

**POTENSI SENYAWA ASETOGENIN DARI DAUN SIRSAK (*Annona Muricata* Linn.) YANG DIEMBANKAN PADA ZEOLIT NaX SEBAGAI
SENYAWA ANTIKANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

Oleh :
SITI MUKHAROMAH
NIM. 14630044



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK
IBRAHIMMALANG
2019

POTENSI SENYAWA ASETOGENIN DARI DAUN SIRSAK (*Annona Muricata* Linn.) YANG DIEMBANKAN PADA ZEOLIT NaX SEBAGAI SENYAWA ANTIKANKER PAYUDARA T47D

SKRIPSI

**Oleh:
SITI MUKHAROMAH
NIM. 14630044**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

POTENSI SENYAWA ASETOGENIN DARI DAUN SIRSAK (*Annona Muricata* Linn.) YANG DIEMBANKAN PADA ZEOLIT NaX SEBAGAI SENYAWA ANTIKANKER PAYUDARA T47D

SKRIPSI

Oleh:
SITI MUKHAROMAH
NIM. 14630044

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 9 Mei 2019

Pembimbing I

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

Pembimbing II

Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009



Mengetahui,
Ketua Jurusan

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

POTENSI SENYAWA ASETOGENIN DARI DAUN SIRSAK (*Annona Muricata* Linn.) YANG DIEMBANKAN PADA ZEOLIT NaX SEBAGAI SENYAWA ANTIKANKER PAYUDARA T47D

SKRIPSI

Oleh:
SITI MUKHAROMAH
NIM. 14630044

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 9 Mei 2019

Penguji Utama : Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

Ketua Penguji : Susi Nurul Khalifah, M.Si
NIDT. 19851020 20180201 2 240

Sekretaris Penguji : Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

Anggota Penguji : Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Mengesahkan,
Ketua Jurusan

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Siti Mukharomah
NIM : 14630044
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Potensi Senyawa Asetogenin dari Daun Sirsak (*Annona
Muricata* Linn.) yang Diembankan pada Zeolit NaX
sebagai Senyawa Antikanker Payudara T47D

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Yang membuat pernyataan

Malang, 9 Mei 2019



Siti Mukharomah
NIM.14630044

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, tiada kata terindah selain syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menimba sebagian dari ilmu-Nya dan dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat dan salam tetap terlimpah curahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW.

Skripsi ini penulis persembahkan untuk:

Kedua orang tua saya, Bapak Tasiyan dan Ibu Ngatini yang senantiasa dengan ikhlas mendoakan, memberi dukungan, dan memenuhi semua kebutuhan penulis dalam menuntut ilmu hingga dapat menyelesaikan tulisan ini. Untuk keluarga tercinta terutama Mbah Kakung Rasenan dan (Almh.) Mbah Putri Sumainah yang selalu memberikan doa dan motivasi kepada penulis.

Tak lupa untuk seluruh teman-teman seperjuangan Antikanker, Chemistry 14 khususnya kelas B, seluruh teman-teman asrama USA (khususnya 36 everlasting), teman-teman KKM, sahabat PPJ (Novitasari dan Yeni Purwandari), keluarga 9.6 (nine point six brother) serta seluruh guru dan dosen yang memberikan dukungan, doa, dan ilmunya kepada penulis. Serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu terealisasinya skripsi ini, semoga Allah selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua.

Aamiiin..

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb.

Alhamdulillah *rabbi'l'amin*, puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul **“Potensi Senyawa Asetogenin dari Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn.) yang Diembankan pada Zeolit NaX sebagai Senyawa Antikanker Payudara T47D”**. Skripsi ini dapat disusun dengan adanya dukungan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, izinkanlah penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Tasiyan dan Ibu Ngatini serta saudara-saudara penulis yang telah memberikan semangat, nasihat, doa, dukungan moril dan materil sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dan dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, motivasi, serta arahan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku pembimbing agama dan ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si selaku dosen konsultan, karena atas bimbingan dan arahnya penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
4. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku dosen penguji, karena atas masukan dan sarannya skripsi ini bisa menjadi lebih baik.
5. Seluruh bapak ibu Dosen Jurusan Kimia dan segenap Laboran serta Staf administrasi Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah

memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana, dan wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis, serta banyak membantu dalam proses penelitian.

6. Keluarga tim riset Analitik yang membantu dalam menjalankan penelitian.
7. Teman-teman kimia angkatan 2014 khususnya “Kimia B”, *my best roommate* (36 *everlasting*), keluarga KKM dan keluarga 9.6 (*nine point six brother*), serta sahabat PPJ (Novitasari dan Yeni Purwandari) yang selalumemberi motivasi.
9. Seluruh teman-teman mahasiswa yang ikut serta memberikan motivasi.

Semoga skripsi ini dapat memberikan informasi dan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua. Amin.

Malang, 9 Mei 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
مستخلص البحث	xv
BAB I : PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah	4
1.3 Tujuan penelitian	5
1.4 Batasan masalah.....	5
1.5 Manfaat penelitian.....	6
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sel kanker payudara T47D.....	7
2.2 Senyawa aktif asetogenin dalam daun sirsak sebagai obat antikanker	8
2.3 Metode ekstraksi maserasi dan fraksinasi	11
2.4 Kromatografi lapis tipis	13
2.4.1 Kromatografi lapis tipis analitik (KLTA)	13
2.4.2 Kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP)	14
2.5 Potensi zeolit NaX sebagai pengemban obat antikanker	15
2.6 Uji aktivitas antikanker secara <i>In-Vitro</i> dengan metode MTT	19
2.7 Analisis dengan <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA) Reader	21
BAB III : METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Waktu dan tempat pelaksanaan penelitian	22
3.2 Alat dan bahan	
3.2.1 Alat.....	22
3.2.2 Bahan	22
3.3 Rancangan penelitian	23
3.4 Tahapan penelitian	23
3.5 Pelaksanaan penelitian	
3.5.1 Preparasi sampel	24
3.5.2 Proses ekstraksi dan fraksinasi senyawa asetogenin dari daun sirsak	24

3.5.3 Pemisahan senyawa asetogenin dengan kromatografi lapis tipis (KLT)	25
3.5.3.1 Pemisahan menggunakan KLT analitik	25
3.5.3.2 Pemisahan menggunakan KLT preparatif	27
3.5.4 Pengembanan ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT pada zeolit NaX	27
3.5.5 Karakterisasi hasil pengembanan menggunakan FTIR	28
3.5.6 Uji aktivitas antikanker dengan metode MTT (CCRC, 2009)	28
3.5.6.1 Penyiapan sel	29
3.5.6.2 Panen sel	29
3.5.6.3 Perhitungan sel kanker	29
3.5.6.4 Peletakan sel pada plate	29
3.5.6.5 Pembuatan larutan sampel	30
3.5.6.6 Pemberian larutan sampel pada plate	30
3.5.6.7 Pemberian larutan MTT	30
3.5.6.8 Pembacaan nilai absorbansi dengan <i>ELISA reader</i>	31
3.5.7 Analisis data	31
BAB IV : PEMBAHASAN	
4.1 Hasil maserasi dan fraksinasi daun sirsak	33
4.2 Pemisahan senyawa asetogenin dengan kromatografi lapis tipis	34
4.3 Pengembanan ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT pada zeolit NaX menggunakan metode impregnasi kering	37
4.4 Uji aktivitas antikanker	42
4.5 Kajian hasil penelitian dalam perspektif islam	47
BAB V : PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Morfologi sel T47D	7
Gambar 2.2	Daun sirsak.....	9
Gambar 2.3	Struktur umum <i>Annonaceae acetogenins</i>	10
Gambar 2.4	Spektra FTIR ekstrak hasil maserasidaun sirsak	12
Gambar 2.5	Kerangka zeolit NaX.....	16
Gambar 2.6	Hasil analisa FTIR (a) kaolin blitar; (b)metakaolin; (c) zeolitNaX dengan suhu hidrotermal 100°C selama 2 jam	18
Gambar 2.7	Pola difraksi sinar-X (a) standar zeolit sodalit, (b) standar zeolit NaX, (c) zeolit NaX dengan suhu hidrotermal (x: zeolit NaX).....	18
Gambar 3.1	Tabel data.....	32
Gambar 4.1	Spektra FTIR isolat hasil KLT	36
Gambar 4.2	(a) Zeolit sebelum impregnasi; b) Zeolit setelah diimpregnasidengan ekstrak hasil fraksinasi; c) Zeolit setelah diimpregnasi dengan isolat hasil KLT.....	37
Gambar 4.3	Dugaan interaksi antara Annomuricin A dengan zeolit NaX	38
Gambar 4.4	Spektra FTIR pada sampel: a) Ekstrak hasil maserasi, b) Ekstrak hasil fraksinasi, c) Isolat hasil KLT.	39
Gambar 4.5	Spektra FTIR pada sampel: a) Ekstrak hasil fraksinasi: zeolit NaX(5:10), b)Isolat hasil KLT; zeolit NaX (5:10), c) Zeolit NaX.....	40
Gambar 4.6	Morfologi sel T47D setelah di treatment (a) sel kontrol, (b) sel + ekstrak hasil maserasi dengan konsentrasi 500 µg/mL, (c) sel + ekstrak hasil maserasi dengan konsentrasi 15,625 µg/mL	43
Gambar 4.7	Reaksi reduksi MTT	44
Gambar 4.8	Struktur natrium dodesil sulfat.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Data hasil perbandingan 2 theta.....	19
Tabel 4.1	Hasil maserasi daun sirsak (<i>Annona muricata</i> Linn.).....	33
Tabel 4.2	Hasil fraksinasi daun sirsak (<i>Annona muricata</i> Linn.)	34
Tabel 4.3	Hasil KLTP ekstrak hasil fraksinasi dengan eluen metanol: diklorometana (1:19).....	35
Tabel 4.4	Interpretasi spektra FTIR sampel zeolit NaX dan hasil pengembangan	41
Tabel 4.5	Nilai IC ₅₀ uji aktivitas antikanker	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan penelitian.....	53
Lampiran 2. Skema kerja	54
L.2.1 Preparasi sampel.....	54
L.2.2 Proses ekstraksi dan fraksinasi asetogenin.....	54
L.2.3 Pemisahan senyawa asetogenin dengan KLTP	55
L.2.4 Pengembanan ekstrak hasil fraksinasi isolat hasil KLT dengan zeolitNaX	55
L.2.5 Karakterisasi hasil pengembanan menggunakan FTIR	56
L.2.6 Uji aktivitas antikanker dengan metode MTT	56
L.2.6.1 Penyiapan sel	56
L.2.6.2 Panen sel	57
L.2.6.3 Penghitungan sel kanker	57
L.2.6.4 Peletakan sel pada <i>plate</i>	57
L.2.6.5 Pembuatan larutan uji (sampel)	58
L.2.6.5 Pemberian larutan uji pada <i>plate</i>	58
L.2.6.7 Pemberian larutan MTT	58
L.2.6.8 Pembacaan nilai absorbansi	59
Lampiran 3. Pembuatan larutan dan reagen	60
L.3.1 Pembuatan larutan etanol 95%	60
L.3.2 Pembuatan reagen vanilin- asam sulfat	60
L.3.3 Pembuatan larutan SDS 10% (b/v)	60
L.3.4 Pembuatan larutan stok MTT (5 mg/mL) (CCRC, 2009)	60
L.3.5 Pembuatan larutan stok 1000 ppm kombinasi ekstrak hasil fraksinasi isolat hasil KLT dengan zeolit NaX	61
Lampiran 4. Data dan perhitungan hasil penelitian	62
L.4.1 Perhitungan rendemen	62
L.4.2 Perhitungan nilai Rf dari hasil KLTP	62
L.4.3 Perhitungan konsentrasi sel	63
L.4.4 Perhitungan persentase sel hidup	64
L.4.5 Hasil perhitungan IC ₅₀ dengan excel	69
Lampiran 5. Dokumentasi	72
L.5.1 Proses maserasi	72
L.5.2 Proses fraksinasi (ekstraksi cair-cair)	73
L.5.3 Pemisahan senyawa aktif dengan KLTA	73
L.5.4 Pemisahan senyawa aktif dengan KLTP	74
L.5.5 Proses impregnasi ekstrak hasil fraksinasi isolat hasil KLT pada zeolit NaX	74
L.5.6 Karakterisasi hasil FTIR	75
L.5.7 Uji aktivitas antikanker menggunakan metode MTT	78
L.5.8 Morfologi sel kanker T47D setelah pemberian larutan MTT	79

ABSTRAK

Mukharomah, Siti. 2019. **Potensi Senyawa Asetogenin dari Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn.) yang Diembankan pada Zeolit NaX sebagai Senyawa Antikanker Payudara T47D**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Dr. Akyunul Jannah S.Si, M.P; Konsultan: Susi Nurul Khalifah, M.Si.

Kata Kunci: Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.), Zeolit NaX, Impregnasi Kering, Sel Kanker Payudara T47D, Metode MTT

Daun sirsak (*Annona Muricata* Linn.) diketahui memiliki aktivitas antikanker secara *in-vitro*. Pada penelitian ini dilakukan fraksinasi dan isolasi senyawa asetogenin dari daun sirsak yang diembankan pada zeolit NaX. Hasil pengembanan diuji aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D.

Ekstraksi maserasi daun sirsak menggunakan pelarut etanol 95%. Fraksinasi (ekstraksi cair-cair) menggunakan campuran diklorometana: air dilanjutkan dengan n-heksana: metanol. Pemisahan dengan KLTA untuk mengetahui eluen terbaik dan pemisahan dengan KLTP untuk mendapatkan isolat menggunakan eluen metanol: diklorometana (1:19). Ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT diembankan pada zeolit NaX menggunakan metode impregnasi kering dengan perbandingan berat 5:10. Keberhasilan pengembanan dianalisis menggunakan spektrofotometer FTIR. Metode uji aktivitas antikanker yang digunakan adalah metode MTT (*Microculture tetrazolium*).

Hasil analisis spektrofotometer FTIR menunjukkan bahwa sampel ekstrak hasil fraksinasi: zeolit, muncul puncak serapan baru pada bilangan gelombang $2909,881\text{ cm}^{-1}$ untuk gugus $\text{Csp}_3\text{-H}$ (*stretch*) asimetri dan $2851,383\text{ cm}^{-1}$ untuk $\text{-Csp}_3\text{-H}$ (*stretch*) simetri. Sampel isolat hasil KLT: zeolit, puncak serapan baru muncul pada bilangan gelombang $2935,178\text{ cm}^{-1}$ untuk gugus $\text{Csp}_3\text{-H}$ (*stretch*) asimetri dan $2851,383\text{ cm}^{-1}$ untuk $\text{Csp}_3\text{-H}$ (*stretch*) simetri. Munculnya serapan baru menunjukkan bahwa senyawa telah teremban dalam zeolit. Nilai IC_{50} yang diperoleh dari sampel pengembanan ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT pada zeolit NaX yaitu $125,683\text{ }\mu\text{g/mL}$ dan $103.514,217\text{ }\mu\text{g/mL}$.

ABSTRACT

Mukharomah, Siti. 2019. **The Potential of Acetogenin Compound from Soursop Leaves which Loading on NaX Zeolite as T47D Breast Anticancer Compound.** Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Consultant: Susi Nurul Khalifah, M.Si.

Keywords: Soursop leaf (*Annona muricata* Linn), NaX Zeolite, dry impregnation, Breast Cancer Cells T47D, MTT Essay.

The soursop leaf (*Annona muricata* Linn.) is known to have anticancer activity in vitro. Fractionation and isolation of acetogenin compound from soursop leaf that impregnated to zeolite NaX were carried out in this study. The result were tested for anticancer activity on T47D breast cancer cells.

Maceration of soursop leaves using 95% ethanol. Fractionation (liquid-liquid extraction) using a mixture of dichloromethane: water followed by n-hexane: methanol. Separation with analytical-TLC to find out the best eluent and separation with preparative-TLC to get isolates using eluent methanol: dichloromethane (1:19). Extract from fractionation and isolate from TLC were carried out on NaX zeolite using the dry impregnation method with a ratio of 5:10. The result of impregnation was analyzed using FTIR spectrophotometer. The anticancer activity test using MTT (*Microculture tetrazolium*) method.

The FTIR spectrophotometer results showed that extract from fractionation: zeolite, new absorption peaks appeared at wavenumber 2909.881 cm^{-1} for $\text{Csp}^3\text{-H}$ (*stretch*) asymmetry and $2851,383\text{ cm}^{-1}$ for $\text{Csp}^3\text{-H}$ (*stretch*) symmetry. Isolate from TLC: zeolite sample, the new absorption peak appeared at wavenumber $2935,178\text{ cm}^{-1}$ for the $\text{Csp}^3\text{-H}$ (*stretch*) asymmetry group and $2851,383\text{ cm}^{-1}$ for $\text{-Csp}^3\text{-H}$ (*stretch*) symmetry. The appearance of new absorption shows that the compound has been impregnated in zeolite. The IC_{50} value of extract from fractionation and isolates from TLC sample that has been impregnated in NaX zeolite was $125,683\text{ }\mu\text{g/mL}$ and $103,514,217\text{ }\mu\text{g/mL}$.

مستخلص البحث

سيقي مكرمة. 2019. إمكانات مركب استيتونجين من أوراق سيرسك (*Annona Muricata Linn.*) والتي تحمل على NaX الزيوليت كمركب لمرض سرطان الثدي T47D. رسالة الليسانس. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج المشرفة الأولى: إيلوك كاملة حياتي، الماجستير؛ المشرفة الثانية: د. أعين اللجنة. المستشارة: سوسي نور الخليفة، الماجستير

الكلمات الرئيسية: أوراق سيرسك (*Annona muricata Linn.*)، الزيوليت NaX، الإشباع الجاف، خلايا سرطان الثدي T47D، طريقة MTT

نعلبأن أوراق سيرسك (*Annona Muricata Linn.*) لها نشاط مضاد للسرطان في المختبر. في هذا البحث سيتم إجراء تجزئة وعزل استيتونجين من أوراق سيرسك على زيوليت NaX. تم اختبار نتائج التطوير لنشاط مضاد للسرطان على خلايا سرطان الثدي T47D.

استخراج تعطيل من أوراق سيرسك باستخدام 95% من الإيثانول، واستخلاص السائل مع خليط من ثنائي كلورو ميثان: المياه تليها ن هكسان: الميثانول. فصل مع KLTA لمعرفة أفضل الشفاف والفصل مع KLTP للحصول على العزلات باستخدام الشفاف الميثانول: ثنائي كلورو ميثان (1:19). تم تنفيذ جزء من الميثانول وعزله على زيوليت NaX باستخدام طريقة التشريب الجاف بنسبة 5:10. تم تحليل نجاح التطوير باستخدام مقياس الطيف الضوئي FTIR. إن طريقة اختبار النشاط المضاد للسرطان المستخدمة هي طريقة MTT (تربازوليم ميكروية) القائمة على التفاعلات اللونية.

أظهرت نتائج مقياس الطيف الضوئي FTIR أن عينة الميثانول: جزء الزيوليت، قمم الامتصاص الجديدة ظهرت عند الموجة رقم $2909,881 \text{ cm}^{-1}$ لمجموعة $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ (الامتداد) و $2851,383 \text{ cm}^{-1}$ لمجموعة $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ (الامتداد). العينة المعزولة: الزيوليت، ظهرت ذروة الامتصاص الجديدة عند الموجة $2935,178 \text{ cm}^{-1}$ لمجموعة $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ (الامتداد) و $2851,383 \text{ cm}^{-1}$ لمجموعة $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ (الامتداد). يظهر مظهر امتصاص جديد أن المركب قد تسجل الدخول في الزيوليت. كانت قيمة IC_{50} التي تم الحصول عليها من العينة الناتجة عن تطوير جزء الميثانول والعزل في زيوليت NaX $125,683 \mu\text{g/mL}$ و $103.514,217 \mu\text{g/mL}$.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan dipercaya oleh masyarakat sebagai obat yang berkhasiat dalam penyembuhan maupun mencegah berbagai penyakit. Salah satunya tumbuhan sirsak (*Annona Muricata* L.) sebagai obat antikanker. Ekstrak daun sirsak dapat digunakan sebagai obat tradisional yang lebih aman, karena efek samping yang dihasilkan relatif lebih kecil dibandingkan dengan obat-obat modern. Beberapa efek samping akibat konsumsi obat modern setelah melakukan terapi kanker seperti operasi, kemoterapi, maupun radioterapi yaitu pembengkakan, lelah, muntah, dan sakit kepala (Gavamukulya, dkk., 2014).

Kemampuan daun sirsak sebagai antikanker disebabkan karena adanya senyawa aktif asetogenin yang merupakan *inhibitor* kuat dari kompleks I mitokondria atau NADH *dehidrogenase*, sehingga dapat mengakibatkan penurunan produksi ATP (Alali, dkk., 1999). Proses pengambilan senyawa asetogenin dalam daun sirsak dapat dilakukan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Kelebihan dari metode maserasi yaitu mudah, sederhana, dan dapat mengurangi resiko kerusakan senyawa yang tidak tahan panas (Rachmani, dkk., 2012). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Gavamukulya, dkk., (2014), ekstrak etanol daun sirsak mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara MDA dan SKBR3 dengan nilai IC_{50} 248,77 μ g/ mL dan 202,33 μ g/ mL. Laila (2016) juga melakukan penelitian yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol

daun sirsak mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} 240,165 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Senyawa aktif asetogenin dapat dipisahkan dari ekstrak kasar hasil maserasi dengan perlakuan fraksinasi. Fraksi(ekstrak hasil fraksinasi) daun sirsak memiliki aktivitas sitotoksik lebih besar daripada ekstrak hasil maserasi. Hal ini didukung oleh penelitian Rachmani, dkk., (2012) yang menunjukkan bahwa fraksi metanol daun sirsak mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} 44,987 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pemisahan senyawa asetogenin dapat dilanjutkan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Kelebihan dari metode KLT yaitu teknik pemisahannya sederhana, waktu dan biaya yang dibutuhkan lebih sedikit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Katrin, dkk., (2013) menunjukkan bahwa isolasi senyawa asetogenin dari daun sirsak menggunakan campuran eluen n-heksana: etil asetat (6:4) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210 dengan nilai IC_{50} 0,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Pernyataan tersebut membuktikan bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT memiliki manfaat dan tidak ada yang sia-sia. Hal ini terkandung dalam surat As-saad ayat 27 seperti di bawah ini (Shihab, 2002):

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ (٢٧)

Artinya: “Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah, yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir maka celakalah orang-orang kafir itu, karena mereka akan masuk neraka.” (QS.Saad ayat: 27).

