

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSISITAS DAN APOPTOSIS EKSTRAK FUKOIDAN FRAKSI AIR  
DARI SARGASSUM CRISTAEFOLIUM PADA SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

**SKRIPSI**

Oleh

**FEBY INDRIYANI BALQIS**

**NIM 165100501111034**



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**2021**



**UJI AKTIVITAS SITOTOKSISITAS DAN APOPTOSIS EKSTRAK FUKOIDAN  
FRAKSI AIR DARI SARGASSUM CRISTAEFOLIUM PADA SEL KANKER**

**PAYUDARA MCF-7**

**SKRIPSI**

Oleh

**FEBY INDRIYANI BALQIS**

**NIM 165100501111034**

Sebagai salah satu syarat memperoleh

**Gelar Sarjana Bioteknologi**



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**2021**





**LEMBAR PERSETUJUAN**

Judul TA : Uji Aktivitas Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Fukoidan Fraksi Air dari *Sargassum Cristaeofolium* pada Sel Kanker

Payudara MCF-7

Nama mahasiswa : Feby Indriyani Balqis

NIM : 165100501111034

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing I,

Dosen Pembimbing II,

Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA

NIP. 195906131986011001

Jhauharul M. STP., MP

NIP. 198912292019032013

Tanggal Persetujuan : 05-08-2021

**LEMBAR PENGESAHAN**

Judul TA : Uji Aktivitas Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Fukoidan Fraksi Air dari *Sargassum Cristaeofolium* pada Sel

Kanker Payudara MCF-7

Nama mahasiswa : Feby Indriyani Balqis

NIM : 165100501111034


Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

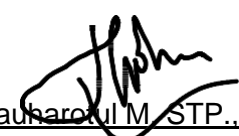
Dosen Penguji I,

  
Jaya Mahar Maligan, STP. MP  
NIP. 198201142008121003

Dosen Pembimbing I,

  
Prof. Dr. Ir. Yuniarta, DEA  
NIP. 195906131986011001

Dosen Pembimbing II,

  
Jhaubarul M, STP., MP  
NIP. 198912292019032013

Ketua Jurusan,

  
Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, S.TP., M.P.  
NIP. 197005041999032002

Tanggal Persetujuan : 05-08-2021



## RIWAYAT HIDUP

Feby Indriyani Balqis merupakan seorang perempuan dengan tempat kelahiran di kota Bogor, Jawa Barat pada tanggal 11 Februari 1998. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Sebelum menempuh pendidikan di Universitas Brawijaya, penulis sebelumnya telah menyelesaikan jenjang pendidikan formal, antara lain pendidikan sekolah dasar di SD Negeri Cantang Jaya Bogor dan lulus pada tahun 2010, dilanjutkan dengan pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 15 Bogor dan lulus pada tahun 2013. Kemudian menyelesaikan pendidikan menengah atas di SMA Negeri 1 Batam dengan jurusan MIA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) dan lulus pada tahun 2016. Masa sekolah oleh penulis dimanfaatkan untuk mengikuti berbagai kegiatan ekstrakurikuler sekolah, perlombaan akademik maupun non akademik, serta aktif pada berbagai organisasi sekolah, seperti OSIS, Kerohanian Islam, Pramuka, Palang Merah Remaja, Paduan Suara dan Paskibra.

Pada tahun 2016 penulis resmi menjadi mahasiswa Universitas Brawijaya, Fakultas Teknologi Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Program Studi Bioteknologi melalui seleksi SNMPTN. Pada masa perkuliahan penulis pernah aktif pada berbagai kegiatan kampus. Seperti bergabung dalam organisasi Lembaga Kegiatan Mahasiswa, yaitu ARSC (*Agritech Research & Study Club*) pada departemen RISTEK (Riset dan Teknologi). Penulis pernah berkontribusi dalam kegiatan Orientasi Pengenalan Jurusan dan Himpunan (OPJH) THP pada tahun 2017 sebagai staff Divisi Acara. Selain itu juga pada kegiatan *Scientific Great Moment* pada tahun 2017 sebagai staff Divisi Humas dan divisi LO (*Liaison officer*). Pengalaman akademik selain perkuliahan, yang didapat penulis adalah pengalaman PKL di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati UB (LSIH-UB) dengan fokus analisis *Myeloma cell line* dalam pembuatan antibodi monoklonal.

## PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Feby Indriyani Balqis

NIM : 165100501111034

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Judul Tugas Akhir : Uji Aktivitas Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Fukoidan Fraksi Air dari *Sargassum Cristaeifolium* pada Sel Kanker Payudara MCF-7

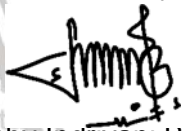
Menyatakan bahwa,

Tugas Akhir dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut di atas.

Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya bersedia dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Malang, Juni 2021

Pembuat Pernyataan,



Feby Indriyani Balqis

NIM. 165100501111034





**PERNYATAAN PEMBIAYAAN TUGAS AKHIR**

Penelitian ini merupakan bagian dari Proyek Penelitian a.n :

Nama Dosen : Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA

NIP : 195906131986011001

Nama Penelitian : Ekstrak Fukoidan sebagai Senyawa Antikanker

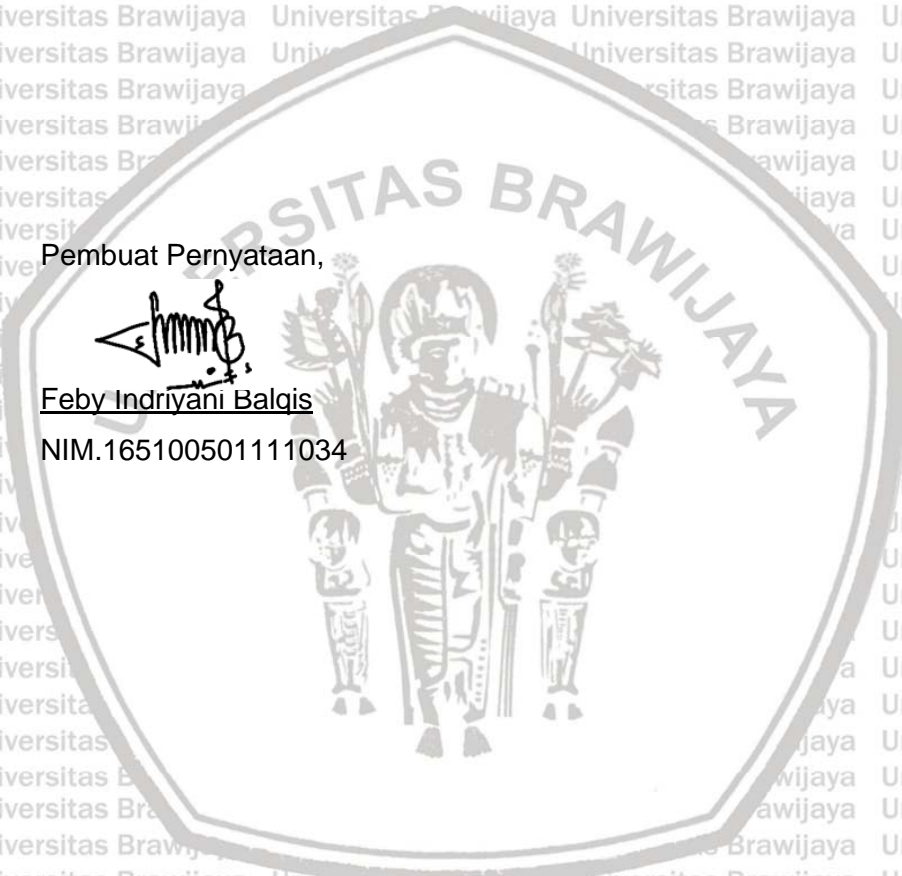
dan penelitian untuk tugas akhir ini dibiayai dari proyek tersebut.

Pembuat Pernyataan,



Feby Indriyani Balqis

NIM.165100501111034



**FEBY INDRIYANI BALQIS. 165100501111034. Uji Aktivitas Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Fukoidan Fraksi Air dari *Sargassum Cristaefolium* pada Sel Kanker Payudara MCF-7. TA. Pembimbing: Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA dan Jhauharotul M, STP., MP**

---

**RINGKASAN**

Senyawa fukoidan merupakan kelompok polisakarida bersulfat yang terdapat pada alga coklat. Senyawa ini memiliki struktur dan komposisi kimia yang sangat beragam tergantung pada jenis dan kondisi lingkungannya. Diketahui fukoidan memiliki aktivitas biologis seperti antioksidan, antivirus dan antibakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak fukoidan dari alga coklat *Sargassum cristaefolium* fraksi air terhadap sitotoksitas dan apoptosis sel kanker payudara MCF-7. Aktivitas sitotoksitas dilakukan dengan uji MTT selama 24 jam menggunakan variasi ekstrak fukoidan sebesar 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800 µg/ml. Selanjutnya viabilitas sel hidup dihitung menggunakan Haemocytometer dengan variasi waktu inkubasi sebesar 24, 48 dan 72 jam. Uji apoptosis dilakukan dengan pewarnaan sel menggunakan pewarna *Hoechst 33342* dengan variasi 24, 48 dan 72 jam.

Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas sitotoksitas sel MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 319,134 µg/ml. Hasil pada uji apoptosis menunjukkan bahwa ekstrak fukoidan dari *Sargassum cristaefolium* fraksi air mampu menginduksi apoptosis sel MCF-7. Hal tersebut menunjukkan bahwa waktu inkubasi memiliki pengaruh signifikan pada viabilitas sel MCF-7. Pada perlakuan 24, 48 dan 72 jam dihasilkan persen viabilitas sel hidup sebesar 50,27%, 34,56 %, dan 29,97 %.

**Kata Kunci:** Senyawa fukoidan, *Sargassum cristaefolium*, sitotoksitas, apoptosis, MCF-7



FEBY INDRIYANI BALQIS. 165100501111034. Uji Aktivitas Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Fukoidan Fraksi Air dari *Sargassum Cristaefolium* pada Sel Kanker Payudara MCF-7. TA. Pembimbing: Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA dan Jhauharotul M, STP., MP

---

### SUMMARY

Fucoidan compound are groups of sulfated polysaccharides found in brown algae. These compounds have a very diverse structure and chemical composition depending on the type and environmental conditions. Fucoidan is known to have biological activities such as antioxidant, antiviral and antibacterial.

This study aimed to determine the activity of fucoidan extract from brown algae *Sargassum cristaefolium* water fraction against cytotoxicity and apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. Cytotoxicity activity was carried out by MTT test for 24 hours using a variation of fucoidan extract of 12.5; 25; 50; 100; 200; 400 and 800 µg/ml. Furthermore, the viability of living cells was calculated using a haemocytometer with variations in incubation time of 24, 48, and 72 hours. The apoptosis test was carried out by staining cells using the Hoechst 33342 with variations in 24, 48 and 72 hours.

The results showed the presence of cytotoxicity activity of MCF-7 cells with an IC<sub>50</sub> value of 319.134 µg/ml. The results of the apoptosis test showed that the aqueous fraction of fucoidan extract from *Sargassum cristaefolium* was able to induce apoptosis of MCF-7 cells. It was shown that incubation time had a significant effect on the viability of MCF-7 cells. In the 24, 48 and 72 hours treatment, the percentage of viability of live cells was 50.27%, 34.56 %, and 29.97%.

**Keywords:** *Fucoidan compounds, Sargassum cristaefolium, cytotoxicity, apoptosis, MCF-7*



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang berkat limpahan berkah dan rahmat-Nya proposal tugas akhir dengan judul “Uji Aktivitas Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Fukoidan Fraksi Air dari *Sargassum Cristaefolium* pada Sel Kanker Payudara MCF-7” dapat diselesaikan dengan baik pada waktu yang tepat. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dan membimbing penulis dalam menyelesaikan proposal ini. Rasa terima kasih dari lubuk hati yang paling dalam ditujukan kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Yuniarta, DEA selaku dosen pembimbing ke-1 yang telah memberikan dukungan, bimbingan, dan arahan selama penyusunan skripsi.
2. Jhauharotul M, STP., MP selaku dosen pembimbing ke-2 yang telah memberikan dukungan, bimbingan, dan arahan selama penyusunan skripsi.
3. Dr. Widya Dwi Rukmi, STP., MP selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya.
4. Seluruh civitas akademik dan non-akademik Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya yang selalu membantu.
5. Keluarga yang selalu memberikan dukungan dan doa selama penulis melaksanakan penyusunan skripsi.
6. Ibu Ocha, Ibu Helly dan Mba Unil yang telah memberikan bimbingan dan dukungan selama mengerjakan penelitian di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya.
7. Teman – teman proyek fukoidan yang selalu memberikan dukungan dan bantuan dalam melakukan penelitian dan penulisan skripsi.

Penulis meyakini dalam penulisan proposal ini masih banyak kekurangan dan kesalahan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dan bermanfaat. Demikian proposal ini dibuat, semoga dapat menjadi perantara dalam penelitian-penelitian lebih lanjut di ranah antikanker.

Malang, Juni 2021

Penulis



**DAFTAR ISI**

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR.....	v
PERNYATAAN PEMBIAYAAN TUGAS AKHIR.....	vi
RINGKASAN.....	vii
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.5 Hipotesis.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Sargassum cristaefolium.....	5
2.2 Senyawa Fukoidan.....	6
2.3 Ekstraksi Fukoidan.....	10
2.4 Kanker.....	12
2.4.1 Tipe Kanker.....	14
2.4.2 Penyebab dan Karakteristik.....	15
2.5 Kanker Payudara.....	15
	x



2.5.1 Gejala .....	16
2.5.2 Faktor Resiko .....	17
2.5.3 Tes Penentuan Stadium Kanker Payudara .....	17
2.5.4 Stadium Kanker Payudara .....	18
2.6 Pengobatan Kanker Payudara .....	19
2.6.1 Operasi .....	20
2.6.2 Terapi .....	20
2.7 Sel MCF-7 .....	21
2.8 Uji MTT .....	23
2.9 Apoptosis .....	24
2.10 Haemocytometer .....	27
2.11 Pewarna Hoechst .....	29
BAB III METODE PENELITIAN .....	31
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan .....	31
3.2 Alat dan Bahan .....	31
3.2.1 Alat .....	31
3.2.2 Bahan .....	31
3.3 Metodologi .....	31
3.4 Pelaksanaan .....	33
3.4.1 Pembuatan Konsentrasi Fukoidan .....	33
3.4.2 Pembuatan Media Kultur Sel .....	33
3.4.3 Kultur cell line MCF-7 .....	34
3.4.4 Penggantian Media Kultur .....	35
3.4.5 Panen Sel dan Perhitungan Sel dengan Haemocytometer .....	35
3.4.6 Uji Sitotoksik dengan metode MTT .....	36
3.4.7 Uji Apoptosis pewarnaan sel dengan pewarna Hoechst 33342 .....	37
3.4.8 Uji Perhitungan Sel Hidup dengan Haemocytometer .....	39
3.5 Analisis Data .....	41



3.5.1	Nilai IC50 dari Uji Sitotoksik Ekstrak Fukoidan .....	41
3.5.2	Uji Apoptosis dengan pewarnaan sel menggunakan pewarna Hoechst 33342 .....	41
3.5.3	Uji Perhitungan Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer .....	41
3.6	Diagram Alir Penelitian .....	42
3.6.1	Pembuatan Konsentrasi Fukoidan .....	42
3.6.2	Pembuatan Media Kultur Sel .....	43
3.6.3	Kultur cell line MCF-7 .....	44
3.6.4	Penggantian Media Kultur .....	45
3.6.5	Panen sel dan Perhitungan Sel dengan Haemocytometer .....	46
3.6.6	Uji Sitotoksik dengan metode MTT .....	48
3.6.7	Uji Apoptosis pewarnaan sel dengan pewarna Hoechst 33342 .....	49
3.6.8	Uji Perhitungan Sel Hidup dengan Haemocytometer .....	51
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	53
4.1	Pembuatan Konsentrasi Fukoidan .....	53
4.2	Uji Sitotoksik dengan Metode MTT .....	54
4.3	Uji Apoptosis pewarnaan sel dengan pewarna Hoechst 33342 .....	57
4.4	Perhitungan Jumlah Sel Hidup dengan Haemocytometer .....	60
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN .....	65
5.1	Kesimpulan .....	65
5.2	Saran .....	65
DAFTAR PUSTAKA	.....	66
LAMPIRAN	.....	75

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Nilai IC50 ekstrak fukoidan pada berbagai jenis spesies alga coklat terhadap sel kanker payudara MCF-7..... 9

Tabel 4. 1 Hasil uji lanjut Tukey lama waktu inkubasi terhadap jumlah sel MCF7 ..... 61





**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2. 1 Morfologi *S. cristaefolium* dan struktur double-bladed ..... 5

Gambar 2. 2 Posisi ikatan glikosidik pada fukoidan ..... 7

Gambar 2. 3 Struktur fukoidan pada berbagai spesies alga coklat..... 8

Gambar 2. 4 Proses invasi-metastatis sel kanker ke jaringan lain..... 14

Gambar 2. 5 Kultur MCF-7 hari ke-6 pada skala 500  $\mu\text{m}$  ..... 21

Gambar 2. 6 Reaksi reduksi MTT ke MTT formazan..... 24

Gambar 2. 7 Perbedaan morfologi sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis 25

Gambar 2. 8 Jalur intrinsik dan ekstrinsik pada proses apoptosis sel..... 27

Gambar 2. 9 Perlengkapan Haemocytometer ..... 28

Gambar 2. 10 Struktur kimia *Hoechst* 3258 dan *Hoechst* 33342..... 30

Gambar 3. 1 Desain Penelitian Pengaruh Ekstrak Fukoidan Terhadap Sitotoksitas dan Apoptosis Sel MCF-7..... 32

Gambar 3. 2 Pembuatan Konsentrasi Fukoidan ..... 42

Gambar 3. 3 Pembuatan Media Kultur Sel..... 43

Gambar 3. 4 Kultur cell line MCF-7 ..... 44

Gambar 3. 5 Penggantian Media Kultur ..... 45

Gambar 3. 6 Panen sel dan Perhitungan Sel dengan Haemocytometer ..... 47

Gambar 3. 7 Uji Sitotoksik dengan metode MTT..... 48

Gambar 3. 8 Uji Apoptosis dengan Metode *Hoechst* 33342..... 50

Gambar 3. 9 Uji Perhitungan Sel dengan Metode *Haemocytometer*..... 52

Gambar 4. 1 Larutan Ekstrak Fukoidan *S. cristaefolium* Fraksi Air ..... 53

Gambar 4. 2 Sel hidup MCF-7 yang telah diberikan larutan MTT pada perbesaran mikroskopis 100X..... 55

Gambar 4. 3 Grafik persen viabilitas sel MCF-7 terhadap konsentrasi ekstrak fukoidan *S. cristaefolium* fraksi air..... 56

Gambar 4. 4 Sel MCF-7 yang telah diwarnai oleh reagen *Hoechst* 33342 pada perbesaran mikroskopis 200X..... 58

Gambar 4. 5 Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi (Jam) terhadap Jumlah Sel MCF-7 (sel/mL)..... 62

Gambar 4. 6 Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi (Jam) terhadap Persen Viabilitas Sel MCF-7 (%) ..... 64

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1 Perhitungan dalam Pemilihan Variasi Konsentrasi Sampel ..... 75

Lampiran 2 Perhitungan Pengenceran Ekstrak Fukoidan ..... 76

Lampiran 3 Desain Microplate 96 Well dan Hasil Pengolahan Data pada Uji  
Sitotoksik MTT ..... 78

Lampiran 4 Desain Microplate 24 Well pada Uji Pewarnaan Sel dengan Pewarna  
Hoechst ..... 81

Lampiran 5 Desain Microplate 96 Well dan Hasil Pengolahan Data pada Uji  
Perhitungan Sel Hidup dengan Haemocytometer ..... 82

Lampiran 6 Dokumentasi Kultur Sel MCF-7 ..... 86





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Sargassum cristaefolium* merupakan salah satu spesies makroalga coklat (*Phaeophyta*) yang tersebar luas di perairan laut dunia (Satyarsa, 2019). Di perairan laut Indonesia *S. cristaefolium* sering dianggap sebagai sampah bagi para nelayan dikarenakan mengganggu bagi pelayaran kapal nelayan. Selama ini makroalga tersebut hanya dimanfaatkan sebagai campuran pembuatan pupuk dan pakan hewan ternak (Umam, 2017). Pada penelitian Kartikaningsih (2020), diketahui bahwa *S. cristaefolium* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thyposa*. Fukoidan merupakan polisakarida tersulfasi yang banyak diekstrak dari rumput laut coklat (*Phaeophyta*). Senyawa ini memiliki struktur dan komposisi kimia yang sangat beragam tergantung pada lokasi geografis, umur populasi, spesies dan musim (Lim dan Aida, 2017). Diketahui bahwa fukoidan memiliki aktivitas biologis yang kuat, seperti antioksidan, antivirus, antikoagulan, antikanker dan antibakteri (Ale *et al.*, 2011b). Selain itu diketahui bahwa fukoidan bersifat antihipertensi, dimana dapat menghambat produksi plasma angiotestinin II (Taylor, 2011). Pada penelitian yang dilakukan oleh Ale *et al.* (2011b), diketahui bahwa ekstrak fukoidan yang diekstraksi menggunakan pelarut air memiliki kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan pelarut asam. Dimana pada penelitian Puspantari *et al.* (2020), diketahui bahwa berat molekul dan gugus fungsi yang dihasilkan oleh pelarut air lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan pelarut asam. Diketahui juga bahwa gugus fungsi pada struktur fukoidan memiliki peranan yang penting dalam menghasilkan kemampuan bioaktivitasnya.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Zhang *et al.* (2013), diketahui bahwa fukoidan dari *Sargassum sp.* dapat menghambat proliferasi pada sel kanker payudara, yaitu *cell line* MCF-7, MDA-MB-231, dan 4T1 sebesar 80% secara *in vivo*. Menurut Satyarsa (2019), diketahui bahwa fukoidan dari *Sargassum sp.* merupakan agen pro-apoptosis terhadap sel kanker payudara dengan efektifitas sebesar 68% pada *cell line* MCF-7 dan MDA-MB-231 secara *in vivo*. Senyawa fukoidan dari *Sargassum sp.* memiliki keunggulan, diantaranya adalah multitarget dalam melakukan apoptosis pada sel kanker secara maksimal, memiliki potensi yang besar sebagai agen anti-metastatis sel kanker,



dan dapat didegradasi oleh makrofag sehingga tidak meninggalkan zat asing yang berbahaya di dalam tubuh.

Kanker payudara merupakan suatu penyakit dimana sel kanker berkembang di jaringan payudara dan menyebabkan kematian (Novianti dan Purnami, 2012). Pada tahun 2018, kanker payudara menempati posisi pertama di Indonesia dengan jumlah penderita baru sebesar 58.256 jiwa (Ferlay *et al.*, 2019). Saat ini pengobatan kanker memiliki kekurangan, seperti harga yang mahal dan terkadang memiliki efek samping (Sirait *et al.*, 2019). Pada pengobatan kemoterapi, efek samping yang dihasilkan sangat kuat. Hal tersebut terjadi karena obat-obatan kemoterapi tidak hanya menyerang sel kanker, tetapi juga menyerang sel normal yang memiliki sifat proliferasi yang cepat, (Pratama dan Nuwarda, 2018). Karena adanya efek samping dari pengobatan tersebut, diperlukan penelitian yang diarahkan pada pengujian bahan alami yang berpotensi sebagai senyawa antikanker atau kemoprevensi (agen pendamping kemoterapi) yang memiliki aktivitas penghambat proliferasi tumor, pemacuan apoptosis sel kanker dan menghambat ekspresi protein yang berperan pada *Multi Drug Resistance* (Meiyanto *et al.*, 2008).

Dalam tulisan ini akan dilakukan penelitian mengenai pengaruh ekstrak fukoidan dari alga coklat *S. cristaefolium* yang diekstraksi dengan pelarut air terhadap aktivitas sitotoksitas dan apoptosis sel kanker payudara MCF-7. Penelitian ini dimulai dengan uji sitotoksitas dengan metode MTT untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$ , dimana nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi terbaik yang mampu menghambat proliferasi sel kanker sebanyak 50% (Meiyanto *et al.*, 2008). Pada uji sitotoksik ini digunakan variasi konsentrasi ekstrak fukoidan sebesar 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800  $\mu\text{g/ml}$ . Pemilihan variasi konsentrasi tersebut berdasarkan pada protokol *Cancer Chemoprevention Research Center* (Junedi, 2010b). Kemudian dilanjutkan dengan uji apoptosis menggunakan metode pewarnaan sel dengan *Hoechst 33342* dan perhitungan viabilitas sel hidup menggunakan alat *Haemocytometer* dengan variasi lama waktu inkubasi sel MCF-7 selama 24, 48 dan 72 jam untuk mengetahui aktivitas apoptosis dan proliferasi sel MCF-7 terhadap pengaruh konsentrasi ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* fraksi air setara nilai  $IC_{50}$ . Analisis dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* dan mikroskop *fluorescence*.



## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- 1) Apakah variasi konsentrasi ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* fraksi air memiliki pengaruh terhadap aktivitas sitotoksitas sel MCF-7?
- 2) Berapa nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak fukoidan *S. cristaefolium* fraksi air terhadap sel MCF-7?
- 3) Apakah variasi lama waktu inkubasi sel dengan ekstrak fukoidan setara nilai  $IC_{50}$  dari *S. cristaefolium* fraksi air memiliki pengaruh terhadap aktivitas proliferasi dan apoptosis sel MCF-7?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka penelitian ini bertujuan untuk:

- 1) Mengetahui pengaruh variasi konsentrasi ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* terhadap aktivitas sitotoksitas sel MCF-7.
- 2) Mengetahui nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak fukoidan *S. cristaefolium* fraksi air terhadap sel MCF-7.
- 3) Mengetahui pengaruh variasi lama waktu inkubasi sel dengan ekstrak fukoidan setara nilai  $IC_{50}$  dari *S. cristaefolium* fraksi air terhadap aktivitas proliferasi dan apoptosis sel MCF-7.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat untuk:

- 1) Memberikan kontribusi baru dalam ilmu pengetahuan mengenai senyawa antikanker yang dihasilkan oleh ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* fraksi air.
- 2) Memberikan informasi mengenai pengaruh variasi konsentrasi ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* fraksi air terhadap aktivitas sitotoksik sel MCF7.
- 3) Memberikan informasi mengenai pengaruh variasi lama waktu inkubasi sel dengan ekstrak fukoidan setara nilai  $IC_{50}$  dari *S. cristaefolium* fraksi air terhadap aktivitas proliferasi dan apoptosis sel MCF-7

## 1.5 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

1. Diduga variasi seri konsentrasi ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* fraksi air memberikan pengaruh terhadap aktivitas sitotoksitas pada sel MCF-7.
2. Diduga variasi lama waktu inkubasi sel MCF-7 menggunakan ekstrak fukoidan dengan konsentrasi setara nilai  $IC_{50}$  memberikan pengaruh terhadap aktivitas proliferasi dan apoptosis sel MCF-7.





## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Sargassum cristaefolium*

*S. cristaefolium* adalah spesies makroalga coklat (*Phaeophyta*). Dimana spesies ini merupakan salah satu dari 200 jenis *Sargassum* yang tersebar luas di perairan laut dunia (Satyarsa, 2019). Klasifikasinya menurut Umam (2017) adalah sebagai berikut:

Empire	: <i>Eukaryota</i>
Kingdom	: <i>Chromista</i>
Phylum	: <i>Ochrophyta</i>
Kelas	: <i>Phaeophyceae</i>
Sub Kelas	: <i>Fucophycidae</i>
Ordo	: <i>Fucales</i>
Family	: <i>Sargassaceae</i>
Genus	: <i>Sargassum</i>
Spesies	: <i>Sargassum cristaefolium</i> C.Agardh



**Gambar 2. 1** Morfologi *S. cristaefolium* dan struktur *double-bladed* (Leliaert et al., 2011)

Makroalga ini memiliki *thallus* yang besar berwarna coklat gelap. Memiliki akar yang berbentuk cakram (*discoïd holdfast*), dimana ukurannya kurang dari 1 cm dan melekat pada bebatuan. Terdapat batang berukuran



pendek dan berbentuk ramping yang tumbuh diatas akar, dimana pada batang tersebut tumbuh 1 atau 2 cabang utama yang halus dan agak padat (Carpenter dan Niem, 1998). Pada cabang batang utamanya terdapat daun dan vesikel yang tersusun secara horizontal. Dimana daun tersebut berbentuk lonjong dengan permukaan yang lebar, panjangnya 2.5 sampai 3.5 cm dan bergerigi kasar pada bagian tepinya serta memiliki bentuk ujung helai daun yang ganda (*double-bladed*). Sementara vesikel yang terdapat pada cabang batang memiliki bentuk bulat lonjong seperti telur dan berdurri dengan panjang 4 mm dan lebar 3 mm serta memiliki batang berbentuk silindris (Santiañez dan Trono Jr, 2013).

*S. cristaefolium* dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian 50 cm dan memiliki tekstur tubuh yang kasar dan kaku menyerupai *Turbinaria* (Leliaert *et al.*, 2011). Memiliki percabangan *dichotomous* (bercabang dua terus-menerus) sehingga membentuk rangkaian yang rimbun dan rapat seperti kembang kol (Farchan dan Mulyono, 2011). *S. cristaefolium* memiliki habitat pada daerah lereng terumbu karang di pesisir pantai terbuka. Makroalga ini hidup tersebar di area perairan Samudra Indo-Pasifik (Leliaert *et al.*, 2011).

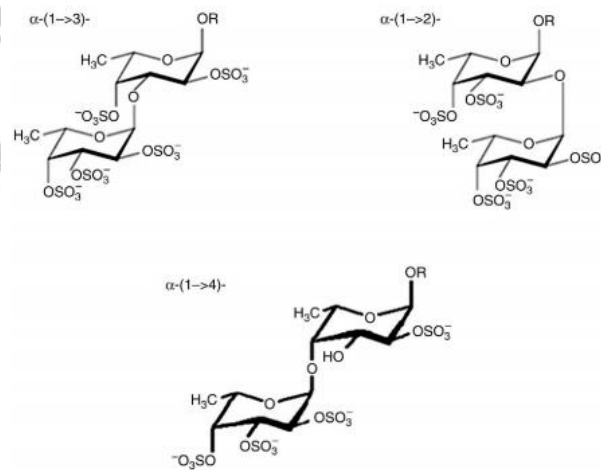
*S. cristaefolium* berpotensi dalam industri farmasi, makanan, tekstil dan kosmetik dikarenakan pada makroalga tersebut memiliki kandungan alginat, tannin, iodin, fenol, Mg, Na, dan Fe. Selain itu diketahui bahwa *S. cristaefolium* menghasilkan senyawa bioaktif seperti menghambat aktivitas enzim, antivirus, antibakteri dan antitumor, serta mengandung triterpenoid, alkaloida, steroida dan fenol. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh *S. cristaefolium* tersebut merupakan hasil dari metabolit sekundernya (Umam, 2017). Pada penelitian Kartikaningsih (2020), diketahui bahwa *S. cristaefolium* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella thyposa* serta aktivitas antioksidan karena mengandung senyawa flavonoid, tannin, steroid, triterpenoid, dan alkaloid.

## 2.2 Senyawa Fukoidan

Senyawa fukoidan merupakan istilah yang digunakan untuk menamai kelompok polisakarida bersulfat yang kaya akan substansi L-fukosa dan ester sulfat. Dimana senyawa ini terdiri dari berbagai senyawa, seperti galaktosa, xilosa dan asam glukoronat. Fukoidan dapat diekstraksi



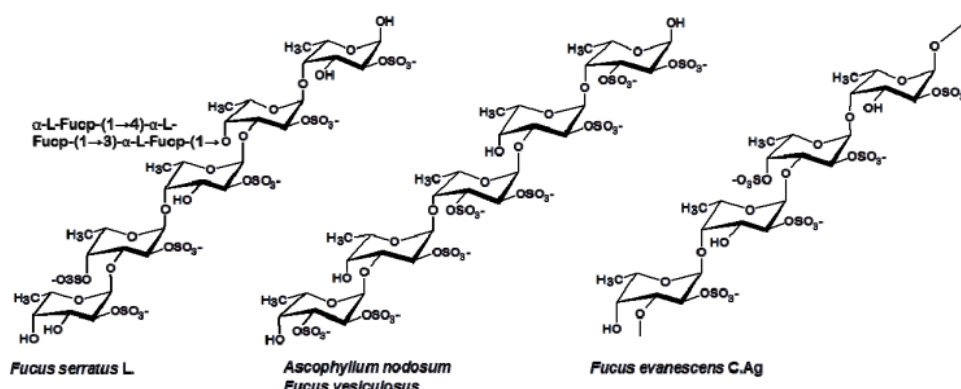
dari dinding sel alga coklat (*Phaeophyta*) (Ale *et al.*, 2011a). Selain itu fukoidan dapat diekstraksi dari mahluk laut invertebrata seperti timun laut (*Ludwigoburea grisea*) atau bulu babi (*Lytechinus variegatus*, *Arbacia lixula* dan *Strongylocentrotus purpuratus*), akan tetapi struktur fukoidannya lebih sederhana dibandingkan fukoidan dari alga coklat (Kim, 2013). Fukoidan merupakan polisakarida utama yang terdapat pada dinding sel alga coklat dan merupakan homo tersulfasi dan/atau heteropolisakarida dengan ikatan glikosidik antara fukosa berada pada posisi  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  2) -,  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  3) -, dan / atau  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$  4) -, tergantung pada spesies rumput laut coklat di mana fukoidan berada diekstrak (Lim dan Aida, 2017).



**Gambar 2. 2** Posisi ikatan glikosidik pada fukoidan (Lim dan Aida, 2017)

Secara umum fukoidan yang diperoleh dari mahluk laut invertebrata memiliki rantai utama monosakarida bersulfat yang tersusun secara linier. Sedangkan fukoidan yang diperoleh dari alga tersusun dalam pecabangan yang beragam (Senni *et al.*, 2011). Fukoidan dapat berbeda secara strukturnya antara spesies yang satu dengan spesies yang lainnya dan bahkan dapat berbeda dalam satu spesies yang sama (Kim, 2013). Faktor yang dapat menyebabkan perbedaan struktur fukoidan antara lain adalah masa panen, jenis spesies, proses tahap pertumbuhan, jenis pelarut ekstraksi, waktu ekstraksi, suhu ekstraksi dan lingkungan hidupnya, seperti salinitas, suhu, kedalaman tumbuh dan arus laut (Sinurat dan Kusumawati, 2017). Fukoidan memiliki karakteristik dapat larut dalam air dan larutan

asam, dimana fukoidan memiliki berat molekul sebesar 100-1600kDa (IPB, 2016).



**Gambar 2. 3** Struktur fukoidan pada berbagai spesies alga coklat

(Lim dan Aida, 2017)

Senyawa fukoidan diketahui memiliki aktivitas biologis diantaranya, yaitu antikoagulan, antioksidan, antiviral, antitrombotik, antikanker, antidiabetik, antiinflamasi, antilipidemik, antifertilisasi dan imunomodulasi (Hifney *et al.*, 2016). Selain itu diketahui bahwa fukoidan bersifat antihipertensi, dimana dapat menghambat produksi plasma angiotestinin II (Taylor, 2011). Fukoidan pertama kali diisolasi oleh Profesor Kylin dari Uppsala *University* di Swedia pada tahun 1913 dari alga coklat *Fucus vesiculosus*. Fukoidan dapat ditemukan pada alga coklat seperti *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria angustata*, *Undaria pinnatifida*, *Padina pavonia*, *Dictyota menstrualis*, dan *Sargassum stenphyllum* dengan jumlah kandungan fukoidan sebesar 10% (Kasanah *et al.*, 2019).

Fukoidan dari *Sargassum sp.* diketahui dapat menghambat metastatis sel MCF-7 dengan cara mempengaruhi proses Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-2 dan Bad, sehingga mampu menurunkan timbulnya keganasan, transformasi dan imortilitas pada sel MCF-7 (Satyarsa, 2019). Pada penelitian yang dilakukan oleh Zhang *et al.* (2013), diketahui bahwa fukoidan dari *Sargassum sp.* dapat menghambat proliferasi pada sel kanker payudara, yaitu *cell line* MCF-7, MDA-MB-231, dan 4TI sebesar 80% secara *in vivo*. Menurut Satyarsa (2019), pada beberapa penelitian diketahui bahwa fukoidan dari *Sargassum sp.* merupakan agen pro-apoptosis terhadap sel kanker payudara dengan efektifitas sebesar 68% pada *cell line* MCF-7 dan MDA-MB-231 secara *in vivo*. Dimana fukoidan



dapat meningkatkan ekspresi protein Bax dan Bad (pro-apoptosis) dan menurunkan ekspresi protein Bcl-2 dan Bcl-xL (anti-apoptosis).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Puspantari *et al.* (2020), diketahui bahwa kemampuan bioaktivitas yang dihasilkan oleh senyawa fukoidan dapat berbeda-beda karena dipengaruhi oleh strukturnya yang berbeda-beda juga antara satu spesies yang sama maupun jenis spesies yang berbeda. Dari pernyataan tersebut diketahui bahwa kemampuan sitotoksitas senyawa fukoidan dari berbagai jenis alga coklat dapat berbeda-beda. Dimana dapat dilihat pada **Tabel 2.1** terdapat informasi dari beberapa sumber penelitian yang telah dilakukan sebelumnya mengenai perbedaan nilai IC<sub>50</sub> setiap jenis ekstrak fukoidan terhadap sel kanker payudara MCF-7

**Tabel 2. 1** Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak fukoidan pada berbagai jenis spesies alga coklat terhadap sel kanker payudara MCF-7

No.	Jenis Spesies	Nilai IC <sub>50</sub>	Sumber
1	<i>Sargassum crassifolium</i>	89,95 µg/ml	(Stefani, 2019)
2	<i>Sargassum polycystum</i>	93.62 µg/ml	(Fernando <i>et al.</i> , 2020)
3	<i>Tubinaria sp</i>	663 µg/ml	(Isnansetyo <i>et al.</i> , 2017)
4	<i>Padina sp</i>	144 µg/ml	(Isnansetyo <i>et al.</i> , 2017)
5	<i>Fucus vesiculosus</i>	60 µg/ml	(Isnansetyo <i>et al.</i> , 2017)
6	<i>Sargassum hystrix</i>	555.54 µg/ml	(Husni <i>et al.</i> , 2021)
7	<i>Undaria Pinnatifida</i>	173 µg/ml	(Mak <i>et al.</i> , 2014)

Senyawa fukoidan dari *Sargassum sp.* memiliki keunggulan pada bidang pengobatan kanker, diantaranya adalah (Satyarsa, 2019):

- a) Dapat bekerja pada banyak target (multitarget) dalam melakukan apoptosis pada sel kanker secara maksimal.
- b) Memiliki potensi yang besar sebagai agen anti-metastatis sel kanker.
- c) Penggunaannya secara *in vivo* dapat didegradasi oleh makrofag sehingga tidak meninggalkan zat asing yang berbahaya di dalam tubuh.



### 2.3 Ekstraksi Fukoidan

Ekstraksi merupakan sebuah proses pemisahan suatu kandungan senyawa dari suatu campuran komponen seperti jaringan tumbuhan atau hewan dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Hambali dan Noermansyah, 2015). Pada proses ekstraksi terjadi pemisahan komponen-komponen senyawa dalam pelarut berdasarkan kelarutan dari komponen senyawa tersebut. Dalam proses ekstraksi suatu senyawa terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi, seperti jenis pelarut, suhu, jumlah pelarut, waktu, viskositas pelarut, dan jumlah *stage* (tahap ekstraksi) (Aziz *et al.*, 2009).

Pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Laeliocattleya *et al.* (2020), diketahui bahwa ekstraksi fukoidan dari makroalga spesies *Sargassum filipendula* dilakukan dengan menggunakan metode *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) dengan pelarut asam. *Ultrasonic-Assisted Extraction* merupakan suatu metode ekstraksi senyawa bioaktif menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi lebih dari 20kHz. Dimana pada metode ini terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi, seperti frekuensi, daya (kekuatan), jenis pelarut, waktu, suhu dan pH pelarut (Kumar *et al.*, 2020). Pada penelitian Laeliocattleya *et al.* (2020), analisis fukoidan dilakukan dengan melakukan presipitasi fukoidan, dimana dilakukan penambahan  $\text{CaCl}_2$  dan etanol 96% yang bertujuan untuk memisahkan fukoidan dari senyawa lain seperti protein, alginat dan jenis polisakarida lain yang terdapat pada alga coklat. Selanjutnya dihitung persentase rendemen ekstrak fukoidan kasar dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Rendemen fukoidan} = \frac{\text{berat fukoidan}(g)}{\text{berat sampel kering}(g)} \times 100\%$$

Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Sinurat dan Kusumawati (2017), diketahui bahwa ekstraksi fukoidan dari makroalga spesies *Sargassum binderi sonder* dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi pelarut asam HCl, pelarut air dan pelarut  $\text{CaCl}_2$ . Dimana pada penelitian tersebut dilakukan analisis fukoidan dengan menggunakan *Fourier-transform infrared spectroscopy* (FT-IR) untuk mengetahui gugus fungsi polisakarida sulfat pada ekstrak kasar fukoidan. Menurut Anam *et*



*al.* (2007), yang menyatakan bahwa *Fourier-transform infrared spectroscopy* (FT-IR) merupakan sebuah metode spektroskopi menggunakan inframerah berdasarkan perbedaan penyerapan dari radiasi inframerah suatu senyawa. Menurut Sjahfirdi *et al.* (2015), metode ini biasanya digunakan untuk menganalisis gugus fungsi dari suatu senyawa berdasarkan absorbansi inframerahnya, dimana pola absorbansi yang dihasilkan berbeda-beda dari setiap senyawa, sehingga senyawa-senyawa pada suatu komponen dapat dibedakan dan dihitung jumlahnya.

Jenis pelarut yang digunakan dalam melakukan ekstraksi fukoidan diketahui dapat mempengaruhi kualitas dari ekstrak fukoidan, dimana pada penelitian yang dilakukan oleh Sinurat dan Kusumawati (2017), diketahui bahwa warna ekstrak fukoidan yang diekstraksi menggunakan pelarut asam HCl menghasilkan warna ekstrak yang cenderung berwarna lebih putih, sedangkan pada pelarut air dan  $\text{CaCl}_2$  2% dihasilkan ekstrak dengan warna yang lebih coklat. Dimana warna coklat pada ekstrak menunjukkan bahwa kandungan fukoidannya lebih tinggi. Selain itu diketahui bahwa kandungan gugus sulfat tertinggi pada ekstrak adalah dengan menggunakan pelarut  $\text{CaCl}_2$  2% dan kandungan yang terendah adalah dengan menggunakan pelarut asam HCl. Dimana penggunaan pelarut asam dapat mendegradasi gugus sulfat yang terikat pada struktur fukoidan. Diketahui juga bahwa kandungan total gula tertinggi dihasilkan oleh pelarut air dan yang terendah adalah pelarut asam, dimana penggunaan pelarut air dapat meningkatkan kelarutan polisakarida seperti fukosa yang merupakan monomer penyusun struktur fukoidan.

Selain itu pada penelitian Ale *et al.* (2011b), diketahui bahwa dalam melakukan ekstraksi fukoidan lebih baik menggunakan pelarut air dibandingkan dengan pelarut asam, dimana total karbohidrat dan gugus sulfat yang dihasilkan oleh pelarut air lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut asam. Hal tersebut terjadi dikarenakan pelarut asam dapat menyebabkan terdegradasinya rantai polimer pada struktur fukoidan. Sementara pada penelitian yang dilakukan oleh Puspantari *et al.* (2020), diketahui bahwa rendemen ekstrak fukoidan dengan pelarut air lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut asam, dimana terdapat proses pemanasan dengan menggunakan pelarut air, sehingga dinding sel dapat hancur dan



dapat mengekstrak fukoidan lebih banyak. Selain itu juga diketahui bahwa berat molekul ekstrak fukoidan menggunakan pelarut air lebih tinggi daripada menggunakan pelarut asam. Diketahui bahwa berat molekul yang tinggi menunjukkan jumlah gugus sulfat yang terkandung dalam ekstrak juga banyak, dimana diketahui juga bahwa gugus sulfat pada struktur fukoidan memiliki peranan penting dalam kemampuan bioaktifitas yang dihasilkan oleh ekstrak fukoidan.

#### 2.4 Kanker

Kanker merupakan sebuah penyakit yang terjadi karena adanya sel ganas yang tumbuh secara cepat dan tidak terkendali dalam bentuk primitif dan tidak sempurna pada jaringan tubuh manusia sehingga menyebabkan efek yang serius (Pratiwi, 2012). Menurut Wani dan Lone (2018), kanker merupakan suatu penyakit dimana sel atau kelompok sel yang menunjukkan pertumbuhan tak terkontrol, dan dapat menyebar ke jaringan tubuh lainnya serta menyebabkan kematian. WHO (*World Health Organization*) telah memprediksikan bahwa pada tahun 2030 penderita kanker di dunia sebesar 26 juta jiwa dengan kematian sebesar 17 juta jiwa (Chen dan CancerHelp, 2012). Pada tahun 2018, kanker merupakan penyebab kematian kedua secara global, terhitung sekitar 9,6 juta kasus. Dimana kanker paru-paru menempati posisi pertama dengan jumlah penderita sebesar 2,1 juta jiwa, diikuti oleh kanker payudara sebesar 2,09 juta jiwa dan kanker usus besar sebesar 1,80 juta jiwa (Bray *et al.*, 2018).

Semua bagian tubuh dapat terkena kanker, mulai dari jaringan asal penyakit (jaringan utama) atau jaringan sekitarnya yang tersebar sel kanker. Pada umumnya kanker menyebar ke jaringan lain melalui sistem peredaran darah dan sistem limfatik. Penyebaran sel kanker ke jaringan sekitarnya disebut dengan proses invasi-metastatis (Teichroew, 2016). Proses terjadinya invasi-metastatis disebabkan oleh perubahan sifat sel ganas, seperti perubahan biokimia permukaan sel, kemampuan mengeluarkan zat litik, pertambahan motilitas, adesi sel tumor satu dengan lainnya berkurang, angiogenesis (membentuk pembuluh darah baru), hilangnya daya pertumbuhan antara sel normal dan sel tumor secara Bersama. Proses terjadinya invasi-metastatis terdiri dari 6 tahapan, yaitu (Maulani, 2012):



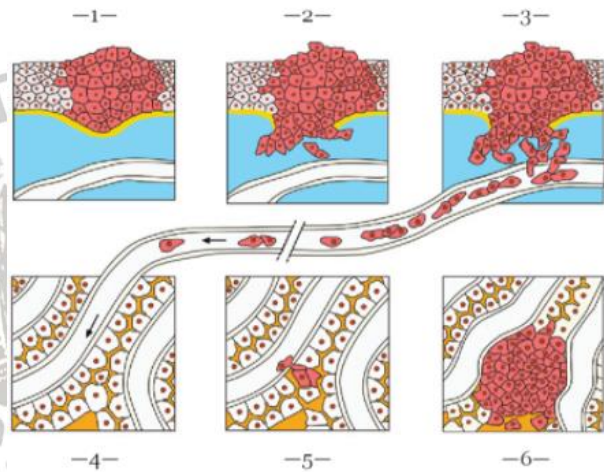
1. **Detachment**, yaitu terlepasnya sel tumor dari kelompok sel tumor primer. *Epithelial cadherin (E-cadherin)* merupakan suatu molekul glikoprotein yang bertanggung jawab dalam proses sel epitel menjadi satu jaringan. Diperkirakan bahwa berkurangnya jumlah *E-cadherin* menyebabkan kelompok antar sel tumor primer menjadi renggang, sehingga sel tumor dapat melepaskan diri dan menyebar ke jaringan lainnya.
2. **Penempelan sel tumor di membran basalis**. Sebelum masuk ke dalam pembuluh darah, sel tumor harus menembus *extracellular matrix (ECM)* dengan cara melekatkan dirinya dengan ECM. Sel tumor mempunyai reseptor yang lebih banyak terhadap fibronektin dan laminin, dimana kedua glikoprotein tersebut merupakan komponen ECM. Selain itu sel tumor juga dapat mengekspresikan integrin. Dimana integrin merupakan reseptor transmembran terhadap kolagen, fibronektin dan vitronektin yang termasuk juga kedalam komponen ECM.
3. **Sel tumor menghasilkan enzim yang menyebabkan lisisnya membran basalis**. Setelah sel tumor melekatkan dirinya dengan ECM, sel tumor merangsang sel-sel makrofag dan fibroblas untuk memproduksi 3 enzim protease, yaitu *cysteine*, *serine* dan *metalloprotease*. Dimana salah satu enzim *metalloprotease* adalah *kollagenase tipe IV*, yaitu enzim yang dapat memotong kolagen tipe IV pada membrane basalis.
4. **Masuknya sel tumor ke dalam pembuluh darah**. Setelah sel tumor melisis ECM dan membran basalis, sel tumor masuk ke dalam pembuluh darah. Untuk bisa masuk ke dalam pembuluh darah, diperlukan motilitas (proses pergerakan sel). Diperkirakan bahwa sel tumor mengeluarkan *autocrine motility factor*, yaitu suatu zat yang mengadakan pergerakan terhadap sel tumor ke pembuluh darah dan aliran darah. Setelah masuk kedalam pembuluh darah dan aliran darah, sel tumor akan menghadapi *natural killer cell* dan sistem kekebalan humoral serta seluler (sel imunokompeten) yang akan menghancurkan sel tumor. Untuk menghadapi hal tersebut, sel-sel tumor akan saling berikatan dengan platelet (trombosit). Dimana platelet berfungsi untuk melindungi sel tumor dari sel



imunokompeten dan tekanan mekanik sel darah merah (eritrosit) yang mengalir di dalam sirkulasi darah.

5. **Melekatnya sel tumor pada jaringan lain.** Sel tumor yang berhasil bertahan dalam sirkulasi darah memilih suatu tempat (jaringan lain) untuk pertumbuhannya. Sel tumor akan mengeluarkan antigen CD44, yaitu glikoprotein yang dalam keadaan normal akan diekspresikan oleh sel limfosit T yang berfungsi untuk migrasinya sel limfosit T ke dalam jaringan limfoid.

6. **Melekatnya sel tumor pada sel endotel membentuk kelompok sel tumor.** Kemudian diikuti proses yang sama pada saat sel tumor memasuki pembuluh darah.



**Gambar 2. 4** Proses invasi-metastatis sel kanker ke jaringan lain  
(Chen dan CancerHelp, 2012)

### 2.4.1 Tipe Kanker

Situs utama yang terserang penyakit kanker pada umumnya meliputi bagian kulit (melanoma), payudara, organ pencernaan (esofagus, hati, pancreas, usus, perut, dan rectum), organ pernapasan (laring dan paru-paru), organ reproduksi dan kemih (ginjal, kandung kemih, prostat, testis, ovarium, serviks, dan uterus), jaringan darah (leukimia) dan jaringan limpa (limfoma). Bagian tubuh lainnya yang dapat terserang kanker, antara lain otak, kelenjar tiroid leher dan kepala. Kanker dapat menyerang manusia dalam berbagai rentang usia. Kanker yang menyerang orang dewasa dan anak-



anak cenderung memiliki tipe yang berbeda. Jenis kanker yang paling sering menyerang anak-anak adalah kanker jaringan saraf, tulang, mata dan ginjal (Teichroew, 2016).

#### 2.4.2 Penyebab dan Karakteristik

Kanker secara umum tergolong dalam penyakit dari lingkungan, dimana sebesar 90-95% kasus dipengaruhi oleh gaya hidup dan faktor lingkungan, serta 5-10% lainnya disebabkan oleh faktor genetik. Faktor-faktor lingkungan yang menjadi penyebab utama kematian akibat kanker, meliputi tembakau (25-30%), infeksi (15-20%), makanan dan obesitas (30-35%), dan sisanya disebabkan oleh radiasi, stress, aktifitas fisik, serta polusi lingkungan (Wani dan Lone, 2018).

Pertumbuhan dan penyebaran kanker mulai terjadi Ketika senyawa karsinogen atau penyebab lain mengakibatkan mutasi pada gen tertentu, kecuali mutasi diturunkan dari orang tua. Terjadinya mutasi tersebut dapat menyebabkan kelainan pada sel, dimana sel dapat membelah secara abnormal, sel dapat berhenti berfungsi, kematian sel, atau dapat menyerang jaringan sehat lainnya. Sel akan berlipat ganda secara berlebihan ketika suatu sel yang disebut *proto-oncogene* berubah menjadi bentuk overaktif yang disebut *oncogene*. Ketika gen yang bernama *suppressor gene* bermutasi, sinyal *stop* yang mengarahkan sel untuk berhenti berlipat ganda akan berhenti berfungsi (Teichroew, 2016).

#### 2.5 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan sebuah penyakit yang terjadi karena adanya pertumbuhan sel-sel di jaringan payudara secara abnormal dan tidak terkendali (Novianti dan Purnami, 2012). Menurut WHO pada tahun 2018 tercatat 2,09 juta kasus penderita kanker payudara dengan jumlah kematian sebesar 627.000 jiwa (Bray *et al.*, 2018). Pada umumnya kanker payudara menyerang kaum wanita. Tetapi hal ini tidak menutup kemungkinan dapat menyerang kaum laki-laki. Dimana



perbandingannya terhadap kaum wanita sebesar 1:1000 (Anggorowati, 2013).

Kanker payudara pada dasarnya merupakan tumor yang terbentuk dalam sel penyusun payudara, dimana dapat menyebar ke jaringan yang lainnya. Payudara tersusun dari beberapa bagian, yaitu lobulus (kelenjar susu), duktal (saluran susu) dan stroma (lapisan lemak dan jaringan ikat). Jenis kanker yang terjadi dipengaruhi oleh bagian sel yang akan berubah menjadi kanker. Jenis kanker payudara yang paling umum terjadi pada sel bagian duktal yang dinamakan *invasive ductal carcinoma (IDC)*. Selain itu juga dapat terjadi pada bagian kelenjar susu yang disebut sebagai *invasive Lobular Carcinoma (ILC)*. Bagian payudara yang paling jarang terjadi kanker payudara adalah pada lapisan lemak dan jaringan lemak (Teichroew, 2016).

### 2.5.1 Gejala

Kanker payudara pada stadium awal biasanya tidak memiliki gejala, akan tetapi setelah munculnya tumor gejalanya mulai tampak dan dapat dideteksi. Setiap orang memiliki gejala yang berbeda-beda, ada juga yang tidak memiliki gejala sama sekali. Berikut ini adalah gejala yang umum dijumpai dalam kanker payudara (Teichroew, 2016):

- a) Terdapat benjolan pada daerah payudara atau ketiak.
- b) Penebalan atau pembengkakan pada berbagai bagian di sekitar payudara.
- c) Perubahan ukuran atau bentuk payudara.
- d) Terjadinya iritasi kulit atau terbentuknya lekukan pada payudara.
- e) Adanya rasa sakit pada bagian payudara atau puting susu.
- f) Terjadinya abnormalitas pada puting susu (keluarnya darah, erosi dan inversi).
- g) Pada daerah payudara atau puting susu, kulit mengalami bengkak, kemerahan dan bersisik.



### 2.5.2 Faktor Resiko

Beberapa faktor mempengaruhi resiko kanker payudara, diantaranya adalah sebagai berikut (Teichroew, 2016).

