

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK FUKOIDAN FRAKSI HCl
DARI *Sargassum filipendula* TERHADAP SEL MCF-7**

SKRIPSI

Oleh:

YOHANA CHRISTINE TIURMA MANURUNG

NIM. 175100500111003



**TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**



**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK FUKOIDAN FRAKSI HCI
DARI *Sargassum filipendula* TERHADAP SEL MCF-7**

SKRIPSI PENELITIAN

Oleh
YOHANA CHRISTINE TIURMA MANURUNG
NIM. 175100500111003

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Bioteknologi



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

2021



LEMBAR PENGESAHAN

Judul TA : Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Fukoidan Fraksi
HCl dari *Sargassum filipendula* terhadap Sel
MCF-7

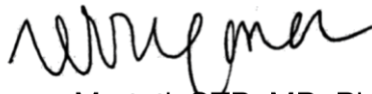
Nama Mahasiswa : Yohana Christine Tiorma Manurung

N I M : 175100500111003

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

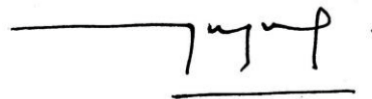
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I



Erryana Martati, STP, MP, Ph.D
NIP. 19691126 199903 2 003

Dosen Penguji II



Tunjung Mahatmanto, STP, M.Si, Ph.D
NIP. 19810908 200801 1 007

Dosen Pembimbing



Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA
NIP. 19590613 198601 1 001

Ketua Jurusan



Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, STP., MP
NIP. 19700504 199903 2 002

Tanggal Persetujuan: 31 Agustus 2021

RIWAYAT HIDUP



Yohana Christine Tiurma Manurung, lahir di Bogor pada tanggal 08 Desember 1999 dari pasangan Alm. Bayer Parasian Manurung dan Elly Eva Yanti Purba. Penulis adalah anak pertama dari empat bersaudara, yaitu adik bernama Yerico Wahyu Bryandi Manurung, Yosephine Tirtauli Manurung dan Yehemia Partahi Manurung. Sebelumnya penulis telah menyelesaikan jenjang pendidikan pada sekolah dasar di SD Pelangi Kasih Bogor pada 2011, sekolah menengah pertama di SMPN 7 Bogor pada tahun 2014, melanjutkan sekolah menengah akhir di SMAN 4 Bogor hingga 2015 dan menyelesaikannya di SMAN 2 Pematangsiantar pada tahun 2017. Selama sekolah, penulis aktif berorganisasi di Pramuka dan ansambel musik pada organisasi gereja. Penulis melanjutkan studi perguruan tinggi pada tahun 2017 di Universitas Brawijaya melalui jalur SBMPTN sebagai mahasiswi Fakultas Teknologi Pertanian jurusan Teknologi Hasil Pertanian program studi Bioteknologi. Selama perkuliahan, penulis aktif melakukan kegiatan akademik maupun non-akademik pada organisasi kampus maupun gereja, seperti menjadi panitia pelaksana kegiatan di berbagai *event*. Penulis juga turut aktif mengikuti perlombaan dan pernah menjadi finalis pada Festival Bahasa dan Budaya UIN Sunan Kalijaga Tahun 2019, dan mendapatkan pendanaan pada program Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) 5 bidang Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Tahun 2020. Selain hal tersebut, penulis juga pernah bekerja sebagai kasir dan pelayan pada *restaurant* Eat Two Burger (2020), barista di kedai kopi AISANT (2021) serta barista pada Menantea FnB (2021).

PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Yohana Christine Tiurma Manurung
N I M : 175100500111003
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian
Judul TA : Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl
dari *Sargassum filipendula* terhadap Sel 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, 22 Juli 2021

Pembuat Pernyataan,



Yohana Christine Tiurma Manurung
NIM. 175100500111003



PERNYATAAN PEMBIAYAAN TUGAS AKHIR

Penelitian ini merupakan bagian proyek penelitian a.n:

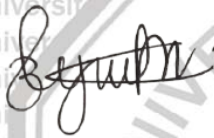
Nama Dosen : Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA

N I P : 19590613 198601 1 001

Nama Penelitian : Fukoidan sebagai Senyawa Antikanker

Penelitian untuk tugas akhir ini dibiayai oleh proyek tersebut.

Pembuat Pernyataan,



Yohana Christine Tiurma Manurung
NIM. 175100500111003





“Bersyukurlah kepada Tuhan, sebab Ia baik! Bahwasanya untuk selama-lamanya kasih setia-Nya.”

Mazmur 107:1

Yohana Christine Tiurma Manurung, 175100500111003. Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl dari *Sargassum filipendula* terhadap Sel MCF-7. Tugas Akhir. Pembimbing: Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA

RINGKASAN

Sargassum filipendula merupakan salah satu alga dengan pigmen berwarna coklat dari genus *Sargassum*. Berdasarkan beberapa penelitian secara *in vitro*, diketahui bahwa ekstrak kasar *Sargassum* mengandung polisakarida heterogen tersulfatasi yang disebut fukoidan. Fukoidan memiliki bioaktivitas pada sel berupa induksi apoptosis, antikanker, antiproliferasi, dll. Kemampuan fukoidan tersebut berpotensi untuk dijadikan sebagai agen kemopreventif maupun antikanker pada berbagai jenis sel kanker, termasuk sel kanker payudara. Kanker payudara merupakan penyakit yang menyerang 30,9% wanita di Indonesia dan menempati urutan kedua penyebab kematian terbanyak pada populasi wanita di Indonesia. Pengobatan yang diberikan pada pasien memiliki efek samping jangka pendek dan jangka panjang yang memengaruhi kualitas hidup serta kegagalan terapi yang diberikan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak fukoidan dari fraksi HCl *S. filipendula* terhadap sitotoksitas dan apoptosis sel kanker payudara MCF-7. Aktivitas sitotoksik dilakukan dengan menggunakan MTT assay dengan variasi konsentrasi sampel fukoidan 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 dan 800 ppm dengan waktu inkubasi 24 jam. Uji apoptosis dilakukan menggunakan metode pewarnaan Hoechst 33342 dengan konsentrasi IC_{50} serta variasi waktu inkubasi 24, 48, dan 72 jam. Selanjutnya dilakukan konfirmasi uji sitotoksik menggunakan metode *direct counting* untuk menghitung jumlah sel hidup dengan konsentrasi IC_{50} serta variasi waktu inkubasi 24, 48, dan 72 jam.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak fukoidan *S. filipendula* mampu menghambat pertumbuhan sel kanker dengan nilai IC_{50} sebesar 222,619 $\mu\text{g/ml}$. Pada uji apoptosis menggunakan pewarna Hoechst 33342 menunjukkan dengan pemberian konsentrasi IC_{50} dan waktu inkubasi 24 hingga 72 jam mampu membuat sel mengalami apoptosis yang ditunjukkan oleh adanya pendaran warna biru pada sel. Keadaan apoptosis terbanyak dikonfirmasi pada perhitungan jumlah sel dengan *direct counting*, dimana pada waktu 24 jam, sel mengalami kematian terbanyak sebanyak 54%, 48 jam sebanyak 41% dan 72 jam sebanyak 28%. Selanjutnya dilakukan uji ANOVA dan uji lanjut Tukey yang menunjukkan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap jumlah sel.

