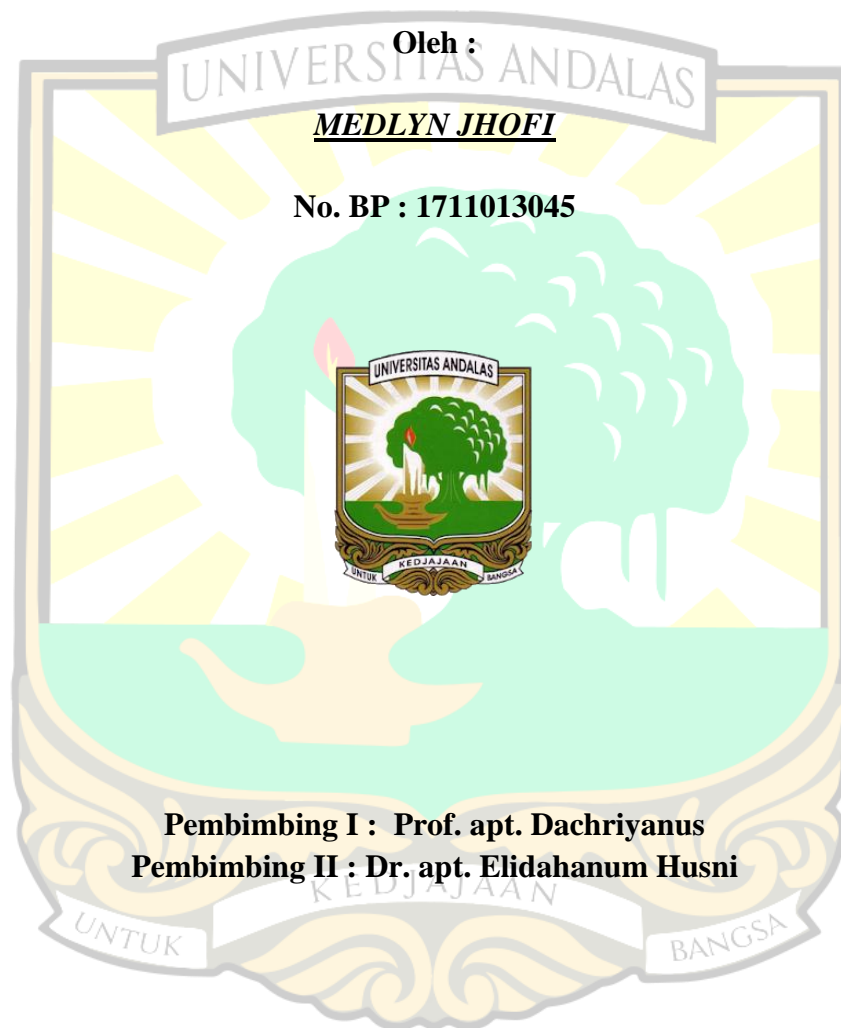


**AKTIVITAS SITOTOKSIK TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA
T47D DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAUN ASAM
KANDIS (*Garcinia cowa* Roxb)**



Oleh :

UNIVERSITAS ANDALAS

MEDLYN JHOFI

No. BP : 1711013045

Pembimbing I : Prof. apt. Dachriyanus
Pembimbing II : Dr. apt. Elidahanum Husni

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS ANDALAS

PADANG

2021

PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Medlyn Jhofi

No.BP : 1711013045

Judul Skripsi : Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Payudara T47D dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Asam Kandis (*Garcinia cowa* Roxb).

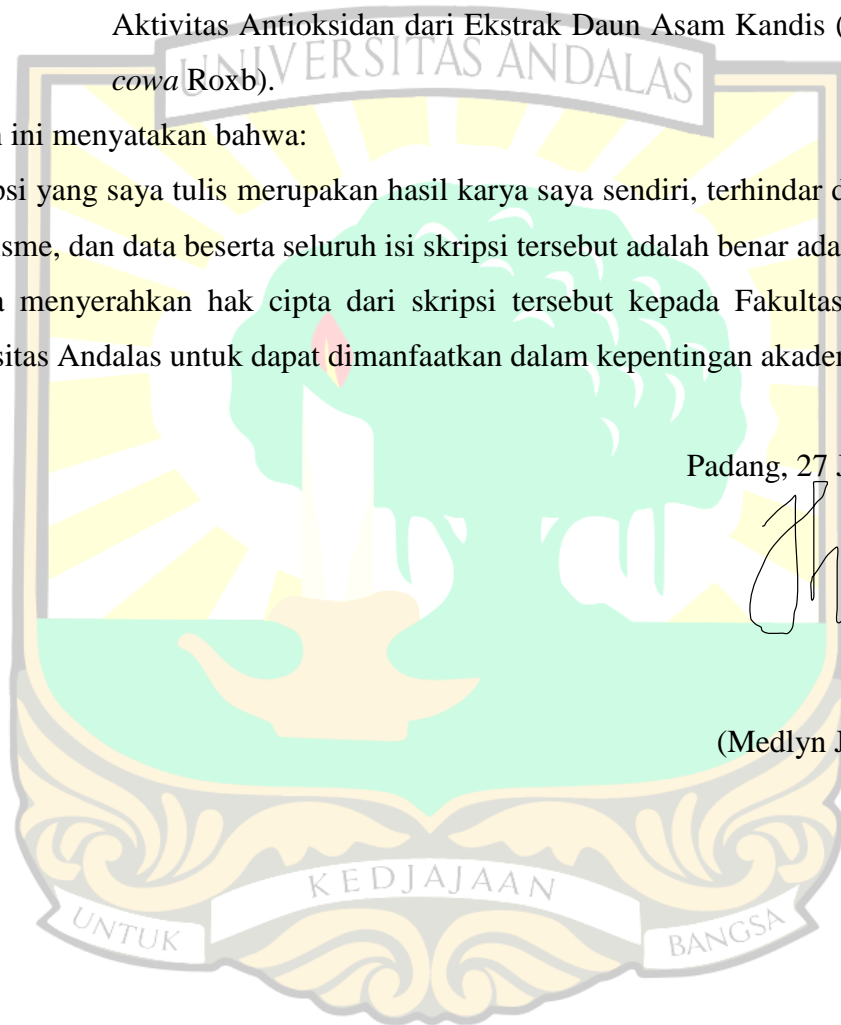
Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi yang saya tulis merupakan hasil karya saya sendiri, terhindar dari unsur plagiarisme, dan data beserta seluruh isi skripsi tersebut adalah benar adanya.
2. Saya menyerahkan hak cipta dari skripsi tersebut kepada Fakultas Farmasi Universitas Andalas untuk dapat dimanfaatkan dalam kepentingan akademis.

Padang, 27 Juni 2021



(Medlyn Jhofi)

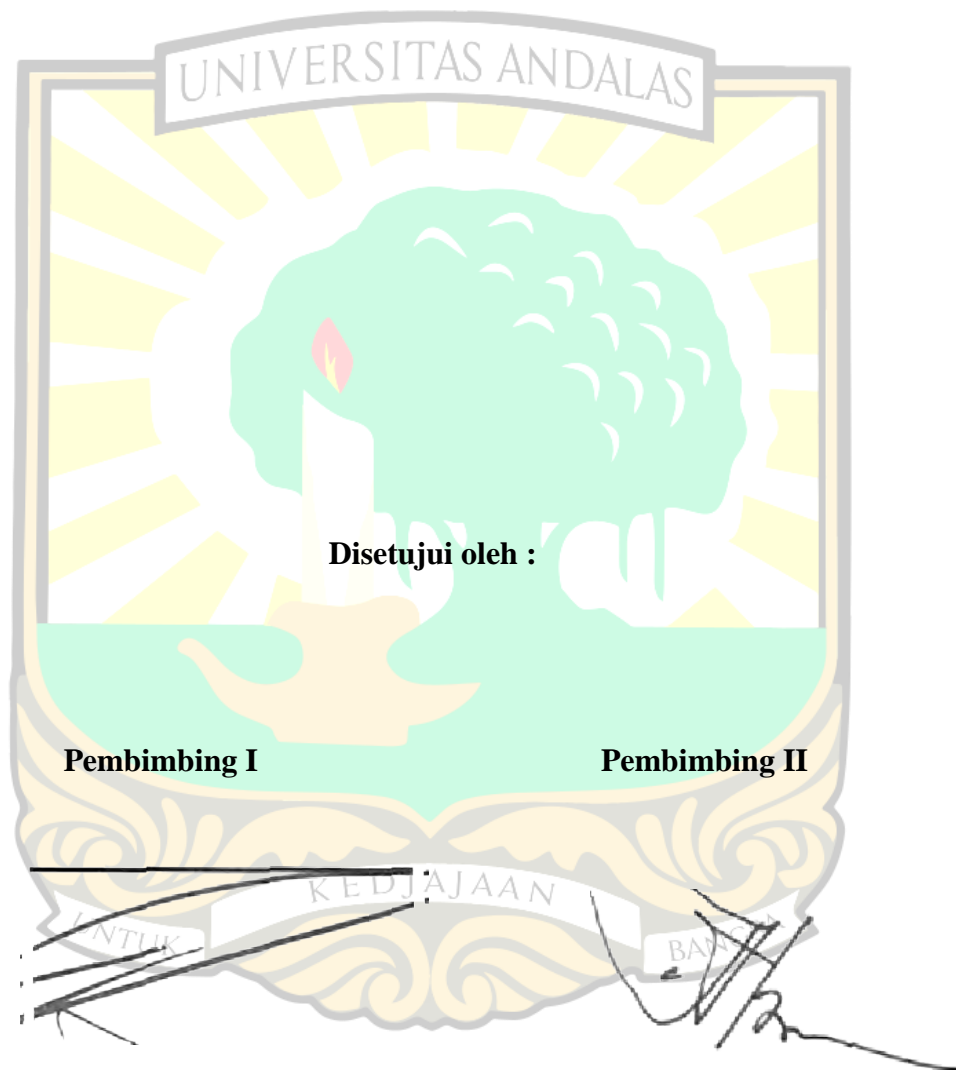


Skripsi ini Diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Menempuh Ujian

Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi

Universitas Andalas

Padang





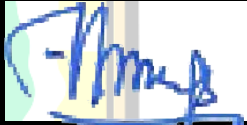
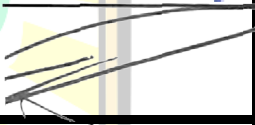

Prof. apt. Dachriyanus

Dr. apt. Elidahanum Husni

Skripsi ini telah dipertahankan di depan Pembahas Seminar Hasil Penelitian

Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Pada tanggal : 5 Juli 2021

No.	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Prof. Dr. rer. nat. Apt. Dian Handayani	Ketua	
2	Dr. Yohannes Alen, M.Sc	Pembahas	
3	Dr. Netty Suharti, MS	Pembahas	
4	Prof. Dr. apt. Dachriyanus	Pembimbing I	
5	Dr. apt. Elidahanum Husni, M.Si	Pembimbing II	



KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia yang telah diberikan secara tiada henti-hentinya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penelusian skripsi yang berjudul “**Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Payudara T47D dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Asam Kandis (*Garcinia cowa Roxb*)**”. Skripsi ini bertujuan sebagai pemenuhan syarat menyelesaikan program sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Andalas.

Rasa hormat dan terimakasih penulis ucapkan kepada :

1. Bapak Prof.Dr.apr.Dacriyanus selaku pembimbing I dan ibu Dr.apr. Elidahanum Husni selaku pembimbing II yang telah mengerahkan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Orangtua (Victor Jhon dan Fitra Ningih) memberikan dukungan dan doa yang tak henti-hentinya.
3. Saudara (Alexander Jhofi, apt.Adven Jhofi, Antomi Jhofi S.T dan Tia Permata Jhofi S.E).
4. Ibu apt.Dwisari Dillasamola,M.Farm selaku penasehat akademik yang telah membimbing penulis selama menjalankan perkuliahan di Fakultas Farmasi.
5. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi yang telah memberikan ilmu bagi penulis.
6. Nanda dan Sukma teman yang senantiasa membantu dan menyemangati.
7. Senior sebimbingan (wawa, kiki dan puput) yang sama berjuang dan membantu dalam penyelesaian penelitian ini.
8. Daniel Putra S.T selaku teman yang selalu menyemangati dan memberikan dukungan pada penulis.
9. Teman- teman metamorfosis yang senantiasa memberikan motivasi dan selalu meningkatkan penulis.

10. Reynold Poernomo sebagai idola yang telah memotivasi penulis dalam menyelesaikan penelitian.

11. Teman-teman Phosphate yang sama -sama berjuang selama masa pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Andalas.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada pihak yang membantu penulis.

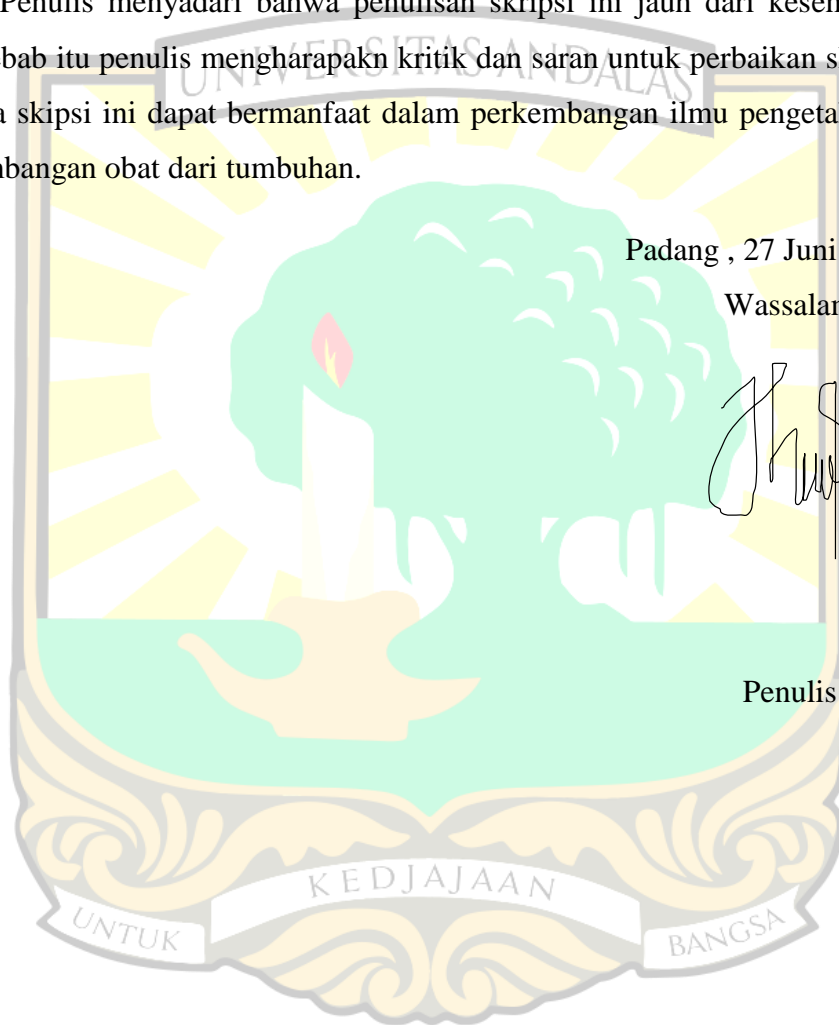
Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Oleh sebab itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan serta pengembangan obat dari tumbuhan.

Padang , 27 Juni 2021

Wassalam



Penulis



ABSTRAK

AKTIVITAS SITOTOKSIK TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAUN ASAM KANDIS (*Garcinia cowa* Roxb)

Oleh :

MEDLYN JHOFI

NIM :1711013045

(Progam Studi Sarjana Farmasi)

Kanker payudara merupakan kanker dengan jumlah kasus terbanyak di Indonesia, yang bukan hanya diderita oleh wanita namun juga oleh laki-laki yang banyak menyebabkan kematian. Upaya pengobatan dan pencegahan kanker payudara terus dikembangkan, tetapi upaya yang berkembang saat ini masih banyak kekurangan dan keterbatasan. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait pengobatan dan pencegahan kanker payudara. Daun tumbuhan asam kandis atau *Garcinia cowa* Roxb telah banyak dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional dan dilaporkan oleh penelitian sebelumnya memiliki aktivitas antikanker kuat terhadap sel kanker payudara T47D. Penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan antioksidan dari ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol daun asam kandis. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode perkolasi. Metode yang digunakan pengujian aktivitas sitotoksik ialah MTT (*Microtetrazolium*) dan pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH (*2-2-difenil-1-pikrilhidrazil*). Hasil penelitian didapatkan ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan antioksidan. Ekstrak n-heksan memiliki aktivitas sitotoksik dan antioksidan kuat dengan IC_{50} $19,43 \pm 4,803 \mu\text{g/ml}$ dan $89,625 \pm 2,258 \mu\text{g/ml}$. Ekstrak etil asetat memiliki aktivitas sitotoksik moderat dengan IC_{50} $28,39 \pm 9,887 \mu\text{g/ml}$ dan aktivitas antioksidan kuat IC_{50} $31,018 \pm 0,127 \mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol memiliki aktivitas sitotoksik lemah dengan IC_{50} $256,3 \pm 4,729 \mu\text{g/ml}$ dan antioksidan sangat kuat dengan IC_{50} $26,892 \pm 0,124 \mu\text{g/ml}$.

Kata kunci : sitotoksik , kanker payudara, antioksidan, *Garcinia cowa* Roxb, MTT, DPPH

ABSTRACT

CYTOTOXIC ACTIVITY AGAINST T47D BREAST CANCER CELL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ASAM KANDIS (*Garcinia cowa* Roxb) LEAF EXTRACT

By :

MEDLYN JHOFI

Student ID Number: 1711013045

(Bachelor of Pharmacy)

Breast cancer is the highest number of cancer case in Indonesia, which is not only suffered by women but also by men which cause many deaths. Effort to treat and prevent breast cancer continue to developed, but effort that are currently developing are still lacking and limited. Therefore, is it necessary to conduct further research related to the treatment and prevention of breast cancer. The leaves of the asam kandis plant or *Garcinia cowa* Roxb have been widely used in traditional medicine and were reported by previous studies to have strong anticancer activity against T47D breast cancer cell. This study aimed to examine the cytotoxic activity against T47D breast cancer cell and antioxidant of n-hexane extract, ethyl acetate extract, and ethanol extract of asam kandis leaves. Extraction was carried out using the percolation method. The method used to test the cytotoxic activity is MTT (Microtetrazolium) and the antioxidant test using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) method. The result showed that *Garcinia cowa* Roxb leaf extract has cytotoxic activity against T47D breast cancer cell and antioxidant. The n-hexane extract had a strong cytotoxic and antioxidant activity with IC_{50} of $19.43 \pm 4.803 \mu\text{g/ml}$ and $89.625 \pm 2.258 \mu\text{g/ml}$. Ethyl acetate extract had moderate cytotoxic activity with IC_{50} $28.39 \pm 9.887 \mu\text{g/ml}$ and strong antioxidant activity IC_{50} $31.018 \pm 0.127 \mu\text{g/ml}$. Ethanol extract has weak cytotoxic activity with IC_{50} $256.3 \pm 4.729 \mu\text{g/ml}$ and very strong antioxidant with IC_{50} $26.892 \pm 0.124 \mu\text{g/ml}$.

Keyword: cytotoxic, breast cancer, antioxidant, *Garcinia cowa* Roxb, MTT, DPPH

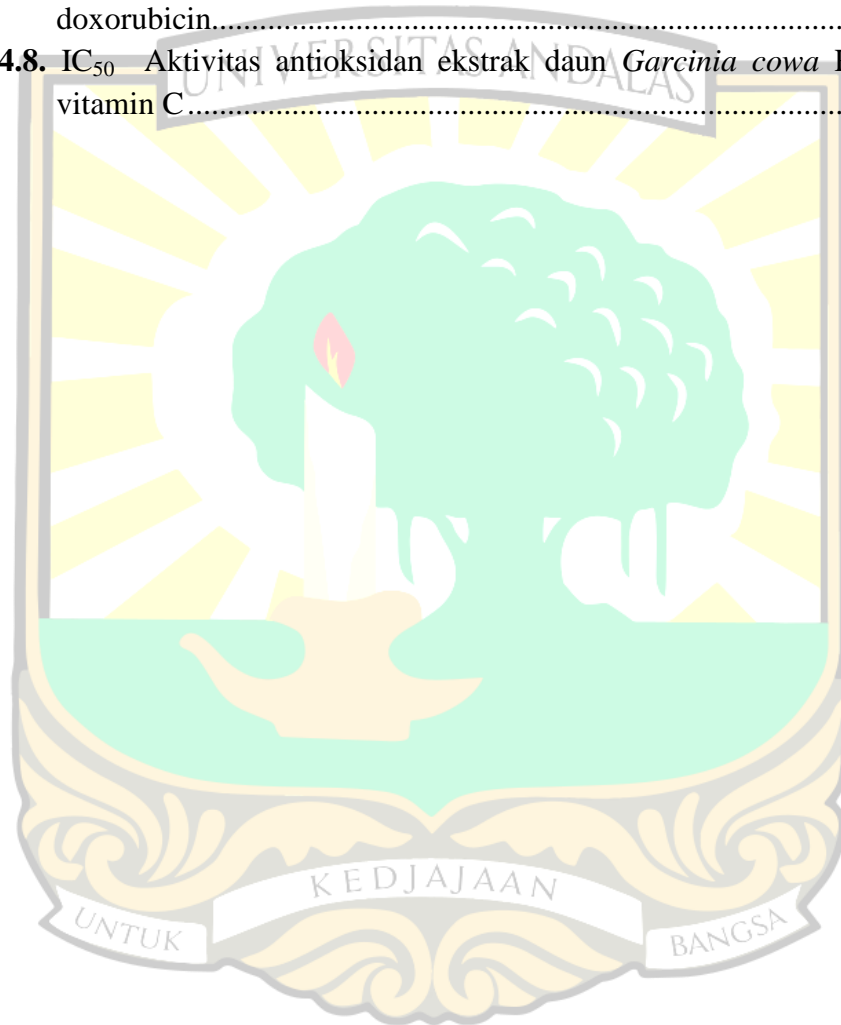
DAFTAR ISI

JUDUL	i
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah.....	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Hipotesa Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tumbuhan <i>Garcinia cowa</i> Roxb.....	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Ekologi.....	6
2.1.4 Penggunaan tradisional	6
2.1.5 Kandungan kimia.....	7
2.1.6 Tinjauan aktivitas ekstrak	11
2.1.7 Tinjauan kimia	11
2.2 Ekstraksi.....	12
2.2.1 Ekstraksi padat-cair.....	13
2.2.1 Ekstraksi cair-cair	14
2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	15
2.4 Kanker dan pengujian MTT	15
2.4.2. Kanker payudara	16
2.4.3 Sel T47D	18
2.4.4 MTT	19
2.5 Antioksidan	20
2.5.1 Radikal bebas.....	20

2.5.2. Antioksidan.....	21
2.5.3 Metode pengujian antioksidan.....	24
2.6 Antioksidan sebagai pencegahan kanker	25
III. METODE KERJA.....	26
3.1 Waktu penelitian	26
3.2 Metode	26
3.2.1 Alat.....	26
3.2.2 Bahan	26
3.3 Prosedur penelitian.....	26
3.3.1 Pengambilan sampel	26
3.3.2 Identifikasi tanaman.....	26
3.3.3 Penyiapan sampel	27
3.3.5 Karakteristik ekstrak	27
3.3.7 Uji Antioksidan.....	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1 Ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb	34
4.1.1 Ekstraksi.....	34
4.1.2 Karakterisasi ekstrak.....	35
4.1.3 Pemeriksaan kandungan.....	36
4.1.4 Profil KLT.....	38
4.2 Antikanker payudara.....	39
4.3 Aktivitas Antioksidan	46
4.4 Hubungan kandungan metabolit sekunder dan aktivitas	51
V . KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1 Kesimpulan	54
5.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA	55

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil rendemen ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb.....	35
Tabel 4.2. Hasil uji organoleptis ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb.....	35
Tabel 4.3. Hasil susut pengeringan ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb.....	35
Tabel 4.5. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb.....	36
Tabel 4.6. Persentase viabilitas sel kanker payudara T47D ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb.....	42
Tabel 4.7. Perbandingan $IC_{50} \pm SD$ ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb dan doxorubicin.....	43
Tabel 4.8. IC_{50} Aktivitas antioksidan ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb dan vitamin C.....	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Tumbuhan <i>Garcinia cowa</i> Roxb	5
Gambar 2.2. Bagian tumbuhan <i>Garcinia cowa</i> Roxb.....	6
Gambar 2.3. Senyawa isolasi <i>Garcinia cowa</i> Roxb wahyuni 2015.	8
Gambar 2.4. Senyawa hasil isolasi daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb Raksat 2020	11
Gambar 2.5. Anatomi dan histologi kanker payudara	16
Gambar 2.6. Skema faktor resiko kanker payudara.....	17
Gambar 2.7. Mekanisme pengujian MTT	19
Gambar 2.8. Perubahan MTT menjadi formazan	20
Gambar 2.9. Sumber utama radikal bebas dalam tubuh dan kerusakan yang diakibatkan	21
Gambar 2.10. Peran antioksidan dalam kesehatan	22
Gambar 2.11. Stuktur (a)DPPH (radikal bebas), (b) difenilpicrilhidrazin (radikal non bebas).....	25
Gambar 4.2. Analisis IC ₅₀ aktivitas sitotoksik kanker payudara sel T47D dari ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb dan doxorubicin	43
Gambar 4.3. Diagram batang aktivitas sitotoksik kanker payudara T47D oleh ekstrak daun <i>Garcinia cowa</i> Roxb dan doxorubicin	44
Gambar 4.4 Diagram batang hambatan radikal DPPH oleh ekstrak daun.....	48
Gambar 4.5. Aktivitas penghambatan radikal bebas ekstrak daun.....	49
Gambar 4.6. Aktivitas penghambatan radikal bebas vitamin C	49
Gambar 4.7. Diagram batang aktivitas antioksidan ekstrak	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil pengujian MTT dan DPPH.....	60
Lampiran 2. Contoh perhitungan	72
Lampiran 3. Foto hasil penelitian.....	75



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kanker merupakan suatu kegagalan genetik sel yang tumbuh tidak terkontrol secara berlebihan dan tidak normal (1). Menurut WHO (*World Health Organization*) kanker menjadi penyebab kematian kedua di dunia, terhitung tahun 2018 sekitar 9,6 juta kematian atau satu dari enam kematian disebabkan oleh kanker (2). Indonesia menjadi negara kedelapan tertinggi kasus kanker di Asia Tenggara dengan peningkatan kasus terhitung dari 2013 hingga tahun 2018 mengalami peningkatan kasus dari 1,4 per 1000 penduduk menjadi 1,79 per 1000 penduduk (3).