Menurut tafsir Al-Mishbah, di dalam ayat ini terdapat petunjuk dari Allah SWT yang menerangkan bahwa langit dan bumi dan apa yang ada diantara

keduanya seperti udara, tanah, bebatuan, mineral, dan lain-lain tidak ada yang sia-sia tanpa hikmah. Jika ada yang menyatakan seperti itu, maka hanyalah anggapan orang kafir saja (Shihab, 2002). Oleh sebab itu, manusia diharuskan untuk selalu berfikir dan mengeksplorasi manfaat dari segala ciptaan Allah SWT.

Zeolit yang merupakan mineral anorganik juga dapat berperan di bidang medis. Salah satunya zeolit NaX dengan rumus senyawa $\text{Na}_{86}[(\text{AlO}_2)_{86}(\text{SiO}_2)_{106}].264\text{H}_2\text{O}$ sebagai *Drug Delivery System* (DDS) atau sistem pembawa obat. Hal ini disebabkan karena zeolit memiliki struktur dan komposisi yang teratur dengan pori dan luas permukaan yang besar (Kwakye, 2008). Zeolit sebagai DDS akan mengontrol laju pelepasan obat yang ditujukan pada sel kanker itu sendiri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Spanakis, dkk., (2013) menunjukkan bahwa pengembanan obat kanker 5-fluorouracil pada zeolit NaX lebih efisien 16,18% dibandingkan dengan zeolit BEA yaitu 6,02%.

Pengembanan pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode impregnasi. Berdasarkan volume larutan prekursor yang digunakan, impregnasi dibedakan menjadi dua yaitu impregnasi basah dan impregnasi kering. Laila (2016) telah melakukan penelitian tentang kombinasi ekstrak etanol hasil maserasi daun sirsak dengan zeolit NaX (5:10) menggunakan metode impregnasi basah menghasilkan nilai IC_{50} 71.076, 923 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sementara itu, Lilbaiq (2017) mengombinasikan ekstrak hasil maserasi daun sirsak dengan zeolit NaX (5:10) menggunakan metode impregnasi kering menghasilkan nilai IC_{50} 67,343 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan metode impregnasi kering lebih efektif dalam menghambat sel kanker.

Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker payudara T47D. Kelebihan dari sel kanker tersebut yaitu penanganannya mudah, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi, dan mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (CCRC., 2009). Sedangkan uji aktivitas antikanker dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Uji MTT digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} yaitu menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Kelebihan dari metode uji MTT yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, dan dapat mengukur sampel dalam jumlah besar.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini akan dilakukan fraksinasi dan isolasi terhadap ekstrak daun sirsak yang selanjutnya diembankan pada zeolit dan dilakukan uji aktivitas kombinasi ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT dengan zeolit NaX dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D secara *in-vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana hasil uji aktivitas ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT daun sirsak yang diembankan pada zeolit NaX dengan perbandingan 5:10 dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui hasil uji aktivitas ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT daun sirsak yang diembankan pada zeolit NaX dengan perbandingan 5:10 dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini antara lain:

1. Sampel daun sirsak (*Annona Mucirata* Linn.) diperoleh di daerah Plaosan, Malang Jawa Timur.
2. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi dengan pelarut etanol 95%.
3. Metode fraksinasi dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan perbandingan pelarut diklorometana: air (1:1) dilanjutkan dengan pelarut n-heksana: metanol (1:1).
4. Isolasi dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Variasi eluen yang digunakan yaitu metanol : diklorometana (1:19), etil asetat: n-heksana (4:6), dan toluen: etil asetat (9:1).
5. Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker payudara T47D dengan medium kultur RPMI.
6. Metode *in-vitro* yang digunakan adalah metode MTT dengan variasi konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 µg/mL.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai kemampuan ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KL yang diembankan pada zeolit NaX sebagai agen antikanker payudara T47D.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sel Kanker Payudara T47D

Kanker payudara merupakan kanker yang berasal dari kelenjar, saluran, dan jaringan penunjang payudara, namun tidak termasuk kulit payudara. Beberapa contoh sel kanker payudara yang telah diketahui yaitu, MCF-7, T47D, BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-231, dan Hs578T. Sel kanker T47D dan MCF-7 adalah sel kanker yang sering digunakan dalam sebuah penelitian. Sel kanker payudara T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Sel T47D sensitif terhadap doksorubisin dan memiliki morfologi seperti sel epitel (CCRC, 2009). Hal tersebut ditunjukkan pada Gambar 2.1



Gambar 2.1Morfologi sel T47D (Dokumen pribadi)

Sel kanker payudara T47D mengekspresikan *reseptor estrogen* (ER positif) dan protein p53 yang telah termutasi. Protein p53 mengalami *missense mutation* pada residu 194 (dalam *zinc-binding* domain L2), sehingga p53

tidak dapat berikatan dengan *response element* pada DNA. Oleh sebab itu, kemampuan p53 dalam meregulasi siklus sel dan memacu apoptosis akan berkurang bahkan dapat hilang. Sel T47D berbeda dengan sel kanker payudara lain seperti sel MCF-7 yang merupakan sel kanker payudara dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun dengan golongan darah O dan Rh positif. Sel MCF-7 tergolong dalam *cell line adherent* yang mengekspresikan *reseptor estrogen alfa* (ER- α), resisten terhadap doksorubisin, dan tidak mengekspresikan *caspase-3* (CCRC, 2009).

2.2 Senyawa Aktif Asetogenin dalam Daun Sirsak Sebagai Obat Antikanker

Nama sirsak (*Annona muricata* L.) berasal dari bahasa Belanda “*Zuurzak*” yang berarti kantung yang asam. Tanaman ini tumbuh dengan baik pada daerah yang mempunyai ketinggian kurang dari 1000 meter di atas permukaan laut. Menurut Kurniasih, dkk., (2015), kedudukan taksonomi dari tanaman sirsak yaitu:

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Divisi</i>	: <i>Spermatophyta</i>
<i>Sub Divisi</i>	: <i>Angiospermae</i>
<i>Class</i>	: <i>Dicotyledonae</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Polycarpiceae</i>
<i>Family</i>	: <i>Annonaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Annona</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Annona muricata</i> Linn.

Annona muricata L. merupakan tanaman dari famili *annonaceae* dengan tinggi pohon sekitar 3-8 meter. Morfologi dari tanaman sirsak yaitu batang coklat berkayu, bulat, dan bercabang. Daun memanjang berbentuk lanset atau bulat telur terbalik dengan ujung runcing dan pendek. Daging buah sirsak berwarna putih dan berbiji hitam. Akarnya berwarna coklat muda, bulat, dan berakar tunggang (CCRC, 2009). Gambar tanaman sirsak dapat dilihat pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Daun sirsak (Gavamukulya,dkk., 2014)

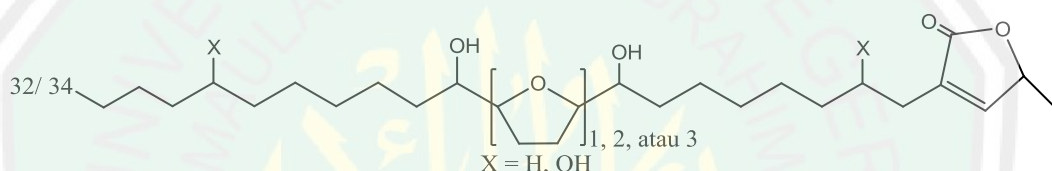
Tanaman sirsak merupakan salah satu bentuk sumber daya alam sebagai nikmat dan karunia Allah SWT yang bisa dieksploitasi dan dioalah manusia untuk mendukung kelangsungan hidupnya dan keperluan makhluk-makhluk lain. Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT yang terkandung dalam surat Al- Baqarah ayat 22 (Utami, 2008):

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ فِرَاشًا وَالسَّمَاءَ بِنَاءً وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجَ بِهِ مِنَ الثَّمَرَاتِ رِزْقًا لَّكُمْ
فَلَا تَجْعَلُوا لِلَّهِ أَنْدَادًا وَأَنْتُمْ تَعْلَمُونَ (٢٢)

Artinya: “ Dialah yang menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu dan langit sebagai atap, dan Dia menurunkan air (hujan) dari langit, lalu Dia menghasilkan dengan hujan itu segala buah-buahan sebagai rezki untukmu; karena itu janganlah kamu mengadakan sekutu-sekutu bagi Allah padahal kamu mengetahui”. (QS. Al- Baqarah; 22)

Ayat-ayat diatas menerangkan bahwa Allah menciptakan langit dan bumi sebagai tempat yang penuh karunia dan penuh keindahan, sehingga manusia harus mampu mengkaji alam sesuai dengan kemampuan masing-masing. Hal ini bertujuan untuk menggali ilmu Allah dan meningkatkan keyakinan akan keberadaan-Nya (Utami, 2008).

Semua bagian tanaman sirsak (daun, biji, batang, akar, dan daun) mengandung banyak senyawa kimia yang aktif secara biologi yaitu *annonaceous acetogenin* (Pradana, dkk., 2015). Asetogenin merupakan turunan dari asam lemak dengan struktur 32/ 34 rantai karbon yang ditambahkan dua unit propanol untuk membentuk γ -lakton. Selain itu, asetogenin mengandung satu atau lebih gugus hidroksil, asetil karbonil, dan cincin tetrahidrofuran (THF). Struktur dari *Annonaceae acetogenins* dapat dilihat pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Struktur umum *Annonaceae acetogenins* (Gorman, 2006)

Senyawa asetogenin telah lama diteliti dan terbukti bersifat antivirus, antiparasit, insektisida, anticacing, antibakteri, dan antikanker. Beberapa turunan senyawa asetogenin yang mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 yaitu, annomuricin A, annomuricin B, annomuricin C, dan muricatocin C (Moghadamtousi, dkk., 2015). Menurut Alali, dkk., (1999) asetogenin mampu mendeteksi dan membedakan antara sel normal dan sel kanker, sehingga dapat menghambat dan membunuh sel kanker secara selektif. Perbedaan sel kanker dan sel normal didasarkan pada kebutuhan sel akan ATP (*Adenosine Trifosphate*). Sel kanker bergerak, tumbuh, membelah lebih cepat dan aktif dibandingkan sel normal, sehingga sel kanker membutuhkan energi ATP yang lebih tinggi. Asetogenin menyerang sel kanker dengan cara masuk ke dalam sel

dan menempel pada dinding sebelah dalam mitokondria (organ di dalam sel yang berfungsi sebagai tempat memproduksi energi ATP bagi sel). Kemudian asetogenin memblok produksi energi ATP di dalam mitokondria sel kanker, sehingga asupan energi untuk sel kanker akan terputus, sel kanker menjadi lemah dan akhirnya mati.

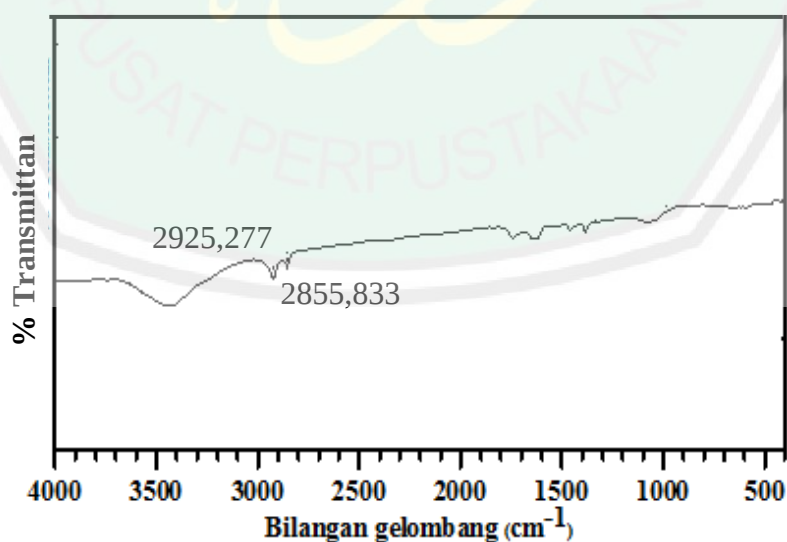
2.3 Metode Ekstraksi Maserasi dan Fraksinasi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu zat yang didasarkan pada perbedaan kelarutan. Salah satu metode ekstraksi yang sering digunakan yaitu maserasi. Maserasi merupakan perendaman serbuk simplisia dengan waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstrak. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam proses maserasi yaitu, jenis pelarut, volume pelarut, berat sampel, dan lama perendaman. Pemilihan pelarut didasarkan atas kepolaran dari senyawa bahan alam yang akan diekstrak. Sementara itu, banyaknya volume pelarut, berat sampel dan lamanya perendaman berbanding lurus dengan hasil yang diperoleh (Hermawan dan Laksono, 2013). Menurut Kurniasih, dkk., (2015) ekstraksi beberapa kali dengan pelarut yang lebih sedikit akan lebih efektif dibandingkan dengan ekstraksi satu kali dengan semua pelarut sekaligus.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Hermawan dan Laksono (2013) tentang variasi pengeringan bahan dan tanpa pengeringan, waktu maserasi satu dan dua hari, berat sampel 4 dan 7 gram, serta jenis pelarut etanol dan n-heksana menunjukkan bahwa hasil keempat variabel bebas tersebut memberikan pengaruh yang positif dengan menghasilkan kondisi optimum pada proses ekstraksi 7 gram menggunakan pelarut etanol dengan pengeringan dan waktu ekstraksi 2 hari.

Perlakuan yang dapat dilakukan setelah maserasi yaitu fraksinasi (ekstraksi cair-cair). Fraksinasi merupakan pemisahan komponen kimia diantara dua fase pelarut yang tidak dapat saling bercampur, dimana sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagian lain larut pada fase kedua. Ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah dilakukan dengan pengocokan, kemudian didiamkan hingga terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair. Senyawa kimia akan terpisah dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya (Kurniasih, dkk., 2015).

Lilbaiq (2017) mendeteksi gugus fungsi ekstrak daun sirsak menggunakan FTIR menghasilkan serapan pada $3100-3600\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus O-H alkohol. Rantai C-H yang tidak simetris ditunjukkan pada bilangan gelombang $2925,277\text{ cm}^{-1}$ dan $2855,833\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan C-H simetris. Spektra FTIR hasil ekstraksi daun sirsak ditunjukkan pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Spektra FTIR ekstrak hasil maserasi daun sirsak (Lilbaiq, 2017)

2.4 Kromatografi Lapis Tipis

Prinsip kromatografi lapis tipis adalah pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi diantara dua fase yaitu, fase diam dan fase gerak yang menyebabkan terjadinya perbedaan migrasi dari masing-masing komponen. Fase diam dapat berupa silika atau alumina yang dilapiskan pada lempeng kaca atau aluminium. Sementara itu, fase gerak atau larutan pengembang yang biasa digunakan adalah pelarut organik. Keuntungan dari metode analisis kromatografi lapis tipis yaitu, teknik pemisahannya sederhana dengan peralatan yang minimal dan analisis beberapa sampel dapat dilakukan dengan fase gerak dalam jumlah kecil. Sehingga, waktu dan biaya yang dibutuhkan lebih sedikit serta lebih ramah lingkungan (Wulandari, 2011).

2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Kromatografi lapis tipis analitik bertujuan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa variasi yang digunakan. Eluen yang baik dapat memisahkan senyawa yang ditandai dengan munculnya noda tidak berekor dan jarak antara noda terlihat jelas. Noda akan dideteksi menggunakan pereaksi yang sesuai dengan golongan senyawa yang dipisahkan. Pereaksi ini memberikan sebuah kepekaan dan perubahan warna yang ada kaitannya dengan struktur senyawanya jika diamati di bawah lampu UV (Wulandari, 2011).

Beberapa variasi eluen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metanol: diklorometana, dapat menunjukkan adanya perubahan warna salah satu noda pada plat KLT menjadi merah muda pucat setelah disemprot dengan reagen kedde. Hal ini menandakan bahwa noda tersebut merupakan asetogenin (Pradana, dkk., 2015). Katrin, dkk., (2013) menggunakan campuran eluen etil asetat: n-heksana

muncul 5 noda terpisah dan menunjukkan adanya perubahan warna pada salah satu noda menjadi merah muda keunguan setelah disemprot dengan reagen serium sulfat 1% dalam H_2SO_4 10%. Sementara itu, Rajsekhar, dkk., (2016) menggunakan campuran toluena: etil asetat dapat menghasilkan 6 noda yang terpisah dengan baik.

2.4.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Pemisahan senyawa asetogenin dilakukan dengan plat silika gel $\text{G}_{60}\text{F}_{254}$ menggunakan eluen terbaik dari hasil KLTA. Plat yang sudah dielusi akan diamati di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pada panjang gelombang 254 nm plat akan berfluoresensi, sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap. Hal tersebut disebabkan karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada plat KLT. Pada panjang gelombang 366 nm, noda akan berfluoresensi dan berwarna terang, sedangkan plat KLT akan berwarna gelap. Hal tersebut disebabkan karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh aoksokrom yang ada pada noda tersebut. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kembali ke keadaan semula dengan melepaskan energi (Wulandari, 2011).

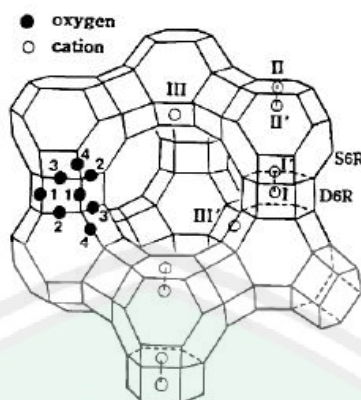
Identifikasi senyawa-senyawa yang terpisah dapat dilakukan dengan membandingkan nilai R_f dengan nilai standar. Nilai R_f dapat dipengaruhi oleh struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat plat silika dan derajat aktivitasnya, tebal dan kerataan plat silika, tingkat kemurnian eluen, derajat kejenuhan dan uap dalam bejana pengembang, teknik percobaan, jumlah cuplikan

sampel yang digunakan tidak berlebihan serta suhu. Rupprecht, dkk., (1990) menyatakan bahwa senyawa asetogenin pada daun sirsak memiliki nilai R_f antara 0.2-0.7, ketika direaksikan dengan reagen vanilin dan dilakukan pengamatan di bawah lampu UV 254 serta 366 nm akan menghasilkan warna oranye.

2.5 Potensi Zeolit NaX Sebagai Pengemban Obat Antikanker

Zeolit merupakan mineral kristal aluminosilikat yang mempunyai struktur kerangka tiga dimensi terbentuk dari tetrahedral $[AlO_4]^{5-}$ dan $[SiO_4]^{4-}$ yang dihubungkan oleh atom-atom oksigen. Zeolit dibedakan menjadi dua yaitu, zeolit alam dan zeolit sintetis. Zeolit sintetis adalah zeolit yang dibuat secara rekayasa dengan sedemikian rupa sehingga didapatkan karakter yang lebih baik dari zeolit alam. Salah satunya yaitu zeolit NaX yang termasuk dalam jenis faujasit (FAU) dengan kation penyeimbang berupa ion Natrium (Na^+). Zeolit NaX dibuat dari *Secondary Building Units* (SBU) yaitu unit 4 dan 6 (Kwakye, 2008).

Zeolit X memiliki diameter α -cage (*supercage*) 13 Å dan diameter β -cage (kerangka sodalit) 6,6 Å dengan diameter pori 7,4 Å membentuk struktur tiga dimensi dengan rasio Si/Al 1,0 – 1,5. Zeolit NaX mempunyai diameter pori yang berstruktur bangun oktahedral pada titik I, II dan III. Hal ini menunjukkan posisi dari kation natrium yang dapat bertukar ion dan dapat berpindah dengan adanya ion lain seperti Gambar 2.5



Gambar 2.5 Kerangka zeolit NaX (Kwaky, 2008)

Perkembangan studi telah menunjukkan bahwa zeolit memiliki kemampuan sebagai sistem pembawa obat atau *Drug Delivery System* (DDS). Hal ini disebabkan karena zeolit memiliki bentuk dan komposisi pori yang teratur dengan rongga dan saluran. Molekul obat yang terdapat didalam pori maupun menempel pada permukaan dapat berdifusi keluar dari sistem saluran secara perlahan, sehingga dapat mengontrol laju pelepasan obat. Pelepasan obat yang terkontrol dapat meningkatkan efisiensi obat dan mengurangi efek samping. Selain itu, zeolit mampu menjaga stabilitas obat antikanker tanpa terjadi modifikasi molekular hingga bertemu dengan sel tumor (Spanakis, dkk., 2013).

