Indah, Kuni, Merisa, Mba Nina, Mba Luna) yang sudah menemani dalam senang dan sulitnya perjuangan untuk mendapatkan gelar S.Farm ini, teman kost Anis, Irene, Rambu, Ramita yang selalu mendukung.*
- 4. Teruntuk Agama, Bangsa dan negara, serta, Almamaterku...*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas berkat, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“UJI SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA DAN FRAKSI AIR 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, S.U., 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. Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt. selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, memberikan bimbingan, pengarahan, saran, motivasi dan petunjuk dalam penyusunan skripsi ini.
5. Fransiska Leviana, M.Sc., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu, memberikan bimbingan, pengarahan, saran, motivasi dan petunjuk dalam penyusunan skripsi ini.
6. Segenap Dosen, Karyawan dan Staff Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah banyak membantu kelancaran skripsi ini.
7. Teruntuk orang-orang tercinta: Ummi, Abi, Kak Lily, Imah, Aisyah, dan sahabat terbaik Nabila dan Pristovia terima kasih atas doa, kasih sayang, serta dukungannya baik dalam hal moril dan material untuk membantu menyelesaikan skripsi ini.

8. Teman - teman *Cancer crew*, 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.
9. 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, Oktober 2016

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|------------------------------------|----------------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | ii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iii |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | iv |
| KATA PENGANTAR | vi |
| DAFTAR ISI..... | viii |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| INTISARI | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| BAB I PENDAHULUAN | |
| A. Latar Belakang..... | 1 |
| B. Perumusan Masalah | 4 |
| C. Tujuan Penelitian | 4 |
| D. Kegunaan Penelitian | 5 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | |
| A. Tanaman Pinang | |
| 1. Klasifikasi tanaman | 6 |
| 2. Nama daerah..... | 6 |
| 3. Morfologi tanaman | 7 |
| 4. Kandungan kimia..... | 8 |
| 5. Kegunaan tanaman | 8 |
| B. Simplisia | |
| 1. Pengertian | 9 |
| 2. Tahap pembuatan simplisia | |
| 2.1 Sortasi basah | 9 |
| 2.2 Pencucian bahan | 10 |
| 2.3 Perajangan | 10 |
| 2.4 Pengeringan | 10 |
| C. Ekstraksi | |
| 1. Pengertian ekstraksi | 11 |
| 2. Pengertian ekstrak | 11 |

| | |
|---|----|
| 3. Metode ekstraksi | 11 |
| 4. Fraksinasi..... | 12 |
| 5. Pelarut | |
| 5.1 Etanol 96% | 13 |
| 5.2 <i>n</i> -heksana | 13 |
| 5.3 Air | 13 |
| D. Kanker | |
| 1. Pengertian kanker | 14 |
| 2. Sifat sel kanker | 14 |
| 3. Siklus sel | |
| 3.1 Fase G1 (<i>Growth phase-1/</i> Pasca Mitosis) | 15 |
| 3.2 Fase S (<i>Synthetic phase/</i> Sintesis) | 16 |
| 3.3 Fase G2 (<i>Growth phase-2/</i> Pra Mitosis) | 16 |
| 3.4 Fase M (<i>Mitotic phase/</i> Mitosis) | 16 |
| 4. Apoptosis | 17 |
| 5. Kanker payudara | 18 |
| 6. Pengobatan kanker | |
| 6.1 Kemoterapi | 20 |
| 6.2 Radioterapi | 21 |
| 6.3 Pembedahan..... | 21 |
| 6.4 Imunoterapi/ bioterapi | 22 |
| 7. Kandungan senyawa tanaman sebagai terapi kanker | 22 |
| E. Sel T47D | 22 |
| F. Metode Uji Sitotoksik MTT Assay | 24 |
| J. Landasan Teori | 26 |
| K. Hipotesis..... | 29 |

BAB III METODE PENELITIAN

| | |
|--|----|
| A. Populasi dan Sampel | 30 |
| B. Variabel penelitian | |
| 1. Identifikasi variabel utama | 30 |
| 2. Klasifikasi variabel utama | 30 |
| 3. Definisi operasional variabel utama..... | 31 |
| C. Alat dan Bahan | |
| 1. Alat | 32 |
| 2. Bahan | 33 |
| D. Jalannya Penelitian | |
| 1. Identifikasi tanaman kulit buah pinang | 33 |
| 2. Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan serbuk | 34 |
| 3. Pemeriksaan organoleptis serbuk kulit buah pinang | 34 |
| 4. Penetapan susut pengeringan | 34 |
| 5. Pembuatan ekstrak etanol kulit buah pinang | 35 |
| 6. Pembuatan fraksi <i>n</i> - heksana dan air kulit buah pinang | 35 |
| 7. Identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak etanol kulit buah pinang | |
| 7.1 Identifikasi flavonoid | 36 |

| | | |
|---------------|--|----|
| 7.2 | Identifikasi alkaloid | 36 |
| 7.3 | Identifikasi tanin | 36 |
| 7.4 | Identifikasi fenolik | 37 |
| 7.5 | Identifikasi steroid dan terpenoid | 37 |
| 8. | Identifikasi kualitatif senyawa dengan metode KLT | 37 |
| 9. | Uji sitotoksik | |
| 9.1 | Sterilisasi alat | 38 |
| 9.2 | Pembuatan media stok RPMI 1640 dan media komplet RPMI 1640 | 38 |
| 9.3 | Pembuatan larutan uji | 39 |
| 9.4 | Pengaktifan sel kanker payudara T47D | 39 |
| 9.5 | Panen dan perhitungan jumlah sel | 40 |
| 9.6 | Treatment sel (pemberian ekstrak dan MTT) | 41 |
| E. | Analisa Hasil | 42 |
| BAB IV | HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN | |
| 1. | Identifikasi tanaman kulit buah pinang | 45 |
| 2. | Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan serbuk | 45 |
| 3. | Pemeriksaan organoleptis serbuk kulit buah pinang | 46 |
| 4. | Penetapan susut pengeringan | 46 |
| 5. | Pembuatan ekstrak etanol kulit buah pinang | 47 |
| 6. | Pembuatan fraksi <i>n</i> - heksana dan air kulit buah pinang | 48 |
| 7. | Identifikasi kandungan senyawa dengan metode tabung .. | 49 |
| 8. | Identifikasi kualitatif senyawa dengan metode KLT | 49 |
| 9. | Uji sitotoksik | 51 |
| BAB V | TINJAUAN PUSTAKA | |
| A. | Kesimpulan | 59 |
| B. | Saran | 59 |
| | DAFTAR PUSTAKA | 60 |
| | LAMPIRAN | 65 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|----------------|
| Gambar 1. Tanaman Pinang | 7 |
| Gambar 2. Siklus Sel | 17 |
| Gambar 3. Reaksi Reduksi MTT <i>Assay</i> | 25 |
| Gambar 4. Skema bilik hitung dalam <i>Haemocytometer</i> | 40 |
| Gambar 5. Skema Pembuatan fraksi <i>n</i> -heksana dan fraksi air kulit buah pinang (<i>Areca catechu</i> L.)..... | 43 |
| Gambar 6. Skema Uji Sitotoksik fraksi <i>n</i> -heksana dan fraksi air kulit buah pinang (<i>Areca catechu</i> L.) terhadap sel kanker payudara T47D..... | 44 |
| Gambar 7. Identifikasi kualitatif metode KLT pada ekstrak dan fraksi..... | 50 |
| Gambar 8. Morfologi sel kanker payudara T47D | 52 |
| Gambar 9. Grafik hubungan % viabilitas sel terhadap fraksi <i>n</i> -heksana dan fraksi air kulit buah pinang | 54 |
| Gambar 10. Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian fraksi kulit buah pinang | 56 |
| Gambar 11. Hasil identifikasi kualitatif metode KLT | 77 |
| Gambar 12. Hasil deteksi penampak bercak | 77 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|----------------|
| Tabel 1. Indeks polaritas pelarut | 14 |
| Tabel 2. Hasil perhitungan rendemen kulit buah pinang | 46 |
| Tabel 3. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk kulit buah pinang | 46 |
| Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kulit buah pinang | 47 |
| Tabel 5. Hasil perhitungan rendemen ekstrak kulit buah pinang | 48 |
| Tabel 6. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol kulit buah pinang .. | 48 |
| Tabel 7. Hasil Identifikasi kandungan senyawa dengan metode tabung | 49 |
| Tabel 8. Hasil Identifikasi fraksi <i>n</i> -heksana dan fraksi air secara KLT | 50 |
| Tabel 9. Data perhitungan IC ₅₀ fraksi <i>n</i> -heksana kulit buah pinang | 87 |
| Tabel 10. Data Perhitungan IC ₅₀ fraksi air kulit buah pinang | 90 |
| Tabel 11. Data hasil uji One-sampel Kolmogorov-Smirnov | 91 |
| Tabel 12. Data hasil <i>Independent T-test</i> | 91 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|----------------|
| Lampiran 1. Surat Keterangan Hasil Determinasi | 66 |
| Lampiran 2. Surat <i>ethical clearance</i> pengujian sitotoksik | 69 |
| Lampiran 3. Surat ijin penelitian | 70 |
| Lampiran 4. Alat dan bahan penelitian | 71 |
| Lampiran 5. Sampel serbuk, fraksi <i>n</i> -heksan dan fraksi air kulit buah pinang | 74 |
| Lampiran 6. Perhitungan rendemen kulit buah pinang | 75 |
| Lampiran 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada kulit pinang | 76 |
| Lampiran 8. Pola <i>micro plate</i> uji MTT | 78 |
| Lampiran 9. Perhitungan volume panen sel | 79 |
| Lampiran 10. Perhitungan pembuatan larutan stok dan larutan seri | 80 |
| Lampiran 11. Degradasi warna saat sebelum pemberian sampel, sesudah pemberian sampel dan sesudah pemberian MTT | 82 |
| Lampiran 12. Gambar kristal formazan pada sel kanker payudara T47D | 83 |
| Lampiran 13. Perhitungan IC ₅₀ fraksi <i>n</i> -heksana dan fraksi air kulit buah pinang | 85 |
| Lampiran 14. Hasil <i>Independent T-test</i> | 91 |
| Lampiran 15. Surat keterangan selesai penelitian | 92 |

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> |
| EGFR | : <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> |
| ELISA | : <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</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 ₅₀ | : <i>Inhibitory Concentration 50%</i> |
| IMRT | : <i>Intensity Modulated Radiotherapy</i> |
| MDR | : <i>Multi Drug Resistance</i> |
| MTT | : <i>Microculture tetrazolium technique</i> |
| PBS | : <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| RNA | : <i>Ribo Nucleic Acid</i> |
| RPMI | : <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SDS | : <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> |
| THFA | : <i>Tetrahydro Folic Acid</i> |

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengaturan multipikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multi seluler (Nafriadi & Gan 2007). Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian nomor dua setelah penyakit kardiovaskuler di dunia. Pada tahun 2012, kanker menjadi penyebab kematian sekitar 8,2 juta orang dan lebih dari 70% kematian terjadi di negara miskin dan berkembang (Kemenkes RI 2015^a). Di Indonesia prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur tahun 2013 sebesar 1,4‰ atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Menurut data *GLOBOCAN, International Agency for Research on Cancer (IARC)* (2012) diketahui bahwa kanker payudara merupakan penyakit kanker dengan persentase kasus baru (setelah dikontrol oleh umur) tertinggi, yaitu sebesar 43,3%, dan persentase kematian (setelah dikontrol oleh umur) akibat kanker payudara sebesar 12,9%. Data *Pathological Based Registration* di Indonesia menunjukkan kanker payudara (KPD) menempati urutan pertama dengan frekuensi relatif sebesar 18,6% (Kemenkes RI 2015^b).

Tingginya prevalensi kanker di Indonesia perlu dicermati dengan tindakan pencegahan dan deteksi dini serta penanganan terhadap penyakit kanker yang tepat. Penyakit kanker pada lebih dari 30% penderita dapat dicegah dengan cara mengubah faktor risiko perilaku, pola makan di antaranya indeks massa tubuh

tinggi, kurang konsumsi buah dan sayur, kurang aktivitas fisik, penggunaan rokok dan konsumsi alkohol berlebihan (Kemenkes RI 2015^c). Penanganan kanker dengan agen kemoterapi masih menjadi pilihan dalam pengobatan kanker. Mekanisme *multidrug resistance* (MDR) mengakibatkan berkurangnya efikasi obat kemoterapi (Conze *et al.* 2001).

Penelitian terhadap penanganan kanker sekarang ini mulai diarahkan pada pengujian potensi bahan alam sebagai agen kemopreventif yang berpotensi sebagai agen pendamping kemoterapi. Tujuannya adalah untuk meningkatkan sensitifitas sel kanker serta mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh agen kemoterapi. Salah satu bahan alam yang telah dimanfaatkan dan teruji sebagai agen pendamping kemopreventif adalah dari family *Arecaceae* yaitu spesies pinang. Senyawa fenolik merupakan salah satu kandungan senyawa *Arecaceae* yang memiliki aktivitas antikanker (Xing *et al.* 2010). Pemanfaatan tanaman pinang sebagian besar hanya sebatas pada biji pinang sedangkan kulit buah pinang sejauh ini masih kurang pemanfaatannya. Pengujian total fenolik dan aktivitas antioksidan pada kulit pinang yakni menunjukkan bahwa ekstrak kulit pinang memiliki total fenolik sebesar 3,16 mg/kg dan aktivitas antioksidan sebesar 54,11% (Ismail *et al.* 2012). Penelitian aktivitas antioksidan kulit buah pinang lainnya menunjukkan ekstrak metanol kulit buah pinang mengandung flavonoid dengan IC₅₀ sebesar 8,3 ppm (Filbert *et al.* 2014).

Tanaman pinang memiliki metabolit sekunder digunakan sebagai anti kanker seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin yang dapat ditemukan pada hampir semua bagian dari tanaman pinang (Filbert *et al.* 2014). Senyawa

flavonoid yang terdapat pada biji pinang bekerja dengan penghambatan proliferasi dan mekanisme apoptosis (Meiyanto *et al.* 2008). Senyawa terpenoid yang terdapat pada pinang dapat memblok siklus sel pada fase mitosis menyebabkan proses mitosis terhambat (Miranti 2014). Beberapa penelitian antikanker terdahulu memanfaatkan biji pinang sebagai bahan alam di antaranya penelitian yang dilakukan oleh Xing *et al.* (2010), menunjukkan bahwa pengujian sitotoksik biji pinang pada sel *line* SGC-7901 (sel kanker lambung) dan sel *line* SMMC-7721 (sel kanker hati manusia) dengan metode MTT didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 5,1 µg/mL dan 9,3 µg/mL.

Senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat antikanker pada tanaman pinang ini memiliki sifat kepolaritasan yang berbeda di antaranya senyawa fenolik memiliki sifat polar dan senyawa terpenoid memiliki sifat yang non polar. Perbedaan kepolaritasan ini akan berpengaruh dengan metode ekstraksi serta pelarut yang akan digunakan untuk menarik senyawa aktif. Penggunaan metode fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana yang merupakan pelarut bersifat non polar ini diharapkan mampu menarik senyawa aktif yang bersifat non polar pada pinang. Begitupun penggunaan fraksinasi menggunakan pelarut air yang bersifat polar diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar dan memiliki aktifitas terhadap sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) yang dilakukan secara *in vitro* terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida] (MTT) yang ditunjukkan dengan parameter nilai IC₅₀.

B. Perumusan Masalah

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

1. Apakah fraksi *n*-heksana kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) mempunyai efek sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan berapa nilai IC_{50} fraksi *n*-heksana?
2. Apakah fraksi air kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) mempunyai efek sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan berapa nilai IC_{50} fraksi air?
3. Manakah di antara fraksi *n*-heksana dan fraksi air yang memiliki efek sitotoksik lebih baik terhadap sel kanker payudara T47D?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui efek sitotoksik fraksi *n*-heksana kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan nilai IC_{50} fraksi *n*-heksana.
2. Mengetahui efek sitotoksik fraksi air kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan nilai IC_{50} fraksi air.
3. Mengetahui efek sitotoksik lebih baik antara fraksi *n*-heksana dan fraksi air terhadap sel kanker payudara T47D.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberi informasi ilmiah tentang kemampuan fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) dalam aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara dan meningkatkan budidaya dan pemanfaatan tanaman kulit buah pinang sebagai alternatif dalam pengobatan antikanker, serta memberikan kontribusi ilmiah terhadap penelitian-penelitian kanker selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

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

1. Klasifikasi tanaman

Klasifikasi tanaman pinang berdasarkan Depkes RI (2001) sebagai berikut:

| | |
|--------------|---|
| Kingdom | : Plantae (tanaman) |
| Subkingdom | : Tracheobionta (tanaman berpembuluh) |
| Super divisi | : Spermatophyta (menghasilkan biji) |
| Divisi | : Magnoliophyta (tumbuhan berbunga) |
| Kelas | : Monocotyledonae (berkeping satu/ monocotil) |
| Sub kelas | : Magnolidae |
| Ordo | : Arecales |
| Famili | : Palmae |
| Genus | : <i>Areca</i> |
| Spesies | : <i>Areca catechu</i> L. |

2. Nama daerah

Sumatera: Pineng, pineung, pianang, batang mayang, batang bangkah, batang pingang, pining, boni; Jawa: Jambe; penang; wohan; Kalimantan: Gahat; gehat; kahat, taan, pinang; Nusatenggara: Buah Jambe, gua, winu, pua, wenji, keu, ua, ehu, glok, wua, tilade (BPOM RI 2010).



Gambar 1. Tanaman Pinang (BPOM RI 2010).