Berdasarkan data kemenkes 2019, kanker payudara menjadi kanker dengan kasus tertinggi di Indonesia dengan prevalensi sebesar 42,1 per 100.000 penduduk dengan tingkat kematian 17 per 100.000 penduduk. Kanker payudara merupakan keganasan yang terjadi pada jaringan payudara yang berasal dari epitel duktus atau lobulusnya (3). Sekitar 80% kejadian kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut, dimana pada stadium ini upaya pengobatan sudah sulit dilakukan. Kanker payudara bukan hanya dialami oleh perempuan namun juga laki-laki dengan prevalensi 1% (4).

Berbagai upaya telah dilakukan dalam mengobati penyakit kanker payudara dengan metode pengobatan seperti pembedahan, penyinaran, dan kemoterapi, namun metode-metode tersebut masih memiliki kekurangan dan keterbatasan. Pengobatan dengan menggunakan pembedahan hanya dapat dilakukan untuk kanker lokal stadium awal namun tidak dapat digunakan untuk pengobatan stadium lanjut dan kanker yang mengalami metastasis. Pengobatan dengan menggunakan penyinaran dan kemoterapi tidak selektif sehingga merusak sel normal (5). Terapi-terapi penyakit kanker ini tergolong kedalam pengobatan yang mahal dan sulit dijangkau oleh semua golongan masyarakat Indonesia yang merupakan negara berkembang dengan angka kemiskinan yang cukup tinggi.

Tingginya mortalitas penyakit kanker payudara di Indonesia mendorong peneliti untuk melakukan penelitian terkait penemuan obat kanker payudara yang

lebih aman dan lebih mudah dijangkau oleh semua golongan masyarakat. Peneliti menilai dalam upaya mengatasi penyakit kanker payudara ini bukan hanya dibutuhkan pengobatan namun juga diperlukan pencegahan.

Pencegahan kanker payudara dapat dilakukan dengan mencegah terjadinya stress oksidatif. Stress oksidatif ialah hasil ketidakseimbangan antara Spesies Oksigen Reaktif (ROS) dengan pertahanan antioksidan endogen dalam tubuh. Stress oksidatif menyebabkan kerusakan sel yang menjadi penyebab kanker (6,7). Senyawa-senyawa antioksidan dapat menetralkan ROS sehingga dapat menjadi salah satu pencegah kanker (8). Selain dapat mencegah kanker, antioksidan dapat berperan sebagai agen hepatoprotektor, mencegah penyakit kardiovaskular, mengobati berbagai penyakit syaraf dan menjaga keadaan sel darah merah (6).

Dalam melakukan penelitian penemuan obat dan pencegahan kanker payudara, peneliti tertarik melakukan penelitian berbasiskan tumbuhan. Dilihat dari segi jumlahnya yang melimpah dan mudah didapatkan, tumbuhan juga telah banyak menunjukkan aktivitas yang potensial dalam pengobatan.

Garcinia cowa Roxb atau yang lebih dikenal oleh masyarakat Indonesia dengan nama asam kandis. Tumbuhan ini telah dimanfaatkan dalam berbagai pengobatan tradisional yang terbukti secara empirik khasiatnya. Di Indonesia pemanfaatan tumbuhan ini masih terbatas pada kulit kering buah sebagai bumbu masakan. Daun tumbuhan ini masih jarang dimanfaatkan oleh masyarakat dan hanya menjadi sampah organik, padahal daun tumbuhan ini memiliki manfaat yang besar dalam pengobatan. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian terhadap daun *G.cowa*.

Dari tinjauan literatur yang dilakukan diketahui bahwa ekstrak etanol daun *G.cowa*. Roxb memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T74D dengan IC_{50} $6,13 \pm 3,51 \mu\text{g} /\text{mL}$ (9). Hasil isolasi daun *G.cowa*, ditemukan tiga senyawa aktif terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC_{50} sebesar $21.0 \pm 10.2 \mu\text{M}$, $21.2 \pm 8.4 \mu\text{M}$ dan $17.2 \pm 6.2\mu\text{M}$ (10). Selain itu diketahui ekstrak

DCM daun *G.cowa* menunjukkan aktivitas antioksidan nilai IC_{50} 27,316 $\mu\text{g/mL}$ (11).

Meskipun telah dilakukan penelitian antivitas sitotoksik dan antioksidan daun *G.cowa*, namun masih diperlukan penelitian tambahan untuk melengkapi penelitian-penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini digunakan teknik ekstraksi yang berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu perkolasi dengan tiga pelarut yang berbeda kepolaran yaitu n-heksan, etil asetat dan etanol.

Uji aktivitas sitotoksik ekstrak daun *G.cowa* Roxb dilakukan dengan metode MTT (*Microtetrazolium*) dan uji antioksidan dengan metode DPPH. Pemilihan metode MTT dan DPPH karena merupakan pengujian sederhana serta merupakan metode yang umum dilakukan untuk pengujian antikanker dan antioksidan, selain itu pengujian dengan menggunakan DPPH tidak membutuhkan waktu yang lama.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan konstribusi dalam penemuan obat dan pencegahan kanker payudara serta meningkatkan penggunaan tumbuhan terutama *G.cowa* dalam pengobatan.

1.2 Rumusan masalah

1. Bagaimana aktivitas sitotoksik ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun *Garcinia cowa* Roxb terhadap sel kanker payudara T47D ?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun *Garcinia cowa* Roxb ?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun *Garcinia cowa* Roxb terhadap sel kanker payudara T47D.
2. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun *Garcinia cowa* Roxb.

1.4 Hipotesa Penelitian

1. Ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun *Garcinia cowa* Roxb memberikan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D.

2. Ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun *Garcinia cowa* Roxb menunjukkan aktivitas antioksidan .



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan *Garcinia cowa* Roxb.



Gambar 2.1. Tumbuhan *Garcinia cowa* Roxb

2.1.1 Klasifikasi

Tumbuhan *Garcinia cowa* Roxb atau yang sering disebut tumbuhan asam kandis memiliki klasifikasi yaitu:

- Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledone
Ordo : Guttiferales
Famili : Guttiferae
Genus : *Garcinia*
Spesies : *Garcinia cowa* Roxb. (12)

2.1.2 Morfologi

Tumbuhan *Garcinia cowa* Roxb memiliki buah muda dengan rasa asam, batang berkulit kayu berwarna coklat tua dengan lateks berwarna kuning.

Tumbuhan ini memiliki bunga yang ditemukan pada ujung cabang berkelamin tunggal, berwarna kuning untuk bunga kelamin kuning dan berwarna orange untuk bunga berkelamin jantan. Daun mengkilap, hijau tua, lonjong dan panjang hingga 6-15 cm dan lebar 2,5-6,0 cm. Buahnya bulat berukuran 2,5-6 cm berwarna hijau saat muda dan oranye kusam atau kuning saat dewasa (13).



Gambar 2. 2. Bagian tumbuhan *Garcinia cowa* Roxb (a) Daun (b) Batang, dan (c) buah.

2.1.3 Ekologi

Garcinia cowa Roxb tumbuh tersebar di daerah bergelombang dan hutan cemara di negara tropis dan subtropis, Asia tenggara, Afrika Barat dan Afrika Timur (14–16). Di Indonesia tumbuhan ini tersebar di seluruh Indonesia dan Semenanjung Malaya (9). Masyarakat Minangkabau (Sumatra Barat) mengenal tumbuhan ini dengan nama asam kandis, sedangkan di Thailand dikenal dengan nama Cha Muang (9,17).

2.1.4 Penggunaan tradisional

Tumbuhan *G. cowa* telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat dalam kebutuhan sehari-hari maupun dalam pengobatan tradisional yang telah terbukti manfaatnya secara empirik. Daun dan buah tumbuhan ini dimanfaatkan sebagai

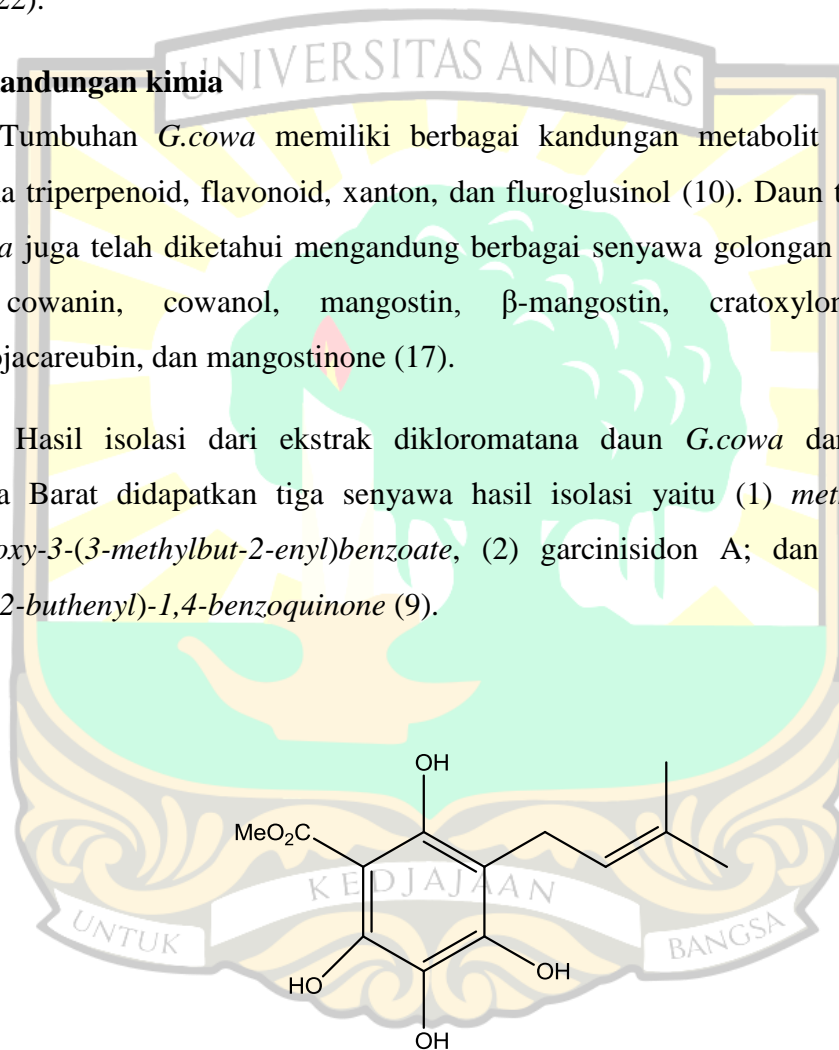
sayuran dan makanan, sedangkan di Sumatera Barat buah keringnya dimanfaatkan sebagai bumbu masak (18–20).

Dalam pengobatan tradisional kulit batang *G. cowa* di manfaatkan sebagai pengobatan infeksi oleh mikroba dan mengobati demam (16,17,21). Buah dan daun tumbuhan ini dimanfaatkan dalam pengobatan gangguan pencernaan seperti sembelit dan batuk serta lateksnya dimanfaatkan dalam mengatasi demam (14,16,22).

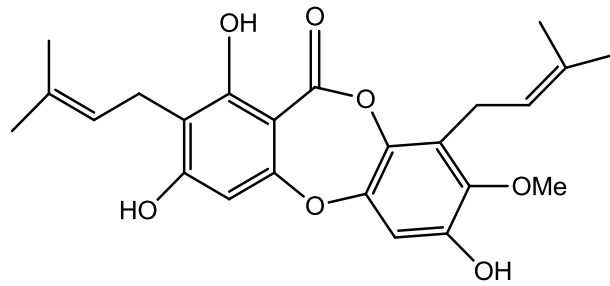
2.1.5 Kandungan kimia

Tumbuhan *G.cowa* memiliki berbagai kandungan metabolit sekunder, terutama triperpenoid, flavonoid, xanton, dan fluroglusinol (10). Daun tumbuhan *G. cowa* juga telah diketahui mengandung berbagai senyawa golongan xanthone yaitu cowanin, cowanol, mangostin, β -mangostin, cratoxylone, 3-4-dihydrojacareubin, dan mangostinone (17).

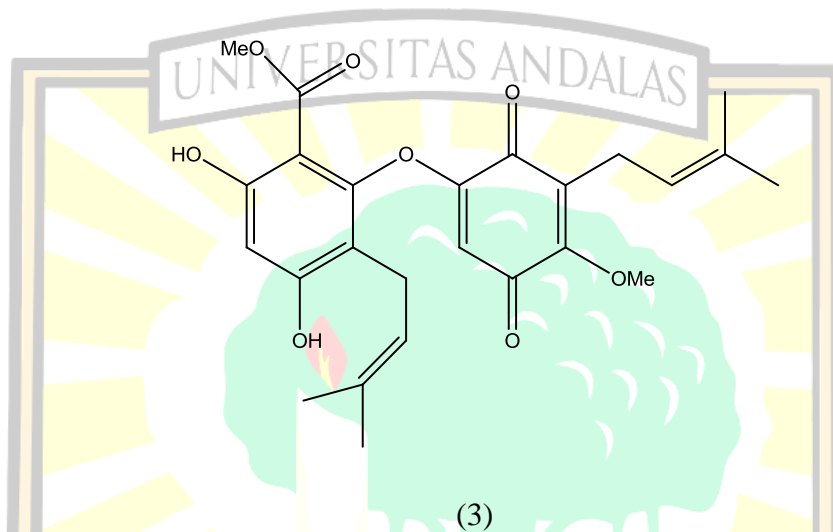
Hasil isolasi dari ekstrak dikloromatana daun *G.cowa* dari daerah Sumatra Barat didapatkan tiga senyawa hasil isolasi yaitu (1) *methyl-2,4,6-trihydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)benzoate*, (2) *garcinisidon A*; dan (3) *3-(1-methyl-2-buthenyl)-1,4-benzoquinone* (9).



(1)



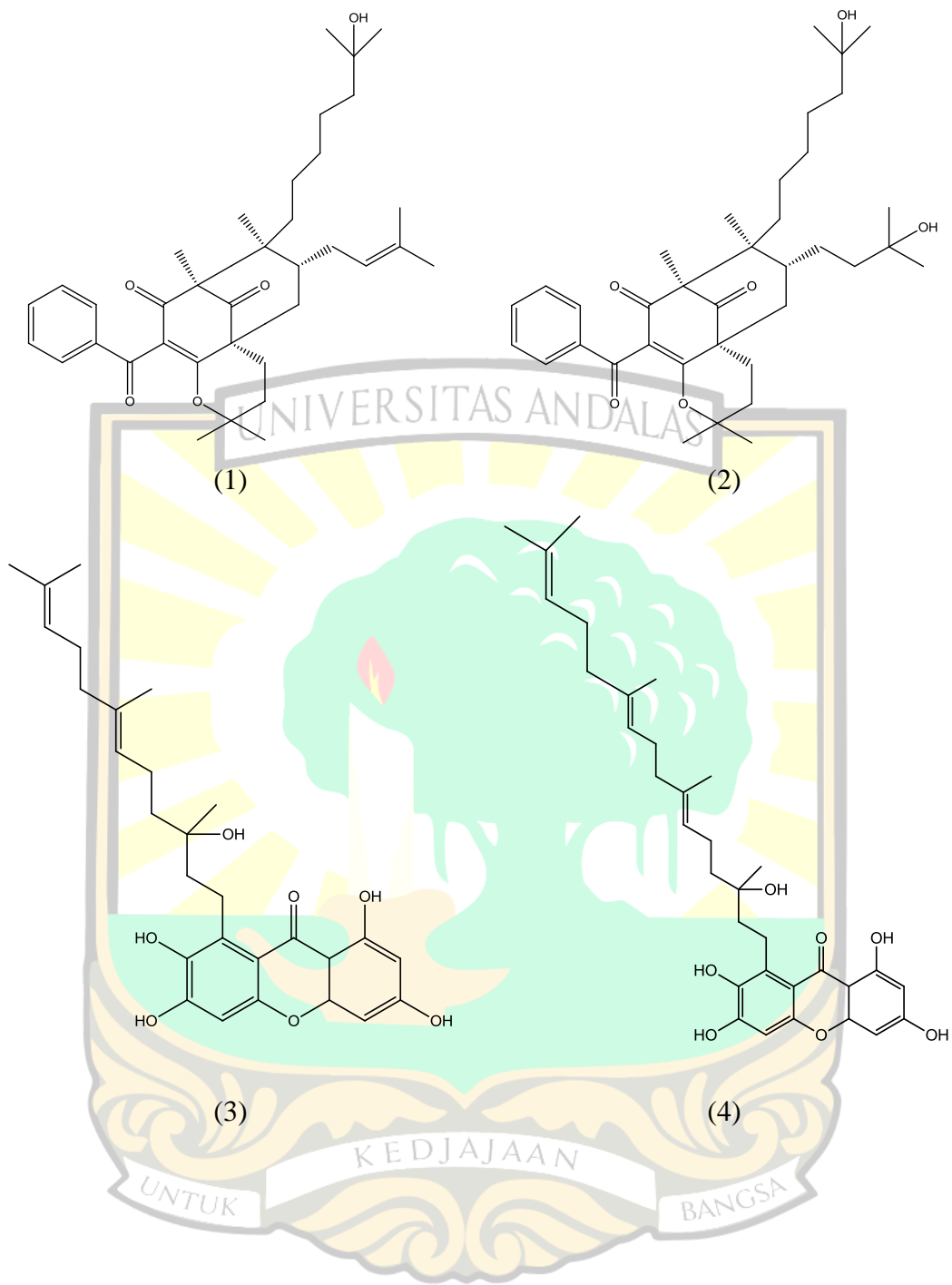
(2)

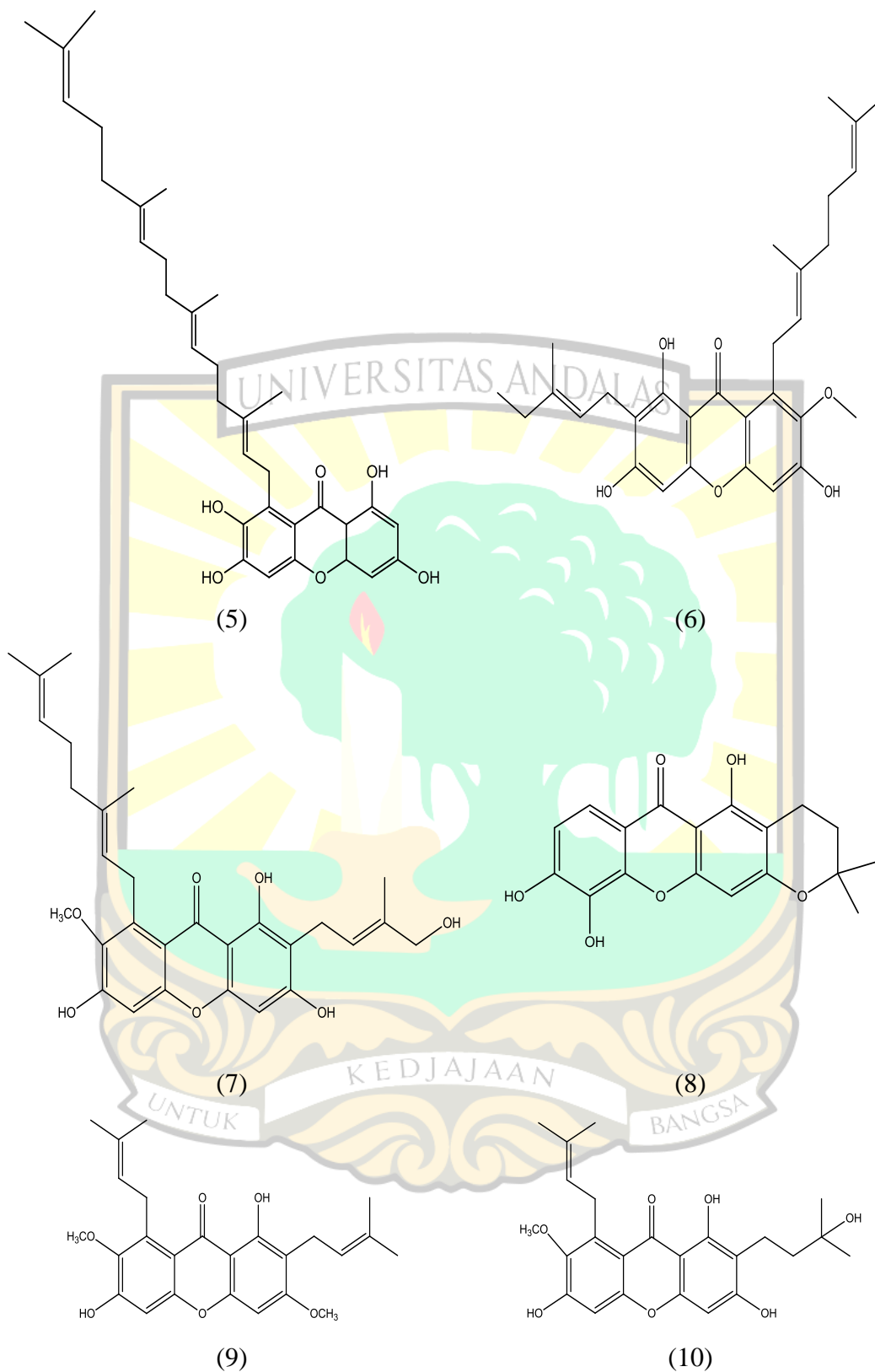


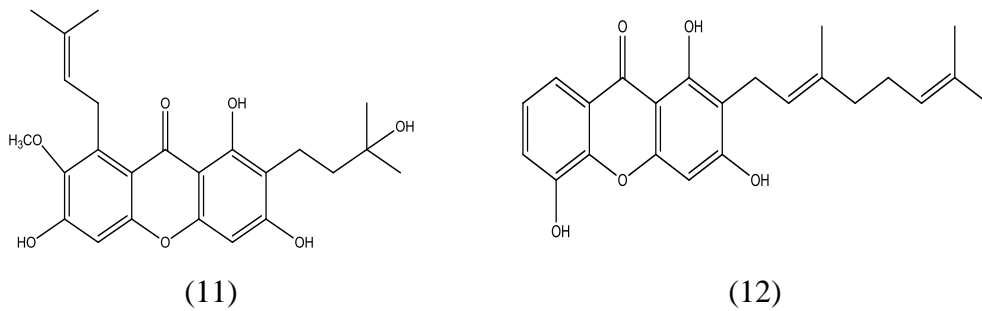
(3)

Gambar 2. 3. Senyawa isolasi *Garcinia cowa* Roxb wahyuni 2015 (9).

Daun *G.cowa* diketahui mengandung senyawa Chamuangone, dan daun segarnya mengandung senyawa *Oxalic acid*, *Citric acid*, dan *(-)-Hydroxycitric acid lactone*(13). Hasil isolasi Raksat (2020) ekstrak daun *G. cowa* ditemukan dua benzofenon baru, *garciniacowones F* (1) dan *G* (2), tiga xanthone baru,*garciniacowones H* (3), *I* (4), dan *J* (5), dan tujuh senyawa (6-12)(17). Kedua belas senyawa tersebut ialah (1) *garcinacowanes F*, (2) *garcinacowanes G*, (3) *garcinacowanes H*, (4) *garcinacowanes I*, (5) *garcinacowanes J*, (6) *cowanin*, (7) *cowanol*, (8) *mangostinin*, (9) β -*mangostin*, (10) *cratoxylone*, (11) *3,4-dihydrojacareubin*, dan (12) *mangostinone*.







Gambar 2.4. Senyawa hasil isolasi daun *Garcinia cowa* Roxb Raksat 2020 (17)

2.1.6 Tinjauan aktivitas ekstrak

Dari penelitian sebelumnya ekstrak daun *Garcinia cowa* Robx telah dilaporkan memiliki manfaat dalam pengobatan. Ekstrak etanol daun *Garcinia cowa* Robx telah terbukti memiliki aktivitas antitumor, anti inflamasi, antioksidan dan antibakteri (9,14,16,21). Ekstrak metanol daun dan ranting *G.cowa* memiliki kemampuan dalam menghambat peroksidasi lipoprotein densitas rendah yang di induksi oleh ion tembaga. Aktivitas penghambatan lebih besar di tunjukkan oleh ekstrak rating (13). Ekstrak metanol daun kering dan segar dari tumbuhan ini menunjukkan aktivitas antitumor pada konsentrasi 200 µg/ml terhadap kultur sel yang di induksi dengan menggunakan virus *Epstein-Barr*. Ekstrak eter daun kering menunjukkan aktivitas antiviral pada sel yang juga di induksi dengan virus *Epstein-Barr* (18).

Ekstrak etanol daun asam kandis memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T74D dengan IC_{50} $6,13 \pm 3,51$ µg/ml , ekstrak etanol menunjukkan penghambatan signifikan pada konsentrasi 10 µg/mL dan 100 µg/ml (10).

2.1.7 Tinjauan kimia

Dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya diketahui bahwa daun *Garcinia cowa* Robx mengandung senyawa chamuangone yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) 7,8 µg/ml, *Streptococuc viridans* dan bakteri *Helicobakter pylori* dengan MIC 15,6 µg/ml, bukan hanya itu senyawa ini juga menunjukkan aktivitas antibakteri pada *Bacillus subtilis*, *Enterococcuc sp.* dan *Staphylococcus aureus* dengan MIC 31,2 µg/ml (13).

Tanaman *G.cowa* mengandung Xanthone dan benzooyphloroglucinol yang menunjukkan aktivitas antibakteri, penghambatan α -glukosidase, efek sitotoksik, antioksidan dan antiinflamasi (14).

Raksat dkk (2020) telah mengisolasi daun *G.cowa* dan mendapatkan 12 senyawa yang telah dilakukan pengujian aktivitas penghambatan glukosa. Aktivitas penghambatan α -glukosidase tertinggi ditunjukkan oleh senyawa 2, dengan nilai IC_{50} sebesar 13,1 μ M, diikuti oleh senyawa 6 (IC_{50} 15,0 μ M) dan senyawa 7 (IC_{50} 18,0 μ M). Senyawa 2, 6, dan 7 merupakan senyawa utama dengan aktivitas penghambatan α -glukosidase yang lebih tinggi dibandingkan dengan akarbose (senyawa kontrol positif) (17).

Hasil isolasi wahyuni (2015) dijelaskan bahwa metil 2,4,6- trihydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl) benzoate (1), garcinisidone-A (2) dan methyl 4,6dihydroxy-2-(4-methoxy-5-(3-methylbut-2-enyl)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienyloxy)-3-(3-methylbut-2-enyl) benzoate (3). Senyawa 1, 2 dan 3 memiliki nilai IC_{50} sebesar $21,0 \pm 10,2 \mu$ M, $21,2 \pm 8,4 \mu$ M dan $17,2 \pm 6,2 \mu$ M terhadap MCF-7, sedangkan hanya senyawa (2) ditemukan aktif terhadap H-460 dengan nilai IC_{50} $18,1 \pm 6,7 \mu$ M (10).