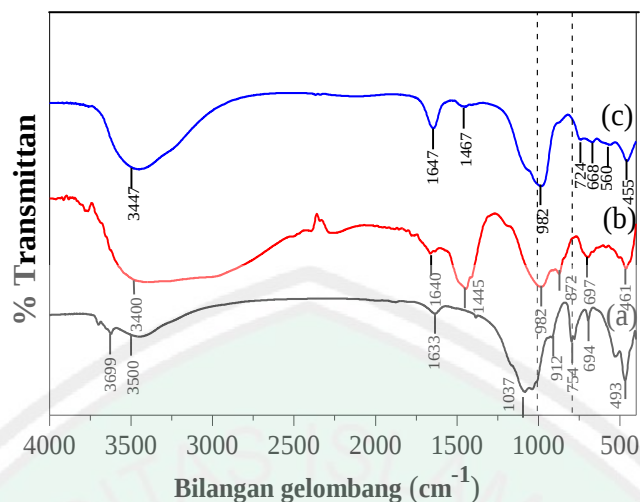
Kontribusi zeolit di berbagai bidang merupakan salah satu hasil usaha manusia yang mampu berpikir dan memanfaatkan ciptaan Allah secara terperinci dan sedalam mungkin. Sebagai manusia yang bertakwa kepada Allah, manusia hendaknya selalu memperhatikan, merenungkan, dan memikirkan segala bentuk ciptaan-Nya baik di langit maupun di bumi, seperti firman Allah SWT dalam surah ke-10 Yunus, ayat 101 (HK, Tjasyono dan Syukur., 2014):

قُلْ انظُرُوا مَاذَا فِي السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَمَا تُعْطِي الْآيَاتُ وَالنُّذُرُ عَنْ قَوْمٍ لَا يُؤْمِنُونَ (١٠١)

Artinya: “*Katakanlah: Perhatikanlah apa yang ada di langit dan bumi. Tidakkah bermanfaat tanda kekuasaan Allah dan rasul-rasul yang member peringatan bagi orang-orang yang tidak beriman.*”

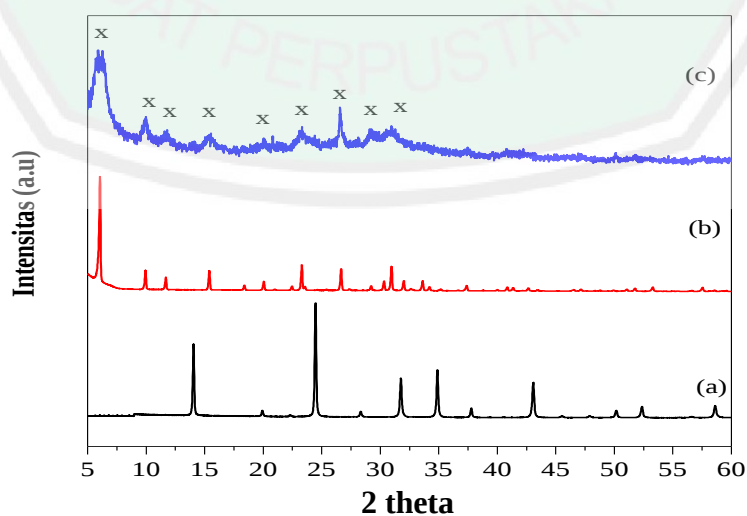
Al-Quran dapat digunakan sebagai sumber ilmu pengetahuan (sains) dan sebagai sumber informasi. Seperti halnya ayat ini yang mendorong manusia untuk memikirkan kajian-kajian tentang langit dan bumi melalui disiplin ilmu astronomi, geologi, meteorologi, sains atmosfer, sains kebumihan dan sebagainya (HK, Tjasyono dan Syukur., 2014).

Rimoli, dkk. (2007) telah melakukan penelitian tentang sintesis zeolit NaX sebagai pengemban senyawa antikanker ketoprofen menggunakan proses perendaman. Hasil yang diperoleh cukup efektif tanpa memberikan efek samping. Obat yang diembankan tidak merubah struktur zeolit dan obat tersebut juga dapat dipertahankan integritas molekulnya. Penentuan gugus fungsi suatu senyawa dapat dilakukan dengan spektroskopi inframerah (FTIR) yang didasarkan pada spektra absorpsi sinar inframerah. Pada umumnya, zeolit mempunyai daerah serapan di sekitar bilangan gelombang 1200-300 cm^{-1} . Vibrasi Si-O dan Al-O berada pada bilangan gelombang sekitar 1100 cm^{-1} dan 700 cm^{-1} yang merupakan *finger print* dari zeolit. Vibrasi ulur asimetri dari Si-O dan Al-O pada kerangka alumina silika berada pada rentang bilangan gelombang 1250-950 cm^{-1} . Sedangkan vibrasi ulur simetri muncul pada daerah serapan sekitar 820-750 cm^{-1} (Kwakye, 2008). Pada penelitian ini digunakan sampel hasil sintesis dari laboratorium anorganik UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Adapun hasil analisis FTIR sampel dapat dilihat pada Gambar 2.6



Gambar 2.6 Hasil analisa FTIR (a) Kaolin Bitar (b) Metakaolin (c) Zeolit NaX dengan suhu hidrotermal 100°C selama 2 jam (Fitriana, 2018)

Spektra diatas menunjukkan adanya serapan kuat pada bilangan gelombang 982 cm^{-1} yang merupakan ciri khas dari zeolit. Karakterisasi zeolit dapat dilanjutkan dengan metode difraksi sinar-X (XRD). Informasi yang didapat berupa kemurnian atau perubahan parameter kisi dari suatu kristal. Berikut difraktogram zeolit NaX sintesis dari Lab. anorganik UIN Malang ditunjukkan pada Gambar 2.7



Gambar 2.7 Pola difraksi sinar-X (a) standar zeolit sodalit, (b) standar zeolit NaX, (c) zeolit NaX dengan suhu hidrotermal (x: zeolit NaX) (Fitriana, 2018)

Kemurnian zeolit NaX hasil sintesis dapat diketahui dengan membandingkan nilai sudut 2θ dan intensitasnya dengan zeolit X standar. Perbandingan sudut 2θ standar dengan zeolit hasil sintesis diatas dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Data hasil perbandingan 2 theta (Treacy dan Higgins, 2001)

Zeolit X Standar ($^{\circ}2\theta$)	Zeolit X Sampel ($^{\circ}2\theta$)
6.31	5.7450
10,31	6.4133
15.92	9.9711
19.01	11.7035
20.71	15.4496
21.98	20.0849
23.19	20.8062
24.06	23.2561
24.06	26.5535
26,24	29.1618
27.52	30.9676
30.16	37.4024
31.29	40.9428
31.95	50.1520

2.6 Uji Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro* dengan Metode MTT

Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam tetrazolium MTT berwarna kuning membentuk kristal formazan berwarna ungu oleh sistem reduktase. Reagen MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) merupakan garam tetrazolium yang larut dalam air. MTT akan diserap ke dalam sel dan masuk dalam sistem respirasi sel di mitokondria. Enzim mitokondria akan memetabolisme garam tetrazolium, sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut air, tetapi larut dalam SDS 10% dan berwarna ungu.

Formazan yang terbentuk berwarna ungu sebanding dengan jumlah sel hidup. Sementara itu, sel yang mati dilarutkan dalam air dan tetap berwarna kuning karena mitokondria sel yang mati bukanlah respirasi cincin tetrazolium yang terputus, sehingga tidak bisa mengurangi reagen MTT menjadi formazan. Hal ini disebabkan karena sel yang mati tidak akan terpengaruh oleh reagen MTT. Sel yang masih hidup memiliki bentuk bulat dengan dinding sel yang terlindungi dan bersinar serta menempel di pelat bawah, sedangkan sel yang mati berwarna gelap dan tidak menempel pada pelat dasar (Rachmani, dkk., 2012).

Setelah diinkubasi selama 4 jam dengan penambahan MTT, reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) dalam 10% HCl. SDS 10% bersifat detergenik sehingga dapat melarutkan kristal formazan dan hasil reaksi MTT tidak menimbulkan pengendapan. Kristal formazan kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISAreader pada panjang gelombang 595 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum untuk mendapatkan pengukuran sensitif dan spesifik (Rachmani, dkk., 2012).

Uji MTT digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} yang menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa dalam menghambat proliferasi sel kanker sebesar 50%. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Menurut *National Cancer Institute* (NCI) (2001), suatu ekstrak dianggap toksik terhadap sel kanker jika memiliki nilai $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$, moderate aktif apabila memiliki nilai $30 \mu\text{g/ml} \leq IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$, dan tidak aktif apabila memiliki nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Katrin, dkk., (2013) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dengan metodi uji MTT menghasilkan nilai IC_{50} 7,36 $\mu\text{g/ml}$ pada sel kanker leukemia L1210.

2.7 Analisis dengan *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Reader*

ELISA merupakan tes cepat yang dapat mendeteksi dan mengukur antibodi atau antigen. *ELISA reader* digunakan untuk menentukan komponen zat warna atau komponen yang belum berwarna dengan menggunakan pewarna reagen yang sesuai. Reagen yang digunakan dalam metode ini adalah reagen MTT (Crowther, 2001).

Output data dari *ELISA reader* berupanilai absorbansi yang menunjukkan jumlah sel aktif yang melakukan metabolisme, sehingga berhubungan dengan kehidupan sel. Semakin besar nilai absorbansi maka semakin banyak jumlah sel yang hidup. Oleh sebab itu, dapat diketahui potensi sampel dalam menghambat kanker. Hasil kuantitatif dari proses *ELISA reader* berupa besaran konsentrasi dan nilai adsorpsi (y) pada sampel. Pengukuran y pada hasil *ELISA reader* prinsipnya sama dengan spektrofotometer. Intensitas cahaya yang diserap oleh sampel pada panjang gelombang tertentu berbanding lurus dengan besar nilai y . Jika semakin banyak intensitas cahaya yang diserap, maka semakin besar nilai y . Semakin kecil nilai intensitas cahaya yang diserap, semakin kecil pula nilai y (Crowther, 2001).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - Desember 2018 di Laboratorium Kimia Organik dan Kimia Analitik Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Protho, Parasitologi Jurusan Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, pensil, penggaris, neraca analitik, klem dan statif, oven, erlenmeyer vakum, gilingan, ayakan 80 mesh, penjepit kayu, loyang, corong pisah, kertas saring, aluminium foil, *tissue*, *stirrer*, penyaring *buchner*, *shaker incubator*, *rotary evaporator vaccum*, pipa kapiler, bejana pengembang, plat KLT silika G₆₀F₂₅₄, sentrifuge, botol vial, mikropipet 10, 100, dan 1000 μ L, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, *vortex*, *conical tube*, *yellow tip*, *blue tip*, *culture dish*, *96-well plate*, *hemocytometer*, *ELISA reader*, dan *Fourier Transform Infra-Red (FTIR)*.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak, zeolit NaX sintesis, etanol 95%, aquades, metanol, diklorometana, n-heksana, etil asetat, toluena, reagen vanillin, PBS, tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25 %), media

kultur RPMI, DMSO, MTT 5 mg/ mL (50 mg MTT dan 10 mL PBS), dan SDS 10 %, dan padatan KBr.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan preparasi sampel daun sirsak (*Annona Muricata* Linn.), kemudian diekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 95% selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* sehingga didapatkan sampel ekstrak pekat hasil maserasi. Selanjutnya dilakukan fraksinasi sebanyak dua kali pengulangan dengan variasi pelarut yang berbeda. Pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* dan diperoleh ekstrak pekat hasil fraksinasi.

Ekstrak hasil fraksinasi dilakukan pemisahan dan pemurnian menggunakan KLTP dengan pelarut terbaik hasil KLTA, sehingga diperoleh isolat hasil KLT. Isolat dan sisa ekstrak hasil fraksinasi dikombinasikan dengan zeolit NaX menggunakan metode impregnasi kering. Campuran distirer selama 48 jam sampai homogen. Sampel hasil impregnasi diuji aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode MTT (secara *in-vitro*) dan di analisis menggunakan spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR).

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Proses ekstraksi dan fraksinasi senyawa asetogenin dari daun sirsak
3. Pemisahan senyawa asetogenin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

4. Pengembangan ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT pada zeolit NaX
5. Karakterisasi hasil pengembangan menggunakan FTIR
6. Uji aktivitas antikanker dengan metode MTT
7. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

Diambil sampel daun sirsak (warna hijau pekat) dalam kondisi baik dan bebas hama pada urutan ke-4 hingga ke-6 dari pucuk batang. Dicuci hingga bersih untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel pada daun. Dipotong kecil-kecil dan dikeringanginkan pada suhu ruang agar senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirsak diharapkan tidak rusak dan terhindar dari perkembangbiakan mikroba. Dihaluskan hingga berbentuk serbuk, kemudian diayak dengan ayakan 80 mesh untuk meningkatkan luas permukaan, sehingga dapat memudahkan proses ekstraksi.

3.5.2 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi Senyawa Asetogenin Dari Daun Sirsak (Pradana, dkk., 2015)

Serbuk sirsak ditimbang 60 gr dan dimasukkan dalam 3 erlenmeyer masing-masing 20 gr. Direndam dengan 140 mL pelarut etanol 95% pada setiap erlenmeyer selama 24 jam dan di-shaker selama 3 jam untuk memaksimalkan proses ekstraksi dengan bantuan pengadukan. Disaring menggunakan corong Buchner dan ampasnya direndam kembali dengan pelarut etanol 95% 140 mL hingga 3 kali pengulangan. Digabung ketiga filtrat dan dipekatkan dengan rotary evaporator vacuum pada suhu 60°C selama 5-6 jam untuk mempercepat laju penguapan.

pelarut. Selanjutnya, ditimbang dan dihitung rendemen ekstrak hasil maserasi dengan persamaan 3.1

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak hasil maserasi}}{\text{Berat sampel (serbuk daun sirsak)}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.1)$$

Diambil 3 grekstrak dan difraksinasi dengan campuran diklorometana dan air (1:1). Dikocok selama 15 menit kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yang tidak saling bercampur. Diambil filtrat diklorometana dan difraksinasi kembali menggunakan n-heksana dan metanol (1:1). Dikocok selama 15 menit kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan kembali. Diambil filtrat metanol kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum* untuk menghilangkan metanol. Ekstrak hasil fraksinasi yang diperoleh ditimbang dan dihitung randemennya dengan persamaan 3.2

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak hasil fraksinasi}}{\text{Berat sampel (ekstrak hasil maserasi)}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.2)$$

3.5.3 Pemisahan Senyawa Asetogenin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Wulandari, 2011)

3.5.3.1 Pemisahan Menggunakan KLT Analitik

Tahap-tahap pemisahan senyawa asetogenin dengan metode KLT Analitik meliputi:

1. Persiapan Plat KLT

Plat KLT yang digunakan adalah plat silika G₆₀F₂₅₄ berukuran 1x10 cm sebagai fasa diam. Kemudian diberi penanda garis pada tepi bawah plat dengan jarak 1 cm sebagai posisi penotolan sampel dan 1 cm pada tepi atas plat untuk

menunjukkan batas dari proses elusi. Plat silika diaktivasi dengan cara di oven pada suhu 100°C selama 30 menit.

2. Persiapan Fase Gerak (Eluen)

Masing-masing eluen dimasukkan dalam bejana (*great chamber*) kemudian dijenuhkan terlebih dahulu selama 1 jam dan ditutup rapat untuk mempermudah proses elusi dengan adanya tekanan uap dari pelarut. Beberapa variasi eluen yang digunakan dalam proses KLTA meliputi metanol: diklorometana (1:19), etil asetat: n-heksana (4:6), dan toluena: etil asetat (9:1).

3. Penotolan Sampel

Dibuat larutan ekstrak hasil fraksinasi 10.000 ppm dan ditotolkan pada plat KLT dengan jarak 1 cm dari tepi bawah plat. Penotolan dilakukan dengan pipa kapiler sebanyak 10 kali di tempat yang sama dan disertai pengeringan antar totolan untuk menghindari penurunan resolusi serta timbulnya bercak yang menyebar.

4. Proses Elusi

Ekstrak hasil fraksinasi yang telah ditotolkan pada plat KLT dielusi dengan masing-masing fasa gerak hingga larutan pengembang (eluen) mencapai batas 1 cm dari tepi atas plat. Plat KLT diangkat dan dikeringanginkan.

5. Identifikasi Noda

Noda-noda yang terbentuk pada plat silika diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm untuk memunculkan komponen senyawa sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi. Noda yang tampak ditandai dengan pensil. Plat disemprot dengan reagen vanilin dan dioven pada suhu 70°C selama 5 menit, kemudian diamati kembali dibawah sinar UV. Jika

terbentuk warna oranye, maka isolat tersebut positif asetogenin. Diamati bentuk masing-masing noda dan dihitung nilai Rf-nya menggunakan persamaan 3.3. Eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik digunakan untuk keperluan preparatif.

$$R_f = \frac{\text{Jarak rambat suatu senyawa tertentu}}{\text{Jarak rambat fasa gerak yang diukur dari penotolan}} \dots\dots\dots (3.3)$$

3.5.3.2 Pemisahan Menggunakan KLT Preparatif

Pemisahan pada KLT preparatif menggunakan plat silika G₆₀F₂₅₄ berukuran 10x10 cm. Dibuat ekstrak hasil fraksinasi 10.000 ppm dan ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah menggunakan pipa kapiler sebanyak 10 kali penotolan. Kemudian dielusi menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik. Spot yang terbentuk pada permukaan plat disinari dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Dihitung nilai Rf dan dibandingkan dengan Rf hasil KLTA, kemudian dikerok dan dilarutkan dalam etanol. Disentrifugasi untuk mengendapkan silika hingga plat silika berwarna putih. Supernatan yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan cara didiamkan pada suhu ruang.

3.5.4 Pengembanan Ekstrak Hasil Fraksinasi dan Isolat Hasil KLT pada Zeolit NaX

Zeolit diaktivasi terlebih dahulu pada suhu 105°C selama 4 jam. Selanjutnya ekstrak hasil fraksinasi dan isolat hasil KLT diembankan pada zeolit NaX dengan perbandingan sebagai berikut:

1. Ekstrak hasil fraksinasi 50 mg: zeolit NaX 100 mg (5:10)

2. Isolat hasil KLT7 mg; zeolit NaX 14 mg (5:10)

Masing-masing campuran ditambahkan dengan etanol 3 mL dan distirrer selama 48 jam pada suhu ruang. Dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 4 jam untuk menguapkan pelarut. Diuji aktivitas antikanker menggunakan metode MTT.

3.5.5 Karakterisasi Hasil Pengembanan menggunakan FTIR

Karakterisasi menggunakan FTIR dilakukan terhadap sampel tanpa pengembanan dan sampel hasil pengembanan dengan zeolit NaX. Sampel dihaluskan menggunakan mortar batu agate hingga menjadi serbuk dan dicampur dengan padatan KBr. Kemudian ditempatkan pada preparat dan dipress dengan alat pengepres untuk membentuk pellet. Sampel ditempatkan pada *sample holder* dan dianalisa menggunakan FTIR pada panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} .

3.5.6 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT (CCRC, 2009)

3.5.6.1 Penyiapan Sel

Sel kanker payudara T47D diambil dari koleksi Universitas Gajah Mada (UGM). Sel kanker dikeluarkan dari *freezer* (-80°C). Dihangatkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2–3 menit. Dipindahkan ke dalam *conical tube* yang telah berisi 10 mL medium komplet (MK). Disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan MK (supernatan). Dibuang supernatan dan diambil pelet. Ditambahkan pelet dengan 4 mL MK dan dimasukkan dalam *culture dish*. Diinkubasi pada suhu $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$ selama 3-4 jam. Diamati dibawah mikroskop *inverted* untuk melihat apakah sel

melekat di dasar *culture dish*. Apabila jumlah sel di dalam *culture dish* mencapai 80% (konfluen) dilakukan panen sel.

3.5.6.2 Panen Sel

Tahapan panen sel yakni dibuang medium menggunakan mikropipet kemudian dicuci sel-sel mati sebanyak dua kali dengan PBS. Ditambahkan tripsin-EDTA secara merata untuk melepaskan ikatan antar sel dan menghilangkan kemampuan sel melekat pada dasar *culture dish*. Diinkubasiselama 3 menit dan ditambahkan MK $\pm$ 5 mL untuk menginaktifkan tripsin. Diamatidibawahmikroskopinverteddan diresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol.Diambil sebanyak 10 μ L untuk dilakukan perhitungan sel kanker dan sisanya dimasukkan dalam *conical tube*.

3.5.6.3 Perhitungan Sel Kanker

Diambil 10 μ L panen sel dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Diamati dan dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel kanker dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

Jumlah sel yang terhitung/ mL

$$= \frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4 \dots\dots (3.4)$$

3.5.6.4 Peletakan Sel pada Plate

Peletakan sel pada plate harus diketahui berapa mL jumlah panen sel yang akan diletakkan pada setiap sumuran dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Volume panen sel yang ditransfer} = \frac{\sum \text{total sel yang diperlukan}}{\sum \text{sel terhitung/ mL}} \dots\dots\dots (3.5)$$

Diambil volume panen sel transfer dan dimasukkan dalam *conical tube* baru. Ditambahkan RPMI hingga total volume 10 mL kemudian dihomogenkan. Dimasukkan dalam sumuran plat uji masing-masing 100 μ L. Disisakan enam sumuran bagian bawah untuk kontrol sel dan kontrol media. Diisi sumuran kontrol sel dengan 200 μ L (MK+sel) dan kontrol medium dengan 200 μ L MK. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C/5%CO₂.

3.5.6.5 Pembuatan Larutan Sampel

Ditimbang sampel 10 mg dan dilarutkan dalam 100 μ L DMSO. Diaduk dengan *vortex* agar sampel lebih cepat larut. Didapatkan larutan stok sampel dengan konsentrasi 100.000 μ g/mL. Dibuat seri konsentrasi larutan sampel 500; 250; 125; 62,5; 31,25, dan 15,625 μ g/mL dengan pengenceran larutan stok.

3.5.6.6 Pemberian Larutan Sampel pada *Plate*

Diambil plat uji berisi sel dari inkubator dan dibuang media sel dengan cara dibalikkan plat uji 180° di atas tempat pembuangan. Ditekan plat uji secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Dimasukkan 100 μ L PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel kemudian dibuang PBS dengan cara yang sama. Dimasukkan seri konsentrasi larutan sampel 100 μ L dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Selanjutnya diinkubasi kembali selama 24 jam.

3.5.6.7 Pemberian Larutan MTT

Dibuang media sel dan dicuci dengan PBS. Ditambahkan larutan MTT 100 μ L ke setiap sumuran kecuali kontrol sel. Diinkubasi selama 3–4 jam dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Apabila formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Kemudian ditambahkan *stopper* SDS

10%sebanyak 100 μ L. Dibungkus *plate* dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) selama semalam.