3. Morfologi tanaman

Tumbuhan berhabitus pohon dengan batang tegak, tinggi dapat mencapai 25 meter, tajuk pohon tidak rimbun. Pelepah daun berbentuk tabung, panjang 80 cm; tangkai daun pendek; helaian daun panjang 80 cm; anak daun ukuran 85 x 5 cm, dengan ujung terbelah. Karangan bunga majemuk tongkol dengan seludang sebagai daun pelindung, panjang dan mudah gugur, tongkol bunga muncul di bawah helaian daun, panjang tongkol bunga 75 cm, ibu tangkai tongkol bunga pendek dan bercabang-cabang sampai ukuran 35 cm, dengan 1 bunga betina pada pangkal cabang ibu tangkai tongkol bunga, di atasnya tersusun bunga jantan dalam 2 baris; bunga jantan panjang 4 mm, putih kuning; benang sari 6; bunga betina panjang 1,5 cm, hijau; bakal buah beruang 1. Buah buni (keras), bulat telur terbalik memanjang, merah jingga jika masak, panjang 3-7 cm dengan dinding buah (endokarpium) keras dan berserabut; biji 1 berbentuk telur, dengan alur-alur yang tidak begitu jelas (BPOM RI 2010).

4. Kandungan tanaman

Komponen utama pada biji pinang yaitu karbohidrat, lemak, serat, polifenol (flavonoid dan tanin) serta alkaloid dan mineral (IARC 2004). Biji pinang mengandung 0,3-0,6% alkaloid, seperti arekolin ($C_8H_{13}NO_2$), arekolidine, arekain, guvakolin, guvasine dan isoguvasine. Tanaman pinang juga mengandung *red* tanin 15%, lemak 14% (palmitat, oleat, stearat, caproat, caprilat, laurat, asam miristat), kanji dan resin (BPOM RI 2010).

5. Khasiat tanaman

Biji memiliki efek antelmintik (obat cacing), peluruh kentut (*antiflatulent*), peluruh haid, peluruh kencing (diuretik), peluruh dahak, memperbaiki pencernaan, pengelat (adstringen), pencahar (laksan). Daun sebagai penambah nafsu makan. Sabut melancarkan sirkulasi tenaga, peluruh kencing, dan pencahar. Ekstrak pinang menunjukkan aktivitas penghambatan yang kuat terhadap esterase kolesterol pankreas (pCEase) secara *in vitro* (BPOM RI 2010). Buah pinang memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan tanin yang memiliki efek sebagai antikanker, antitumor, antibakteri, dan juga sebagai antifertilisasi (Filbert *et al.* 2014).

Senyawa flavonoid yang terdapat pada biji pinang bekerja dengan penghambatan proliferasi dan mekanisme apoptosis (Meiyanto *et al.* 2008). Asam fenolat berperan dalam mencegah kanker dan antigenotoksik (Kampa *et al.* 2003), Senyawa alkaloid bersifat antineoplastik sehingga ampuh menghambat pertumbuhan

sel-sel kanker (Agoes 2010). Senyawa tanin mempunyai aktifitas sebagai antiproliferatif pada sel kanker yang bekerja pada tingkat sel yang dengan menghambat fase “S” dari siklus sel (Khanbabaee & Ree 2011).

B. Simplisia

1. Pengertian

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain berupa bahan yang dikeringkan (Depkes RI 1986). Simplisia nabati adalah simplisia berupa tanaman utuh, bagian tanaman dan eksudat tanaman. Eksudat tanaman adalah isi sel yang spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dikeluarkan dari selnya dengan cara tertentu atau zat yang dipisahkan dari tanamannya dengan cara tertentu yang masih belum berupa zat kimia murni (Depkes RI 1979).

2. Tahap pembuatan simplisia

Cara pembuatan simplisia ada beberapa cara yaitu: sortasi basah, pencucian bahan, perajangan, pengeringan, sortasi kering pengepakan dan penyimpanan (Prasetyo & Inorah 2013).

2.1 Sortasi basah. Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Bahan asing yang dimaksudkan diantaranya tanah, rumput, kerikil, ranting, serta bagian tumbuhan yang digunakan. Tanah mengandung berbagai macam mikroba dalam jumlah yang tinggi.

Pembersihan simplisia yang teikut tanah ini bertujuan untuk mengurangi jumlah mikroba awal.

2.2 Pencucian bahan. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan kotoran lainnya yang melekat atau menempel pada bahan simplisia. Simplisia yang mudah larut dalam air diharapkan pencucian dilakukan secepat mungkin. Pencucian tidak dapat membersihkan simplisia dari semua mikroba karena air pencucian yang digunakan juga biasanya masih mengandung jumlah mikroba. Cara sortasi dan pencucian sangat mempengaruhi jenis dan jumlah awal mikroba pada simplisia.

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

2.4 Pengeringan. Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama, dengan cara mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik tertentu di dalam sel. Kadar air simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Pengeringan simplisia dilakukan menggunakan sinar matahari atau menggunakan suatu alat pengering. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama proses pengeringan adalah suhu pengeringan,

kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan, dan luas permukaan bahan. Pada pengeringan bahan simplisia tidak dianjurkan menggunakan alat dari plastik.

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi merupakan pemindahan massa zat yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga terjadi pemindahan larutan zat aktif ke dalam cairan penyari. Metode penyarian yang digunakan tergantung dari wujud dan kandungan zat dari bahan tumbuhan yang diekstraksi dan serta jenis senyawa yang diisolasi (Voigt 1994).

2. Pengertian ekstrak

Ekstrak adalah sediaan padat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang ditentukan (Depkes RI 1995).

3. Metode ekstraksi

Ragam metode ekstraksi yang tepat sudah tentu bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Jumlah dan jenis senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi yang berbeda sudah tentu berbeda, bergantung pada jenis tumbuhan. Cara penyarian atau ekstraksi dapat dibedakan menjadi infudasi, maserasi, perkolasi, dan soxhletasi. Sifat

dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi (Ansel 1989).

Pembuatan maserasi kecuali dinyatakan lain, lakukan sebagai berikut: masukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok kedalam sebuah bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup, dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, serkai, peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya (25 bagian) hingga diperoleh 100 bagian. Pindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Enap tuangkan atau saring (Depkes RI 1979).

4. Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu pemisahan suatu campuran berupa golongan senyawa. Fraksinasi merupakan ekstraksi cair-cair yaitu pemisahan suatu komponen kimia yang tidak saling campur diantara dua macam pelarut, dimana sebagian komponen larut dalam sebagian fase pertama, dan sebagian larut dalam fase kedua. Kedua fase yang mengandung zat terdispersi dikocok, kemudian diamkan 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. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non polar akan masuk ke dalam pelarut non polar (Harborne 1987).

5. Pelarut

Pemilihan pelarut untuk ekstraksi berdasarkan pada daya larut dari zat aktif, zat yang tidak aktif, zat yang tidak diinginkan dan tipe preparatnya (Ansel 1989).

5.1. Etanol 96%. Etanol merupakan pelarut serba guna yang baik untuk ekstraksi pendahuluan (Harborne 1987). Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih selektif, netral, tidak beracun, absorpsinya baik, kapang dan kuman sulit tumbuh, dan dapat bercampur dengan air dengan segala jenis perbandingan dan panas yang digunakan untuk pemekatan lebih sedikit. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, lemak malam, tannin dan saponin namun hanya sedikit yang larut (Depkes RI 1986).

5.2. *n*-Heksana. *n*-heksana merupakan salah satu hasil dari penyulingan minyak tanah kasar. Pelarut ini baik digunakan untuk minyak-minyak dan lemak-lemak (Syamsuni 2007). *n*-heksana merupakan pelarut non polar berupa cairan jernih, tidak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar mempunyai bau seperti eter lemah, praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol, mutlak dapat bercampur dengan eter, kloroform, benzene dan dengan sebagian besar minyak lemak, dan minyak atsiri. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa non-polar seperti lemak, steroid, terpenoid, keratonoid (Depkes RI 1979).

5.3. Air. Air merupakan pelarut polar yang dapat menyerupai senyawa-senyawa organik polar sehingga cocok digunakan dalam fraksinasi. Penggunaan air kurang menguntungkan karena beberapa zat aktif tidak ikut tersari seperti garam alkaloid, minyak menguap, glikosida tannin, dan gula, juga melarutkan gom, pati, enzim, lilin, lemak, pektin, zat warna dan asam organik (Depkes RI 1979).

Tabel 1. Indeks polaritas pelarut

| Pelarut | Indeks polaritas |
|---|-------------------------|
| <i>n</i> -heksana (C ₆ H ₁₄) | 0 |
| Etanol (C₂H₅) | 5,2 |
| Air (H₂O) | 9,0 |

(Watson 2009)

D. Kanker

1. Pengertian kanker

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol diikutidengan proses invasi ke jaringan sekitar dan penyebaran (metastasis) kebagian tubuh yang lain. Kanker pada dasarnya merupakan sel dengan proliferasi yang tak terkendali akibat kerusakan gen, utamanya padaregulator daur sel (Sher 1996). Kanker terjadi karena adanya proliferasi tak terkontrol yang terjadi tanpa batas yang akhirnya tumbuh menjadi malignan. Setiap kanker memiliki ciri yang unik, kanker muncul melalui beberapa proses yang sama yang pada akhirnya bergantung pada perubahan genetik (Corwin 2009).

2. Sifat sel kanker

Menurut Franks dan Teich (1998), sifat sel kanker diantaranya memiliki bentuk dan struktur sel bermacam-macam (*polymorph*) karena adanya perbedaan bentuk dan susunan dengan sel normal asalnya, maka dapat dibuat diagnosa patologi kanker. Kedua, tumbuh autonom sel kanker itu tumbuh terus tanpa batas (*immortal*), liar, terlepas dari kendali pertumbuhan normal sehingga terbentuk suatu tumor (benjolan) yang terpisah dari bagian tubuh normal. Ketiga, mendesak dan merusak

sel-sel normal disekitarnya. Sel-sel tumor itu mendesak (ekspansif) sel-sel normal disekitarnya, yang berubah menjadi kapsel yang membatasi pertumbuhan tumor.

Sel kanker tidak mengenal program kematian sel yang dikenal dengan nama apoptosis. Protein *p53* mampu mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong penghancuran sendiri dari sel yang mengandung DNA yang tidak normal, peristiwa ini disebut apoptosis. 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).

3. Siklus sel

Siklus sel merupakan proses perkembangbiakan sel yang memperantarai pertumbuhan dan perkembangan makhluk hidup. Setiap sel baik normal maupun kanker mengalami siklus sel. Siklus sel memiliki dua fase utama, yakni fase S (sintesis) dan fase M (mitosis). Fase S merupakan fase terjadinya replikasi DNA kromosom dalam sel, sedangkan pada fase M terjadi pemisahan 2 sel DNA kromosom tersebut menjadi 2 sel (Nurse 2000).

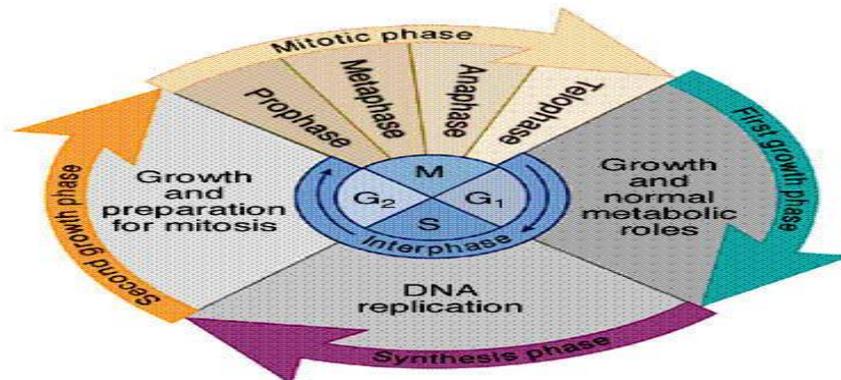
3.1 Fase G1 (*Growth phase-1/ Pasca Mitosis*). Fase ini dipersiapkan suatu interval dalam proses pembelahan sel dan dimulai dengan sintesis asam deoksiribonukleat (DNA) (Mulyadi 1997). Pada fase G1, sel anak baru berupa untai

tunggal DNA yang terbentuk setelah mitosis akan tumbuh menjadi sel dewasa membentuk protein, enzim, dan sebagainya. Sel yang berhenti tumbuh akan masuk ke fase G₀ (Sukardja 2000).

3.2 Fase S (*Synthetic phase/ Sintesis*). Pada fase ini dibentuk untai DNA yang baru melalui proses replikasi. Replikasi DNA terjadi dengan bantuan enzim DNA-polimerase, dengan dibentuknya DNA baru maka rantai tunggal DNA menjadi rantai ganda. Selama fase S juga berlangsung perbaikan DNA yang dapat mencegah berkembangnya generasi kanker. Fase ini kira-kira berlangsung selama 6-8 jam (Mulyadi 1997).

3.3 Fase G₂ (*Growth phase-2/ Pra Mitosis*). Fase G₂ terjadi proses pembentukan RNA, protein, enzim, dan sebagainya untuk persiapan fase M. Sel yang telah masuk dalam fase pra mitosis ini memiliki ciri sel berbentuk tetraploid, mengandung dua kali lebih banyak DNA (Nafriadi & Gan 2007).

3.4 Fase M (*Mitotic phase/ Mitosis*). Proses mitosis ini terjadi pengurangan sintesis protein dan RNA secara tiba-tiba, berlangsung pemisahan sel menjadi dua sel anakan dengan sifat dan karakteristik yang sama dengan induknya (Nafrialdi & Gan 2007). Berdasarkan morfologinya proses ini dapat dibagi menjadi 4 subfase, yaitu profase, metafase, anafase, dan telofase. Fase ini berlangsung sekitar 30-60 menit (Mulyadi 1997).



Gambar 2. Siklus sel (Berek & Natarajan 2007).

4. Apoptosis

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram yang penting dalam berbagai proses biologi melalui mekanisme genetik dengan kerusakan/fragmentasi kromosom atau DNA. Apoptosis dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu apoptosis fisiologis dan apoptosis patologis. Apoptosis fisiologis adalah kematian sel yang diprogram (*programmed cell death*) (Sudiana 2011).

Proses kematian sel erat kaitannya dengan enzim telomerase. Pada sel embrional, enzim ini mengalami aktivasi sedangkan pada sel somatik enzim ini tidak mengalami aktivasi, kecuali sel bersangkutan mengalami transformasi menjadi ganas. Telomer yang terletak pada ujung kromosom merupakan faktor yang sangat penting dalam melindungi kromosom. Pada sel normal, telomer akan memendek pada saat pembelahan diri. Apabila ukuran telomer mencapai ukuran tertentu (level kritis) akibat pembelahan berulang, maka sel tersebut tidak dapat melakukan pembelahan diri lagi. Selanjutnya sel akan mengalami apoptosis secara fisiologis. Pada sel ganas, pemendekan telomerase sampai pada level kritis tidak terjadi karena pada sel ganas

terjadi aktivasi dari enzim ribonukleoprotein (telomerase) secara terus menerus. Enzim ini sangat berperan pada sintesis telomer DNA, sehingga berbagai elemen yang dibutuhkan pada pembentukan telomer dapat dibentuk secara terus menerus dan ukuran telomer pada ujung kromosom dapat dipertahankan. Oleh karena itu, sel ganas dapat bersifat *immortal* (Sudiana 2011).

Apoptosis patologis adalah kematian sel karena adanya proses suatu rangsangan. Proses ini dapat melalui beberapa jalur, yaitu aktivitas *p53*, jalur sitotoksik, disfungsi mitokondria, dan kompleks fas dan ligan. Apoptosis dipicu oleh aktivitas *p53* karena sel memiliki gen cacat yang dipicu oleh banyak faktor, antara lain bahan kimia, radikal bebas, maupun virus (*oncovirus*). Gen yang cacat dapat memicu aktivitas beberapa enzim seperti PKC dan CPK-K2 yang dapat memicu aktivitas *p53*. *P53* adalah faktor transkripsi terhadap pembentukan *p21*. Peningkatan *p21* akan menekan semua CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) dengan *cyclin*, dimana siklus pembelahan sel sangat tergantung pada ikatan kompleks antara CDK dengan *cyclin* (Sudiana 2011).

5. Kanker payudara

Kanker payudara merupakan kanker yang menyerang jaringan epitelial payudara, yaitu membran mukosa dan kelenjar sehingga kanker payudara tergolong pada karsinoma. Penyebab kanker payudara sangat beragam, antara lain kerusakan pada DNA yang menyebabkan mutasi genetik. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh radiasi yang berlebihan. Selanjutnya karena kegagalan *immune surveillance* dalam

pengecahan proses malignan pada fase awal, faktor pertumbuhan yang abnormal, dan malfungsi DNA *repairs* seperti BRCA1, BRCA2, dan *p53* (Torosian 2002).

Perkembangan payudara mempengaruhi risiko terjadinya kanker payudara, keseimbangan antara proliferasi, diferensiasi dan kematian sel-sel kelenjar payudara berperan penting dalam proses perkembangan tersebut. Gangguan dalam keseimbangan ini akan dapat mengakibatkan terjadinya kanker (Kumar *et al.* 2000). Proses metastasis kanker payudara diinisiasi oleh adanya aktivasi/ekspresi berlebih beberapa protein, seperti Estrogen Reseptor (ER) dan c-erbB-2 (HER- 2) yang merupakan protein predisposisi kanker payudara. Aktivasi reseptor estrogen melalui ikatan kompleks dengan estrogen akan memacu transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel. Estrogen dapat memacu ekspresi protein yang berperan dalam siklus sel seperti *cyclin* D1, CDK4, *cyclin* E, dan CDK2. Selain itu, aktivasi reseptor estrogen mampu mengaktifasi beberapa onkoprotein yang berperan dalam sinyal pertumbuhan, misalnya Ras, Myc, dan *cycD1* (Foster *et al.* 2001).

