

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jambu biji yang diambil dari Karanganyar.

Sampel adalah representasi populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Maka sampel merupakan bagian dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jambu biji. Sampel diambil dari pohon yang berada di Karanganyar yang diperoleh dalam keadaan segar, tidak terlalu tua, bebas dari penyakit yang diambil secara acak, bersih dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik dan nilai IC_{50} ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel kanker payudara MCF-7

Variabel utama kedua adalah indeks selektivitas ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap sel Vero

Variabel utama ketiga adalah golongan senyawa kimia dalam daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang diduga berperan dalam aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7.

Variabel utama keempat adalah fraksi teraktif dari daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7.

2. Klasifikasi variabel utama

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

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang diujikan pada sel kanker payudara MCF-7.

Variabel tergantung adalah pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu jumlah sel MCF-7 yang mati untuk masing-masing seri konsentrasi serta indeks selektivitasnya.

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 kondisi inkubator, lama perlakuan, kondisi laboratorium, alat, konsentrasi sampel uji, keadaan sel MCF-7, keadaan sel Vero dan peneliti sendiri.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun jambu biji adalah bagian dari tanaman jambu biji yang ditanam di Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

Kedua, uji aktivitas sitotoksik adalah uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antiproliferasi dan antiapoptosis dari suatu senyawa mendeteksi serta tingkat ketoksikan senyawa terhadap suatu sel.

Ketiga, ekstrak etanol daun jambu biji adalah ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi daun menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi daun jambu biji adalah fraksi yang diperoleh dari hasil fraksinasi ekstrak etanol daun jambu biji dengan pelarut yang berbeda kepolarnya, yaitu n-heksana, etil asetat dan air.

Kelima, konsentrasi adalah jumlah ekstrak dan fraksi yang terlarut dalam zat pembawa.

Keenam, sel kanker payudara MCF-7 adalah kultur sel (*cell line*) yang diambil dari jaringan pleural kanker payudara seorang pasien wanita Kaukasian berumur 69 tahun dengan golongan darah O dan Rh positif dan diperoleh dari

Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta..

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

Kesembilan, indeks selektivitas adalah kemampuan suatu senyawa membunuh sel kanker payudara MCF-7 secara selektif dibandingkan dengan sel Vero yang dihitung dengan rumus : $indeks\ selektivitas : \frac{IC50\ Sel\ Vero}{IC50\ Sel\ Kanker}$, dimana IS lebih dari tiga dinyatakan selektif.

C. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah gunting, blender, oven, pipet *pastur*, pH meter, *96-well plate*, vorteks, bejana, kertas saring, botol penampung, timbangan analitik, *cryotube*, botol duran, pipa kapiler, pisau, kertas saring, *rotary evaporator*, kolom, gelas beker, tabung reaksi, sentrifus, inkubator CO₂, ELISA *reader*, hemositometer, tabung konikal steril, *Laminar Air Flow*, penangas air, tangki nitrogen cair, rak tabung kecil, waterbath, corong pisah, silika GF₂₅₄, statif dan klem, mikroskop, inkubator CO₂ 5%, mikropipet 100-1000 μ L, mikropipet 50-100 μ L, *counter*, alat sonifikasi, *chamber* dan tutupnya, pipa kapiler, pinset, gelas ukur 5 mL dan 10 mL, oven, lampu UV 254 nm dan 366 nm, autoklaf, kertas saring, *compressor*, corong *bunchner*, batang pengaduk, LAB 100 mL dan 50 mL, cawan porselin, spatula lemari asam.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun jambu biji, aquadest, etanol 70%, etil asetat, n-heksana, sel MCF-7, sel Vero, SDS (*Sodium Dodesil Sulfat*) 10% dalam HCl 0,01 N, MTT (3-((4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromida), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*), DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% v/v, PBS, *fungizone*, streptomisin-penisilin, serbuk Mg, HCl pekat, amil alkohol, H₂SO₄ pekat, kloroform, asetat anhidrad, reagen mayer, cisplatin, tripsin 0,025%, PBS (*Phosphat Buffered Saline*), pereaksi semprot Liebermann-Baurchard, FeCl₃, Dragendorff, dan Sitroborat.

E. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi tanaman

Tahap awal penelitian ini ialah identifikasi tanaman. Tujuan penelitian untuk memastikan kebenaran sampel tanaman daun jambu biji sesuai dengan ciri-ciri morfologinya dengan petunjuk identifikasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Pengambilan, pengeringan dan pembuatan serbuk daun jambu biji

Daun diambil dari populasi tanaman jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang ada di Karanganyar, Jawa Tengah. Daun segar dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, kemudian dikeringkan dengan alat pengering (oven) pada suhu 50°C selama 5 hari. Suhu terlalu tinggi akan merusak kandungan senyawa didalam tanaman tersebut. Sedangkan suhu yang terlalu rendah tidak akan mengeringkan dengan sempurna, akan membuat sampel cepat busuk. Daun jambu biji yang telah kering, kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan alat grinding dan blender, kemudian diayak dengan ayakan mesh nomor 40. Penyerbukan bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga dapat mempermudah dan mempercepat proses ekstraksi. Selanjutnya, dilakukan pemeriksaan organoleptis untuk mengetahui sifat fisik dari serbuk daun jambu biji. Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

3. Penetapan kadar air serbuk daun jambu biji

Sebanyak 20 gram serbuk dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut *xylen* jenuh air (9:1) 200 ml sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, lalu dipanaskan diatas bunsen. Pemanasan dihentikan bila sudah tidak ada air yang menetes pada tetesan. Kadar air diukur dengan melihat volume pada skala yang terdapat pada alat *Sterling-Bidwell*.

4. Pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji

Ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70%. Ekstraksi menggunakan serbuk daun jambu biji sebanyak 1 kg dimasukkan ke dalam bejana maserasi, kemudian direndam dalam etanol 70% sebanyak 7,5 liter selama 5 x 24 jam diaduk sesekali agar tidak jenuh. Hasil maserasi kemudian serkai, peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (penambahan 2,5 liter cairan penyari) biarkan ditempat sejuk, terlindungi dari cahaya selama 2 hari, saring kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (BPOM RI 2011). Selanjutnya, dilakukan pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol untuk mengetahui sifat fisik dari serbuk daun jambu biji. Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

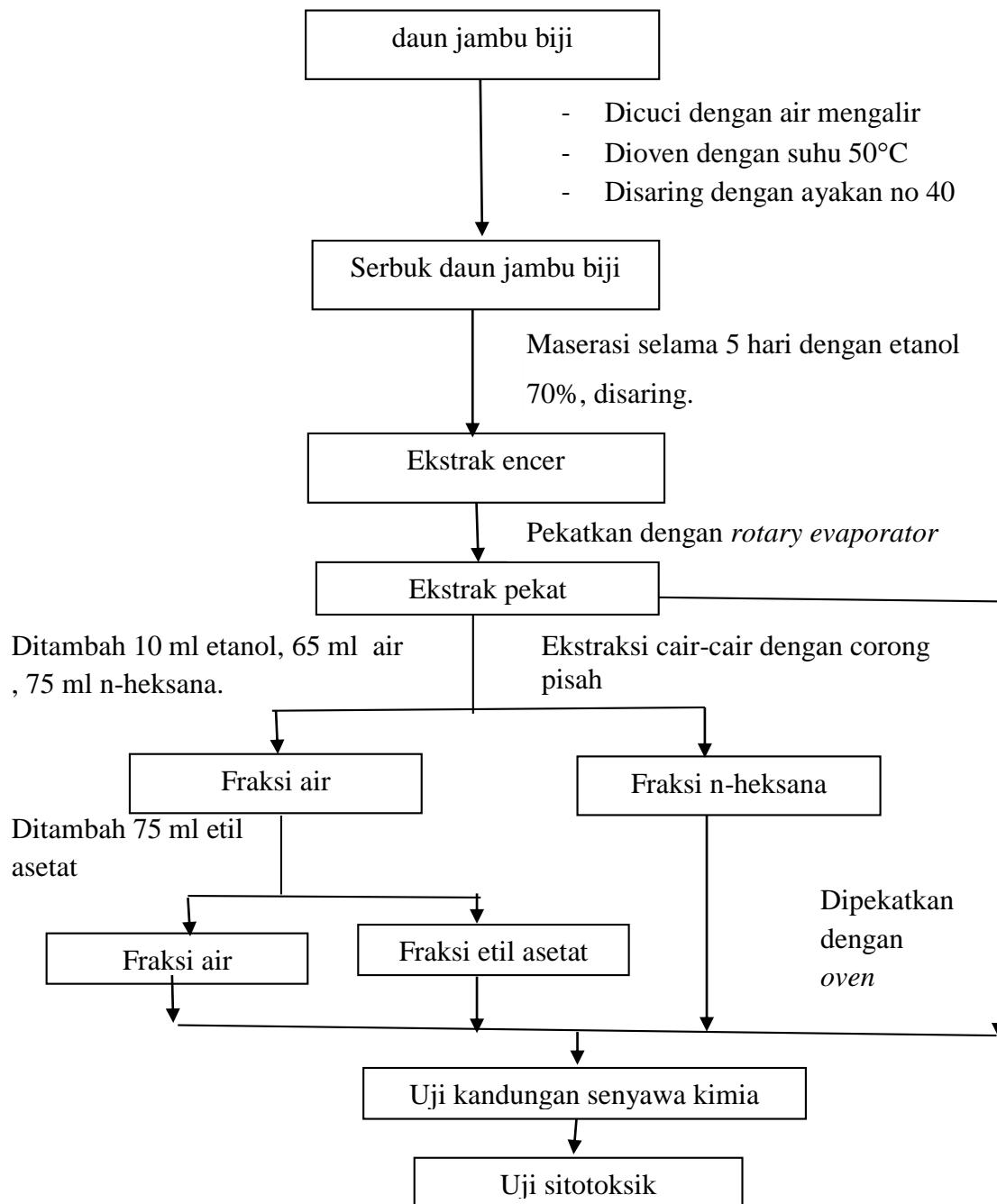
5. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun jambu biji