3.5.6.8 Pembacaan Nilai Absorbansi dengan *ELISA Reader*

Dibaca nilai absorbansi dengan *ELISA reader* untuk mengetahui nilai IC_{50} setiap sampel. Dihidupkan *ELISA reader* dan ditunggu hingga *proccessing* selesai. Dibuka pembungkus *plate* kemudian dimasukkan dalam *ELISA reader*. Dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 550–600 nm dan dimatikan kembali *ELISA reader*. Selanjutnya dihitung persentase sel hidup dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.6)$$

Keterangan :

A = absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel)

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur)

Data dari persentase sel hidup kemudian dianalisis untuk mengetahui nilai IC_{50} dengan microsoft excel.

3.5.7 Analisis Data

Potensi sampel dalam menghambat atau membunuh sel kanker payudara T47D dapat diketahui dengan melakukan uji IC_{50} menggunakan analisa *regression linier* di Microsoft Excel untuk masing-masing konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 μ g/mL. Data yang diperoleh merupakan data hubungan antara konsentrasi dengan persentase sel hidup. Kemudian dibuat grafik dengan *chart type scatter*. Dicari persamaan regresi linier dari grafik tersebut

dengan menampilkan *add trendline-regresi linier*. Dimasukkan $y = 50\%$ pada persamaan regresi linier dan cari nilai x -nya sehingga diperoleh harga IC_{50} . Data yang diperoleh dimasukkan dalam tabel data sesuai Tabel 3.1

Tabel 3.1 Tabel data perhitungan persen sel hidup

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi Sampel			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Hasil Maserasi dan Fraksinasi Daun Sirsak

Senyawa aktif asetogenin dalam daun sirsak akan diisolasi melalui tahapan preparasi, ekstraksi maserasi, fraksinasi, dan kromatografi lapis tipis. Hasil preparasi berupa serbuk daun sirsak dengan luas permukaan yang besar, sehingga memudahkan kontak dengan pelarut pada saat ekstraksi berlangsung (Kurniasih, dkk., 2015). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, yaitu metode pemisahan komponen dengan merendam serbuk sampel dalam pelarut yang sesuai. Pelarut yang digunakan adalah etanol 95%. Menurut Hermawan dan Laksono (2013), ekstraksi daun sirsak menggunakan pelarut etanol memiliki kadar fenol lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut n-heksana. Hal ini disebabkan karena etanol mampu memecah dinding sel tanaman dan melarutkan senyawa dengan tingkat kepolaran yang sama. Secara umum, senyawa metabolit sekunder termasuk asetogenin dalam daun sirsak masih terikat pada gugus gulayang bersifat polar, sehingga dapat larut dalam etanol 95%. Hasil maserasi serbuk daun sirsak ditunjukkan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil maserasi daun sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Pelarut	Warna ekstrak	Berat sampel (gram)	Berat ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
Etanol 95 %	Hijau tua	60	9,1346	15,22

Fraksinasi (ekstraksi cair-cair) dilakukan untuk memisahkan asetogenin dari senyawa lain yang terdapat dalam ekstrak hasil maserasi. Pelarut yang digunakan merupakan campuran dari diklorometana dan air kemudian dilanjutkan dengan campuran n-heksana dan metanol. Asetogenin memiliki struktur rantai yang panjang. Namun, pada rantai tersebut terdapat ikatan rangkap dan lakton yang membuat sifat asetogenin menjadi sedikit polar, sehingga mudah larut dalam metanol dibandingkan pada n-heksana (Swari, 2012). Hasil dari proses fraksinasi dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil fraksinasi daun sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Warna ekstrak pekat	Berat sampel	Berat ekstrak pekat (gram)	Rendemen (%)
Hijau kecoklatan	3,0005	1,1895	39,65 %

Ekstrak hasil fraksinasi akan diisolasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis.

4.2 Pemisahan Senyawa Asetogenin dengan Kromatografi Lapis Tipis

Pemisahan senyawa asetogenin dilakukan dengan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) dan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). KLTA bertujuan untuk mencari eluen terbaik dari ketiga variasi yang digunakan. Variasi eluen tersebut meliputi metanol: diklorometana (1:19) menghasilkan 13 spot, etil asetat: n-heksana (4:6) menghasilkan 10 spot, dan toluena: etil asetat (9:1) menghasilkan 5 spot. Eluen terbaik yang digunakan pada proses KLTP adalah metanol: diklorometana (1:19) karena mampu memisahkan senyawa dengan

jumlah terbanyak. KLTP merupakan pemisahan senyawa dalam jumlah lebih besar, sehingga diharapkan senyawa hasil pemisahan diperoleh dalam bentuk murni dan dalam jumlah yang besar. Pemisahan senyawa menggunakan KLTP menghasilkan 18 spot yang ditunjukkan pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Hasil KLTP ekstrak hasil fraksinasi dengan eluen metanol: diklorometana (1:19)

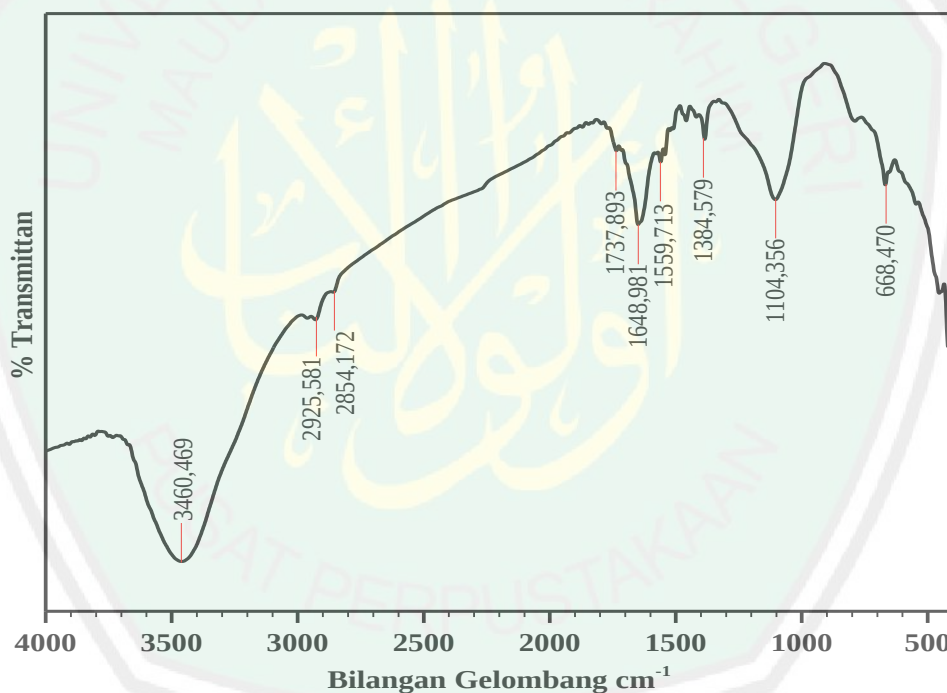
Spot	Nilai Rf	Warna spot dibawah lampu UV pada λ 254 nm	Warna spot dibawah lampu UV pada λ 366 nm	*Rf referensi (0,20-0,70)
1.	0,07	Abu-abu	Merah	-
2.	0,10	Abu-abu	Merah	-
3.	0,18	Abu-abu	Merah keoranyean	-
4.	0,22	Abu-abu	Tidak berwarna	-
5.	0,33	Tidak berwarna	Tidak berwarna	-
6.	0,38	Tidak berwarna	Tidak berwarna	-
7.	0,47	Abu-abu	Oranye	+
8.	0,51	Tidak berwarna	Tidak berwarna	-
9.	0,55	Abu-abu	Merah muda	-
10.	0,62	Abu-abu	Merah muda	-
11.	0,70	Abu-abu	Merah	-
12.	0,73	Tidak berwarna	Merah	-
13.	0,78	Abu-abu	Oranye	-
14.	0,81	Tidak berwarna	Putih	-
15.	0,83	Abu-abu	Merah	-
16.	0,86	Abu-abu	Merah	-
17.	0,90	Abu-abu	Merah	-
18.	0,92	Abu-abu	Ungu	-

* Rupprecht, dkk., (1990)

Keterangan:(+) mengandung senyawa asetogenin; (-) tidak mengandung senyawa asetogenin

Berdasarkan Tabel 4.3 diketahui bahwa spot ke-7 dengan nilai Rf 0,47 diduga mengandung senyawa asetogenin, karena menghasilkan warna oranye

setelah disemprot dengan reagen vanilin asam sulfat dan diamati di bawah sinar UV pada λ 366 nm. Asetogenin mempunyai ikatan konjugasi pada strukturnya, sehingga pada saat direaksikan dengan reagen vanilin asam sulfat menyebabkan terjadinya perpanjangan konjugasi yang menimbulkan perubahan warna pada senyawa hasil reaksi. Isolat asetogenin dari proses KLTP diperoleh dengan berat 0,75 mg dan akan dianalisis menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*). Spektra hasil FTIR ditunjukkan pada Gambar 4.1



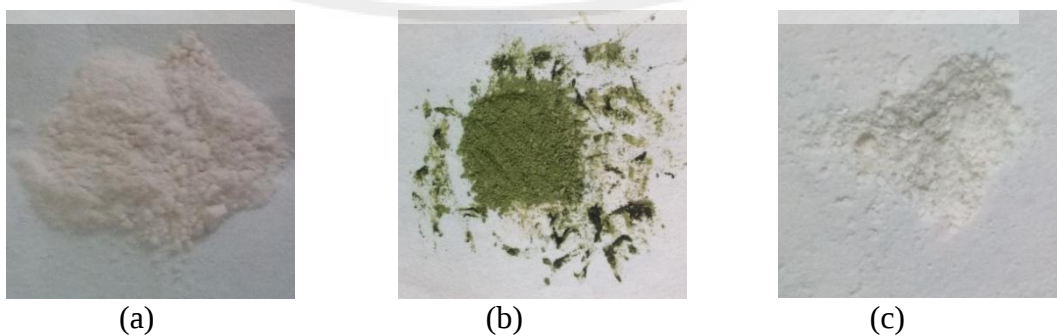
Gambar 4.1 Spektra FTIR isolat hasil KLT

Spektra di atas menunjukkan adanya gugus O-H alkohol pada bilangan gelombang 3460,469 cm^{-1} dengan serapan yang cukup lebar. Serapan lainnya terdapat pada bilangan gelombang 2925,581 cm^{-1} menunjukkan rantai $\text{C}_{\text{sp}}^3\text{-H}$ tidak simetris dan 2854,172 cm^{-1} rantai $\text{C}_{\text{sp}}^3\text{-H}$ simetris. Asetogenin memiliki ciri khas

berupa gugus lakton pada salah satu ujungnya. Hal tersebut dapat ditunjukkan dengan adanya beberapa serapan gugus penyusun lakton yang meliputi gugus C=O pada bilangan gelombang $1737,893\text{ cm}^{-1}$, ikatan C=C pada bilangan gelombang $1648,981\text{ cm}^{-1}$, vibrasi C-H bengkok pada bilangan gelombang $1384,579\text{ cm}^{-1}$, dan ikatan C-O pada bilangan gelombang $1104,356\text{ cm}^{-1}$. Oleh sebab itu, dapat dikatakan bahwa isolat yang diperoleh berupa senyawa asetogenin.

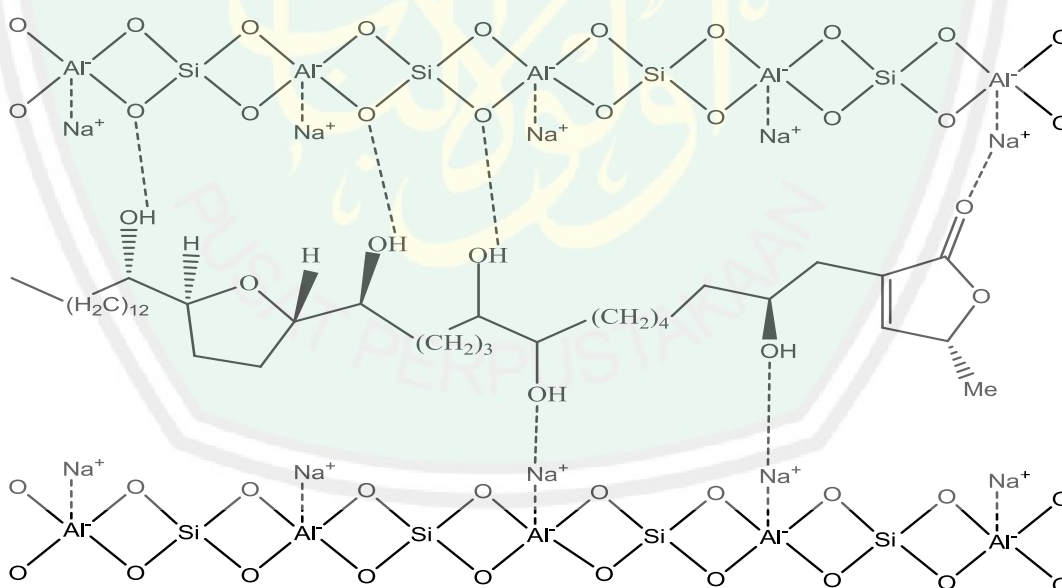
4.3 Pengembanan Ekstrak Hasil Fraksinasi dan Isolat Hasil KLT pada Zeolit NaX menggunakan Metode Impregnasi Kering

Zeolit dapat digunakan sebagai media pengembanan karena memiliki pori dan luas permukaan yang besar. Perbandingan sampel yang diembankan pada zeolit NaX adalah 5:10. Hasil dari proses pengembanan dapat diukur secara kualitatif dengan melihat perubahan warna zeolit dari putih keabuan menjadi hijau keabuan untuk sampel ekstrak hasil fraksinasi. Sementara itu pada sampel isolat hasil KLT, warna yang dihasilkan tetap putih keabuan. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 a) Zeolit sebelum diimpregnasi; b) Zeolit setelah diimpregnasi dengan ekstrak hasil fraksinasi; c) Zeolit setelah diimpregnasi dengan isolat hasil KLT.

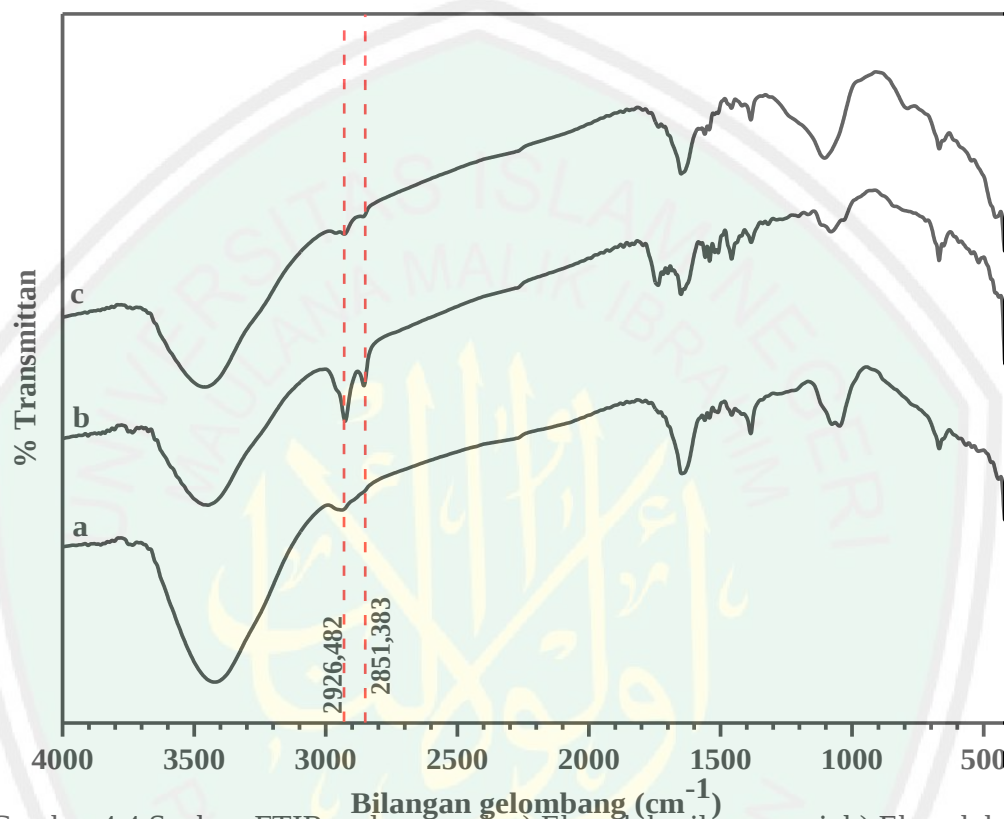
Senyawa aktif yang teremban pada zeolit NaX akan mengalami interaksi ion-dipol, yaitu interaksi antara Na^+ pada kerangka zeolit yang berfungsi sebagai kation penyeimbang dengan senyawa aktif asetogenin. Selain itu, terdapat ikatan hidrogen ditunjukkan oleh interaksi antara atom hidrogen pada senyawa yang diimbangkan dengan atom oksigen yang terdapat pada permukaan kerangka zeolit. Menurut Moghadamtousi, dkk., (2015) beberapa senyawa aktif asetogenin yang telah diisolasi dan diidentifikasi yaitu, annomuricin A, muricapentocin, muricatocin C, dan annopentocin B. Dugaan interaksi yang terjadi antara zeolit NaX dengan salah satu jenis senyawa aktif asetogenin (annomuricin A) dapat dilihat pada Gambar 4.3



Gambar 4.3 Dugaan interaksi antara Annomuricin A dengan zeolit NaX

Keberhasilan impregnasi dapat dilihat dengan membandingkan spektra zeolit NaX sebelum dan sesudah pengembanan. Spektra sampel sebelum pengembanan

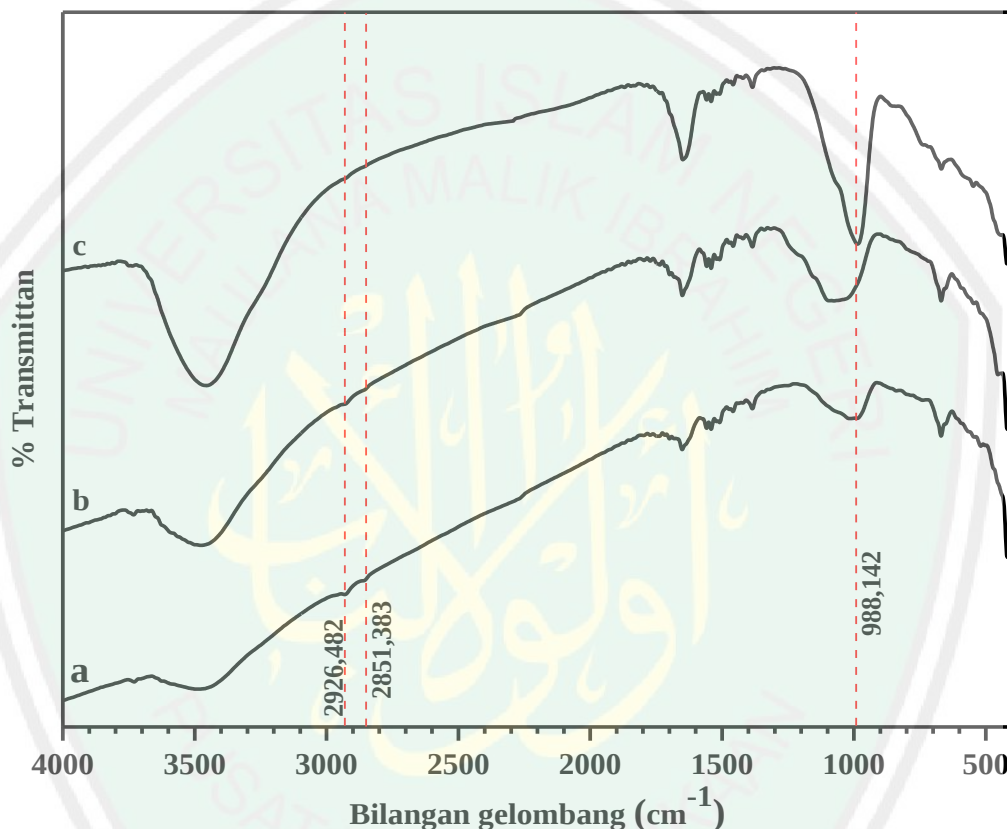
meliputi ekstrak hasil maserasi, ekstrak hasil fraksinasi, dan isolat hasil KLT ditunjukkan pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Spektra FTIR pada sampel: a) Ekstrak hasil maserasi, b) Ekstrak hasil fraksinasi, c) Isolat hasil KLT.

Spektra FTIR (a) ekstrak hasil maserasi, (b) ekstrak hasil fraksinasi, dan (c) isolat hasil KLT memiliki puncak serapan yang khas pada bilangan gelombang 2800-3000 cm^{-1} . Bilangan gelombang tersebut menunjukkan gugus $-\text{C}_{\text{sp}}^3-\text{H}$ (*stretch*) asimetri dan $-\text{C}_{\text{sp}}^3-\text{H}$ (*stretch*) simetri. Berdasarkan spektra di atas diketahui sampel b) ekstrak hasil fraksinasi memiliki puncak serapan khas paling kuat dibandingkan dengan sampel ekstrak hasil maserasi dan isolat hasil KLT. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan senyawa asetogenin di dalam ekstrak

hasil fraksinasi lebih besar dibandingkan pada sampel ekstrak hasil maserasi dan isolat hasil KLT. Sementara itu, sampel hasil pengembunan dan zeolit NaX ditunjukkan pada Gambar 4.5



Gambar 4.5 Spektra FTIR pada sampel: a) Ekstrak hasil fraksinasi: zeolit NaX(5:10), b) Isolat hasil KLT: zeolit NaX (5:10), c) Zeolit NaX.