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fukoidan *S. filipendula* fraksi HCl memiliki kemampuan sebagai senyawa antikanker dan termasuk dalam kategori sitotoksik moderat atau cukup aktif yang dapat dijadikan acuan pengembangan senyawa untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Saran dari penelitian ini dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengidentifikasi jalur kematian sel serta perbandingan penghambatan pertumbuhan sel dengan kanker.

Kata Kunci: Apoptosis, Fukoidan, MCF-7, *Sargassum filipendula*, Sitotoksitas

Yohana Christine Tiurma Manurung. 175100500111003. Anticancer Activity of Fucoidan Extracted with Fraction HCl from *Sargassum filipendula* against MCF-7 Cell. TA.

Supervisor: Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA

SUMMARY

Sargassum filipendula is one of the algae with brown pigment from genus *Sargassum*. Based on several in vitro studies, it is known that crude extract of *Sargassum* contains sulfated heterogeneous polysaccharides called fucoidan. Fucoidan has bioactivity on cells in the form of induction of apoptosis, anticancer, antiproliferation, etc. This fucoidan ability has the potential to be used as a chemopreventive and anticancer agent in various types of cancer cells, including breast cancer cells. Breast cancer is a disease that affects 30,9% of women in Indonesia and ranks as the second most common cause of death in the female population in Indonesia. *Treatment* given to patients has short-term and long-term side effects that affect the quality of life and failure of the therapy given.

This study aimed to determine the activity of fucoidan extract from the HCl fraction of *S. filipendula* against cytotoxicity and apoptosis of MCF-7 breast cancer cell line. Cytotoxic activity was carried out using MTT assay with various concentrations of fucoidan 12.5; 25; 50; 100; 200; 400 and 800 ppm with an incubation time of 24 hours. Apoptosis test was carried out using Hoechst 33342 staining method with IC₅₀ concentration and incubation time variations of 24, 48, and 72 hours. Furthermore, confirmation of the cytotoxic test was carried out using the direct counting method to count the number of live cells with IC₅₀ concentrations and variations in incubation time of 24, 48 and 72 hours.

The results of this study showed that the fucoidan extract of *S. filipendula* was able to inhibit the growth of cancer cells with an IC₅₀ value was 222,619 ppm. In the apoptosis test using Hoechst 33342 dye, it was shown that given the concentration of IC₅₀ and incubation time of 24 to 72 hours, the cells were able to undergo apoptosis, which was indicated by the presence of blue luminescence in the cells. The most apoptotic state was confirmed in the calculation of the number of cells by direct counting, where at 24 hours, cells experienced the most death by 54%, 48 hours by 41% and 72 hours by 28%. Furthermore, the ANOVA test and Tukey's further test were carried out which showed that incubation time had a significant effect on the number of cells.

In this study, it can be concluded that fucoidan *S. filipendula* HCl fraction has the ability as an anticancer compound and is included as a moderately active cytotoxic category which can be used as a reference for the development of compounds to inhibit cancer cell growth. Suggestions from this study are further research to identify cell death pathways and comparing normal cell growth inhibition with cancer cell.

Keywords: *Apoptosis, Cytotoxicity, Fucoidan, MCF-7, Sargassum filipendula*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan yang Maha Esa atas rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul "**Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl dari *Sargassum filipendula* terhadap Sel MCF-7**". Tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Bioteknologi. Penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada:

1. Tuhan Yesus Kristus, Bapakku yang baik, atas kasih sayang-Nya yang tak pernah henti,
2. Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA selaku Dosen Pembimbing Tugas Akhir,
3. Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, STP., MP selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang,
4. Tunjung Mahatmanto, STP., M.Si., Ph.D selaku Ketua Program Studi Bioteknologi,
5. Orangtua dan segenap keluarga atas dukungan dan doa yang diberikan,
6. *Sargassum team* dan semua Laboran LSIH yang selalu mendukung selama penelitian,
7. Sahabat-sahabat terbaik dan semua teman-teman yang tidak dapat diucapkan satu persatu yang turut dan selalu membantu menyelesaikan laporan ini.

Demikian yang dapat disampaikan. Penulis menyadari bahwa laporan ini masih memiliki kekurangan. Oleh karena itu, diharapkan adanya kritik dan saran yang membangun untuk kesempurnaan laporan ini. Atas kesempatannya, diucapkan terimakasih.