Beberapa onkogen telah diketahui mempengaruhi karsinogenesis kanker payudara, diantaranya *Ras*, *c-myc*, *epidermal growth factor receptor* (EGFR, erb-B1), dan erb-B2 (HER-2/neu) (Greenwald 2002). Perubahan ekspresi maupun fungsi dari gen supresor tumor seperti *BRCA1*, *BRCA2* dan *p53* tidak sepenuhnya bertanggungjawab dalam tingginya prevalensi kanker payudara spontan. Mutasi atau ketiadaan *BRCA1* terdapat pada <10% kanker payudara, sementara itu mutasi *p53* terjadi pada lebih dari 30% kanker payudara (Bouker *et al.* 2005).

Beberapa jenis sel kanker payudara yang dapat dikultur adalah MCF-7, Ia-270, BT 20, BT-474, BT-549, Colo-824, HBL-100, MA-CLS-2, MDA-MB-231, MDA-MB 435S, MDA-MB-436, MB-MDA-468, MX-1, SK-BR-3, ZR-75-1, dan T47D (Pao *et al.* 1985; Anonim 2014). Banyaknya jenis sel kanker payudara ini akan memberikan hasil yang berbeda pada setiap selnya. Perbedaan hasil ini akan memberikan peluang baru untuk menyelidiki perkembangan yang terjadi pada resistensi obat pada pasien dengan tumor payudara yang memiliki *p53* termutasi (Schafer *et al.* 2000).

6. Pengobatan kanker

Pengobatan secara modern sekarang ini membutuhkan biaya yang tinggi, namun pengobatannya tidak spesifik dan menimbulkan efek samping yang cukup besar. Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan cara operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi dan kemoterapi, yang sekarang berkembang menjadi imunoterapi. Pengobatan ini ditujukan untuk membunuh sel-sel kanker sehingga tidak dapat berkembang dan membahayakan bagi tubuh (Diyah 2000).

6.1 Kemoterapi. Kemoterapi merupakan salah satu pengobatan yang bertujuan mematikan ataupun memperlambat pertumbuhan sel kanker. Jenis agen kemoterapi yang sering digunakan pada kanker payudara antara lain kemoterapi neoajuvan, ajuvan, dan paliatif (Yudissanta *et al.* 2012). Kemoterapi menimbulkan efek samping yang umum seperti anemia, anoreksia, ansietas, perdarahan, demam, infeksi, insomnia, nyeri, alopesia (rambut rontok) dan *herpez zoster*. Sehingga penggunaan obat-obat ini seringkali dikombinasi dengan obat-obat lain dengan

maksud untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan (Indrawati 2009). Beberapa pengobatan kemoterapi yang paling umum digunakan antara lain yaitu senyawa golongan antimetabolit seperti metotreksat yang bekerja dengan menghambat reduksi dari asam folat menjadi THFA (*Tetrahydro Folic Acid*) dengan efek samping utama penekanan sumsum tulang belakang. Golongan lain seperti antibiotika (sitotoksik) seperti doksorubisin bekerja dengan menghambat sintesis DNA dan RNA ini memiliki efek samping dapat merusak otot jantung dengan gagal jantung (Tjay & Rahardja 2006).

6.2 Radioterapi. Radiasi payudara diberikan sebagai *adjuvant* terhadap kasus-kasus kanker payudara stadium dini yang dilakukan *Breast Conserving Surgery* (BCS). Teknik radiasi dapat berupa tangensial 2D, 3D konformal dengan FIF (*Field in field*), ataupun teknik *Intensity Modulated Radiotherapy* (IMRT). Area radiasi meliputi seluruh jaringan payudara, dengan dosis 45-50 Gy dalam 23-25 fraksi atau 40-42.5 Gy dalam 15-16 fraksi. Booster pada tumor bed direkomendasikan dengan dosis 10-16 Gy dalam 2 Gy/fraksi, terutama untuk pasien risiko tinggi (usia <50 tahun atau derajat keganasan tinggi). Booster tersebut juga dapat diberikan dalam bentuk baik terapi atau elektron. Pemberian radiasi diberikan 5 kali seminggu (Depkes RI 2015^b).

6.3 Pembedahan. Tindakan pembedahan dimaksudkan untuk mengurangi ukuran tumor, meredakan nyeri, dan mencegah metastasis jika dilakukan sejak dini (Indrawati 2009). Terapi dipusatkan pada pengendalian lokal dan resiko penyebaran sistemik. Pengendalian lokal dengan *tylectomy* (pengangkatan benjolan dan

pengambilan kelenjar getah bening) sama efektifnya dengan *mastectomy* radikal dengan modifikasi (Woodley & Whelan 1995).

6.4 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).

7. Kandungan senyawa tanaman sebagai terapi kanker

Senyawa kimia pada tanaman terdapat dalam metabolit primer dan metabolit sekunder. Sebagian besar produk metabolit sekunder berfungsi sebagai agen pelindung terhadap berbagai pathogen atau molekul pengatur pertumbuhan (misalnya zat yang merangsang hormon atau menghambat pembelahan sel dan morfogenesis). Potensi obat antikanker memiliki fungsi-fungsi fisiologis, metabolit sekunder yang bekerja secara langsung pada sel kanker dengan memodulasi sehingga akan menghambat pertumbuhan sel kanker. Beberapa komponen metabolit pada tanaman yang memiliki khasiat antikanker (antitumor): aldehid, alkaloid, *annonaceous acetogenins*, flavonoid, glikosida, lignin, lipid, lipid (*unsaponified*), asam nukleat, fenol dan turunannya, polisakarida, protein, terpenoid, serta beberapa senyawa yang tidak teridentifikasi (Kintzios & Barberaki 2003).

E. Sel T47D

Sel kanker payudara T47D merupakan *continous cell line* yang morfologinya sama seperti sel epitel yang diambil dari jaringan payudara seorang wanita berumur

54 tahun yang menderita *ductal carcinoma*. Sel ini ditumbuhkan dalam media dasar penumbuh RPMI 1640 yang di dalamnya terkandung banyak nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam organik, glukosa, hormon pertumbuhan sel, albumin sebagai protein transport, lipid untuk pembentukan sel dan mineral sebagai kofaktor enzim. Media kultur sel biasanya berupa media kompleks yang terdiri dari RPMI yang kemudian ditambahkan dengan 0,2 U/ mL *bovine insulin* dan *Foetal Bovine Serum* (FBS) hingga konsentrasi akhir FBS dalam media 10%. Sel ditumbuhkan pada suhu 37⁰C lebih kurang 1⁰C dengan kadar CO₂ 5% lebih kurang 1% (ATCC 2012).

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

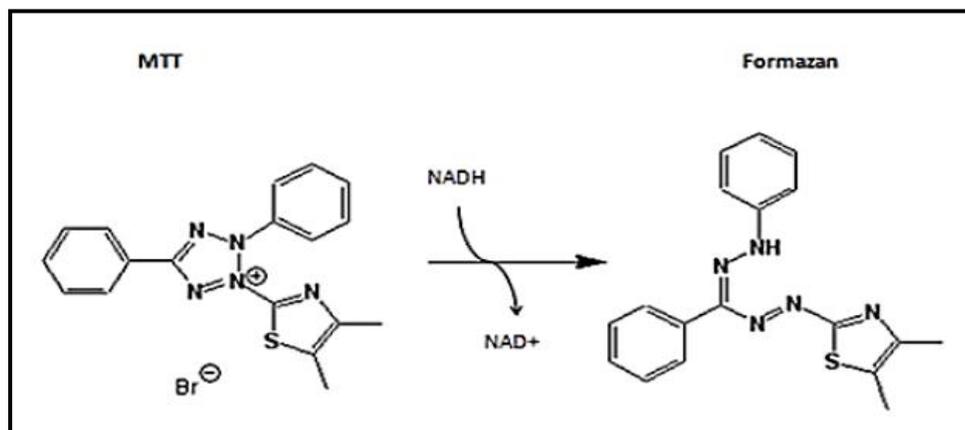
Sel T47D sering digunakan dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas atau cepat pertumbuhannya, memiliki homogenitas yang tinggi dan mudah diganti sel baru yang

telah dibekukan jika terjadi kontaminasi (Abcam 2007). Sel T47D memiliki mekanisme antiapoptosis dan karsinogenesis lebih kuat daripada sel MCF-7. Beberapa protein yang terlibat dalam stimulasi pertumbuhan sel ini termasuk caspase-3 subunit p12, protein nuklir Hcc-1, *G1/S-specific cyclin-D3*, cathepsin B, protein CDV3 homolog, N (G), *N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2*, dan prohibitin (Aka *et al.* 2012).

F. Metode Uji Sitotoksik MTT Assay

Uji MTT adalah uji sensitif, kuantitatif dan terpercaya. Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi seluler yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan (Basmal *et al.* 2009). Sel yang mengalami proliferasi, mitokondria akan menyerap MTT sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu akibat terbentuknya kristal tetrazolium (Formazan) (Depemede & Rosyidi 2009). Garam tetrazolium atau MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolium bromida*) yang berwarna kuning dimana akan dimetabolisme oleh enzim *suksinat dihidrogenase* yang terdapat pada mitokondria sel menjadi kristal formazan. MTT ditambahkan secara langsung pada plate yang berisi medium kultur sebanyak 10-100 μL dan diinkubasi selama kurang lebih 4 jam pada 37°C . Kristal formazan yang berwarna ungu yang terbentuk akan terlarut dengan penambahan isopropanolol asam 100 μL 0,04 N HCl dalam isopropanolol atau SDS 10% dalam HCl 0,01 N.

Prinsip uji MTT adalah untuk mengukur aktivitas seluler berdasarkan kemampuan enzim *mitokondria reduktase* pada mitokondria dalam mereduksi garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT). Ketika bermetabolisme sel-sel hidup akan menghasilkan *mitokondria reduktase*. Enzim ini bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka jumlah sel hidup semakin banyak (Junedi 2000). Kristal formazan bersifat *impermeable* pada membrane sel dan tidak larut dalam air sehingga biasanya ditambahkan dengan zat tambahan pelarut seperti isopropanol, DMSO, atau larutan SDS yang diencerkan dalam HCl untuk melarutkan kristal formazan ungu tersebut (Berata 2000).



Gambar 3. Reaksi reduksi MTT Assay (Doyle *et al.* 2000)

Kristal formazan yang memberi warna ungu ini kemudian dibaca absorbansinya dengan menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *Reader* (Pemilih 2009). 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 penghambatan proliferasi sel sebesar 50%. Nilai IC_{50} menentukan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik, dengan rentang standar $<100 \mu\text{g/mL}$. Semakin besar IC_{50} maka senyawa tersebut semakin kecil aktivitas sitotoksiknya atau tidak poten/ toksik. Rentan nilai IC_{50} bila $<10 \mu\text{g/mL}$ sangat aktif, $10-20 \mu\text{g/mL}$ aktif dan $>20 \mu\text{g/mL}$ dinyatakan kurang aktif, namun nilai IC_{50} $50-100 \mu\text{g/mL}$, tetapi berpotensi terhadap sel kanker (Freshney 2000).

G. Landasan Teori

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol diikuti dengan proses invasi ke jaringan sekitar dan penyebaran (metastasis) ke bagian tubuh yang lain. Perkembangan sel kanker dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya sehingga dapat menyebabkan kematian (Sher 1996).

Kanker payudara merupakan kanker yang menyerang jaringan epitelial payudara, yaitu membran mukosa dan kelenjar. Perkembangan payudara mempengaruhi risiko terjadinya kanker payudara, keseimbangan antara proliferasi, diferensiasi dan kematian sel-sel kelenjar payudara berperan penting dalam proses perkembangan tersebut. Gangguan dalam keseimbangan ini akan dapat mengakibatkan terjadinya kanker (Kumar *et al.* 2000).

Salah satu penyebab kanker payudara yaitu adanya kerusakan pada DNA yang menyebabkan mutasi genetik. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh radiasi yang berlebihan. Selanjutnya karena kegagalan *immune surveillance* dalam pencegahan proses malignan pada fase awal, faktor pertumbuhan yang abnormal, dan malfungsi DNA *repairs* seperti BRCA1, BRCA2, dan *p53* (Torosian 2002).

Pengobatan secara modern sekarang ini membutuhkan biaya yang tinggi, namun pengobatannya tidak spesifik dan menimbulkan efek samping yang cukup besar. Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan cara operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi dan kemoterapi, yang sekarang berkembang menjadi imunoterapi. Pengobatan ini ditujukan untuk membunuh sel-sel kanker sehingga tidak dapat berkembang dan membahayakan bagi tubuh (Diyah 2000).

Komponen utama pada biji pinang (*Areca catechu* L.) yaitu karbohidrat, lemak, serat, polifenol (flavonoid dan tanin) serta alkaloid dan mineral (IARC 2004). Biji pinang mengandung 0,3-0,6% alkaloid, seperti arekolin ($C_8H_{13}NO_2$), arekolidine, arekain, guvakolin, guvasine dan isoguvasine. Selain itu juga mengandung *red* tanin 15%, lemak 14% (palmitat, oleat, stearat, caproat, caprilat, laurat, asam miristat), kanji dan resin (BPOM RI 2010). Senyawa flavonoid yang terdapat pada biji pinang bekerja dengan penghambatan proliferasi dan mekanisme apoptosis (Meiyanto *et al.* 2008). Asam fenolat berperan dalam mencegah kanker dan antigenotoksik (Kampa *et al.* 2003). Senyawa alkaloid bersifat antineoplastik sehingga ampuh menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Agoes 2010). Senyawa tanin mempunyai aktifitas

sebagai antiproliferatif pada sel kanker yang bekerja pada tingkat sel yang dengan menghambat fase “S” dari siklus sel (Khanbabaee & Ree 2011).

Uji aktivitas sitotoksik yang telah dilakukan oleh Xing (2010), menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji pinang pada sel *line* SGC-7901 (sel kanker lambung) dan sel *line* SMMC-7721 (sel kanker hati manusia) dengan metode MTT didapatkan nilai IC_{50} sebesar 5,1 $\mu\text{g/mL}$ dan 9,3 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian lain yang dilakukan oleh A'yun (2010) menunjukkan hasil uji sitotoksitas secara *in vitro* terhadap sel leukemia L1210 diperoleh nilai IC_{50} ekstrak etanol biji pinang sebesar 24,7279 $\mu\text{g/mL}$.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksik fraksi *n*-heksana dan fraksi air terhadap kultur sel kanker payudara jenis T47D. Pengujian menggunakan sel kanker payudara ini didasarkan tingginya prevalensi kanker payudara terutama di Indonesia. Pengujian kali ini dilakukan menggunakan fraksi *n*-heksana dan fraksi air dari ekstrak etanol 96% kulit buah pinang. Penelitian menggunakan kulit buah pinang ini diharapkan dapat memberikan hasil yang maksimal dengan memanfaatkan bagian lain dari tanaman pinang. Uji MTT dalam penelitian ini dipilih sebagai metode uji sitotoksik dengan parameter berupa nilai IC_{50} yang akan ditentukan dengan mengukur (%) kehidupan sel dan pembentukan kristal formazan. Rentan nilai IC_{50} bila $<10 \mu\text{g/mL}$ sangat aktif, 10-20 $\mu\text{g/mL}$ aktif dan $>20 \mu\text{g/mL}$ dinyatakan kurang aktif, namun nilai IC_{50} 50-100 $\mu\text{g/mL}$, tetapi berpotensi terhadap sel kanker (Freshney 2000).

H. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini yaitu:

1. Fraksi *n*-heksana kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$.
2. Fraksi air kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara T47D dan memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$.
3. Perbandingan antara fraksi *n*-heksana dan fraksi air yang paling baik dalam aktivitas sitostatikya.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah kumpulan semua elemen atau individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah pinang yang diperoleh dari Nusa Tenggara Timur yang ditanam dan dibudidayakan di Desa Topobali Kabupaten Flores Timur.

Sampel adalah representasi populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah pinang yang segar dan sudah matang.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah adalah fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang yang akan diuji aktifitas terhadap kultur sel kanker payudara T47D.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi pada penelitian ini diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang dengan sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang yang diujikan pada sel kanker payudara T47D.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik sel kanker payudara T47D dengan menghitung jumlah sel yang mati.

Variabel terkendali adalah variabel yang dianggap berpengaruh, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu, tekanan inkubator, lama inkubasi, kondisi laboratorium seperti kebersihan dari ruangan dan instrumen laboratorium, konsentrasi sampel uji, keadaan sel T47D, kerapatan T47D, dan peneliti sendiri.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji pinang adalah bagian kulit dari buah pinang yang sudah matang, berwarna hijau kekuningan, diperoleh dari Nusa Tenggara Timur yang ditanam dan dibudidayakan di Desa Topobali, Kabupaten Flores Timur.

Kedua, fraksi *n*-heksana kulit buah pinang adalah ekstrak kental berupa hasil fraksinasi dari ekstrak etanol kulit buah pinang dengan menggunakan pelarut *n*-heksana dengan metode ekstraksi cair-cair.

Ketiga, fraksi air adalah ekstrak kental hasil sisa fraksinasi dari fraksi etil asetat menggunakan pelarut air, dengan metode ekstraksi cair-cair.

Keempat, aktivitas sitotoksik adalah kemampuan senyawa untuk membunuh sel kanker setengah dari jumlah populasi yang diukur berdasarkan parameter IC_{50} dengan nilai parameter $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$.