- a) Dapat terjadi pada usia muda saat periode menstruasi pertama (usia sebelum 12 tahun).
- b) Dapat terjadi pada usia lanjut saat periode *menopause* (setelah usia 55 tahun).
- c) Tidak pernah melahirkan atau melahirkan pertama kali pada usia diatas 30 tahun.
- d) Bertambahnya usia.
- e) Tingginya kepadatan jaringan payudara.
- f) Adanya riwayat penyakit kanker payudara atau penyakit payudara non-kanker.
- g) Adanya paparan hormon estrogen dalam jumlah tinggi.
- h) Adanya riwayat keluarga yang menderita penyakit payudara (ibu, saudara perempuan, anak perempuan).
- i) Adanya riwayat terapi dengan radiasi pada bagian dada atau payudara.
- j) Memiliki kelebihan berat badan (resiko meningkat setelah terjadinya menopause).
- k) Adanya riwayat terapi hormon pengganti dalam jangka panjang (estrogen dan progesteron).
- l) Memiliki kerentanan genetik (gen BRCA1 atau BRCA2).
- m) Mengonsumsi minuman beralkohol secara berlebihan (lebih dari 1 gelas sehari).
- n) Jarang berolahraga.

### 2.5.3 Tes Penentuan Stadium Kanker Payudara

Tes dan prosedur yang digunakan untuk menentukan stadium pada kanker adalah sebagai berikut (Teichroew, 2016).

- a) Tes darah, seperti *Complete Blood Count* (CBC).
- b) Tes Mammografi pada payudara.
- c) Melakukan rontgen pada bagian dada.
- d) Melakukan scan pada tulang.

- e) *Computerized Tomography Scan* (CT-Scan)
- f) *Positron Emission Tomography* (PET-Scan)

#### 2.5.4 Stadium Kanker Payudara

Dalam kanker payudara terdapat 5 stadium, diantara lain adalah (George dan Ashing, 2017):

##### 1) Stadium 0 (Nol)

Pada stadium ini, terdapat 2 jenis kanker payudara, yaitu *Ductal carcinoma in situ* (DCIS) dan *Lobular carcinoma in situ* (LCIS). Dimana *Ductal carcinoma in situ* (DCIS) adalah kanker lokal yang terdapat pada daerah lapisan saluran susu dari lobulus ke arah puting susu. Sementara itu, *Lobular carcinoma in situ* (LCIS) adalah kanker lokal yang terdapat pada daerah kecil di bagian kelenjar susu dimana susu di produksi.

##### 2) Stadium I

- Stadium IA, yaitu merupakan fase dimana ukuran tumor sekitar 2cm atau lebih kecil dan tidak menyebar ke kelenjar limpa.
- Stadium IB, yaitu merupakan fase dimana terdapat sel kanker berukuran mikroskopis pada kelenjar limpa dekat payudara dan tidak ada tumor di sekitar payudara atau terdapat tumor dengan ukuran kurang dari 2cm.

##### 3) Stadium II

- Stadium IIA, merupakan fase dimana tidak terdapat tumor atau terdapat tumor berukuran 2cm atau kurang pada payudara dan terdapat sel kanker mikroskopis di satu atau tiga kelenjar limpa yang terletak dibawah ketiak atau dekat dengan tulang payudara atau terdapat tumor berukuran 2-5cm tanpa kelenjar limpa dengan sel kanker.
- Stadium IIB, merupakan fase dimana terdapat tumor dengan ukuran lebih dari 2cm tetapi kurang dari 5cm dan terdapat sel kanker pada kelenjar limpa dekat tulang dada



dalam jumlah kecil. Atau terdapat tumor berukuran lebih dari 5cm tanpa kelenjar limpa dengan sel kanker.

4) Stadium III

- Stadium IIIA, merupakan fase dimana tidak terdapat tumor pada payudara atau terdapat tumor dalam ukuran yang bervariasi dan sel kanker ditemukan pada 4-9 kelenjar limpa dibawah ketiak atau kelenjar limpa dekat tulang dada.
- Stadium IIIB, merupakan fase dimana tumor menyebar melalui kulit dari payudara atau dinding dada dan kulit terbuka membentuk luka atau menyebabkan pembengkakan. Kanker dapat menyebar tidak lebih dari 9 kelenjar limpa dibawah ketiak atau tulang dada.
- Stadium IIIC, merupakan fase dimana tumor memiliki ukuran yang bervariasi atau tidak ada sama sekali. Akan tetapi kanker telah menyebar melalui kulit menyebabkan pembengkakan atau membentuk luka dan menyebar ke dinding dada. Kanker payudara juga telah menyebar setidaknya ke 10 kelenjar limpa dibawah ketiak atau tulang dada.

5) Stadium IV

Merupakan fase dimana terdapat tumor dengan ukuran bervariasi, kelenjar limpa dapat memiliki atau tidak memiliki sel kanker dan kanker telah meyebar ke bagian lain dari tubuh, seperti paru-paru, otak, hati dan tulang.

**2.6 Pengobatan Kanker Payudara**

Opsi pengobatan kanker payudara tergantung pada jenis kanker payudara, stadium, sensitivitas kanker terhadap hormon dan kesehatan serta keinginan pasien.pengobatan dapat diklasifikasikan menjadi terapi lokal dan sistemik. Dimana terapi lokal ditujukan untuk mengobati tumor

pada daerah terdampak tanpa mempengaruhi bagian tubuh yang lain. Contohnya adalah operasi dan terapi radiasi. Terapi sistemik memiliki pengaruh pada tubuh dimana obat diberikan melalui mulut atau secara langsung melalui peredaran darah untuk mengobati sel kanker. Contohnya adalah kemoterapi, terapi hormon, dan terapi tertarget (Teichroew, 2016).

### 2.6.1 Operasi

Operasi merupakan pengobatan yang paling umum untuk mengatasi kanker payudara dan jenis operasi tergantung pada ukuran dan letak tumor. Jenis operasi dalam pengobatan kanker payudara, antara lain adalah (Teichroew, 2016):

- a) Lumpektomi, merupakan operasi pengangkatan bagian benjolan pada payudara dan di sekitar batas jaringan normal.
- b) Mastektomi parsial, merupakan operasi pengangkatan bagian jaringan payudara dalam jumlah yang lebih besar daripada lumpektomi.
- c) Mastektomi, merupakan operasi pengangkatan seluruh jaringan payudara dengan pengangkatan kelenjar limpa dibawah ketiak.
- d) Mastektomi ganda, merupakan operasi pengangkatan pada kedua jaringan payudara.

### 2.6.2 Terapi

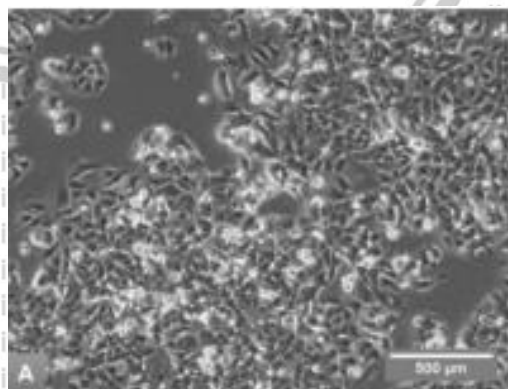
- a) Terapi radiasi, merupakan pengobatan yang menggunakan pancaran energi tinggi (radiasi) untuk menghancurkan sel kanker. Radiasi biasa dilakukan setelah dilakukannya operasi yang mempertahankan bentuk payudara untuk membantu mengurangi kemungkinan kembalinya kanker (Teichroew, 2016).
- b) Kemoterapi, merupakan pengobatan dengan menggunakan obat yang dapat membunuh kanker yang diberikan secara injeksi, atau dikonsumsi dalam bentuk pil. Kemoterapi dilakukan dalam siklus tertentu, dimana setiap periode pengobatan diikuti dengan periode pemulihan (Teichroew, 2016).



- c) Terapi hormonal, merupakan terapi yang menghilangkan hormon dari tubuh atau menghentikan aktifitas hormon dan mencegah pertumbuhan kanker. Terapi hormon mencegah kanker dalam menggunakan hormone alami, yaitu hormon estrogen dan progesteron yang dibutuhkan kanker untuk tumbuh (Teichroew, 2016).
- d) Terapi biologis, merupakan pengobatan yang bekerja dengan memanfaatkan system imun tubuh untuk membantu melawan kanker atau mengendalikan efek samping dari pengobatan kanker yang lain (Teichroew, 2016).
- e) Terapi tertarget, merupakan pengobatan yang menggunakan obat yang dapat menghentikan pertumbuhan sel kanker payudara secara spesifik (Teichroew, 2016).

## 2.7 Sel MCF-7

Sel MCF-7 merupakan salah satu sel yang banyak digunakan dalam penelitian kanker payudara. Sampai saat ini telah ada hampir 25.000 penelitian yang dipublikasikan mengenai sel ini (Lee *et al.*, 2015). Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara manusia dengan reseptor estrogen, glukokortikoid dan progesteron. Sel MCF-7 cocok digunakan untuk studi kanker payudara secara *in vitro*, karena sel ini mampu mempertahankan beberapa karakteristik ideal khusus pada epitel payudara. Seperti pemrosesan estrogen, dalam bentuk estradiol, melalui reseptor estrogen (ER) di sitoplasma sel (Camarillo *et al.*, 2014).



Gambar 2. 5 Kultur MCF-7 hari ke-6 pada skala 500  $\mu\text{m}$

(Pirsko *et al.*, 2018)



Suster Catherine Frances (Helen Marion) Mallon lahir pada 1901 dan merupakan biarawati di *Immaculate Heart of Mary Convent Monroe*, Michigan. Ia merupakan wanita Kaukasia berumur 69 tahun yang mengidap kanker payudara. Pada tahun 1963 ia melakukan mastektomi pada tumor jinak di payudara kanannya. Kemudian pada tahun 1967 ia kembali melakukan mastektomi radikal pada adenokarsinoma di payudara kirinya. Hal ini tidak mengherankan terjadi, dimana Bernardino Ramazzini (*the father of industrial medicine*) yang menyatakan bahwa “tumor payudara sering dijumpai pada biarawati daripada wanita lainnya”. Pernyataan tersebut sesuai dengan studi epidemiologi selanjutnya yang menyatakan bahwa wanita nuliparu memiliki resiko yang lebih tinggi terhadap kanker payudara (Lee *et al.*, 2015).

Usai menjalani radioterapi pasca-operasi pada dinding dada Helen Marion, diketahui bahwa adanya tumor jinak yang kambuh pada area dada kirinya. Akan tetapi perkembangannya telah dikontrol dengan radiasi dan hormon terapi selama 3 tahun. Pada tahun 1970 tumor tersebut bermetastatis ke pleura dan dinding dada. Kemudian pada saat itu peneliti Herbert D. Soule dari *Michigan Cancer Foundation* melakukan pengembangan garis sel dari potongan nodul dinding dada dan dari efusi pleura. Proses pengembangan yang dilakukan oleh Soule mengalami kegagalan pada kultur yang diperoleh dari nodul dinding dada dimana pada kultur tersebut ditumbuhi oleh fibroblast. Akan tetapi pada kultur yang diperoleh dari efusi pleura mampu membentuk lapisan tunggal yang tumbuh secara berkelanjutan. Garis sel yang mampu dikembangkan oleh Soule diberi nama MCF-7. Dimana nama tersebut dinamai menurut *Michigan Cancer Foundation* dan mewakili upaya ketujuh Soule dalam garis sel kanker ini (Lee *et al.*, 2015).

Sel MCF-7 memiliki bentuk yang terbaik dibandingkan dengan sel kanker payudara lainnya pada manusia. Dikarenakan hal tersebut sel MCF-7 banyak digunakan dalam penelitian efek sel kanker payudara (Ayu, 2015). Sel ini dapat tumbuh pada media kultur RPMI (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) atau DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) dengan kandungan FBS (*Foetal Bovine Serum*) 10% dan *Penicilin-Streptomycin* 1% (Meiyanto *et al.*, 2008). Sel MCF-7 merupakan jenis sel *adherent* dengan metode kultur *monolayer* (Rosita dan Saifudin, 2017).



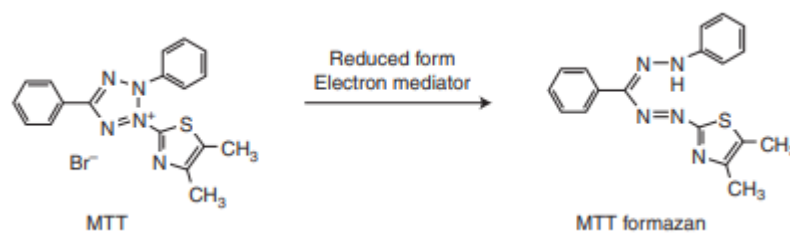
Sel MCF-7 memiliki karakteristik, yaitu tidak mengekspresikan *caspase-3*, overekspresi *Bcl-2* dan *PgP* sehingga tidak mampu melakukan apoptosis (Hermawan *et al.*, 2010). Selain itu sel ini bersifat resisten terhadap *doxorubicin* dan mengekspresikan estrogen reseptor alfa (ER- $\alpha$ ) (Ayu, 2015). Sifat resistensi terhadap *doxorubicin* terjadi karena *doxorubicin* tidak dapat menekan ekspresi *Bcl-2* yang diekspresikan sel oleh MCF-7 (Rosita dan Saifudin, 2017). Karakteristik khusus sel ini adalah membentuk estradiol dari estrogen di sitoplasma sel melalui reseptor estrogen. Dimana hal tersebut membuat sel MCF-7 mengekspresikan estrogen positif (ER+) dalam kontrol sel (Diantini *et al.*, 2013).

## 2.8 Uji MTT

MTT [3- (4,5 *dimethylthiazol-2-yl*) -2,5-*diphenyltetrazolium bromide*] adalah uji standar kolorimetri yang digunakan untuk mengukur proliferasi atau pertumbuhan sel. MTT dapat tereduksi menjadi senyawa *formazan* melalui adanya reaksi pada mitokondria dari sel hidup. Umumnya uji MTT digunakan untuk mengukur sitotoksitas dari suatu obat (Schwab, 2011). Pengukuran proliferasi sel dengan uji MTT bersifat kuantitatif dan sensitif, dimana adanya pengukuran laju pertumbuhan sel berdasarkan hubungan antara aktivitas sel dan absorbansi secara linier (Mahajan *et al.*, 2012).

Prinsip dari metode ini adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT [3- (4,5 *dimethylthiazol-2-yl*) -2,5-*diphenyltetrazolium bromide*] oleh sel-sel hidup dalam mitokondria dengan melibatkan enzim suksinat dehidrogenase yang menyebabkan reduksi pada NADH dan NADPH. Kemudian membentuk kristal *formazan* berwarna ungu yang tidak larut air. Penambahan reagen *stopper* surfaktan akan melarutkan kristal *formazan* sehingga dapat diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Semakin pekat warna ungu yang dihasilkan maka berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup (Rosita dan Saifudin, 2017).





**Gambar 2. 6** Reaksi reduksi MTT ke MTT formazan (Kumar *et al.*, 2018).

Uji MTT merupakan salah satu uji yang banyak digunakan untuk mengetahui viabilitas sel, proliferasi, sitoksisitas, studi kemo dan radiosensitivitas *in vitro* (Stockert *et al.*, 2018). Pada mekanisme reaksinya, pewarna *tetrazolium* yang berwarna kuning bersifat larut dalam air direduksi oleh sel hidup menjadi produk *formazan* berwarna ungu yang tidak larut dalam larutan air. Jumlah MTT-*formazan* yang dihasilkan dapat ditentukan secara spektrofotometri setelah dilarutkan dalam pelarut yang sesuai (Van Meerloo *et al.*, 2011). Kemudian konsentrasinya ditentukan pada absorbansi sebesar 570-600 nm (Kumar *et al.*, 2018). Kekurangan dari uji MTT adalah uji ini tidak dapat membedakan antara efek sitotoksik (membunuh sel) dan sitostatik (laju pertumbuhan yang berkurang) (Van Meerloo *et al.*, 2011).

## 2. 9 Apoptosis

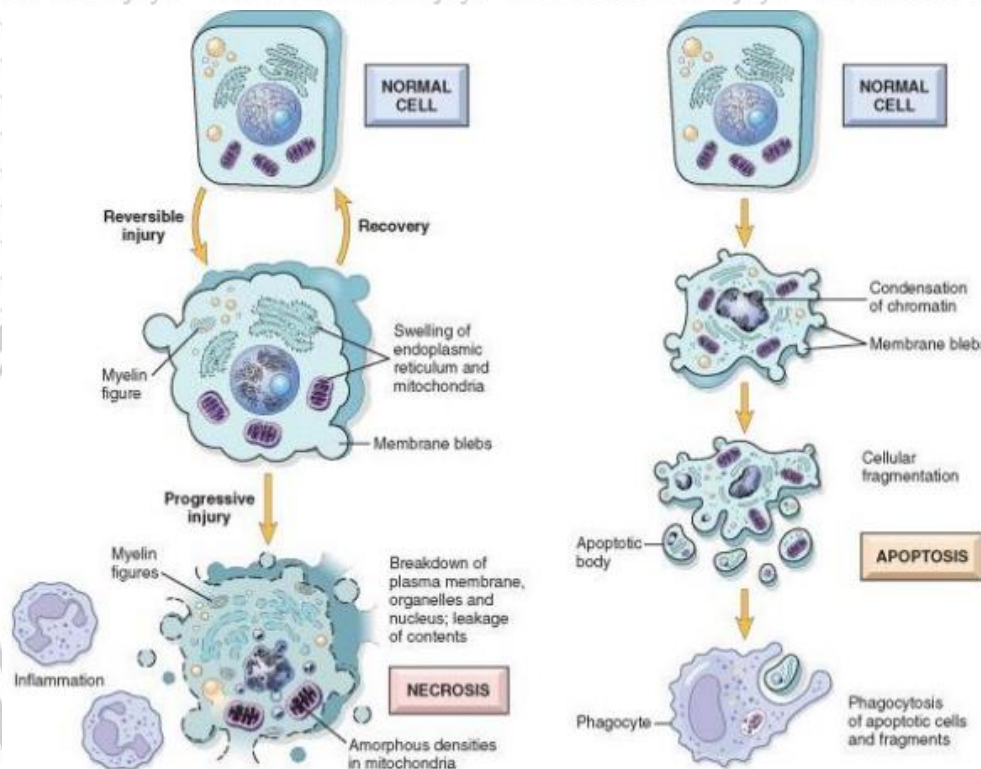
Kematian sel adalah mekanisme penting untuk mengontrol keseimbangan dinamis dalam sistem kehidupan. Terdapat dua jenis kematian sel, yaitu nekrosis dan apoptosis. Dimana nekrosis merupakan proses pasif yang terjadi secara tidak sengaja menyebabkan kerusakan awal pada membran sel dan kerusakan secara bertahap daripada struktur sel sebagai respon gangguan lingkungan, seperti hipoksia/iskemia parah, suhu ekstrem dan trauma mekanik (Vermeulen *et al.*, 2005). Sementara itu, apoptosis merupakan proses kematian sel secara terprogram dengan adanya perubahan inti sel, tanpa merubah organel sitoplasma, dapat disebabkan oleh adanya transkripsi gen baru dan melalui jalur regulasi yang kompleks (Schiffer, 2006).

Pada tubuh, proses apoptosis berfungsi untuk mematikan sel yang membuat organisme terancam bahaya. Misalnya, sel yang terinfeksi virus



atau sel dengan DNA yang rusak akan dihilangkan dengan apoptosis (Vermeulen *et al.*, 2005). Sel yang mengalami apoptosis memiliki karakteristik morfologi, seperti penyusutan sel, membran plasma yang mengalami kebocoran, kondensasi dan fragmentasi pada kromatin DNA.

Sementara pada sel yang mengalami nekrosis, memiliki karakteristik seperti hilangnya integritas membran, kromatin yang teragregasi, kebocoran lisosom dan pembengkakan sel (Purwaningsih, 2014).



**Gambar 2. 7** Perbedaan morfologi sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis (Purwaningsih, 2014).

Mekanisme proses apoptosis sangat kompleks dan mutakhir, yang melibatkan rangkaian peristiwa molekuler yang bergantung pada energi.

Sampai saat ini, penelitian menunjukkan bahwa ada dua jalur apoptosis utama, yaitu jalur reseptor ekstrinsik dan jalur intrinsik. Namun, sekarang ada bukti bahwa kedua jalur tersebut saling terkait dan bahwa molekul dalam satu jalur dapat mempengaruhi jalur lainnya. Jalur ekstrinsik merupakan jalur pensinyalan yang memulai apoptosis dengan melibatkan interaksi yang dimediasi oleh reseptor transmembrane. Sementara itu, jalur intrinsik merupakan jalur pensinyalan yang memulai apoptosis dengan



melibatkan beragam rangsangan yang dimediasi oleh non-reseptor, dimana menghasilkan sinyal intraseluler yang bekerja secara langsung pada target di dalam sel dan merupakan proses yang diinisiasi oleh mitokondria. (Elmore, 2007).

Apoptosis pada jalur ekstrinsik diawali dengan adanya pelepasan sinyal molekuler yang disebut dengan ligan. Dimana pelepasan molekul tersebut dilakukan oleh sel lain yang tidak akan mengalami apoptosis.

Kemudian ligan akan berikatan dengan reseptor kematian yang berada pada transmembran sel target yang akan mengalami apoptosis. Dimana reseptor kematian merupakan anggota dari superfamili gen reseptor *Tumor*

*Necrosis Factor* (TNF). Anggota keluarga reseptor TNF berbagi domain ekstraseluler serupa yang kaya akan sistein dan memiliki domain

sitoplasma sekitar 80 asam amino yang disebut dengan "domain kematian". Domain kematian ini memainkan peran penting dalam

mentransmisikan sinyal kematian dari permukaan sel ke jalur pensinyalan intraseluler. Ligan yang berikatan dengan reseptor kematian akan

menginisiasi pro caspase-8. Kemudian caspase-8 akan mengaktifkan pro caspase-3 melalui caspase-9. Selanjutnya caspase-3 akan mengaktifkan

caspase lainnya yang mampu menghambat siklus sel dengan meningkatkan kerusakan seluler, yaitu caspase-6 dan 7. Sementara

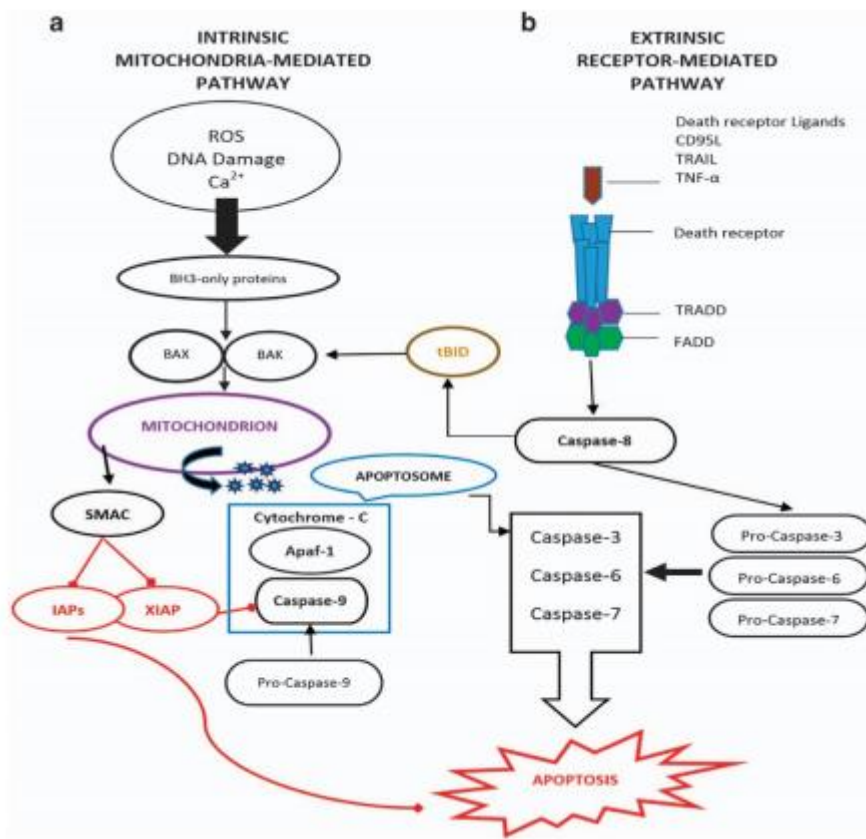
apoptosis pada jalur intrinsik terjadi saat stress mitokondria, dimana sitokrom C didalam mitokondria dilepaskan ke sitoplasma. Pelepasan

sitokrom C diatur oleh gen Bax dan Bad yang merupakan famili Bcl-2 yang terikat dengan mitokondria. Kemudian sitokrom C tersebut akan

mengaktifkan caspase-9 dengan cara berikatan dengan Apaf-1. Selanjutnya pro-caspase-9 mengikat kompleks apoptosom dan

mengaktifkan pro-caspase-3 menjadi caspase-3 untuk melaksanakan apoptosis (Baig *et al.*, 2016).



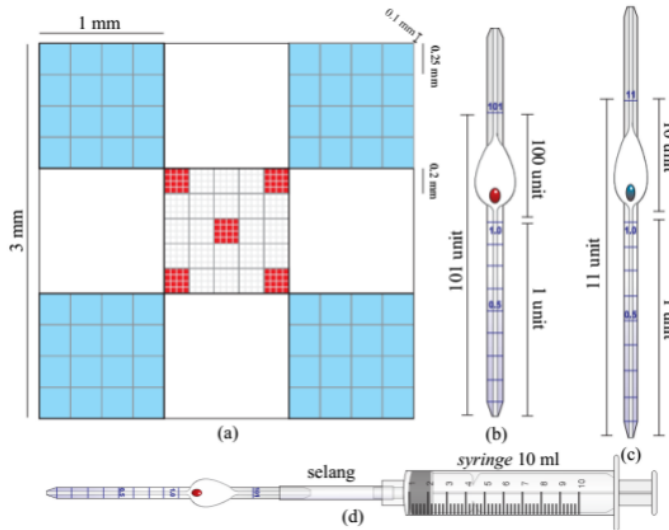


Gambar 2. 8 Jalur intrinsik dan ekstrinsik pada proses apoptosis sel (Baig *et al.*, 2016).

## 2. 10 Haemocytometer

Haemocytometer atau *Counting Chamber* adalah alat perhitungan sel yang diciptakan oleh Louis-Charles Malassez pada tahun 1874.

Haemocytometer biasanya digunakan untuk menghitung jumlah sel darah (Vembadi *et al.*, 2019). Selain menghitung jumlah sel darah, saat ini haemocytometer juga digunakan untuk menghitung jumlah sel hidup, seperti sel bakteri, sel kanker, spermatozoa dan partikel mikroskopis lainnya (Wijaya *et al.*, 2015). Alat ini terdiri dari *counting chamber* (kamar hitung sel) dan pipet thoma. Dimana terdapat 2 jenis pipet thoma, yaitu pipet leukosit dan pipet eritrosit (Hardian *et al.*, 2020).