2.2 Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (23).

Ekstraksi adalah pengambilan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang menjadi target untuk dipisahkan dari biomasa atau ampas atau bagian yang tidak diperlukan karena sifatnya yang mengganggu baik dalam penyajian maupun karena mengganggu efektivitas khasiat dari bahan aktifnya (24).

Klasifikasi ekstraksi berdasarkan sampel yang digunakan dibagi menjadi 2 yaitu :

2.2.1 Ekstraksi padat-cair

Ekstraksi padat cair ialah proses pemisahan secara difusi analit dari sampel padat kedalam pelarut. Prinsip ekstraksi padat-cair didasarkan kemampuan daya larut analit dalam pelarut, sehingga pelarut yang digunakan ialah pelarut yang dapat melarutkan dan mampu menarik analit yang diinginkan (25). Proses ekstraksi padat-cair meliputi pelarut menembus matriks padat, zat terlarut larut dalam pelarut dan keluar matriks, kemudian pelarut dikumpulkan. Selain sifat pelarut yang digunakan ukuran partikel zat padatan, suhu dan durasi dalam ekstraksi juga menentukan efisiensi ekstrak (26).

Berdasarkan prosesnya ekstraksi padat cair dibedakan menjadi :

a. Meserasi

Metode ekstraksi yang digunakan untuk ekstraksi komponen termolabil, metode ini merupakan metode yang sederhana namun membutuhkan waktu yang lama dengan efisiensi ekstraksi yang rendah (26). Selain itu proses meserasi membutuhkan pelarut yang banyak. Proses meserasi dilakukan dengan cara merendam sampel pada suhu kamar menggunakan pelarut yang sesuai selama 3-5 hari dan dilakukan pengadukan sesekali untuk mempercepat proses pelarutan analit (25). Ekstraksi dilakukan secara berulang kali sehingga semua analit tertarik secara sempurna dalam pelarutnya, parameter yang digunakan untuk melihat proses meserasi telah mencapai optimal (semua analit sudah tertarik ialah pelarut sudah tidak berwarna) (25).

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses ekstraksi padat-cair secara terus menerus dimana pelarut jenuh terus-menerus diganti dengan pelarut baru (26). Pelarut dialirkan secara perlahan-lahan pada sampel pada suatu perlokator. Indikasi untuk melihat analit telah terekstraksi secara sempurna adalah pelarut yang digunakan tidak berwarna (25). Parameter lain yang dapat digunakan untuk melihat analit sudah terekstraksi secara sempurna ialah dengan menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) atau spektrofotometri UV. Jika menggunakan KLT ditandai jika tidak terdapat noda/spot pada plat KLT, dan jika menggunakan spektrofotometer UV tidak terdapat puncak/peak pada kromatogram (25).

c. Dekonsasi

Proses ekstraksi dengan menggunakan metode dekonsasi tidak dapat digunakan untuk zat termolabil atau volatile. Dalam ekstraksi menggunakan pelarut air dengan pemanasan (26).

d. Refluks

Metode refluks menggunakan pelarut yang relatif lebih sedikit dengan waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan meserasi dan perkolasi. Meskipun menggunakan pelarut yang relatif yang sedikit dan waktu yang singkat namun metode refluks tidak dapat digunakan untuk senyawa yang termolabil (26).

e. Sokletasi

Metode sokletasi mengkombinasikan keunggulan ekstraksi metode perkolasi dengan metode refluks. Ekstraksi dengan metode sokletasi ialah metode ekstraksi terus menerus yang lebih efisien dengan menggunakan pelarut yang lebih sedikit dan pemanasan (26). Namun penggunaan suhu yang tinggi pada metode sokletasi dengan waktu yang lama akan menyebabkan degradasi termal (26). Pada sokletasi, pelarut dan sampel diletakkan secara terpisah dengan prinsip ekstraksi dilakukan terus menerus menggunakan pelarut yang relatif sedikit (26). Sokletasi dilakukan dengan pemanasan pelarut, uap pelarut yang dihasilkan mengalami pendingin oleh kondesor, uap pelarut tersebut akan menjadi pelarut kembali yang akan membasahi sampel secara terus menerus dan akan masuk kembali ke labu yang berisikan pelarut (26).

2.2.1 Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair atau ekstraksi pelarut merupakan metode pemisahan yang didasarkan pada fenomena distribusi atau partisi analit diantara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Ekstraksi cair-cair digunakan untuk pemisahan senyawa dalam fase cair dengan menggunakan fase cair lainnya dengan menggunakan prinsip perbedaan kelarutan dalam dua pelarut yang berbeda. Pada ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah, penggunaan corong pisah didasarkan pada pemisahan dua fase pelarut dengan perbedaan massa jenis atau densitas yang terpisah dalam corong pisah (25).

2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan teknik pemisahan campuran yang dilakukan diatas selembaar kaca, plastik atau aluminium foil yang dilapisi dengan lapisan tipis adsorben. Lapisan adsorben yang biasa digunakan ialah silika gel, aluminium oksida, atau selulosa (kertas penyerap). Dalam KLT lapisan adsorben berperan sebagai fase diam dan sebagai fase gerak ialah pelarut atau pun campuran beberapa pelarut. Pemisahan senyawa didasarkan kemampuan fase gerak untuk menarik campuran pada fase diam (27).

Keuntungan penggunaan KLT ialah penggunaan yang mudah, dapat dilakukan secara luas pada sampel yang berbeda, sensitifitas yang tinggi, kecepatan pemisahan yang cepat, dan biaya yang diperlukan relatif murah. Selain itu KLT juga memiliki keunggulan dimana solven yang digunakan relatif lebih sedikit, polaritas dari solven dapat diubah-ubah, dan jumlah sampel yang diukur dalam satu kali pengukuran atau pengembangan lebih banyak karena berukuran 20 cm dapat dilakukan lebih kurang 20 penotolan (28).

KLT dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu senyawa, memisahkan dan mengidentifikasi komponen dalam suatu campuran, dan analisa kualitatif dari satu atau lebih komponen yang terdapat dalam sampel (29).

Pemisahan menggunakan KLT dilakukan dengan beberapa eluen dengan berbagai tingkat kepolaran untuk memperoleh pemisahan yang baik serta noda yang baik. Bercak atau noda pada plat KLT dilihat dengan menggunakan sinar UV 254 nm atau 365 nm. Identifikasi golongan senyawa plat KLT dilakukan penyemprotan menggunakan reagen spesifik (30).

Rumus pencarian nilai Rf:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}}$$

(24)

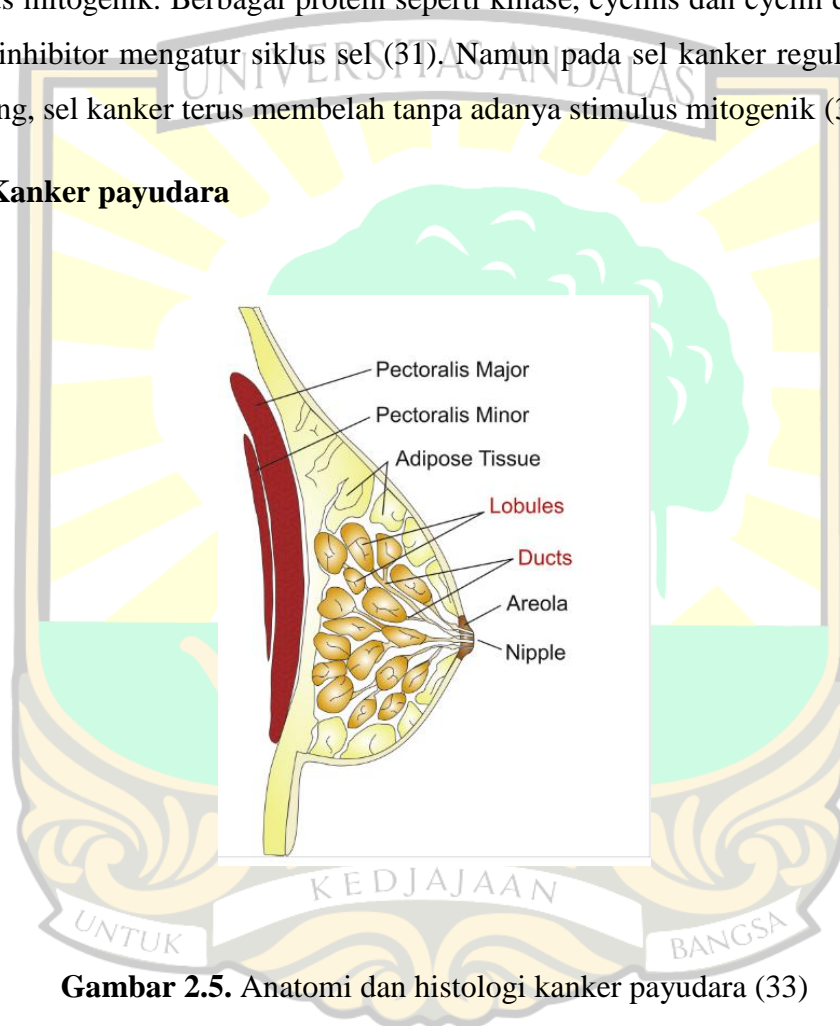
2.4 Kanker dan pengujian MTT

2.4.1 Kanker

Kanker merupakan suatu kegagalan genetik sel yang tumbuh *incoordinate* yang berlebihan, pertumbuhan yang terjadi tidak normal (1). Sel kanker memiliki siklus sel yang berbeda dengan sel normal.

Siklus sel dapat didefinisikan sebagai serangkaian peristiwa yang berurutan yang berpuncak pada pembelahan dan pertumbuhan sel menjadi dua sel baru yang identik. Dalam sel normal, proses kompleks dimulai dengan adanya stimulus mitogenik. Berbagai protein seperti kinase, cyclins dan cyclin dependent kinase inhibitor mengatur siklus sel (31). Namun pada sel kanker regulasi siklus ini hilang, sel kanker terus membelah tanpa adanya stimulus mitogenik (32).

2.4.2. Kanker payudara



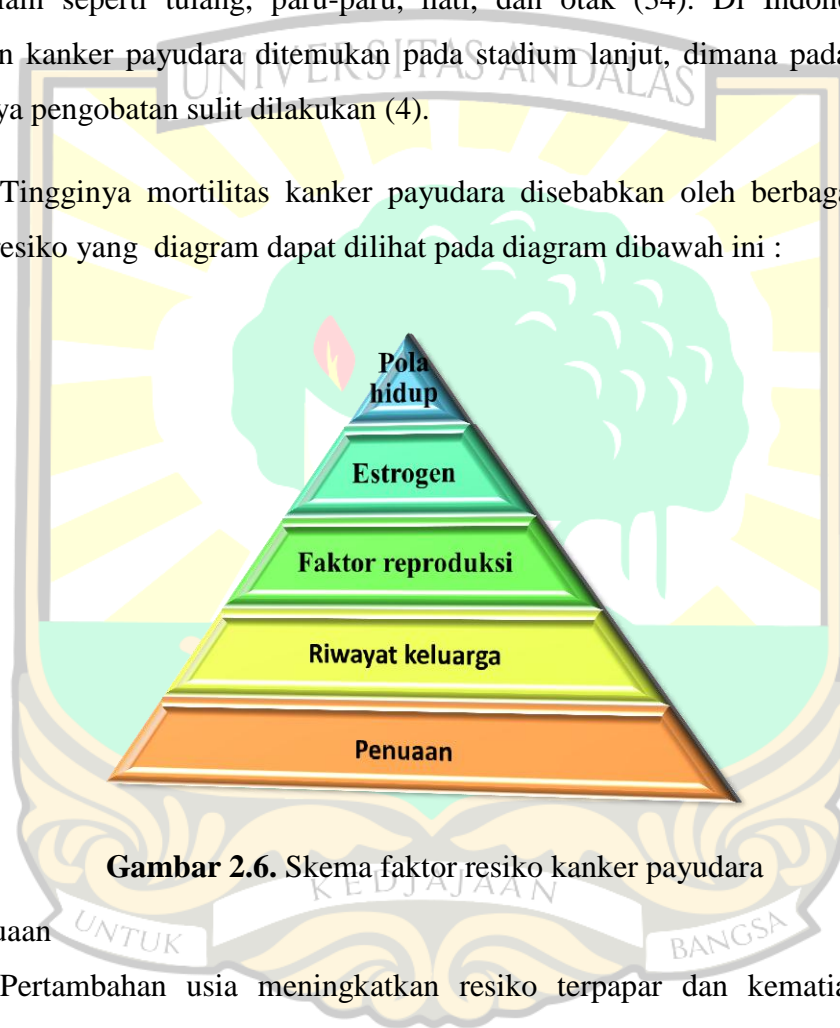
Gambar 2.5. Anatomi dan histologi kanker payudara (33)

Kanker payudara merupakan keganasan yang terjadi pada jaringan payudara yang berasal dari epitel duktus atau lobulusnya. Di Indonesia kanker payudara salah satu jenis kanker terbanyak. Berdasarkan *Pathological Based Registration* Indonesia, kanker payudara menjadi kasus kanker tertinggi dengan frekuensi relatif 18,6 pada tahun 2010. Diperkirakan kasus kanker payudara di Indonesia terjadi 12/100.000 wanita sedangkan di Amerika terjadi 92/100.000 wanita dengan mortalitas kematian 27/100.000 atau 18% dari kematian pada

wanita. Kasus ini tidak hanya terjadi pada perempuan namun juga pada laki-laki sekitar 1% (4). Tercatat pada tahun 2015, lebih 1,5 juta wanita (25 % dari semua wanita menderita kanker) didiagnosa kanker payudara setiap tahunnya di dunia. Pada tahun 2017 diperkirakan 30% dari semua kasus kanker baru di Amerika (252.710) pada wanita adalah kanker payudara (34).

Kanker payudara merupakan kanker metastasis dan dapat menyebar ke organ lain seperti tulang, paru-paru, hati, dan otak (34). Di Indonesia 80% kejadian kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut, dimana pada stadium ini upaya pengobatan sulit dilakukan (4).

Tingginya mortalitas kanker payudara disebabkan oleh berbagai faktor-faktor resiko yang dapat dilihat pada diagram dibawah ini :



Gambar 2.6. Skema faktor resiko kanker payudara

1. Penuaan

Pertambahan usia meningkatkan resiko terpapar dan kematian akibat kanker payudara. Tercatat di Amerika pada tahun 2016 99,3% dan 71,2 % kematian pada kanker payudara terjadi pada usia 40-60 tahun (34).

2. Riwayat keluarga

Kanker payudara dapat diturunkan melalui genetik yang dikaitkan dengan mutasi gen BRCA1 dan BRCA2. Wanita dengan satu kerabat dengan riwayat kanker payudara memiliki resiko 1,75 kali lipat dan 2,5 kali lipat dengan dua

kerabat dengan riwayat kanker payudara lebih tinggi resiko terpapar kanker payudara (34).

3. Faktor reproduksi

Faktor reproduksi seperti usia kehamilan pertama, usia monopouse, dan usia menstruasi pertama. Faktor reproduksi ini berkaitan dengan antara ER+ dan ER-. Semakin tua usia kehamilan pertama, semakin muda usia menstruasi pertama dan semakin tua usia monopouse akan meningkatkan resiko terpapar kanker (34).

4. Estrogen

Hormon estrogen eksogen seperti terapi pengganti hormon, penggunaan kontrasepsi hormonal meningkatkan resiko seseorang wanita terpapar kanker payudara (34).

5. Gaya hidup

Gaya hidup yang tidak sehat seperti konsumsi alkohol berlebihan, makanan berlemak dapat menjadi faktor resiko terpapar kanker payudara. Konsumsi alkohol dapat meningkatkan kadar hormon estrogen dan konsumsi tinggi kalori, kaya lemak hewani dan kaya protein dapat meningkatkan kadar insulin yang menyebabkan peningkatan kadar androgen dan penurunan kadar *Sex Hormon Binding Globulin* (SHBG). Penurunan kadar SHBG mengakibatkan peningkatan kadar estrogen yang memicu terjadinya karsinoma payudara (34,35).

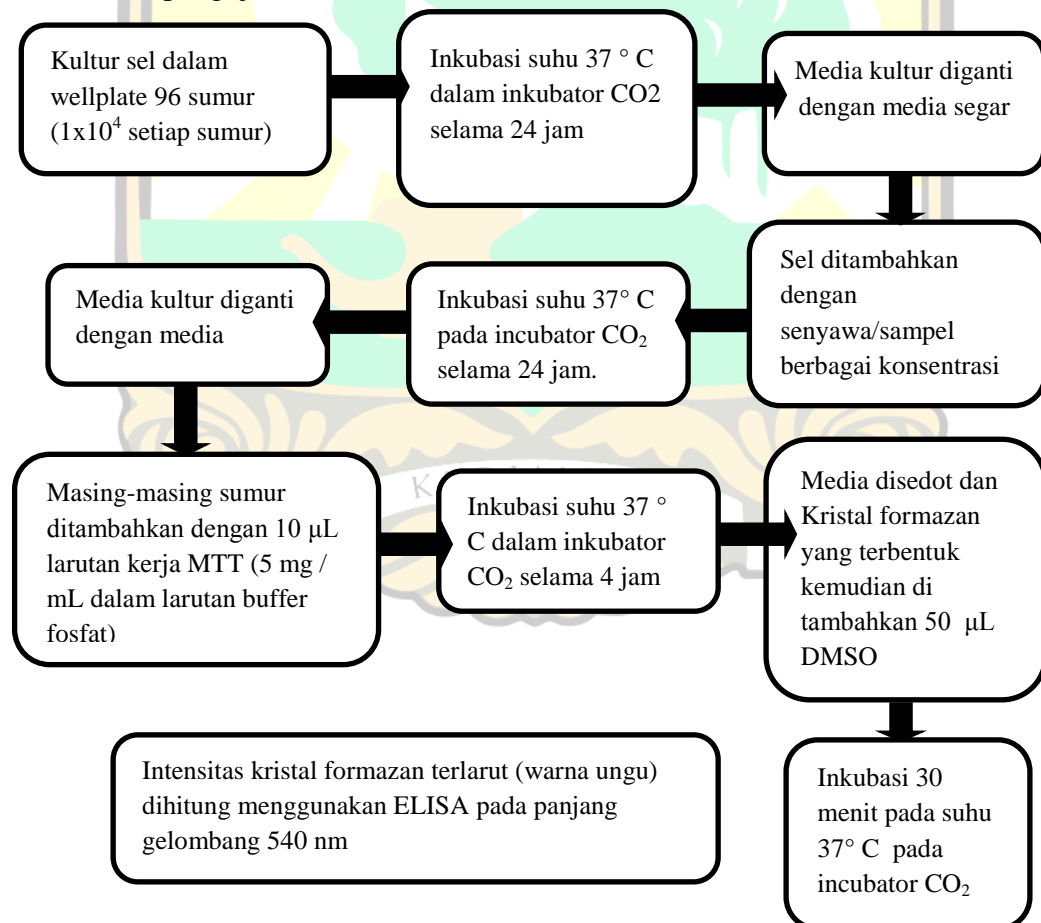
2.4.3 Sel T47D

T47D merupakan garis sel kanker payudara, garis sel atau *cell line* merupakan populasi sel yang sengaja diturunkan dari satu jenis sel dalam organisme hidup (28). Garis sel kanker dibuat untuk ditanam dalam waktu lama secara *in vitro* (36). Garis sel kanker payudara manusia menyediakan platform yang sangat baik untuk penelitian kanker payudara dan pengembangan obatnya. Garis sel kanker payudara yang umum digunakan dalam pengujian ialah T47D dan MCF7, kedua garis sel ini merupakan garis sel kanker payudara yang tergantung hormon manusia yang banyak digunakan dalam pengujian studi kanker payudara. Dua baris sel ini digunakan dalam pengujian secara *in vitro* maupun *in vivo* dengan menggunakan tikus (tumor xenograft pada tikus) dari fungsi gen dan protein serta penilaian efikasi inhibitory (36).

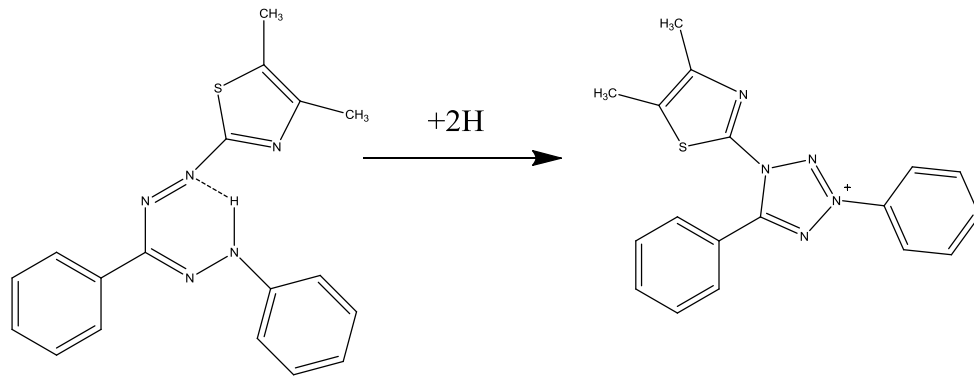
2.4.4 MTT

MTT adalah metode yang umum digunakan untuk evaluasi viabilitas sel dan sitotoksik untuk skrining obat. Prinsip metode ini ialah reduksi MTT (bewarna kuning) dan pewarna tetrazolium lainnya bergantung pada aktivitas metabolik sekunder seluler oleh enzim oksidoreduktase seluler yang bergantung pada NAD(P)H. Sel yang sehat dan tumbuh dengan cepat akan mengubah MTT menjadi formazan sehingga kadar formazan tinggi sedangkan sel yang mati akan gagal untuk menghasilkan formazan. Produk akhir dari MTT ialah formazan warna ungu yang mudah larut dalam DMSO. Pengukuran viabilitas dalam uji MTT dilakukan pada gelombang 540 nm, semakin tinggi kadar formazan yang dihasilkan maka semakin tinggi absorban yang dihasilkan dan sebaliknya. Warna ungu dan absorban dari formazan yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel (36).

Mekanisme pengujian MTT :



Gambar 2.7. Mekanisme pengujian MTT (37)

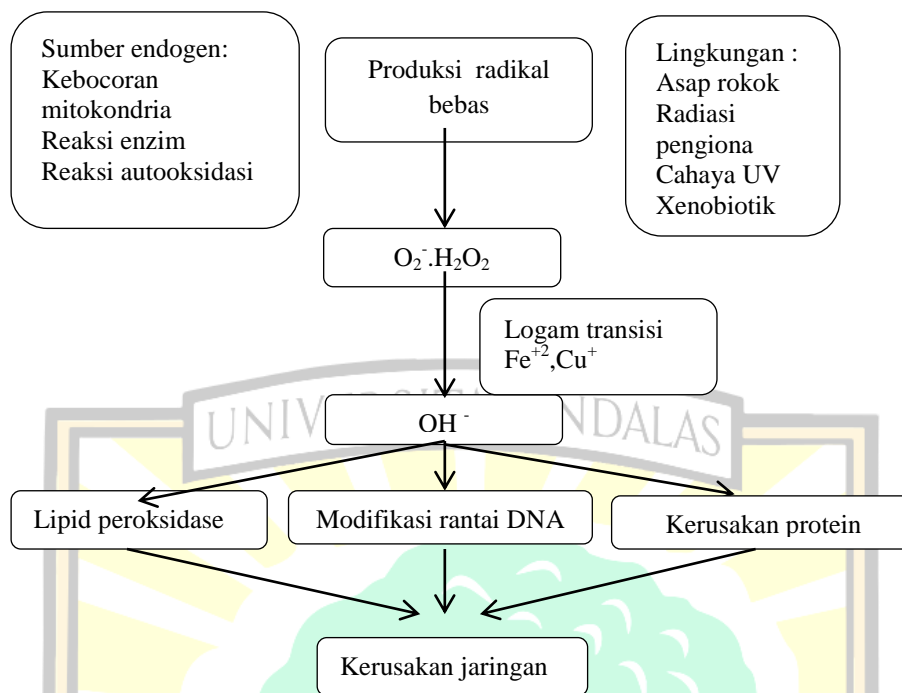


Gambar 2.8. Perubahan MTT menjadi formazan (36)

2.5 Antioksidan

2.5.1 Radikal bebas

Radikal bebas adalah suatu molekul atom, atau gugus yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada kulit bagian terluar sehingga bersifat reaktif (7). Radikal bebas dalam tubuh dihasilkan dari proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung selama bernafas, metabolisme sel, olahraga yang berlebihan, peradangan dan terpapar polusi (asap kendaraan, asap rokok, makanan, logam berat, dan radiasi matahari). Dalam tubuh radikal bebas akan bereaksi dengan elektron dari molekul sekitarnya, molekul sel yang kehilangan elektron akan menjadi radikal bebas, reaksi ini akan terus berlangsung terus menerus bila tidak dihentikan akan menimbulkan stress oksidatif. Stress oksidatif adalah hasil ketidakseimbangan antara Spesies Oksigen Reaktif (ROS) dan pertahanan antioksidan yang menyebabkan peradangan, kerusakan DNA atau sel dan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, artritis, asma, penyakit autoimun, diabetes, penyakit neurodegeneratif, penyakit alzheimer, demensia parkinson serta penyakit degenerative lainnya (6,7). Radikal bebas dalam tubuh bereaksi dengan cepat dengan membran yang akhirnya menyebabkan degenerasi sel dan akhirnya kematian sel (6).



Gambar 2.9. Sumber utama radikal bebas dalam tubuh dan kerusakan yang diakibatkan (38)

2.5.2. Antioksidan

Antioksidan memiliki kemampuan dalam menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas. Aktivitas antioksidan didefinisikan sebagai kemampuan senyawa atau campuran yang diberikan untuk mereduksi pro-antioksidan atau spesies reaktif, termasuk radikal bebas (39).

Klasifikasi antioksidan berdasarkan sumbernya:

1. Antioksidan endogen

Antioksidan endogen merupakan antioksidan yang diproduksi oleh tubuh yang dikenal dengan enzim antioksidan (enzim Superoksida Dismutase (SOD), Glutation Peroksidase (GPx), dan Katalase (CAT) (7).

2. Antioksidan sintesis

Antioksidan sintesis, banyak digunakan pada produk pangan seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), propil galat dan Tert-Butil

Hidroksi Quinon (TBHQ) (7). Penggunaan beberapa antioksidan sintetis seperti BHA dan BHT, telah terungkap berpotensi toksik dan karsinogenik (7).