Kelima, sel kanker payudara T47D yang digunakan adalah *continuous cell line* koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, dimana kultur sel ditumbuhkan dalam media dasar penumbuh RPMI 1640 yang mengandung FBS 10%, penisillin-streptomisin (Penstrep) 2% dan *fungizone* 0,5%.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, di antaranya: alat penyari terdiri atas bejana maserasi, kain flanel, ayakan no. 40, batang pengaduk, blender, corong pisah, klem & batang statip, *moisture balance* O'haus MB23, kertas saring, eksikator, timbangan elektrik, corong Buchner, oven, evaporator dan alat gelas.

Alat uji sitotoksik meliputi tangki nitrogen cair, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), *autoclave*, inkubator 37°C aliran CO_2 5% model 6200 (Napco), *laminar air flow class II* (Labconco), spektrokolorimeter pada alat ELISA *reader* (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), tabung konikal steril (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), *mikroplate* 96 sumuran (Nunclone), lampu ultraviolet, neraca elektrik (Sartorius), mikropipet 20-200 μL dan

200-1000 μ L (Pipetman), mesin *vortex*, mikroskop *inverted* (Axiovert-25), *magnetic stirrer* dan kamera digital.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah serbuk kering kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) dan ekstraksi menggunakan etanol 96%, serta pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air untuk fraksinasi.

Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker payudara *cell line*; T47D; media stok: RPMI 1640 (Gibco); media kultur sel: media RPMI 1640 (Gibco), NaHCO_3 , *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin (Penstep) 2% v/v (Gibco), *Fungizone* (Amphoterasin B) 0,5% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, MTT 5mg/mL dalam PBS; media pencuci sel: larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,2; *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penghenti (*stopper*).

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman kulit buah pinang

Penelitian ini diawali dengan menetapkan kebenaran tanaman atau melakukan identifikasi 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, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan, pengeringan bahan, dan pembuatan serbuk

Kulit buah pinang diperoleh pada bulan Juni 2016 dari Kabupaten Flores Timur, Nusa Tenggara Timur. Pengambilan kulit buah pinang dilakukan pada saat sudah matang dan buah belum pecah. Buah pinang yang siap dipanen kemudian dikupas bagian kulitnya dan diambil bagian kulit buah pinang, dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan cemaran kemudian ditiriskan.

Kulit buah pinang yang sudah dibersihkan, kemudian dirajang untuk memperkecil ukuran sehingga cepat kering, selanjutnya dilakukan pengeringan menggunakan oven suhu 40⁰C. Kulit buah pinang yang sudah kering, digiling, kemudian diayak menggunakan ayakan nomor *mesh* 40. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah kering tertutup rapat dan dilakukan pemeriksaan secara organoleptis dan selanjutnya digunakan untuk penelitian.

3. Pemeriksaan organoleptis serbuk kulit buah pinang

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

4. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk kulit buah pinang dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, pengujian 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 105⁰C selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pembacaan sampai muncul angka

dalam persen. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana kadar air suatu serbuk simplisia <10%.

5. Pembuatan ekstrak etanol kulit buah pinang

Ekstrak etanol kulit buah pinang dibuat dengan metode maserasi. Serbuk kulit buah pinang yang sudah jadi ditimbang sebanyak 500 gram lalu dimasukkan dalam wadah gelap ditambah dengan etanol 96% sebanyak 3750 mL. Wadah diaduk, ditutup kemudian disimpan dalam ruangan yang terhindar dari cahaya matahari selama 5 hari dan sering diaduk. Setelah 5 hari, maserat disaring menggunakan kertas saring dan cuci ampas dengan etanol 96% sebanyak 1250 mL hingga diperoleh 5000 mL. Filtrat ditampung dalam bejana dan dibiarkan ditempat sejuk terlindung dari cahaya selama 2 hari. Endapan disaring, filtrat ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu maksimal 50⁰C sampai pelarut etanol habis. Ekstrak etanol kulit buah pinang selanjutnya dilakukan pemeriksaan organoleptis pada ekstrak kental.

6. Pembuatan fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang

Ekstrak etanol yang telah diperoleh dari penyarian sebanyak 20 gram ditambahkan dengan 200 mL *aquadest* (1:10), kemudian dipartisi menggunakan pelarut *n*-heksana sebanyak 200 mL. Campuran larutan kemudian dikocok di dalam corong pisah secara perlahan-lahan sehingga menghindari proses penyabunan, selanjutnya didiamkan dan ditunggu hingga terjadi pemisahan sempurna antara lapisan *n*-heksana dan lapisan air. Proses partisi dengan 200 mL pelarut *n*-heksana dilakukan sebanyak 3 kali. Lapisan *n*-heksana dipisahkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50⁰C sampai diperoleh fraksi *n*-heksana kental.

Lapisan air dari hasil partisi dengan *n*-heksana dimasukkan ke dalam corong pisah dan dipartisi lagi dengan 200 mL pelarut etil asetat. Didiamkan dan ditunggu hingga terjadi pemisahan sempurna antara lapisan etil asetat dan lapisan air. Proses partisi dengan 200 mL pelarut etil asetat dilakukan sebanyak 3 kali. Lapisan etil asetat dipisahkan kemudian sisa lapisan air ditampung. Hasil lapisan air (sisa) ditampung dan dipekatkan dengan *water bath* sampai diperoleh fraksi air kental.

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

Kandungan senyawa yang terdapat di dalam serbuk simplisia, ekstrak etanol kulit buah pinang diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing.

7.1 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 RI 1979).

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

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

7.4 Identifikasi fenolik. Pengujian dilakukan dengan cara sampel dilarutkan dengan akuadest secukupnya lalu ditambahkan dengan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1%, hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau, biru atau ungu (Harborne 1987).

7.5 Identifikasi steroid dan terpenoid. Pengujian dilakukan dengan menggunakan larutan uji sampel sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan porselen. Residu dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Asam sulfat pekat sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Ciulei 1984).

8. Identifikasi kualitatif senyawa dengan metode KLT

Profil senyawa fenolik, flavonoid dan alkaloid dapat dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase gerak dipilih berdasarkan hasil optimasi fase gerak terlebih dahulu. Sampel dilarutkan dengan pelarut sebelumnya, kemudian ditotolkan pada plat silika gel GF_{254} . Plat dimasukkan dalam *chamber* dengan fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1). Setelah itu plat disemprot dengan pereaksi sitroborat, Dragendorff, FeCl_3 dan Liebermann-Burchad. Deteksi bercak dilakukan pada UV 254 nm dan pada UV 366 nm (Harborne 1987).

Deteksi flavonoid dilakukan dengan penyemprotan sitroborat memberikan hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning yang cepat pudar (Depkes 1987). Deteksi alkaloid dengan penyemprotan Dragendorff dan memberikan

hasil positif apabila muncul bercak merah bata (Meiyanto *et al.* 2008). Deteksi bercak fenolik dilakukan dengan pereaksi FeCl_3 10%, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam (Marliana 2007). Deteksi terpenoid dengan penyemprotan Liebermann-Burchard, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu kemerahan menandakan adanya senyawa terpenoid dan terbentuk warna biru atau ungu menandakan adanya senyawa steroid (Harborne 1987).

9. Uji sitotoksik

9.1. Sterilisasi alat. Alat-alat gelas yang akan digunakan harus berada dalam keadaan steril. Alat dicuci dan dikeringkan. Alat-alat kering tersebut dibungkus dengan kertas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15-30 menit pada suhu 121°C .

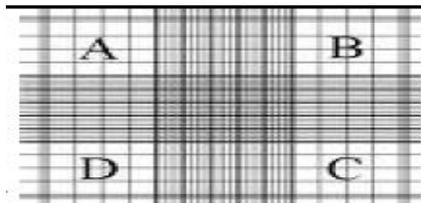
9.2. Pembuatan media stok RPMI 1640 dan media komplet RPMI 1640. Media padat RPMI disiapkan, kemudian dimasukkan 950 mL *aquabidest* steril dalam gelas beker 1 liter di dalam LAF. Media bubuk dituang ke dalam *aquabidest* steril ke dalam gelas beker, aduk hingga rata. Bagian dalam pembungkus media bubuk dibilas dengan *aquabidest*, tuang cairannya kedalam gelas beker di atas. NaHCO_3 ditambahkan sebanyak 2,2 gram untuk setiap liter media yang dibuat, diaduk rata. *Aquabidest* steril ditambahkan hingga volume 1 liter. Media padat dan NaHCO_3 diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga semua dapat larut. *Adjusting* pH dilakukan (seharga 0,2-0,3 dibawah pH yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Filtrasi media dilakukan dengan menggunakan filter 0,2 mikron, tampung ke dalam botol Duran 500 mL. Media diberi penanda dan simpan di kulkas dengan

suhu 4⁰C. 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* (Amphoterisin) 0,5%.

9.3. Pembuatan larutan uji. Sebanyak 10 mg fraksi *n*-heksana dan fraksi air ditimbang selanjutnya dilarutkan dengan 100 µL 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 dibuat dalam variasi konsentrasi (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,63 µg/mL dan 7,81 µg/mL), dipipet sebanyak 100 µL ke dalam tiap sumuran dengan 4 kali pengulangan 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 37⁰C) 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 komplit RPMI 1640 dengan FBS 10%. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (2-3 buah) dan diamati di bawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel. Sel hidup kelihatan bulat, jernih dan bersinar. *Flask* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO₂ 5% pada suhu 37⁰C. 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 (*Phosphat Buffer Saline*) kurang lebih 7 mL sebanyak 2 kali. Kemudian ditambahkan tripsin $\frac{1}{2}$ dari jumlah PBS. Diinkubasi selama 3-5 menit, lalu diamati pelepasan sel dari dasar *flask* dengan mikroskop. Sel dipipet masuk ke *conical* steril, ditambah media penumbuh sebanyak 2-3 mL untuk menghentikan kerja tripsin. Sel dilakukan pencampuran dengan pipet sampai sel terlepas, kemudian diamati keadaan sel di mikroskop. Sel yang terlepas dipindahkan ke dalam tabung *conical* baru dan disisakan sedikit di dalam *flask* yang kemudian ditambahkan media kultur 2-3 mL, diresuspensikan. Suspensi sel diambil 10 μ l dan dipipetkan ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted*.



Gambar 4. Skema bilik hitung dalam *Haemocytometer*

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung (A, B, C, dan D), setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Sel dihitung pada 4 kamar hemositometer, 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 (Nugroho *et al.* 2012) :

$$\sum \frac{\text{sel}}{\text{mL}} = \frac{\Sigma \text{ sel A} + \Sigma \text{ sel B} + \Sigma \text{ sel C} + \Sigma \text{ sel D}}{4} \times 100 \% \quad (1)$$

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

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

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 CO₂ 5% (37⁰C) selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan.

9.6. Treatment sel (pemberian ekstrak dan MTT). Sumuran-sumuran yang berisi sel tersebut ditambahkan 100 µL larutan uji yaitu fraksi *n*-heksana dan fraksi air yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81) µg/mL tiap sumuran. Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media komplet RPMI. Sebagai kontrol media digunakan hanya larutan uji media komplet RPMI . Kemudian sel tersebut diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media masing-masing sumuran dibuang dengan cara *microplate* dibalikkan 180⁰C di atas tempat buangan kemudian *plate* ditekan untuk meniriskan sisa cairan. Setelah itu, ditambahkan 100 µL MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu, sedangkan sel yang mati akan memberikan warna kuning. Untuk menghentikan

reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100 μ L SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasikan semalaman 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.

E. Analisis Hasil

1. Uji sitotoksitas

Hasil uji sitotoksik berupa respon serapan dikonversikan ke dalam persen kehidupan sel dengan persamaan sebagai berikut:

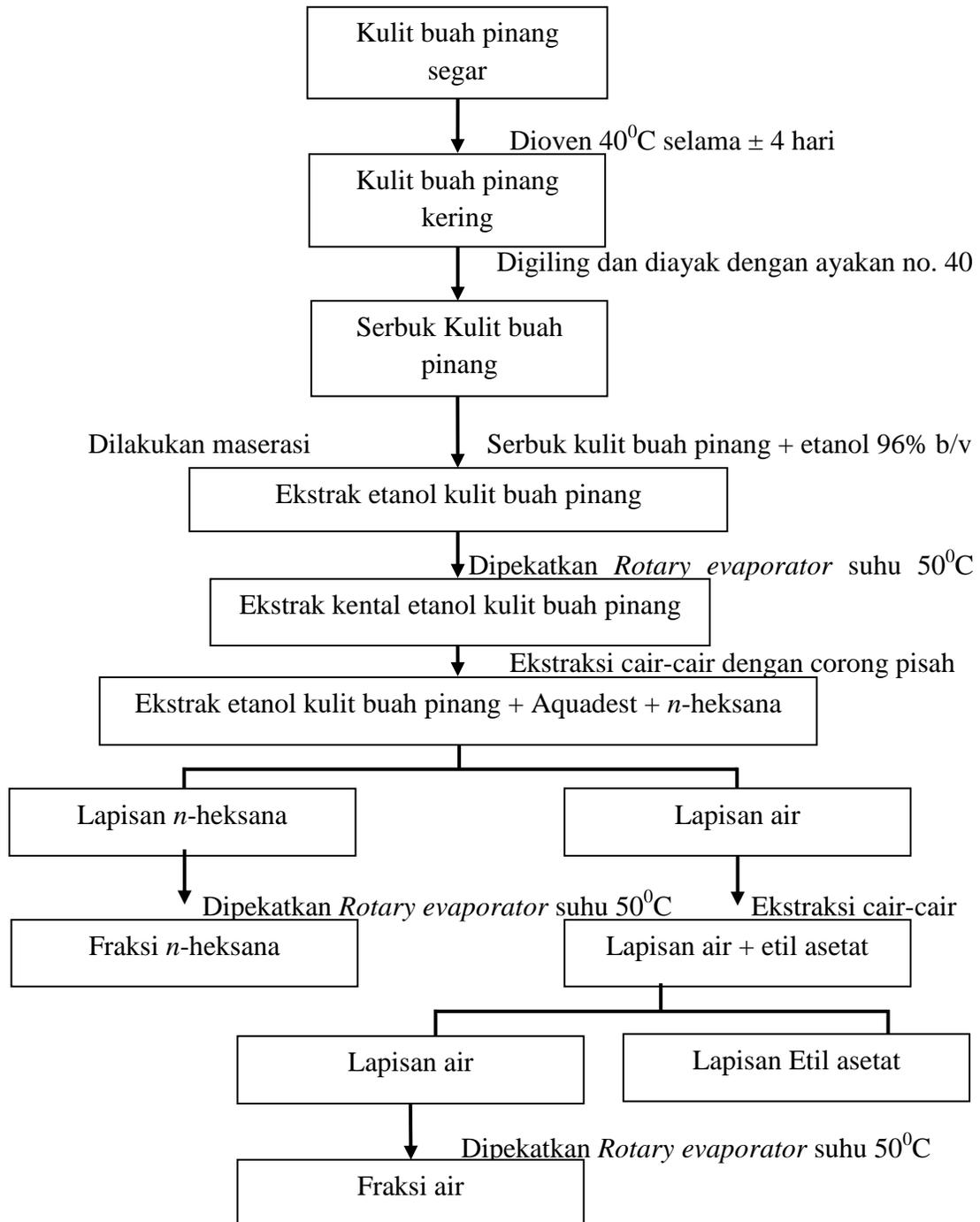
$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{(\text{abs sel perlakuan} - \text{abs kontrol media})}{(\text{abs kontrol sel} - \text{abs kontrol media})} \times 100\% \quad (3)$$

Dilanjutkan analisis untuk menentukan regresi linear antara log konsentrasi sampel uji (Fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang) *versus* persen sel hidup menggunakan *Microsoft Excel* 2010, hingga akan didapatkan persamaan:

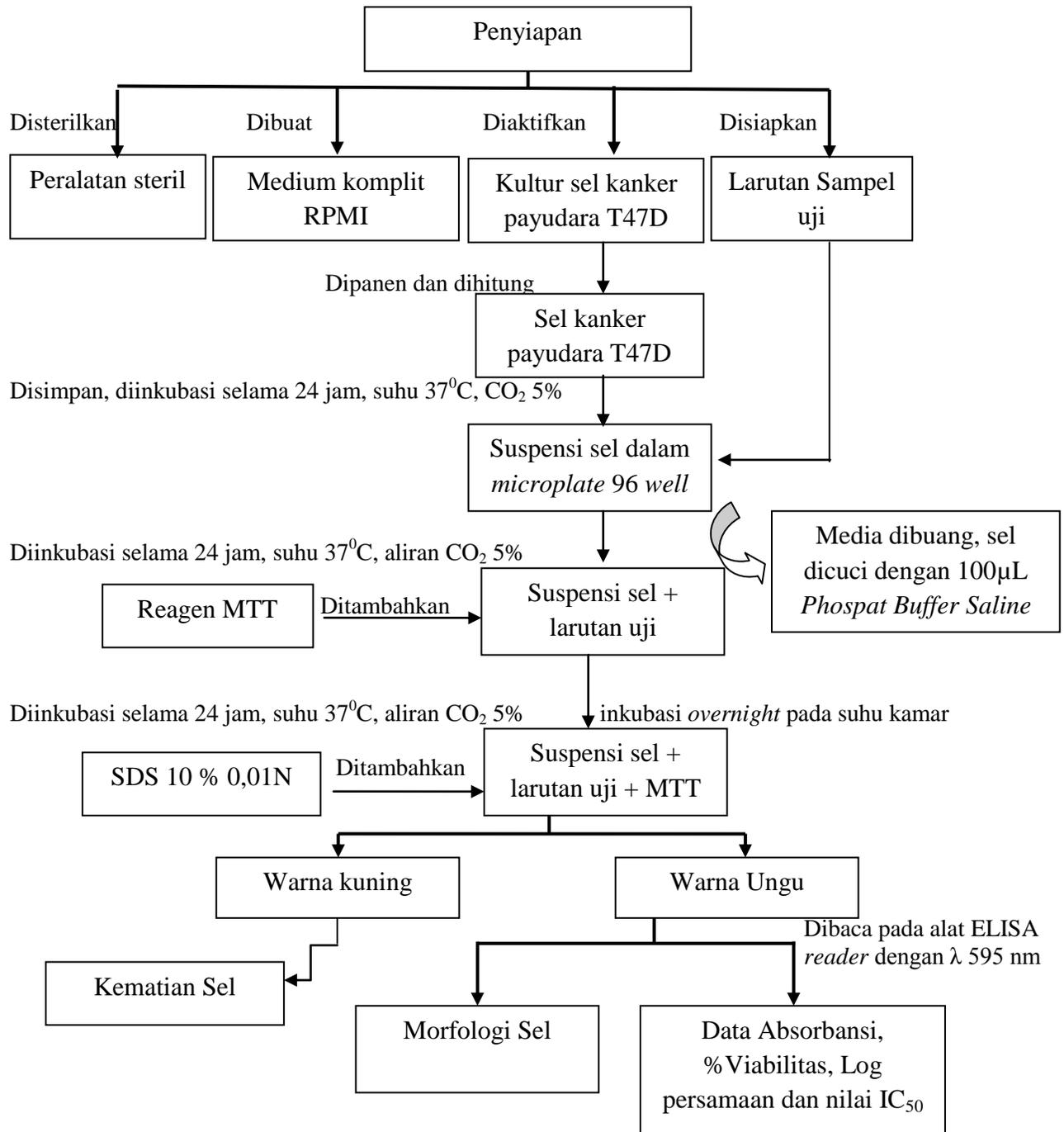
$$Y = a + bx \quad \boxed{\text{Keterangan: } Y = \text{Log konsentrasi sampel uji; } X: \% \text{ Viabilitas sel}}$$

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

Analisis lanjutan untuk melihat adanya keefektifitasan pada kedua fraksi dilakukan analisis *Independent T-test* menggunakan SPSS versi 17.