Sebanyak 20 gram ekstrak dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut *xylen* jenuh air (9:1) 200 ml sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, lalu dipanaskan diatas bunsen. Pemanasan dihentikan bila sudah tidak ada air yang menetes pada tetesan. Kadar air diukur dengan melihat volume pada skala yang terdapat pada alat *Sterling-Bidwell*.

6. Pembuatan fraksi-fraksi daun jambu biji

Fraksinasi menggunakan metode Partisi cair-cair. Fraksinasi dilakukan menggunakan pelarut berbeda kepolaran yaitu n-heksana, etil asetat dan air. Ekstrak kental daun jambu biji sebanyak 10 gram yang dilarutkan dengan 10 ml etanol dan 65 ml air suling. Kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan

ditambahkan n-heksana 75 ml kemudian digojog dan diulangi 3x sampai didapat filtrat berwarna bening dengan penambahan n-heksana 75 ml tiap pengulangan. Campuran antara n-heksana dan air diekstraksi cair-cair hingga terbentuk 2 lapisan. Fase n-heksana dan fase air dipisahkan, fase n-heksana yang didapat dipekatkan dengan oven sehingga menjadi fraksi n-heksana. Selanjutnya, fase air yang terbentuk diekstraksi cair-cair kembali dengan penambahan etil asetat sebanyak 75 ml dan diulangi 3x sampai didapat filtrat berwarna bening dengan penambahan etil asetat 75 ml tiap pengulangan, sehingga mendapatkan lapisan etil asetat dan air. Lapisan etil asetat dipisahkan dengan lapisan air. Fase etil asetat yang didapatkan dipekatkan dengan oven sehingga menjadi fraksi etil asetat. Kemudian, fase air yang didapatkan dipekatkan dengan oven sehingga menjadi fraksi air (Gaffar *et al.* 2018).



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi-fraksi

7. Penetapan persen rendemen

Persen rendemen ekstrak diperoleh dari menimbang hasil ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun jambu biji dan dikalikan 100%.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk daun jambu biji}} \times 100\%$$

Persen rendemen fraksi diperoleh dari hasil fraksi ditimbang kemudian dibagi berat ekstrak awal yang digunakan untuk fraksinasi dan dikalikan 100%.

$$\% \text{ Rendeman Fraksi} = \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\%$$

8. Identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji secara kualitatif

Identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak etanol daun jambu biji secara kualitatif, meliputi :

8.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji dilarutkan dengan pelarut secukupnya. Ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol, kemudian diamati. Kemudian dikocok kuat-kuat dan biarkan memisah. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol (Farnsworth 1966).