Sampel hasil pengembunan pada Gambar 4.6 menunjukkan adanya penurunan intensitas puncak serapan khas senyawa asetogenin pada bilangan gelombang 2800-3000 cm^{-1} . Hal tersebut disebabkan karena adanya proses pengembunan dengan zeolit NaX sehingga muncul puncak serapan ciri khas dari zeolit pada bilangan gelombang 1200-300 cm^{-1} . Intensitas puncak khas zeolit pada sampel (a) lebih lemah dibandingkan pada sampel (b) yang menunjukkan

bahwa jumlah zeolit pada sampel (a) lebih sedikit dibandingkan pada sampel (b). Namun, puncak serapan khas zeolit pada sampel (b) mengalami pelebaran pita dengan panjang gelombang $1074,832 \text{ cm}^{-1}$. Hal tersebut dipengaruhi oleh interaksi antara senyawa asetogenin dengan zeolit NaX. Keberadaan puncak karakteristik dari zeolit dan senyawa aktif daun sirsak dalam spektra FTIR menunjukkan bahwa pengembanan telah berhasil dilakukan. Interpretasi spektra FTIR sampel ditunjukkan dalam Tabel 4.4

Tabel 4.4 Interpretasi spektra FTIR sampel zeolit NaX dan hasil pengembanan

No	Bilangan gelombang (cm^{-1}) referensi	Zeolit NaX	Ekstrak hasil fraksinasi: zeolit (5: 10)	Isolat hasil KLT: zeolit (5: 10)	Keterangan
1.	3600 – 3100	3455,044	3483,022	3477,236	Regangan O-H
2.	3000 – 2850	-	2909,881	2935,178	Csp ³ -H (<i>stretch</i>) asimetri
3.	3000 – 2850	-	2851,383	2851,383	Csp ³ -H (<i>stretch</i>) simetri
4.	1650-1600	1648,600	1650,966	1650,235	Tekukan H-O-H
5.	1250 – 920	986,049	1015,173	1074,832	<i>Stretch</i> asimetris O-T-O internal
6.	720 – 650	668,280	669,110	668,819	<i>Stretch</i> asimetris O-T-O eksternal
7.	650-500	547,166	518,998	552,569	Cincin ganda
8.	500 – 420	418,182	418,182	418,182	Tekukan O-T-O (T=Si atau Al)

¹Auerbach, dkk., (2003) ²Silverstein, dkk., (2005)

4.4 Uji Aktivitas Antikanker

Pengujian aktivitas antikanker dilakukan secara *in-vitro* menggunakan metode MTT (*Microculture tetrazolium*) dengan mengukur aktivitas selular terhadap perubahan warna pada bioreduksi garam tetrazolium ke formazan. Kelebihan uji secara *in-vitro* adalah bahan yang dibutuhkan lebih sedikit dan waktu pengujian relatif lebih singkat. Tahap-tahap yang dilakukan dalam uji aktivitas antikanker yaitu penyiapan sel kanker, panen sel, perhitungan sel, uji toksisitas, pemberian reagen MTT, dan pembacaan absorbansi.

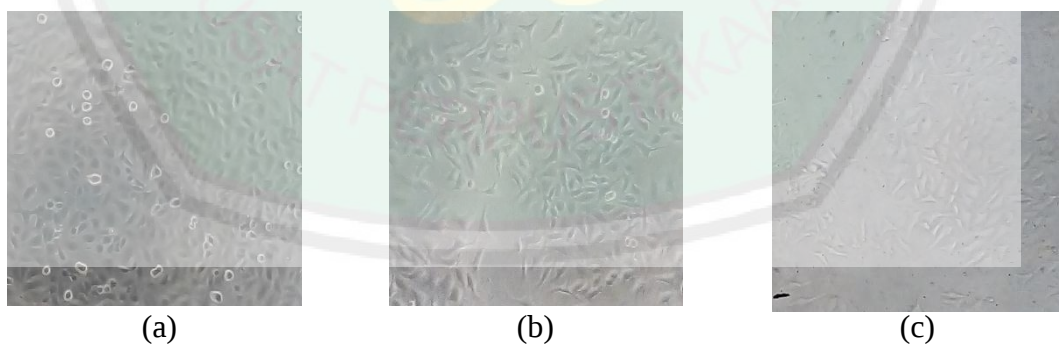
Penyiapan sel dilakukan dengan menghidupkan kembali sel yang telah ditidurkan (inaktif sel). Kemudian ditumbuhkan hingga sel tersebut menempel dan berkembang memenuhi wadah kultur. Panen sel adalah penumbuhan dan pengembangbiakan sel dengan penambahan media kultur berupa RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, glukosa, antijamur, dan serum. Serum pada medium RPMI berupa FBS (*Fetal Bovine Serum*) yang berfungsi memacu pertumbuhan sel.

Prinsip dari panen sel yaitu melepaskan ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matrik tanpa merusak sel. Perhitungan sel hidup yang tidak berwarna dilakukan dengan alat *hemocytometer* dibawah mikroskop *inverted* (terbalik). Sel yang dihitung harus berdiri sendiri dan tidak menggerombol. Hasil perhitungan sel yang diperoleh adalah 280×10^4 sel/mL.

Tahap uji toksisitas meliputi subkultur sel, preparasi sampel, dan *treatment* sel. Subkultur dilakukan dengan memindahkan sel dari kondisi konfluen ke tempat yang lebih kosong agar sel dapat tumbuh maksimal dalam medianya. Sel yang diambil untuk dikultur kembali berjumlah 0,4 mL sel. Preparasi

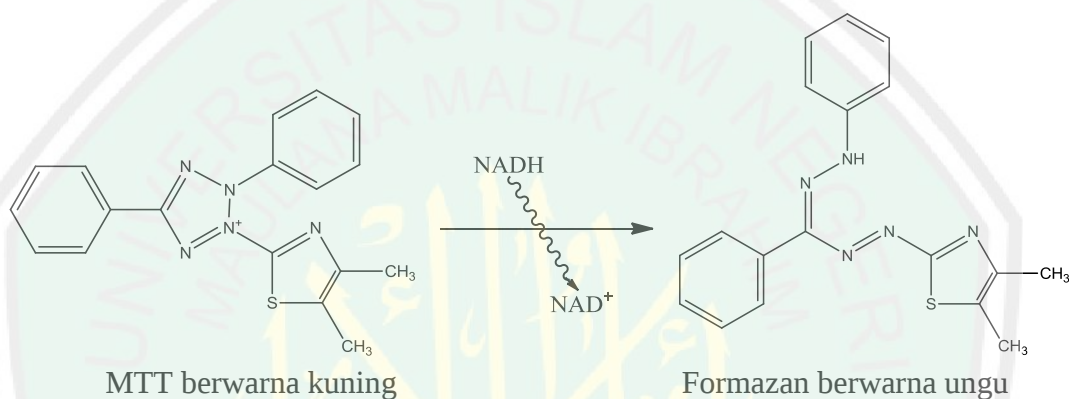
sampel meliputi penimbangan sampel, pelarutan sampel dengan dimetilsulfoksida (DMSO), dan penentuan konsentrasi. Konsentrasi sampel yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker payudara yaitu 500, 250, 125, 62,5, 31,25, dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Treatment sel dilakukan selama 24 jam. Morfologi sel kanker payudara T47D diamati pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ dibawah mikroskop *inverted* setelah *ditreatment* menggunakan sampel. Jumlah sel mati pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ lebih banyak dibandingkan dengan jumlah sel yang mati pada konsentrasi rendah yaitu 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Morfologi sel yang hidup jika diamati dengan mikroskop *inverted* berbentuk lonjong seperti jarum yang saling berdempet dengan sel lainnya dan dinding sel terlindungi sehingga terlihat bersinar dan menempel pada dasar wadah kultur. Sedangkan sel yang mati berbentuk bulat, berwarna gelap, tersebar, dan mengapung. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.6 dan Lampiran 5.8



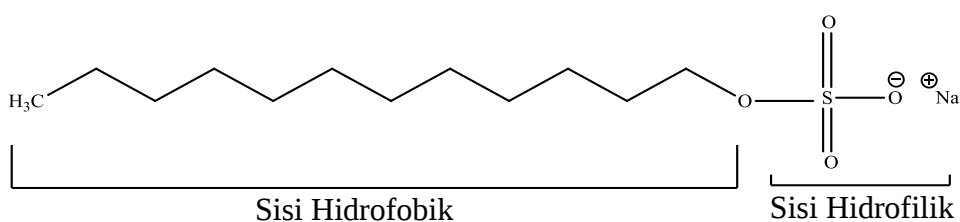
Gambar 4.6 Morfologi sel T-47D setelah di treatment (a) Sel control (b) Sel + ekstrak hasil maserasi dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ (c) Sel + ekstrak hasil maserasi dengan konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$

Aktivitas antikanker dapat ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna setelah pemberian larutan MTT. Sementara itu, jika terjadi perubahan warna menjadi ungu menunjukkan tidak adanya aktivitas antikanker, karena larutan MTT hanya bisa teradsorpsi oleh sel yang hidup. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh reaksi redoks di dalam mitokondria sel. Reaksi reduksi dapat dilihat pada Gambar 4.7



Gambar 4.7 Reaksi reduksi MTT (Sukhramani, dkk., 2011)

Reaksi antara reagen MTT dengan sel dapat dihentikan dengan menambahkan reagen *stopper* natrium dodesil sulfat (SDS) 10 % untuk menghambat pembentukan kristal sebelum dianalisis (Rachmani, dkk., 2012). Reagen SDS akan melisiskan membran sel sehingga kristal formazan dapat keluar dari sel dan melarutkan kristal formazan tersebut. Gambar struktur natrium dodesil sulfat dapat dilihat pada Gambar 4.8



Gambar 4.8 Struktur natrium dodesil sulfat (Caligur, 2008)

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm, karena warna yang tampak pada larutan adalah ungu kebiruan sehingga akan menyerap warna kuning dari spektra sinar tampak (Rachmani, dkk., 2012). Nilai absorbansi yang diperoleh menunjukkan banyaknya sel yang masih hidup. Ketoksikan suatu sampel juga dapat dilihat dari perubahan warna yang terjadi dalam *plate 96 well* setelah pemberian garam SDS. Hal ini dapat dilihat pada Lampiran 5.7. Ekstrak hasil maserasi, ekstrak hasil fraksinasi, dan kombinasi ekstrak hasil fraksinasi dengan zeolit (5:10) pada konsentrasi 500, 250, dan 125 $\mu\text{g/mL}$ memiliki warna kuning pudar. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga sampel pada konsentrasi tinggi mempunyai persen hidup sel kanker dalam jumlah kecil. Pada konsentrasi 62,5; 31,25; dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ memiliki warna ungu muda yang menunjukkan bahwa pada konsentrasi rendah memiliki persen hidup sel kanker dalam jumlah besar. Oleh sebab itu, dapat dikatakan bahwa ketiga sampel ini berpotensi dengan baik sebagai penghambat pertumbuhan sel kanker pada konsentrasi tinggi.

Sementara itu, sampel zeolit NaX, isolat hasil KLT, dan kombinasi isolat dengan zeolit (5:10) menghasilkan perubahan warna menjadi ungu muda pada konsentrasi tinggi, dan ungu tua pada konsentrasi rendah. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah persen hidup sel kanker masih dalam jumlah besar, sehingga belum mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D secara maksimal. Intensitas warna ungu yang dihasilkan oleh sampel hampir sama dengan kontrol sel, sehingga menunjukkan bahwa sampel hanya mampu menghambat pertumbuhan sel kanker dalam jumlah kecil.

Nilai absorbansi yang diperoleh dari hasil analisis menggunakan ELISA reader digunakan untuk menghitung persen hidup sel dan nilai IC_{50} dari masing-masing sampel. Nilai IC_{50} yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 4.5

Tabel 4.5 Nilai IC_{50} uji aktivitas antikanker

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak hasil maserasi	92,821
Ekstrak hasil fraksinasi	15,417
Isolat hasil KLT	523.600,437
Ekstrak hasil fraksinasi : zeolit NaX (5:10)	125,683
Isolat hasil KLT : zeolit NaX(5:10)	103.514,217
Zeolit NaX	753,356

Berdasarkan Tabel 4.5 ekstrak hasil maserasi mempunyai nilai IC_{50} bukan dibawah 50 $\mu\text{g/mL}$. Setelah difraksinasi, nilai IC_{50} yang diperoleh lebih kecil menjadi 15,417 $\mu\text{g/mL}$. Oleh sebab itu, dapat dikatakan bahwa ekstrak hasil fraksinasi mempunyai aktivitas antikanker lebih baik dibandingkan dengan ekstrak hasil maserasi. Sampel isolat mempunyai nilai IC_{50} yang sangat tinggi yaitu, 523.600,437 $\mu\text{g/mL}$. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat tidak lebih baik jika dibandingkan dengan ekstrak hasil maserasi yang masih mengandung senyawa antikanker lain seperti alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Berdasarkan ketiga sampel sebelum pengembanan tersebut, dapat dikatakan bahwa ekstrak hasil fraksinasi mempunyai aktivitas antikanker paling baik dengan menghasilkan nilai IC_{50} paling kecil. Hal ini didukung dengan spektra hasil FTIR pada Gambar 4.5 yang menunjukkan intensitas puncak serapan khas senyawa aktif paling kuat dibandingkan dengan ekstrak hasil maserasi dan isolat hasil KLT.

Disamping itu, zeolit yang digunakan sebagai pengemban memiliki IC_{50} tinggi 753,356 $\mu\text{g/mL}$, karena zeolit hanya berfungsi sebagai pengemban senyawa antikanker yang tidak berbahaya bagi tubuh. Sampel ekstrak hasil fraksinasi yang diembankan pada zeolit memiliki IC_{50} cukup tinggi 125,683 $\mu\text{g/mL}$. Hal tersebut dikarenakan *treatment* sampel terhadap sel kanker hanya dilakukan selama ± 18 jam, sehingga pelepasan ekstrak hasil fraksinasi yang teremban pada zeolit tidak berlangsung maksimal. Sementara itu, isolat yang telah teremban pada zeolit menghasilkan nilai IC_{50} lebih kecil 103.514,217 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan dengan isolat yang tidak diembankan pada zeolit. Sehingga, laju pelepasan isolat yang teremban pada zeolit lebih baik.

4.5 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak hasil maserasi dan ekstrak hasil fraksinasi daun sirsak berpotensi menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 92,821 $\mu\text{g/mL}$ dan 15,417 $\mu\text{g/mL}$. Sementara itu, ekstrak hasil fraksinasi yang diembankan pada zeolit NaX mempunyai kemampuan lebih baik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dibandingkan dengan isolat yang teremban pada zeolit NaX. Oleh sebab itu, penelitian ini telah membuktikan bahwa tumbuhan merupakan salah satu bentuk ciptaan Allah SWT yang bermanfaat bagi kelangsungan hidup manusia sebagaimana difirmankan dalam Surah Q.S. al-Syuara ayat 7 yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (٧)

Artinya: *"Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?"* (Q.S. al-Syuara: 7)

Kata *ila* pada ayat ini bermakna batas akhir yang mendorong manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya. Sementara itu, kata *zauj* berarti pasangan yang mengarah pada tumbuh-tumbuhan. Sehingga ayat ini menunjukkan bahwa tumbuh-tumbuhan memiliki pasangan (benang sari dan putik) untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Kata *karim* digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik untuk setiap objek yang disifatinya (Shihab, 2002).

Tumbuhan yang telah dimanfaatkan dalam penelitian ini yaitu tumbuhan sirsak sebagai antikanker. Kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal dan akan menyebar ke jaringan sekitarnya serta menyerang organ-organ penting. Banyak penderita kanker yang merasa putus asa karena mengalami kegagalan dalam proses penyembuhannya. Sebagai manusia yang beriman, sifat putus asa seharusnya tidak tertanam dalam diri kita, karena semua penyakit pasti ada obatnya dan Allah tidak menguji melebihi batas kemampuan hamba-Nya. Hal tersebut diterangkan dalam hadist yang berbunyi:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: *"Tidaklah Allah turunkan penyakit kecuali Allah turunkan pula obatnya."* (HR. Imam Bukhari dan Imam Muslim, 10/134 nomer 5678).

Oleh sebab itu, manusia dengan kemampuan akal dan pikiran yang dimilikinya dapat mengambil pelajaran dan manfaat terhadap segala ciptaan Allah SWT.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Nilai IC_{50} ekstrak hasil fraksinasi sebelum dan sesudah diembankan pada zeolit NaX dengan perbandingan 5:10 adalah 15,417 $\mu\text{g/mL}$ dan 125,683 $\mu\text{g/mL}$. Sementara itu nilai IC_{50} isolat hasil KLT sebelum dan sesudah diembankan pada zeolit NaX dengan perbandingan 5:10 adalah 523.600,437 $\mu\text{g/mL}$ dan 103.514,217 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi senyawa asetogenin dengan cara mengoptimasi perbandingan eluen pada metode KLT yang digunakan dan menambah jumlah isolat.
2. Perlu dilakukan modifikasi proses elusi menggunakan metode menurun (*descending*) atau metode dua dimensi.

DAFTAR PUSTAKA

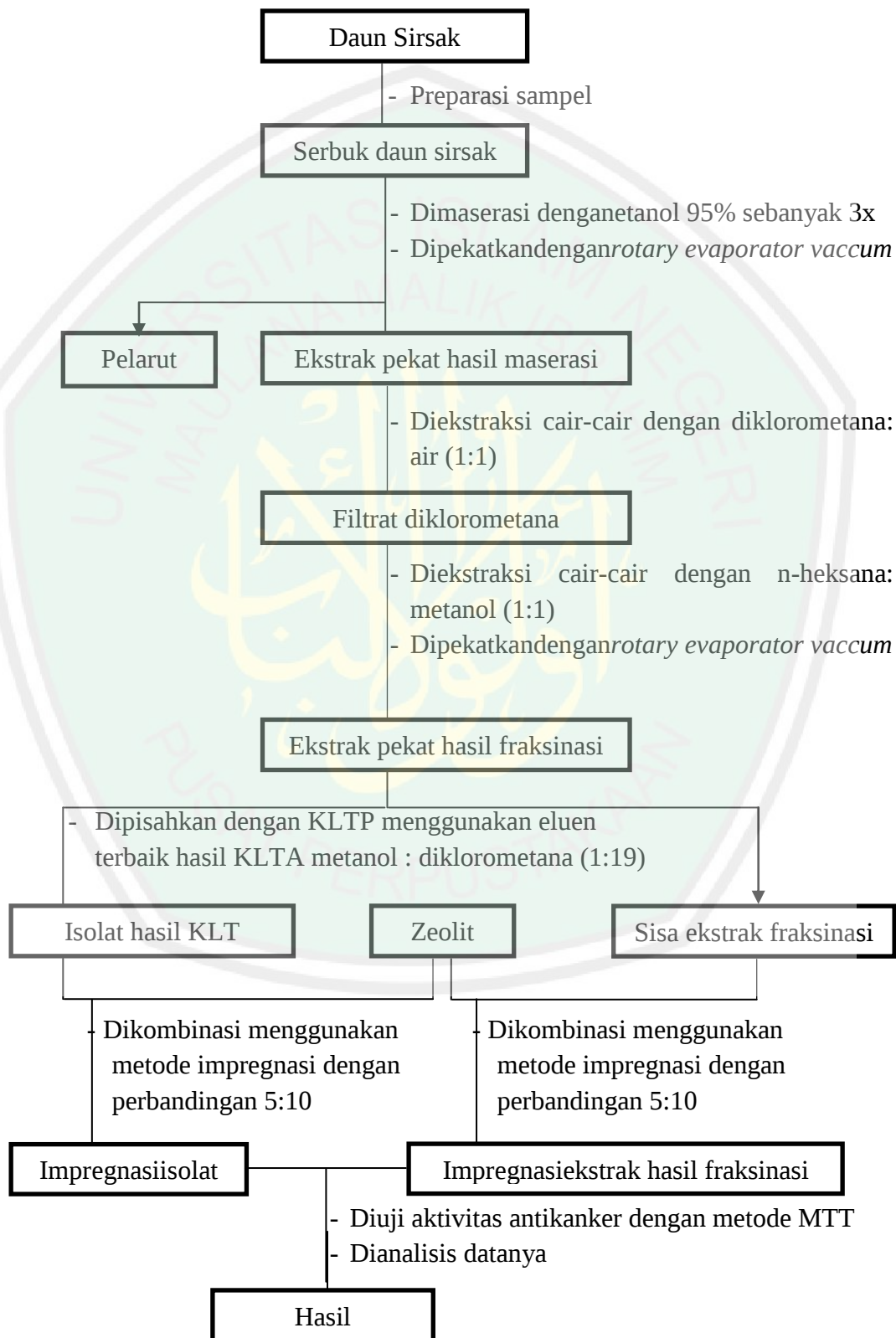
- Alali, F.Q., Liu, X.X., dan McLaughlin, J.L. 1999. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Product*, 62: 504-540.
- Auerbach, S.M., Carrado K.A., dan Dutta, P.K. 2003. *Handbook of Zeolite Science and Technology*. New York: Marcel Dekker.
- Caligur, V. 2008. Detergent Properties and Applications, *BioFiles*, 3(3): 14
- CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center). 2009. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, UGM.
- Crowther, J.R. 2001. *The ELISA Guidebook*. New Jersey: Humana Press.
- Fitriana, L. 2018. Sintesis dan Karakterisasi Zeolit NaX dari Kaolin Blitar dengan Pre-treatment Alkali Fusi menggunakan Metode Hidrotermal Variasi Suhu Kristalisasi. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Gavamukulya, Y., Elella, F.A., Wamunyokoli, F., and El-Shemy, H.A. 2014. Phytochemical Screening, Anti-Oxidant Activity and In vitro Anticancer Potential Of Etanolic and Water Leaves Extracts of *Annona Muricata*(Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1): 930-939.
- Gorman, J.S.T. 2006. Transition Metal- Mediated Cyclizations and Synthesis of Annonaceous Acetogenin Analogs. *Dissertation*. Austin: Faculty of The Graduate School of The University of Texas at Austin.
- Hermawan, G.P., dan Laksono, H. 2013. Ekstraksi Daun Sirsak (*Annona Muricata*L) menggunakan Pelarut Etanol. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 2(2): 111-115.
- HK. Tjasyono, B., dan Syukur, M. 2014. *Keajaiban Planet Bumi: Kajian Perspektif Science dan Islam*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya Offset.
- Katrin, E., Amaliah, R., Aziz, Z., dan Winarno, H. 2013. Aktivitas Sitotoksik dan Profil Kromatogram Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) yang Diiradiasi. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 11(1): 244-254.
- Kurniasih, N., Kusmiyati, M., Nurhasanah., Sari, R.P., dan Wafdan, R. 2015. *Potensi daun Sirsak (Annona Muricata Linn), Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten) Steenis), dan Daun Benalu Mangga (Dendrophthoe pentandra) sebagai Antioksidan Pencegah Kanker*. ISSN 1979-8911. IX(1): 162-184.