Malang, 01 Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN.....	i
SUMMARY.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 <i>Sargassum filipendula</i>	4
2.2 Fukoidan.....	6
2.3 Ekstraksi Fukoidan.....	9
2.4 Kanker Payudara.....	10
2.5 MCF-7.....	15
2.6 Apoptosis.....	16
2.7 Efek Fukoidan terhadap Apoptosis Sel.....	18
2.8 Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT Assay.....	19
2.9 Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode <i>Direct Counting</i>	21
2.10 Uji Aktivitas Apoptosis dengan Metode Hoechst.....	23
2.11 Hipotesis Penelitian.....	25
BAB III. METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	26
3.2 Alat dan Bahan.....	26
3.3 Metode.....	27
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	29
3.5 Pengamatan dan Analisis Data.....	34
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	44
4.1 Analisa Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT Assay.....	44
4.2 Analisa Aktivitas Apoptosis dengan Metode Pewarnaan Hoechst.....	48

4.3 Analisa Aktivitas Sitotoksik dengan Metode <i>Direct Counting</i>	52
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	66



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi kimia <i>Sargassum filipendula</i>	6
Tabel 2.2 Perbandingan Kandungan Fukoidan dari Berbagai Sumber <i>Sargassum</i>	8
Tabel 2.3 Perbandingan Kemampuan Kandungan Fukoidan dari Berbagai Sumber terhadap Sel Kanker Payudara.....	10
Tabel 2.4 Perbandingan Gambaran Sel yang Mengalami Nekrosis dan Apoptosis	17
Tabel 4.1 Data Perlakuan Fukoidan terhadap Viabilitas Sel MCF-7.....	46
Tabel 4.2 Data Hasil Rata-Rata Jumlah Sel Hidup MCF-7 setelah Pemberian Ekstrak Fukoidan Konsentrasi IC ₅₀ pada Berbagai Waktu Inkubasi.....	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. *Sargassum filipendula*..... 5

Gambar 2.2. Struktur kerangka penyusun fukoidan..... 7

Gambar 2.3. Ilustrasi perbedaan anatomi payudara..... 11

Gambar 2.4. Ilustrasi Stage 0..... 12

Gambar 2.5 Ilustrasi Stage I dan Stage IIB..... 13

Gambar 2.6. Ilustrasi Stage IIIB dan Stage IV..... 14

Gambar 2.7. MCF-7 *Cell Line*..... 15

Gambar 2.8. Mekanisme Kematian MCF-7 yang Diinduksi Ekstrak Fukoidan..... 20

Gambar 2.9. Reaksi MTT Assay..... 21

Gambar 2.10. Representasi *Haemocytometer*..... 23

Gambar 2.11. Perbedaan Sel dengan *Trypan blue* pada *Haemocytometer*..... 24

Gambar 2.12. Struktur kimia dari jenis *Hoechst dye*..... 25

Gambar 3.1. Kerangka Penelitian..... 28

Gambar 3.2. Persiapan dan Pemeliharaan Kultur MCF-7..... 36

Gambar 3.3. Pemanenan Kultur MCF-7..... 37

Gambar 3.4. *Cryopreservation* Sel Kultur MCF-7..... 38

Gambar 3.5. Preparasi Larutan Uji..... 39

Gambar 3.6. Uji Aktivitas Sitotoksisitas dengan Metode MTT Assay..... 40

Gambar 3.7. Uji Aktivitas Sitotoksisitas dengan Metode *Direct Counting*..... 42

Gambar 3.8. Uji Aktivitas Apoptosis dengan Metode *Hoechst*..... 43

Gambar 4.1. Bentuk Kompleks Garam Formazan sel MCF-7..... 44

Gambar 4.2. Gambaran Mikroskopik Sel MCF-7 MTT Assay..... 45

Gambar 4.3. Kurva Viabilitas Sel Hidup dan nilai IC₅₀ Fukoidan..... 47

Gambar 4.4. Pewarnaan *Hoechst 33342* sel MCF-7 selama 24 jam..... 49

Gambar 4.5. Perbandingan Pewarnaan *Hoechst 33342* sel MCF-7..... 51

Gambar 4.6. Gambaran Mikroskopik Sel dalam *Haemocytometer*..... 52

Gambar 4.7. Grafik Hubungan antara Persentase Viabilitas Sel Hidup dengan Waktu Inkubasi..... 54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Ekstraksi Fukoidan66

Lampiran 2. Perhitungan Pengenceran Bertingkat Sampel Fukoidan Fraksi HCl.....69

Lampiran 3. Denah *Well Plate*71

Lampiran 4. Perhitungan Persentase Viabilitas Sel MCF-7 dari MTT Assay.....73

Lampiran 5. Perhitungan IC₅₀ dengan *webtool IC₅₀ calculator*76

Lampiran 6. Perhitungan Nilai Viabilitas Sel dari Jumlah Sel Hidup.....77

Lampiran 7. Hasil Uji ANOVA dan Uji Lanjut Tukey.....81



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan bahan alam menjadi salah satu upaya dalam pengobatan yang sudah banyak dikembangkan. Hal tersebut dikarenakan penggunaan bahan alam dinilai lebih aman dan memiliki efek samping relatif kecil bagi pasien. Salah satu bahan alam yang banyak dikaji adalah alga atau rumput laut. Berdasarkan pigmen dominan yang dimilikinya, alga dapat dikelompokkan menjadi phylum alga hijau (*Chlorophyta*), alga emas (*Chrysophyta*), alga cokelat (*Phaeophyta*), dan alga merah (*Rhodophyta*) (Sambamurty, 2017). *Sargassum* sp. merupakan salah satu spesies dari anggota kelompok alga dengan pigmen cokelat (*Phaeophyceae*).

Sargassum terbentuk oleh salah satu polisakarida heterogen tersulfatasi yang memiliki potensi sebagai bahan pengobatan yaitu fukoidan. *Sargassum filipendula* ditemukan memiliki kandungan fukoidan yang lebih tinggi dibandingkan beberapa jenis *Sargassum* lainnya, seperti *S. polycystum* dan *S. cinereum* (Laeliocattleya *et al.*, 2020; Ponce dan Stortz, 2020). Zat bioaktif fukoidan dalam beberapa penelitian, dilaporkan memiliki efek bioaktivitas terhadap sel seperti aktivitas antitumor, imunomodulator, antioksidan, anti-angiogenesis, induksi apoptosis sel, antiproliferasi pada sel, dan lain sebagainya (Morya *et al.*, 2012). Adanya bioaktivitas fukoidan yang sangat bervariasi memiliki potensi yang sangat tinggi untuk dijadikan agen kemopreventif maupun antikanker pada berbagai jenis kanker, termasuk kanker payudara.