**Gambar 2. 9** Perlengkapan *Haemocytometer*

Keterangan: Skala kamar hitung sel (a), pipet thoma eritrosit (b), pipet thoma leukosit (c) dan selang pipet thoma yang terhubung dengan spuit (d)

(Hardian *et al.*, 2020)

Prinsip kerja dari *Haemocytometer* adalah menghitung secara langsung jumlah sel dalam suspensi sel yang terdapat diantara *cover glass* dan kamar hitung sel yang diamati dengan lensa objektif mikroskop. Dimana pada kamar hitung sel terdapat 9 kotak besar berukuran 1 mm. Pada satu kotak besar tersebut terdapat 25 kotak sedang berukuran 0,2 mm dan pada satu kotak sedang terdapat lagi 16 kotak kecil berukuran 0,05 mm. Ketinggian dari setiap kamar hitung sel adalah 0,1 mm, sehingga volume pada setiap satu kotak besar adalah 0,0001 ml. Pembagian kotak kecil tersebut bertujuan untuk memudahkan perhitungan sehingga mengurangi kesalahan dalam perhitungan (Hansen, 2000). Perhitungan jumlah sel dihitung dengan rumus (Junedi, 2010a) :

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

Kelebihan dari penggunaan alat ini adalah dapat digunakan untuk analisis viabilitas sel dan menghitung jumlah sel yang hidup maupun mati. Saat pewarna *tryphan blue* dicampurkan dengan suspensi sel, saat diamati dibawah mikroskop sel yang hidup berbentuk bulat dan tidak berwarna. Sementara sel yang mati akan berwarna biru berbentuk bulat tipis yang tidak beraturan (mengerut) (Vembadi *et al.*, 2019). Selain itu, kelebihan



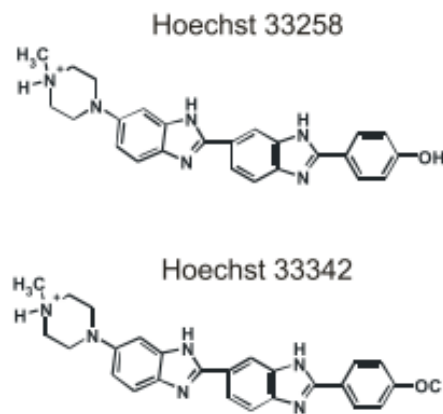
yang lainnya adalah harganya yang murah dan sederhana sehingga dapat dengan cepat melakukan perhitungan sel (Oktiyani dan Muhlisin, 2017).

Kekurangan dari penggunaan alat ini adalah besarnya *human error* saat melakukan perhitungan. Dikarenakan perhitungan masih dilakukan secara manual sehingga hanya yang ahli saja yang dapat menggunakan alat ini dengan benar. Selain itu kesalahan juga dapat terjadi pada proses pencampuran, penanganan dan pengenceran. Dimana pada proses pencampuran dan pengenceran, suspensi sel dengan *trypan blue* harus dilakukan dengan benar dan menyeluruh. Sehingga saat penanganannya (perhitungan sel), sel tidak terlalu padat atau sedikit dan tidak sulit untuk dilihat atau dihitung dibawah mikroskop (Vembadi *et al.*, 2019).

## 2. 11 Pewarna Hoechst

Pewarna *Hoechst* adalah senyawa turunan *bis-benzimide* yang dapat mewarnai asam nukleat pada sel. Pewarna ini dapat tereksitasi saat terpapar sinar UV. Pewarna *Hoechst* dapat dengan mudah diserap oleh semua jenis sel, kecuali sel yang dapat mengekspresikan transporter ABCG2. Pembacaan sel dengan reagen ini dapat menggunakan *flowcytometer* dan mikroskop fluorescence (Schwab, 2011). Pewarna *Hoechst* merupakan senyawa dengan potensi karsinogenik dan mutagenik, karena senyawa ini dapat mengikat DNA, yang dapat mengganggu replikasi DNA selama pembelahan sel. Sehingga dalam penanganan dan pembuangannya harus dilakukan secara hati-hati (Bazhulina *et al.*, 2009).

Pewarna *Hoechst* dapat digunakan untuk menganalisis status siklus sel dan apoptosis pada sel. Selain itu pewarna ini memiliki sifat permeabilitas sel, sehingga dapat mengikat DNA pada sel hidup atau fiksasi (sel tetap) (Lin dan Goodell, 2011). Pada prinsipnya pewarna *Hoechst* akan berikatan dengan semua asam nukleat pada DNA. Akan tetapi ikatan pada daerah yang kaya akan AT (Adenin-Timin) dapat meningkatkan fluoresensi secara signifikan sehingga dapat berpendar dengan kuat (Wink *et al.*, 2006).



**Gambar 2. 10** Struktur kimia pewarna *Hoechst 33258* dan *Hoechst 33342*

(Bazhulina *et al.*, 2009)

Pada umumnya pewarna *Hoechst* yang sering digunakan adalah jenis *Hoechst 33342* dan *Hoechst 33258*. Dimana kedua jenis pewarna ini memiliki spektrum emisi dan eksitasi yang sama, yaitu pada spektrum emisi sebesar 461 nm dan spektrum eksitasi sebesar 350 nm. Perbedaan kedua jenis pewarna ini adalah permeabilitas sel pada *Hoechst 33258* sepuluh kali lipat lebih kecil dibandingkan dengan *Hoechst 33342*. Sehingga pewarna *Hoechst 33258* tidak dapat mencapai situs pengikatan DNA secara optimal. Selain itu, *Hoechst 33258* lebih larut dalam pelarut air, hal tersebut dikarenakan pada struktur *Hoechst 33258* terdapat gugus hidroksil. Sementara pada struktur *Hoechst 33342* terdapat gugus etil eter sehingga bersifat hidrofobik dan lebih mudah larut dalam pelarut organik (Bazhulina *et al.*, 2009).



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan selama 4 bulan, yaitu pada bulan Februari 2021 hingga Juni 2021. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya (LSIH-UB) Malang, Jawa Timur.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mikropipet, spuit, filter membran (Sartorius Stedim Biotech), gelas beaker, pipet tetes, labu ukur 250 ml, *bottle schott* 100 ml dan 250 ml, pinset, *ependorf tube*, *cover slip*, *microscope cover glass*, vortex, *shaker waterbath*, *cell culture flask* (SPL), erlenmeyer, *conical tube* 15 ml dan 50 ml (SPL), *magnetic stirrer*, *96 wellplate* (Costar), *24 wellplate* (SPL), *microplate reader* (BMG LABTECH), inkubator CO<sub>2</sub>, *microscope fluorescence*, *microscope inverted*, *cryopreservation tube* dan *sentrifuge*.

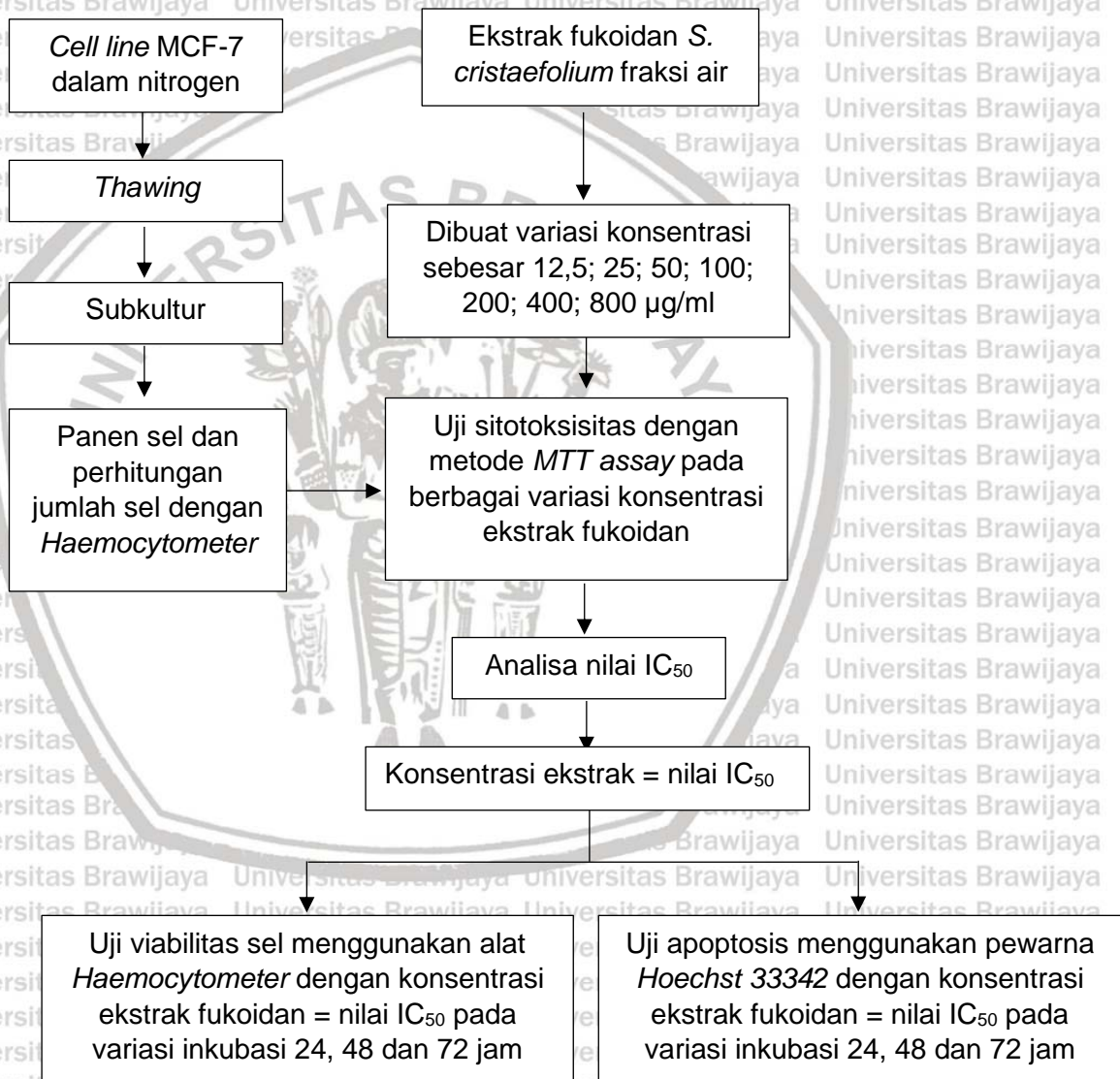
#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak fukoidan dari *Sargassum cristaefolium* fraksi air yang diperoleh dari perairan daerah Sumenep Madura-Jawa Timur, *Cell line* MCF-7 yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, *aluminium foil*, media RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) powder (Gibco), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), 1% *Penicillin-Streptomycin*, reagen MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromida], reagen *Hoechst* (Thermofisher), *Phosphate Buffer Saline*, DMSO (Merck), *trypsin-EDTA* 0,25%, DPBS dan steril water.

### 3.3 Metodologi

Metode penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental di laboratorium dan studi literatur. Metode penelitian yang akan dilakukan terdiri dari 3 tahapan utama, yaitu tahap pertama adalah penentuan nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak fukoidan terhadap sitotoksitas sel MCF-7 menggunakan metode MTT dengan variasi konsentrasi ekstrak fukoidan sebesar 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800 µg/ml. Kemudian tahap kedua adalah uji apoptosis sel MCF-7

menggunakan metode pewarnaan sel dengan pewarna *Hoechst 33342* terhadap pengaruh lama waktu inkubasi sebesar 24, 48 dan 72 jam dengan konsentrasi ekstrak fukoidan yang setara dengan nilai  $IC_{50}$ . Selanjutnya tahap ketiga adalah pengujian viabilitas sel hidup menggunakan *Haemocytometer* terhadap pengaruh lama waktu inkubasi sebesar 24, 48 dan 72 jam dengan konsentrasi ekstrak fukoidan yang setara dengan nilai  $IC_{50}$ . Dimana pada pengujian tahap ketiga digunakan rancangan percobaan penelitian RAL (Rancangan Acak Lengkap).



**Gambar 3. 1** Desain Penelitian Pengaruh Ekstrak Fukoidan Terhadap Sitotoksitas dan Apoptosis Sel MCF-7



### 3.4 Pelaksanaan

#### 3.4.1 Pembuatan Konsentrasi Fukoidan

Ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* yang digunakan pada penelitian ini telah diekstraksi pada penelitian terdahulu, yaitu penelitian Laeliocattleya *et al.* (2020), dimana ekstraksi dilakukan dengan pelarut air menggunakan UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) dalam kondisi homogen. *S. cristaefolium* diperoleh dari perairan di daerah Sumenep Madura, Jawa Timur. Pembuatan seri konsentrasi ekstrak fukoidan disesuaikan dengan modifikasi dari metode penelitian yang dilakukan oleh Muzani (2019), dimana langkah-langkahnya sebagai berikut.

- Dibuat larutan stok konsentrasi sebesar 2000 µg/ml, dengan melarutkan 10 mg ekstrak fukoidan kedalam steril water sebanyak 5 ml.
- Dihomogenisasi menggunakan *vortex*.
- Dilakukan pengenceran bertingkat pada berbagai konsentrasi (12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800 µg/ml) dengan ditambahkan media RPMI *complete*.
- Jumlah media RPMI *complete* dihitung dengan rumus.

$$M1.V1 = M2.V2$$

Keterangan :

M1: Konsentrasi awal larutan

M2: Konsentrasi akhir larutan

V1: Volume awal larutan

V2: Volume akhir larutan

#### 3.4.2 Pembuatan Media Kultur Sel

Pembuatan media kultur sel pada penelitian ini disesuaikan dengan modifikasi dari metode penelitian yang dilakukan oleh Phelan dan May (2015), dimana langkah-langkahnya sebagai berikut.

- Dibuat media RPMI 4 kali dengan cara memasukan 1 sachet (10,4 gram) media RPMI powder ke dalam labu ukur 250 ml.
- Ditambahkan NaHCO<sub>3</sub> sebanyak 2 gram dan steril water sampai tanda batas.
- Dihomogenkan dengan menggunakan magnetic stirrer.
- Difilter menggunakan filter membran berukuran 22 µm.
- Dibuat media RPMI 1 kali dengan cara mengambil media RPMI 4 kali sebanyak 12,5 ml.
- Dimasukkan ke dalam conical tube 50ml.
- Ditambahkan steril water sebanyak 37,5 ml dan dihomogenisasi.
- Dibuat 50 ml media RPMI Complete yang mengandung *Fetal Bovine Serum* 10% v/v dan 1% *Penicillin-Streptomycin*.
- Dimasukkan 44,5 ml media kultur RPMI 1 kali ke dalam conical 50 ml.
- Ditambahkan 5 ml FBS dan 500 µl *Penicillin-Streptomycin*.
- Dilakukan homogenisasi dan difilter menggunakan filter membran berukuran 22 µm.

### 3.4.3 Kultur *cell line* MCF-7

*Cell line* MCF-7 yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari koleksi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Kultur atau penumbuhan *cell line* MCF-7 pada penelitian ini disesuaikan dengan modifikasi dari metode penelitian yang dilakukan oleh Meiyanto *et al.* (2008), dimana langkah-langkahnya sebagai berikut.

- Sel MCF-7 dalam *cryo tube* di lakukan thawing selama 3-5 menit.
- Dimasukkan suspensi sel ke dalam *conical tube* 15 ml.
- Ditambahkan media kultur RPMI *complete* sampai tanda batas 6 ml.
- Disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2500 rpm.
- Dibuang *supernatant* dan *pellet* (sel) ditambahkan media RPMI *complete* yang telah difilter sebanyak 1 ml.



- Diresuspensikan dan dimasukkan ke dalam *cell culture flask* yang telah berisi 4 ml media kultur RPMI *complete*.
- Diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37<sup>o</sup> dan CO<sub>2</sub> 5%.

#### 3.4.4 Penggantian Media Kultur

Penggantian media kultur bertujuan untuk memberikan nutrisi agar pertumbuhan sel optimum dan menghindari terjadinya kontaminasi sel. Penggantian media dilakukan setiap 2-3 hari sekali setelah sel dimasukkan ke dalam inkubator atau Ketika warna media kultur mulai memudar (tidak cerah). Tahapan penggantian media pada penelitian ini disesuaikan dengan modifikasi dari metode penelitian yang dilakukan oleh Amrulloh (2018), dimana langkah-langkahnya sebagai berikut.

- Diambil media lama pada *cell culture flask* dengan spuit secara perlahan.
- Ditambahkan 4 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*) yang telah difilter dengan filter membran berukuran 22 µm.
- Digoyang-goyangkan secara perlahan dan PBS dibuang.
- Ditambahkan media kultur yang telah di filter menggunakan filter membran berukuran 22 µm sebanyak 5 ml.
- Diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif dengan mikroskop inverted.
- Diinkubasi sampai sel konfluen 80% (sel hampir memenuhi seluruh permukaan *cell culture flask*) dan media kultur dapat diganti kembali jika media sudah berwarna merah pucat.

#### 3.4.5 Panen Sel dan Perhitungan Sel dengan *Haemocytometer*

Setelah dilakukan kultur sel, kemudian dilakukan tahapan panen sel. Dimana panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen (sel hampir memenuhi seluruh permukaan *cell culture flask*).

Tahapan panen sel dan perhitungan sel pada penelitian ini disesuaikan dengan modifikasi dari metode penelitian yang dilakukan oleh Amrulloh (2018) dan Junedi (2010a), dimana langkah-langkahnya sebagai berikut.



- Diambil media lama pada *cell culture flask* dengan spuit secara perlahan.
- Dicuci dua kali dengan PBS sebanyak 8 ml.
- Ditambahkan tripsin-EDTA 0,25% sebanyak 2,5 ml.
- Diinkubasi selama 2 menit.
- Ditambahkan media kultur RPMI *complete* sebanyak 5 ml.
- Diamati keadaan sel dengan mikroskop inverted apakah sel sudah terlepas dari dasar *cell culture flask*. Jika sel sudah lepas dan tidak bergerombol maka sel dapat ditransfer ke *conical tube* 15 ml yang steril.
- Disentrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- Dibuang *supernatant* dan *pellet* (sel) ditambahkan media kultur RPMI *complete* sebanyak 1 ml dan diresuspensikan.
- Dilakukan perhitungan sel dengan *haemocytometer*, dengan cara sel yang telah diresuspensikan diambil sebanyak 10 µl.
- Ditambahkan *tryphan blue* sebanyak 10 µl dan dihomogenkan.
- Diteteskan ke dalam alat *haemocytometer* sebanyak 10 µl.
- Dihitung sel hidup dengan counter dibawah mikroskop cahaya *inverted*.
- Dihitung jumlah sel hidup per ml dengan rumus berikut.

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

### 3.4.6 Uji Sitotoksik dengan metode MTT

Sel MCF-7 yang telah dipanen dan dilakukan perhitungan dengan *haemocytometer*, kemudian dilakukan plating (penanaman sel pada *well plate*) pada 96 *well plate* untuk dilakukan uji sitotoksitas dengan metode MTT. Tahapan uji sitotoksik pada penelitian ini disesuaikan dengan modifikasi dari metode penelitian yang dilakukan oleh Darma *et al.* (2011) dan Putri (2013), dimana langkah-langkahnya sebagai berikut.

- Ditanam sel dengan kepadatan sebesar  $10 \times 10^3$  sel/sumuran, dengan cara diambil sebanyak 100 µl dan ditanam pada setiap sumuran yang telah di desain untuk sampel dan kontrol.



- Diinkubasi selama 24-48 jam (sampai sel konfluen 80%) dengan CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37<sup>o</sup> untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik.
- Dibuang media lama dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali.
- Ditambahkan ekstrak fukoidan pada berbagai perlakuan (12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800 µg/ml).
- Diinkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> dan CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam.
- Dibuang media dan ekstrak fukoidan pada akhir inkubasi.
- Dicuci sel dengan PBS.
- Ditambahkan 100 µl media kultur *complete* yang mengandung larutan MTT (0,5 mg/ml) pada masing-masing sumuran. Penambahan reagen MTT dilakukan dalam kondisi lingkungan yang gelap.
- Diinkubasi selama 2-4 jam pada suhu 37<sup>o</sup> dan CO<sub>2</sub> 5%.
- Dilakukan pengamatan dan dokumentasi menggunakan *microscope inverted* pada akhi inkubasi.
- Ditambahkan 100 µL larutan *stopper* DMSO pada masing-masing sumuran.
- Dibaca serapannya menggunakan *Microplate reader* pada panjang gelombang 595nm.
- Dihitung persentase sel hidup dengan menggunakan data absorbansi dari setiap sumuran.
- Analisis regresi linear digunakan untuk menghitung IC<sub>50</sub>, dimana pesentase sel hidup dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\text{Persen Viabilitas Sel Hidup (\%)} =$$

$$\frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

### 3.4.7 Uji Apoptosis pewarnaan sel dengan pewarna *Hoechst 33342*

Setelah melakukan perhitungan persen viabilitas sel hidup dan didapatkan nilai IC<sub>50</sub>, yaitu konsentrasi terbaik dari *S. cristaefolium* fraksi air yang mampu menghambat pertumbuhan sel MCF-7 sebesar 50%. Kemudian dilakukan uji apoptosis dengan metode pewarnaan sel menggunakan pewarna *Hoechst 33342*.





Tahapan uji pewarnaan sel dengan *Hoechst* 33342 pada penelitian ini disesuaikan dengan modifikasi dari metode penelitian yang dilakukan oleh Crowley *et al.* (2016), dimana langkah-langkahnya sebagai berikut.

- Dilakukan penanaman sel pada 24 well plate dengan kepadatan  $30 \times 10^3$  sel/sumuran, dimana sebelumnya pada setiap sumuran telah dimasukan cover slip.
- Diambil sebanyak 300  $\mu$ l kultur sel dan ditanam pada setiap sumuran yang telah di desain untuk sampel dan kontrol sel.
- Dimasukkan sel secara perlahan dimana mikrotip diposisikan miring, hal ini bertujuan agar sel dapat tumbuh di dasar cover slip.
- Diinkubasi selama 24-48 jam (sampai sel konfluen 80%) dengan CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37<sup>o</sup>.
- Dibuang media kultur pada setiap sumuran menggunakan mikropipet.
- Dicuci dengan PBS sebanyak 300  $\mu$ L dan PBS dibuang.
- Ditambahkan larutan sampel ekstrak fukoidan dengan konsentrasi setara nilai IC<sub>50</sub> sebanyak 300  $\mu$ L pada setiap sumuran.
- Diinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam dengan CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37<sup>o</sup>.
- Dilakukan fiksasi pada akhir inkubasi dengan cara membuang media dan ekstrak fukoidan pada setiap sumuran.
- Ditambahkan PFA 4% sebanyak 400  $\mu$ l dan diinkubasi selama 10 menit.
- Dibuang PFA dan dicuci 2 kali dengan PBS dingin sebanyak 300  $\mu$ l.
- Dibuang PBS dan ditambahkan 300  $\mu$ l DPBS pada setiap sumuran.
- Dilakukan proses pewarnaan dengan reagen *Hoechst*, dimana pada proses ini dilakukan dalam keadaan lingkungan yang gelap.
- Dibuang DPBS pada setiap sumuran.



- Ditambahkan larutan *Hoechst* sebanyak 200  $\mu$ l dan diinkubasi selama 5 menit.
- Dibuang larutan *Hoechst*.
- Dicuci dengan DPBS pada setiap sumuran sebanyak 200  $\mu$ l, lalu DPBS dibuang.
- Disiapkan *object cover glass* yang telah diberi label.
- Ditambahkan *mounting* sebanyak 1 tetes.
- Diambil cover slip dari sumuran dan cover slip diletakkan pada *object cover glass* dengan posisi terbalik.
- Dilakukan pembacaan dengan menggunakan *microscope fluorescence* pada panjang gelombang 460-490 nm.

#### 3.4.8 Uji Perhitungan Sel Hidup dengan *Haemocytometer*

Setelah melakukan uji apoptosis dengan metode pewarnaan sel menggunakan pewarna *Hoechst* 33342. Kemudian dilakukan uji perhitungan sel menggunakan konsentrasi yang setara dengan nilai  $IC_{50}$  menggunakan alat *Haemocytometer*. Dimana tahapan uji ini disesuaikan dengan modifikasi dari metode penelitian yang dilakukan oleh Junedi (2010a), dimana langkah-langkahnya sebagai berikut.

- Dilakukan penanaman sel pada 96 *well plate* dengan kepadatan sebesar  $10 \times 10^3$  sel/sumuran. Dengan cara diambil sebanyak 100  $\mu$ l dan ditanam pada setiap sumuran yang telah di desain untuk sampel dan kontrol sel.
- Diinkubasi selama 24-48 jam (sampai sel konfluen 80%) dengan  $CO_2$  5% dan suhu  $37^\circ$ .
- Dibuang media kultur pada setiap sumuran menggunakan mikropipet.
- Dicuci dengan PBS sebanyak 100  $\mu$ L dan PBS dibuang.
- Ditambahkan larutan sampel ekstrak fukoidan dengan konsentrasi setara nilai  $IC_{50}$  sebanyak 100  $\mu$ L pada setiap sumuran.
- Diinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam dengan  $CO_2$  5% dan suhu  $37^\circ$ .

- Dibuang larutan sampel pada setiap sumuran pada akhir inkubasi.
- Dicuci dengan PBS sebanyak 100 µL pada setiap sumuran dan PBS dibuang.
- Ditambahkan tripsin-EDTA 0,25% sebanyak 40 µL pada setiap sumuran.
- Diinkubasi selama 2 menit dengan CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37°.
- Ditambahkan media kultur RPMI *complete* sebanyak 100 µL pada setiap sumuran.
- Diamati keadaan sel dengan mikroskop inverted apakah sel sudah terlepas dari dasar sumuran.
- Dilakukan *pipetting* menggunakan mikropipet untuk memastikan bahwa sel sudah terlepas dari dasar sumuran.
- Dipindahkan suspense sel ke dalam conical tube 15 ml.
- Ditambahkan media RPMI *complete* sampai 1 ml lalu diresuspensikan.
- Dilakukan perhitungan sel dengan *haemocytometer*.
- Diambil sebanyak 10 µl sel yang telah diresuspensikan tadi.
- Ditambahkan *tryphan blue* sebanyak 10 µl dan dihomogenkan.
- Diteteskan ke dalam alat *haemocytometer* sebanyak 10 µl.
- Dihitung jumlah sel hidup dengan *counter* dibawah mikroskop cahaya *inverted*.
- Dihitung jumlah sel hidup per ml dengan rumus berikut.

Jumlah sel terhitung/mL

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



### 3.5 Analisis Data

#### 3.5.1 Nilai IC<sub>50</sub> dari Uji Sitotoksik Ekstrak Fukoidan

Dari hasil pembacaan absorbansi menggunakan *microplate reader*, didapatkan nilai absorbansi. Kemudian dilakukan perhitungan nilai persen viabilitas sel hidup dan dicari nilai IC<sub>50</sub>, yaitu nilai konsentrasi senyawa toksik yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker sebesar 50%. Nilai IC<sub>50</sub> yang didapatkan kemudian dibandingkan dengan literatur yang telah ada secara relevan.