- Kwakye-Awuah, B. 2008. Production of Silver-Loaded Zeolites and Investigation of Their Antimicrobial Activity. *Thesis*. United Kingdom: University of Wolverhampton.
- Laila, A.K. 2012. Uji Aktivitas Antikanker Payudara (T47D) Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata*Linn) yang Diembankan pada Zeolit NAX. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lilbaig, F.Z. 2017. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn.) yang Diembankan pada Zeolit NaX menggunakan Metode Impregnasi Kering sebagai Antikanker Payudara T-47D. *Skripsi*.Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Moghadamtousi, S.Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H.M., and Kadir, H.A. 2015. *Annona Muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067. 16: 15625-15658.
- NCI (National Cancer Institute). 2001. *Measuring Cancer Death*. (Online), (<http://www.cancer.gov.csr>), diakses Maret 2007.
- Pradana, P.Y., Suratmo., dan Retnowati, R. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Turunan *Acetogenin*dari Daun Sirsak (*Annona Muricata*) serta Uji Toksisitas. *Kimia Student Journal*, 1(1): 798 – 804.
- Rachmani, E.P.N., Suhesti, T.S., Widiastuti, R., and Aditiyono. 2012. The Breast of Anticancer from Leaf Extract of *Annona Muricata* Againts Cell Line in T47D. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2(1): 157-164.
- Rajsekhar, S.P.V., J. Chandra, H., and S. Sridhar. 2016. Seclusion of Bioactive Complexes from *Annona Muricata* Leaf Extract Using TLC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(3): 1446-1449.
- Ranisaharivony, B.G., Ramanandraibe, V., Rasoanaivo, L.H., Rakotovao, M., and Lemaire, M. 2015. Separation and Potential Valorization of Chemical Constituents of Soursop Seeds. *Journal of Pharmacolognosy and Phytochemistry*, 4(2): 161-171.
- Rimoli, M.G., Rabaioli, M.R., Melisi, D., Curcio, A., Mondello, S., Mirabelli, R., Abignente, E. 2007. Synthetic Zeolites as a New Tool for Drug Delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 156-164.
- Rupprecht, J.K., Hui, Y.H., and McLaughlin, J.L. 1990. Annonaceous Acetogenins: A Review. *Journal of Natural Products*, 33(2): 237-278.
- Shihab, M.Q. 2002.*Tafsir Al-Amanah*. Jakarta: Lentera Hati.

- Silverstein, R.M., Webster, F.X., and Kiemle, D.J. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed. New York: John Wiley and Sons, Ltd.
- Spanakis, dkk. 2013. Controlled Release of 5-Fluorouracil from Microporous Zeolites. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1-29.
- Sukhramani, Prakash S., Sukhramani, Poonam S., Tirthani, S.R., Sesai, S.A., Suthar, M.P. 2011. Biological Cytotoxicity Evaluation of spiro[azetidine-2, 3'-indole]-2', 4(1'H)-dione Derivatives for Anti-lung and Anti-breast Cancer Activity. *Der Pharmacia Lettre*, 3(5): 236-243.
- Swari, S.R. 2012. Penentuan Kandungan *Annonaceous Acetogenin* pada Daun Sirsak menggunakan Metode Spektrofotometri Gugus Lakton. *Skripsi*. Depok: Universitas Indonesia.
- Treacy, M.M.J., dan Higgins, J.B. 2001. *Collection of Simulated XRD Powder Patterns for Zeolites*, 4th ed. New York: Elsevier Science Publishers B.V.
- Utami, U. 2008. *Konservasi Sumber Daya Alam: Perspektif Islam dan Sains*. Malang: UIN Malang Press.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.
- Yunus, S. 2017. *Memilih Daun Sirsak yang Cocok untuk Bahan Baku Herbal*. Alamtani: Blog Agribisnis dan Hobi. (Online), diakses 16 Januari 2017.

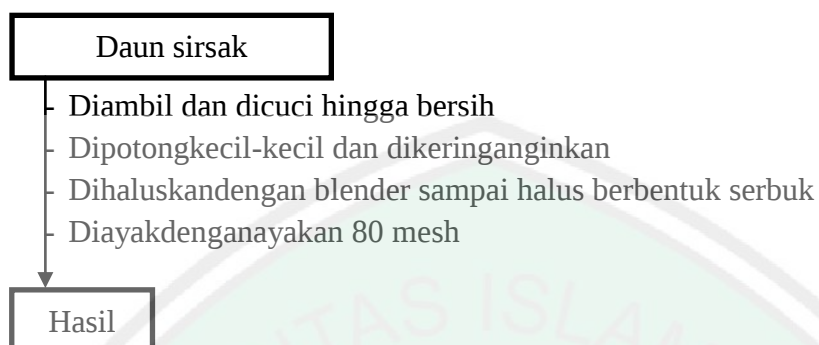
LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian

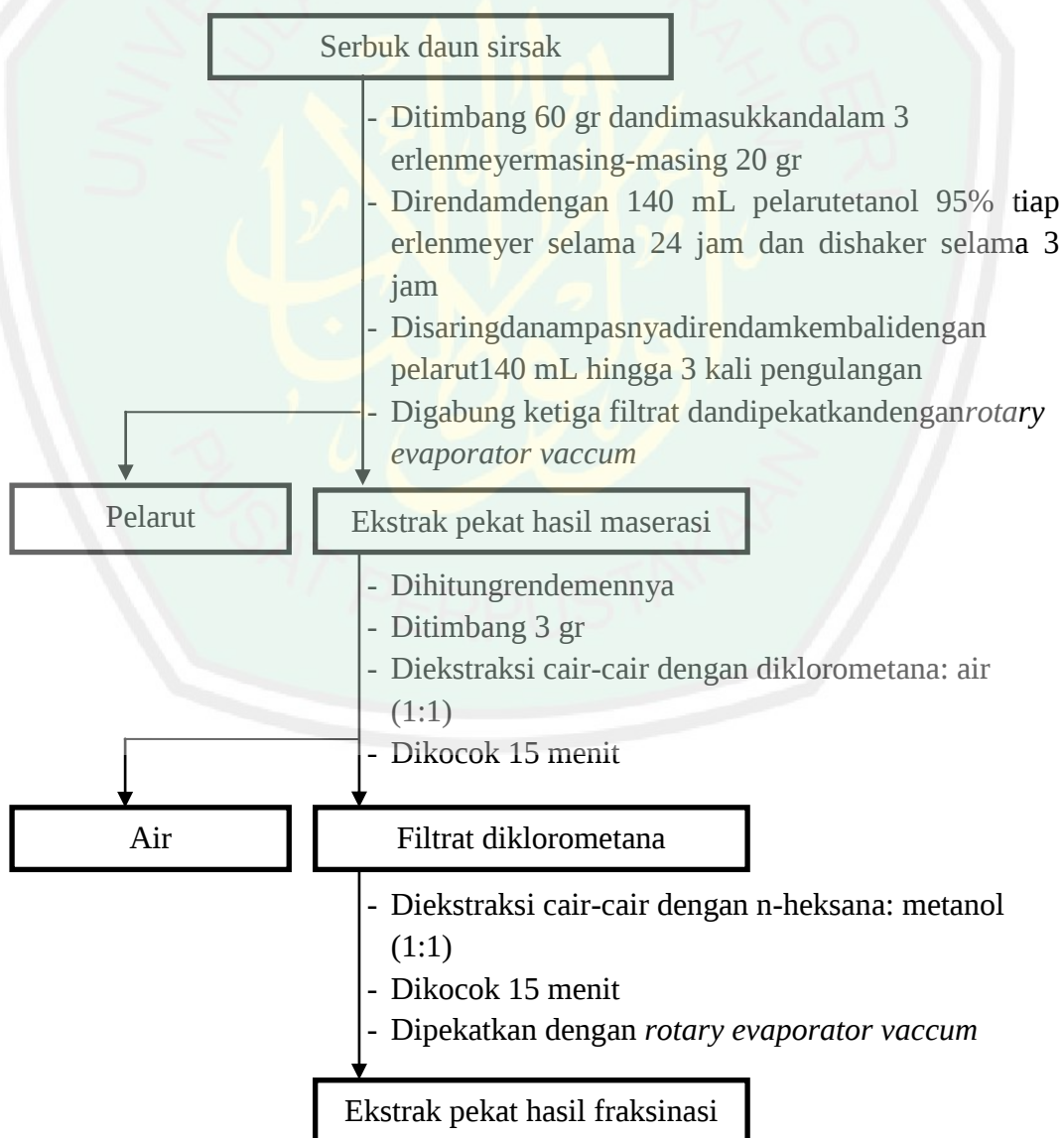


Lampiran 2. Skema Kerja

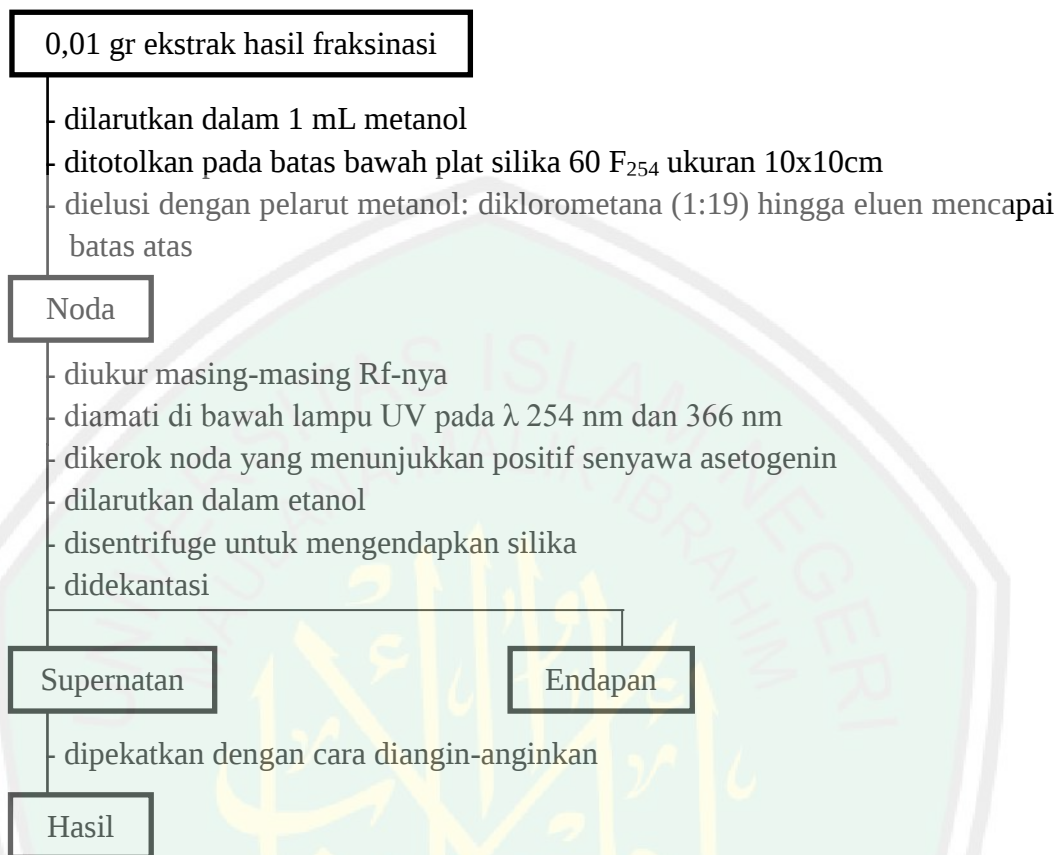
L.2.1 Preparasi Sampel



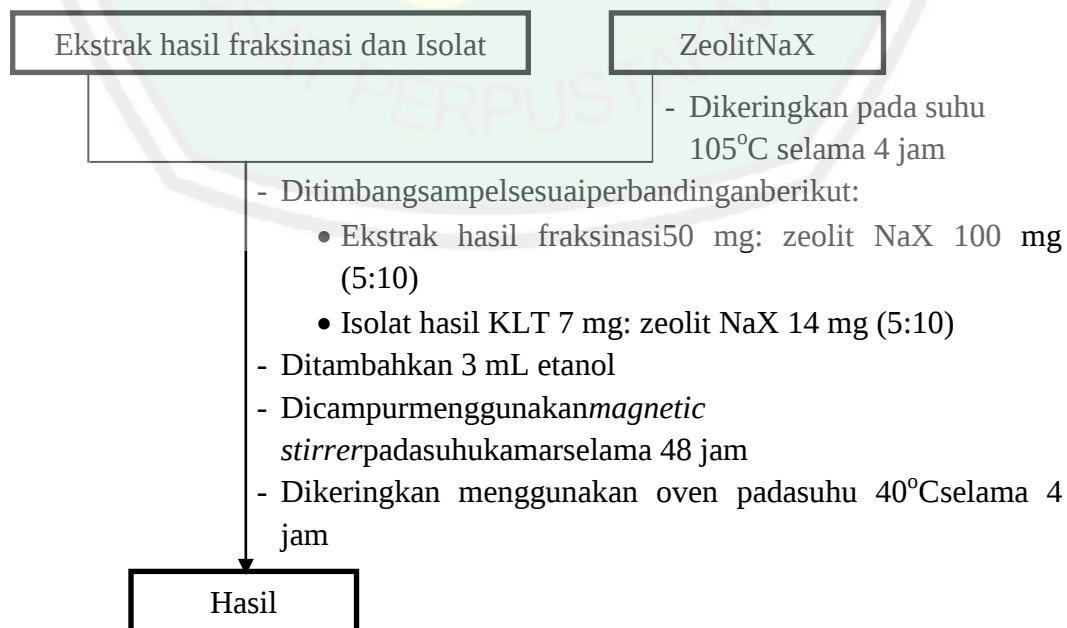
L.2.2 Proses Ekstraksi dan Fraksinasi Asetogenin



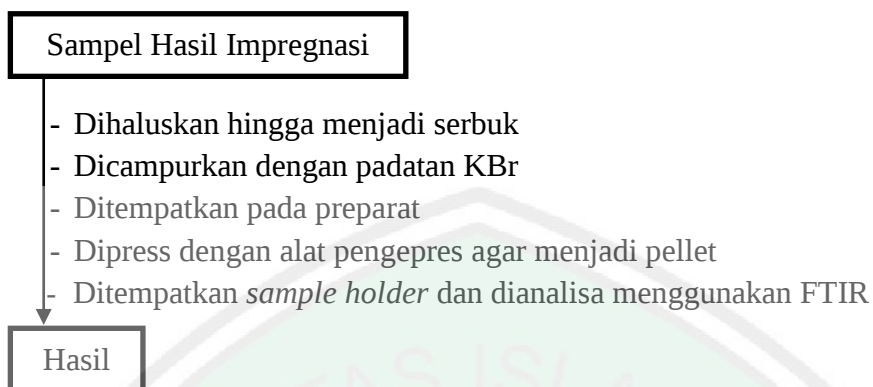
L.2.3 Pemisahan Senyawa Asetogenin dengan KLTP



L.2.4 PengembananEkstrak Hasil Fraksinasi dan Isolat Hasil KLT dengan Zeolit NaX

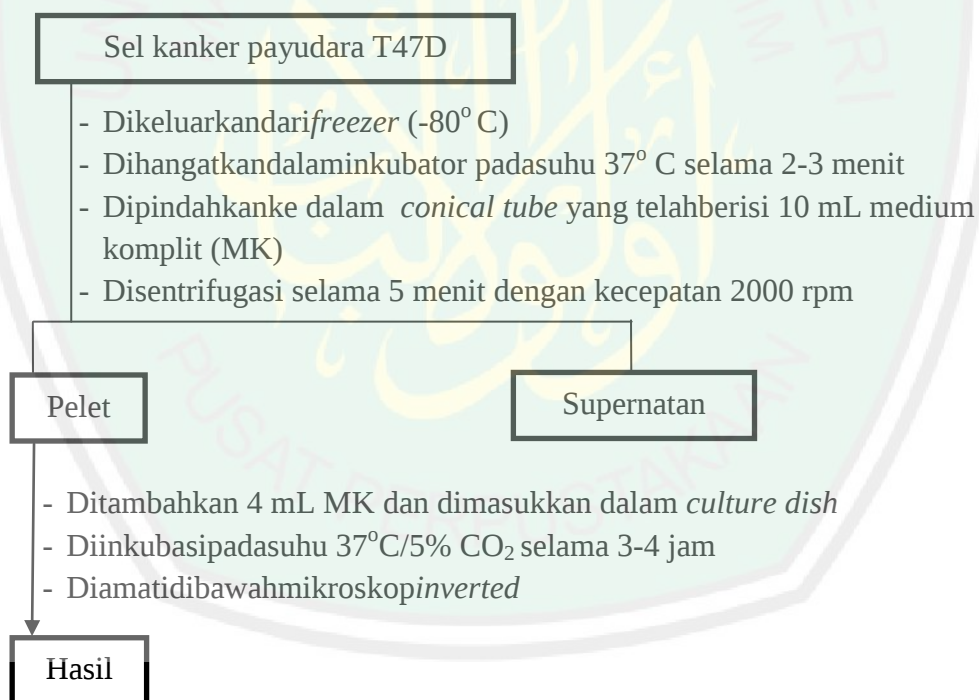


L.2.5 Karakterisasi Hasil Pengembangan Menggunakan FTIR



L.2.6 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

L.2.6.1 Penyiapan Sel



L.2.6.2 Panen Sel

Sel kanker payudara T47D

- Dibuang medium menggunakan mikropipet
- Dicuci dua kali dengan PBS
- Ditambahkan tripsin-EDTA dan diinkubasi pada suhu 37°C/ 5% CO₂ selama 3 menit
- Ditambahkan MK ± 5 mL
- Diamatidi bawahmikroskopinverted
- Diresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
- Diambil10 µLuntuk dihitung jumlah sel kanker dengan *hemacytometer*
- Dimasukkan sisa sel kanker dalam *conical tube*

Hasil

L.2.6.3 PenghitunganSelKanker

Sel kanker payudara T47D

- Diambil10 µL
- Dipipetkanke *hemacytometer*
- Dihitungdibawahmikroskopinverteddengancounter

Hasil

L.2.6.4 PeletakanSelpada Plate

Sel kanker payudara T47D

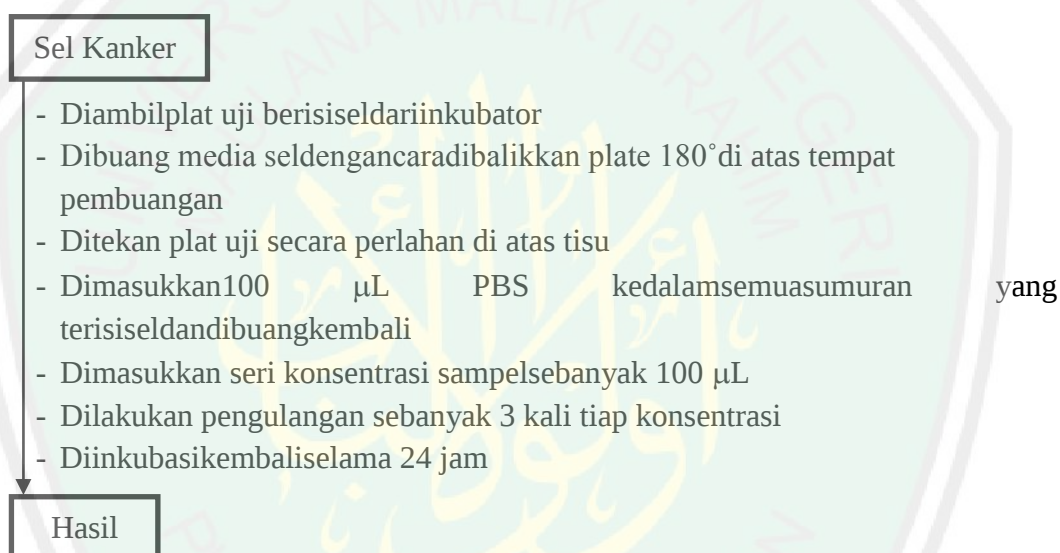
- Diambil volume panen sel transfer dan dimasukkan dalam *conical tube* baru
- Ditambahkan MK hingga volume total 10 mL dan dihomogenkan
- Dimasukkan dalam sumuran plat uji masing-masing 100 µL
- Disisakan 6 sumuranbagianbawahuntuk kontrol seldan kontrol media
- Diisi sumuran kontrol sel dengan 200 µL (MK+sel)
- Diisi sumuran kontrol medium dengan 200 µL MK
- Diinkubasiselama 24 jam padasuhu 37°C/ 5%CO₂