Kanker payudara merupakan salah satu penyakit tidak menular yang kerap menyerang wanita di seluruh dunia. Menurut Globocan (2020), pada tahun 2018 telah ditemukan sebanyak hampir 30,9% wanita di Indonesia atau sebesar 58.256 jiwa mengalami kasus kanker payudara dengan estimasi kematian sebanyak 22.692 jiwa. Hal tersebut menyebabkan penderita kanker payudara menjadi penyumbang kematian kedua tertinggi pada populasi wanita di Indonesia setelah kasus kanker serviks. Pengobatan pasien yang didiagnosis pada stadium lanjut umumnya sangat sulit untuk disembuhkan. Pengobatan atau *treatments* yang biasa diberikan berupa kemoterapi, pembedahan, terapi radiasi, terapi hormonal, dan terapi target (Kemenkes, 2015).

Salah satu pengobatan seperti kemoterapi memiliki efek samping jangka pendek maupun jangka panjang bagi tubuh pasien. Efek samping dapat berupa peradangan, infertilitas, mati rasa dan kesemutan, mual dan muntah, gangguan kognitif, kerusakan organ secara akut maupun kronik, alopecia, serta resistensi terhadap agen obat (*doxorubicin* dan *tamoxifen*) (American Cancer Society, 2019). Efek samping memicu depresi yang dapat memengaruhi kualitas hidup serta mengakibatkan kegagalan terapi pada penderita kanker payudara. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan bahan alam sebagai alternatif pengobatan antikanker guna meningkatkan efikasi agen anti kanker dini yang lebih aman dalam menghambat perkembangan sel dan meminimalisir efek samping serta meningkatkan angka harapan hidup penderita kanker.

Berdasarkan beberapa penelitian secara *in vitro*, tercatat menurut Priyan *et al.* (2020), bahwa terdapat aktivitas sitotoksik fukoidan *Sargassum sp.* dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7, yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} mencapai $93,62 \pm 3,53 \mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} dari senyawa hasil ekstraksi akan dinilai selektif dan berpotensi sebagai kemopreventif apabila nilai $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$. Diketahui selanjutnya, fukoidan bekerja dengan memengaruhi sinyal siklus sel pada jalur apoptosis yang dimediasi mitokondria sel. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Wu *et al.* (2016), yang melaporkan bahwa sebanyak $200 \mu\text{g/mL}$ fukoidan *Sargassum hemiphyllum* mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara MDA-MB-231 (21%) dan MCF-7 (12%), serta mengurangi invasi sel MDA-MB-231 (43%) dan MCF-7 (62%) selama perendaman 48 jam, tanpa memberikan *inhibitory effect* pada sel normal. Namun dalam penelitian Isnansetyo *et al.* (2017), melaporkan aktivitas fukoidan *Sargassum* yang sangat berbeda, dimana fukoidan *S. cristaefolium* kurang selektif melakukan penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC_{50} mencapai $461 \mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan penelitian terdahulu yang telah dilakukan menunjukkan bahwa penelitian terkait pembuktian aktivitas antikanker fukoidan dari jenis *S. filipendula* masih belum banyak dilakukan. Sehingga, fokus penelitian ini ialah pengujian bioaktivitas fukoidan *S. filipendula* terhadap sel kanker payudara secara *in vitro* pada sel MCF-7. Sel MCF-7 berperan sebagai model sel kanker payudara yang dikulturkan dari seorang pasien kanker payudara. Sel ini sering digunakan untuk melakukan uji efek senyawa secara *in vitro* karena kemampuan sel yang responsif dan mampu mempertahankan karakteristik sel epitel mammae *in vivo* manusia dibandingkan model sel lainnya. Selain itu, MCF-7 mudah dikulturkan dan

tumbuh sebagai sel monolayer yang mudah diamati, meskipun setelah kultur berkepanjangan dapat tumbuh membentuk nodus multilayer (Comşa *et al.*, 2015).

Penelitian ini akan dilakukan menggunakan zat bioaktif fukoidan *S. filipendula* yang diekstrak dengan metode maserasi pelarut HCl. Selanjutnya, akan dilakukan uji sitotoksik dengan metode IC₅₀ menggunakan konsentrasi yang berbeda. Variasi konsentrasi yang diberikan pada rentang 0-1000 µg/ml. Selain uji sitotoksik, dilakukan pengujian aktivitas apoptosis menggunakan metode pewarnaan Hoechst 33342 dan uji sitotoksik menggunakan metode *direct counting* untuk menghitung jumlah sel hidup. Analisis dilakukan menggunakan bantuan mikroskop *fluorescent* dan *microplate reader*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan permasalahan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak fukoidan *S. filipendula* memiliki efek sitotoksik terhadap sel MCF-7?
2. Berapakah nilai IC₅₀ ekstrak fukoidan *S. filipendula* terhadap sel MCF-7?
3. Apakah ekstrak fukoidan *S. filipendula* memiliki efek apoptosis terhadap sel MCF-7?

1.3 Tujuan

1. Mengetahui efek sitotoksik ekstrak fukoidan *S. filipendula* terhadap sel MCF-7
2. Mengetahui nilai IC₅₀ ekstrak fukoidan *S. filipendula* terhadap sel MCF-7
3. Mengetahui efek apoptosis ekstrak fukoidan *S. filipendula* terhadap sel MCF-7

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan serta pengembangan pengetahuan aktivitas *in vitro* senyawa fukoidan dari *S. filipendula* sebagai antikanker, khususnya kanker payudara.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Sargassum filipendula*

Sargassum merupakan genus makroalga yang hidup berkelompok pada samudera zona intertidal iklim tropis maupun subtropis, terutama daerah Indo-west Pasifik dan Australia (Lutfiawan *et al.*, 2015). *Sargassum* umumnya tumbuh menempel pada substrat dasar berbatu seperti terumbu karang dan dapat mengapung di perairan dangkal. Pada zona intertidal atau zona pasang surut dengan suhu hangat, *Sargassum* akan menggunakan cahaya matahari untuk melakukan fotosintesis. Dalam membantu proses fotosintesis, alga tersebut membawa beberapa pigmen seperti klorofil a, klorofil b, dan karoten dominan berupa fukosantin yang menyebabkan alga berwarna cokelat. Selain itu, *Sargassum* juga kaya akan metabolit sekunder, seperti fenolik, flavonoid, tannin, sterol, terpenoid, saponin, alkaloid (Sedjati *et al.*, 2018).