#### 3.5.2 Uji Apoptosis dengan pewarnaan sel menggunakan pewarna Hoechst 33342

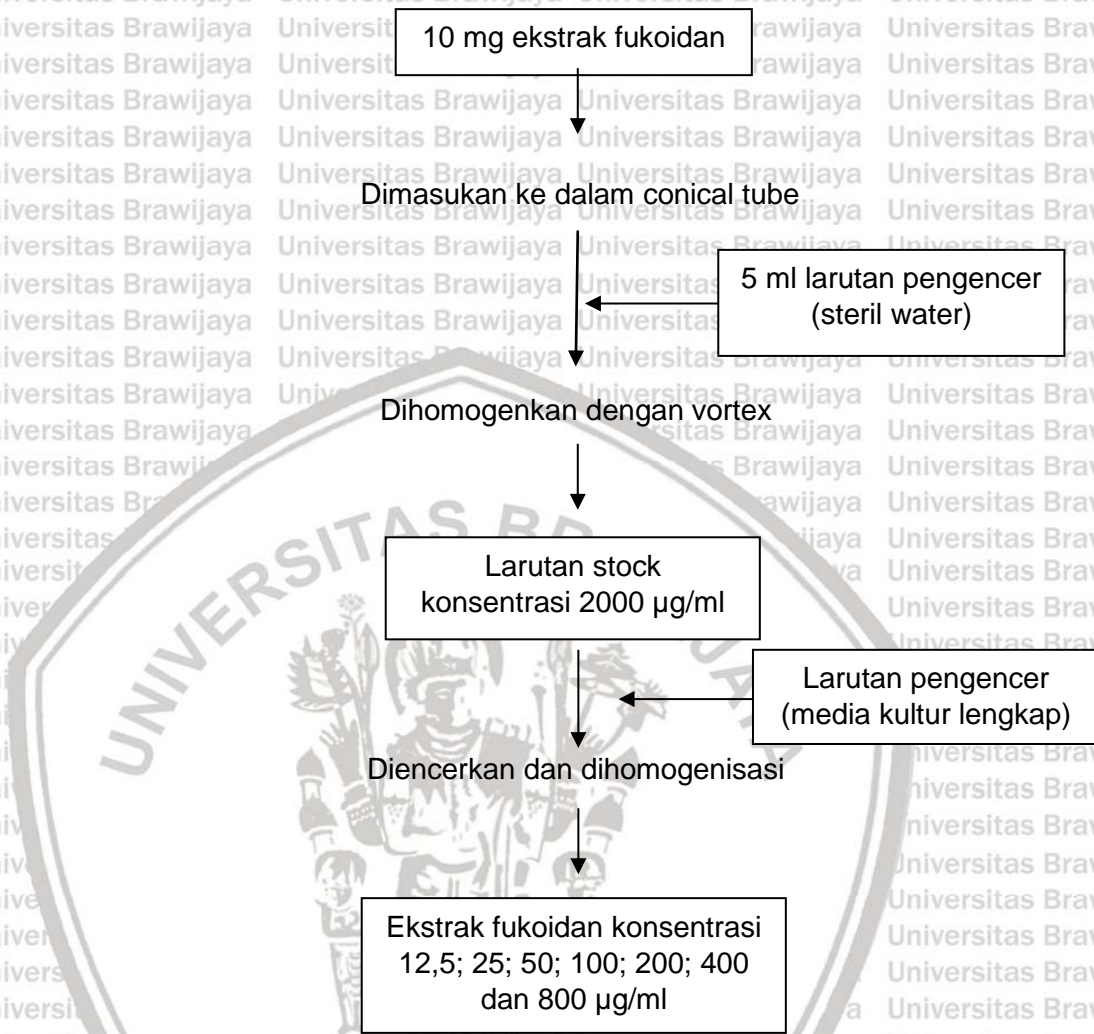
Data yang diperoleh dari uji ini adalah berupa gambar dari hasil pembacaan dengan menggunakan mikroskop fluorescence. Dimana dari hasil gambar tersebut akan dilakukan analisis mengenai perbedaan sel yang mengalami apoptosis (kematian) dan sel hidup. Pada uji ini dilakukan perlakuan lama waktu inkubasi dengan 3 level, yaitu 24, 48 dan 72 jam. Kemudian dari data gambar tersebut dilakukan analisis mengenai perbedaan pengaruh lama waktu inkubasi sel dengan ekstrak fukoidan = IC<sub>50</sub> terhadap morfologi sel yang mengalami apoptosis. Selanjutnya dari semua data tersebut dibandingkan dengan literatur yang telah ada secara relevan.

#### 3.5.3 Uji Perhitungan Jumlah Sel Hidup menggunakan Haemocytometer

Dari uji ini data yang diperoleh adalah jumlah sel hidup per ml (sel/ml). kemudian dilakukan perhitungan sehingga didapatkan nilai persen viabilitas sel hidup (%). Selanjutnya data dilakukan uji ANOVA dengan rancangan percobaan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan faktor variasi lama waktu inkubasi sebanyak 3 level, yaitu 24,48 dan 72 jam. Kemudian data dari hasil pengujian tersebut dibandingkan dengan data kontrol untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan. Selanjutnya dilakukan perbandingan dengan literatur yang telah ada secara relevan.

### 3.6 Diagram Alir Penelitian

#### 3.6.1 Pembuatan Konsentrasi Fukoidan

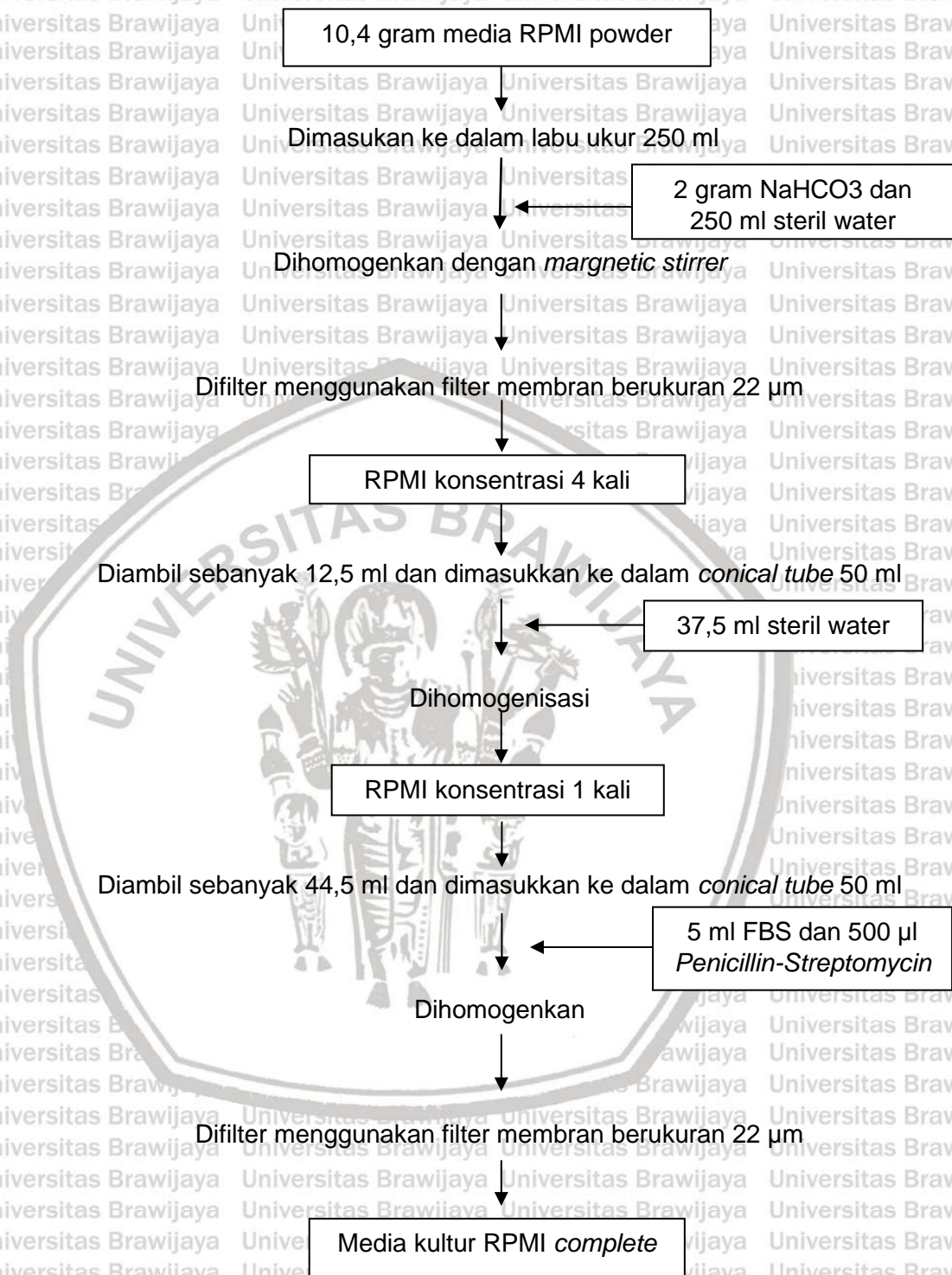


**Gambar 3. 2** Pembuatan Konsentrasi Fukoidan

(Modifikasi dari (Muzani, 2019)).



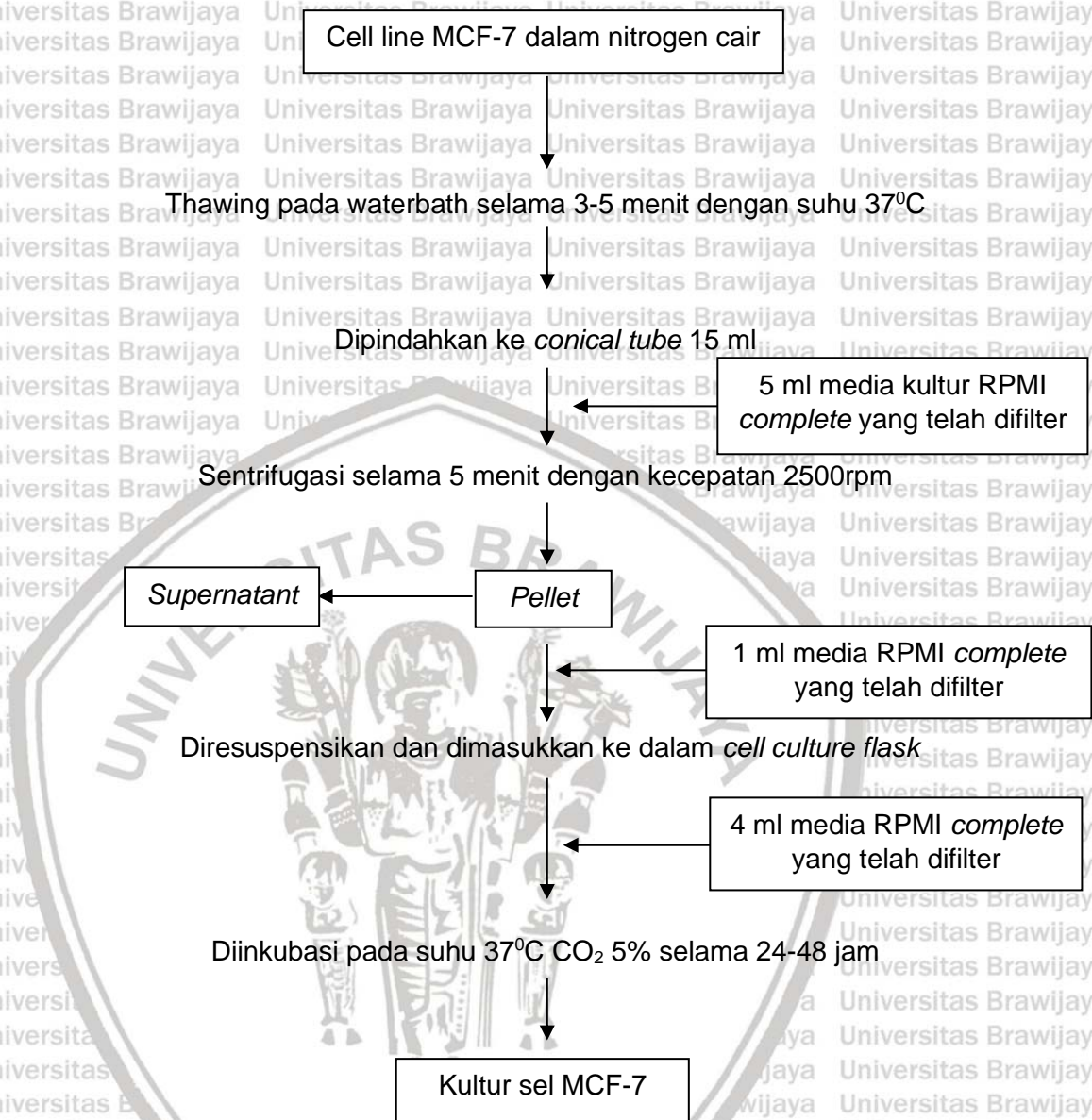
### 3.6.2 Pembuatan Media Kultur Sel



**Gambar 3. 3** Pembuatan Media Kultur Sel

(Modifikasi dari (Phelan dan May, 2015)).

### 3.6.3 Kultur cell line MCF-7

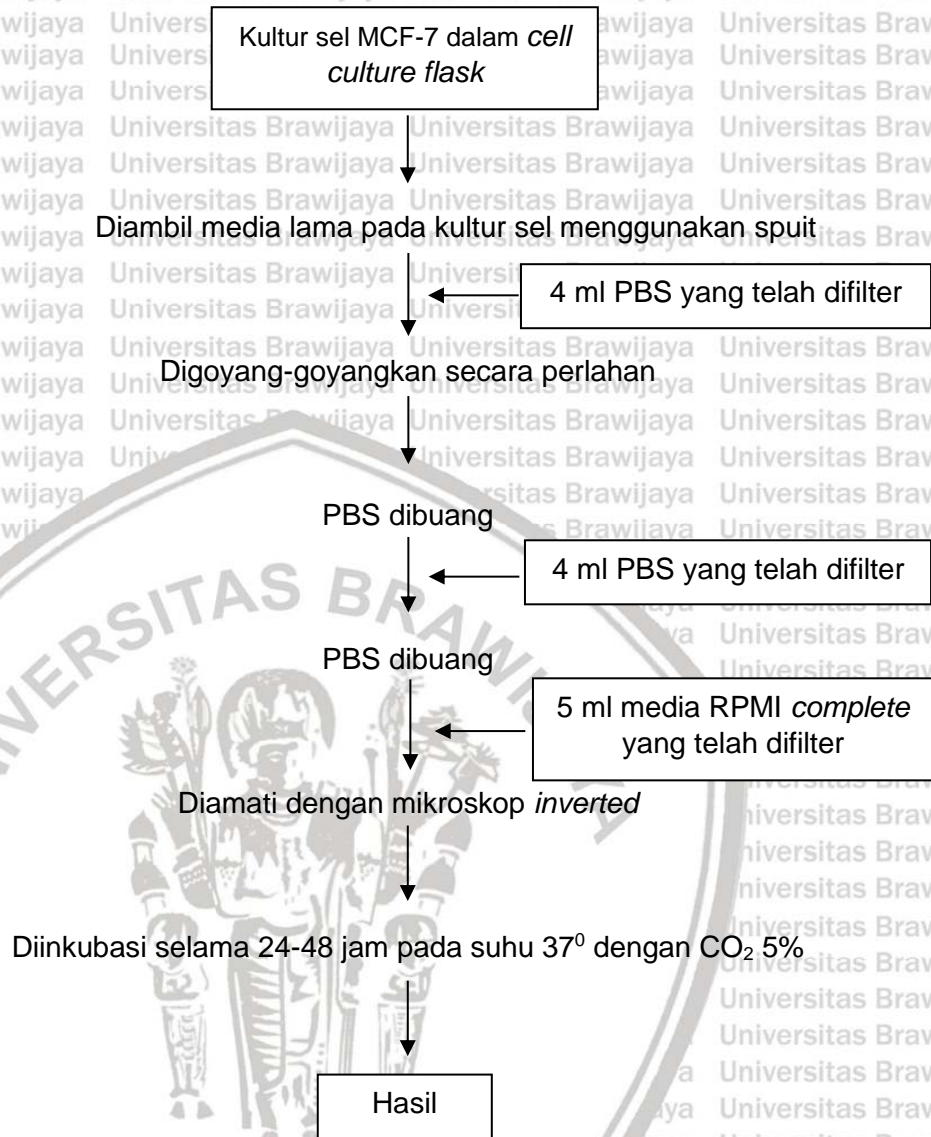


Gambar 3. 4 Kultur cell line MCF-7

(Modifikasi dari (Meiyanto et al., 2008)).



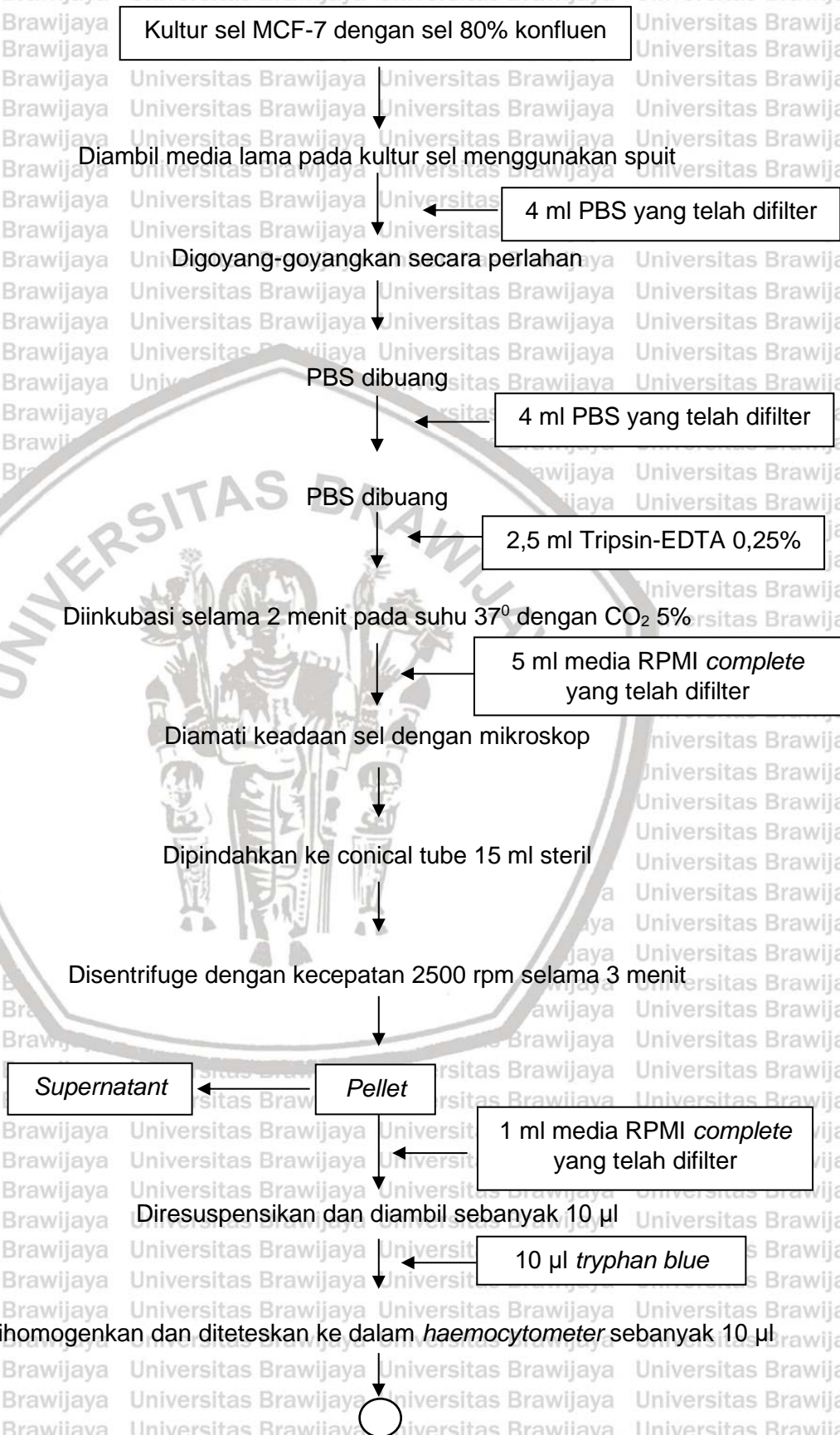
### 3.6.4 Penggantian Media Kultur



**Gambar 3. 5** Penggantian Media Kultur

(Modifikasi dari (Amrulloh, 2018)).

### 3.6.5 Panen sel dan Perhitungan Sel dengan *Haemocytometer*







Dihitung dengan counter dibawah mikroskop cahaya

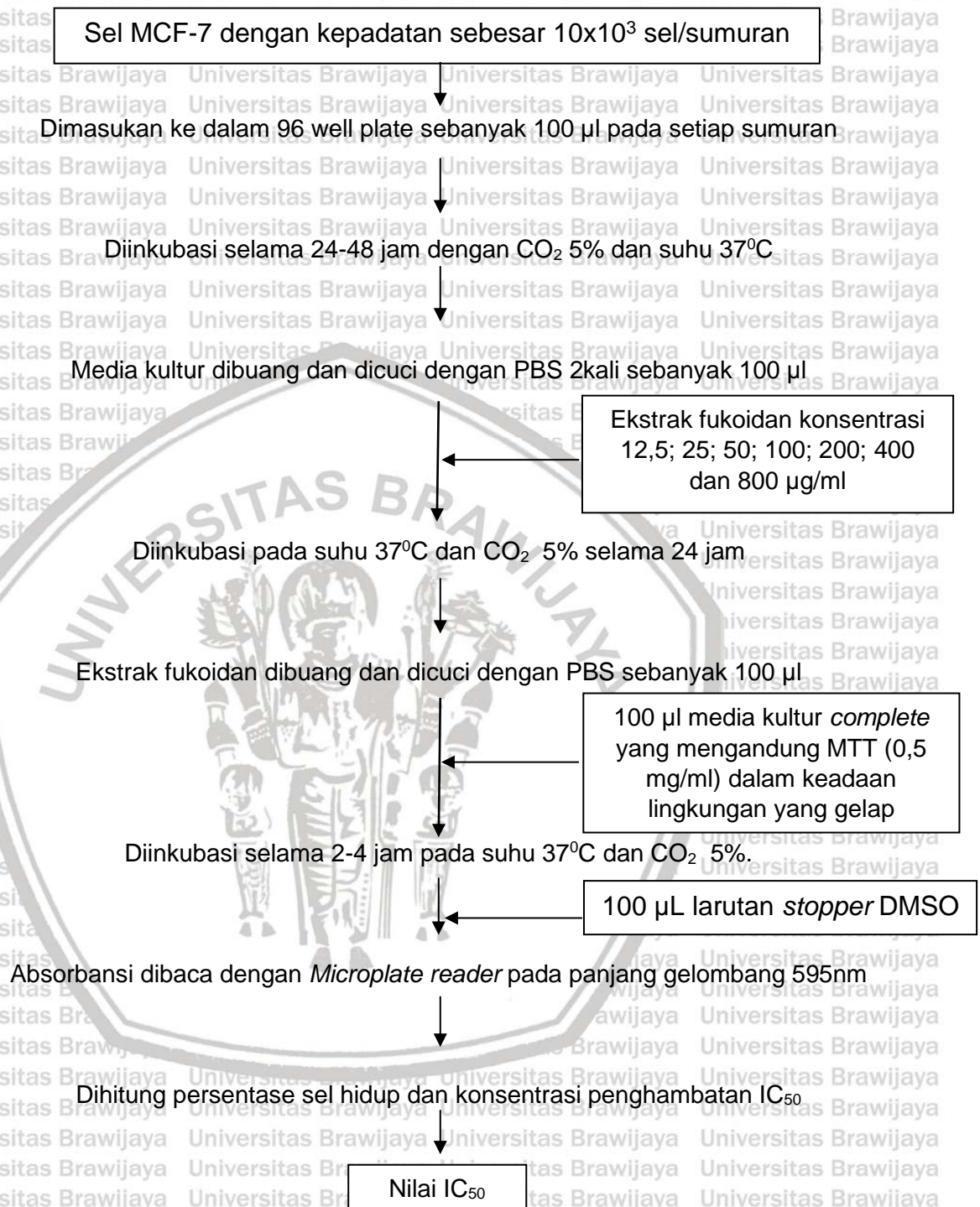
Hasil

**Gambar 3. 6** Panen sel dan Perhitungan Sel dengan *Haemocytometer*

(Modifikasi dari (Amrulloh, 2018) dan (Junedi, 2010a)).



### 3.6.6 Uji Sitotoksik dengan metode MTT



**Gambar 3. 7** Uji Sitotoksik dengan metode MTT

(Modifikasi dari (Meiyanto *et al.*, 2008)



### 3.6.7 Uji Apoptosis pewarnaan sel dengan pewarna *Hoechst* 33342

Sel MCF-7 dengan kepadatan  $30 \times 10^3$  sel/sumuran

Dimasukkan ke dalam 24 *well plate* yang telah dimasukkan *cover slip* sebanyak

300  $\mu$ l

Diinkubasi selama 24-48 jam dengan CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37°C

Dicuci dengan PBS

Media kultur dibuang dan dicuci dengan PBS sebanyak 300  $\mu$ l

Ekstrak fukoidan = nilai IC<sub>50</sub>

Diinkubasi pada suhu 37°C dan CO<sub>2</sub> 5% selama 24, 48 dan 72 jam

Ekstrak fukoidan dibuang

400  $\mu$ l PFA 4%

Diinkubasi selama 10 menit

PFA dibuang dan dicuci 2 kali dengan PBS dingin sebanyak 300  $\mu$ l

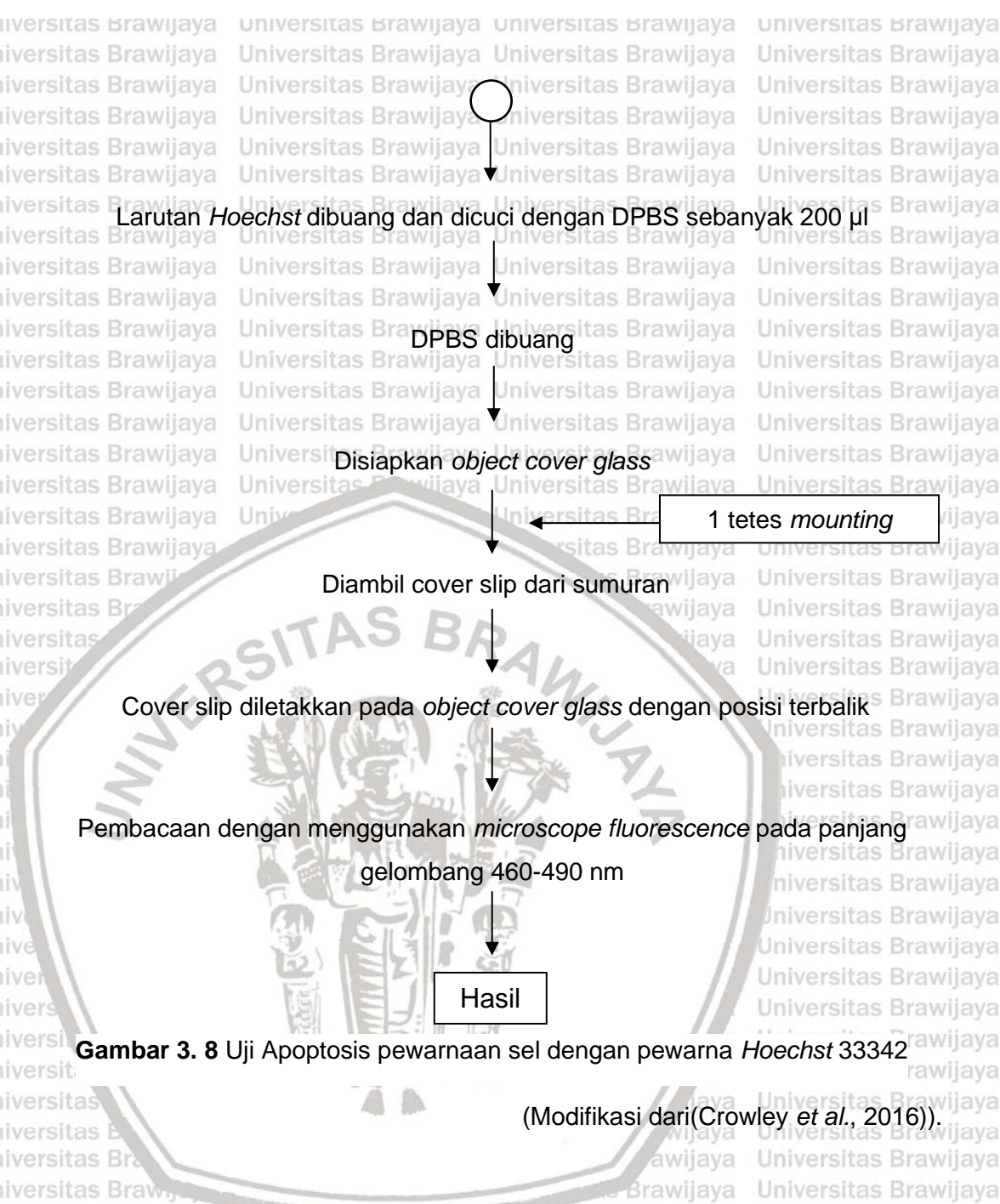
300  $\mu$ l DPBS

DPBS dibuang

200  $\mu$ l larutan *Hoechst* 1  $\mu$ g/ml dalam keadaan lingkungan yang gelap

Diinkubasi selama 5 menit





Gambar 3. 8 Uji Apoptosis pewarnaan sel dengan pewarna *Hoechst* 33342

(Modifikasi dari (Crowley *et al.*, 2016)).