3. Antioksidan alami

Antioksidan alami ialah antioksidan yang diperoleh dari tanaman (akar, daun, batang, buah, bunga, biji dan serbuk sari). Antioksidan alami yang sering dijumpai yaitu vitamin A, Vitamin C, vitamin E dan senyawa fenolik (Flavonoid) (7).

Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan dapat dibedakan menjadi 3:

1. Antioksidan yang mencegah pembentukan radikal bebas baru

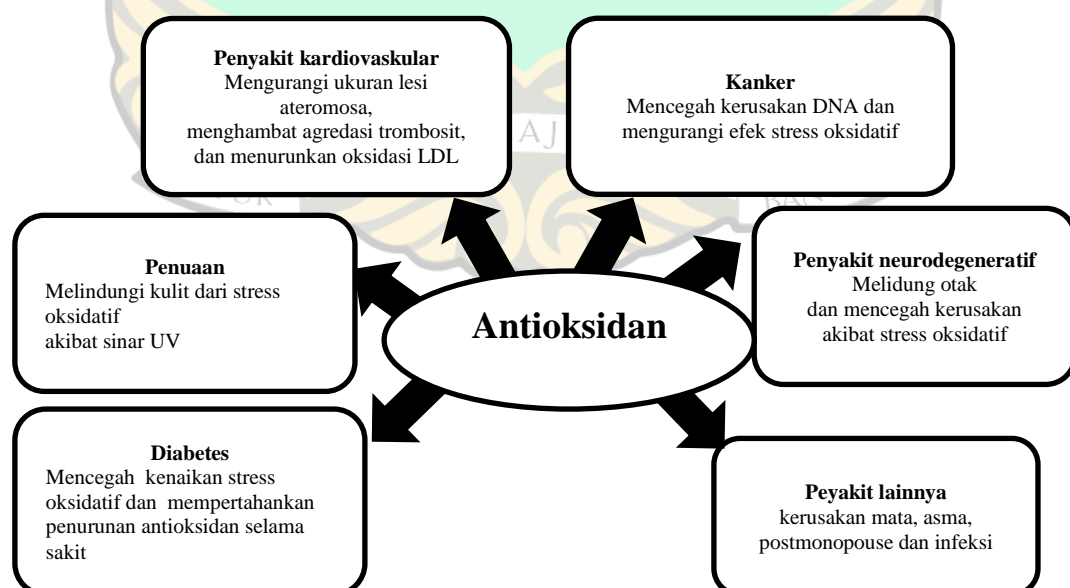
Contoh : superoksidase dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathione peroksidase dismutase (GPX), feritin, ceruloplasmin dan mineral (Se,Cu dan Zn) (38).

2. Antioksidan yang berperan dalam menangkap radikal bebas sehingga mencegah terbentuknya reaksi oksidatif.

Contoh : enzim glutathione, albumin, vitamin C dan E, karotenoid, dan flavonoid (38).

3. Antioksidan yang menyebabkan kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas

Contoh : *DNA repair enzyme, lipase, proteases, transferase, lipase, protease, reduktase metionin-sulfosidase* (38)



Gambar 2. 10. Peran antioksidan dalam kesehatan (38)

Manfaat antioksidan dalam dunia pengobatan :

1. Antioksidan sebagai antikanker

Dari hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa senyawa antioksidan Lantanida, selenium, flavonoid, likopen dan glutathione sebagai senyawa antikanker (6).

2. Antioksidan sebagai agen hepatotektor

Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa senyawa antioksidan digunakan dalam pengobatan penyakit hati. Vitamin C, E merupakan senyawa antioksidan yang telah dilakukan uji klinis sebagai pengobatan karsinoma patoselluer (6).

3. Antioksidan dalam pengobatan penyakit syaraf

Otak kecil yang berperan dalam mengendalikan berbagai aktivitas motorik, rentan akan efek merugikan yang disebabkan oleh ROS. Antioksidan telah dilaporkan dapat mencegah kerusakan oksidatif dalam perkembangan incerebellar. Beberapa antioksidan telah dilaporkan sebagai agen terapeutik untuk cedera syaraf pusat (6).

4. Antioksidan dan sel darah merah

Dalam perjalanan sel darah merah membawa CO₂ dan O₂, selama perjalan ini sel darah merah rentan akan terpapar oleh ROS intraseluler yang berasal dari antioksidan oksihemoglobin, sehingga menyebabkan kerusakan pada sel darah merah ini (6).

Antioksidan sebagai pencegahan kanker

Salah satu penyebab kanker ialah kerusakan sel yang disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Spesies Nitro Gen* (RNS). ROS dan RNS merupakan hasil samping metabolisme tubuh dalam upaya menghasikan ATP (*Adenosine Triphosphate*). ROS dan RNS dapat merusak stuktur sel, protein, lipid dan asam nukleat yang menyebabkan kerusakan DNA sel dan mutasi gen penekan tumor yang menjadi penyebab karsiogenesis (8).

Tubuh manusia memiliki antioksidan endogen yang berfungsi untuk menetralkan ROS dan RNS, namun karna faktor eksogen (seperti pola hidup) menyebabkan produksi ROS dan RNS lebih tinggi dibandingkan dengan

antioksidan endogen dalam tubuh, sehingga diperlukan antioksidan eksogen untuk mengatasi ketidak seimbangan ini (8).

2.5.3 Metode pengujian antioksidan

1. DPPH assay

Metode DPPH (2,2-Dipenyl-1-picrylhydrazyl) merupakan metode pengujian in-vitro antioksidan yang mudah, cepat dan tidak banyak menggunakan reagen (40). DPPH merupakan radikal bebas reaktif yang berperan sebagai akseptor elektron (oksidan/ oksidator) dan menyebabkan oksidasi zat lainnya. Sedangkan antioksidan berperan sebagai donor elektron yang menetralkan DPPH (41).

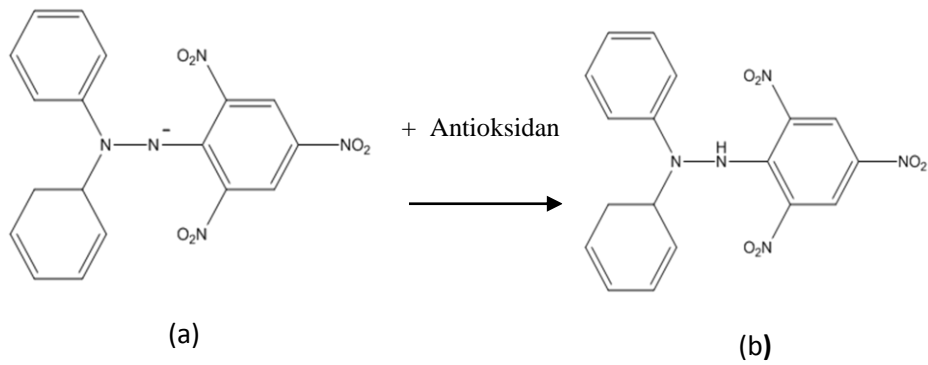
DPPH memiliki bentuk kristal berwarna gelap yang terdiri dari molekul radikal bebas yang stabil dan membentuk larutan berwarna ungu. Reaksi netralisasi DPPH oleh senyawa antioksidan ditunjukkan oleh warna ungu yang berubah menjadi kuning pucat atau tidak berwarna (41). Selain itu efek antioksidan dapat dilihat dari penurunan absorban DPPH setelah direaksikan dengan senyawa antioksidan (39).

Pengukuran aktivitas antioksidant yang dihasilkan oleh senyawa antioksidan yaitu dengan perhitungan nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$ diperlukan untuk menghambat pembentukan radikal DPPH sebesar 50%) dan persen inhibisi (42).

Perhitungan persen inhibisi dapat dilakukan dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Ablank} - \text{Asampel}}{\text{Ablank}} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan berdasarkan kekuatannya dibedakan menjadi 3 yaitu sangat kuat bila $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$, kuat bila nilai $IC_{50} = 50-100 \mu\text{g/ml}$, sedang pada $IC_{50} = 101-250 \mu\text{g/ml}$, dan lemah bila $IC_{50} = 250-500 \mu\text{g/ml}$, dan tergolong tidak aktif bila $IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$ (42).



Gambar 2.11. Struktur (a) difenilpikrilhidrazil (radikal bebas), (b) difenilpikrilhidrazin (radikal non-bebas)

2.6 Antioksidan sebagai pencegahan kanker

Salah satu penyebab kanker ialah kerusakan sel yang disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Spesies Nitro Gen* (RNS). ROS dan RNS merupakan hasil samping metabolisme tubuh dalam upaya menghasilkan ATP (*Adenosine Triphosphate*). ROS dan RNS dapat merusak struktur sel, protein, lipid dan asam nukleat yang menyebabkan kerusakan DNA sel dan mutasi gen penekan tumor yang menjadi penyebab karsinogenesis (8).

Tubuh manusia memiliki antioksidan endogen yang berfungsi untuk menetralkan ROS dan RNS, namun karena faktor eksogen (seperti pola hidup) menyebabkan produksi ROS dan RNS lebih tinggi dibandingkan dengan antioksidan endogen dalam tubuh, sehingga diperlukan antioksidan eksogen untuk mengatasi ketidakseimbangan ini (8). Antioksidan akan mencegah kerusakan DNA yang diakibatkan oleh ROS dan mengurangi efek yang diakibatkan oleh radikal bebas lainnya.

III. METODE KERJA

3.1 Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan selama \pm 6 bulan di Laboratorium Penelitian dan Kultur Sel Farmasi Universitas Andalas.

3.2 Metode

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan ialah satu set alat perkolasi, Erlenmeyer(Pirex[®]), *beaker glass* (Pirex[®]), corong pisah (Pirex[®]), *aluminium foil* (Klinpak[®]), gelas ukur (IWAKI), *Rotary evaporator*, pipet tetes, spatel, kapas, pipa kapiler, kertas saring, spektrofotometer UV-Vis (THERMO), *microplate reader*, *wellplate* 96, mikro pipet, sonic (THERMO), plat KLT, oven, hotplate, inkubator, tabung sentrifus, *hemostometer neubaurer*, *Elisa reader*, mikrotube, labu volumetric (Pirex[®]), pipet volume, mikroskop, *cryotube*, *freezer*, *falcon[®] colonial centrifuge tubes*, sentrifus, UV 254 nm, dan UV 366 nm.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan ialah daun asam kandis (*Garcinia cowa* Robx.), n-heksan, etil asetat, etanol, metanol, DPPH, vitamin C, media *Dubelccoâs modified eagle medium* (DMEM), *Foetal Bovine Serum* 10% (FBS), tripsin EDTA, medium komplit DMEM, DMSO (Dimetil sulfoksida), CO₂, Tripsin, PBS, dan sel kanker payudara T47D.

3.3 Prosedur penelitian

3.3.1 Pengambilan sampel

Sampel daun asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb) diambil dari Padang Landua, kecamatan Palembayan, provinsi Sumatra Barat.

3.3.2 Identifikasi tanaman

Identifikasi tanaman dilakukan di Hebarium Universitas Andalas (ANDA).

3.3.3 Penyiapan sampel

Daun asam kandis (*Garcinia cowa* Robx.) dibersihkan kemudian dikeringkan di rumah kaca Universitas Andalas selama 5 hari. Daun yang sudah kering dihaluskna dengan menggunakan grinder, sehingga diperoleh serbuk kering daun *Garcinia cowa* Robx. sebanyak 1,81 kg.

3.3.4 Ekstraksi

Daun asam kandis yang sebelumnya telah menjadi serbuk kering diekstraksi dengan metode perkolasi menggunakan pelarut dengan tiga kepolaran yang berbeda. Ekstraksi dimulai dengan menggunakan pelarut non polar yaitu n-heksan, kemudian pelarut diganti dengan menggunakan pelarut semipolar etil asetat, dan terakhir menggunakan pelarut polar yaitu pelarut etanol.

Masing-masing ekstrak dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

3.3.5 Karekateristik ekstrak

a. Uji Non Spesifik

1) Susut Pengerinan

Panaskan krus pada suhu 105° C selama 30 menit lalu ditara, masukkan ekstrak sebanyak 1-2 gram ke dalam krus lalu ratakan dengan menggoyangkan hingga ketebalan lapisan kurang lebih 5-10 mm. Masukkan krus yang telah berisi ekstrak tersebut ke dalam ruang pengeringan dengan kondisi terbuka pada suhu 105° C. Timbang dan ulangi pemanasan sapaai didapat berat konstan (43).

$$\text{susut pengeringan} = \frac{(w1 - w0) - (W2 - W0)}{w1 - w0} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = berat krus kosong

W2 = berat krus + ekstrak

W₂ = berat krus + hasil pengeringan

2) Kadar Abu Total

Keringkan, pijarkan dan tarakan krus. Masukkan sebanyak 2-3 gram ekstrak. Lalu pijarkan hingga arang habis, dinginkan dan timbang (43).

$$\text{Kadar abu} = \frac{w_2 - w_1}{w_1 - w_0} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = berat krus kosong

W1 = berat krus + ekstrak

W2 = berat krus + hasil pemijaran

b. Uji spesifik

Lakukan uji organoleptis meliputi bentuk, bau, warna, dan rasa dari ekstrak menggunakan panca indera (43).

c. Pemeriksaan kandungan kimia

1) Uji Alkaloid

Timbang 0,5 gram ekstrak kemudian larutkan dengan 1 mL HCL dan saring. Filtrat yang didapat dari penyaringan tersebut diuji menggunakan pereaksi berikut:

- Pereaksi Mayer: tambahkan 2 tetes reagen Mayer (K_2HgI_4) ke dalam filtrat, hasil positif jika terbentuk endapan warna kuning.
- Pereaksi Dragendorf: tambahkan 2 tetes reagen Dragendorf ke dalam filtrat, hasil positif jika terbentuk endapan warna merah.

2) Uji Flavonoid

Masukkan serbuk Mg ke dalam ekstrak lalu tambahkan 5 tetes HCl pekat, hasil positif jika terbentuk endapan warna merah atau jingga.

3) Uji Fenolik

Tambahkan 3-4 tetes $FeCl_3$ ke dalam ekstrak, hasil positif jika terbentuk warna hitam kebiruan.

3.3.6. Uji Sitotoksik

1. Penyiapan alat

Alat yang digunakan dalam pengujian hendaklah dalam keadaan bersih dan steril. Semua alat dibersihkan dan disterilkan terlebih dahulu, sterilisasi tergantung dari jenis alat yang hendak disterilkan. Wadah suspensi yang digunakan ialah wadah steril sekali pakai, selama kemasan tidak rusak maka sterilitasnya terjamin. Alat-alat berbahan gelas disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 15 lbs. Untuk *microbial safety cabinet* *air flow* kelas II disterilkan dengan cara disterilkan dengan menggunakan alkohol 70 % dan disinari dengan UV. Ruangan kerja disterilkan sebelum dan sesudah kerja dengan disinari UV selama 30 menit.

2. Penyiapan sel

Sel yang digunakan yaitu sel kanker payudara T47D yang merupakan koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM). Sel kanker dalam *cryotube* dikeluarkan dari *freezer* (-80°C) kemudian dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 2-3 menit. Setelah itu sel kanker dari *cryotube* dipindahkan dalam *falcon*[®] *colonial centrifuge tubes* yang berisi 9 ml medium complete. Kemudian *falcon*[®] *colonial centrifuge tubes* disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifus dibuang dan pellet sel kanker ditambahkan medium komplet DMEM $\pm 1-2$ ml, kemudian dihomogenkan dan dimasukkan kedalam *flask* dan ditambahkan 3-4 ml medium komplet DMEM, setelah itu *flask* diinkubasi dalam inkubator 5% CO_2 , kemudian dilihat dibawah mikroskop untuk melihat apakah sel melekat dilapisan *flask* membentuk lapisan monolayer. Medium pertumbuhan diganti sekali sehari dan apabila jumlah sel *flask* telah mencapai 70-85%, lakukan sub-kultur sel sampai jumlah sel mencukupi.

3. Perhitungan jumlah sel

Medium *flask* yang berisikan sel dibuang dan ditambahkan 1 ml PBS, kemudain PBS dibuang dan ditambahkan 1 ml tripsin EDTA 0,25%, kemudian

diinkubasi 2-5 menit dalam inkubator 5% CO₂, lihat dibawah mikroskop untuk mengetahui sel telah terpisah dari dasar *flask*. Selanjutnya medium dipipet dan dimasukkan kedalam *falcon*[®] *colonial centrifuge tubes* dan disentrifus selama 10 menit 2000 rpm kemudian supernatant dibuang, pellet ditambahkan 3 ml medium komplit DMEM. Pipet 10 μ l suspensi sel diletakkan pada masing-masing kotak perhitungan sel hematositometer. Perhitungan sel kanker dilakukan dibawah *microscope interved*.

Jumlah sel dihitung pada hematositometer, cara perhitungan sel sendiri yaitu sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar tidak dihitung serta sel yang dempet hanya dihitung sebagai satu sel.

$$\Sigma \text{ jumlah } \frac{\text{sel}}{\text{ml}} = \frac{\Sigma \text{ jumlah sel kotak 1} + \dots + \text{jumlah sel kotak ke 8}}{4} \times 10^4$$

Hitung jumlah suspensi sel yang dibutuhkan untuk mendapat antara 1.000-10.000 sel/sumur, dengan menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah suspensi} = \frac{\text{jumlah sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/ml}}$$

4. Peletakan sel (uji viabilitas sel)

Masukkan sebanyak 180 μ L suspensi sel yang telah dibuat dan sebelumnya telah dihitung jumlah selnya sebelumnya kedalam masing-masing sumur plat 96, kecuali untuk sumur blanko yang hanya akan berisi medium. Kemudian plat diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C 5% CO₂.

5. Pembuatan larutan uji

- a. Pembuatan medium komplit DMEM

Medium DMEM + 1% *pentsrep* + 10 % *fetal bovine serum* (FBS) kemudian difilter dengan saringan 0.2 μ M.

- b. Pembuatan larutan uji

Timbang ekstrak etanol, etil asetat dan n-heksan daun *Garcinia cowa* Roxb. Kemudian larutkan dalam DMSO hingga mencapai konsentrasi 100.000 μ g/ml.

c. Pembuatan larutan uji

Dipipet 10 μL dari larutan stok kemudian dipindahkan ke tabung *ependorf* lalu tambahkan 990 μL medium DMEM untuk mendapatkan larutan uji konsentrasi 1000 $\mu\text{L}/\text{ml}$. kemudian lakukan hal yang sama untuk tabung selanjutnya sehingga didapatkan larutan uji 10 dan 1 $\mu\text{L}/\text{ml}$.

6. Uji poliferasi (Uji MTT)

1. Penambahan Larutan Uji (Hari ke-0)

Plat uji yang berisi sel yang telah diinkubasi selama 24 jam, dibagi menjadi 4 bagian yang masing-masing terdiri dari 24 sumur, setiap pengujian dilakukan untuk 4 kali pengulangan. Peletakan larutan uji dimulai dari konsentrasi paling rendah. Sebanyak 20 μL larutan uji dipipet dimasukkan kedalam sumur uji. Kedalam sumur kontrol dimasukkan 200 μL media. Plat kembali di inkubasi selama 96 jam di inkubator 37⁰C 5% CO₂. Kemudian diamati perubahan yang terjadi selama inkubasi.

2. Penambahan Larutan MTT (hari ke-4)

Sebanyak 20 μL larutan 5 mg/ml MTT dipipet ke dalam masing-masing sumur. Kemudian inkubasi pada suhu 37⁰C 5% CO₂ selama 3-4 jam. Setelah inkubasi akan terlihat endapan ungu kristal formazan. Kristal formazan dipisahkan dari medium dengan cara memipet medium. Endapan kristal formazan kemudian dilarutkan dengan 100 μL DMSO dan diukur serapan dengan menggunakan spektrofotometer *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm.

3. Analisa data

Analisa data menggunakan data absorban yang diperoleh dari pengukuran sehingga diperoleh nilai persentase penghambatan sel dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{viabilitas sel} = \frac{\text{rata - rata absorban sel uji}}{\text{rata - rata absorban kontrol}} \times 100\%$$

3.3.7 Uji Antioksidan

1. Pembuatan larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan melarutkan 10 mg serbuk DPPH kedalam 100 ml metanol sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/ml. Selama pembuatan larutan DPPH, larutan dihindari dari cahaya.

2. Pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH yang telah dibuat sebelumnya dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3. Pembuatan larutan sampel

Masing-masing ekstrak ditimbang 10 mg dan dilarutkan dalam 10 ml metanol, sehingga didapatkan larutan sampel 1.000 µg/ml, kemudian diencerkan menjadi 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml dan 3,125 µg/ml. Vit C ditimbang 10 mg dan dilarutkan dalam 10 ml metanol hingga didapatkan larutan vitamin C dengan konsentrasi 1.000 µg/ml kemudian dilakukan pengeceran menjadi 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml dan 1,25 µg/ml.

4. Pengukuran daya antioksidan

Uji aktivitas antioskidan dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* dengan metode DPPH assay pada panjang gelombang 516 nm. Pengujian dilakukan dengan menggunakan *microtiter plate 96-well* yang terdiri dari 8 baris A-H yang masing-masing terdiri dari 12 sumur.

Baris A-B kolom 1-3 dimasukkan ekstrak n-heksan dengan konsentrasi 200 µg/ml, Baris A-B kolom 4-6 dimasukkan ekstrak etil asetat dengan konsentrasi 200 µg/ml, baris A-B kolom 7-9 dimasukkan ekstrak etanol dengan konsentrasi 200 µg/ml, dan baris A-B kolom 10-12 dimasukkan vit C dengan konsentrasi 20 µg/ml, masing-masing-masing ekstrak dan vit C dimasukkan 100 µl. Baris B-H dimasukkan metanol 100 µl. Baris B dihomogenkan dan dipipet 100 µl kemudian dimasukkan ke baris C, baris C dipipet 100 µl dimasukkan ke baris dan seterusnya hingga baris F. Baris F dipipet 100 µl dan dibuang kemudian baris A-H ditambahkan 100 µl larutan DPPH kemudian diinkubasi selama 30 menit

didalam tempat gelap. Aktivitas antioksidan (penangkalan radikal bebas) diukur sebagai penurunan absorban DPPH dengan *microplate reader* dan pengolah data.

5. Analisis data uji aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\text{inhibition (\%)} = \frac{\text{Ablank} - \text{Asampel}}{\text{Ablank}} \times 100\%$$

Kemudian dilakukan perhitungan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi larutan uji yang dapat menangkal 50 persen radikal bebas dengan menggunakan persamaan regresi yang didapat dari % inhibisi.

3.3.8 Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan dengan SPSS 23.0 dan GraphPad Prism 9 untuk paket perangkat lunak Windows. Hasilnya dinyatakan sebagai $\text{mean} \pm \text{SD}$. Uji one-way ANOVA dan Duncan's multiple-distance test digunakan untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing variasi konsentrasi terhadap persentase viabilitas sel dan persentase inhibisi.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

Penelitian ini menggunakan daun tumbuhan asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb) yang dikumpulkan dari daerah Padang Landua Kecamatan Palembayan Sumatera Barat. Untuk memastikan tumbuhan yang diambil ialah *Garcinia cowa* Roxb dilakukan identifikasi tumbuhan di Herbarium ANDA jurusan biologi Universitas Andalas. Dari hasil identifikasi yang telah dilakukan diketahui bahwa tumbuhan yang telah dikumpulkan ialah *Garcinia cowa* Roxb.

Daun yang telah dikumpulkan disortasi basah untuk memisahkannya dari kotoran dan bagian-bagian yang tidak diperlukan. Setelah itu dilakukan pencucian dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran pada permukaan daun. Daun yang telah bersih dikering anginkan selama 5 hari hingga memiliki tekstur rapuh. Kemudian daun kering disortasi kering dan dihaluskan dengan menggunakan grinder sehingga diperoleh serbuk kering daun sebanyak 1,81 kg. Penghalusan sampel bertujuan untuk memperluas permukaan sampel sehingga proses ekstraksi menjadi lebih efektif dan efisien.

4.1.1 Ekstraksi

Daun *Garcinia cowa* Roxb diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi bertingkat dengan tiga pelarut berbeda kepolaran yaitu n-heksan (non polar), etil asetat (semi polar) dan etanol (polar). Metode yang digunakan ialah perkolasi dengan bantuan alat perkolator, pemilihan metode ini karena mudah, sederhana, tidak menggunakan panas sehingga tidak merusak zat yang termolabil, dan membutuhkan waktu yang lebih sedikit dibandingkan dengan dengan maserasi. Ekstraksi dilakukan dengan mengalirkan pelarut pada sampel secara terus menerus. Pertama ekstraksi dilakukan dengan pelarut n-heksan, kemudian etil asetat dan etanol. Penggunaan tiga pelarut yang berbeda bertujuan untuk memperoleh ekstrak dari tiga kepolaran yang berbeda.

Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan didapatkan ekstrak kental. Kemudian dilakukan perhitungan

rendemen masing-masing ekstrak, nilai rendemen masing-masing ekstrak dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 4.1. Hasil rendemen ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

Ekstrak	Berat (gram)	Rendemen (%)
Ekstrak n-heksan	245,13	13,54
Ekstrak etil asetat	136,42	7,537
Ekstrak etanol	210,13	11,61
Total	591,68	32,687

4.1.2 Karakterisasi ekstrak

Karakterisasi ekstrak dilakukan sebagai tahapan standarisasi ekstrak yang meliputi karakterisasi spesifik dan non spesifik. Karakterisasi spesifik dilakukan ialah uji organoleptik yang diamati melalaui penglihatan, penciuman dan pengecapan. Hasil pengujian organoleptik dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 4.2. Hasil uji organoleptis ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

Pemeriksaan	Pengamatan		
	Ekstrak N-heksan	Ekstrak Etil asetat	Ekstrak Etanol
Bau	Khas	Khas	Khas
Bentuk	Kental	Kental	Padat
Warna	Hitam kehijauan	Hitam kehijauan	Merah kehitaman
Rasa	Pahit	Pahit	Pahit

Karakteristik non spesifik dilakukan ialah susut pengeringan dan kadar abu. Hasil susut pengeringan dan kadar abu dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 4.3. Hasil susut pengeringan ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

Ekstrak	A (gram)	B (gram)	C (gram)	% SP	Rata-rata SP (%)
Ekstrak n-heksan	30,4	32,84	32,79	2,049	3,907
	31,5	33,49	33,41	4,020	
	31,8	34,1	33,97	5,652	

4.1.3 Pemeriksaan kandungan

Pemeriksaan kandungan pada ekstrak ialah untuk mengetahui golongan metabolit sekunder pada ekstrak. Hasil pemeriksaan kandungan kimia ekstrak dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4.4. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

Konstituen Fitokimia	Ekstrak n-heksan	Ekstrak etil aasetat	Ekstrak etanol
Fenolik	+	+	+
Saponin	-	-	-
Steroid	+	+	+
Terpenoid	-	-	-
Flavonoid	-	-	-
Alkaloid	-	-	-

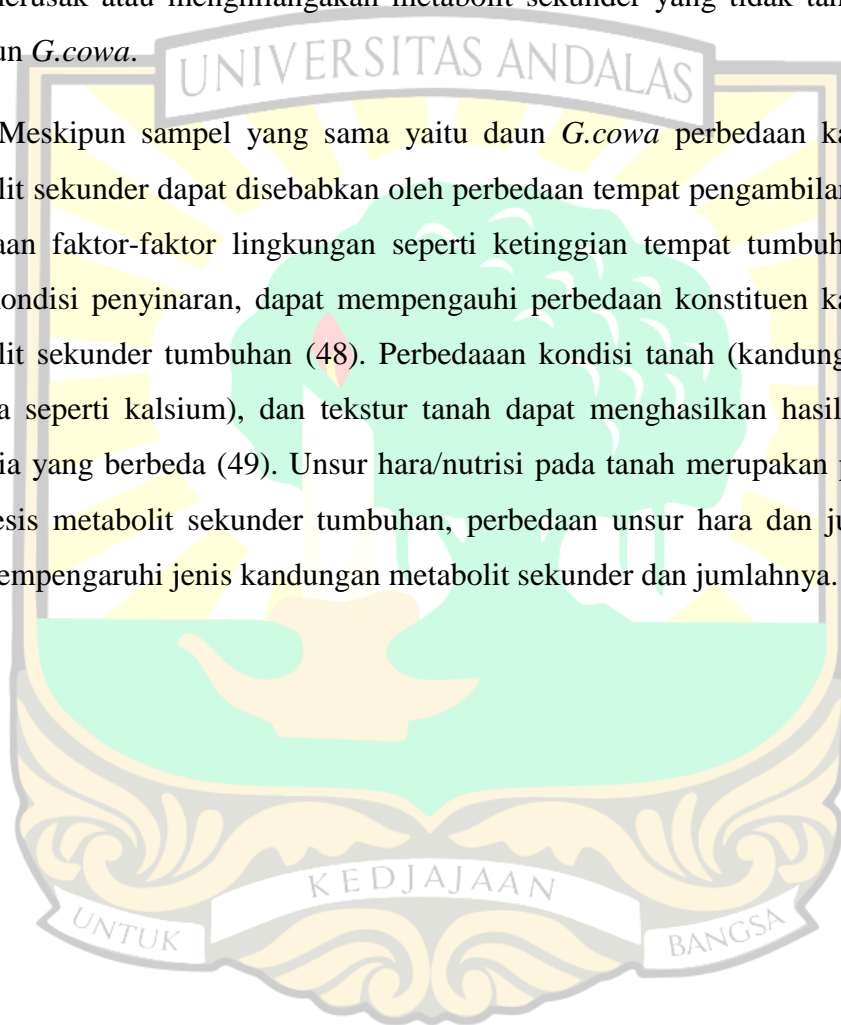
Dari hasil skrining fitokimia ekstrak n-heksan daun *Garcinia cowa* Roxb memiliki kandungan metabolit sekunder fenolik dan steroid. Hasil skrining fitokimia ini berbeda dengan hasil skrining fitokimia fraksi n-heksan daun *G.cowa* yang diteliti oleh Nasution pada 2017 yang menunjukkan mengandung fenolik dan terpenoid (44).

Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol pada penelitian mengandung metabolit sekunder fenolik dan steroid, jika dibandingkan dengan ekstrak etanol daun *G.cowa* yang diambil dari Batu Busuk Limau Manih diekstraksi dengan metode meserasi yang dilakukan oleh Triastusi pada 2012 dari hasil skrining uji fitokimia diketahui mengandung golongan metabolit sekunder flavonoid, terpenoid, steroid dan fenolik (45). Sedangkan hasil skrining fitokimia ekstrak diklorometan daun *G.cowa* oleh Ningsih pada 2016 yang diperoleh dari ekstraksi dengan menggunakan metode sokletasi dari daerah Batu Busuk mengandung metabolit sekunder golongan fenolik dan terpenoid (46).

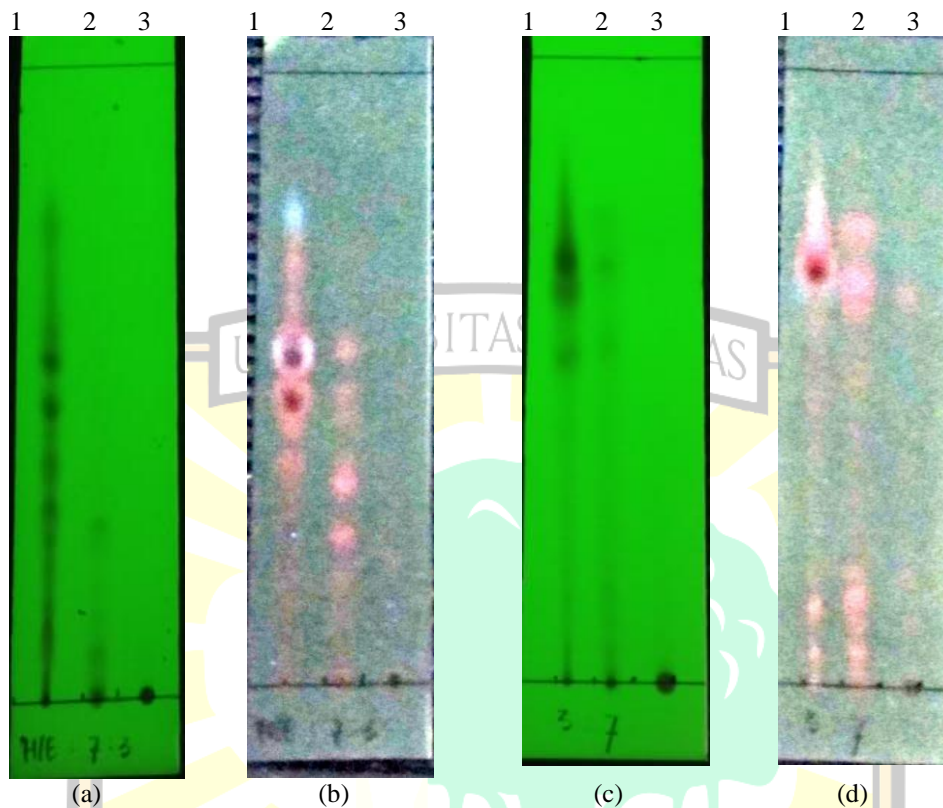
Kandungan metabolit sekunder ekstrak tumbuhan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu teknik ekstraksi yang digunakan, pelarut yang digunakan, kondisi tanah dan lingkungan tempat tumbuhan tumbuh.

Ekstraksi dengan menggunakan panas dapat merusak atau menghilangkan kandungan metabolit sekunder yang tidak tahan panas. Teknik ekstraksi pada penelitian ini yaitu perkolasi yang merupakan ekstraksi tanpa pemanasan sehingga tidak merusak atau menghilangkan metabolit sekunder yang tidak tahan panas dari daun *G.cowa*.

Meskipun sampel yang sama yaitu daun *G.cowa* perbedaan kandungan metabolit sekunder dapat disebabkan oleh perbedaan tempat pengambilan sampel. Perbedaan faktor-faktor lingkungan seperti ketinggian tempat tumbuh (47,48), suhu, kondisi penyinaran, dapat mempengaruhi perbedaan konstituen kandungan metabolit sekunder tumbuhan (48). Perbedaan kondisi tanah (kandungan unsur zat hara seperti kalsium), dan tekstur tanah dapat menghasilkan hasil skrining fitokimia yang berbeda (49). Unsur hara/nutrisi pada tanah merupakan prekursor biosintesis metabolit sekunder tumbuhan, perbedaan unsur hara dan jumlahnya akan mempengaruhi jenis kandungan metabolit sekunder dan jumlahnya.



4.1.4 Profil KLT



Gambar 4.1. Profil KLT ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

Keterangan :

- | | |
|-------------------------|---|
| (1) Ekstrak n-heksan | (a) Eluen heksan : etil (7:3) dibawah sinar UV 254 nm |
| (2) Ekstrak etil asetat | (b) Eluen heksan : etil (7:3) dibawah sinar UV 366 nm |
| (3) Ekstrak etanol | (c) Eluen heksan : etil (3:7) dibawah sinar UV 254 nm |
| | (d) Eluen heksan : etil (3:7) dibawah sinar UV 366 nm |

Dari hasil pengujian KLT dibawah sinar UV 254 nm ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol daun *G.cowa* memiliki profil KLT yang berbeda. Ekstrak n-heksan memiliki penampakan noda yang lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol. KLT dengan menggunakan eluen heksan : etil (7:3) memiliki hasil profil KLT yang lebih baik. Hal ini disebabkan oleh KLT yang dipengaruhi oleh eluen yang digunakan, senyawa- senyawa pada ekstrak akan terpisah berdasarkan kepolaran, pada KLT penelitian ini menggunakan KLT fase normal dimana semakin polarnya eluen yang digunakan maka senyawa polar akan mudah tertarik oleh eluen dan memiliki jarak tempuh yang lebih jauh. Pada KLT eluen heksan : etil (7:3) ekstrak n-heksan menunjukkan profil KLT yang dengan senyawa yang lebih banyak di bandingkan dengan ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol. Profil KLT ekstrak etanol dengan

eluen heksan : etil (7:3) tidak terjadi pemisahan yang baik karena kurangnya polaritas eluen yang digunakan.

Jika dibandingkan dengan profil KLT menggunakan lampu UV 366 nm memiliki profil KLT yang lebih baik, dimana lebih tampak jelas pemisahan dibandingkan dengan lampu UV 254 nm. Dan senyawa- senyawa yang tidak nampak pada lampu UV 254 tampak pada lampu UV 366 nm. Senyawa yang tampak pada lampu UV 254 nm adalah senyawa- senyawa golongan aromatik, α dan β karbonil tak jenuh dan terkonjugasi. Perbedaan panjang gelombang pada analit menjadi penyebab perbedaan profil KLT pada lampu UV 254 nm dan 366 nm.

4.2 Antikanker payudara

Aktivitas sitotoksik kanker payudara dari ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb dilakukan dengan menggunakan *cell line* T47D. Sel T47D merupakan *cell line* kanker payudara yang diisolasi dari duktal tumor payudara wanita berumur 54 tahun (50). Kultur sel ini telah banyak digunakan pada penelitian *in vitro* dimana memiliki sifat homogenitas tinggi, kemampuan replikasi yang tidak terbatas dan penanganan yang mudah (50).

Medium yang digunakan dalam kultur sel ialah medium komplet DMEM. Medium kultur memiliki peranan yang sangat penting dimana medium menyediakan nutrisi, faktor pertumbuhan dan hormon untuk sel serta mengatur pH dan tekanan osmotik kultur (51). Medium komplet DMEM yang digunakan terdiri dari 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*), 1% penisilin streptomisin, dan 89% DMEM. FBS pada medium berfungsi sebagai serum yang menyediakan sumber pertumbuhan, hormon, lipid, dan mineral untuk sel, selain itu serum juga berperan mengatur permeabilitas membran sel, dan pembawa lipid, enzim, dan mikronutrien ke sel (51). Penisilin streptomisin dalam medium berfungsi sebagai antimikroba, melindungi sel dari kontaminasi dan menjaga integritas sel (51). Suhu yang digunakan untuk inkubasi sel ialah 37⁰C dalam inkubator CO₂ 5%. Suhu yang digunakan untuk inkubasi bergantung pada suhu sel inang tersebut diisolasi, sel T47D diisolasi dari payudara wanita memiliki suhu optimal 36-37⁰C yang merupakan suhu optimal untuk sel yang bersumber dari manusia atau mamalia (51). Sel kanker memiliki pH pertumbuhan 7,4. Karbon dioksida (CO₂) dapat mempertahankan kondisi pH medium sel, karena pH medium tergantung

pada keseimbangan CO_2 (karbon dioksida) dan HCO_3^- (bikarbonat) selama proses inkubasi, dan kadar CO_2 dapat digunakan untuk inkubasi sel ialah 4-5% (51). Sebelum digunakan dalam pengujian sel terlebih dahulu dicuci dengan menggunakan PBS (*Phosphate Buffered Saline*). PBS memiliki sifat yang tidak toksik dan mencegah sel tidak pecah/mengkerut karena osmosis sehingga cocok digunakan sebagai pencuci sel (52).

Untuk memindahkan sel dari *flask* ke *well plate* 96 digunakan tripsin EDTA. Tripsin EDTA digunakan untuk melepaskan sel dari wadah flask dengan mekanisme enzimatik (51,53). Tripsin merupakan enzim proteolitik yang dapat memotong peptida pada sisi C-terminal dari lysine atau arginine. Penggunaan EDTA dapat meningkatkan kerja tripsin dengan menghilangkan magnesium dan kalsium dari permukaan sel sehingga memungkinkan tripsin untuk menghidrolisis ikatan peptida tertentu, selain itu penggunaan bersama EDTA dengan tripsin juga menghilangkan adhesi sel antar sel (54).

Pengujian sitotoksik menggunakan MTT assay dengan menggunakan garam 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Dipenyltetrazolium Bromide yang berwarna kuning. Metode ini telah banyak digunakan untuk pengujian viabilitas sel dalam proliferasi sel dan uji sitotoksik (55). Metode ini sederhana, mudah dilakukan dan memberikan hasil secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian dilakukan menggunakan garam tetrazolium berwarna kuning dengan konsentrasi 5 mg/ml dalam PBS. Penggunaan PBS untuk melarutkan MTT karena PBS yang memiliki kemampuan mempertahankan pH dan tidak mengakibatkan kematian sel (52).

Sebelum ekstrak diujikan terhadap sel, masing-masing ekstrak dilarutkan dalam DMSO. DMSO merupakan pelarut polar protik yang mampu melarutkan senyawa polar dan non polar sehingga dapat digunakan untuk melarutkan sampel yang terdiri dari ekstrak n-heksan, etil asetat, dan etanol daun *G.cowa*. Meskipun memiliki kemampuan melarutkan yang baik dalam pengujian dengan menggunakan sel konsentrasi DMSO tidak boleh melebihi 10 % karena dapat menyebabkan kematian sel (56). Dalam melarutkan sampel masing-masing sampel ditimbang 200 mg dan dilarutkan dengan 2 ml DMSO dalam *cryotube*

sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 100.000 µg/ml, larutan induk kemudian dilakukan pengenceran menjadi 100 µg/ml menggunakan medium komplet DMEM pengenceran seterusnya dilakukan menjadi 10, 1, dan 0,1 µg/ml. Karena telah dilakukan pengenceran dari larutan induk sehingga larutan sampel mengandung konsentrasi DMSO sama atau kecil dari 1%.

Kematian sel kanker dapat dilihat dibawah mikroskop setelah 48 jam pemberian sampel, sel yang mati akan berubah warna menjadi hitam dan tampak menggerut. Bentuk dan jumlah sel secara visual dapat dibandingkan dengan sel pada blanko. Dibawah mikroskop sel kanker yang hidup tampak berkurang dengan meningkat nya konsentrasi yang digunakan (lampiran 3). Namun metode ini tidak akurat, tidak dapat untuk memperkirakan kekuatan sitotoksik sampel dan hasil tidak kuantitatif, jadi tetap diperlukan pengujian dengan menggunakan MTT.

Pengujian dengan menggunakan MTT secara kualitatif dapat dilihat hasil dari perubahan warna yang terjadi (lampiran 3). Pada pengujian sitotoksik kanker payudara ekstrak n-heksan dan etil asetat daun *G.cowa*, pada konsentrasi 100 µg/ml secara organoleptis tidak terjadi perubahan MTT (bewarna kuning), namun pada konsentrasi 10, 1 dan 0,1 µg/ml terjadi perubahan warna yang awalnya bewarna kuning menjadi ungu dan warna ungu yang dihasilkan semakin pekat dengan semakin kecilnya konsentrasi ekstrak. Pengujian MTT ekstrak etanol telah menunjukkan perubahan warna menjadi ungu pada konsentasi 100 µg/ml dan warna ungu yang dihasilkan semakin pekat semakin kecilnya konsentrasi ekstrak.

Terjadinya perubahan warna pada pengujian menandakan bahwa sel masih hidup, semakin pekat warna yang dihasilkan maka semakin banyak sel yang masih hidup. Namun apabila tidak terjadi perubahan warna maka manandakan tidak terdapatnya sel hidup. Perubahan warna yang awalnya kuning warna MTT menjadi ungu menandakan terbentuknya kristal formazan sebagai produk hasil dari proses reduksi MTT oleh enzim oksidoreduktase ymag dihasilkan oleh mitokondria sel kanker (37,55,57). Namun bila tidak terjadi perubahan warna disebabkan sel mati sehingga tidak mampu secara metabolik menghasilkan enzim oksidoreduktase yang mereduksi MTT menjadi kristal formazan.

Semakin pekat warna ungu pada pengujian sitotoksik dengan metode MTT maka semakin banyak jumlah formazan yang dihasilkan yang berbanding lurus dengan absorban dan IC₅₀. Pada pengujian ini hasil yang diharapkan ialah nilai persentase viabilitas sel dan IC₅₀ yang kecil. Semakin kecilnya nilai persen viabilitas sel maka semakin sedikit sel yang hidup dan semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas sitotoksik ekstrak.

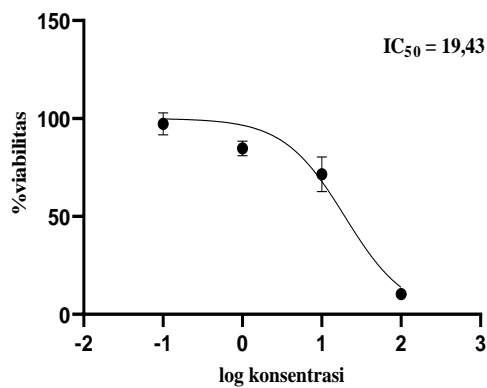
Hasil kuantitatif dari pengujian MTT berupa persentase viabilitas sel dan IC₅₀. Untuk mengetahui nilai persentase viabilitas dilakukan pengukuran absorban kristal formazan dengan menggunakan panjang gelombang maksimum 550 nm (58). Nilai persentase viabilitas dari ketiga ekstrak dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 4.5. Persentase viabilitas sel kanker payudara T47D ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

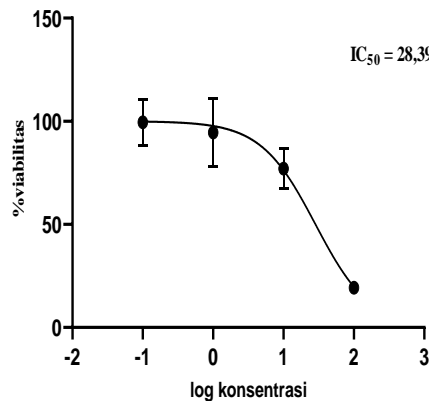
Konsentrasi (µg/ml)	% Viabilitas sel		
	Ekstrak n-heksan	Ekstrak etil asetat	Ekstrak etanol
100	10,287	17,9079	76,691
10	71,515	77,009	97,589
1	84,736	94,521	106,215
0,1	97,267	99,469	107,469
N=3			

Nilai persentase viabilitas sel dari ketiga ekstrak pada konsentrasi sama viabilitas paling kecil yaitu ekstrak n-heksan kemudian ekstrak etil dan etanol. Persentase viabilitas sel masing-masing ekstrak akan berbanding lurus dengan absorban dan akan naik seiring turunnya konsentrasi ekstrak.

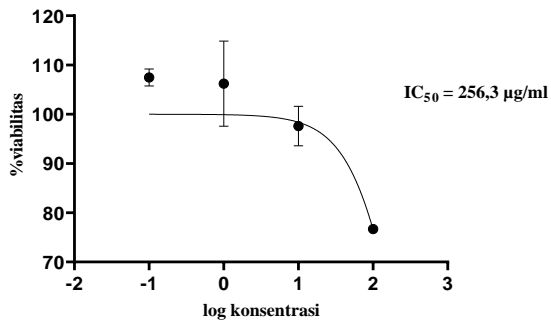
Analisa IC₅₀ Ekstrak N-heksan daun *Garcinia cowa* Roxb



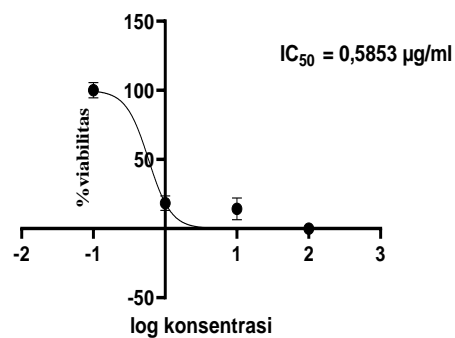
Analisa IC₅₀ Ekstrak etil asetat daun *Garcinia cowa* Roxb



Analisa IC₅₀ ekstrak etanol daun *Garcinia cowa* Roxb



Analisa IC₅₀ Doxorubicin

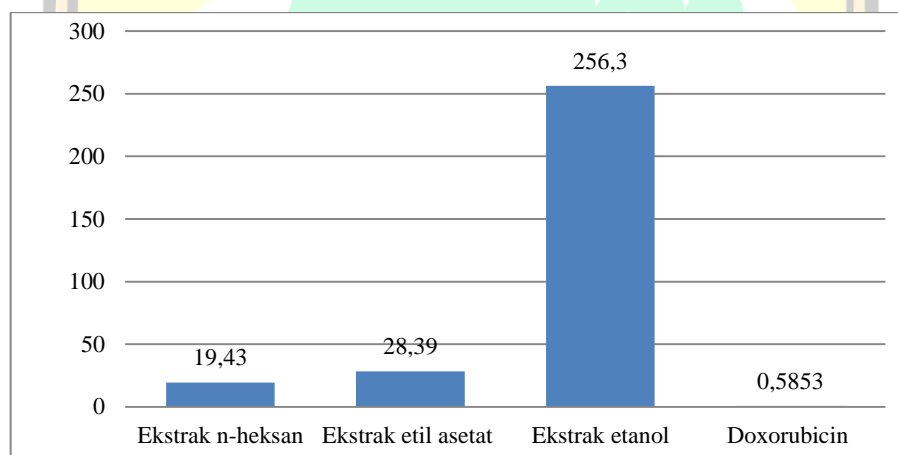


Gambar 12. Analisis IC₅₀ aktivitas sitotoksik kanker payudara sel T47D dari ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb dan doxorubicin

Tabel 4.6. Perbandingan IC₅₀ ±SD ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb dan doxorubicin

Sampel	IC ₅₀ ±SD (µg/ml)
Ekstrak n-heksan	19,43 ± 4,803
Ekstrak etil asetat	28,39 ± 9,887
Ekstrak etanol	256,3 ± 4,729
Doxorubicin	0,585 ± 0,712

Nilai IC_{50} dari ketiga ekstrak dari terkecil ke terbesar yaitu ekstrak n-heksan 19,43 $\mu\text{g/ml}$ kemudian ekstrak etil asetat 28,39 $\mu\text{g/ml}$ dan ekstrak etanol 256,3 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghambat 50% proliferasi sel. Berdasarkan nilai IC_{50} ekstrak dapat dikategorikan menjadi empat yaitu kuat untuk senyawa yang memiliki $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$, moderat untuk senyawa yang memiliki $IC_{50} = 21-200 \mu\text{g/ml}$, lemah untuk senyawa yang memiliki $IC_{50} = 201-500 \mu\text{g/ml}$ dan tidak sitotoksik untuk senyawa yang memiliki $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g/ml}$ (59). Dari kategori ini, ekstrak n-heksan termasuk kedalam sitotoksik kuat, ekstrak etil asetat moderat dan ekstrak n-heksan lemah. Sebagai kontrol positif dalam pengujian ini digunakan doxorubicin yang telah terbukti khasiatnya sebagai antikanker payudara (60). Doxorubicin memiliki IC_{50} yang lebih kecil dibandingkan ekstrak daun *G.cowa* yaitu 0,585 $\mu\text{g/ml}$.



Gambar 13. Diagram batang aktivitas sitotoksik kanker payudara T47D oleh ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb dan doxorubicin

Ketiga ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb memiliki nilai IC_{50} yang lebih besar dibandingkan doxorubicin yang berarti ekstrak daun *G. cowa* Roxb tidak lebih sitotoksik dibanding doxorubicin. Meskipun memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih rendah dibandingkan doxorubicin, ekstrak daun *G. cowa* memiliki potensi untuk diteliti lebih lanjut aktivitas sitotoksiknya terutama ekstrak n-heksan yang tergolong sitotoksik kuat. Ekstrak memiliki berbagai kandungan metabolit sekunder dengan persentase yang berbeda, kandungan dalam ekstrak ada yang aktif sebagai sitotoksik payudara ada yang tidak aktif, hal inilah yang membuat ekstrak relatif memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih rendah dibandingkan

doxorubicin yang merupakan senyawa tunggal yang telah terbukti memiliki aktivitas sitotoksik kuat.

Ekstrak etanol dari daun *Garcinia cowa* Roxb telah dilakukan pengujian sitotoksik antikanker payudara T47D oleh Wahyuni pada tahun 2015(9). Ekstrak etanol memiliki aktivitas sitotoksik kuat dengan IC_{50} 6,13 μ g/ml, sedangkan pada ekstrak etanol pada penelitian ini memiliki aktivitas sitotoksik lemah. Perbedaan dari hasil pengujian ini dapat dipengaruhi oleh tempat pengambilan sampel yang berbeda dan teknik ekstraksi yang berbeda, teknik ekstraksi yang dilakukan oleh Wahyuni 2015 menggunakan teknik ekstraksi maserasi (9), sedangkan ekstrak etanol pada penelitian ini menggunakan teknik ekstraksi bertingkat dengan metode perkolasi tiga pelarut yaitu n-heksan, etil asetat dan etanol. Etanol merupakan pelarut terakhir yang digunakan dalam ekstraksi sehingga senyawa-senyawa metabolit yang cenderung non polar dan semipolar telah terekstraksi oleh pelarut n-heksan dan etil asetat. Sedangkan ekstrak etanol pada penelitian Wahyuni 2015 yang diekstraksi dengan menggunakan etanol tanpa dilakukan ekstraksi dengan pelarut lain sebelumnya(9), sehingga lebih banyak senyawa yang terekstraksi pada penelitian Wahyuni dibandingkan ekstrak etanol pada penelitian ini.