Alga berwarna cokelat termasuk kedalam phylum *Phaeophyta* dengan genera terbesar dari famili *Sargassaceae* dibandingkan famili lainnya, yaitu *Fucaceae* (Yende *et al.*, 2014). Diperkirakan terdapat lebih dari 400 spesies di lautan, yang dibedakan berdasarkan bentuk morfologi, kadar kandungan bahan utama serta substrat yang ditinggalinya (Camacho *et al.*, 2015). Karena jumlah spesies yang sangat banyak, keluarga *Sargassum* banyak digunakan untuk dipelajari, terutama kandungan polisakarida yang banyak terdapat pada berbagai jenis alga. Spesies alga *Sargassum* yang digunakan sebagai bahan baku utama dalam penelitian ini yaitu *Sargassum filipendula*.



Gambar 2.1. *Sargassum filipendula* (Bertagnolli *et al.*, 2014)

Klasifikasi *Sargassum filipendula* (GBIF Secretariat, 2019) dapat dituliskan sebagai berikut :

Kingdom	:	Chromista
Phylum	:	Phaeophyta – <i>brown algae</i>
Class	:	Phaeophyceae
Ordo	:	Fucales
Family	:	Sargassaceae
Genus	:	Sargassum
Species	:	<i>Sargassum filipendula</i>

Ciri umum bentuk *S. filipendula* tidak jauh berbeda dengan ciri umum dari *Sargassum* lainnya. *S. filipendula* digolongkan dalam kingdom Chromista karena tidak memiliki akar, batang dan daun sejati. Namun, organ yang terdapat pada tubuh alga (talus) menyerupai tumbuhan tingkat tinggi. Talus tersebut menyerupai cabang seperti jari, yang terdiri atas 3 bagian yaitu *holdfast* (bagian akar yang digunakan untuk melekat menyerupai cakram), *blade* (bagian daun berbentuk linear, panjang dan pipih dengan tepi bergerigi) dan *stipe* (bagian batang yang sangat ramping). Menurut Camacho *et al.* (2015), *S. filipendula* dapat tumbuh hingga tinggi mencapai 12 meter, dan memiliki *pneumatocysts* (kantung udara) berbentuk bulat yang sangat banyak, sehingga dapat membantu alga mengapung di permukaan air dan berfungsi sebagai tempat penyimpanan air saat terhempas ke daerah daratan.

Tabel 2.1 Komposisi kimia *Sargassum filipendula*

Kandungan Kimia	Nilai
Karbohidrat	48,10%
Crude Fiber	42,55%
Kelembaban	15,03%
Protein	4,38%
Lemak	0,07%

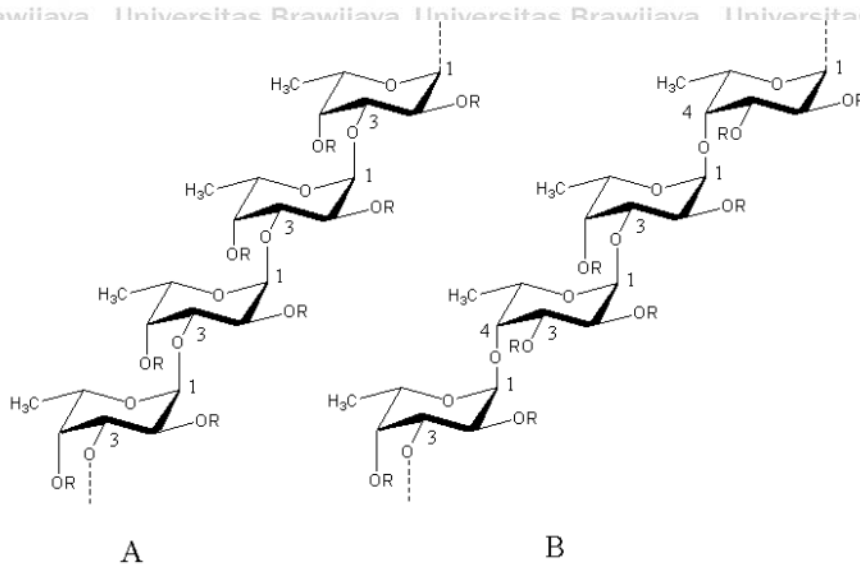
Sumber : (Laeliocattleya *et al.*, 2020).

Alga diketahui mengandung karbohidrat dalam bentuk polisakarida yang melimpah, yang didukung oleh komponen lain, seperti protein, lemak, air dan komponen lainnya (Yende *et al.*, 2014). Hal tersebut juga dibuktikan pada **Tabel 2.1** dalam penelitian Laeliocattleya *et al.* (2020), dimana komponen utama *S. filipendula* dalam bentuk *raw material* didominasi oleh karbohidrat sebanyak 48,1% dengan kandungan protein dan lemak yang sedikit (ditemukan hanya <10%). Karbohidrat tersebut berfungsi sebagai tempat menyimpan cadangan makanan serta menjadi struktur pembentuk tubuh alga. Selain itu, *S. filipendula* juga kaya akan vitamin dan kandungan mineral seperti magnesium, zat besi, kalium, natrium, dan kalsium (Verma *et al.*, 2019).

2.2 Fukoidan

Fukoidan merupakan kompleks polisakarida heterogen tersulfatasi yang mengandung substansial dari L-fukosa dan golongan ester sulfat dengan berat molekul antara 100-1600 kDa. Kandungan fukoidan banyak terdapat pada famili alga cokelat (*Phaeophyta*) dan beberapa spesies hewan laut, yaitu mentimun laut dan landak laut (Morya *et al.*, 2012). Pada alga cokelat sebagai produsen utama, polisakarida tersulfatasi tersebut berguna untuk mencegah terjadinya pengeringan oleh air laut, dimana fukoidan bekerja untuk menjaga tekanan osmotik menggunakan gugus hemiester sulfat dan ion magnesium pada alga. Fukoidan juga berperan penting pada stuktur tubuh terutama matriks *mucilaginous* dinding sel, dimana fukoidan bekerja menstabilkan dinding sel dengan menghubungkan silang antara mikrofibril selulosa matriks, yang akan memperkuat dinding sel (Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Ikatan silang tersebut akan melindungi dinding sel dari tekanan mekanik, kimia dan osmotik, dan faktor lingkungan, dan secara langsung memengaruhi kandungan fukoidannya. Kandungan gugus sulfat pada fukoidan, menyebabkan fukoidan mampu mengikat kation (terutama K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) dan berpartisipasi melakukan pertukaran anion dengan lingkungan.