### 3.6.8 Uji Perhitungan Sel Hidup dengan *Haemocytometer*

Sel MCF-7 dengan kepadatan sebesar  $10 \times 10^3$  sel/sumuran

Dimasukan ke dalam 96 well plate sebanyak 100  $\mu$ l pada setiap sumuran

Diinkubasi selama 24-48 jam dengan CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37°C

Media kultur dibuang dan dicuci dengan PBS sebanyak 100  $\mu$ l

Ekstrak fukoidan = nilai IC<sub>50</sub>

Diinkubasi pada suhu 37°C dan CO<sub>2</sub> 5% selama 24, 48 dan 72 jam

Ekstrak fukoidan dibuang dan dicuci dengan PBS sebanyak 100  $\mu$ l

PBS dibuang

40  $\mu$ L Tripsin-EDTA 0,25%

Diinkubasi selama 2 menit pada suhu 37° dengan CO<sub>2</sub> 5%

100  $\mu$ L media RPMI *complete* yang telah difilter

Diamati keadaan sel dengan mikroskop

Dilakukan pipetting menggunakan mikropipet

1ml media RPMI *complete* yang telah difilter

Dipindahkan ke dalam conical tube 15 ml

Diresuspensikan dan diambil sebanyak 10  $\mu$ l

10  $\mu$ l *tryphan blue*



**Gambar 3. 9** Uji Perhitungan Sel Hidup dengan *Haemocytometer*

(Modifikasi dari (Junedi, 2010a)).





## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pembuatan Konsentrasi Fukoidan

Fukoidan merupakan kelompok polisakarida bersulfat yang kaya akan substansi L-fukosa dan ester sulfat. Senyawa ini terdiri dari berbagai senyawa, seperti galaktosa, xilosa dan asam glukoronat (Ale *et al.*, 2011a). Ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* yang digunakan pada penelitian ini telah diekstraksi pada penelitian terdahulu, yaitu penelitian Laeliocattleya *et al.* (2020), dimana *S. cristaefolium* didapatkan dari perairan pantai Sumenep Madura, Jawa Timur. Ekstraksi dilakukan dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) pada frekuensi 40 KHz dengan pelarut air.

Variasi konsentrasi yang digunakan sebesar 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800 µg/ml. Pemilihan variasi seri konsentrasi tersebut didapatkan dari rumus perhitungan pada protokol *Cancer Chemoprevention Research Center* (Junedi, 2010b) dimana perhitungan tersebut dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Tahap pertama pada penelitian ini adalah pembuatan larutan stok ekstrak fukoidan dengan konsentrasi sebesar 2000 µg/ml, dapat dilihat pada **Gambar 4.1**. Kemudian dilakukan pengenceran secara bertingkat, perhitungan dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Volume pengenceran dihitung dengan rumus (Muzani, 2019) :

$$M1.V1 = M2.V2$$



**Gambar 4. 1** Larutan Ekstrak Fukoidan *S. cristaefolium* Fraksi Air  
(Dokumentasi Pribadi)



Menurut Puspantari *et al.* (2020), stuktur fukoidan memiliki beberapa gugus sulfat yang berbeda-beda sehingga mempengaruhi berat molekul fukoidan. Diketahui bahwa gugus sulfat tersebut memiliki peranan penting dalam kemampuan bioaktifitas yang dihasilkan oleh ekstrak fukoidan.

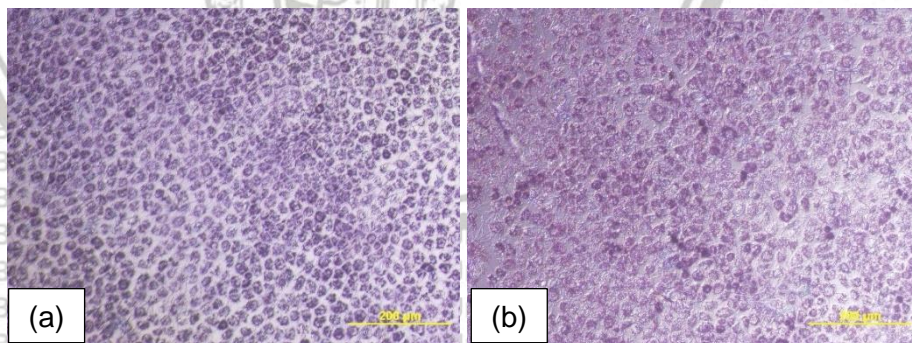
Ekstraksi fukoidan dengan pelarut air menghasilkan fukoidan dengan berat molekul yang lebih besar daripada ekstraksi menggunakan pelarut asam kuat.

Selain itu ekstraksi fukoidan dengan pelarut air menghasilkan rendemen ekstrak fukoidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut asam kuat.

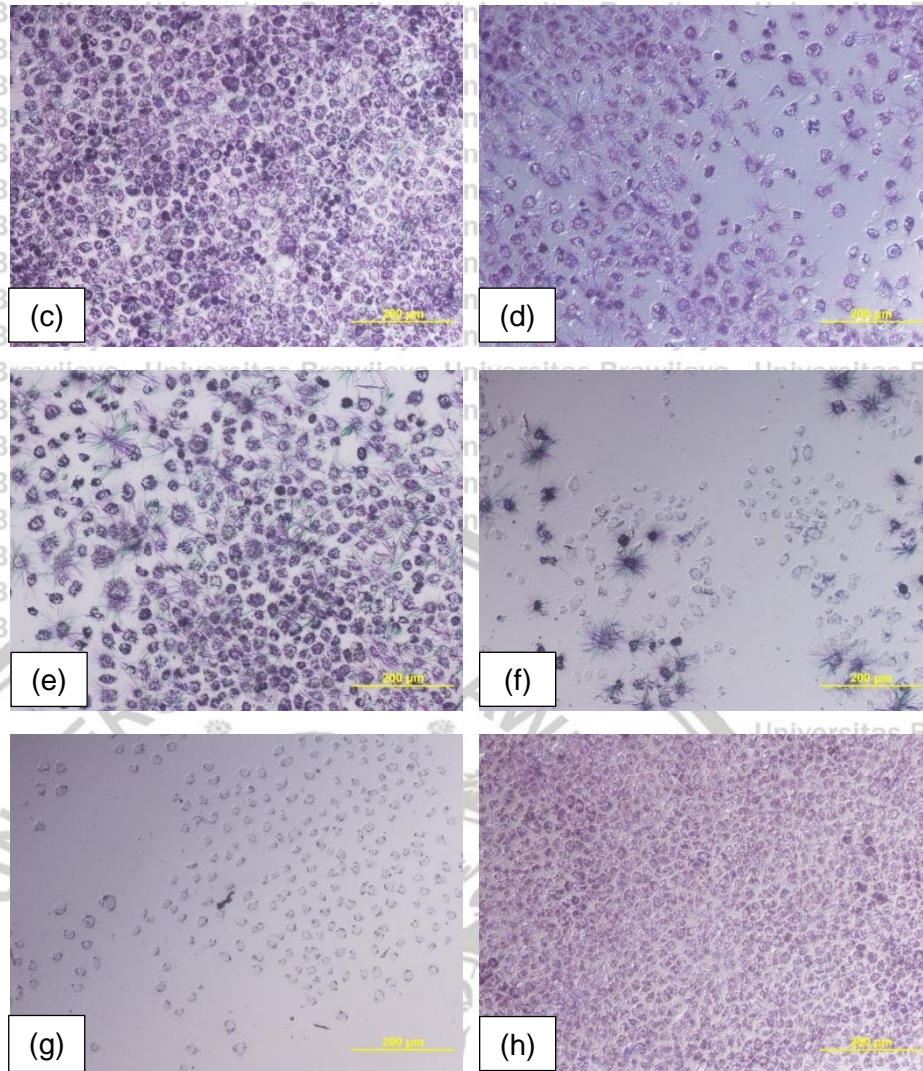
Lalu warna larutan ekstrak fukoidan juga lebih coklat dibandingkan dengan ekstrak pelarut asam kuat.

#### 4.2 Uji Sitotoksik dengan Metode MTT

Uji sitotoksik terhadap sel MCF-7 dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak fukoidan dalam menghambat pertumbuhan sel MCF-7. Pengujian ini dilakukan dengan pemberian variasi konsentrasi ekstrak fukoidan sebesar 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800  $\mu\text{g/ml}$ . Uji MTT adalah uji standar kolorimetri yang digunakan untuk mengukur proliferasi atau pertumbuhan sel (Schwab, 2011). Uji sitotoksik bertujuan untuk mengetahui nilai  $\text{IC}_{50}$  atau kadar sampel uji yang dapat menghambat pertumbuhan (anti proliferasi) sel kanker sampai 50% dari populasi sel aslinya (Meiyanto *et al.*, 2008). Dimana semakin kecil nilai  $\text{IC}_{50}$  yang didapatkan maka semakin tinggi potensi sampel senyawa uji sebagai agen sitotoksik sel kanker (Wati *et al.*, 2016).







**Gambar 4. 2** Sel hidup MCF-7 yang telah diberikan larutan MTT pada perbesaran mikroskopis 100X

Keterangan: Konsentrasi ekstrak 12,5 µg/ml (a), Konsentrasi ekstrak 25 µg/ml (b), Konsentrasi ekstrak 50 µg/ml (c), Konsentrasi ekstrak 100 µg/ml (d), Konsentrasi ekstrak 200 µg/ml (e), Konsentrasi ekstrak 400 µg/ml (f), Konsentrasi ekstrak 800 µg/ml (g), Kontrol sel (h) (Dokumentasi Pribadi)

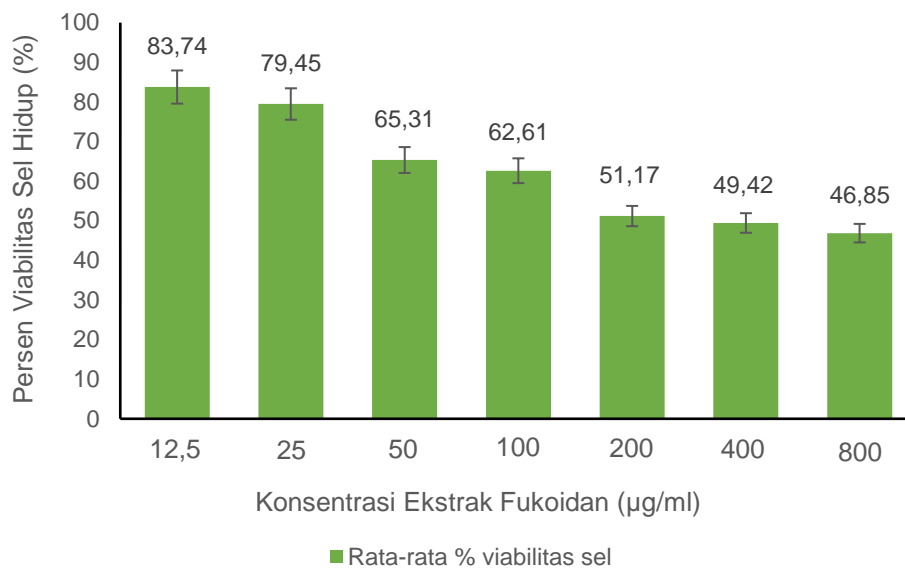
Sel MCF-7 yang telah diberi perlakuan variasi konsentrasi sampel ekstrak fukoidan mengalami perubahan warna menjadi ungu saat diberikan larutan MTT, dapat dilihat pada **Gambar 4.2.** dimana semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka warna ungu yang dihasilkan semakin tidak pekat. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak fukoidan yang diberikan, maka semakin sedikit jumlah sel hidup atau persentase viabilitas sel hidupnya. Menurut Amalia (2017), yang menyatakan



bahwa pada proses uji MTT terjadi reaksi reduksi oksidasi, dimana garam tetrazolium berwarna kuning tereduksi menjadi kristal formazan berwarna ungu dengan bantuan enzim suksinat dehidrogenase dalam jalur respirasi sel di mitokondria sel hidup. Semakin pekat warna ungu yang terbentuk maka semakin besar juga jumlah sel yang hidup.

Setelah dilakukan pembacaan nilai absorbansi menggunakan *microplate reader*, didapatkan nilai absorbansi. Kemudian dihitung persen viabilitas sel hidup dengan rumus sebagai berikut (Sitorus, 2013).

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$



**Gambar 4. 3** Grafik persen viabilitas sel MCF-7 terhadap konsentrasi ekstrak fukoidan *S. cristaefolium* fraksi air

Dimana hasil perhitungan viabilitas sel dapat dilihat pada **Gambar 4.3**. Diketahui bahwa grafik terbentuk secara linear dengan persentase tertinggi sebesar 83,74% pada perlakuan konsentrasi 12,5 µg/ml dan persentase terendah sebesar 46,85% pada perlakuan konsentrasi 800 µg/ml. Menurut Susilowati dan Anggraini (2019), yang menyatakan bahwa jumlah konsentrasi mempengaruhi persen viabilitas sel atau yang disebut dengan fenomena “*dose dependent*”. Dimana semakin besar jumlah konsentrasi ekstrak sampel yang diberikan, maka nilai persen viabilitas sel akan semakin rendah.



Setelah dilakukan perhitungan persen viabilitas sel, kemudian dicari persamaan regresi linier antara persen viabilitas sel hidup dengan log konsentrasi menggunakan *webtool aatbio IC<sub>50</sub> Calculator* (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>). Kemudian didapatkan persamaan regresi dimana nilai Y adalah 50. Sehingga didapatkan nilai X, dimana nilai antilog X merupakan nilai IC<sub>50</sub>. Berdasarkan hasil pengolahan data menggunakan *webtool aatbio IC<sub>50</sub> Calculator* (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>), dapat dilihat pada **Lampiran 3**. Didapatkan nilai IC<sub>50</sub> dengan konsentrasi ekstrak fukoidan *S. cristaefolium* fraksi air sebesar 319,134 µg/ml ± 3,742.

Konsentrasi atau nilai IC<sub>50</sub> dari *S. cristaefolium* fraksi air tersebut dapat dikategorikan sebagai agen anti kanker yang cukup aktif dalam menghambat proliferasi sel MCF-7. Karena menurut Sirait *et al.* (2019), yang menyatakan bahwa aktivitas sitotoksik sel kanker pada suatu ekstrak diklasifikasikan menjadi 4 kategori. Dimana kategori pertama adalah bersifat sangat aktif jika nilai IC<sub>50</sub> < 10 µg/ml, kategori kedua adalah bersifat aktif jika nilai IC<sub>50</sub> = 10-100 µg/ml, kategori ketiga adalah bersifat cukup aktif jika nilai IC<sub>50</sub> = 100-500 µg/ml dan kategori keempat adalah bersifat tidak aktif (tidak memiliki aktivitas sitotoksik) jika IC<sub>50</sub> > 500 µg/ml.

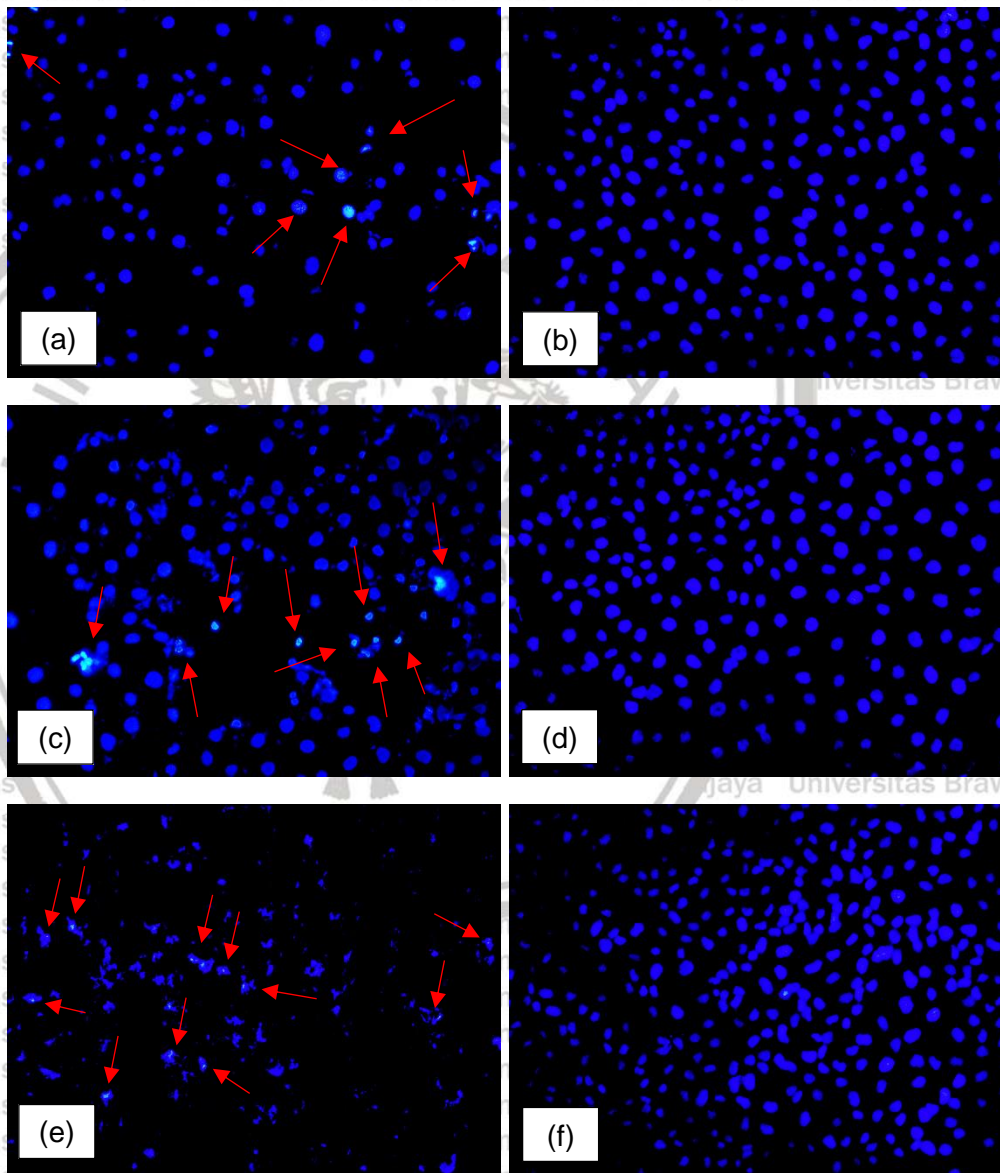
#### 4.3 Uji Apoptosis pewarnaan sel dengan pewarna *Hoechst 33342*

Uji apoptosis dengan metode pewarnaan sel menggunakan pewarna *Hoechst 33342* bertujuan untuk mendeteksi adanya kematian sel kanker payudara MCF-7 akibat pengaruh perlakuan ekstrak fukoidan dari *S. cristaefolium* fraksi air dengan berbagai lama waktu inkubasi (24, 48 dan 72 jam). Apoptosis merupakan proses kematian sel secara terprogram dengan adanya perubahan inti sel, proses apoptosis bertujuan untuk mempertahankan kestabilan populasi sel dalam sistem kehidupan makhluk hidup (Schiffer, 2006).

Menurut Putri *et al.* (2016), yang menyatakan bahwa sel yang mengalami apoptosis pada lingkungan *in vivo* akan membentuk badan apoptosis. Dimana badan apoptosis tersebut akan difagositosis (dimakan) oleh sel lain disekitarnya. Sementara, pada sel yang mengalami apoptosis di lingkungan *in*



*in vitro* dapat mengalami pembengkakan kemudian terjadi lisis sel yang dinamakan dengan nekrosis sekunder. Faktor yang menyebabkan hal tersebut Sebagian besar bersifat ekstrinsik, seperti perbedaan gradien osmosis, perubahan suhu, proses *hypoxic-ischemic* (perubahan kadar oksigen), adanya senyawa toksik dan trauma sel. Menurut Kim *et al.* (2007), sel yang mengalami apoptosis dapat dideteksi secara mikroskopis dengan cara pewarnaan sel menggunakan pewarna *fluorescence*, seperti pewarna *Hoechst 33342*.



**Gambar 4. 4** Sel MCF-7 yang telah diwarnai oleh pewarna *Hoechst 33342* pada perbesaran mikroskopis 200X



Keterangan: Sampel uji perlakuan 24 jam (a), Kontrol sel perlakuan 24 jam (b), Sampel uji perlakuan 48 jam (c), Kontrol sel perlakuan 48 jam (d), Sampel uji perlakuan 72 jam (e), Kontrol sel perlakuan 72 jam (f) (Dokumentasi Pribadi)

Pada **Gambar 4.4.** diketahui bahwa pada setiap perlakuan lama waktu inkubasi (24, 48, dan 72 jam) dengan ekstrak fukoidan terdapat sel yang mengalami apoptosis, yaitu sel yang berpendar terang dan mengalami fragmentasi yang ditandai dengan anak panah pada gambar. Selain itu terlihat bahwa semakin lama waktu inkubasinya, sel yang mengalami apoptosis semakin banyak. Dimana pada perlakuan 24 dan 48 jam sel yang berpendar semakin banyak. Lalu pada perlakuan 72 jam terlihat bahwa sel sudah tidak berbentuk bulat utuh dan membentuk badan apoptosis. Menurut Sirait *et al.* (2019), yang menyatakan bahwa sel yang mengalami apoptosis akan memancarkan cahaya *fluorescence* berwarna biru terang. Dimana pada prinsipnya pewarna *Hoechst* bisbenzimidazole akan berikatan dengan inti DNA khususnya pada pasangan basa yang kaya akan AT (Adenin-Timin), sehingga menghasilkan cahaya *fluorescence* biru yang berpendar dengan terang pada inti sel yang mengalami apoptosis.

Menurut Yulianto *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa selain inti sel berpendar dengan terang, sel yang mengalami apoptosis juga menunjukkan adanya perubahan morfologi secara seluler. Perubahan tersebut yaitu adanya penyusutan densitas sel (*cell shrinkage*), dimana pada fase tersebut ditandai dengan ukuran sel yang semakin kecil, organel sel yang semakin rapat dan sitoplasma yang semakin padat. Selain itu, menurut Putri *et al.* (2016), sel yang mengalami apoptosis ditandai dengan adanya kondensasi kromatin dari proses piknosis, fragmentasi inti sel, dan sel, serta kondensasi sitoplasma sehingga terbentuk badan apoptosis. Sementara pada kontrol sel (sel tanpa perlakuan ekstrak fukoidan) menunjukkan tidak terdapat sel yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan mempertahankan bentuk selnya yang utuh dan tidak terfragmentasi. Menurut Sivakumaran *et al.* (2018), yang menyatakan bahwa morfologi dari kontrol sel MCF-7 dengan pewarnaan *Hoechst* menunjukkan karakteristik, seperti mempertahankan bentuknya yang oval utuh dengan sudut atau poligonalnya yang normal, memiliki inti sel yang



utuh dengan kromatin yang tersebar secara merata dan warna *fluorescence* biru yang dihasilkan kurang cerah atau tidak berpendar.

Pada penelitian Atashrazm *et al.* (2015), diketahui bahwa senyawa fukoidan memiliki bioaktivitas sebagai proapoptosis terhadap sel kanker payudara MCF-7. Dimana pada mekanismenya senyawa fukoidan diketahui dapat memicu apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik yang menyebabkan pelepasan sitokrom C dan aktivasi sinyal serta reseptor kematian. Dalam menginduksi apoptosis, ekstrak fukoidan menekan regulasi (*downregulation*) dari ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-xl yang merupakan gen reseptor anti-apoptosis. Kemudian ekstrak fukoidan juga menginduksi aktivasi (*upregulation*) dari protein caspase 3, 7 dan 8 yang merupakan protein pro apoptosis yang mengekspresikan kematian sel terprogram.

#### 4.4 Perhitungan Jumlah Sel Hidup dengan *Haemocytometer*

Setelah dilakukan uji sitotoksik dan didapatkan nilai IC<sub>50</sub> serta uji apoptosis dengan pewarna *Hoechst* 33342. Kemudian dilakukan uji selanjutnya, yaitu menghitung jumlah viabilitas sel hidup dengan alat *haemocytometer*, dimana terdapat variasi waktu inkubasi sebesar 24, 48 dan 72 jam. Dimana uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak fukoidan terhadap laju proliferasi sel kanker payudara MCF-7 selama 24, 48 dan 72 jam dengan melihat jumlah sel nya dalam persen viabilitas sel hidup. Menurut Vembadi *et al.* (2019), *haemocytometer* merupakan alat yang digunakan untuk menghitung jumlah sel secara cepat. Dimana alat ini memiliki kelebihan yaitu dapat digunakan pada sel hidup maupun mati. Perhitungan dilakukan dengan rumus sebagai berikut (Junedi, 2010a).

$$\begin{aligned} & \text{Jumlah sel terhitung/mL} \\ & = \frac{(\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D})}{4} \times 10^4 \end{aligned}$$

Setelah didapatkan data perhitungan jumlah sel, yang dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Dilakukan pengolahan data menggunakan *Minitab* 17, dimana digunakan metode rancangan acak lengkap (RAL) dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ) untuk mengetahui pengaruh lama waktu inkubasi sampel fukoidan terhadap jumlah sel MCF-7. Berdasarkan hasil uji ANOVA pada **Lampiran 5**. Diketahui bahwa lama waktu inkubasi memberikan pengaruh signifikan terhadap jumlah viabilitas sel MCF-7, yang ditandai dengan



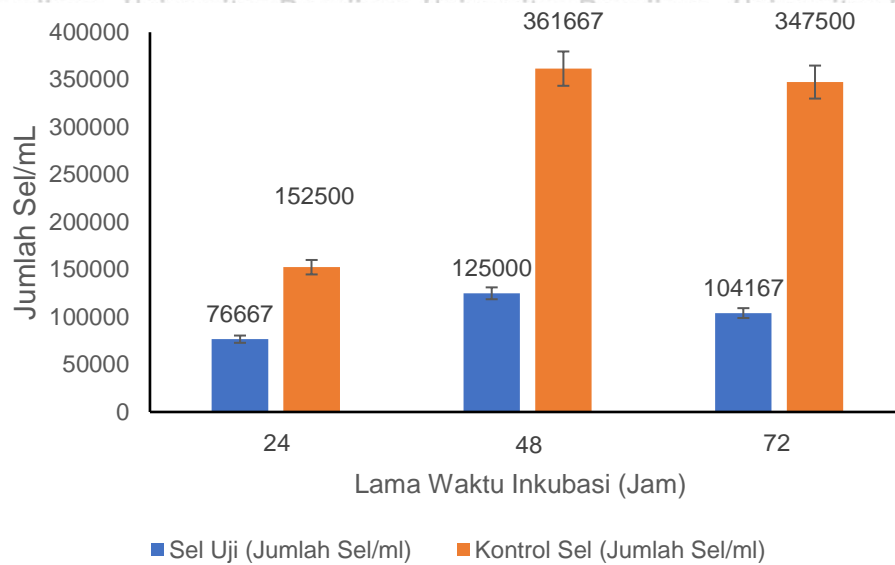
nilai P kurang dari 0,05. Berdasarkan dari hasil uji ANOVA tersebut, maka dilakukan uji Tukey pada faktor perlakuan lama waktu inkubasi.