Daun *Garcinia cowa* Roxb pada penelitian Wahyuni dikumpulkan dari daerah Batu Busuk, Limau Manih, Padang, sedangkan daun *G.cowa* pada penelitian ini dikumpulkan dari daerah Padang Landua, kecamatan Palembayan kabupaten Agam. Tempat pengambilan sampel yang mempengaruhi kandungan metabolit sekunder dan jumlah yang terkandung (47,48), perbedaan ini dapat memperengaruhi kekuatan aktivitas sitotoksik pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya.

Pengolahan data menggunakan One Way ANOVA dilanjutkan dengan Duncan Advanced Test. Hasil uji One Way ANOVA ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun asam kandis memberikan hambatan yang berbeda nyata terhadap pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Hasil yang diperoleh pada uji One Way ANOVA berbeda nyata, kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf signifikansi 5%. Duncan kemudian

dilakukan pengujian data diperoleh bahwa ekstrak n-heksan pada konsentrasi 100 µg/ml berbeda nyata dengan konsentrasi 10 µg/ml, konsentrasi 10 µg/ml berbeda nyata dengan konsentrasi 1 µg/ml dan konsentrasi 1 µg/ml berbeda nyata dengan konsentrasi 0,1 µg/ml. Ekstrak etil asetat pada konsentrasi 100 µg/ml berbeda nyata dengan konsentrasi 10 µg/ml, konsentrasi 10 g/ml tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 1 µg/ml dan konsentrasi 1 µg/ml tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0,1 µg/ml. Ekstrak etanol pada konsentrasi 100 µg/ml berbeda nyata dengan konsentrasi 10 µg/ml, konsentrasi 10 µg/ml berbeda nyata dengan konsentrasi 1 µg/ml dan konsentrasi 1 µg/ml tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0,1 µg/ml.

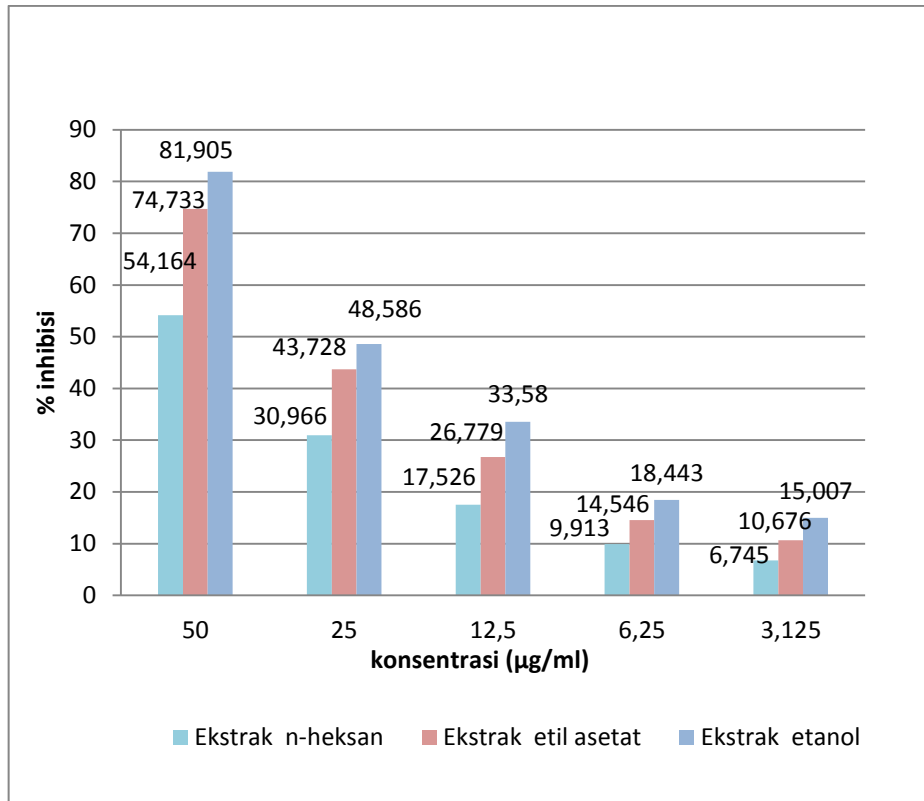
4.3 Aktivitas Antioksidan

Pengujian antioksidan daun *G.cowa* dilakukan menggunakan metode DPPH assay dengan *microplate reader* 96-well. Pemilihan metode DPPH assay karena metode yang mudah, efisien, cepat dan yang hanya membutuhkan sedikit sampel dan pelarut dalam pengujiaanya. Penggunaan *well plate* 96 mengurangi jumlah sampel, DPPH dan pelarut yang dibutuhkan dalam pengujian, mempermudah dan mempercepat karena dalam sekali pengukuran dapat mengukur 96 sumur sekaligus.

DPPH yang digunakan dalam metode ini bertindak sebagai radikal bebas. Sebelum dilakukan pengujian menggunakan DPPH dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum terlebih dahulu, pengukuran panjang gelombang atau lamda max, ini diperlukan untuk mengetahui panjang gelombang disepanjang spektrum penyerapan yang menunjukkan penyerapan foton terkuat. Dari hasil panjang gelombang yang dilakukan didapatkan panjang gelombang maksimum dari DPPH ialah 516 nm dengan absorban 0,628 nm. Pelarut yang digunakan dalam pengujian DPPH ialah metanol. Metanol telah banyak digunakan oleh penelitian antioksidan DPPH oleh penelitian sebelumnya selain itu metanol juga dapat melarutkan DPPH dan ketiga ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb dengan baik. Sebagai pembanding digunakan vitamin C yang merupakan antioksidan kuat (61).

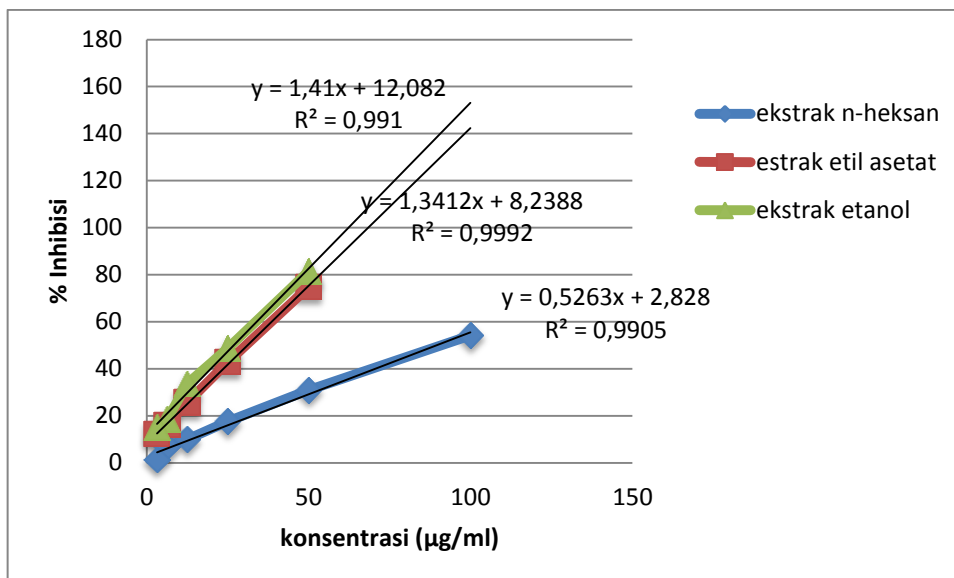
Secara kualitatif pengujian antioksidan dengan metode DPPH assay dapat diamati dari perubahan warna DPPH yang bewarna ungu menjadi warna kuning. Perubahan warna ini terjadi karena perubahan senyawa radikal bebas menjadi senyawa non radikal yang mengakibatkan DPPH yang bewarna ungu tereduksi menyebabkan warna ungu DPPH memudar dan digantikan warna kuning dari *diphenylpicrylhydrazyl* (42). Hasil penelitian dapat diamati pada (lampiran 3). Ekstrak n-heksan daun *G.cowa* pada konsentrasi 100 µg/ml menunjukkan perubahan warna DPPH yang bewarna ungu menjadi kuning, namun pada konsentrasi 50 µg/ml tidak terjadi perubahan warna tapi warna ungu DPPH yang dihasilkan lebih pudar, warna ungu yang dihasilkan akan semakin pekat mendekati warna DPPH blanko semakin kecilnya konsentrasi ekstrak n-heksan yang digunakan. Pada pengujian ekstrak etil asetat dan etanol konsentrasi 100 dan 50 µg/ml terjadi perubahan warna DPPH menjadi kuning, dan pada konsentrasi 25 µg/ml warna ungu DPPH tampak pudar dan warna DPPH semakin pekat dengan semakin kecilnya konsentrasi ekstrak. Meskipun tidak terjadi perubahan warna menjadi warna kuning perubahan warna DPPH yang memudar menandakan ikatan senyawa antioksidan dan radikal bebas meskipun ikatan yang terjadi tidak sebanyak ikatan yang mampu mengakibatkan perubahan warna kuning.

Secara kuantitatif aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dapat dilihat dari nilai absorban, besar atau kecilnya nilai absorban menandakan absorban dari DPPH yang tidak berikatan dengan senyawa. Nilai absorban dari masing-masing ekstrak naik seiring turunnya konsentrasi ekstrak uji. Dari absorban dapat dihitung persentase inhibisi dan IC₅₀.

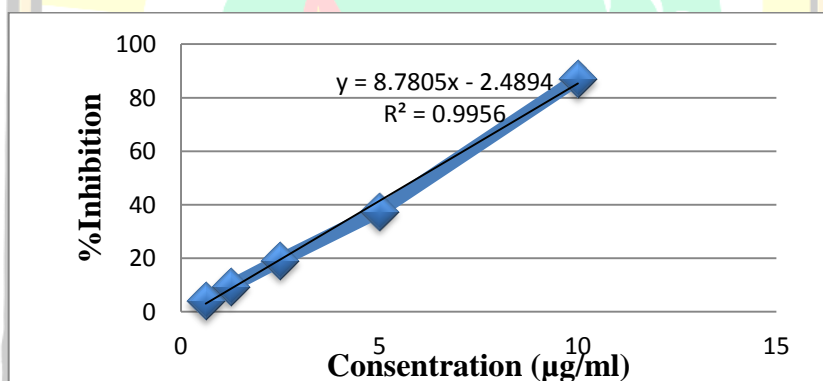


Gambar 14 Diagram batang hambatan radikal DPPH oleh ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

Persentase inhibisi adalah perbandingan antara selisih dari absorban blanko dan absorban sampel dengan absorban blanko. Persentase inhibisi digunakan untuk menentukan persentase hambatan dari sampel terhadap radikal bebas (DPPH). Persentase inhibisi dari ketiga ekstrak dengan konsentrasi yang sama ekstrak etanol memiliki persen inhibisi yang lebih besar dari ekstrak etil asetat dan n-heksan.



Gambar 4.15. Aktivitas penghambatan radikal bebas ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb



Gambar 4.16. Aktivitas penghambatan radikal bebas vitamin C

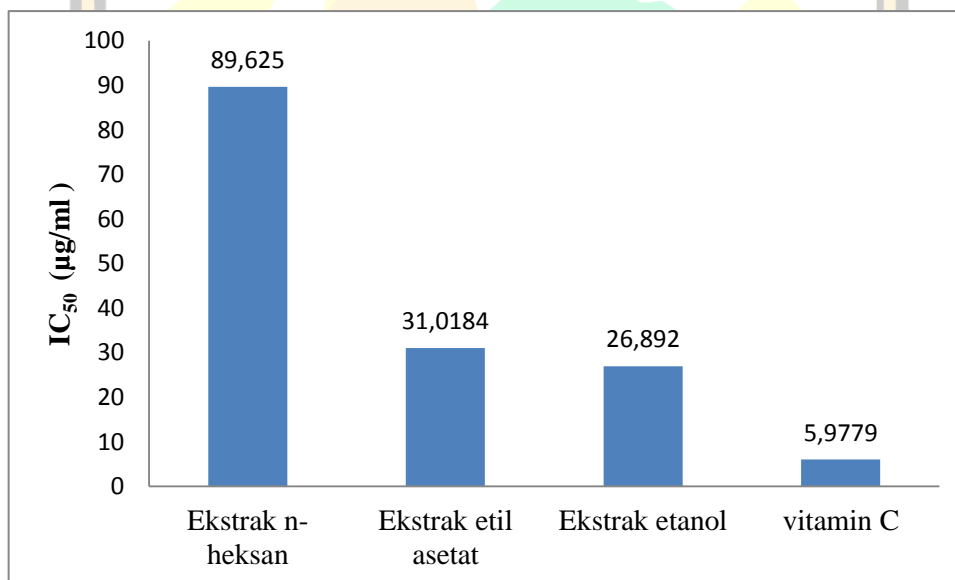
Tabel 4.7. IC₅₀ Aktivitas antioksidan ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb dan vitamin C

Sampel	IC ₅₀ ±SD (µg/ml)
Ekstrak n-heksan	89,625 ± 2,258
Ekstrak etil asetat	31,0184 ± 0,127
Ekstrak etanol	26,892 ± 0,124
Vitamin C	5,978 ± 0,125

Sedangkan IC₅₀ ialah konsentrasi senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk menurunkan radikal bebas sebesar 50%. Nilai IC₅₀ dari ekstrak daun

G.cowa dari ketiga ekstrak menunjukkan nilai yang berbeda, nilai IC_{50} ekstrak n-heksan 89,625 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak etil asetat 31,018 $\mu\text{g/ml}$ dan ekstrak etanol 26,892 $\mu\text{g/ml}$. Semakin rendah nilai IC_{50} semakin kecil konsentrasi yang dibutuhkan untuk penghambatan radikal bebas 50% dan semakin kuat aktivitas antioksidan ekstrak tersebut.

Dari nilai IC_{50} dan persentase inhibisi dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan paling kuat, kemudian disusul oleh ekstrak etil asetat dan terakhir ekstrak n-heksan. Aktivitas antioksidan berdasarkan kekuatannya dibedakan menjadi 3 yaitu sangat kuat bila $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$, kuat bila nilai $IC_{50} = 50-100 \mu\text{g/ml}$, sedang pada $IC_{50} = 101-250 \mu\text{g/ml}$, dan lemah bila $IC_{50} 250-500 \mu\text{g/ml}$, dan tergolong tidak aktif bila $IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$ (42). Berdasarkan kategori ini, ekstrak etanol dan ekstrak etil asetat dapat dikategorikan antioksidan sangat kuat dan ekstrak n-heksan dikategorikan antioksidan kuat. Meskipun tergolong antioksidan sangat kuat dan kuat, ketiga ekstrak ini memiliki aktivitas antioksidan yang lebih lemah dibandingkan dengan vitamin C yang memiliki IC_{50} 5,978 $\mu\text{g/ml}$. Meskipun memiliki nilai IC_{50} lebih kecil dari vitamin C, ketiga ekstrak daun *G.cowa* memiliki potensial sebagai agen antioksidan.



Gambar 4.17. Diagram batang aktivitas antioksidan ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb dan vitamin C

Pengolahan data menggunakan One Way ANOVA dilanjutkan dengan Duncan Advanced Test. Hasil uji One Way ANOVA ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun asam kandis memberikan hambatan yang berbeda nyata terhadap pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Hasil yang diperoleh pada uji One Way ANOVA berbeda nyata, kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf signifikansi 5%. Duncan kemudian dilakukan pengujian data diperoleh bahwa ekstrak n-heksan pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$, dan konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etil asetat konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$, dan konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$ tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol pada konsentrasi konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$, dan konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$ berbeda nyata dengan konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$.

4.4 Hubungan kandungan metabolit sekunder dan aktivitas

Dari hasil skrining uji fitokimia ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol dari daun *Garcinia cowa* Roxb mengandung metabolit sekunder golongan fenolik dan steroid. Kedua golongan senyawa ini yang berperan dalam aktivitas sitotoksik kanker dan antioksidan.

Tiga senyawa golongan fenolik hasil isolasi daun *G.cowa* yang dilakukan oleh wahyuni pada tahun 2015 dan pengujian sitotoksik kanker payudara sel MCF7 dan kanker paru-paru H-460. Tiga senyawa isolasi tersebut ialah (1) metil 2,4,6-trihydroxy-3- (3-methylbut-2-enyl) benzoate, (2) garcinisidone-A dan (3) methyl 4,6dihydroxy-2- (4-methoxy-5-(3-methylbut-2-enyl) -3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienyloxy) -3-(3-methylbut-2-enyl) benzoate. Senyawa 1, 2 dan 3 memiliki nilai IC_{50} sebesar $21,0 \pm 10,2 \mu\text{M}$, $21,2 \pm 8,4 \mu\text{M}$ dan $17,2 \pm 6,2\mu\text{M}$ terhadap MCF-7, sedangkan hanya senyawa (2) ditemukan aktif terhadap H-460 dengan nilai IC_{50} $18,1 \pm 6,7 \mu\text{M}$ (10). Senyawa fenolik memiliki aktivitas antikanker melalui proses

penangkapan siklus sel dan mengaktifkan jalur sinyal apoptosis yang mengakibatkan kematian sel (62).

Senyawa fenolik ialah senyawa yang berperan besar sebagai antioksidan bagi tumbuhan. Dari tinjauan literatur yang dilakukan belum terdapat pengujian antioksidan senyawa fenolik hasil isolasi daun *G.cowa* namun senyawa kelompok fenolik telah banyak menunjukkan aktivitas antioksidan seperti asam galat, katekin dan apikatekin (63). Gugus hidroksi pada senyawa fenolik mudah teroksidasi menyumbangkan atom hidrogen pada radikal bebas membentuk radikal fenoksi yang stabil (63).

Dari penelitian-penelitian sebelumnya terhadap aktivitas senyawa golongan steroid. Dari hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa senyawa golongan steroid memiliki aktivitas antikanker. Dari tinjauan literatur belum ada dilakukan isolasi senyawa golongan senyawa steroid dari daun *G.cowa*. Meskipun begitu telah dilaporkan steroid hasil isolasi dari tumbuhan lainnya memiliki aktivitas sitotoksik seperti senyawa stigmasterol yang diisolasi dari *Premna serratifolias* (64).

4.5 Hubungan aktivitas sitotoksik dan antioksidan terhadap kanker payudara

Salah satu penyebab kanker payudara ialah ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan *Spesies Nitro Gen* (RNS). ROS dan RNS merupakan hasil samping metabolisme yang terbentuk akibat ketidak seimbangan antioksidan dalam tubuh dengan radikal bebas. ROS dan RNS dapat merusak stuktur sel, protein, lipid dan asam nukleat yang menyebabkan kerusakan DNA sel dan mutasi gen penekan tumor yang menjadi penyebab karsinogenesis (8).

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menetralkan radikal bebas sehingga mencegah terbentuknya ROS dan RNS. Senyawa antioksidan eksogen yang berasal dari tumbuhan seperti daun *Garcinia cowa* Roxb dapat menjaga keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh, sehingga dapat menencegah kanker payudara. Karena daun asam kandis memiliki sifat sitotoksik

dan antioksidan sekaligus sehingga dapat dijadikan sebagai pengobatan dan pencegahan kanker payudara.



V . KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D, ekstrak n-heksan memiliki aktivitas kuat dengan IC_{50} $19,43 \pm 4,803 \mu\text{g/ml}$, ekstrak etil asetat memiliki aktivitas moderat dengan IC_{50} $28,39 \pm 9,887 \mu\text{g/ml}$ dan ekstrak etanol memiliki aktivitas lemah dengan IC_{50} $256,3 \pm 4,729 \mu\text{g/ml}$.
2. Ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb memiliki aktivitas antioksidan, ekstrak n-heksan memiliki aktivitas kuat dengan IC_{50} $89,625 \pm 2,256 \mu\text{g/ml}$, ekstrak etil asetat memiliki aktivitas sangat kuat dengan IC_{50} $31,018 \pm 0,127 \mu\text{g/ml}$ dan ekstrak etanol memiliki aktivitas sangat kuat dengan IC_{50} $26,892 \pm 0,124 \mu\text{g/ml}$.

5.2 Saran

Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa bioktif yang terdapat pada ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol daun *Garcinia cowa* Roxb .

DAFTAR PUSTAKA

1. Mamahit DJ. Detection Early Breast Cancer By Using Digital Infrared Image Based on Asymmetry Thermal. Detect Early Breast Cancer By Using Digit Infrared Image Based Asymmetry Therm. 2014;1–8.
2. who. Cancer [Internet]. who. Available from: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
3. Kemenkes. hari kanker sedunia [Internet]. kemenkes. 2019 [cited 2019 Dec 31]. Available from: <https://www.kemkes.go.id/article/view/19020100003/hari-kanker-sedunia-2019.html>
4. Ministry of Health. Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara (Breast Cancer Treatment Guideline). J Kesehat Masy [Internet]. 2019;4(4):1–50. Available from: <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PPKPayudara.pdf>
5. Meiyanto E, Sismindari, Lany Candra, Moordiani. Efek AntiProliferatif Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Tanaman Cangkring (*Erithryma fusca* L) terhadap Sel Hela. Maj Farm Indones. 2003;14(3):124–31.
6. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants – A review. J Pharm Res [Internet]. 2013;7(9):828–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>
7. Parwata MOA. Bahan Ajar Antioksidan. Kim Terap Progr Pascasarj Univ Udayana. 2016;(April):1–54.
8. Arsova-Sarafinovska Z, J. Dimovski A. Natural antioxidants in cancer prevention. Maced Pharm Bull. 2013;59:3–14.
9. Wahyuni FS, Triastuti DH, Arifin H. Cytotoxicity study of ethanol extract of the leaves of asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb.) on T47D breast cancer cell line. Pharmacogn J. 2015;7(6):369–71.
10. Wahyuni FS, Shaari K, Stanslas J, Lajis N, Hamidi D. Cytotoxic compounds from the leaves of *Garcinia cowa* Roxb. J Appl Pharm Sci. 2015;5(2):006–11.
11. Farmasi SS, Ningsih RD. Fraksi Diklorometana Daun Asam Kandis (*Garcinia Cowa* Roxb.). 2016.
12. Tjitrosoepomo G. Taksonomi Tumbuhan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 1993.
13. Ritthiwigrom, Thunwadee; Laphookhieo, Surat; and Pyne SG. Chemical constituents and biological activities of *Garcinia cowa* Roxb. Chem Biodivers. 2013;10(12):2133–60.

14. Phukhatmuen P, Raksat A, Laphookhieo S, Charoensup R, Duangyod T, Maneerat W. Bioassay-guided isolation and identification of antidiabetic compounds from *Garcinia cowa* leaf extract. *Heliyon* [Internet]. 2020;6(4):e03625. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03625>
15. Sriyatep T, Siridechakorn I, Maneerat W, Pansanit A, Ritthiwigrom T, Andersen RJ, et al. Bioactive prenylated xanthenes from the young fruits and flowers of *Garcinia cowa*. *J Nat Prod*. 2015;78(2):265–71.
16. Na Pattalung P, Thongtheeraparp W, Wiriyaichitra P, Taylor WC. Xanthenes of *Garcinia cowa*. *Planta Med*. 1994;60(4):365–369.
17. Raksat A, Phukhatmuen P, Yang J, Maneerat W, Charoensup R, Andersen RJ, et al. Phloroglucinol Benzophenones and Xanthenes from the Leaves of *Garcinia cowa* and Their Nitric Oxide Production and α -Glucosidase Inhibitory Activities. *J Nat Prod*. 2020;83(1):164–8.
18. Likhitwitayawuid K, Phadungcharoen T, Mahidol C, Ruchirawat S. 7-O-methylgarcinone E from *Garcinia cowa*. *Phytochemistry*. 1997;45(6):1299–301.
19. Murakami A, Jiwajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H. Screening for in vitro anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand. *Cancer Lett*. 1995;95(1–2):139–46.
20. Nanasombat S, Teckchuen N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J Med Plants Res*. 2009;3(5):443–9.
21. Mahabusarakam W, Chairerk P, Taylor WC. Xanthenes from *Garcinia cowa* Roxb. latex. *Phytochemistry*. 2005;66(10):1148–53.
22. Poomipamorn S KA. Edible multipurpose tree species. 1997. 486 p.
23. RI DK. Farmakope Indonesia. empat. Jakarta: Depertemen Kesehatan; 1995.
24. Agoes K. Teknologi Bahan Alam. Bandung. Bandung: ITB; 2007.
25. Maria Aloisia Uron Leba. Ekstraksi dan Real Kromatografi. Yogyakarta: deepublish; 2017.
26. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Med (United Kingdom)* [Internet]. 2018;13(1):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
27. Bele AA, Khale. A. AN OVERVIEW ON THIN LAYER CHROMATOGRAPHY Archana A. Bele* and Anubha Khale H. K. College of Pharmacy, Jogeshwari (W), Mumbai, Maharashtra, India. *J Pharm Sci*. 2011;2(2):256–67.