Pertukaran ini memungkinkan alga untuk melakukan adaptasi dengan fluktuasi salinitas air dan efek toksik logam berat (Pierucci *et al.*, 2019).



Gambar 2.2. Struktur kerangka penyusun fukoidan. Struktur tipe (A) (1→3)-linked α -L-fucopyranose, (B) kombinasi ikatan (1→3)- dan (1→4)- α -L-fucopyranose (Z. Lin *et al.*, 2020)

Struktur kerangka penyusun fukoidan pada **Gambar 2.2** menunjukkan bahwa rantai utama dapat dibagi menjadi dua tipe ikatan berulang, yaitu ikatan (1 → 3)- α -L-fucopyranose dan kombinasi ikatan (1→3) dan (1→4)- α -L-fucopyranose (Z. Lin *et al.*, 2020). Fukoidan juga terdiri dari beragam molekul, hal tersebut dikarenakan rantai samping yang dapat berikatan dengan rantai utama berupa sebagian kecil karbohidrat (galaktosa, manosa, xilosa) maupun non-karbohidrat lain (asam uronat, gugus asetil dan protein) (Barbosa *et al.*, 2014).

Tabel 2.2 Perbandingan Kandungan Fukoidan dari Berbagai Sumber *Sargassum*

Spesies	Kandungan Fukoidan (%)	Sumber
<i>Sargassum cinereum</i>	4	(Somasundaram <i>et al.</i> , 2016)
<i>Sargassum aquifolium</i>	6	(Bilan <i>et al.</i> , 2017)
<i>Sargassum horridum</i>	6,8-13,5	(Di Filippo-Herrera <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sargassum polycostum</i>	7	(Bilan <i>et al.</i> , 2013)
<i>Sargassum binderi</i>	8	(Lim <i>et al.</i> , 2016)
<i>Sargassum filipendula</i>	11-26	(Costa <i>et al.</i> , 2011; García-Ríos <i>et al.</i> , 2012)
<i>Sargassum crassifolium</i>	22	(Yang <i>et al.</i> , 2017)
<i>Sargassum feldmanii</i>	25	(Shevchenko <i>et al.</i> , 2017)
<i>Sargassum duplicatum</i>	32-38	(Shevchenko <i>et al.</i> , 2017)

Pada filum *Phaeophyta*, genus *Sargassum* menjadi salah satu genus yang banyak dipelajari karena jumlah spesiesnya yang melimpah di lautan. Kandungan fukoidan pada masing-masing spesies sangat bervariasi (**Tabel 2.2**). Beberapa spesies memiliki kandungan yang lebih tinggi dibandingkan jenis lainnya, seperti *S. duplicatum*, *S. feldmani*, *S. crassifolium* dan *S. filipendula*. Hal tersebut disebabkan oleh berbagai faktor, seperti spesies, habitat (baik lokasi geografis dan kondisi lingkungan), waktu pemanenan, dan cara ekstraksi (Wang *et al.*, 2019). Metode ekstraksi kasar dapat merusak struktur sulfasi serta bioaktivitas fukoidan. Adanya perbedaan konsentrasi fukoidan yang dihasilkan dalam tiap spesies juga berpengaruh terhadap aktivitas yang mampu dilakukan oleh fukoidan.

Berbagai penelitian yang dirangkum oleh Morya *et al.* (2012), fukoidan turut bekerja dalam melakukan aktivitas proses biologi dalam sel, seperti antitumor, antivirus, imunomodulator, antikoagulan, antiinflamasi, antioksidan, antitrombotik, sifat *anticomplementary*, antihepatopati, mampu mengurangi lipid dalam darah, antineoplastik, antiangiogenesis, induksi apoptosis sel, antiproliferasi pada sel, dll. Dilaporkan selanjutnya pada penelitian Priyan *et al.* (2020), fukoidan *Sargassum* sp. memiliki aktivitas sitotoksik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara jenis MCF-7. Fukoidan tersebut bekerja dengan memengaruhi sinyal siklus sel pada jalur apoptosis yang dimediasi mitokondria sel.

2.3 Ekstraksi Fukoidan

Fukoidan merupakan kompleks polisakarida heterogen tersulfatasi yang dapat diekstraksi dari alga cokelat (*Phaeophyta*). Proses ekstraksi dan isolasi fukoidan pada literatur, pertama kali dilakukan oleh Kylin pada tahun 1913.

Aktivitas farmakologis fukoidan yang sangat bervariasi mendukung adanya pengembangan proses ekstraksi fukoidan. Fukoidan sendiri dapat larut secara bebas dalam pelarut dengan konstanta dielektrik yang tinggi seperti air. Selain itu juga, fukoidan dapat larut dengan baik menggunakan pelarut air dengan suhu panas, baik dalam kondisi asam atau basa. Metode lain yang sering digunakan adalah asam/basa panas, enzim, *microwave*, atau *ultrasound-assisted aqueous extraction*; yang mana sering dikembangkan untuk mengoptimalkan proses ekstraksi fukoidan. Namun demikian, teknik pemurnian guna mendapatkan kadar murni ekstrak fukoidan tersebut seringkali memakan waktu dan membutuhkan biaya yang tinggi (Hahn *et al.*, 2012; Zayed *et al.*, 2016).

Salah satu penelitian proses ekstraksi yang dilakukan Laeliocattleya *et al.* (2020) adalah melakukan ekstraksi fukoidan dari *Sargassum filipendula* dari perairan pantai Sumenep Madura, Jawa Timur menggunakan metode ekstraksi *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE). Hasil ekstraksi menggunakan metode UAE akan digunakan sebagai bahan pengujian antikanker dalam penelitian ini. Metode UAE menggunakan pelarut berupa air dan asam kuat (HCl) yang berpengaruh terhadap *yield* ekstrak yang dihasilkan. Dari hasil penelitian, fukoidan terbaik diekstrak menggunakan kondisi optimalnya yaitu pada konsentrasi HCl sebesar 0,03 M dengan waktu 15 menit. Konsentrasi pelarut asam yang terlalu tinggi dengan waktu yang lama dapat memutuskan ikatan matriks dinding sel diikuti dengan penetrasi asam ke dalam jaringan antar sel yang berdampak pada degradasi parsial dan kerusakan fukosa fukoidan. Fukoidan yang diekstraksi dibuktikan dengan melakukan pengujian lanjutan berupa analisis gugus fungsi fukoidan seperti gugus sulfat dan fukosa menggunakan metode FTIR.