Gambar 5. Skema pembuatan fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang (*Areca catechu* L.).



Gambar 6. Skema uji sitotoksik fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) terhadap sel kanker payudara T47D.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Identifikasi tanaman kulit buah pinang

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

2. Pengumpulan, pengeringan bahan, dan pembuatan serbuk

Tanaman buah pinang yang akan digunakan merupakan buah yang matang dengan ciri berwarna kuning kemerahan kemudian dilakukan sortasi kering terlebih dahulu, untuk memisahkan sampel dengan pengotor atau bagian tanaman lain yang terbawa bersama sampel. Proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan sampel dengan tanah atau debu. Perajangan pada kulit buah pinang bertujuan untuk memperkecil ukuran sampel sehingga mudah untuk dilakukan pengeringan. Proses pengeringan kulit buah pinang bertujuan dari pengeringan ini adalah mencegah terjadinya proses kimiawi yang terjadi pada sampel dan mencegah sampel dari kerusakan akibat bakteri dan jamur. Berat sampel basah kulit buah pinang yang didapat dari proses sebelumnya sekitar 1200 gram, sedangkan sampel kering yang didapat setelah proses pengeringan yaitu sebanyak 650 gram. Data rendemen berat

kulit buah pinang kering dapat dilihat pada Tabel 2 dan perhitungan lengkap rendemen kulit buah pinang kering dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 2. Hasil perhitungan rendemen kulit buah pinang

| Berat basah (g) | Berat basah (g) | Rendemen (%) |
|------------------------|------------------------|---------------------|
| 1200 | 650 | 54,17 |

3. Pemeriksaan organoleptis serbuk kulit buah pinang

Proses pembuatan serbuk bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel sampel dan memperluas permukaan sehingga pada saat ekstraksi berlangsung dapat meningkatkan kontak antara pelarut dan serbuk sampel, sehingga zat yang terekstrak pun dapat ditarik dengan maksimal. Serbuk yang diperoleh selanjutnya diperiksa secara organoleptis yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk kulit buah pinang

| Organoleptis | Hasil |
|---------------------|----------------------|
| Bentuk | Serbuk serabut kasar |
| Warna | Kuning kecoklatan |
| Bau | Khas pinang |
| Rasa | Agak sepat |

4. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan dalam penelitian ini dilakukan pada serbuk kulit buah pinang dan juga pada ekstrak etanol kulit buah pinang. Pengujian dilakukan Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Hasil penetapan Penetapan susut pengeringan serbuk kulit buah pinang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk kulit buah pinang

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

Berdasarkan data pada tabel 4 rata-rata susut pengeringan serbuk kulit buah pinang sebesar 8,9 %. Hal ini menunjukkan susut pengeringan serbuk dan ekstrak etanol kulit buah pinang memenuhi syarat dimana kadar air suatu serbuk simplisia <10%, yang memungkinkan terhentinya proses enzimatis pada sampel dan dengan kadar air yang rendah ini menghindarkan sampel dari adanya pembusukan oleh bakteri maupun jamur (Prasetyo & Inorih 2013).

5. Pembuatan ekstrak etanol kulit buah pinang

Pembuatan ekstrak etanol kulit buah pinang dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi dengan menggunakan metode maserasi. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Mokoginta *et al.* (2013) menggunakan metode sokletasi, didapatkan ekstrak kulit biji pinang Yaki dengan kandungan flavonoidnya sangat rendah. Proses pemanasan dapat mengurangi kadar flavonoid karena adanya proses oksidasi. Pemilihan dengan metode diharapkan akan menghindarkan senyawa aktif (flavonoid) yang tidak tahan terhadap pemanasan. Metode ini biasanya digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung bahan aktif yang mudah larut dalam pelarut dan tidak mudah mengembang dalam cairan penyari (Voigt 1994).

Pemilihan etanol 96% merupakan pelarut serba guna (*universal*) yang baik untuk ekstraksi pendahuluan (Harborne 1987). Hasil yang didapat berupa ekstrak cair

berwarna hijau pekat yang kemungkinan merupakan zat klorofil yang ikut tersari dalam kulit buah pinang. Data rendemen ekstrak kulit buah pinang dapat dilihat pada Tabel 5 dan hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 5. Hasil perhitungan rendemen ekstrak kulit buah pinang

| Berat serbuk (g) | Berat ekstrak (g) | Rendemen (%) |
|------------------|-------------------|--------------|
| 500 | 31,7406 | 6,35 |

Tabel 6. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol kulit buah pinang

| Organoleptis | Hasil |
|--------------|-------------------------|
| Bentuk | Ekstrak kental |
| Warna | Hijau pekat, kecoklatan |
| Bau | Khas pinang |

6. Pembuatan fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang

Pembuatan fraksi *n*-heksana kulit buah pinang dilakukan menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan menggunakan corong pisah. Prinsip kerja dari metode ekstraksi cair-cair yaitu adanya adanya kesetimbangan senyawa di antara dua pelarut yang saling tidak bercampur. *n*-heksana merupakan pelarut non polar yang diharapkan dapat melarutkan senyawa-senyawa non-polar seperti terpenoid dan steroid secara maksimal. Sedangkan air merupakan pelarut polar yang mampu menarik senyawa-senyawa bersifat polar seperti fenolik dan flavonoid dalam ekstrak.

Hasil fraksi *n*-heksana yang didapat dari proses ekstraksi yaitu sebanyak 5,023 gram dengan % rendemen sebesar 15,83%. Fraksi air kulit buah pinang merupakan hasil sisa ekstraksi cair-cair. Hasil fraksi air kulit buah pinang kental yang didapatkan dari ekstraksi sebanyak 9,245 gram dengan % rendemen fraksi air sebanyak 29,13 %.

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

Identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak kulit buah pinang dilakukan dengan melihat adanya perubahan warna dengan penambahan reagen pereaksi tertentu, seperti terjadinya perubahan warna atau endapan yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam serbuk maupun ekstrak. Identifikasi dilakukan dengan menambahkan serbuk dan ekstrak dengan pereaksi yang sesuai dan diamati perubahannya. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 7.

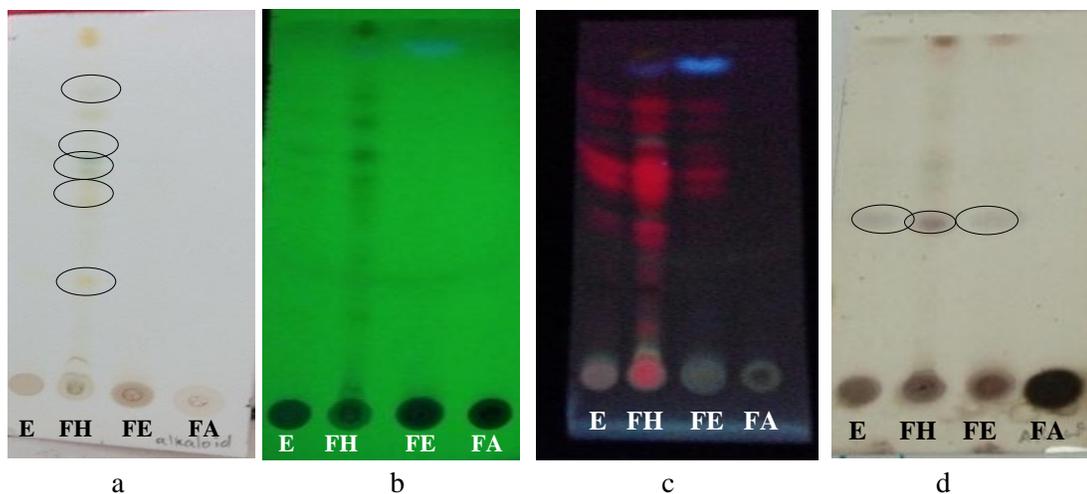
Tabel 7. Hasil Identifikasi kandungan senyawa

| Senyawa | Hasil identifikasi | Pustaka | Kesimpulan |
|---|--|--|--------------------|
| Terpenoid / steroid | Cincin kecoklatan (terpenoid) Cincin biru (steroid) | Cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan (terpenoid) Cincin biru kehijauan (steroid) | Positif |
| Alkaloid (Reagen Mayer) (Dragondroff) | Endapan kuning Endapan warna merah | Endapan kuning Endapan warna merah | Positif Positif |
| Fenolik | Warna hijau | Warna hijau, biru atau ungu | Positif |
| Tannin | Terbentuk endapan | Terbentuk endapan | Positif |
| Flavonoid | Warna merah | Warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol | Positif |

8. Identifikasi kualitatif senyawa dengan metode KLT

Identifikasi kualitatif senyawa kimia pada ekstrak dan fraksi dilakukan pengujian lanjutan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Pengujian ini dilakukan untuk memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan perbedaan kecepatan

migrasi komponen atau senyawa-senyawa yang dibawa oleh fase gerak dan ditahan secara selektif oleh fase diam. Pengujian kualitatif dengan metode KLT menggunakan fase diam silica gel GF₂₅₄. Pengujian ini diawali dengan optimasi fase gerak. Berdasarkan hasil optimasi, toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1) dipilih sebagai fase gerak. Hal ini didasarkan pada pola pemisahan senyawa yang teramati melalui deteksi bercak pada sinar UV 254 dan 366 nm. Penyemprotan dilakukan dengan pereaksi Sitroborat, Dragendorff, FeCl₃ dan Liebermann-Burchard. Hasil identifikasi KLT dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. a) Sebelum penyemprotan, b) Deteksi sinar UV 254, c) Deteksi sinar UV 366, d) Setelah penyemprotan Liebermann-Burchard. 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 8. Hasil identifikasi fraksi *n*-heksana dan fraksi air secara KLT

| Kandungan senyawa | Fase gerak | Rf | | | | | |
|-------------------|--|---------|--------------------------|------------|---------|--------------------------|------------|
| | | Ekstrak | Fraksi <i>n</i> -heksana | Fraksi air | Ekstrak | Fraksi <i>n</i> -heksana | Fraksi air |
| Fenolik | Toluen : etil asetat : dietilamin (7 : 2 : 1) | - | - | - | - | - | - |
| Flavonoid | | - | - | - | - | - | - |
| Alkaloid | | - | - | - | - | - | - |
| Terpenoid | | 0,50 | 0,45 | - | Ungu | Ungu | - |

Penyemprotan menggunakan pereaksi sitroborat bertujuan untuk mengidentifikasi flavonoid memberikan perubahan warna menjadi kuning yang cepat pudar. Pada penyemprotan dengan Dragendorff untuk identifikasi alkaloid tidak menunjukkan hasil yang signifikan (positif jika berwarna merah bata). FeCl_3 untuk identifikasi fenolik juga tidak terlalu memberikan hasil yang signifikan dimana terbentuk warna hitam, namun bercak yang terbentuk tidak terlalu terlihat jelas. Penyemprotan Liebermann-Burchard untuk identifikasi terpenoid/ steroid dengan penyemprotan ini dapat menunjukkan hasil yang berupa terbentuknya warna ungu kemerahan. Bercak yang terbentuk dilakukan perhitungan Rf.

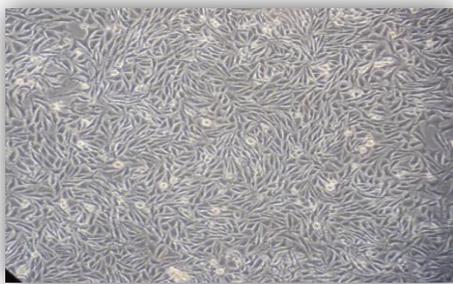
Hasil yang didapatkan berupa Rf ekstrak sebesar 0,50 cm; Rf fraksi n-heksana sebesar 0,47 cm dan Rf fraksi etil asetat sebesar 0,45 cm, sedangkan pada fraksi air tidak muncul bercak. Berdasarkan hasil perhitungan ini juga, nilai Rf yang berdekatan pada ekstrak, fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dimungkinkan bahwa adanya kandungan senyawa yang sama pada proses pemisahan.

9. Uji sitotoksik

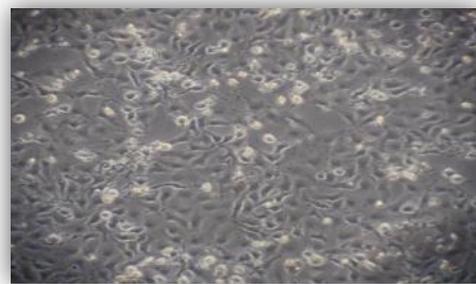
Pengujian sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada pada Juli 2016. Sel kanker payudara yang digunakan berupa kultur sel kanker payudara T47D. Kultur sel merupakan salah satu teknik untuk mengembangkan sel diluar tubuh (*in vitro*). Penggunaan kultur sel mempunyai keuntungan yaitu lingkungan tempat hidup sel dapat dikontrol dan diatur sehingga kondisi fisiologis dari kultur relatif konstan. Adapun kelemahan dari teknik ini adalah sel yang dikultur mengalami perubahan

sifat karena perkembangbiakan sel di dalam tubuh (*in vivo*) bekerja secara terintegrasi dalam suatu jaringan, sedangkan dalam kultur sel terpisah-pisah (Zairisman 2006).

Pengujian sitotoksik secara garis besar dibagi menjadi empat tahapan. Tahap pertama yaitu melakukan kulture sel dengan cara sel kanker payudara T47D ditumbuhkan dalam media kultur RPMI. Pencucian menggunakan PBS yang bertujuan untuk menghilangkan sel-sel yang tidak sehat serta menghilangkan kandungan zat dalam media RPMI yang tertinggal, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin (Maulana 2010). Proses penambah tripsin dan diinkubasi selama 5 menit, tujuannya yaitu untuk membiarkan sel berpenetrasi dengan tripsin yang 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). Morfologi sel kanker payudara T47D normal (awal) dan setelah pemberian tripsin (Gambar 8).



a

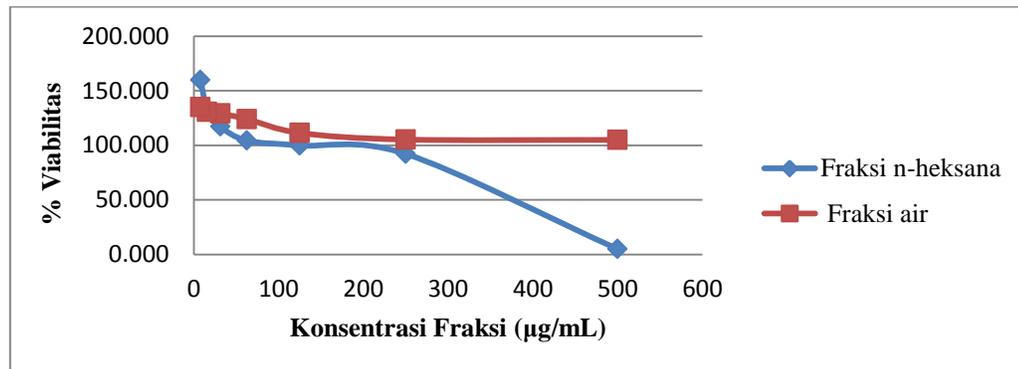


b

Gambar 8. a) Morfologi sel kanker payudara T47D normal, b) Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian tripsin.

Pada penelitian ini jumlah sel kanker hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur adalah $101,75 \times 10^4$ sel. Kemudian dilakukan pengenceran suspensi untuk mendapatkan konsentrasi sel kanker payudara T47D untuk 96 sumuran dimana tiap sumuran sebanyak 100 μL /sumuran. Pada tahap kedua dilakukan *treatment* sampel menggunakan sampel uji fraksi *n*-heksana dan fraksi air. DMSO berfungsi sebagai *buffer* agar fraksi dapat larut dengan baik. Pelarut DMSO (*dimetil sulfoksida*) digunakan secara luas untuk melarutkan senyawa polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik. Seri konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 500 $\mu\text{g/mL}$; 250 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$; 62,5 $\mu\text{g/mL}$; 31,2 $\mu\text{g/mL}$; 15,6 $\mu\text{g/mL}$; 7,81 $\mu\text{g/mL}$.