28. Touchstone JC. *Practise of Thin Layer Chromatography*. 2nd ed. New York: Wiley & Sons; 1983.
29. Sherma J, Fried B. *Handbook of Thin-Layer Chromatography (3rd Edition, Revised and Expanded)* (Sherma, J., and Fried, B. (eds.), Marcel Dekker, New York-Basel, 2003, 1016 p., \$250). Vol. 69, *Biochemistry (Moscow)*. 2004. 703 p.
30. Tsuchida S. Test and repair of non-volatile commodity and embedded memories. *IEEE Int Test Conf*. 2002;1223.
31. Norbury C, Nurse P. *Animal cell cycles and their control*. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:441–70.
32. Dolezal T. Adenosine: A selfish-immunity signal? *Oncotarget*. 2015;6(32):32307–8.
33. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* [Internet]. 2018;5(2):77–106. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
34. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387–97.
35. Naik S L D, Hedau S, Bahadur AK, Saha R, Kaur S, Ray A. Sex hormone binding globulin in breast cancer. *Indian J Clin Biochem*. 2008;23(3):250–4.
36. Aka JA, Lin SX. Comparison of functional proteomic analyses of human breast cancer cell lines T47D and MCF7. *PLoS One*. 2012;7(2):1–9.
37. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J Pharmacol*. 2017;12(2):115–8.
38. Zampelas A, Micha R. Antioxidants in health and disease. *Antioxidants Heal Dis*. 2015;1–302.
39. Olszowy M, Dawidowicz AL. Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? *Chem Pap*. 2018;72(2):393–400.
40. Elin Novia Sembiring, Berna Elya, Rani Sauriasari. Total Flavonoid Content Total Phenolic Content. *Pharmacogn J* [Internet]. 2018;10(1):123–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2014.01.002>.
41. Tanha FA. Antioxidant and Anti-microbial Activity Assessment of Methanol Extract of *Garcinia cowa* Leaves. 2013;1–90.
42. Mustarichie R, Runadi D, Ramdhani D. The antioxidant activity and phytochemical screening of ethanol extract, fractions of water, ethyl

- acetate, and n-hexane from mistletoe tea (*Scurrula atropurpurea* BL. dans). *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(2):343–7.
43. Courtney A. Formularies. *Pocket Handb Nonhum Primate Clin Med.* 2012;213–8.
 44. NASUTION FR. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Fraksi Heksana Daun Asam Kandis (*Garcinia cowa* Roxb.). 2016;
 45. Triastuti DH. Uji Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun *Garcinia cowa* Roxb Terhadap Sel Kanker Payudara T47D Dengan Metode MTT (Microtetrazolium) Assay. Universitas Andalas; 2012.
 46. Rifka Desti Ningsih. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Fraksi Diklorometana Daun Asam Kandis (*Garcinia cowa* Roxb). Universitas Andalas; 2016.
 47. Rino H.H. Katuuk, Sesilia A. Wanget PT. Pengaruh Perbedaan Ketinggian Tempat Terhadap Kandungan Metabolit Sekunder Pada Gulma Babadotan (*Ageratum Conyzoides* L.). *Cocos.* 2019;1(4).
 48. Dong J, Ma X, Wei Q, Peng S, Zhang S. Effects of growing location on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of *Eucommia ulmoides*. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2011;34(3):1607–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.007>
 49. Sulasmi ES, Rohmawati U, Amin AM. Comparison of Secondary Metabolite Content of *Pteris vittata* L. in Baluran National Park and Malang and Its Effect on Environment. *El-Hayah.* 2019;7(1):1–5.
 50. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MRJ, Speirs V. Breast cancer cell lines: Friend or foe? *Breast Cancer Res.* 2003;5(2):89–95.
 51. CELL CULTURE BASICS Handbook.
 52. Martin NC, Pirie AA, Ford L V., Callaghan CL, McTurk K, Lucy D, et al. The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. *Sci Justice - J Forensic Sci Soc.* 2006;46(3):179–84.
 53. Hemming S, Cakouros D, Gronthos S. Detachment of mesenchymal stem cells with trypsin/EDTA has no effect on apoptosis detection. *Stem Cells.* 2014;32(7):1991–2.
 54. Sumsuzzman DM. What is exact role of Trypsin and EDTA in dislodging the plated cells ?. [Internet]. 2018. Available from: https://www.researchgate.net/post/What_is_exact_role_of_Trypsin_and_EDTA_in_dislodging_the_plated_cells/5b9635f0a5a2e246ad2550ee/citation/download.

55. Lim SW, Loh HS, Ting KN, Bradshaw TD, Allaudin ZN. Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Trop Life Sci Res.* 2015;26(1):111–20.
56. Mezenchev R. Re: Until what percentage does DMSO remain not toxic to cells.?. [Internet]. 2015. Available from: https://www.researchgate.net/post/Until_what_percentage_does_DMSO_remain_not_toxic_to_cells/54cfb6fdd3df3e73548b46f3/citation/download
57. Liu Y, Peterson D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J ...* [Internet]. 1997;69(2):581–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231715> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x/full>
58. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ ML. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual (internet)*; 2016.
59. Sajjadi SE, Ghanadian M, Haghighi M, Mouhebat L. Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *J HerbMed Pharmacol.* 2015;4(1):15–9.
60. Franco YL, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther.* 2018;10:131–41.
61. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee H, et al. Journal of the American College of Nutrition Vitamin C as an Antioxidant : Evaluation of Its Role in Disease Prevention Vitamin C as an Antioxidant : Evaluation of Its Role in. 2013;5724.
62. Hashemi L, Asadi-Samani M, Moradi M-T, Alidadi S. Anticancer Activity and Phenolic Compounds of *Pistacia atlantica* Extract Anticancer Activity and Phenolic Compounds of. *eIJPR.* 2017;7(2):26–31.
63. Emy Dhurhanian AN. Uji Kandungan Fenolik Total dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Bentuk Sediaan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). *J Farm dan Ilmu Kefarmasian Indones.* 2018;5(2):62–8.
64. Biradi M, Hullatti K. Bioactivity guided isolation of cytotoxic terpenoids and steroids from *Premna serratifolia*. *Pharm Biol* [Internet]. 2017;55(1):1375–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1301491>

Lampiran 1. Hasil pengujian MTT dan DPPH

1. Hasil MTT

1.1 Absorban

Tabel 1. Hasil pengukuran absorban pengujian MTT ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol daun *Garcinia cowa* Roxb

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorban								
	Ekstrak n-heksan			Ekstrak etil asetat			Ekstrak etanol		
100	0,107	0,107	0,108	0,155	0,146	0,148	0,606	0,607	0,638
10	0,46	0,597	0,588	0,462	0,518	0,514	0,723	0,638	0,648
1	0,61	0,667	0,649	0,534	0,675	0,6	0,84	0,877	0,804
0,1	0,692	0,752	0,751	0,6	0,637	0,665	0,822	0,838	0,895
KS	0,719	0,812	0,727	0,684	0,621	0,615	0,781	0,774	0,829
KM	0,033	0,035	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033

Tabel 2. Hasil pengukuran absorban pengujian MTT doxorubicin

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorban		
	1	2	3
100	0,306	0,308	0,312
10	0,345	0,326	0,333
1	0,347	0,341	0,339
0,1	0,494	0,494	0,489
KS	1,304	1,335	1,349
KM	0,034	0,035	0,033

1.2 Hasil pengolahan statistik

1.2.2 Hasil perhitungan IC₅₀ dengan GraphPad Prism 9

Ekstrak n-heksan

Software : GraphPad Prism 9

Metode analisis : Regresi non linear log(inhibitor) vs. normalized response --

Variable slope

log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC ₅₀	1,288
HillSlope	-1,122
IC ₅₀	19,43
95% CI (profile likelihood)	
LogIC ₅₀	1,112 to 1,463
HillSlope	-2,075 to -0,7114
IC ₅₀	12,94 to 29,02
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	10
R squared	0,9439
Sum of Squares	765,2
Sy.x	8,748
Number of points	
# of X values	12
# Y values analyzed	12

Ekstrak etil asetat

Software : GraphPad Prism 9

Metode analisis : Regresi non linear log(inhibitor) vs. normalized response --

Variable slope

log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC ₅₀	1,453
HillSlope	-1,116
IC ₅₀	28,39
95% CI (profile likelihood)	
Log IC ₅₀	1,251 to 1,659
HillSlope	-1,717 to -0,7254
IC ₅₀	17,81 to 45,62
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	10
R squared	0,9243
Sum of Squares	997,0
Sy.x	9,985
Number of points	
# of X values	12

# Y values analyzed	12
---------------------	----

Ekstrak etanol

Software : GraphPad Prism 9

Metode analisis : Regresi non linear log(inhibitor) vs. normalized response --

Variable slope

log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
Log IC ₅₀	2,409
HillSlope	-1,263
IC ₅₀	256,3
95% CI (profile likelihood)	
Log IC ₅₀	??? to 3,277
HillSlope	??? to -0,5067
IC ₅₀	??? to 1891
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	10
R squared	0,7626
Sum of Squares	477,3
Sy.x	6,909
Number of points	
# of X values	12
# Y values analyzed	12

Doxorubicin

Software : GraphPad Prism 9

Metode analisis : Regresi non linear log(inhibitor) vs. normalized response -

Variable slope

Best-fit values	
LogI IC ₅₀	-0,2326
HillSlope	-2,776
IC ₅₀	0,5853
95% CI (profile likelihood)	
LogIC50	-0,4814 to ???
HillSlope	??? to -1,358
IC ₅₀	0,3301 to ???
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	10
R squared	0,9546
Sum of Squares	848,3
Sy.x	9,210
Number of points	
# of X values	12
# Y values analyzed	12

1.2.2 Hasil pengolahan statistik anova satu arah

Ekstrak n-heksan

Test of Homogeneity of Variances

viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,028	3	8	,189

ANOVA

viabilitas

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13389,119	3	4463,040	141,421	,000
Within Groups	252,468	8	31,559		
Total	13641,588	11			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

Viabilitas

Duncan^a

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
100	3	10,2868			
10	3		71,5152		
1	3			84,7367	
0.1	3				97,2668
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Ekstrak etil asetat

Test of Homogeneity of Variances

viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,126	3	8	,175

ANOVA

viabilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11673,891	3	3891,297	31,880	,000
Within Groups	976,491	8	122,061		
Total	12650,382	11			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Viabilitas

Duncan^a

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
100	3	20,9289		
10	3		77,0092	
1	3		94,5216	94,5216
0.1	3			99,4697
Sig.		1,000	,088	,598

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Test of Homogeneity of Variances

viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,666	3	8	,063

Ekstrak etanol

ANOVA

viabilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1992,419	3	664,140	19,079	,001
Within Groups	278,479	8	34,810		
Total	2270,898	11			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Viabilitas

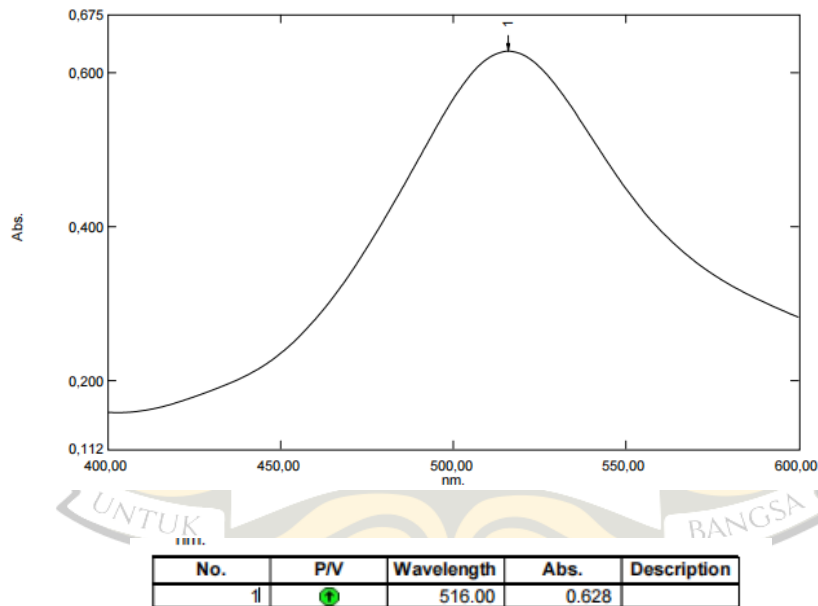
Duncan^a

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
100	3	76,6907		
10	3		88,0549	
1	3			106,2157
0.1	3			107,4699
Sig.		1,000	1,000	,801

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

2. Hasil DPPH



Gambar 1. Spektrum UV-Vis DPPH (panjang gelombang maksimum pada 516 nm dengan absorban 0,628 nm).

Tabel 3. Data nilai absorban DPPH ekstrak n-heksan

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorban (nm)		
	1	2	3
100	0,303	0,289	0,305
50	0,441	0,449	0,461
25	0,553	0,529	0,532
12,5	0,587	0,589	0,587
6,25	0,606	0,611	0,608
3,125	0,649	0,636	0,647
Blanko	0,652	0,653	0,652

Tabel 4. Persentase inhibisi berbagai konsentrasi ekstrak n-heksan

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Inhibisi			Rata-rata	SD
	1	2	3		
100	53,528	55,743	53,221	54,164	1,376
50	32,362	31,240	29,294	30,966	1,552
25	15,184	18,989	18,405	17,526	2,049
12,5	9,969	9,801	9,969	9,913	0,097
6,25	7,055	6,432	6,748	6,745	0,312
3,125	0,460	2,603	0,767	1,277	1,159
IC ₅₀	90,045	87,226	91,693	89,655	2,258

Tabel 5. Data nilai absorban DPPH ekstrak etil asetat

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorban (nm)		
	1	2	3
50	0,189	0,186	0,193
25	0,421	0,422	0,422
12,5	0,548	0,55	0,548
6,25	0,643	0,645	0,633
3,125	0,676	0,657	0,675

Blanko	0,749	0,749	0,75
--------	-------	-------	------

Tabel 6. Persentase inhibisi berbagai konsentrasi ekstrak etil asetat

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Inhibisi			Rata-rata	SD
	1	2	3		
50	74,766	75,167	74,267	74,733	0,451
25	43,792	43,658	43,733	43,728	0,067
12,5	26,836	26,569	26,933	26,779	0,189
6,25	14,152	13,885	15,6	14,546	0,923
3,125	9,746	12,283	10	10,676	1,397
IC ₅₀	31,058	30,870	31,111	31,013	0,127

Tabel 7. Data nilai absorban DPPH ekstrak etanol

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorban (nm)		
	1	2	3
50	0,14	0,144	0,144
25	0,395	0,389	0,398
12,5	0,507	0,508	0,512
6,25	0,624	0,624	0,627
3,125	0,641	0,655	0,658
Blanko	0,766	0,766	0,767

Tabel 8. Persentase inhibisi berbagai konsentrasi ekstrak etanol

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibisi (%)			Rata-rata	SD
	1	2	3		
50	81,723	82,768	81,225	81,905	0,240
25	48,433	49,217	48,109	48,586	0,108
12,5	33,812	33,681	33,246	33,580	0,164
6,25	18,538	18,538	18,253	18,443	0,0672

3,125	16,318	14,491	14,211	15,007	0,927
IC ₅₀	26,687	26,472	26,472	26,544	0,1243

Tabel 9. Data nilai absorban vitamin C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorban (nm)		
	1	2	3
10	0,101	0,09	0,095
5	0,459	0,46	0,457
2,5	0,595	0,59	0,597
1,25	0,675	0,658	0,663
0,625	0,707	0,707	0,701
Blanko	0,734	0,735	0,738

Tabel 10. Persentase inhibisi vitamin C

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Inhibisi			Rata-rata	SD
	1	2	3		
10	86,239	87,755	87,127	87,041	0,761
5	37,466	37,415	38,076	37,652	0,368
2,5	18,937	19,728	19,106	19,257	0,416
1,25	8,038	10,476	10,163	9,559	1,326
0,625	3,678	3,809	5,014	4,167	0,736
IC ₅₀	5,978				0,125

Hasil pengolahan statistik dengan anova satu arah

Ekstrak n-heksan

Test of Homogeneity of Variances

viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,834	5	12	,026

ANOVA

viabilitas

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5764,381	5	1152,876	695,087	,000
Within Groups	19,903	12	1,659		
Total	5784,284	17			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

Viabilitas

Duncan^a

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
3,125	3	1,2768					
6,25	3		6,7452				
12,5	3			9,9132			
25	3				17,5261		
50	3					30,9656	
100	3						54,1637
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Ekstrak Etil astetat

Test of Homogeneity of Variances

viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,552	4	10	,024

ANOVA

viabilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7848,344	4	1962,086	261,392	,000
Within Groups	75,063	10	7,506		
Total	7923,407	14			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

viabilitas

Duncan^a

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
3,125	3	12,1288			
6,25	3	15,9047			
12,5	3		25,5421		
25	3			42,7805	
50	3				74,7670
Sig.		,122	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Ekstrak Etanol

Test of Homogeneity of Variances

viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,408	4	10	,014

ANOVA

viabilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8745,260	4	2186,315	5955,458	,000
Within Groups	3,671	10	,367		
Total	8748,931	14			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

viabilitas

Duncan^a

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
3,125	3	15,0069				
6,25	3		18,4429			
12,5	3			33,5800		
25	3				48,5866	
50	3					81,3833
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 2. Contoh perhitungan

1. Perhitungan rendemen ekstrak

Berat ekstrak n-heksan = 245,13 gram

Berat sampel serbuk kering = 1,81 kg = 1810 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{massa ekstrak (gram)}}{\text{massa sampel (gram)}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{245,13 \text{ gram}}{1810 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 13,54 \%$$

2.. Perhitungan susut pengeringan

Krus kosong = 30,4 gram

Krus kosong + sampel = 32,84 gram

Krus kosong + sampel yang telah dikeringkan = 32,79 gram

$$\text{Susut pengeringan (\%)} = \frac{(B-A)-(C-A)}{B-A} \times 100 \%$$

$$\text{Susut pengeringan (\%)} = \frac{(32,84 \text{ gram} - 30,4 \text{ gram}) - (32,79 \text{ gram} - 30,4 \text{ gram})}{(32,84 \text{ gram} - 30,4 \text{ gram})} \times 100 \%$$

$$\text{Susut pengeringan (\%)} = 3,907 \%$$

A = krus kosong

B = krus kosong + sampel

C = krus kosong + sampel yang telah dikeringkan

3. Perhitungan kadar abu total

Krus kosong = 30,4 gram

Krus kosong + sampel = 32,79 gram

Krus kosong + sampel yang telah dikeringkan = 30,6 gram

$$\text{Kadar abu total (\%)} = \frac{(C-A)}{(B-A)} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar abu total (\%)} = \frac{(30,6 \text{ gram} - 30,4 \text{ gram})}{(32,79 \text{ gram} - 30,4 \text{ gram})} \times 100 \%$$

$$\text{Kadar abu total (\%)} = 6,224 \%$$

A = krus kosong

B = krus kosong + sampel

C = krus kosong + sampel yang telah dikeringkan

4. Perhitungan viabilitas sel

Tabel 11. nilai absorban ekstrak n-heksan

Konsentrasi (µg/ml)	Absorban (nm)
100	0,107
10	0,46
1	0,61
0,1	0,692
Ks	0,719
Km	0,033

Rumus :

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Asampel} - \text{Akm}}{\text{Aks} - \text{Akm}} \times 100\%$$

keterangan :

km : kontrol media

ks : kontrol sel

konsentrasi 100 µg/ml

$$\begin{aligned} \text{viabilitas sel (\%)} &= \frac{0,107 - 0,033}{0,719 - 0,033} \times 100\% \\ &= 10,787\% \end{aligned}$$

konsentrasi 10 µg/ml

$$\begin{aligned} \text{viabilitas sel (\%)} &= \frac{0,46 - 0,033}{0,719 - 0,033} \times 100\% \\ &= 62,245\% \end{aligned}$$

5. Persentase inhibisi

Tabel 12. Nilai absorban ekstrak n-heksan

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorban (nm)
100	0,303
50	0,441
25	0,553
12,5	0,587
6,25	0,606
3,125	0,649
Blanko	0,652

Rumus :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Ablank} - \text{Asampel}}{\text{Ablank}} \times 100$$

konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$


$$\begin{aligned} \text{inhibisi (\%)} &= \frac{0,652 - 0,303}{0,652} \times 100\% \\ &= 54,164 \% \end{aligned}$$

konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned} \text{inhibisi (\%)} &= \frac{0,652 - 0,441}{0,652} \times 100\% \\ &= 32,362 \% \end{aligned}$$

Lampiran 3. Foto hasil penelitian

1. Hasil identifikasi tumbuhan asam kandis

 **HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)**
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. *811 e-mail: nas_herb@yahoo.com;
herbariumandaunand@gmail.com

Nomor : 296/K-ID/ANDA/VII/2021
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth,
Medlyn Jhofi
Di
Tempat


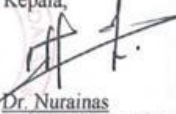
Dengan hormat,
Sehubungan dengan surat mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang dibawa, atas nama:

Nama : Medlyn Jhofi
No. BP : 1711013045
Instansi : Fakultas Farmasi Universitas Andalas

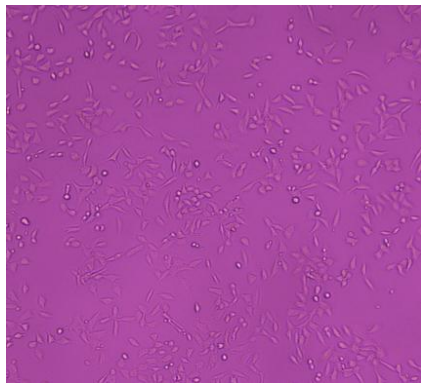
Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.

No	Family	Spesies
1.	Clusiaceae	<i>Garcinia cowa</i> Roxb. ex Choisy

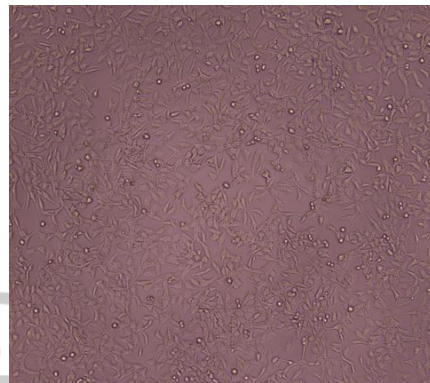
Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

 Padang, 02 Juli 2021
Kepala,

Dr. Nurainas
NIP. 196908141995122001

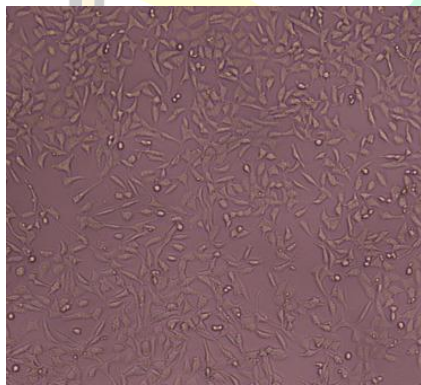
2. Sel T47D dibawah mikroskop dan perlakuan setelah ditambahkan ekstrak



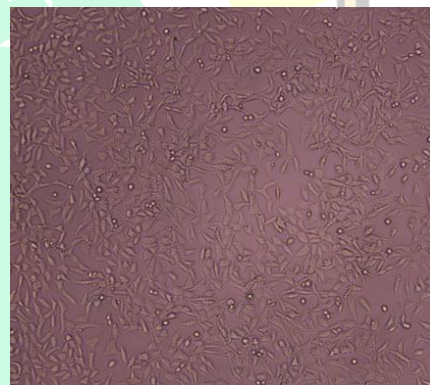
Sel kanker payudara T47D (kontrol pada pada 0 jam)



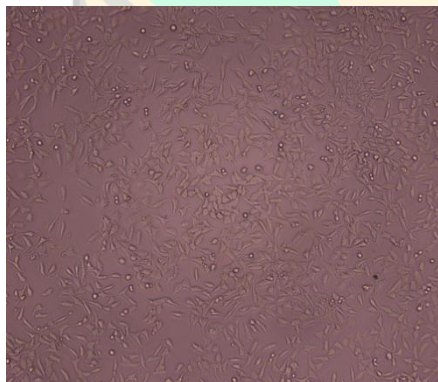
Kontrol setelah 48 jam



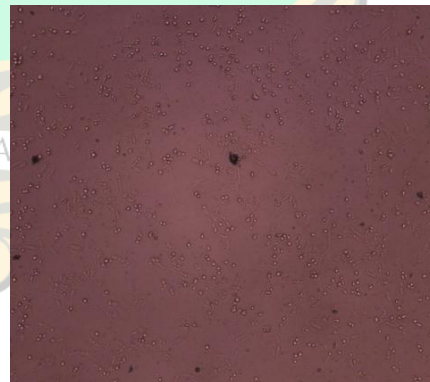
Sel T47D +ekstrak n-heksan 0,1 µg/ml setelah 48 jam



Sel T47D +ekstrak n-heksan 1 µg/ml setelah 48 jam

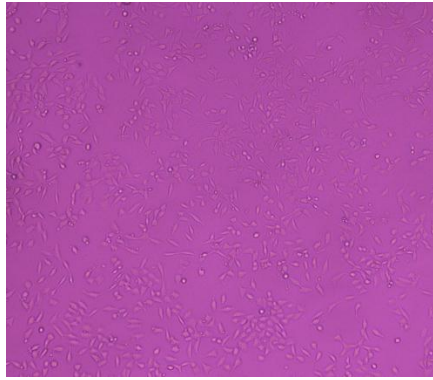


Sel T47D +ekstrak n-heksan 10 µg/ml setelah 48 jam

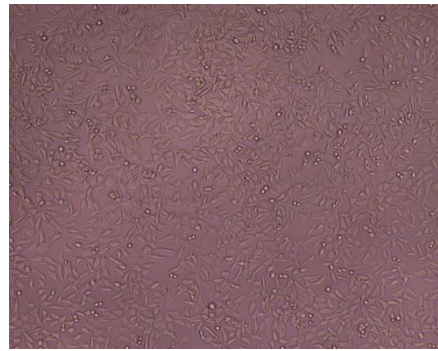


Sel T47D +ekstrak n-heksan 100 µg/ml setelah 48 jam

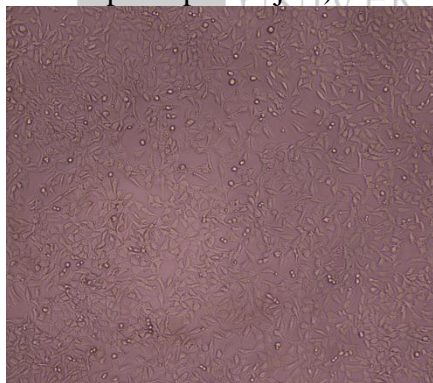
Gambar 2. Sel T47D dibawah mikroskop dan perlakuan setelah ditambahkan ekstrak n-heksan



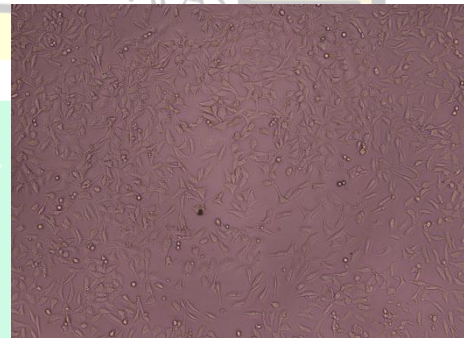
Sel kanker payudara T47D (kontrol pada pada 0 jam)



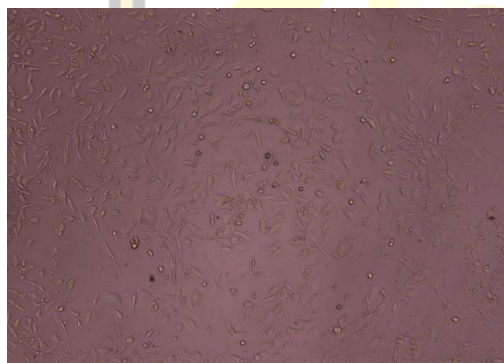
kontrol setelah 48 jam



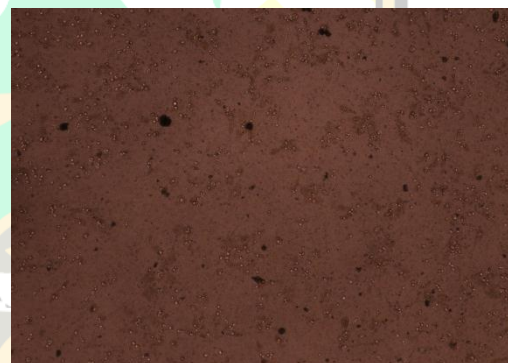
Sel T47D + ekstrak etil asetat 0,1 µg/ml setelah 48 jam