Ekstrak fukoidan yang dihasilkan akan sangat bervariasi didasarkan pada proses ekstraksinya, sehingga akan berpengaruh juga pada kemampuan atau bioaktivitas fukoidan terhadap sel yang tercatat pada **Tabel 2.3**. Kemampuan bioaktivitas ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ yaitu penghambatan pertumbuhan sel sebanyak 50% setelah pemberian senyawa.

Tabel 2.3. Perbandingan Kemampuan Kandungan Fukoidan dari Berbagai Sumber terhadap Sel Kanker Payudara

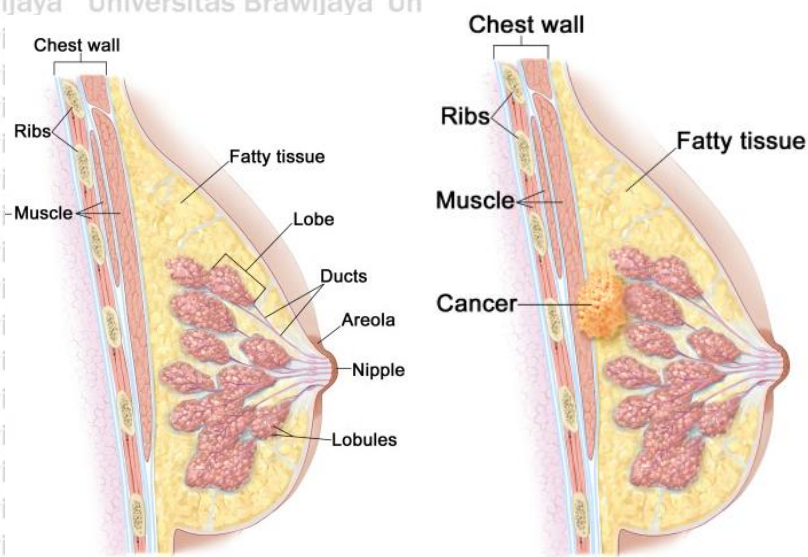
Sumber Fukoidan	Ekstraksi	Target	IC ₅₀ (µg/ml)	Kategori	Ref.
<i>Sargassum polycystum</i>	DEAE-cellulose anion exchange chromatography	MCF-7	93,62	Moderat	Priyan, 2020
<i>Padina fraseri</i>	Anion-exchange chromatography	MCF-7	144,00	Moderat	Isnansetyo, 2017
<i>Sargassum binderi</i> Sonder	Acid Method- Dialysis membrane	T47D	184,22	Moderat	Saepudin et al., 2018
<i>Undaria pinnatifida</i>	Anion-exchange chromatography	MCF-7	405,00	Lemah	Mak et al., 2014
<i>Sargassum cristaefolium</i>	Anion-exchange chromatography	MCF-7	461,00	Lemah	Isnansetyo, 2017
<i>Cladosiphon novae-caledoniae</i> Kylin	Abalone glycosidase-digested	MDA-MB-231	820,00	Tidak Toksik	Zhang et al., 2011

2.4 Kanker Payudara

Payudara merupakan salah satu organ bagian dada wanita yang memiliki reseptor hormon estrogen dan progesteron, dengan struktur anatomi yang tersusun atas area luar (puting susu dan areola) serta area dalam (*lymph nodes*, jaringan lemak, lobus, lobulus, dan duktus) (National Cancer Institute, 2014).

Kanker payudara terjadi akibat adanya keganasan yang menyerang jaringan epitel duktus dan lobulus payudara yang menjadi pembunuh kedua populasi wanita di Indonesia (Globocan, 2020). Kanker payudara awalnya tidak berkembang terlalu cepat dan hampir tidak diketahui, dimana gejala ditandai dengan adanya benjolan tanpa rasa nyeri sehingga kurang mendapat perhatian dari penderita (YKPI, 2018).

Benjolan akan membesar hingga berukuran 1 cm dalam kurun waktu 8-12 tahun diikuti oleh gejala nyeri pada payudara, pembesaran dan gatal pada puting susu, kemerahan dan mengeringnya kulit secara keseluruhan, penyusutan ukuran payudara, maupun keluarnya cairan dari puting susu. Tidak adanya penanganan yang baik, menyebabkan sel kanker melakukan metastasis hingga seluruh tubuh, dengan munculnya pembengkakan di bawah ketiak, nyeri pada tulang, sesak napas dan lainnya (Kemenkes, 2015).



Gambar 2.3 Ilustrasi perbedaan anatomi payudara. Payudara normal dan Kanker Stadium III (sel abnormal tumbuh pada lobulus payudara (National Cancer Institute, 2014)

Gejala yang terjadi biasanya ditemukan pada penderita yang berasal dari faktor genetik dan umur. Adanya riwayat kanker payudara meningkatkan risiko berkembangnya kasus, dimana biasanya akan diturunkan dari kerabat tingkat pertama dan tingkat kedua. Berdasarkan data World Health Organization (WHO) (dalam Irena, 2018), menunjukkan bahwa sebanyak 78% kasus kanker menyerang pasien yang berusia lebih dari 50 tahun dan hanya 6% menyerang pasien yang kurang dari 40 tahun. Menurut Duffy (2017), kanker payudara disebabkan oleh adanya gangguan regulasi siklus sel sehingga menyebabkan pertumbuhan sel abnormal yang terus menerus tumbuh pada saluran susu (duktus) atau kelenjar susu (*lobules*). Sel abnormal tersebut terjadi akibat adanya mutasi pada gen sel normal yang dipicu oleh faktor usia, faktor metabolisme (hormonal), faktor lingkungan (paparan radiasi) maupun faktor genetik (Patton, 2016). Selain itu, faktor keturunan dalam keluarga merupakan salah satu faktor risiko terbesar terjadinya kanker payudara, yang biasanya diturunkan pada kerabat tingkat pertama dari ibu. Gen terkait yang biasanya mengalami mutasi akibat faktor genetik meliputi gen BRCA1 dan BRCA2, TP53, PTEN, CDH1 dan STK11 (Thankamma & Helen, 2011). Dari total angka kejadian, sebanyak hampir 10% penderita dipicu oleh faktor genetik turunan (familial), yang mana sebanyak 80-90% mutasi terjadi pada gen BRCA1 dan BRCA2. Menurut (Suparman dan Suparman, 2014), faktor lain pemicu kanker payudara seperti ketidaknormalan