Hasil

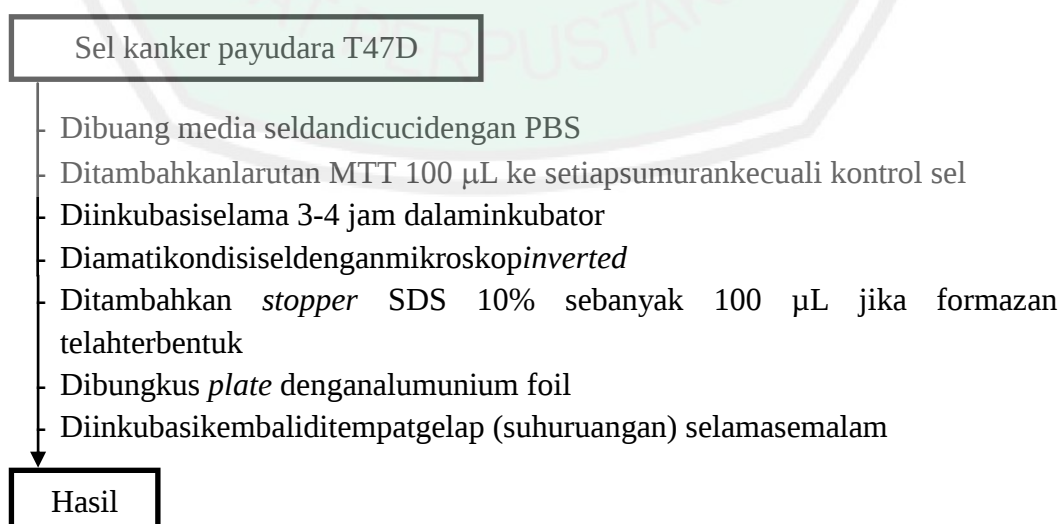
L.2.6.5 Pembuatan Larutan Uji (Sampel)



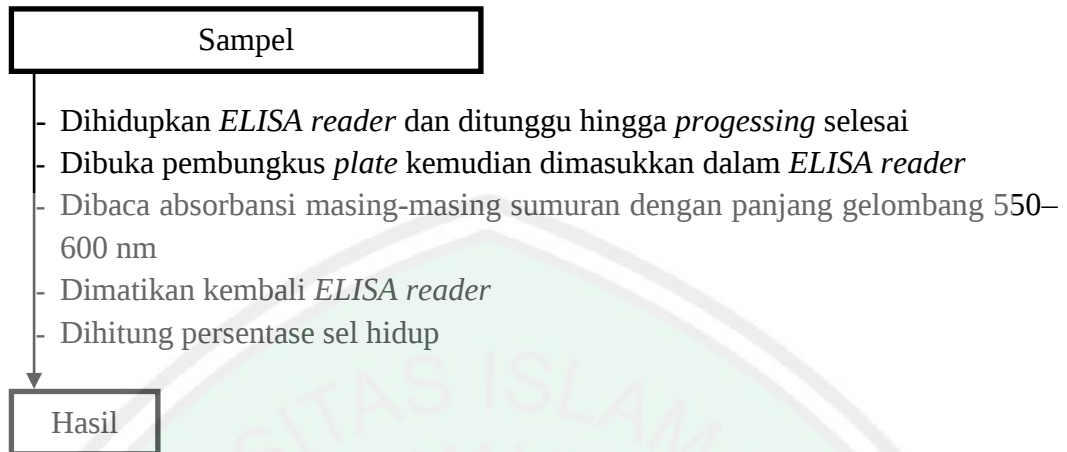
L.2.6.6 Pemberian Larutan Sampel pada Plate



L.2.6.7 Pemberian Larutan MTT



L.2.6.8 Pembacaan Nilai Absorbansi



Lampiran 3. Pembuatan Larutan dan Reagen

L.3.1 Pembuatan Larutan Etanol 95%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$96\% \times V_1 = 95\% \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = 989,58 \text{ mL} \rightarrow 990 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diisi labu takar 1000 mL dengan 10 mL aquades, kemudian ditambahkan 990 mL etanol p.a (96%) secara perlahan. Digoyangkan sebentar lalu ditambahkan aquades kembali hingga tanda batas. Selanjutnya dikocok hingga homogen.

L.3.2 Pembuatan Reagen Vanilin- Asam Sulfat

Cara pembuatannya adalah ditimbang 0,5 gr vanilin dan dilarutkan dalam campuran 85 mL metanol, 10 mL asam asetat, dan 5 mL asam sulfat dibawah pendinginan (*ice bath*).

L.3.3 Pembuatan Larutan SDS 10% (b/v)

$$\text{SDS } 10\% = \frac{10 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang 10 gram SDS (*Sodium Deodecyle Sulphate*) dan dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL. Kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades.

L.3.4 Pembuatan Larutan Stok MTT (5 mg/mL) (CCRC, 2009)

Ditimbang 50 mg serbuk MTT, kemudian dilarutkan dalam 10 mL PBS dan diaduk dengan *vortex*.

L.3.5 Pembuatan Larutan Stok 1000 ppm Kombinasi Ekstrak Hasil Fraksinasi dan Isolat Hasil KLT dengan Zeolit NaX

Berat sampel = 10 mg

Volume pelarut = 100 μ L (DMSO)

$$M = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ } \mu\text{L}} = \frac{10.000 \text{ } \mu\text{g}}{100 \text{ } \mu\text{L}} = 100.000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100.00 \text{ } \mu\text{g/mL} \times V_1 = 500 \text{ } \mu\text{g/mL} \times 1000 \text{ } \mu\text{L}$$

$$V_1 = 5 \text{ } \mu\text{L}$$

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan cara mengambil 5 μ L sampel yang telah dilarutkan dengan DMSO. Kemudian ditambahkan 995 μ L media kultur RPMI dan diresuspensi hingga homogen.

Lampiran 4. Data dan Perhitungan Hasil Penelitian

L.4.1 Perhitungan Rendemen

➤ Ekstrak Hasil Maserasi

$$\text{Berat sampel} = 60 \text{ gr}$$

$$\text{Berat ekstrak pekat} = 9,1346 \text{ gr}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{9,1346 \text{ gr}}{60 \text{ gr}} \times 100 \% = 15,22 \%$$

➤ Ekstrak Hasil Fraksinasi

$$\text{Berat ekstrak pekat} = 3 \text{ gr}$$

$$\text{Berat fraksi} = 1,1895 \text{ gr}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat fraksi}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{1,1895 \text{ gr}}{3 \text{ gr}} \times 100 \% = 39,65 \%$$

L.4.2 Perhitungan Nilai Rf dari Hasil KLTP

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{0,6}{8} = 0,07$$

$$\text{Nilai Rf 10} = \frac{5}{8} = 0,62$$

$$\text{Nilai Rf 2} = \frac{0,8}{8} = 0,10$$

$$\text{Nilai Rf 11} = \frac{5,6}{8} = 0,70$$

$$\text{Nilai Rf 3} = \frac{1,5}{8} = 0,18$$

$$\text{Nilai Rf 12} = \frac{5,9}{8} = 0,73$$

$$\text{Nilai Rf 4} = \frac{1,8}{8} = 0,22$$

$$\text{Nilai Rf 13} = \frac{6,3}{8} = 0,78$$

$$\text{Nilai Rf 5} = \frac{2,7}{8} = 0,33$$

$$\text{Nilai Rf 14} = \frac{6,5}{8} = 0,81$$

$$\text{Nilai Rf 6} = \frac{3,1}{8} = 0,38$$

$$\text{Nilai Rf 15} = \frac{6,7}{8} = 0,83$$

$$\text{Nilai Rf 7} = \frac{3,8}{8} = 0,47$$

$$\text{Nilai Rf 16} = \frac{6,9}{8} = 0,86$$

$$\text{Nilai Rf 8} = \frac{4,1}{8} = 0,51$$

$$\text{Nilai Rf 17} = \frac{7,2}{8} = 0,90$$

$$\text{Nilai Rf 9} = \frac{4,4}{8} = 0,55$$

$$\text{Nilai Rf 18} = \frac{7,4}{8} = 0,92$$

L.4.3 Perhitungan Konsentrasi Sel

- Pengamatan jumlah sel dengan *hemacytometer* dibawah mikroskop *inverted*

Kuadran A 304	Kuadran B 254
Kuadran C 229	Kuadran D 333

- Jumlah sel yang dihitung (mL^{-1})

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\sum \text{sel kuadran A} + \sum \text{sel kuadran B} + \sum \text{sel kuadran C} + \sum \text{sel kuadran D}}{4} \times 10^4 \\
 &= \frac{304 + 254 + 229 + 333}{4} \times 10^4 \\
 &= 280 \times 10^4 \text{ sel/mL}
 \end{aligned}$$

- Volume panenan sel yang ditransfer

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung}} \\
 &= \frac{100 \times 10^4}{280 \times 10^4 / \text{mL}} \\
 &= 0,357 \text{ mL} = 0,4 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 0,4 mL, ditambahkan media kultur RPMI hingga 10 mL, karena setiap sumuran akan diisi 100 μ L MK berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100 μ L x 100 sumuran = 10.000 μ L atau 10 mL (berisi MK 9,6 mL dan sel 0,4 mL).

L.4.4 Perhitungan Persentase Sel Hidup

➤ Data Uji aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

No.	Absorbansi kontrol sel	Absorbansi kontrol media
1.	0,627	0,303
2.	0,649	0,327
3.	0,683	0,318
Rata –Rata:	0,653	0,316

1. Ekstrak Hasil Maserasi

Konsentrasi (μ g/mL)	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,496	0,456	0,465	0,472	46,291
250	0,348	0,344	0,331	0,341	7,418
125	0,335	0,306	0,434	0,358	12,463
62,5	0,507	0,568	0,503	0,526	62,315
31,25	0,590	0,568	0,578	0,579	78,042
15,625	0,613	0,595	0,578	0,595	82,789

2. Ekstrak Hasil Fraksinasi

Konsentrasi (μ g/mL)	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,401	0,405	0,411	0,406	26,706
250	0,347	0,330	0,339	0,339	6,825
125	0,321	0,319	0,330	0,323	2,077
62,5	0,296	0,300	0,293	0,296	-5,935
31,25	0,443	0,500	0,486	0,476	47,478
15,625	0,480	0,531	0,499	0,503	55,490

3. Isolat Hasil KLT

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,638	0,674	0,665	0,659	101,780
250	0,691	0,616	0,641	0,649	98,813
125	0,728	0,650	0,653	0,677	107,122
62,5	0,710	0,684	0,658	0,684	109,199
31,25	0,681	0,719	0,767	0,722	120,475
15,625	0,645	0,695	0,720	0,687	110,089

4. Kombinasi ekstrak hasil fraksinasi : zeolit NaX (5:10)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,355	0,358	0,343	0,352	10,682
250	0,326	0,310	0,322	0,319	0,890
125	0,492	0,478	0,504	0,491	51,929
62,5	0,549	0,557	0,528	0,545	67,953
31,25	0,602	0,651	0,612	0,622	90,801
15,625	0,579	0,725	0,612	0,639	95,846

5. Kombinasi isolat hasil KLT : zeolit NaX (5:10)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,615	0,584	0,599	0,599	83,976
250	0,618	0,617	0,610	0,615	88,724
125	0,599	0,637	0,602	0,613	88,131
62,5	0,585	0,680	0,676	0,647	98,220
31,25	0,683	0,631	0,654	0,656	100,890
15,625	0,643	0,864	0,734	0,747	127,893

6. Zeolit NaX

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,655	0,672	0,647	0,658	70,455
250	0,66	0,646	0,658	0,655	69,749
125	0,689	0,685	0,878	0,751	92,320
62,5	0,628	0,648	0,630	0,635	65,047
31,25	0,802	1,351	0,816	0,990	148,511
15,625	0,645	0,634	0,626	0,635	65,047

➤ Perhitungan Prosentase Sel Hidup

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \%$$

Keterangan : A = absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel)

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur) 0,156

1. Ekstrak Hasil Maserasi

- Konsentrasi 500 → % Hidup = $\frac{0,472 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 46,291 \%$
- Konsentrasi 250 → % Hidup = $\frac{0,341 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 7,418 \%$
- Konsentrasi 125 → % Hidup = $\frac{0,358 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 12,463 \%$
- Konsentrasi 62,5 → % Hidup = $\frac{0,526 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 62,315 \%$
- Konsentrasi 31,25 → % Hidup = $\frac{0,579 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 78,042 \%$
- Konsentrasi 15,625 → % Hidup = $\frac{0,595 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 82,789 \%$

2. Ekstrak Hasil Fraksinasi

- Konsentrasi 500 → % Hidup = $\frac{0,406 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 26,706 \%$
- Konsentrasi 250 → % Hidup = $\frac{0,339 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 6,825 \%$

- Konsentrasi 125 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,323 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 2,077 \%$
- Konsentrasi 62,5 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,296 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = -5,935 \%$
- Konsentrasi 31,25 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,476 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 47,478 \%$
- Konsentrasi 15,625 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,503 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 55,490 \%$

3. Isolat Hasil KLT

- Konsentrasi 500 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,659 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 101,780 \%$
- Konsentrasi 250 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,649 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 98,813 \%$
- Konsentrasi 125 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,677 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 107,122 \%$
- Konsentrasi 62,5 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,684 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 109,199 \%$
- Konsentrasi 31,25 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,722 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 120,475 \%$
- Konsentrasi 15,625 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,687 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 110,089 \%$

4. Kombinasi ekstrak hasil maserasi: zeolit NaX (5:10)

- Konsentrasi 500 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,352 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 10,682 \%$
- Konsentrasi 250 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,319 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 0,890 \%$
- Konsentrasi 125 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,491 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 51,929 \%$
- Konsentrasi 62,5 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,545 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 67,953 \%$
- Konsentrasi 31,25 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,622 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 90,801 \%$
- Konsentrasi 15,625 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,639 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 95,846 \%$

5. Kombinasi isolat hasil KLT: zeolit NaX (5:10)

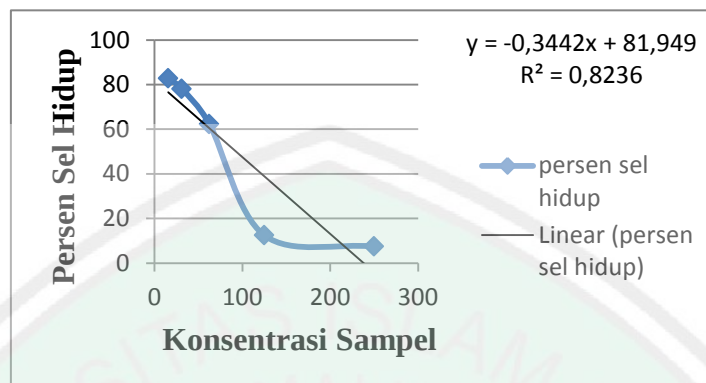
- Konsentrasi 500 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,599 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 83,976 \%$
- Konsentrasi 250 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,615 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 88,724 \%$
- Konsentrasi 125 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,613 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 88,131 \%$
- Konsentrasi 62,5 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,647 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 98,220 \%$
- Konsentrasi 31,25 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,656 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 100,890 \%$
- Konsentrasi 15,625 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,747 - 0,316}{0,653 - 0,316} \times 100 \% = 127,893 \%$

6. Zeolit NaX

- Konsentrasi 500 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,658 - 0,358}{0,784 - 0,358} \times 100 \% = 70,455 \%$
- Konsentrasi 250 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,655 - 0,358}{0,784 - 0,358} \times 100 \% = 69,749 \%$
- Konsentrasi 125 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,751 - 0,358}{0,784 - 0,358} \times 100 \% = 92,320 \%$
- Konsentrasi 62,5 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,635 - 0,358}{0,784 - 0,358} \times 100 \% = 65,047 \%$
- Konsentrasi 31,25 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,990 - 0,358}{0,784 - 0,358} \times 100 \% = 148,511 \%$
- Konsentrasi 15,625 $\rightarrow \% \text{ Hidup} = \frac{0,635 - 0,358}{0,784 - 0,358} \times 100 \% = 65,047 \%$

L.4.5 Hasil Perhitungan IC₅₀ dengan Excel

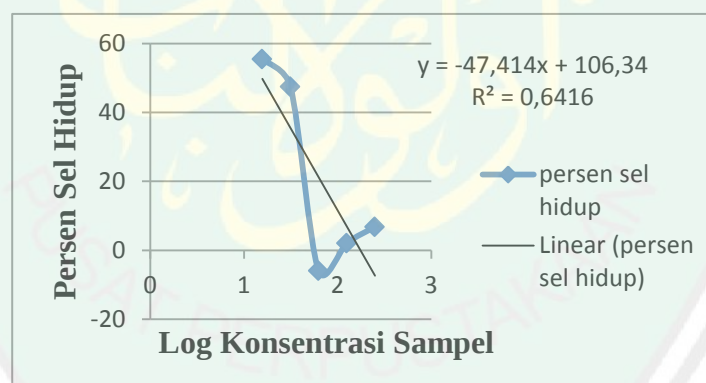
1. Ekstrak Hasil Maserasi



$$y = -0,3442x + 81,949$$

$$x = \frac{50 - 81,949}{-0,3442} = 92,821 \mu\text{g/mL}$$

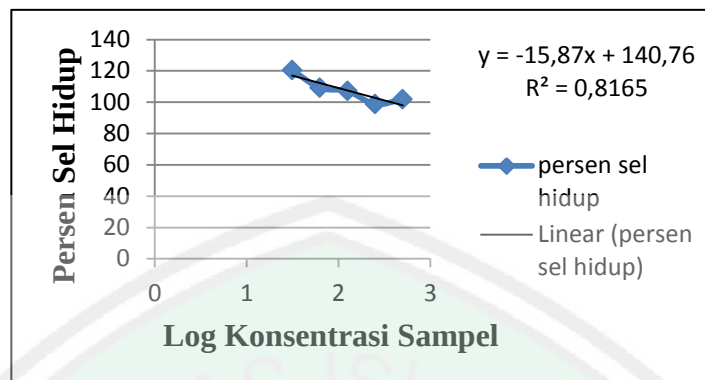
2. Ekstrak Hasil Fraksinasi



$$y = -47,414x + 106,34$$

$$x = \frac{50 - 106,34}{-47,414} = 15,417 \mu\text{g/mL}$$

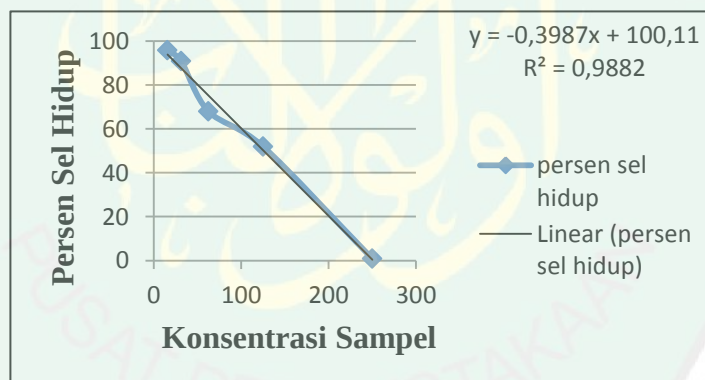
3. Isolat Hasil KLT



$$y = -15,87x + 140,76$$

$$x = \frac{50 - 140,76}{-15,87} = 523.600,437 \mu\text{g/mL}$$

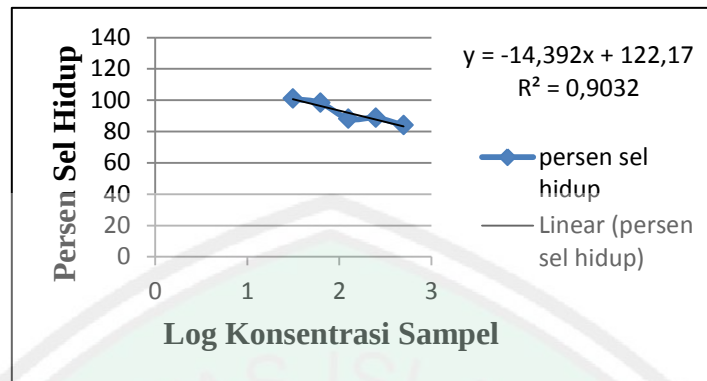
4. Kombinasi Ekstrak Hasil Maserasi: Zeolit NaX(5:10)



$$y = -0,3987x + 100,11$$

$$x = \frac{50 - 100,11}{-0,3987} = 125,683 \mu\text{g/mL}$$

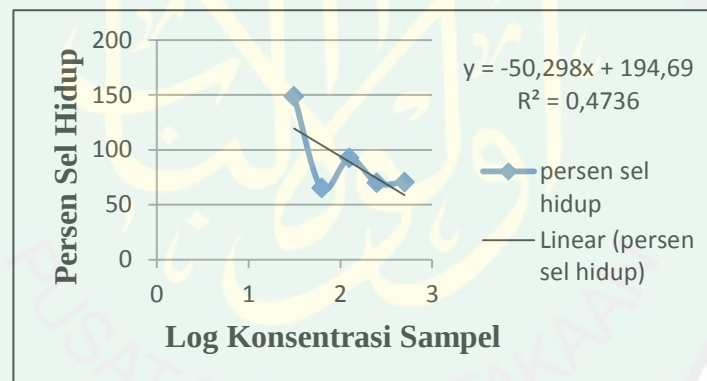
5. Kombinasi Isolat Hasil KLT: Zeolit NaX (5:10)



$$y = -14,392x + 122,17$$

$$x = \frac{50 - 122,17}{-14,392} = 103.514,217 \mu\text{g/mL}$$

6. Zeolit NaX



$$y = -50,298x + 194,69$$

$$x = \frac{50 - 194,69}{-50,298} = 753,356 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 5. Dokumentasi

L.5.1 Proses Maserasi



Pengeringan daun
sirsak



Serbuk daun sirsak



Maserasi



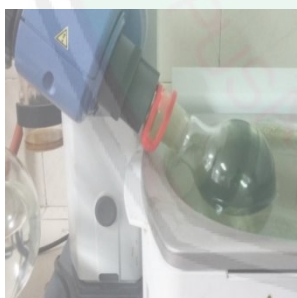
Proses pemisahan



Serbuk hasil penyaringan



Filtrat hasil maserasi



Penguapan pelarut
dengan *rotary
evaporator vaccum*



Ekstrak pekat daun sirsak

L.5.2 Proses Fraksinasi (Ekstraksi cair-cair)