8.2. Identifikasi steroid/triterpenoid. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji dilarutkan dengan pelarut secukupnya, diuapkan diatas waterbath. Filtrat digerus kemudian dilarutkan dengan 2 ml kloroform dalam tabung reaksi, ditambah 10 tetes asetat anhidrat dan 3 tetes H₂SO₄. Hasil positif steroid menunjukkan munculnya warna hijau-biru, Hasil positif triterpenoid memberikan cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut (Nugrahani *et al.* 2016).

8.3. Identifikasi tanin. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji dilarutkan dengan pelarut secukupnya. Ditambahkan 3 tetes FeCl₃. Hasil positif tanin ditunjukkan larutan menjadi biru kehitaman (tanin galat) atau hijau kehitaman (tanin katekol) (Agustina *et al.* 2016).

8.4. Identifikasi saponin. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji diencerkan dengan 3 ml air suling panas, dinginkan sesaat kemudian dikocok kuat-kuat selama 2 menit. Apabila terbentuk buih mantap selama tidak lebih dari 10 menit,

setinggi 1 cm sampai 10 cm, dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang maka ekstrak positif mengandung saponin (Agustina *et al.* 2016).

8.5. Identifikasi alkaloid. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji dilarutkan dengan 5 ml HCl homogenkan, dan disaring. Ditambahkan dengan beberapa tetes reagen Mayer, hasil positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan putih sampai kuning, sedangkan pada test dengan reagen Dragendorff hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan warna merah (Kumoro 2015).

9. Identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji secara kromatografi lapis tipis (KLT)

9.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji dilarutkan dengan menggunakan pelarut secukupnya, kemudian ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Baku pembanding adalah quercetin. Kemudian deteksi bercak dilakukan dengan UV 254 nm, UV 366 nm, serta pereaksi semprot Sitroborat hasil positif bila terbentuk bercak berwarna kuning (Depkes 1987).

9.2. Identifikasi steroid/triterpenoid. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji dilarutkan dengan menggunakan pelarut secukupnya, kemudian ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan : etil asetat (6:4). Baku pembanding adalah stigmasterol. Kemudian deteksi bercak dilakukan dengan UV 254 nm, UV 366 nm, serta pereaksi semprot Lieberman Burchard hasil positif ditunjukkan dengan bercak berwarna merah keunguan pada senyawa triterpenoid dan terbentuk warna biru atau hijau menandakan adanya senyawa steroid (Harbone 1987).

9.3. Identifikasi tanin. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji dilarutkan dengan menggunakan pelarut secukupnya, kemudian ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Baku pembanding adalah asam galat.. Kemudian Deteksi bercak dilakukan dengan UV 254 nm, UV 366 nm, serta pereaksi semprot FeCl₃ hasil positif bila terbentuk bercak berwarna hijau tua kehitaman (Harbone 1987).

9.4. Identifikasi alkaloid. Ekstrak dan fraksi daun jambu biji dilarutkan dengan menggunakan pelarut secukupnya, kemudian ditotolkan pada plat silika

gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah toluen : etil asetat : dietil amin (7:2:1). Baku pembanding adalah kafein. Kemudian Deteksi bercak dilakukan dengan UV 254 nm, UV 366 nm, serta pereaksi semprot Dragendorff hasil positif bila terbentuk bercak berwarna merah bata (Harbone 1987).

10. Uji aktivitas sitotoksik

Tahap uji sitotoksik meliputi :

10.1. Sterilisasi Alat. Alat-alat gelas yang akan digunakan harus dalam keadaan steril, dengan dicuci menggunakan deterjen atau antiseptik, lalu dibilas dengan air bersih mengalir dan direndam dengan aquadest kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam. Setelah kering, alat-alat gelas tersebut diberi indikator steril dan dimasukkan ke dalam *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121°C.