**Tabel 4. 1** Hasil uji lanjut Tukey lama waktu inkubasi terhadap jumlah sel MCF7

Perlakuan	Rata-rata nilai jumlah sel MCF-7 (sel/mL)
24 Jam	76667± 3819 <sup>c</sup>
48 Jam	125000± 7500 <sup>a</sup>
72 Jam	104167± 6292 <sup>b</sup>

Keterangan: Nilai rata-rata jumlah sel MCF-7 ± SD (n = 3)

Berdasarkan hasil uji lanjut Tukey pada **Tabel 4.1**. Diketahui bahwa pada masing-masing perlakuan (24, 48 dan 72 jam) terdapat peningkatan dan perbedaan jumlah sel per ml nya. Dimana sebelumnya jumlah sel awal yang ditanam pada *well plate* adalah sebesar 30.000 sel/ml. Selain itu diketahui adanya perbedaan notasi, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada setiap perlakuan lama waktu inkubasi (24, 48 dan 72 jam) memberikan pengaruh signifikan terhadap setiap perlakuan satu sama lain dan jumlah sel MCF-7. Menurut Pertiwi *et al.* (2020), yang menyatakan bahwa variasi lama waktu inkubasi sel merupakan faktor berpengaruh terhadap konsentrasi dan jumlah persen viabilitas sel. Dimana semakin lama waktu inkubasi akan mempengaruhi konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat proliferasi sel dari jumlah populasi sel aslinya.



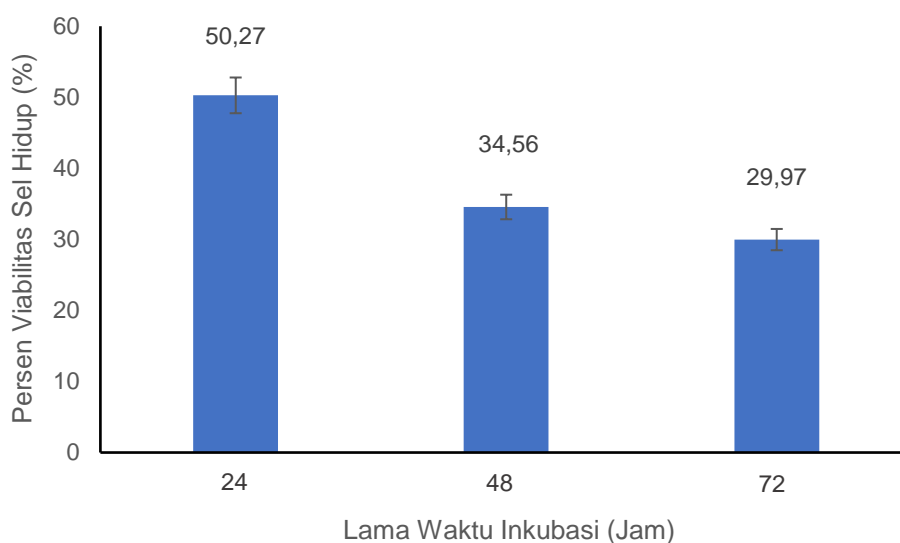
**Gambar 4. 5** Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi (Jam) terhadap Jumlah Sel MCF-7 (sel/mL)

Berdasarkan pada grafik di **Gambar 4.5.** dapat diketahui bahwa jumlah sel hidup yang telah diberikan perlakuan ekstrak fukoidan lebih rendah dibandingkan dengan jumlah sel pada kontrol sel (tanpa perlakuan ekstrak fukoidan). Hal tersebut membuktikan bahwa ekstrak fukoidan dari *Sargassum cristefolium* fraksi air dapat berperan sebagai agen antikanker yang bersifat anti proliferasi terhadap sel kanker payudara MCF-7. Pada penelitian Atashrazm *et al.* (2015), diketahui bahwa senyawa fukoidan dari *Sargassum Sp.* memiliki bioaktivitas sebagai antiproliferasi terhadap sel kanker payudara MCF-7. Dimana pada mekanismenya sebagai agen antiproliferasi diketahui mampu menghambat perkembangan siklus sel kanker payudara. Terhambatnya perkembangan siklus sel kanker dikarenakan fukoidan mampu menghambat fase G0 atau G1 dalam siklus pembelahan sel MCF-7. Hal tersebut terjadi karena adanya penekanan aktivitas CDK (*Cyclin Dependent Kinase*), yaitu CDK2 dan CDK4 terhambat karena peningkatan jumlah p21/WAF1/CIP1, yang merupakan protein yang berfungsi menghambat aktivitas CDK dan aktivasi p53. Dimana CDK2 dan CDK4 berperan dalam amplifikasi sentrosom dan duplikasi sentriol didalam siklus sel. Jika CDK2 dan CDK4 terhambat, maka siklus pembelahan sel akan terhambat juga dan tidak dapat dilanjutkan.



Selain itu, pada grafik di **Gambar 4.5.** tersebut diketahui bahwa terjadi peningkatan jumlah sel hidup pada perlakuan 24 jam ke 48 jam, kemudian terjadi penurunan jumlah sel hidup pada perlakuan 48 jam ke 72 jam. Penurunan tersebut terjadi dikarenakan sel MCF-7 semakin lama terpapar oleh ekstrak dan jumlah nutrisi yang terkandung di dalam media telah habis sehingga sel memasuki fase pertumbuhan terakhir. Hal ini sesuai dengan literatur dari (Sarasmita dan Laksmiani, 2015) yang menyatakan bahwa sel yang dikultur secara *in vitro* memiliki tiga fase pertumbuhan, yaitu *lag phase*, *log phase* dan *plateau phase*. Dimana *lag phase* merupakan proses sel untuk melakukan adaptasi dengan memulai pelekatan dan penyebaran dasar substrat. *Log phase* merupakan periode peningkatan jumlah populasi sel secara eksponensial, dimana pada fase ini kecepatan metabolisme sel dalam keadaan optimum sehingga dihasilkan jumlah populasi sel tertinggi. *Plateau phase* merupakan fase yang ditandai dengan konfluennya kultur pada permukaan substrat, dimana pada fase ini kemampuan pertumbuhan sel menurun hingga 10%. Faktor yang mempengaruhi kemampuan pertumbuhan sel adalah jumlah kandungan nutrisi pada media kultur. Dimana sel yang telah konfluen akan menghasilkan warna media kultur yang pucat, hal tersebut menunjukkan bahwa nutrisi yang terkandung dalam media kultur telah habis, sehingga perlu dilakukan penggantian media kultur.

Selain itu menurut Sitorus (2013), yang menyatakan bahwa terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan kultur sel secara *in vitro*, seperti suhu, pH, kadar oksigen, kadar CO<sub>2</sub>, nutrisi dan kualitas serta kuantitas media kultur. Media kultur yang digunakan mengandung nutrisi yang menunjang pertumbuhan sel, seperti vitamin, asam amino, garam organik, glukosa dan zat lainnya. Dimana nutrisi tersebut akan habis seiring bertambahnya jumlah sel dan waktu, sehingga untuk mempertahankan kehidupan dan pertumbuhan sel perlu dilakukan penambahan nutrisi dengan cara melakukan penggantian media baru setiap 2 atau 3 hari sekali.



**Gambar 4. 6** Grafik Pengaruh Waktu Inkubasi (Jam) terhadap Persen Viabilitas Sel MCF-7 (%)

Pada grafik di **Gambar 4.6.** diketahui bahwa semakin lama waktu inkubasi, maka nilai persen viabilitas sel hidup yang dihasilkan semakin menurun. Dimana pada waktu 24 jam didapatkan nilai persen viabilitas sel sebesar 50,27 %. Pada waktu 48 jam didapatkan nilai persen viabilitas sel sebesar 34,56 %, dan pada 72 jam didapatkan nilai persen viabilitas sel sebesar 29,97 %. Hal tersebut menunjukkan adanya peningkatan efektifitas dari ekstrak fukoidan *S. cristaefolium* fraksi air. Menurut Sirait (2018), penurunan persen viabilitas sel hidup seiring dengan lamanya waktu inkubasi sel dengan ekstrak menunjukkan adanya pengaruh antara lamanya waktu inkubasi terhadap nilai  $IC_{50}$  dan kemampuan proliferasi sel kanker.

Menurut Wati *et al.* (2016), kemampuan penghambatan proliferasi sel kanker dari suatu senyawa ekstrak dapat dikaitkan dengan proses *cell cycle arrest*. Dimana pada proses *cell cycle arrest*, sel yang mengalami kerusakan DNA atau RNA akan mengaktifasikan gen p53, yaitu gen yang dapat menghentikan siklus sel secara sementara atau permanen. Dimana pada saat siklus sel terhenti, terjadi proses perbaikan DNA atau RNA sehingga siklus sel dapat berjalan kembali, akan tetapi jika kerusakan pada DNA atau RNA cukup parah dan tidak dapat diperbaiki, maka gen p53 akan menginisiasi sel untuk mengalami kematian sel terprogram yang disebut dengan apoptosis.



## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Perlakuan variasi seri konsentrasi pada uji sitotoksitas sel MCF-7 memberikan pengaruh yang signifikan, dimana semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka nilai persen viabilitas sel semakin kecil.
2. Uji sitotoksitas ekstrak kasar fukoidan terhadap sel MCF-7 menggunakan metode MTT Assay didapatkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 319,134  $\mu\text{g/ml}$ .
3. Uji apoptosis dengan metode pewarnaan sel menggunakan pewarna *Hoechst 33342* dengan perlakuan lama waktu inkubasi sebesar 24, 48 dan 72 jam. Diketahui pada setiap perlakuan terdapat sel yang mengalami apoptosis.
4. Uji perhitungan sel hidup menggunakan *Haemocytometer* dilakukan dengan perlakuan lama waktu inkubasi sebesar 24, 48 dan 72 jam. Diketahui bahwa dihasilkan nilai persen viabilitas sel MCF-7 sebesar 50,27 %, 34,56 % dan 29,97%.
5. Ekstrak kasar fukoidan dari *S. cristaefolium* fraksi air memiliki aktivitas anti-kanker, pro-apoptosis dan anti-proliferasi terhadap sel kanker payudara MCF-7.

### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme proses pro-apoptosis dan anti-proliferasi dari ekstrak *S. cristaefolium* fraksi air terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara molekuler.
2. Perlunya uji *doubling time* untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat mengenai proliferasi sel MCF-7.
3. Perlunya penambahan warna dalam uji pewarnaan sel untuk mengetahui lebih jelas mengenai sel yang mengalami apoptosis tahap awal, apoptosis tahap lanjut dan nekrosis.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ale, M. T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J. D. & Meyer, A. S. 2011a. Fucoidan From *Sargassum* Sp. And *Fucus Vesiculosus* Reduces Cell Viability Of Lung Carcinoma And Melanoma Cells In Vitro And Activates Natural Killer Cells In Mice In Vivo. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 49, 331-336.
- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D. & Meyer, A. S. 2011b. Important Determinants For Fucoidan Bioactivity: A Critical Review Of Structure-Function Relations And Extraction Methods For Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides From Brown Seaweeds. *Marine Drugs*, 9, 2106-2130.
- Amalia, P. K. 2017. *Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (Typonium Flagelliforme L.), Kemangi (Ocimum Sanctum L.), Dan Pepaya (Carica Papaya L.) Terhadap Sel Mcf-7*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Amrulloh, M. F. 2018. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Bunga Matahari (Helianthus Annuus) Terhadap Induksi Apoptosis, Siklus Sel, Dan Ekspresi P53 Sel Kanker Serviks Hela*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Anam, C., Firdausi, K. S. & Sirojudin, S. 2007. Analisis Gugus Fungsi Pada Sampel Uji, Bensin Dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi Ftir. *Berkala Fisika*, 10, 79-85.
- Anggorowati, L. 2013. Faktor Risiko Kanker Payudara Wanita. *Kemas: Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 8.
- Atashrazm, F., Lowenthal, R. M., Woods, G. M., Holloway, A. F. & Dickinson, J. L. 2015. Fucoidan And Cancer: A Multifunctional Molecule With Anti-Tumor Potential. *Marine Drugs*, 13, 2327-2346.
- Ayu, M. S. 2015. Uji Sitotoksitas Dan Proliferasi Senyawa 1-(2-Klorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara (Mcf-7).



Aziz, T., Kn, R. C. & Fresca, A. 2009. Pengaruh Pelarut Heksana Dan Etanol, Volume Pelarut, Dan Waktu Ekstraksi Terhadap Hasil Ekstraksi Minyak Kopi. *Jurnal Teknik Kimia*, 16.

Baig, S., Seevasant, I., Mohamad, J., Mukheem, A., Huri, H. & Kamarul, T. 2016. Potential Of Apoptotic Pathway-Targeted Cancer Therapeutic Research: Where Do We Stand? *Cell Death & Disease*, 7, E2058-E2058.

Bazhulina, N., Nikitin, A., Rodin, S., Surovaya, A., Kravatsky, Y. V., Pismensky, V., Archipova, V., Martin, R. & Gursky, G. 2009. Binding Of Hoechst 33258 And Its Derivatives To Dna. *Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics*, 26, 701-718.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. 2018. Global Cancer Statistics 2018: Globocan Estimates Of Incidence And Mortality Worldwide For 36 Cancers In 185 Countries. *Ca: A Cancer Journal For Clinicians*, 68, 394-424.

Camarillo, I. G., Xiao, F., Madhivanan, S., Salameh, T., Nichols, M., Reece, L. M., Leary, J. F., Otto, K., Natarajan, A. & Ramesh, A. 2014. Low And High Voltage Electrochemotherapy For Breast Cancer: An In Vitro Model Study. *Electroporation-Based Therapies For Cancer*, 55-102.

Carpenter, K. E. & Niem, V. H. 1998. *The Living Marine Resources Of The Western Central Pacific: 1. Seaweeds, Corals, Bivalves And Gastropods*.

Chen, R. & Cancerhelp, T. 2012. *Solusi Cerdas Mencegah & Mengobati Kanker*, Agromedia.

Crowley, L. C., Marfell, B. J. & Waterhouse, N. J. 2016. Analyzing Cell Death By Nuclear Staining With Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016, Pdb. Prot087205.

Darma, A. P., Ashari, R. A., Nugroho, P. A., Monikawati, A., Fauzi, I. A., Hermawan, A. & Meiyanto, E. 2011. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis Angulata L.*) Pada Sel Kanker Leher Rahim Hela Melalui Modulasi Ekspresi Protein P53. *Farmasains: Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kesehatan*, 1.



Diantini, A., Febriyanti, M., Barliana, M. I. & Abdulah, R. 2013. Sitotoksisitas Kombinasi Ekstrak Puspa (*Schiima Wallichii*) Dankecambah Brokoli Iv (*Brassica Olerasea*) Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf-7. *Fitofarmaka: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3, 159-170.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review Of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.

Farchan, M. & Mulyono, M. 2011. *Dasar Dasar Budidaya Perikanan*, Stp Press.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D., Piñeros, M., Znaor, A. & Bray, F. 2019. Estimating The Global Cancer Incidence And Mortality In 2018: Globocan Sources And Methods. *International Journal Of Cancer*, 144, 1941-1953.

Fernando, I. P. S., Sanjeewa, K. K. A., Lee, H. G., Kim, H.-S., Vaas, A. P. J. P., De Silva, H. I. C., Nanayakkara, C. M., Abeytunga, D. T. U., Lee, D.-S. & Lee, J.-S. 2020. Fucoidan Purified From *Sargassum Polycystum* Induces Apoptosis Through Mitochondria-Mediated Pathway In HI-60 And Mcf-7 Cells. *Marine Drugs*, 18, 196.

George, M. & Ashing, K. T. 2017. *Detecting & Living With Breast Cancer For Dummies*, Wiley.

Hambali, M. & Noermansyah, F. 2015. Ekstraksi Antosianin Dari Ubi Jalar Dengan Variasi Konsentrasi Solven, Dan Lama Waktu Ekstraksi. *Jurnal Teknik Kimia*, 20.

Hansen, P. 2000. Use Of A Hemocytometer. *Department Of Animal Science, University Of Florida*, 10-15.

Hardian, A. B., Nugrahani, W. P., Irahma Putri Rahmawati, D. & Megarani, V. 2020. Metode Penghitungan Eritrosit Dan Leukosit Total Pada Raptor Di Wildlife Rescue Centre (Wrc) Jogja.

Hermawan, A., Meiyanto, E. & Susidarti, R. A. 2010. Hesperidin Meningkatkan Efek Sitotoksik Doxorubicin Pada Sel Mcf-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21, 8-17.



Hifney, A. F., Fawzy, M. A., Abdel-Gawad, K. M. & Gomaa, M. 2016. Industrial Optimization Of Fucoïdan Extraction From Sargassum Sp. And Its Potential Antioxidant And Emulsifying Activities. *Food Hydrocolloids*, 54, 77-88.

Husni, A., Pamungkas, B., Sinurat, E. & Isnansetyo, A. 2021. Characteristics And Cytotoxic Activity Of Fucoïdan From The Brown Seaweed Sargassum Hystrix Against Mcf-7 Breast Cancer Cells. *Tropical Journal Of Natural Product Research*, 5, 564-569.

Ipb, D. G. B. 2016. *Teknologi Pengembangan Perikanan Dan Kelautan Untuk Memperkuat Ketahanan Pangan Serta Memacu Perekonomian Nasional Secara Berkelanjutan*, Pt Penerbit Ipb Press.

Isnansetyo, A., Lutfia, F. N. L., Nursid, M. & Susidarti, R. A. 2017. Cytotoxicity Of Fucoïdan From Three Tropical Brown Algae Against Breast And Colon Cancer Cell Lines. *Pharmacognosy Journal*, 9.

Junedi, S. 2010a. Protokol: Perhitungan Sel. *Cancer Chemoprevention Research Center. Fakultas Farmasi, Ugm*.

Junedi, S. 2010b. Protokol: Preparasi Sampel. *Cancer Chemoprevention Research Center. Fakultas Farmasi, Ugm*.

Kartikaningsih, H. 2020. Antibakteri Ekstrak Etanol Serbuk Kering Sargassum Cristaefolium Terhadap Bakteri Escherischia Coli Dan Salmonella Thyposa. *Jfmr (Journal Of Fisheries And Marine Research)*, 4, 53-60.

Kasanah, N., T, T. I. & Press, U. 2019. *Rumput Laut Indonesia: Keanekaragaman Rumput Laut Di Gunung Kidul Yogyakarta*, Ugm Press.

Kim, E. J., Park, S. Y., Shin, H.-K., Kwon, D. Y., Surh, Y.-J. & Park, J. H. Y. 2007. Activation Of Caspase-8 Contributes To 3, 3'-Diindolylmethane-Induced Apoptosis In Colon Cancer Cells. *The Journal Of Nutrition*, 137, 31-36.

Kim, S. K. 2013. *Marine Nutraceuticals: Prospects And Perspectives*, Crc Press.

Kumar, K., Srivastav, S. & Sharanagat, V. S. 2020. Ultrasound Assisted Extraction (Uae) Of Bioactive Compounds From Fruit And Vegetable Processing By-Products: A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 105325.

Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. 2018. Analysis Of Cell Viability By The Mtt Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, Pdb. Prot095505.



Laeliocattleya, R. A., Suloi, A., Gayatri, P., Putri, N. & Anggraeni, Y. Fucoidan Content From Brown Seaweed (*Sargassum Filipendula*) And Its Potential As Radical Scavenger. *Journal Of Physics: Conference Series*, 2020. Iop Publishing, 012023.

Lee, A. V., Oesterreich, S. & Davidson, N. E. 2015. MCF-7 Cells—Changing The Course Of Breast Cancer Research And Care For 45 Years. *Jnci: Journal Of The National Cancer Institute*, 107.

Leliaert, F., De Clerck, O. & Coppejans, E. 2011. Marine Macroalgae; Seaweeds. *Field Guide To The Seashores Of Eastern Africa And The Western Indian Ocean Islands*. Swedish International Development Co-Operation (Sida).

Lim, S. J. & Aida, W. M. W. 2017. Extraction Of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) From Brown Seaweed. *Seaweed Polysaccharides*. Elsevier.

Lin, K. K. & Goodell, M. A. 2011. Detection Of Hematopoietic Stem Cells By Flow Cytometry. *Methods In Cell Biology*, 103, 21-30.

Mahajan, S. D., Law, W.-C., Aalinkeel, R., Reynolds, J., Nair, B. B., Yong, K.-T., Roy, I., Prasad, P. N. & Schwartz, S. A. 2012. Nanoparticle-Mediated Targeted Delivery Of Antiretrovirals To The Brain. *Methods In Enzymology*. Elsevier.

Mak, W., Wang, S. K., Liu, T., Hamid, N., Li, Y., Lu, J. & White, W. L. 2014. Anti-Proliferation Potential And Content Of Fucoidan Extracted From Sporophyll Of New Zealand *Undaria Pinnatifida*. *Frontiers In Nutrition*, 1, 9.

Maulani, I. R. 2012. Aspek Molekuler Pada Metastasis Sel Kanker. *Mdj (Makassar Dental Journal)*, 1.

Meiyanto, E., Susidarti, R. A., Handayani, S. & Rahmi, F. 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca Catechu L.*) Mampu Menghambat Proliferasi Dan Memacu Apoptosis Sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19, 12-19.

Muzani, A. A. 2019. Pengembangan Sensor Kreatinin Melalui Modifikasi Membran Nylon Dengan Molecularly Imprinted Polymer. *Indonesian Journal Of Materials Chemistry*, 2, 16-24.

Novianti, F. A. & Purnami, S. W. 2012. Analisis Diagnosis Pasien Kanker Payudara Menggunakan Regresi Logistik Dan Support Vector Machine (Svm)





- Berdasarkan Hasil Mamografi Fourina Ayu Novianti Dan Santi Wulan Purnami. *Jurnal Sains Dan Seni Its*, 1, D147-D152.
- Oktiyani, N. & Muhlisin, A. 2017. Akurasi Hitung Jumlah Eritrosit Metode Manual Dan Metode Otomatis. *Medical Laboratory Technology Journal*, 3, 37-41.
- Pertiwi, W., Arisanty, D. & Linosefa, L. 2020. Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (Annona Muricata Lin) Terhadap Viabilitas Cell Line Kanker Payudara T47d Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 9.
- Phelan, K. & May, K. M. 2015. Basic Techniques In Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols In Cell Biology*, 66, 1.1. 1-1.1. 22.
- Pirsko, V., Cakstina, I., Priedite, M., Dortane, R., Feldmane, L., Nakazawa-Miklasevica, M., Daneberga, Z., Gardovskis, J. & Miklasevics, E. 2018. An Effect Of Culture Media On Epithelial Differentiation Markers In Breast Cancer Cell Lines Mcf7, Mda-Mb-436 And Skbr3. *Medicina*, 54, 11.
- Pratama, F. E. & Nuwarda, R. F. 2018. Senyawa Aktif Antikanker Dari Bahan Alam Dan Aktivasnya. *Farmaka*, 16, 149-158.
- Pratiwi, T. F. 2012. Kualitas Hidup Penderita Kanker. *Developmental And Clinical Psychology*, 1.
- Purwaningsih, E. 2014. Pemendekan Telomer Dan Apoptosis. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 22, 132-141.
- Puspantari, W., Kusnandar, F., Lioe, H. N. & Laily, N. Penghambatan Fraksi Fukoidan Rumput Laut Cokelat (Sargassum Polycystum Dan Turbinaria Conoides) Terhadap  $\pm$ -Amilase Dan  $\pm$ -Glukosidase. 2020.
- Putri, D. U., Hutomo, S. & Susilowati, H. 2016. Profil Kerusakan Nukleus Sel Hela Oleh Induksi Ekstrak Ethanol Curcuma Longa. *Berkala Ilmiah Kedokteran Duta Wacana*, 1, 120-126.
- Putri, H. 2013. Protokol: Uji Sitotoksik Metode Mtt. *Cancer Chemoprevention Research Center. Fakultas Farmasi, Ugm*.
- Rosita, S. S. & Saifudin, A. 2017. Uji Sitotoksitas Ekstak Metanol Jamur Dari Isolat Tanah Di Daerah Istimewa Yogyakarta Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf7. Universitas Muhammadiyah Surakarta.



Santiañez, W. J. E. & Trono Jr, G. C. 2013. Taxonomy Of The Genus Sargassum (Fucales, Phaeophyceae) From Alabat Island, Quezon, Northeastern Philippines. *Science Diliman*, 25.

Sarasmita, M. & Laksmiani, N. 2015. Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*) Pada Sel Kanker Payudara Secara In Vitro Dan In Silico. *Jurnal Farmasi Udayana*, 4, 279864.

Satyarsa, A. B. 2019. Potential Of Fucoidan From Brown Seaweeds (*Sargassum* Sp.) As Innovation Therapy On Breast Cancer. *Journal Of Medicine And Health*, 2.

Schiffer, D. 2006. *Brain Tumor Pathology: Current Diagnostic Hotspots And Pitfalls*, Springer Science & Business Media.

Schwab, M. 2011. *Encyclopedia Of Cancer*, Springer Berlin Heidelberg.

Senni, K., Pereira, J., Gueniche, F., Delbarre-Ladrat, C., Sinquin, C., Ratskol, J., Godeau, G., Fischer, A.-M., Helley, D. & Collic-Jouault, S. 2011. Marine Polysaccharides: A Source Of Bioactive Molecules For Cell Therapy And Tissue Engineering. *Marine Drugs*, 9, 1664-1681.

Sinurat, E. & Kusumawati, R. 2017. Optimasi Metode Ekstraksi Fukoidan Kasar Dari Rumput Laut Cokelat *Sargassum Binderi* Sonder--Optimization Of Crude Fucoidan Extraction Methods From Brown Seaweed *Sargassum Binderi* Sonder. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 12.

Sirait, M. 2018. Aktivitas Penghambatan Proliferasi Dan Siklus Sel 4t1 Dengan Pemberian Ekstrak Etil Asetat Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* Dc.).

Sirait, P. S., Setyaningsih, I. & Tarman, K. 2019. Aktivitas Antikanker Ekstrak Spirulina Yang Dikultur Pada Media Walne Dan Media Organik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22, 50-59.

Sitorus, S. 2013. Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol *Angiopteris Angustifolia* C. Presl Terhadap Kultur Sel Kanker Payudara (Mcf-7 Cell Line) Secara In Vitro.

Sivakumaran, N., Samarakoon, S. R., Adhikari, A., Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H., Malavige, N., Thabrew, I. & Shrestha, R. L. S. 2018. Cytotoxic And





- Apoptotic Effects Of Govaniadine Isolated From Corydalis Govaniana Wall. Roots On Human Breast Cancer (Mcf-7) Cells. *Biomed Research International*, 2018.
- Sjahfirdi, L., Aldi, N., Maheshwari, H. & Astuti, P. 2015. Aplikasi Fourier Transform Infrared (Ftir) Dan Pengamatan Pembengkakan Genital Pada Spesies Primata, Lutung Jawa (*Trachypithecus Auratus*) Untuk Mendeteksi Masa Subur. *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal Of Veterinary Sciences*, 9.
- Stefani, F. 2019. *Aktivitas Antioksidan Dan Sitotoksitas Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf-7 Dari Fukoidan Rumput Laut Coklat (Sargassum Crassifolium)*. Universitas Andalas.
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. & Blázquez-Castro, A. 2018. Tetrazolium Salts And Formazan Products In Cell Biology: Viability Assessment, Fluorescence Imaging, And Labeling Perspectives. *Acta Histochemica*, 120, 159-167.
- Susilowati, S. & Anggraini, T. D. 2019. Efek Sitotoksitas Dan Selektivitas Fraksi Aktif Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera Lamk.*) Terhadap Sel Kanker Payudara T47d. *Farmasains : Jurnal Ilmiah Ilmu Kefarmasian*, 5, 47-54.
- Taylor, S. 2011. *Marine Medicinal Foods: Implications And Applications, Macro And Microalgae*, Elsevier Science.
- Teichroew, J. K. 2016. *Chronic Diseases: An Encyclopedia Of Causes, Effects, And Treatments [2 Volumes]*, Abc-Clio.
- Umam, R. S. 2017. *Karakteristik Daun Alga Coklat Sargassum Cristaefolium Dalam Bentuk Kering Dan Teh Dari Perairan Talango, Sumenep, Madura*. Universitas Brawijaya.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. & Cloos, J. 2011. Cell Sensitivity Assays: The Mtt Assay. *Cancer Cell Culture*. Springer.
- Vembadi, A., Menachery, A. & Qasaimh, M. A. 2019. Cell Cytometry: Review And Perspective On Biotechnological Advances. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 7, 147.



Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. 2005. Apoptosis: Mechanisms And Relevance In Cancer. *Annals Of Hematology*, 84, 627-639.

Wani, S. H. & Lone, S. A. 2018. *Cancer: Diseases*, Educreation Publishing.

Wati, E. M., Puspaningtyas, A. R. & Pangaribowo, D. A. 2016. Uji Sitotoksitas Dan Proliferasi Senyawa 1-(4-Nitrobenzoiloksi-Metil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf-7 (Cytotoxicity And Proliferation Studies Of 1-(4-Nitrobenzoiloksi-Metil)-5-Fluorourasil) On Breast Cancer Cells Mcf-7. *Pustaka Kesehatan*, 4, 484-488.

Wijaya, R. C., Utari, E. L. & Yudianingsih, Y. 2015. Perancangan Alat Penghitung Bakteri. *Respati*, 10.

Wink, M., Kasties, N., Fitzroy, R., Jandciu, E. & Jones, A. 2006. *An Introduction To Molecular Biotechnology*, Wiley.

Yulianto, W., Andarwulan, N., Giriwono, P. E. & Pamungkas, J. 2017. Bioactive Compounds From Torbangun [*Plectranthus Amboinicus* (Lour.) Spreng] Chloroform Fraction Induce Apoptosis In Breast Cancer (Mcf-7 Cells) In Vitro. *Majalah Obat Tradisional*, 22, 37-44.

Zhang, Z., Teruya, K., Yoshida, T., Eto, H. & Shirahata, S. 2013. Fucoidan Extract Enhances The Anti-Cancer Activity Of Chemotherapeutic Agents In Mda-Mb-231 And Mcf-7 Breast Cancer Cells. *Marine Drugs*, 11, 81-98.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan dalam Pemilihan Variasi Konsentrasi Sampel

Perhitungan 7 variasi seri konsentrasi sampel antara 12,5-1000 µg/mL

$$f = \sqrt[n-1]{\left(\frac{Dt}{Dr}\right)}$$

Keterangan :

$f$  = kelipatan variasi konsentrasi

$n$  = banyaknya seri konsentrasi

$Dt$  = dosis atau konsentrasi tertinggi

$Dr$  = dosis atau konsentrasi terendah

Diketahui : terdapat 7 variasi seri konsentrasi dengan rentang 12,5-1000 µg/mL

$$f = \sqrt[7-1]{\left(\frac{1000}{12,5}\right)}$$

$$f = \sqrt[6]{(80)}$$

$f = 2,075$  , pembulatan menjadi kelipatan 2

Maka variasi seri konsentrasi sampel uji adalah 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800 µg/mL.



**Lampiran 2** Perhitungan Pengenceran Ekstrak Fukoidan

Perhitungan Pengenceran Ekstrak Fukoidan *S. cristaefolium* fraksi air sebanyak 600  $\mu\text{L}$

Rumus:  $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$

Keterangan :

M1: Konsentrasi awal larutan

M2: Konsentrasi akhir larutan

V1: Volume awal larutan

V2: Volume akhir larutan

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

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

$$25 \times V_1 = 12,5 \times 600 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 300 \mu\text{L ekstrak dan } 300 \mu\text{L media kultur}$$

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

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

$$50 \times V_1 = 25 \times (600 \mu\text{L} + 350 \mu\text{L})$$

$$V_1 = 475 \mu\text{L ekstrak dan } 475 \mu\text{L media kultur}$$

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

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

$$100 \times V_1 = 50 \times (600 \mu\text{L} + 500 \mu\text{L})$$

$$V_1 = 550 \mu\text{L ekstrak dan } 550 \mu\text{L media kultur}$$

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

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

$$200 \times V_1 = 100 \times (600 \mu\text{L} + 600 \mu\text{L})$$

$$V_1 = 600 \mu\text{L ekstrak dan } 600 \mu\text{L media kultur}$$



5. Konsentrasi 200 µg/ml :

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

$$400 \times V_1 = 200 \times (600 \mu\text{L} + 650 \mu\text{L})$$

$V_1 = 625 \mu\text{L}$  ekstrak dan  $625 \mu\text{L}$  media kultur

6. Konsentrasi 400 µg/ml :

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

$$800 \times V_1 = 400 \times (600 \mu\text{L} + 650 \mu\text{L})$$

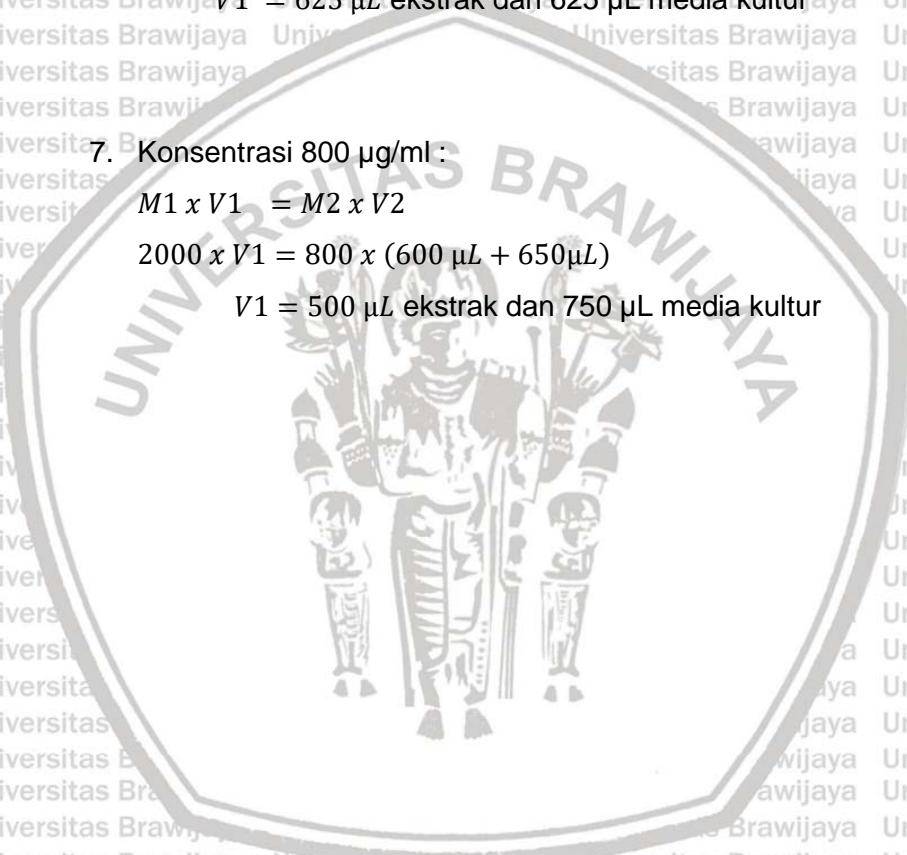
$V_1 = 625 \mu\text{L}$  ekstrak dan  $625 \mu\text{L}$  media kultur

7. Konsentrasi 800 µg/ml :

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

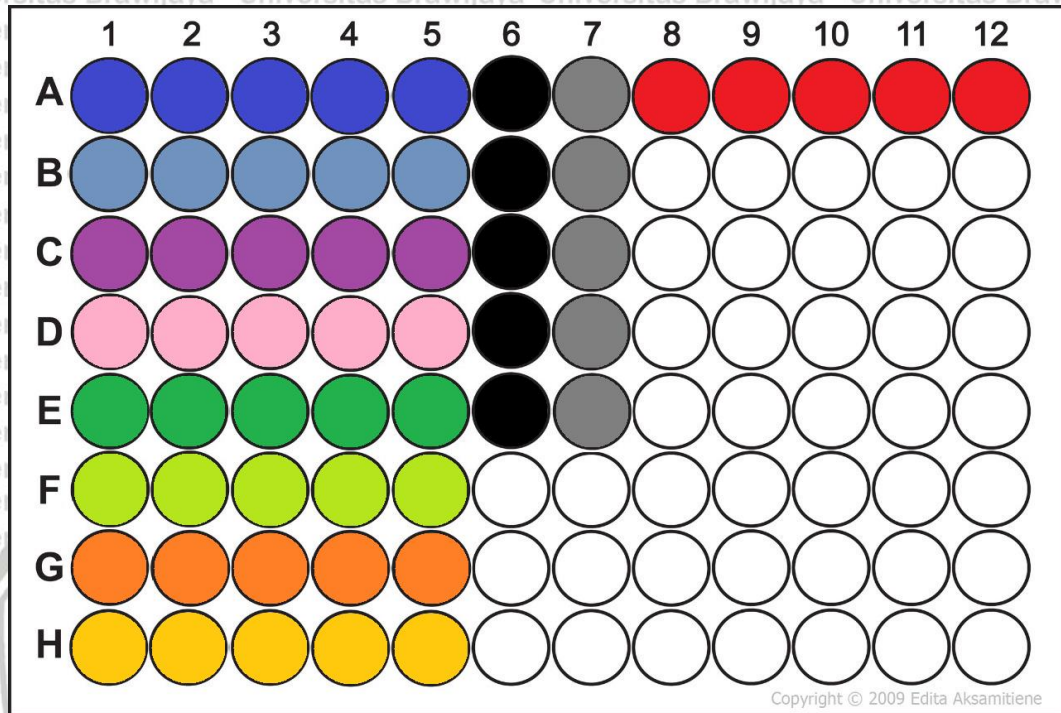
$$2000 \times V_1 = 800 \times (600 \mu\text{L} + 650 \mu\text{L})$$

$V_1 = 500 \mu\text{L}$  ekstrak dan  $750 \mu\text{L}$  media kultur



Lampiran 3 Desain *Microplate* 96 Well dan Hasil Pengolahan Data pada Uji Sitotoksik MTT

Desain *microplate* 96 well untuk uji MTT



Keterangan :

-  : Blanko
-  : Konsentrasi fukoidan *S. cristaefolium* sebesar 12,5 µl/ml
-  : Konsentrasi fukoidan *S. cristaefolium* sebesar 25 µl/ml
-  : Konsentrasi fukoidan *S. cristaefolium* sebesar 50 µl/ml
-  : Konsentrasi fukoidan *S. cristaefolium* sebesar 100 µl/ml
-  : Konsentrasi fukoidan *S. cristaefolium* sebesar 200 µl/ml
-  : Konsentrasi fukoidan *S. cristaefolium* sebesar 400 µl/ml
-  : Konsentrasi fukoidan *S. cristaefolium* sebesar 800 µl/ml
-  : Kontrol media
-  : Kontrol pelarut
-  : Kontrol sel



Hasil perhitungan persen viabilitas sel terhadap variasi konsentrasi ekstrak fukoidan

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Ulangan			Persen Viabilitas Sel (%)			Rata-rata % Viabilitas	STDEV
		1	2	3	1	2	3		
12,5	1,09691	1,308	1,178	1,386	85,101	74,960	91,185	83,749	8,196
25	1,39794	1,207	1,171	1,329	77,223	74,414	86,739	79,459	6,459
50	1,69897	0,927	1,136	1,1	55,382	71,684	68,876	65,314	8,715
100	2	0,893	1,072	1,094	52,730	66,692	68,408	62,610	8,599
200	2,30103	0,811	0,854	0,954	46,333	49,687	57,488	51,170	5,723
400	2,60206	0,782	0,833	0,937	44,071	48,049	56,162	49,427	6,161
800	2,90309	0,704	0,83	0,919	37,987	47,815	54,758	46,853	8,426

Hasil pengolahan data dengan webtool aatbio

IC<sub>50</sub> Regression Results [conc.]

Parameter	Value
IC <sub>50</sub>	48.4558
Equation	$Y = 44.9691 + \frac{92.7918 - 44.9691}{1 + \left(\frac{X}{48.4558}\right)^{1.1357}}$
Equation Form	$Y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{X}{\text{IC}_{50}}\right)^{\text{Hill coefficient}}}$

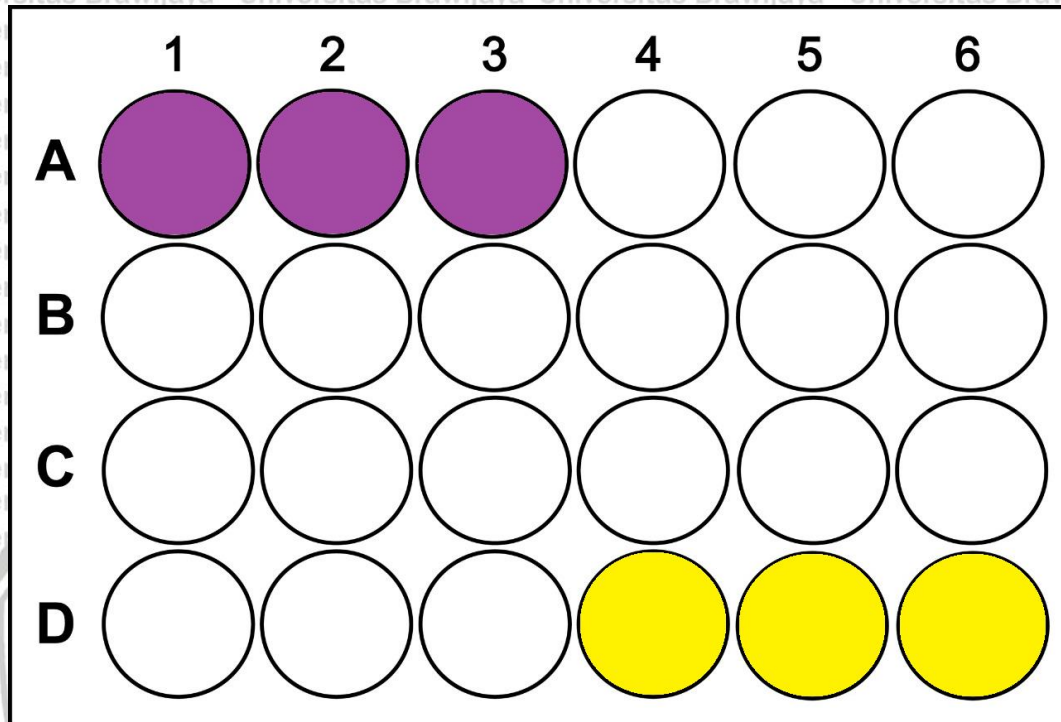
IC<sub>50</sub> Regression Calculator [conc.]

X	Y
319.134	50
Enter x to calculate y	Enter y to calculate x



Lampiran 4 Desain *Microplate 24 Well* pada Uji Pewarnaan Sel dengan Pewarna *Hoechst*

Desain *microplate 24 well* untuk uji Pewarnaan Sel dengan Pewarna *Hoechst*  
33342



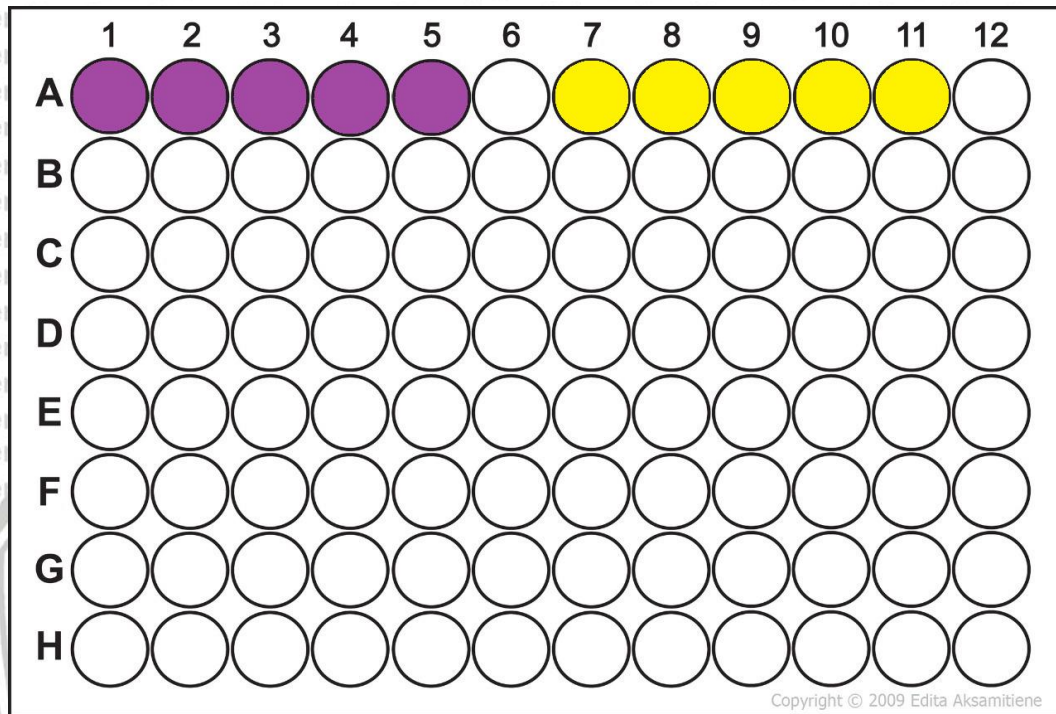
Keterangan :

-  : Ekstrak fukoidan *S. cristaefolium* konsentrasi = IC<sub>50</sub>
-  : Kontrol sel



**Lampiran 5** Desain *Microplate* 96 Well dan Hasil Pengolahan Data pada Uji Perhitungan Sel Hidup dengan *Haemocytometer*

Desain *microplate* 96 well untuk uji perhitungan sel hidup dengan *Haemocytometer*



Keterangan :

- : Ekstrak fukoidan *S. cristaefolium* konsentrasi =  $IC_{50}$
- : Kontrol sel

Perhitungan Pengenceran Ekstrak Fukoidan *S. cristaefolium* pada konsentrasi 319,134 µg/ml sebanyak 2 ml.

Konsentrasi 319,134 µg/ml :

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$2000 \times V1 = 319,134 \times 2000 \mu L$$

$$V1 = 319,134 \mu L + 1680,9 \mu L \text{ media kultur}$$



**Hasil perhitungan sel pada setiap perlakuan dengan ekstrak fukoidan menggunakan alat Haemocytometer**

**Perlakuan 24 Jam dengan Ekstrak Fukoidan**

Ulangan	A	B	C	D	Total	Jumlah Sel/mL	Rerata ulangan	STDEV
1	6	5	10	10	31	77500	30,66666667	1,527525232
2	7	9	5	8	29	72500		
3	10	7	8	7	32	80000		

**Perlakuan 48 Jam dengan Ekstrak Fukoidan**

Ulangan	A	B	C	D	Total	Jumlah Sel/mL	Rerata ulangan	STDEV
1	18	14	11	7	50	125000	50	3
2	15	10	12	10	47	117500		
3	14	9	14	16	53	132500		

**Perlakuan 72 Jam dengan Ekstrak Fukoidan**

Ulangan	A	B	C	D	TOTAL	Jumlah Sel/mL	Rerata ulangan	STDEV
1	8	10	12	12	42	105000	41,66666667	2,516611478
2	9	9	11	10	39	97500		
3	14	9	11	10	44	110000		

**Pengaruh Lama Waktu Inkubasi Terhadap Jumlah Sel MCF-7**

Perlakuan	Ulangan (Jumlah Sel/mL)			Rata-rata (Jumlah Sel/mL)	STDEV
	1	2	3		
P1	77500	72500	80000	76666,67	3819
P2	125000	115000	132500	124166,7	7500
P3	105000	97500	110000	104166,7	6292

**Keterangan :**

P1 = Perlakuan 24 jam

P2 = Perlakuan 48 jam

P3 = Perlakuan 72 jam

**Analysis of Variance**

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Perlakuan	2	3526388889	1763194444	47,91	0,000
Error	6	220833333	36805556		
Total	8	3747222222			

**Tukey Pairwise Comparisons**

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Perlakuan	N	Mean	Grouping
P2	3	125000	A
P3	3	104167	B
P1	3	76667	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Hasil perhitungan sel pada setiap perlakuan menggunakan Haemocytometer tanpa ekstrak fukoidan (kontrol sel)**

Perlakuan 24 Jam Kontrol Sel								
Ulangan	A	B	C	D	Total	Jumlah Sel/mL	Rerata ulangan	STDEV
1	13	17	11	20	61	152500	61	2
2	16	15	19	13	63	157500		
3	13	11	17	18	59	147500		

Perlakuan 48 Jam Kontrol Sel								
Ulangan	A	B	C	D	Total	Jumlah Sel/mL	Rerata ulangan	STDEV
1	40	30	18	57	145	362500	144,6666667	3,511884584
2	37	27	39	38	141	352500		
3	42	34	41	31	148	370000		

Perlakuan 72 Jam Kontrol Sel								
Ulangan	A	B	C	D	Total	Jumlah Sel/mL	Rerata ulangan	STDEV
1	40	30	25	44	139	347500	139	1
2	37	34	31	36	138	345000		
3	42	31	33	34	140	350000		



**Pengaruh Lama Waktu Inkubasi Terhadap Jumlah Sel MCF-7 pada kontrol sel**

Perlakuan	Ulangan (Jumlah Sel/mL)			Rata-rata (Jumlah Sel/mL)	STDEV
	1	2	3		
P1	152500	157500	147500	152500	5000
P2	362500	352500	370000	361666,6667	8779,7
P3	347500	345000	350000	347500	2500

**Keterangan :**

P1 = Perlakuan 24 jam

P2 = Perlakuan 48 jam

P3 = Perlakuan 72 jam

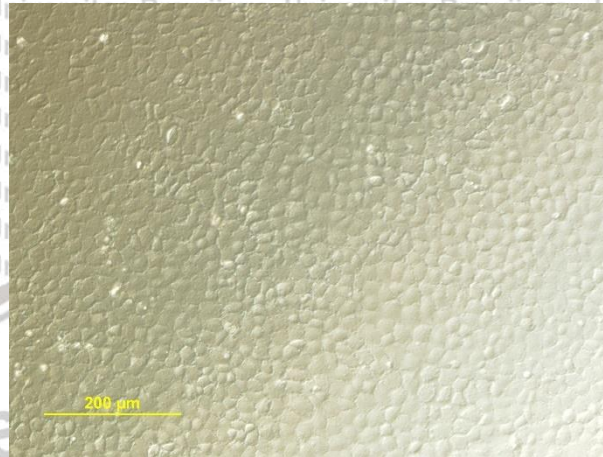
**Pengaruh Lama Waktu Inkubasi Terhadap Jumlah Sel dan Persen viabilitas hidup sel MCF-7**

Waktu Inkubasi (Jam)	Jumlah Sel Uji (Sel/ml)	Jumlah Kontrol Sel (Sel/ml)	Persen Viabilitas Sel Hidup (%)
24	76667	152500	50,27
48	125000	361667	34,56
72	104167	347500	29,97

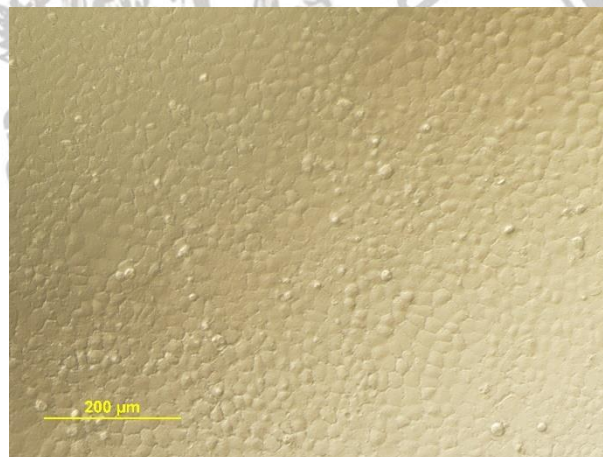
Lampiran 6 Dokumentasi Kultur Sel MCF-7

**Dokumentasi kultur sel MCF-7 pada uji Perhitungan Sel Hidup dengan Alat Haemocytometer**

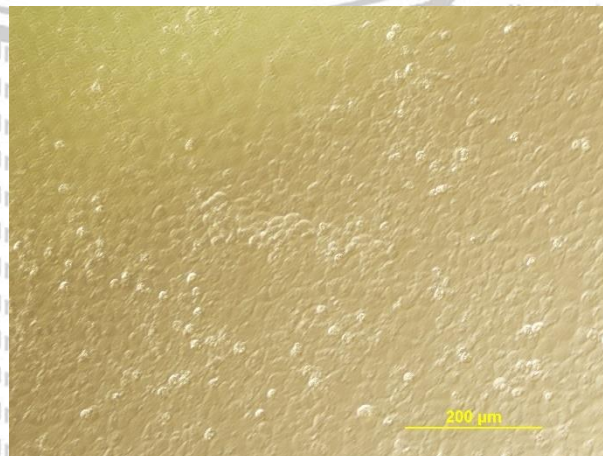
- Perlakuan 24 jam, perbesaran mikroskop sebesar 200x



- Perlakuan 48 jam, perbesaran mikroskop sebesar 200x



- Perlakuan 72 jam, perbesaran mikroskop sebesar 200x

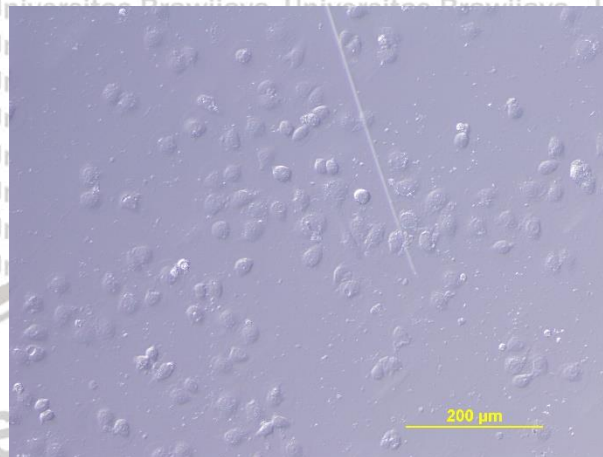




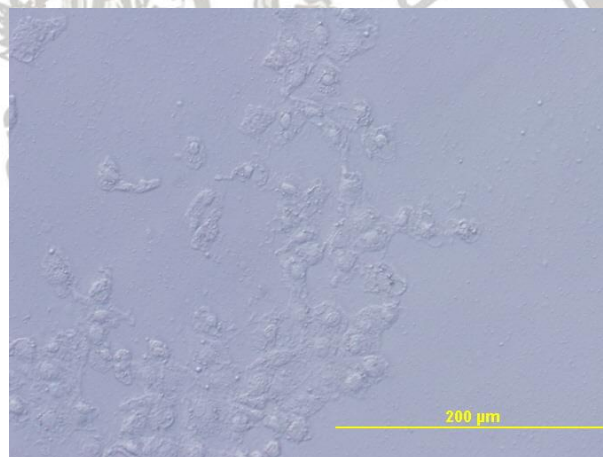
### Dokumentasi kultur sel MCF-7 pada uji Apoptosis dengan Pewarna *Hoechst*

33342

- Perlakuan 24 jam, perbesaran mikroskop sebesar 200x



- Perlakuan 48 jam, perbesaran mikroskop sebesar 200x



- Perlakuan 72 jam, perbesaran mikroskop sebesar 200x