Pengujian sitotoksik pada tahap ketiga yaitu tahap pengujian dengan MTT *Assay*. Sel-sel yang masih hidup akan menghasilkan enzim *mitokondria reduktase* yang selanjutnya akan bereaksi dengan cara mereduksi MTT sehingga membentuk kristal formazan yang berwarna ungu. Kristal formazan bersifat *impermeable* pada membrane sel dan tidak larut dalam air sehingga ditambahkan dengan zat tambahan pelarut SDS yang bertujuan untuk melarutkan kristal formazan ungu tersebut. Tahap keempat yaitu pembacaan absorbansi perlakuan. Data hasil absorbansi selanjutnya dilakukan penyajian hubungan antara % viabilitas sel terhadap konsentrasi fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang (Gambar 9).



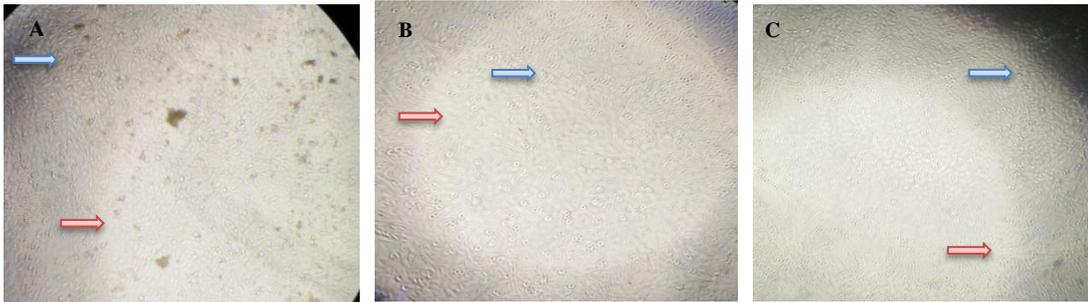
Gambar 9. Grafik hubungan % viabilitas sel terhadap konsentrasi fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang.

Persentasi viabilitas sel menunjukkan persentasi kehidupan sel setelah dilakukan perlakuan. Grafik hubungan pada kelompok perlakuan fraksi *n*-heksana menunjukkan terjadinya penurunan persentasi kehidupan sel pada konsentrasi tinggi. Hal ini menunjukkan adanya kemampuan dari senyawa yang terkandung dalam fraksi *n*-heksana yang berperan dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker. Pada grafik kelompok perlakuan dengan fraksi air tidak terlihat adanya penurunan yang menunjukkan bahwa dengan perlakuan dengan fraksi air kurang efektif dalam penghambatan sel kanker. Hal ini akan diidentifikasi lebih lanjut menggunakan perhitungan lebih lanjut pada nilai IC_{50} yang dapat dilihat pada Lampiran 11.

Penentuan sitotoksik suatu senyawa dapat dilakukan dengan melihat nilai IC_{50} . Pada penentuan nilai IC_{50} dilakukan dengan regresi linear pada konsentrasi sampel. Kelompok perlakuan dengan fraksi *n*-heksana didapatkan persamaan regresi linear $Y = -67.006x + 222.01$ dengan nilai $r = 0.8083$. Nilai r merupakan koefisien korelasi yang menunjukkan linearitas dan menunjukkan seberapa besar kemampuan semua variabel bebas dalam menjelaskan varians dari variabel terikatnya. Harga nilai

r sebesar 0,61-0,80 tergolong interpretasi cukup (Scheffler 1987). Pada persamaan linear tersebut didapatkan nilai IC_{50} sebesar 377,543 $\mu\text{g/mL}$. Menurut Freshney (2000) rentan nilai IC_{50} bila $<10 \mu\text{g/mL}$ sangat aktif, 10-20 $\mu\text{g/mL}$ aktif dan $>20 \mu\text{g/mL}$ dinyatakan kurang aktif, namun nilai IC_{50} 50-100 $\mu\text{g/mL}$ dinyatakan kurang aktif, tetapi berpotensi terhadap sel kanker. Berdasarkan kriteria tersebut kelompok perlakuan fraksi *n*-heksana dengan nilai IC_{50} sebesar 377,543 $\mu\text{g/mL}$ tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel kanker payudara T47D. Pada pengujian sebelumnya menggunakan fraksi *n*-heksana buah pinang pada sel kanker T47D didapatkan nilai IC_{50} sebesar 39 $\mu\text{g/mL}$ (Meiyanto 2007). Berdasarkan data ini dapat disimpulkan bahwa buah pinang memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih baik dibandingkan dengan kulit buah pinang.

Kelompok perlakuan dengan fraksi air didapatkan persamaan regresi linear $Y = -18.889x + 154$ dengan nilai $r = 0.9413$. Pada persamaan linear tersebut didapatkan nilai IC_{50} sebesar 380.851,935 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan kriteria rentan nilai IC_{50} diatas kelompok perlakuan fraksi air tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D. Hal ini juga ditunjukkan dengan pengamatan fisik pada *microplate*, dimana pada kelompok perlakuan dengan fraksi air tidak menunjukkan perubahan warna kuning (adanya hambatan pertumbuhan sel). Gambaran morfologi sel kanker payudara T47D setelah perlakuan dengan sampel (Gambar 10).



Gambar 10. Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian fraksi kulit buah pinang. (A) Fraksi *n*-heksana konsentrasi 500 µg/ mL; (B) Fraksi air konsentrasi 500 µg/ mL (C) Kontrol sel kanker payudara T47D. (⇨ sel hidup, ⇨ sel mati).

Pada gambar di atas menunjukkan gambaran morfologi penyebaran dari sel kanker payudara T47D setelah diberikan perlakuan dan konsentrasi fraksi yang berbeda-beda. Kelompok perlakuan menggunakan fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 500 µg/ mL menunjukkan kemampuan dalam penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker, hal ini terlihat pada pengamatan dengan mikroskop *inverted* dimana kepadatan selnya tidak terlalu banyak dibandingkan dengan kepadatan pada konsentrasi lainnya.

Penelitian yang dilakukan oleh Yenjit (2010) menunjukkan kandungan senyawa yang terdapat pada kulit buah pinang (*Pericarp*) dari hasil ekstraksi menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan methanol pada pengujian secara *in vitro* diindikasikan mengandung senyawa terpenoid yaitu triterpenoid di antaranya fornenol (fern-9(11)-en-3 α -ol), arundoin ((fern-9(11)-en-3 α -olME) dan campuran dari stigmasterol dan β -sitosterol, asam lemak dan asam laurat. Berdasarkan pengujian kualitatif dengan metode KLT positif menunjukkan adanya senyawa

terpenoid/ steroid pada fraksi *n*-heksana, dimana terbentuk warna ungu kemerahan dengan penyemprotan dengan pereaksi Liebermann-Burchard.

Senyawa terpenoid yang terdapat pada pinang dapat memblok siklus sel pada fase G₂ dengan menstabilkan benang-benang spindel pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat, selain itu juga mampu menghambat enzim topoisomerase pada sel mamalia. Enzim topoisomerase pada sel Tipe I dan tipe II bekerja dengan mengendorkan lilitan DNA dupleks (rantai ganda), sadanya enzim helikase selanjutnya bekerja dengan memotong ikatan hidrogen antara asam basa penyusun DNA sehingga lilitan rantai ganda menjadi terbuka (Pratiwi 2008). Inhibitor enzim topoisomerase akan menstabilkan kompleks topoisomerase dan DNA terbuka menyebabkan terjadinya kerusakan DNA akibat penghambatan pada proses replikasi, hal ini juga menyebabkan terekspresinya protein proapoptosis yang dapat memacu terjadinya apoptosis (Miranti 2014).

Pada kelompok fraksi air berdasarkan hasil uji sitotoksik tidak memberikan efek sitotoksik pada sel kanker payudara T47D. Hal ini dimungkinkan karena sebagian besar senyawa aktif yang berperan sebagai agen sitotoksik seperti fenolik dan flavonoid (Meiyanto 2007) telah ditarik pada saat proses fraksinasi oleh pelarut etil asetat yang memiliki kemampuan semipolar. Senyawa fenolik dan flavonoid memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara T47D melalui penghambatan kinetika proliferasi dan induksi apoptosis melalui aktivasi Caspase-3 tanpa meningkatkan ekspresi protein Bax. Pada identifikasi senyawa dengan metode KLT senyawa fenolik dan flavonoid tidak memunculkan bercak, dikarenakan konsentrasi

senyawa yang sangat kecil yaitu 3,16 mg/Kg (Ismail 2012) dan 2,57 mg/Kg (Ikroma 2014). Selain kandungan senyawa yang sedikit pada pengujian sitotoksik, sifat sangat polar dari kelompok fraksi air menyebabkan senyawa akan sulit menembus membrane sel kanker yang bersifat nonpolar (hidrofobik). Sel kanker terdiri dari membrane sel dengan penyusun berupa P-glikoprotein yang merupakan pelindung sel dan bersifat hidrofobik sehingga obat yang masuk biasanya mengalami *bypassing* atau adanya *efflux* pengeluaran obat (Wei *et al.* 2015).

Penelitian ini selain mengetahui nilai IC_{50} dari fraksi *n*-heksana dan fraksi air juga mencari keefektivitasan yang paling baik antara kedua fraksi tersebut. Untuk itu perlu dilakukan analisis menggunakan SPSS yang diawali dengan melihat distribusi sampel menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* yang didapatkan signifikansi fraksi *n*-heksana $0,648 > 0,05$ sedangkan pada fraksi air didapatkan signifikansi $0,952 > 0,05$. Hal ini dapat disimpulkan kedua data pada fraksi *n*-heksana maupun fraksi air terdistribusi normal dan dapat dilakukan analisis lanjutan dengan *Independent sampel T-test* yang bertujuan untuk membandingkan rata-rata dari dua grup yang tidak berhubungan satu dengan yang lainnya dengan melihat parameter nilai signifikansinya.

Pada *output* hasil analisis didapatkan nilai F untuk absorbansi dengan *Equal variances assumed* untuk mengetahui adanya asumsi kesamaan kedua varians, didapatkan hasil sebesar 2,202 dengan nilai probabilitas dilihat berdasarkan nilai signifikansi yaitu sebesar 0,164. Hasil ini menunjukkan probabilitas $> 0,05$ sehingga H_0 diterima atau menunjukkan kedua varians (Fraksi *n*-heksana dan fraksi air) adalah tidak berbeda signifikan

dalam aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D. Hasil uji analisis *Independent T-test* dapat dilihat pada Lampiran 14.

Evaluasi keamanan sampel kulit buah pinang dilakukan dengan pengukuran nilai indeks selektivitas yang dilakukan pada ekstrak etanol kulit buah pinang. Indeks selektivitas mengindikasikan selektivitas sitotoksik (keamanan) ekstrak dari kultur sel kanker payudara T47D terhadap sel normal (sel vero), yang dihitung dengan membandingkan IC_{50} ekstrak terhadap sel normal (sel vero) dan IC_{50} ekstrak terhadap sel kanker. Berdasarkan hasil pengujian didapatkan nilai indeks selektivitas ekstrak etanol kulit buah pinang terhadap sel kanker payudara T47D sebesar 0,437. Menurut Prayong *et al.* (2008), ekstrak dikatakan memiliki selektivitas yang tinggi apabila nilai indeks selektivitas > 3 . Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang memiliki indeks selektivitas yang rendah atau tidak selektif terhadap sel normal.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Fraksi *n*-heksana kulit buah pinang tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel kanker payudara T47D, dinyatakan dengan nilai IC₅₀ sebesar 377,543 µg/ mL.
2. Fraksi air kulit buah pinang tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel kanker payudara T47D, dinyatakan dengan nilai IC₅₀ sebesar 380.851,935 µg/ mL.
3. Fraksi *n*-heksana dan fraksi air kulit buah pinang sama-sama menunjukkan tidak memiliki efek sitotoksik yang lebih baik terhadap sel kanker payudara T47D.

B. Saran

1. Perlu dilakukan uji lebih lanjut terkait kandungan senyawa kulit buah pinang dengan menggunakan metode pengujian lainnya, sehingga didapatkan pemisahan yang lebih baik.
2. Perlu dilakukan pengujian sitotoksik kulit buah pinang dengan menggunakan sel kanker lainnya.

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.
- Aka J.A, Lin X.S. 2012. Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF-7. *Proteomic Analyses of Breast Cancer Cell Lines*. 7(2): e31532.
- Anonim. 2014. Cell Line Service. http://www.cellineservice.de/content/e3969/e4254/e4256/index_eng.htm. [28 Februari 2016].
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Ed ke-4. Farida Ibrahim, penerjemah. Jakarta: UI Press.
- ATCC. 2012. *Thawing, Propagating and Cryopreserving of NCI-PBCF-HTB133 (T-47D, ATCC HTB-133) cells breast carcinoma*. [23 Maret 2016 pkl 12.44 AM].
- A'yun Q. 2010. Uji sitotoksitas ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap sel leukemia (L1210) secara *in vitro*. [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Basmal J, Amini S, Sugiyono M. 2009. *Seminar Nasional Pengelolaan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta. Hal 208
- Berek J.S, Natarajan S. 2007. Ovarian and fallopian tube cancer, in: *Berek & Novak's Gynecology*. 14th. Ed. California: Lippincott William & Wilkins. p.1457-1531.
- [BPOM RI] Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2010. *Acuan Sediaan Herbal*. Edisi Pertama. Jakarta: Direktorat Obat Asli Indonesia.
- [CCRC] Cancer Chemoprevention Research Centre. 2009^a. *Protokol Uji sitotoksik*. CCRC Fakultas Farmasi UGM. <http://ccrcfarmasi.ugm.wordpress.com/protokol>. [28 Februari 2016 pukul 08.55 AM]
- [CCRC] Cancer Chemoprevention Research Centre. 2009^b. *Protokol Pembuatan Media Kultur*. CCRC Fakultas Farmasi UGM. <http://ccrcfarmasi.ugm.wordpress.com/protokol>. [28 Maret 2016 pukul 09.47 AM].

- Ciulei J. 1984. *Methodology for Analysis of Vegetable and Drug*. Bocharest Rumania: Faculty of Pharmacy.
- Conze D, Weiss L, Regen P.S, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, and Rincon M. 2001. Autocrine production of interleukin 6 causes multi drug resistance in breast cancer cells. *Cancer Research*. 61. 8851–8858.
- Corwin E.J. 2009. *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi III. Subekti N B, penerjemah. Jakarta Penerbit Buku Kedokteran. Terjemahan dari : LippincottWilliams & Wilkins.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Farmakope Indonesia. Edisi III*. Jakarta: Depkes RI.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia. Edisi IV*. Jakarta: Depkes RI.
- [DEPKES RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2001. *Inventaris Tanaman Obat. Jilid I*. Jakarta: Depkes RI.
- Depamede S. N, Rosyidi A. 2009. Penghambatan proliferasi limfosit mencit Balb/C oleh ekstrak testis sapi Bali peran TGF- β . *Media peternakan*. 32(2): 95-103.
- Diyah N.W, Sukohardjono. 2000. Antikanker. Dalam: *Kimia Medicinal*. edisi II. Surabaya: Airlangga University Press.
- Doyle A, Griffiths JB. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York: John Willey and Sons Ltd.
- Filbert, Koleangana S.J, Runtuwenea R.J, Kamu VS. 2014. Penentuan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀ ekstrak metanol dan fraksi hasil partisinya pada kulit biji pinang yaki (*Areca vestiaria* Giseke). *Jurnal Mipa Unsrat*. (3) 2: 149-154.
- Franks L.M, Teich N.M. 1998. *Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Third edition. New York: Oxford University Press Inc. Hal. 4-19.
- Freshney RI. 2000. *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique*. New York : John Willey & sonc. Inc Publication.
- Foster JS, Henley DC, Ahamed S, dan Wimalasena J. 2001. Estrogens and daur sel regulation in breast cancer. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* 12: 320-327.

- Greenwald P. 2002. Cancer Chemoprevention. *BMJ*. 324:714-718.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Ed ke-2. Padmawinata K dan Soediro I, penerjemah. Bandung: Penerbit ITB.
- Indrawati M. 2009. *Bahaya Kanker bagi Wanita dan Pria*. Cetakan pertama. Jakarta: Pendidikan untuk Kehidupan.
- [IARC] International Agency for Research on Cancer / WHO. 2012. *GLOBOCAN: Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012*.
- Ismail J, Runtuwene M.R.J, Fatimah F. 2012. Penentuan total fenolik dan uji aktivitas antioksidan pada biji dan kulit buah pinang yakni (*Areca vestiaria* Giseke). *Jurnal Ilmiah Sains*. 12 (2): 84-88.
- Junedi S, Susidarti R.A, Meiyanto E. 2010. Naringenin meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin pada sel kanker payudara T47D melalui induksi apoptosis. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 8(2): 85-90.
- [KEMENKES RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. *Riset kesehatan dasar*. Jakarta: Depkes RI.
- [KEMENKES RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015^a. *Situasi penyakit kanker*. Jakarta: Depkes RI.
- [KEMENKES RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015^b. *Panduan Nasional Penanganan Kanker*. Jakarta: Kemenkes RI.
- [KEMENKES RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015^c. *Pusat data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Khanbabaee K, Ree TV. 2001. Tannins classification and definition. *Nat Prod Rep*. 18: 641.
- Kintzios SE, Barberaki MG. 2005. *Plant That Fight Cancer*. United States of America : CRC Press LLC.
- Kampa M, *et al*. 2003. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res*. 6. R63-R74.
- Kumar V, Abas A.K, dan Foustro N. 2005. *Pathology Basic of Disease*. New York: Elsevier Inc. halaman 270-336.