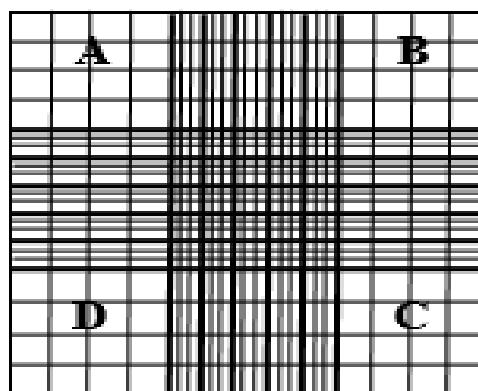
10.2. Sterilitas LAF (*Laminar Air Flow*). Sterilisasi dilakukan dengan menyalakan lampu ultraviolet (UV) selama 15 menit dengan keadaan LAF masih tertutup. Kemudian lampu UV dimatikan dan membuka pintu LAF, lampu LAF dihidupkan, dan sebelum digunakan permukaan LAF disterilkan dengan etanol 70%.

10.3. Pembuatan media kultur untuk sel. Medium kultur dibuat dari 20 ml *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 % yang dimasukkan dalam botol steril dan ditambahkan 2 mL penisilin-streptomisin 1%, 1 mL *fungison* 0,5% dan 100 mL medium DMEM murni untuk sel MCF-7 dan sel Vero. Pembuatan medium kultur dilakukan dalam LAF lalu disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C (CCRC 2009).

10.4. Pengaktifan sel MCF-7 dan sel Vero. Kultur sel kanker MCF-7 dan sel Vero diambil dari ampul yang disimpan dalam tangki nitrogen cair yang diletakkan dalam lokator pada suhu -196°C. Ampul yang berisi sel dicairkan dalam air ± 37,7°C, kemudian ampul disemprot dengan alkohol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung conical steril yang berisi 10 ml medium DMEM. Suspensi sel disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama ± 10 menit. Supernatan dibuang, pelet yang berisi sel ditambahkan 5 ml medium penumbuh DMEM kedalam sel yang masing-masing mengandung FBS 10%. Lalu diresuspensi perlahan sampai homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam

beberapa (2-3) buah tissue culture flask kecil dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan sampai konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian (CCRC 2009).

10.5. Pemanenan dan Perhitungan sel MCF-7. Sel diambil dari dalam inkubator CO₂ 5%, mengamati kondisi sel dibawah *microsoft inverted*. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Media dalam sel dibuang dengan menggunakan mikropipet atau pipet pasteur steil. Sel dicuci menggunakan PBS (volume PBS adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal), dilakukan 2x pencucian. Jika media pada kultur sel 7 ml maka PBS yang diberikan adalah 3,5 ml. Tambahkan tripsin EDTA (tripsin 0,25%) secara merata dan inkubasi didalam inkubator selama 3 menit. Keluarkan dari inkubator, menambahkan media DMEM \pm 5 ml untuk menginaktifkan tripsin. *Centrifuge* dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet sel ditambahkan media penumbuh DMEM sebanyak \pm 5 ml (CCRC 2009). Panenan sel diambil sebanyak 10 μ L dan dipipet ke hemasitometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted* (mikroskop cahaya) dengan *counter*.



Gambar 5. Skema bilik hitung dari hemasitometer

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung. Setiap kamar terdapat 16 kotak. Dihitung sel pada semua kamar hemasitometer, sel yang mati (gelap) dan sel yang berada di batas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan bawah ikut di hitung. Perhitungan jumlah sel per mL dengan rumus:

$$\Sigma \text{sel/ml} = \frac{\Sigma \text{semua sel dalam kamar (ABCD)}}{4} \times 10^4$$

Kemudian dihitung volume pemanenan sel yang diperlukan (dalam ML),
Dengan rumus :

$$\text{volume pemanenan sel} = \frac{\text{jumlah plate well} \times \text{jumlah sel tanam}}{\text{jumlah sel terhitung/ml}}$$

Diambil volume pemanenan sel, dipindahkan ke *conical* baru dan ditambahkan medium penumbuh sampai total volume yang diperlukan. Kemudian, jumlah suspense sel yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan dihitung hingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 1×10^4 sel / 100 μL . Setiap sumuran diisi 100 μL media penumbuh berisi sel kedalam *microplate* sumuran 96. Kemudian di inkubasi selama 24 jam pada inkubator CO_2 5% suhu 37% untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan.