Sel T47D + ekstrak etil asetat 1 µg/ml setelah 48 jam

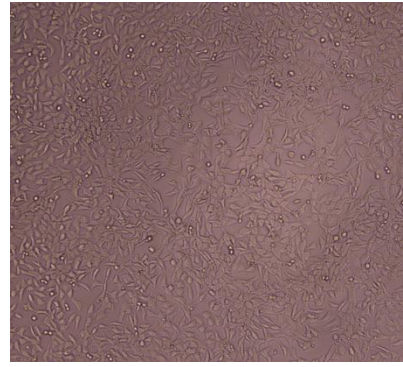
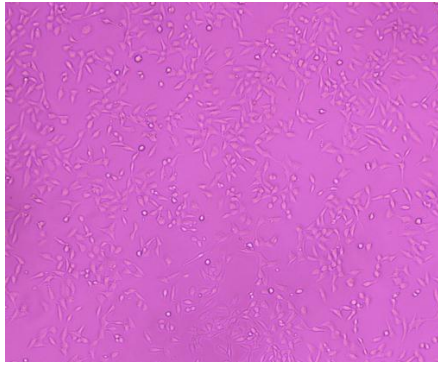


Sel T47D + ekstrak etil asetat 10 µg/ml setelah 48 jam

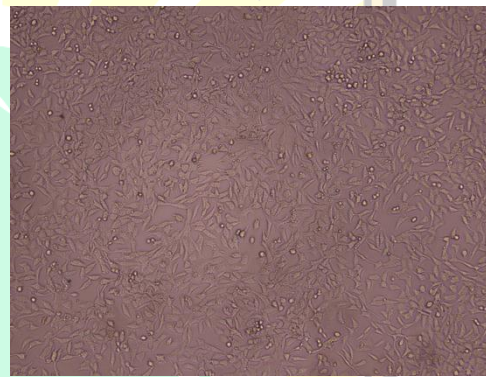
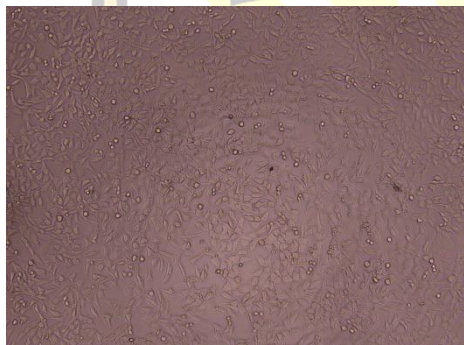


Sel T47D + ekstrak etil asetat 100 µg/ml setelah 48 jam

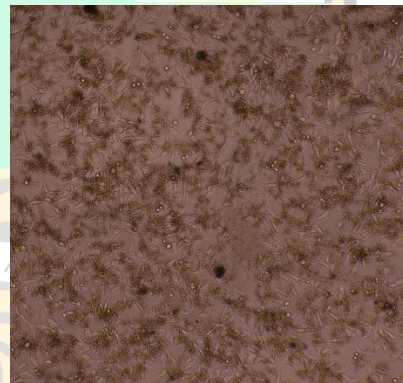
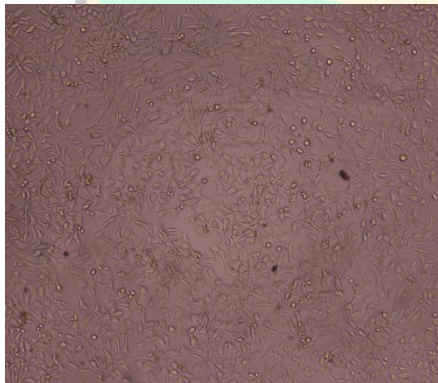
Gambar 3. Sel T47D dibawah mikroskop dan perlakuan setelah ditambahkan ekstrak etil asetat



Sel kanker payudara T47D (kontrol pada 0 jam) Kontrol pada 48 jam



Sel T47D + ekstrak etanol 0,1 µg/ml setelah 48 jam Sel T47D + ekstrak etanol 1 µg/ml setelah 48 jam



Sel T47D + ekstrak etanol 10 µg/ml setelah 48 jam Sel T47D + ekstrak etanol 100 µg/ml setelah 48 jam

Gambar 4. Sel T47D dibawah mikroskop dan perlakuan setelah ditambahkan ekstrak etanol

3. Hasil pengujian MTT ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb



Keterangan :

1:Kontrol media

2 :Kontrol sel

3 :Ekstrak n-heksan 100 µg/ml

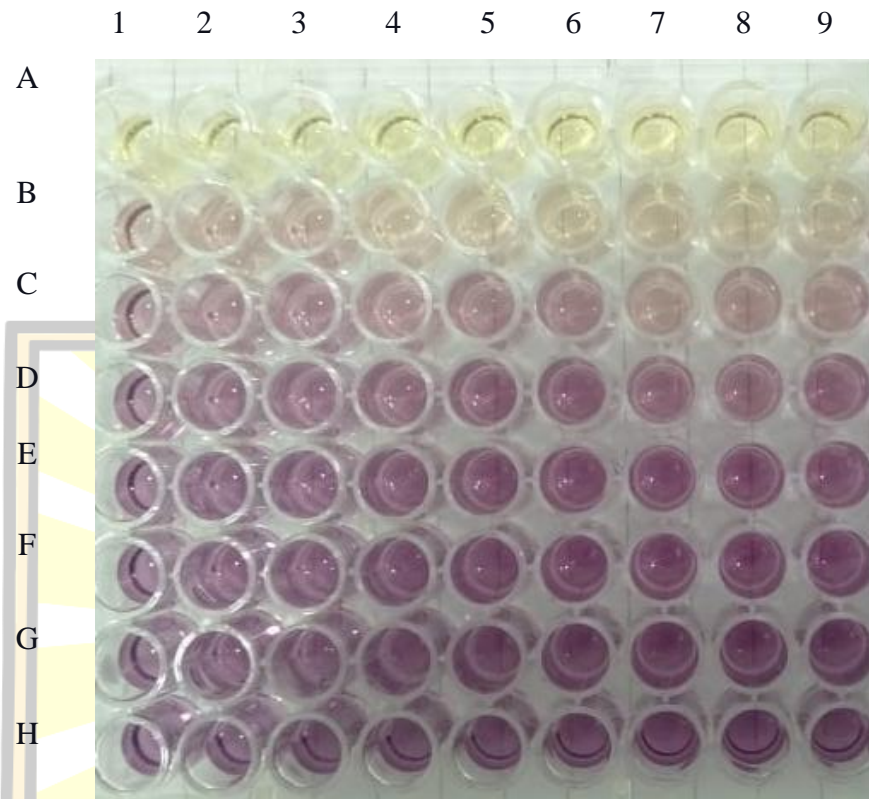
4 :Ekstrak n-heksan 10 µg/ml

5 :Ekstrak n-heksan 1 µg/ml

6 :Ekstrak n-heksan 0,1 µg/ml

Gambar 5. Hasil pengujian MTT ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

4. Hasil pengujian MTT ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb



Gambar 6. Hasil pengujian DPPH ekstrak daun *Garcinia cowa* Roxb

Keterangan :

Kolom 1-3 : Ekstrak n-heksan

Kolom 4-6 : Ekstrak etil asetat

Kolom 7-9 : Ekstrak etanol

A : Konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$

B : Konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$

C : Konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$

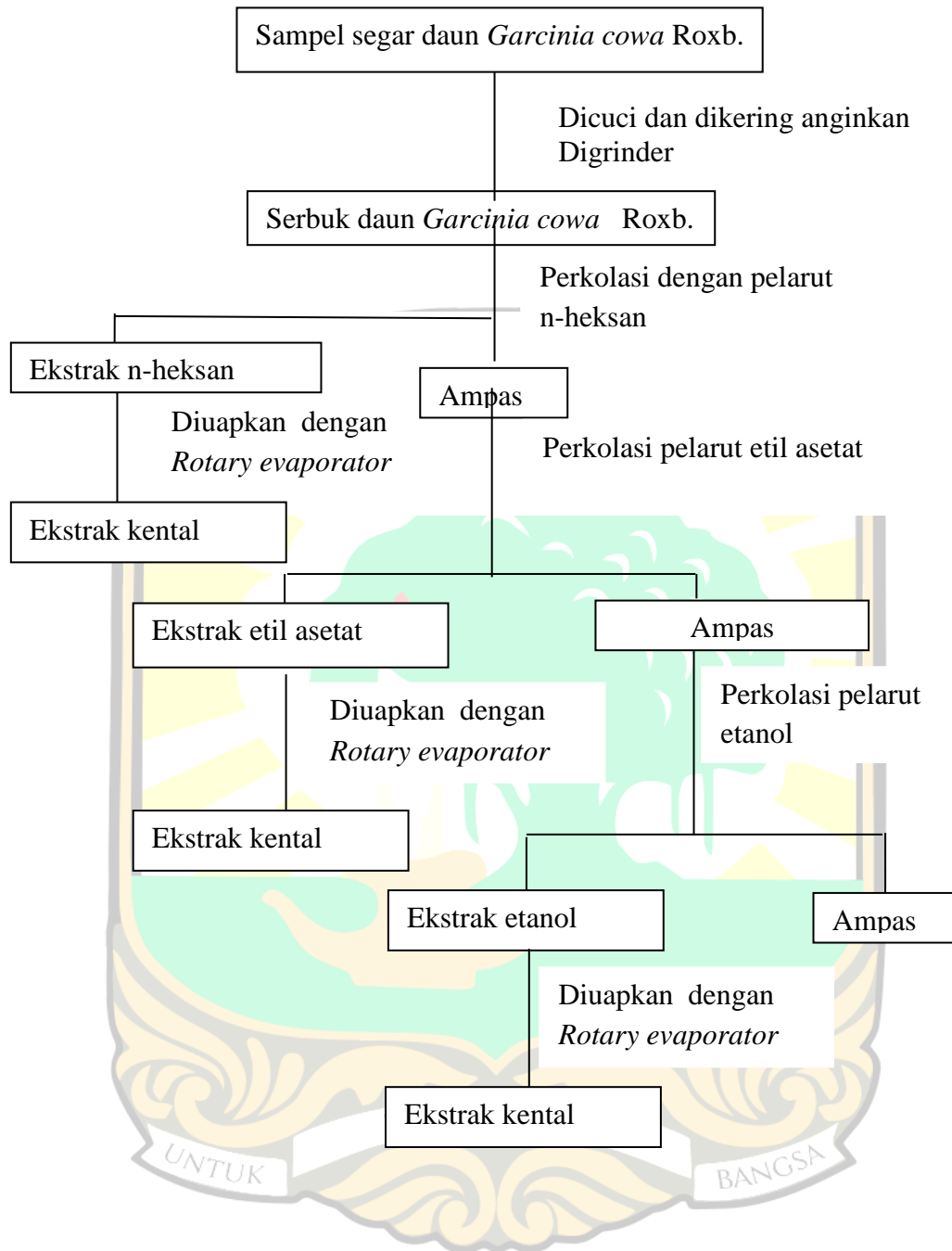
D : Konsentrasi 12,5 $\mu\text{g/ml}$

F : Konsentrasi 6,25 $\mu\text{g/ml}$

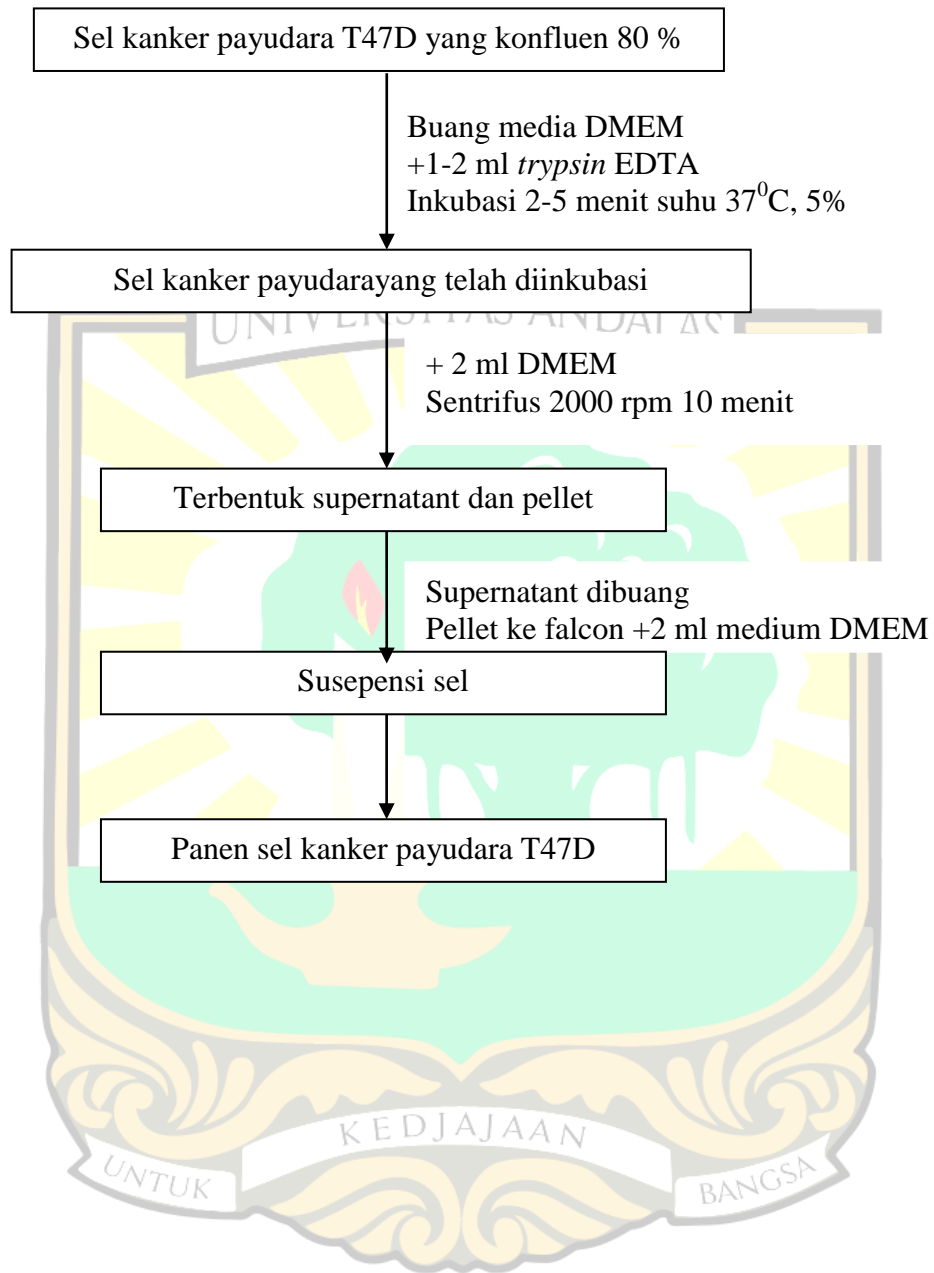
G : Konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$

H : Blanko

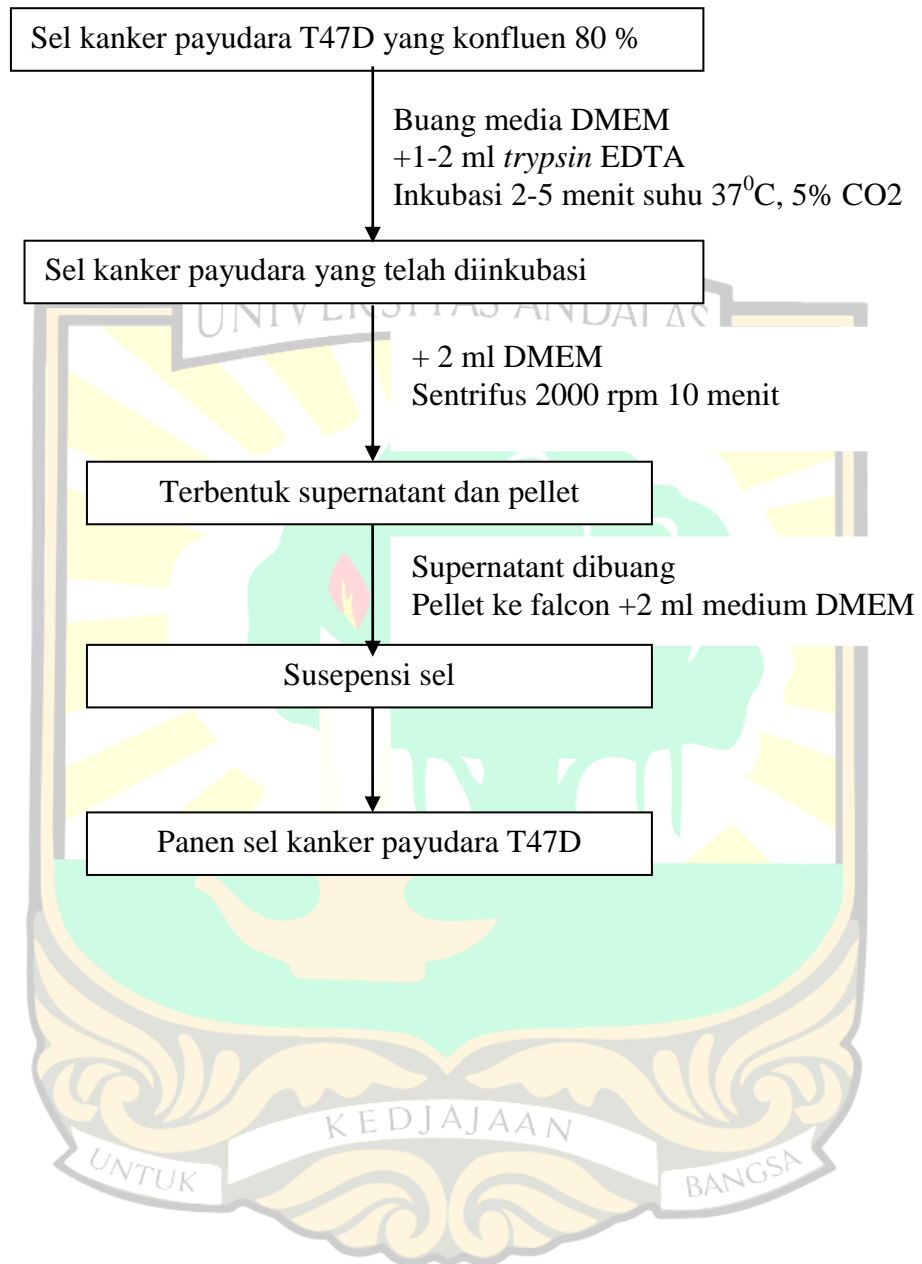
5.. Bagan kerja ekstraksi



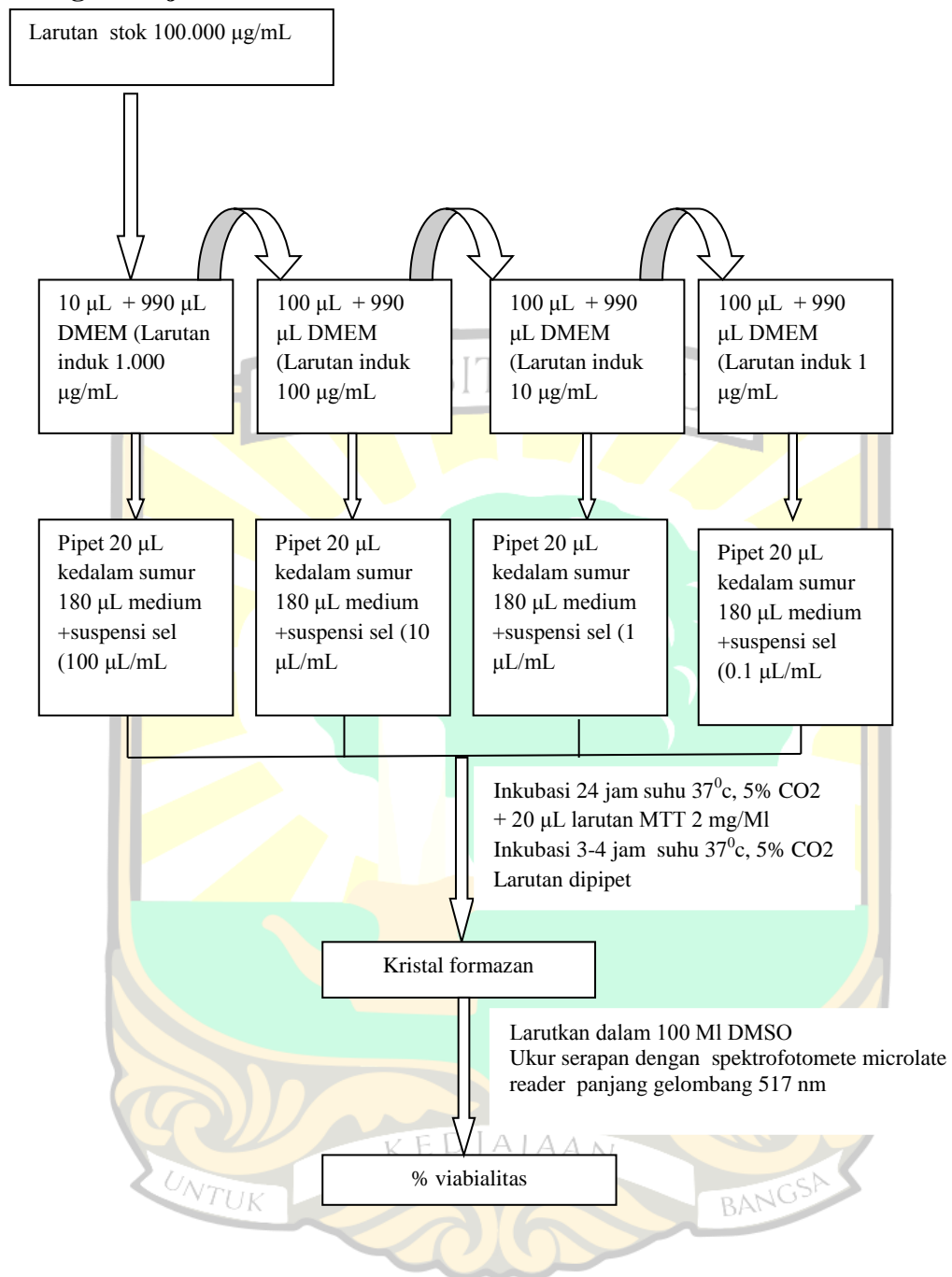
7. bagan kerja penyiapan sel kanker payudara T47D



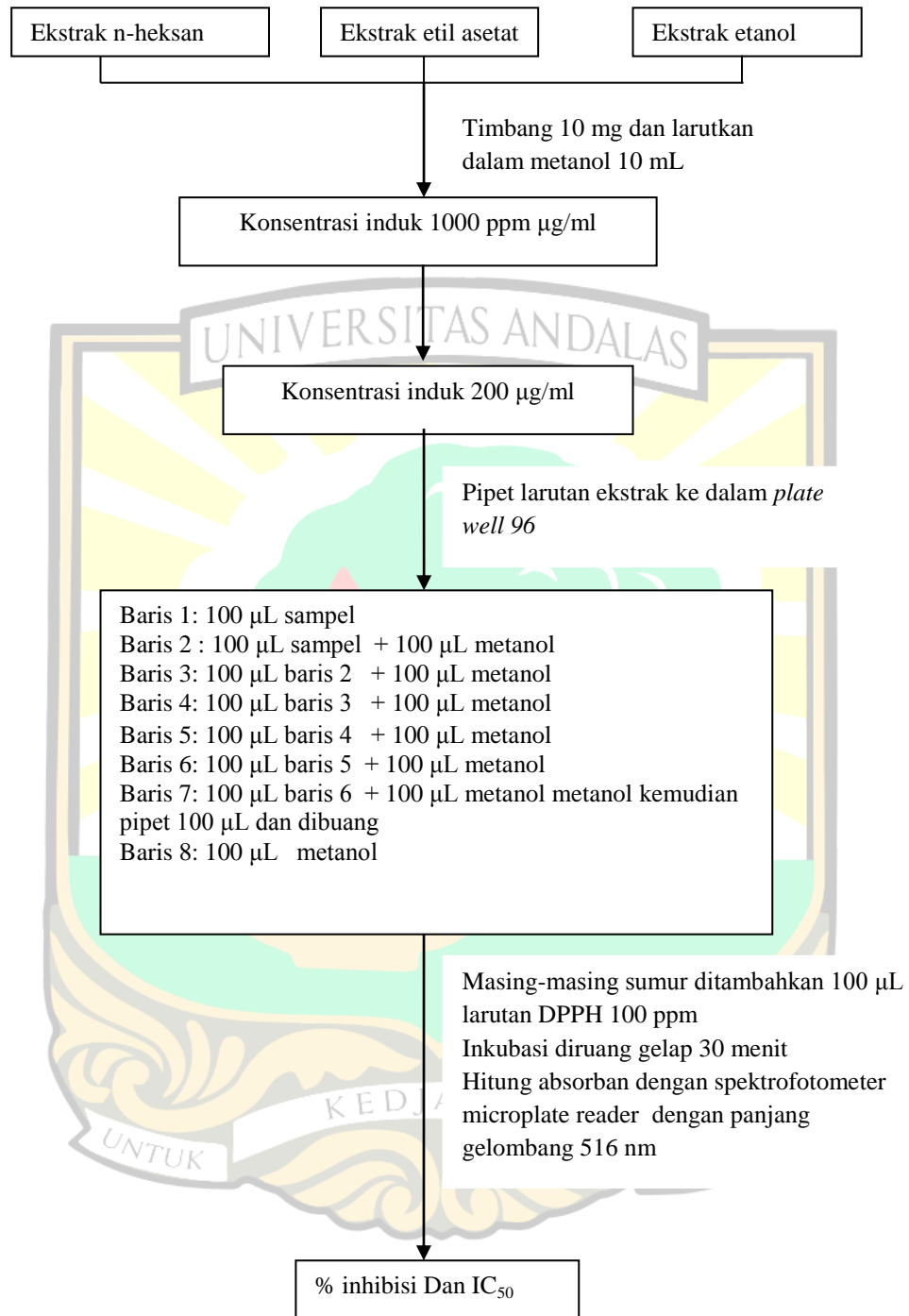
8. Bagan kerja paneen sel T47D



9. Bagan kerja MTT



10. Bagan Kerja DPPH



AKTIVITAS SITOTOKSIK TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAUN ASAM KANDIS (*Garcinia cowa* Roxb)

ORIGINALITY REPORT

0%

SIMILARITY INDEX

0%

INTERNET SOURCES

0%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

Exclude quotes Off

Exclude matches < 3%

Exclude bibliography On