Proses partisi dengan diklorometana dan air

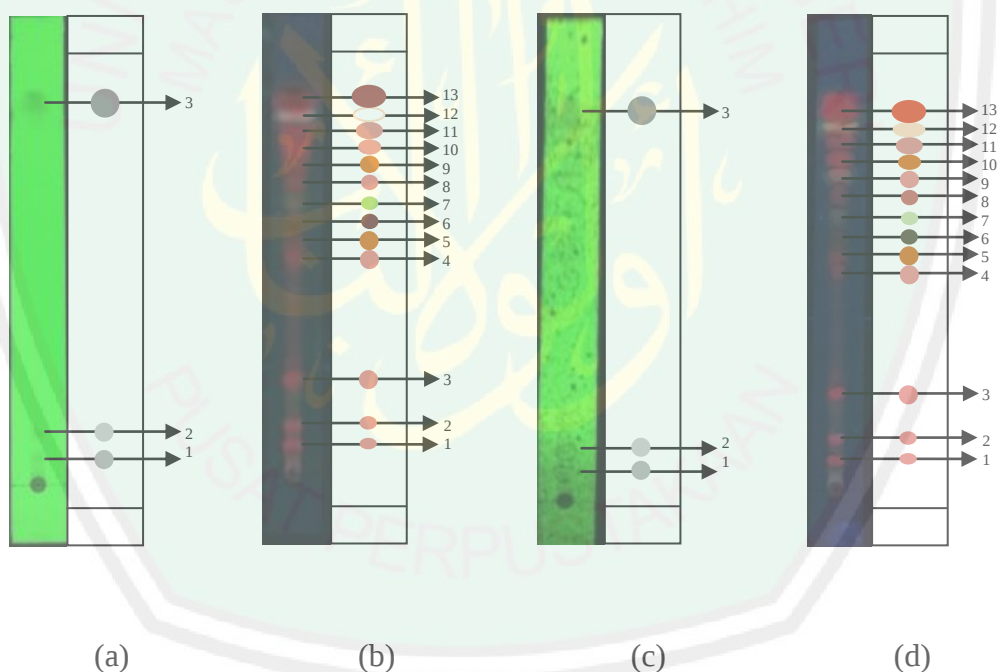


Proses partisi dengan n-heksana dan metanol



Ekstrak pekat hasil fraksinasi

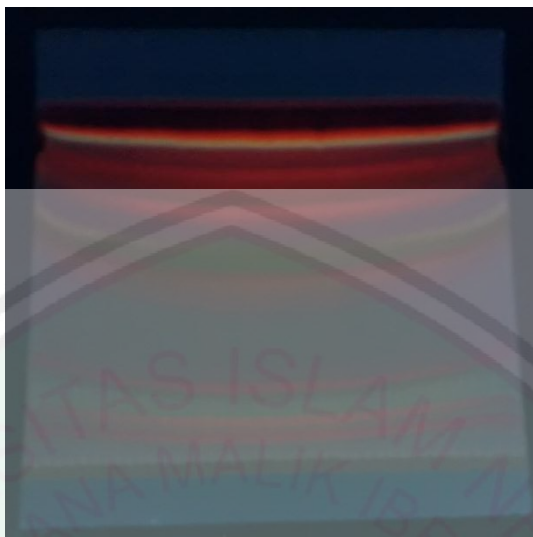
L.5.3 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTA



Hasil KLTA senyawa asetogenin dengan eluen metanol :diklorometana (1:19)

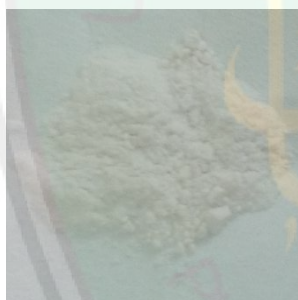
- (a) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ 254 nm sebelum disemprot reagen vanilin
- (b) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ 366 nm sebelum disemprot reagen vanilin
- (c) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ 254 nm setelah disemprot reagen vanilin
- (d) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ 366 nm setelah disemprot reagen vanilin

L.5.4 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTP



Gambar Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ 366 nm

L.5.5 Proses Impregnasi Ekstrak Hasil Fraksinasi Dan Isolat Hasil KLTP pada Zeolit NaX



Zeolit NaX



Pengadukan menggunakan stirrer



Pengeringan menggunakan oven



Hasil impregnasi ekstrak hasil fraksinasi: zeolit NaX (5:10)



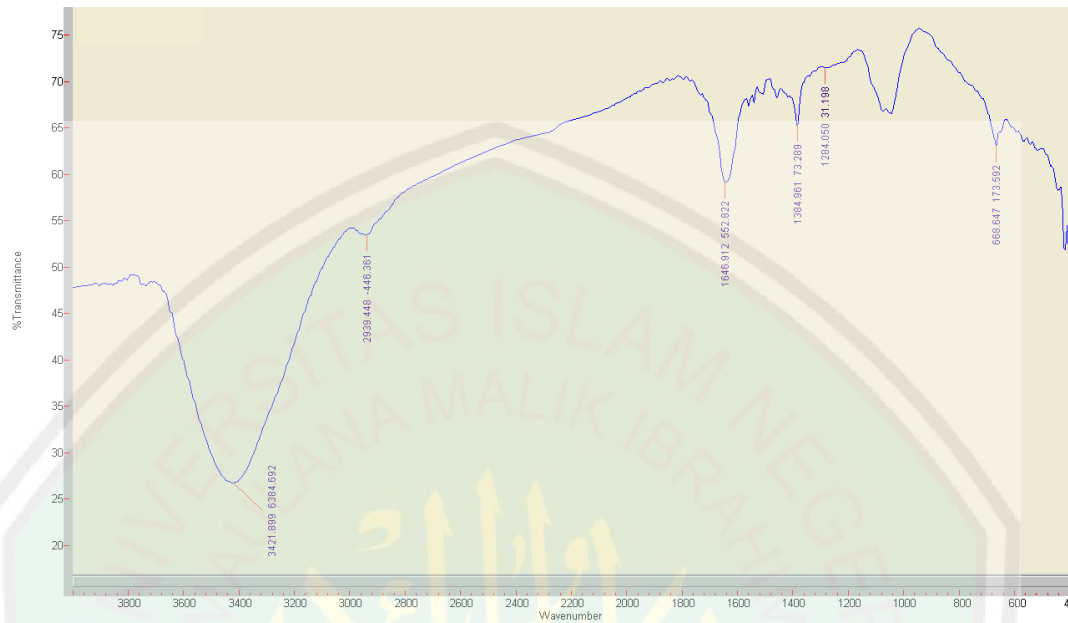
Pengadukan menggunakan stirrer



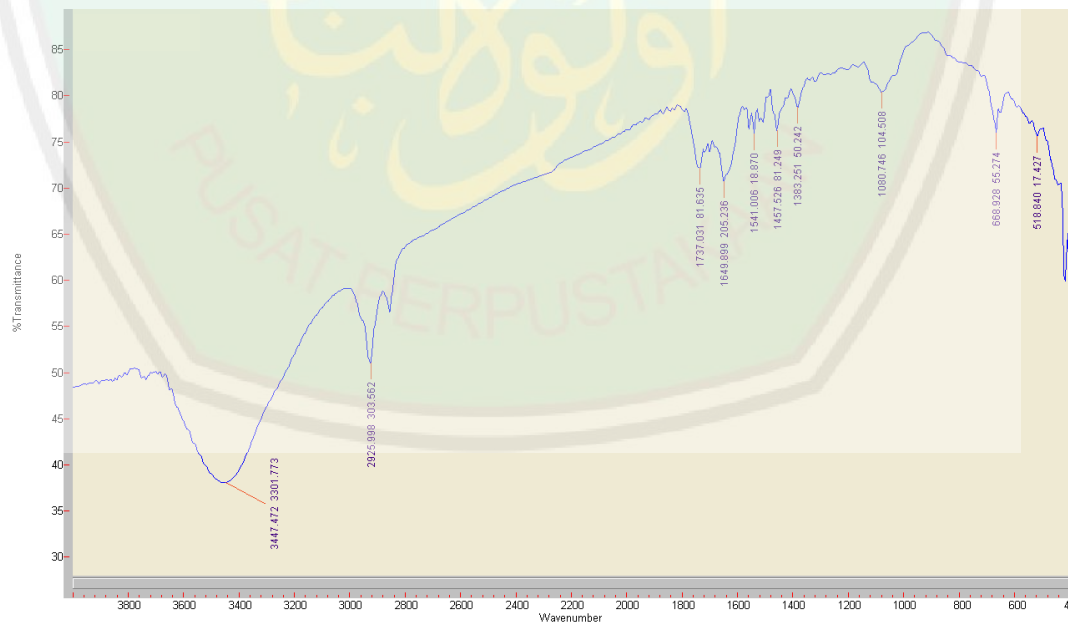
Hasil impregnasi isolat hasil KLTP: zeolit NaX (5:10)

L.5.6 Karakterisasi Hasil FTIR

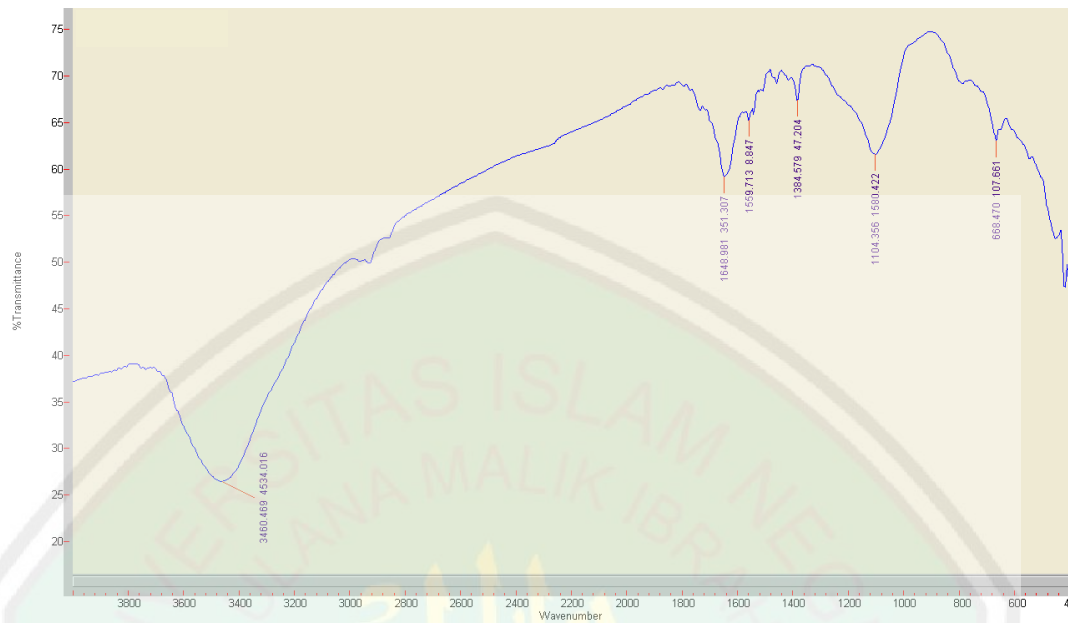
L.5.6.1 Spektra FTIR Ekstrak Hasil Maserasi



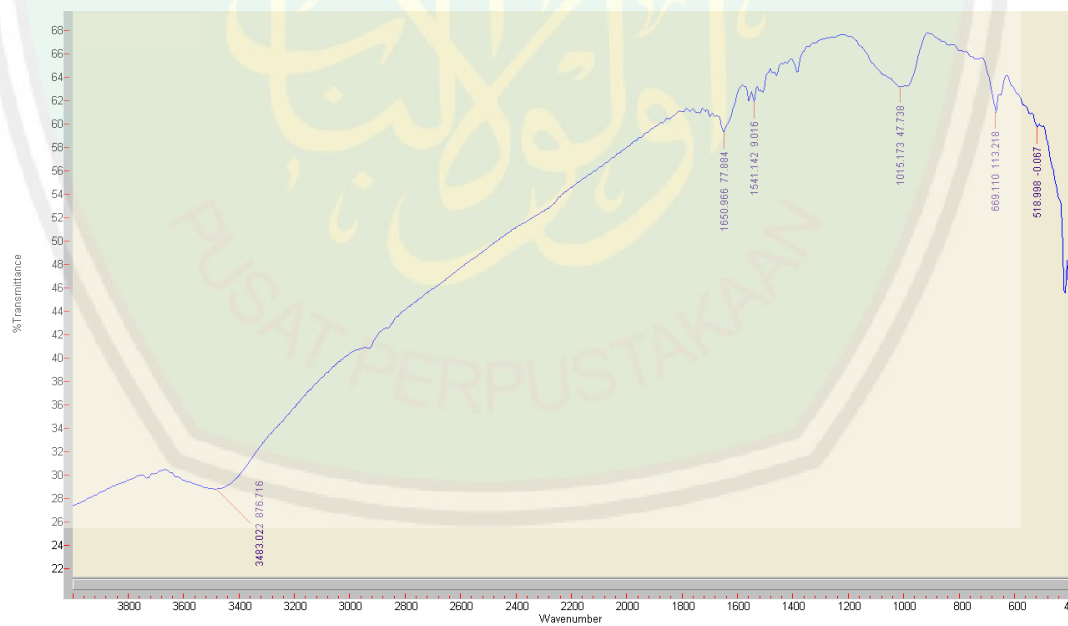
L.5.6.2 Spektra FTIR Ekstrak Hasil Fraksinasi



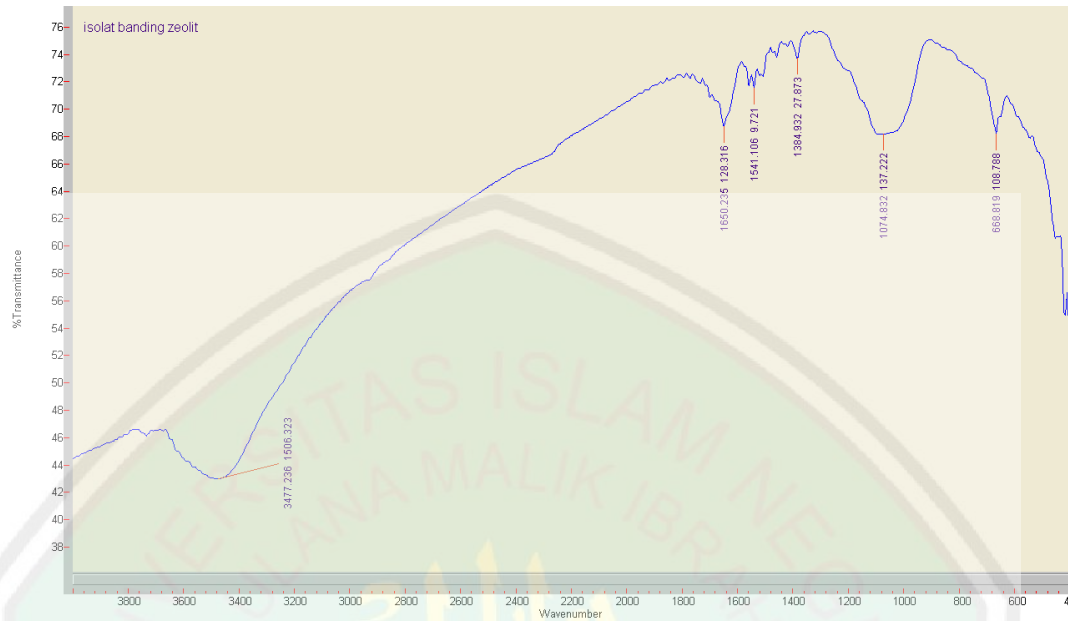
L.5.6.3 Spektra FTIR Isolat Hasil KLT



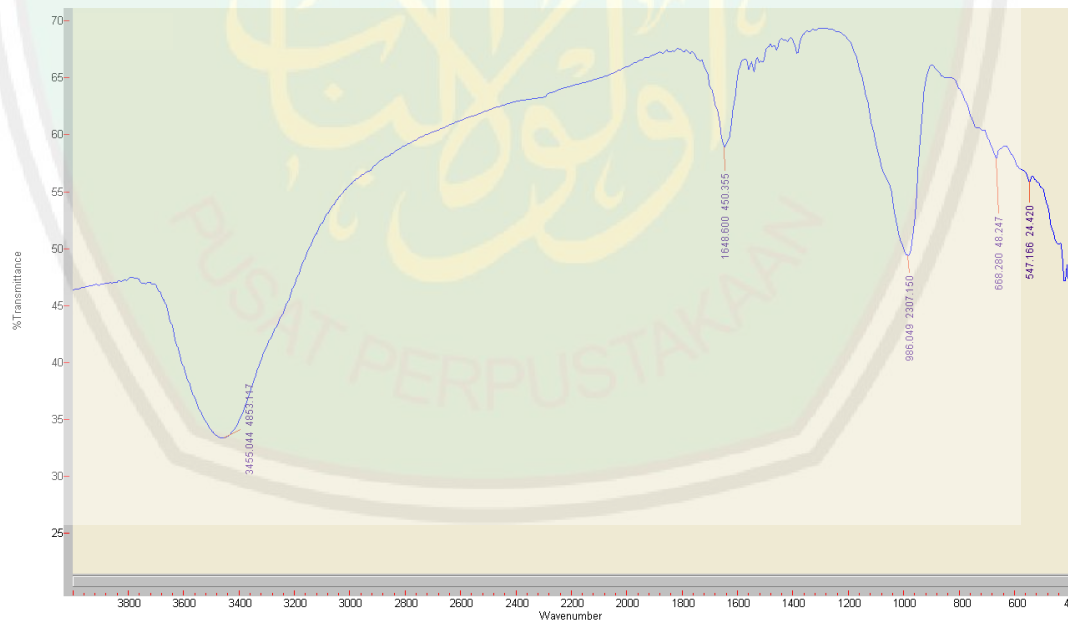
L.5.6.4 Spektra FTIR Ekstrak Hasil Fraksinasi : Zeolit NaX (5:10)



L.5.6.5 Spektra FTIR Isolat Hasil KLT: Zeolit NaX (5:10)



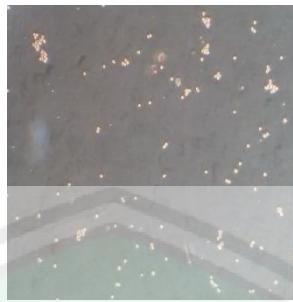
L.5.6.6 Spektra FTIR Zeolit NaX



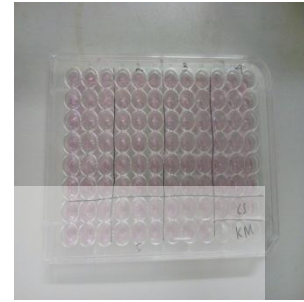
L.5.7 Uji Aktivitas Antikanker menggunakan Metode MTT



Pengamatan dan perhitungansel dibawah mikroskop inverted



Morfologi perhitungan sel



Peletakan sel pada *plate*



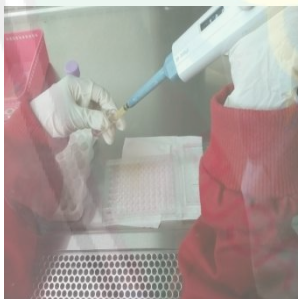
Penimbangan sampel



Hasil penimbangan sampel 10 mg



Pemberian DMSO pada sampel



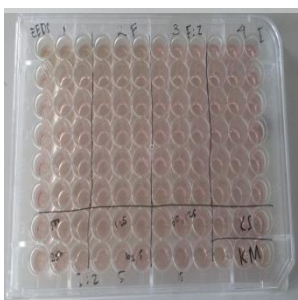
Pengenceran konsentrasi dan pemberian larutan sampel pada *plate*



Hasil peletakan sel dan sampel



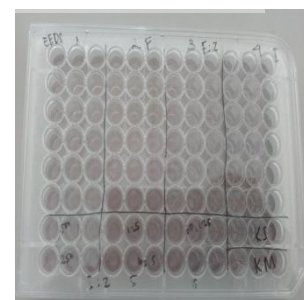
Hasil *treatment* sel dengan sampel



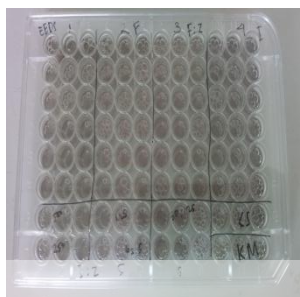
Pemberian larutan MTT



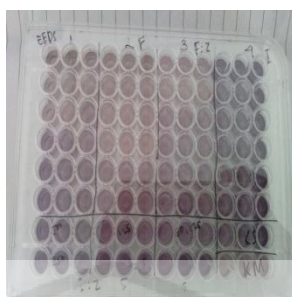
Inkubator CO₂/37 °C



Setelah pemberian larutan MTT



Pemberian stopper SDS



Setelah pemberian stopper SDS



Elisa reader

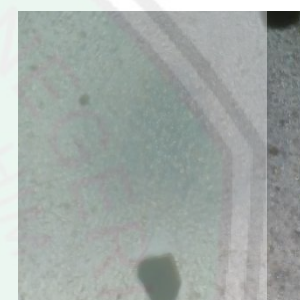
L.5.8 Morfologi Sel Kanker T-47D setelah Pemberian Larutan MTT



Ekstrak daun sirsak + sel konsentrasi 500 ppm



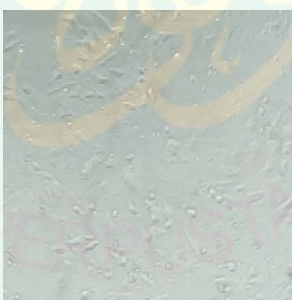
Fraksi metanol + sel konsentrasi 500 ppm



Fraksi : zeolit (5:10) + sel konsentrasi 500 ppm



Isolat + sel konsentrasi 500 ppm



Isolat : zeolit (5:10) + sel konsentrasi 500 ppm



Kontrol Sel