- Mamonto S. I, Runtuwene M.R.J, Wehantouw F. 2014. Aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji buah pinang yaki (*Areca vestiaria* Giseke) yang di ekstraksi secara soklet. *Pharmacon: Jurnal Ilmiah Farmasi*. UNSRAT (3) 3: 263-272.
- Meiyanto E. 2008. Ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca cathecu* Linn) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*. 19 (1): 12-19.
- Miranti. 2014. Uji potensi anti kanker ekstrak biji pinang merah dan implementasinya dalam pembelajaran mitosis. [Artikel Penelitian]. Jakarta: Fakultas FKIP MIPA. Universitas Tanjungpura.
- Nefrialdi, Sulistia G. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. (cetak ulang dengan tambahan, 2012). Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI. Jakarta: Badan Penerbit FKUI Hal 732-739.
- Nugroho A.E, Hermawan A, Putri D.P, Novika A, Meiyanto E. 2012. Combinational Effect of Hexan Insoluble Fraction of *Ficus septica* Burn F. and Doxorubicin Chemotherapy on T47D Breast Cancer Cell. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 2:1-6.
- Nurse P. 2000. A Long Twentieth Century of The Cell Cycle and Beyond. *Cell*. 100: 71-78.
- Pao M.L, Clamon G, MacIndoe J, White M, Hukku B, Peterson W.D. 1985. Development of a new human breast cancer line Ia-270. *Breast Cancer Researh and Treatment*. 5(1): 23-29.
- Prasetyo, Inorih E. 2013. *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan*. Bengkulu : Badan Penerbitan Fakultas Pertanian UNIB.
- Ramli M. 2000. *Kanker Tiroid Penatalaksanaan Diagnosis dan Terapi*. Dalam Ramli H, Umbas, dan Danogoro S. 2000. *Deteksi Dini Kanker*. Jilid III. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Schafer J.M, Lee E.S, O'Regan R.M, Yao K, Jordan V.C. 2000. Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice. *Clinical Cancer Research*. 6: 4373-4380.
- Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science*. 6;274(5293):1672-7.
- Sudiana I.K. 2011. *Patobiologi Moleuler Kanker*. Jakarta: Salemba Empat. Halaman 1, 45-52.
- Sukardja D.G. 2000. *Onkologi Klinik*. Edisi 2. Surabaya: Airlangga University Press.

- Syamsuni H.A. 2007. *Ilmu Resep*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Tan T.H, Rahardja K. 2006. *Obat-Obat Penting*. Edisi VI. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Torosian M.H. 2002. *Breast Cancer: A Guide to Detection and Multidisciplinary Therapy*. New Jersey: Humana Press. Halaman 5-9.
- Trease GE, Evan WC. 1996. *Pharmacognosy*. 14th edition. London: Saunders, Company.
- Voigt R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Soewandhi SN, Widiyanto MB, penerjemah. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. Terjemahan dari : *Lehrbuchder Pharmazeutischen Technologie*.
- Watson D.G. 2009. *Analisis Farmasi*. Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi. Edisi 2. Diterjemahkan oleh Winny R. Syarif. Jakarta: EGC.
- Woodley M, Whelan A. 1995. *Pedoman Pengobatan*. Edisi I. Yogyakarta: Yayasan essentia Medica dan Penerbit andi Offset. Hal :571-572.
- Xing Z, Jiao W, Zhuang H, Wenli M. 2010. Antioxidant and cytotoxic phenolic compounds of areca nut (*Areca catechu* L.). China: *Academy of tropical Agricultural Sciences*.
- Yudissanta A, Ratna M. 2012. Analisis Pemakaian Kemoterapi pada Kasus Kanker Payudara dengan Menggunakan Metode Regresi Logistik Multinomial (Studi Kasus Pasien di Rumah Sakit "X"). Surabaya: *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 1(1): D112-D117.

Lampiran 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: 564/A.E-I/LAB.BIO/VI/2016

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

Nama : Nur Atik Hidayah

NIM : 18144362 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 |

| | |
|---------|---|
| | pangkal dan bunga jantan di bagian atasnya sampai ke ujung. ♀ panjang ± 1,5 cm, berwarna hijau, bakal buah beruang 1. ♂ panjang ± 4 mm, berwarna putih kekuningan, stamen atau benang sari 6. |
| 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 : 394/ V / HREC /2016

*The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine
Sebelas
Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas
Sebelas Maret*

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

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

UJI SITOTOKSIK FRAKSI N-HEKSANA DAN FRAKSI AIR KULIT BUAH PINANG
(ARECA CATECHU L.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

Principal investigator : Nur Atik Hidayah
Peneliti Utama 18144362A

Location Of Research : FK UGM
Lokasi Tempat Penelitian

**Is ethically approved
Dinyatakan laik etik**

Issued on : 04 Mei 2016

Chairman
Ketua



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

Lampiran 3. 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/275/M/05/07 13 Juli 2016
 Hal : Ijin Penelitian.

Kepada Yth. : NUR ATIK HIDAYAH
 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 FRAKSI n-HEKSANA DAN FRAKSI AIR 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. Alat dan bahan penelitian**A. Alat**

Botol maserat



Rotary Evaporator



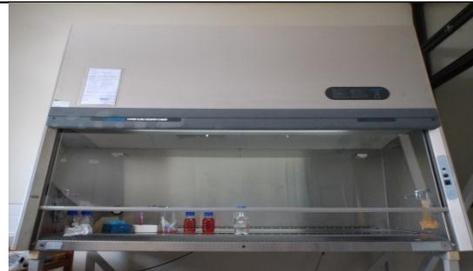
Mesin penggiling serbuk



Moisture balance



Mikroskop inverted



Laminar Air Flow



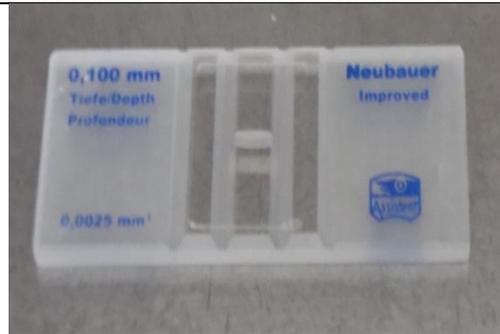
Oven



Micropipet



Counter hand



Haemocytometer



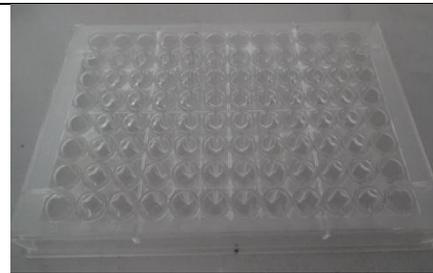
Bio Cane



Vortex



ELIZA Reader



Microplate



Ependrof



Yellow tip

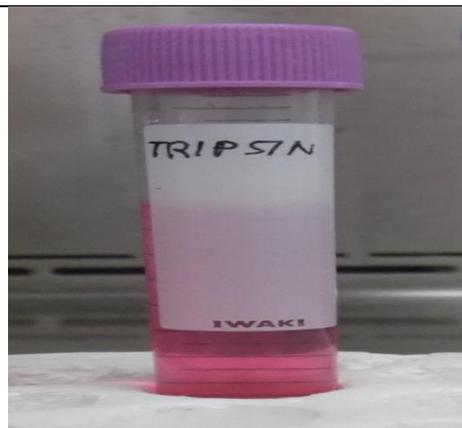
B. Bahan



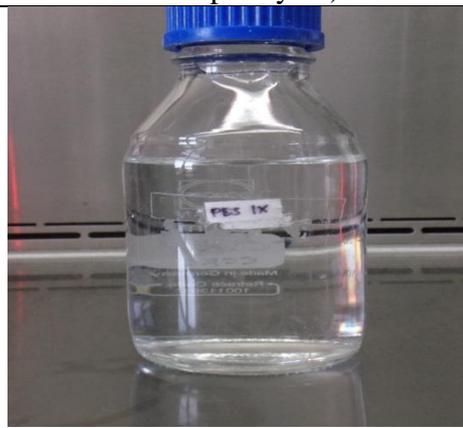
Media RPMI dan M199



Bahan tambahan MK (Fungizone, Amphoteresin, Penicilin-Streptomycin)



Tripsin



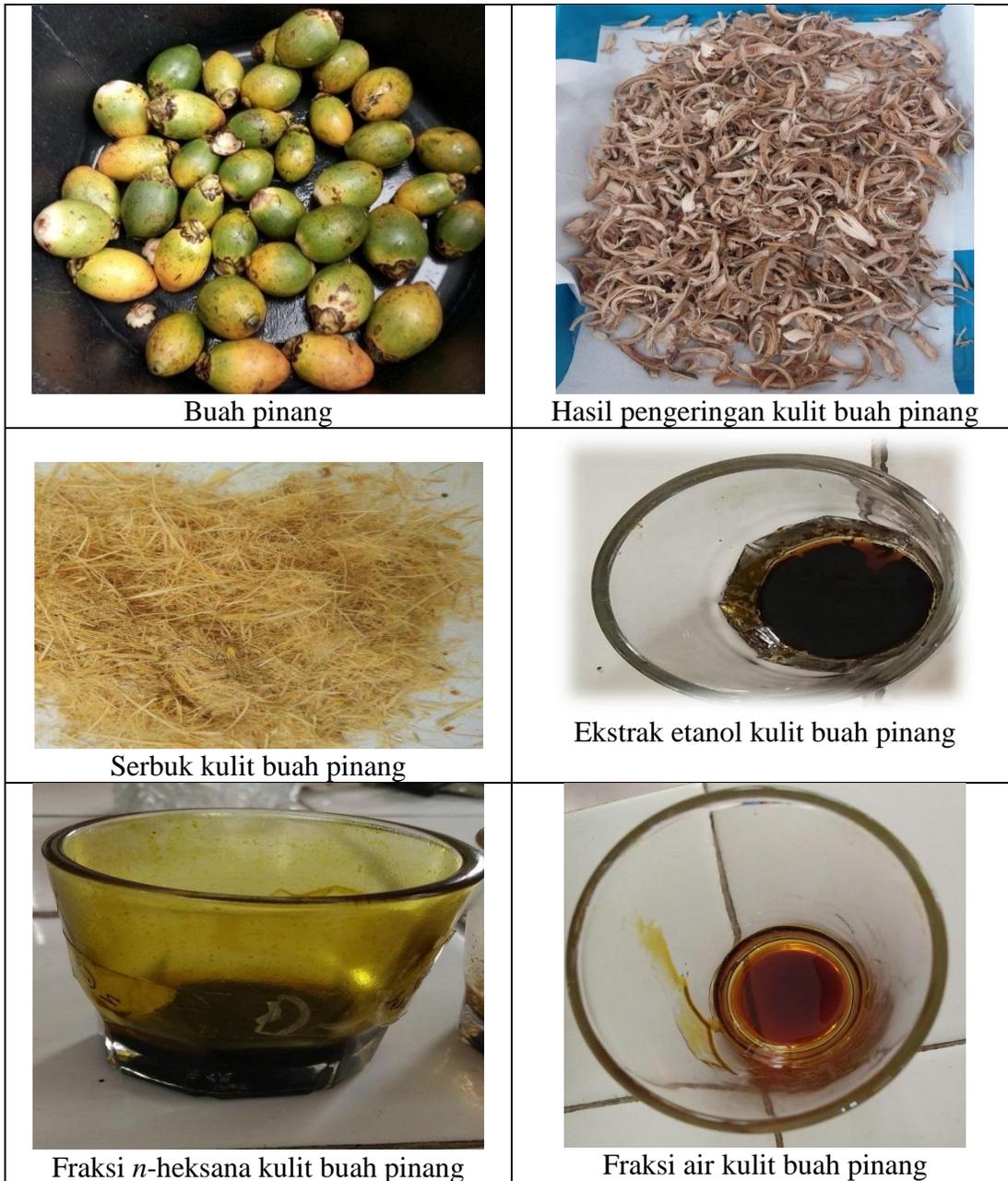
PBS (*Phospat Buffer Saline*)



DMSO



Sampel Fraksi *n*-heksana dan air

Lampiran 5. Sampel serbuk, fraksi *n*-heksan dan fraksi air kulit buah pinang

Lampiran 6. Perhitungan rendemen kulit buah pinang

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

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

$$\text{Rendemen } \left(\% \frac{b}{b} \right) = \frac{650 \text{ gram}}{1200 \text{ gram}} \times 100\% = 54.17 \%$$

B. Rendemen hasil ekstrak etanol kulit buah pinang

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

$$\text{Rendemen } \left(\% \frac{b}{b} \right) = \frac{31,7406 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100\% = 6.35 \%$$

C. Rendemen hasil fraksi *n*-heksana kulit buah pinang

$$\text{Rendemen } \left(\% \frac{b}{b} \right) = \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen } \left(\% \frac{b}{b} \right) = \frac{5,023 \text{ gram}}{31,7406 \text{ gram}} \times 100\% = 15,83 \%$$

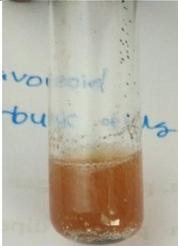
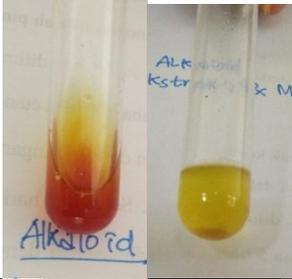
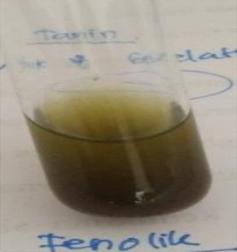
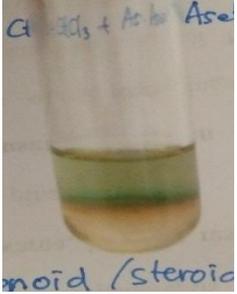
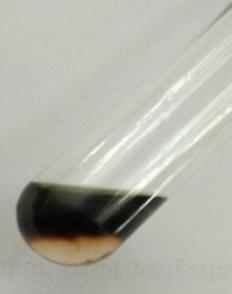
D. Rendemen hasil fraksi air kulit buah pinang

$$\text{Rendemen } \left(\% \frac{b}{b} \right) = \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

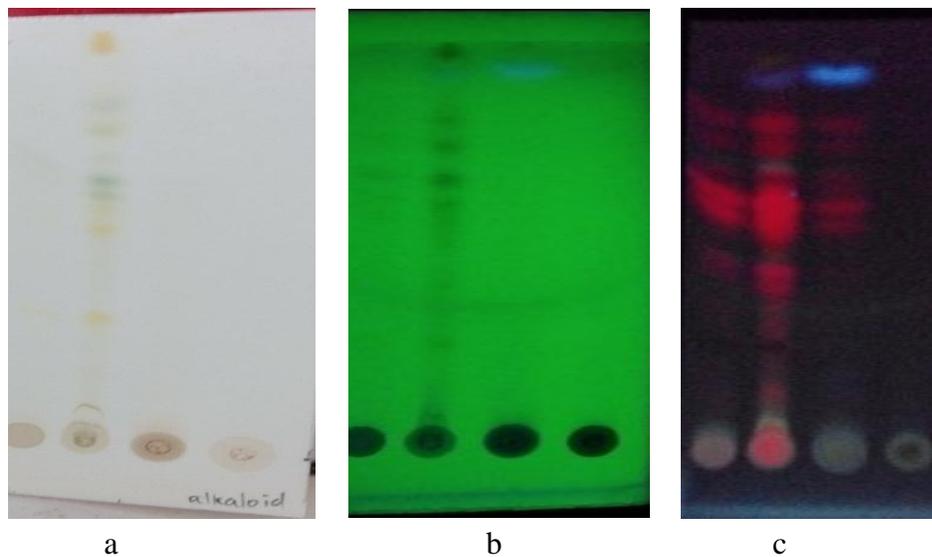
$$\text{Rendemen } \left(\% \frac{b}{b} \right) = \frac{9,245 \text{ gram}}{31,7406 \text{ gram}} \times 100\% = 29,13 \%$$

Lampiran 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada kulit pinang

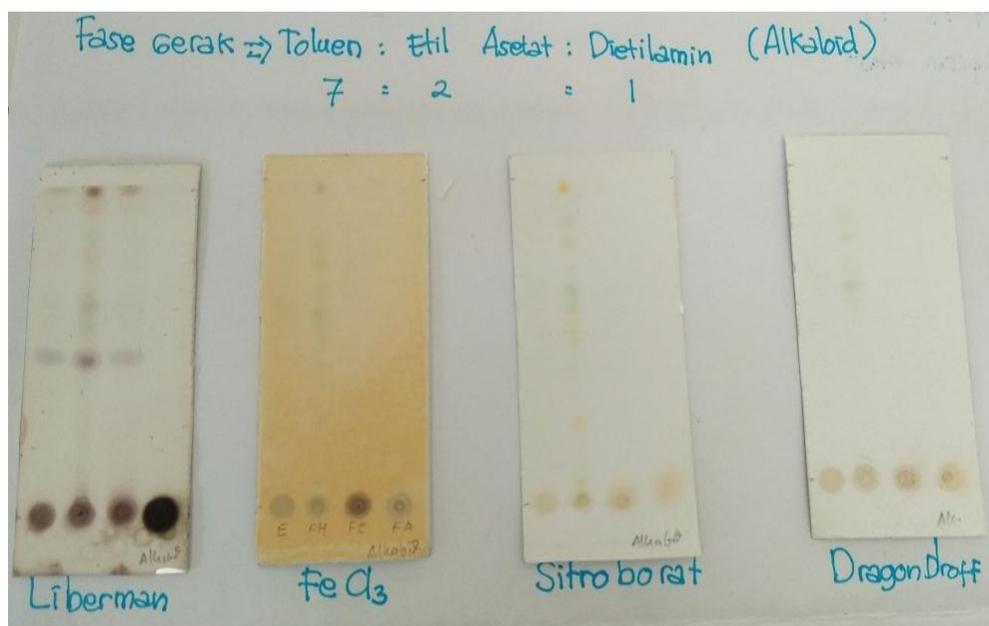
A. Identifikasi kualitatif dengan metode tabung

| Identifikasi | Serbuk | Ekstrak |
|---------------------|---|---|
| Flavonoid |  |  |
| Alkaloid |  |  |
| Fenolik |  |  |
| Tanin |  |  |
| Terpenoid & Steroid |  |  |