10.6. Pembuatan larutan uji. Ambil ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 μL DMSO dalam tabung Ependrof dan disimpan sebagai larutan stok dengan konsentrasi akhir yaitu 100.000 $\mu\text{g/mL}$ yang digunakan dalam uji. Pembuatan larutan stok dilakukan secara aseptis di dalam LAF.

10.7. Uji aktivitas sitotoksik. Metode MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide) digunakan dalam uji sitotoksik. Media dalam *microplate* dibuang lalu dimasukkan sebanyak masing-masing 100 μL larutan uji yaitu ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji yang dilarutkan dengan DMSO. Ekstrak dan fraksi-fraksi masuk dalam *microplate* dengan variasi konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 $\mu\text{g/mL}$ pada tiap sumuran. Cisplatin sebagai kontrol positif dengan variasi konsentrasi 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 $\mu\text{g/mL}$. Kontrol negatif yang digunakan adalah kultur sel dengan penambahan media komplit DMEM. Kontrol media pada penelitian ini menggunakan larutan media komplit DMEM. Sel tersebut diinkubasi dalam *incubator* CO_2 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam media sel dibuang, lalu disiapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara 1

ml stok MTT diambil dalam PBS (5mg/mL), diencerkan dengan MK sampai 10 mL (untuk 1 buah 96-well plate). Kemudian media sel dibuang, dicuci PBS 1x dan ditambahkan reagen MTT 100 μ L ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator. Sel yang hidup akan beraksi dengan MTT membentuk warna ungu (formazen). Setelah inkubasi berjalan 4 jam, ditambahkan 100 μ L SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% untuk menghentikan kerja MTT kemudian dinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Pada akhir inkubasi, serapan dibaca dengan ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) pada panjang gelombang 595 nm.

F. Analisis Data

1. Uji aktivitas Sitotoksik

Data hasil pengujian dengan metode MTT berupa respon serapan masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen viabilitas sel dengan menggunakan persamaan berikut :

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

Kemudian dilanjutkan analisis untuk menentukan nilai IC₅₀ (nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dari populasi sel kanker payudara MCF-7 dan sel vero) menggunakan regresi linear antara log konsentrasi sediaan uji versus persen (%) viabilitas sel MCF-7, hingga didapatkan persamaan :

$$Y = a + bx$$

keterangan :

y = persen (%) viabilitas sel

x = log konsentrasi sampel uji (μ g/ml)

IC₅₀ = anti log x

Dari kurva hubungan antara log konsentrasi senyawa uji versus persen (%) viabilitas sel, ditentukan harga IC₅₀, dengan cara log konsentrasi sebagai nilai x dan viabilitas 50% sebagai nilai y diplotkan pada kurva sehingga diperoleh persamaan regresi linear. Kemudian hasil persamaan regresi linear digunakan

untuk mencari nilai IC_{50} dengan nilai $Y = 50$, hasil yang didapatkan dilakukan anti log, hasil anti log yang diperoleh disebut IC_{50} . Sitotoksik suatu bahan berdasarkan nilai IC_{50} dapat digolongkan menjadi 3, yaitu : sitotoksik potensial ($IC_{50} < 100\mu\text{g/mL}$), sitotoksik moderat ($100\mu\text{g/mL} < IC_{50} < 1000\mu\text{g/mL}$) dan tidak toksik ($IC_{50} > 1000\mu\text{g/mL}$) (Prayong *et al.* 2008).

2. Indeks Selektivitas

Berdasarkan nilai IC_{50} dari masing-masing ekstrak dan fraksi-fraksi selanjutnya dilakukan perhitungan indeks selektivitas ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air. Indeks selektivitas diperoleh dari rasio IC_{50} sel Vero dibandingkan dengan sel kanker yang diuji. Apabila sampel memiliki indeks selektivitas lebih tinggi dari 3 (>3) menunjukkan bahwa obat atau ekstrak memiliki selektivitas yang tinggi dan kurang dari 3 (< 3) dianggap dapat memberi toksisitas umum dan juga menyebabkan sitotoksitas pada sel normal (Sutejo *et al.* 2016). Indeks selektivitas dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{indeks selektivitas : } \frac{IC_{50} \text{ Sel Vero}}{IC_{50} \text{ Sel Kanker payudara MCF-7}}$$