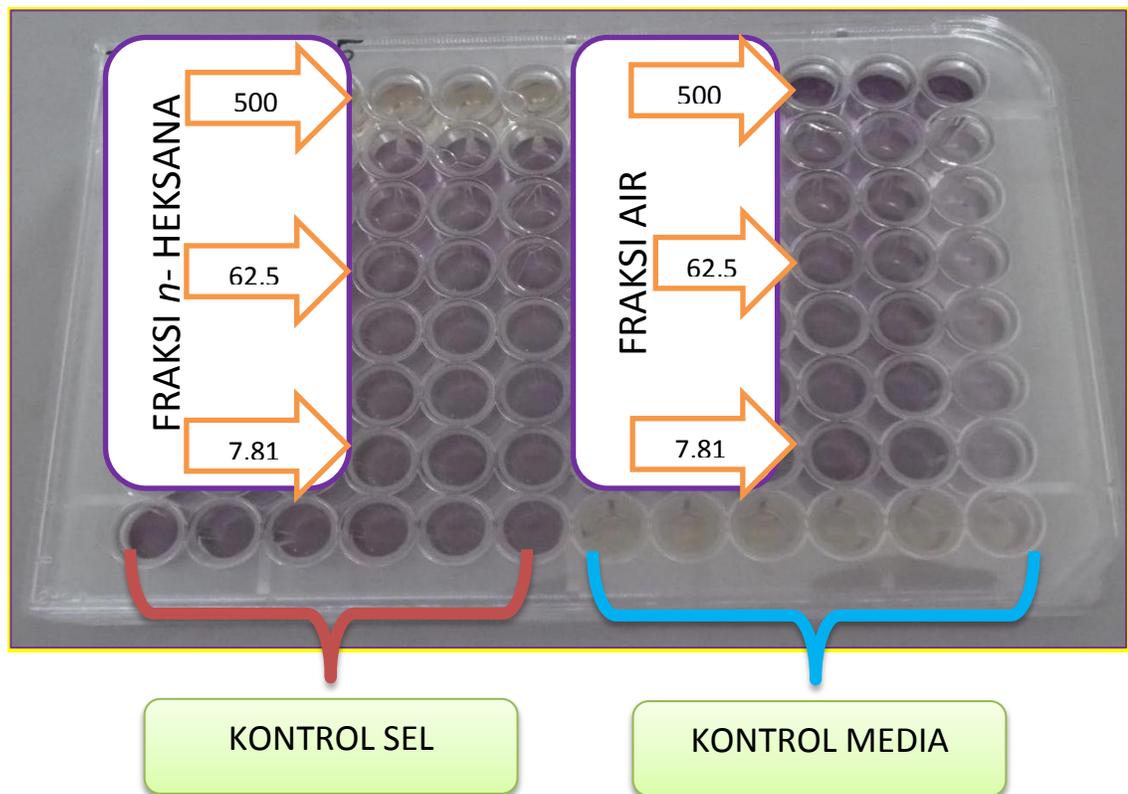
B. Identifikasi kualitatif dengan metode KLT



Gambar 11. a) sebelum penyemprotan, b) Deteksi sinar UV 254, c) Deteksi sinar UV 366



Gambar 12. Hasil deteksi penampang bercak

Lampiran 8. Pola *micro plate* uji MTT

Lampiran 9. Perhitungan volume panen sel

Jumlah sel T47D terhitung/ mL:

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

$$\sum \frac{\text{sel}}{\text{mL}} = \frac{407}{4} \times 10^4 = 101,75 \times 10^4 / \text{mL}$$

Volume jumlah panen sel yang di kultur sebanyak 100 sumuran/ well

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{\sum \text{total sel yang diperlukan}}{\sum \text{sel terhitung/mL}}$$

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

Lampiran 10. Perhitungan pembuatan larutan stok dan larutan seri

A. Pembuatan larutan stok

Dibuat larutan stok dengan konsentrasi = 10 mg/100 μ L

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

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

Pembuatan seri konsentrasi

1. Konsentrasi 500 μ L

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1 \text{ mL} \times 500 &= V_2 \times 100.000 \\ V_2 &= 5 \mu\text{L} \end{aligned}$$

*) Dipipet 5 μ L dari larutan stok + 995 μ L media RPMI

2. Konsentrasi 250 μ L

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1 \text{ mL} \times 250 &= V_2 \times 500 \\ V_2 &= 0,5 \text{ mL} \\ V_2 &= 500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

*) Dipipet 500 μ L dari konsentrasi 1 dan (+) 500 μ L media RPMI

3. Konsentrasi 125 μ L

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1 \text{ mL} \times 125 &= V_2 \times 250 \\ V_2 &= 0,5 \text{ mL} \\ V_2 &= 500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

*) Dipipet 500 μ L dari konsentrasi 2 dan (+) 500 μ L media RPMI

4. Konsentrasi 62,5 μ L

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1 \text{ mL} \times 62,5 &= V_2 \times 125 \\ V_2 &= 0,5 \text{ mL} \\ V_2 &= 500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

*) Dipipet 500 μ L dari

konsentrasi 3 dan (+) 500 μ L media RPMI

5. Konsentrasi 31,25 μ L

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1 \text{ mL} \times 31,25 &= V_2 \times 62,5 \\ V_2 &= 0,5 \text{ mL} \\ V_2 &= 500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

*) Dipipet 500 μ L dari konsentrasi 4 dan (+) 500 μ L media RPMI

6. Konsentrasi 15,63 μ L

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1 \text{ mL} \times 15,63 &= V_2 \times 31,25 \\ V_2 &= 0,5 \text{ mL} \\ V_2 &= 500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

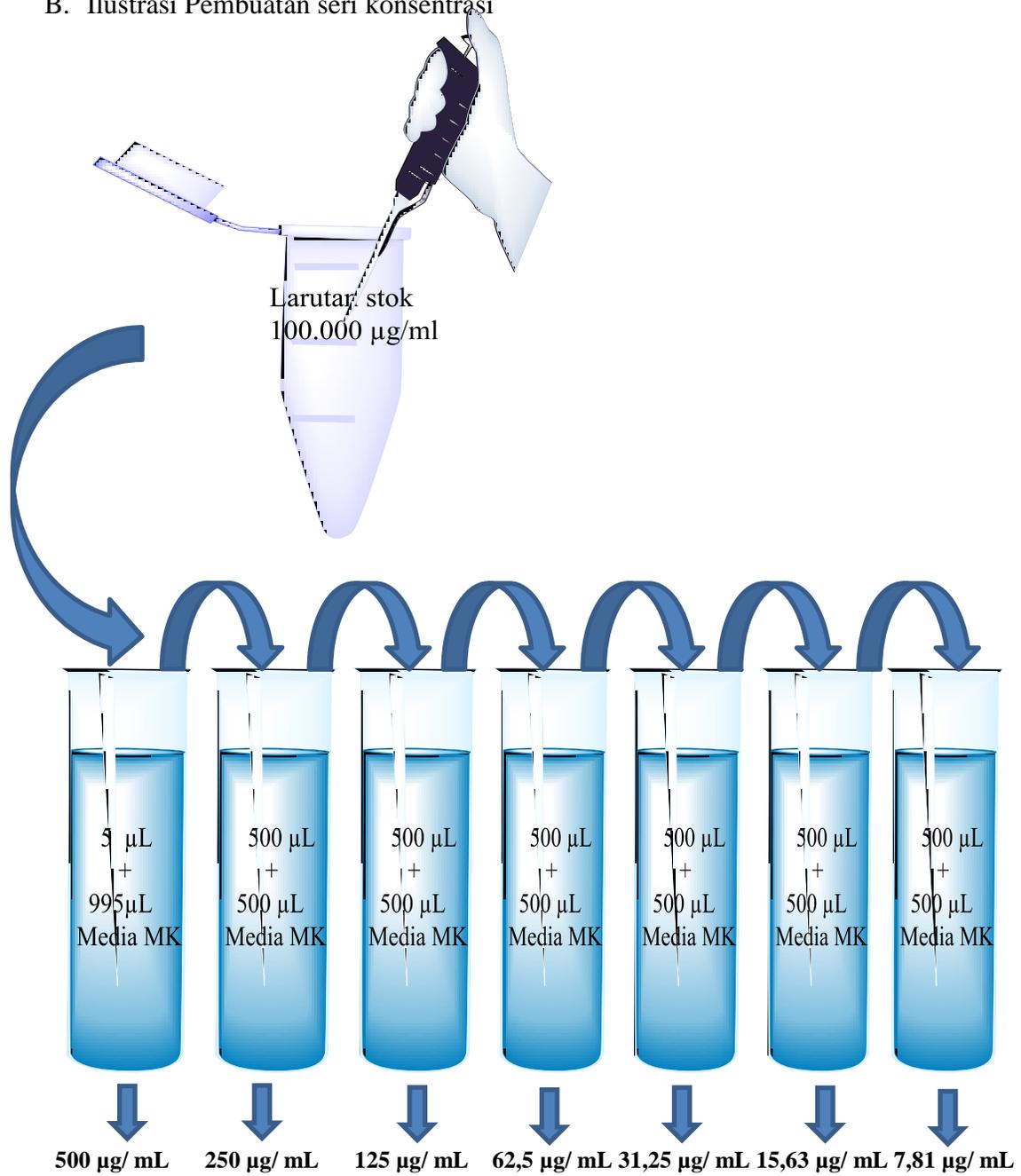
*) Dipipet 500 μ L dari konsentrasi 5 dan (+) 500 μ L media RPMI

7. Konsentrasi 7,81 μ L

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1 \text{ mL} \times 7,81 &= V_2 \times 15,63 \\ V_2 &= 0,5 \mu\text{L} \\ V_2 &= 500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

*) Dipipet 500 μ L dari konsentrasi 6 dan (+) 500 μ L media RPMI

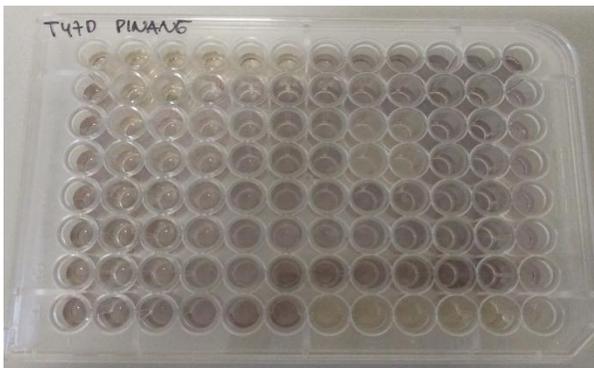
B. Ilustrasi Pembuatan seri konsentrasi



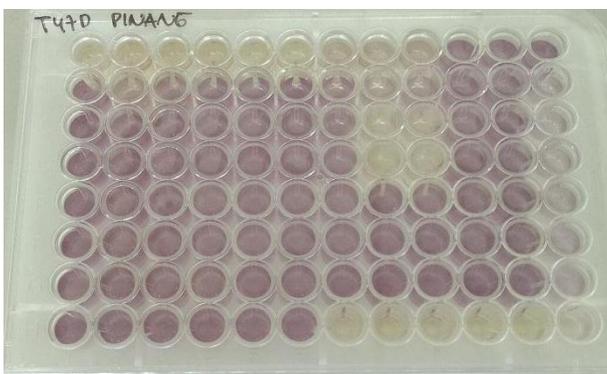
Lampiran 11. Degradasi warna saat sebelum pemberian sampel, sesudah pemberian sampel dan sesudah pemberian MTT



Degradasi warna saat sebelum pemberian sampel

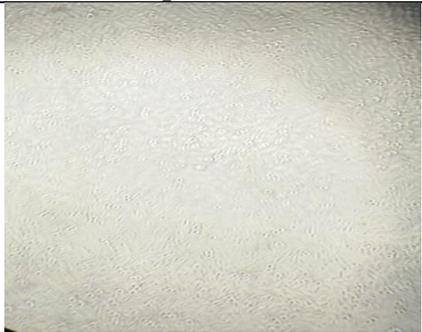
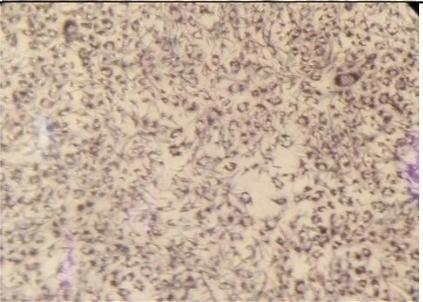
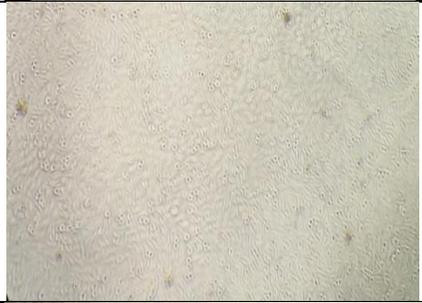
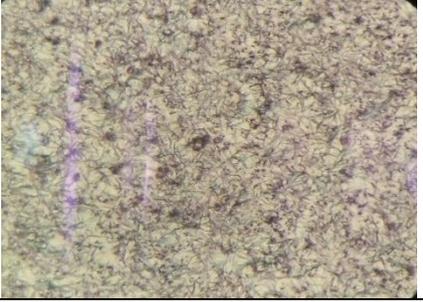


Degradasi warna sampel setelah pemberian MTT selama 4 jam

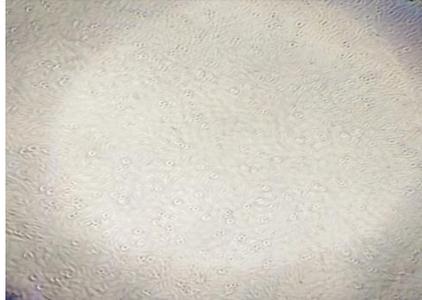
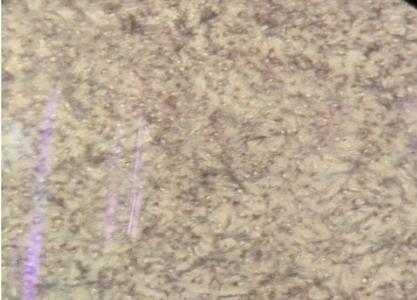


Degradasi warna setelah pemberian MTT + SDS 10%

Lampiran 12. Gambar kristal formazan pada sel kanker payudara T47D**A. Kristal formazan pada sel kanker payudara T47D dengan Fraksi *n*-heksana**

| Perlakuan | Sebelum pemberian MTT | Sesudah pemberian MTT |
|--|---|--|
| Kontrol Sel T47D |  |  |
| Fraksi <i>n</i> -heksana kulit buah pinang 500 µg/ mL |  |  |
| Fraksi <i>n</i> -heksana kulit buah pinang 62,5 µg/ mL |  |  |
| Fraksi <i>n</i> -heksana kulit buah pinang 7,81 µg/ mL |  |  |

B. Kristal formazan pada sel kanker payudara T47D dengan Fraksi air

| Perlakuan | Sebelum pemberian MTT | Sesudah pemberian MTT |
|--|---|--|
| Kontrol Sel T47D |  |  |
| Fraksi <i>n</i> -heksana kulit buah pinang 500 µg/ mL |  |  |
| Fraksi <i>n</i> -heksana kulit buah pinang 62,5 µg/ mL |  |  |
| Fraksi <i>n</i> -heksana kulit buah pinang 7,81 µg/ mL |  |  |

Lampiran 14. Hasil analisis uji *Independent T-test*

Tabel 11. Data hasil uji One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Fraksiheksan | fraksiair |
|----------------------------------|----------------|--------------|-----------|
| N | | 7 | 7 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | 101.68443 | 120.07829 |
| | Std. Deviation | 48.477424 | 12.663360 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .279 | .195 |
| | Positive | .120 | .182 |
| | Negative | -.279 | -.195 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | .737 | .517 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .648 | .952 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tabel 12. Data hasil uji *Independent T-test*

Group Statistics

| Viabilitas | | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|------------|---------------|---|-----------|----------------|-----------------|
| Viabilitas | fraksi heksan | 7 | 101.68443 | 48.477424 | 18.322744 |
| | fraksi air | 7 | 120.07829 | 12.663360 | 4.786300 |

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 | 2.202 | .164 | -.971 | 12 | .351 | -18.393857 | 18.937572 | -59.655281 | 22.867567 |
| | Equal variances not assumed | | | -.971 | 6.815 | .365 | -18.393857 | 18.937572 | -63.421641 | 26.633927 |

Lampiran 15. Surat keterangan selesai 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

SURAT KETERANGAN
 No. UGM/KU/Prst/314 /TL/04/03

Yang bertanda tangan di bawah ini,

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

Nama : NUR ATIK HIDAYAH
 Instansi : Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
 NIM. : 18144362A

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

“UJI SITOTOKSIK FRAKSI n-HEKSANA DAN FRAKSI AIR 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,



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