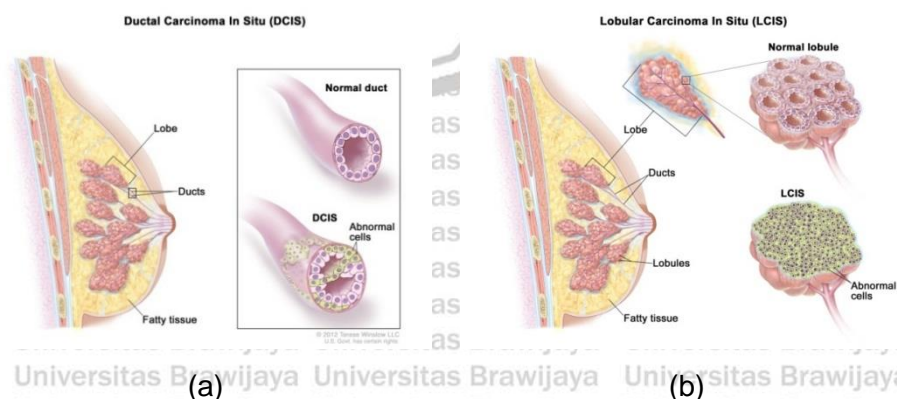
hormon pada wanita nuliparitas (wanita yang belum mempunyai anak), wanita yang memiliki anak pertama pada umur >35 tahun, menarche dini (menstruasi pertama dibawah usia 12 tahun), konsumsi obat hormonal, gaya hidup wanita (makanan *junk food*, obesitas, makanan berkadar lemak tinggi, alkohol, diet), maupun penggunaan radiasi.

Kanker payudara dapat dibagi menjadi empat tingkatan prognosis (prediksi perkembangan penyakit), yaitu stadium I – IV (Ryan & Goss, 2013). Penentuan stadium didasarkan pada ukuran, ekstensi, maupun penyebaran sel pada bagian tubuh lainnya, yang dapat digunakan untuk menentukan proses pengobatan yang tepat (Sobri *et al.*, 2020). Pembagian kanker payudara dibagi menjadi :

a. Stage 0 (carcinoma in situ)

Pada tahap ini, sel kanker payudara berkembang di area kelenjar payudara, tanpa melakukan invasi ke dalam jaringan payudara normal yang berdekatan. Pada tahap ini, (**Gambar 2.4**) dibagi menjadi tiga tipe *breast carcinoma in situ*, yaitu :

- 1) Karsinoma duktal in situ (DCIS) merupakan kondisi non-invasif yang ditemukan pada saluran duktal payudara. Sel-sel abnormal tersebut, belum menyebar ke luar saluran ke jaringan lain di payudara, namun pada beberapa kasus, DCIS dapat menjadi kanker invasif dan melakukan metastasis.
- 2) Karsinoma lobular in situ (LCIS) adalah suatu kondisi di mana sel-sel abnormal ditemukan di lobulus payudara. Kondisi ini jarang menjadi kanker invasif, namun mampu meningkatkan risiko terkena kanker payudara di kedua payudara.



Gambar 2.4. Ilustrasi (a) DCIS dan (b) LCIB pada Stage 0 Kanker Payudara (National Cancer Institute, 2014)

3) *Paget disease nipple* adalah suatu kondisi di mana sel-sel abnormal hanya ditemukan pada puting susu.

b. Stage I

Pada tahap ini (**Gambar 2.5**) keadaan terjadi dimana gejala mulai dapat dikenali melalui deteksi dini, baik dari diri sendiri maupun secara klinis.

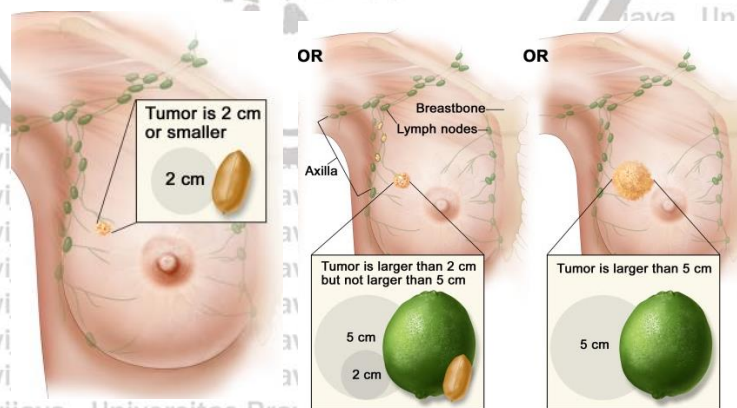
Keadaan ini ditemukan adanya terdapat benjolan atau tumor dengan perkiraan ukuran sebesar 2 cm.

c. Stage IIA

Pada tahap ini, keadaan sering ditemukan dalam beberapa kondisi, seperti : sel kanker ditemukan tumbuh pada kelenjar getah bening ketiak saja; keadaan lain dimana sel dapat tumbuh dengan perkiraan ukuran 2 cm dan melakukan penyebaran ke kelenjar getah bening ketiak; keadaan lain dimana sel berkembang hingga mencapai 5 cm namun belum melakukan penyebaran ke area kelenjar getah bening ketiak.

d. Stage IIB

Pada tahap ini (**Gambar 2.5**) terjadi dimana sel sudah berukuran mencapai hampir 5 cm dan telah menyebar ke kelenjar getah bening pada area ketiak. Pada keadaan lain stadium ini, ditemukan pula sel belum melakukan penyebaran pada kelenjar getah bening ketiak, namun memiliki ukuran sel lebih dari 5 cm.



(a) (b)

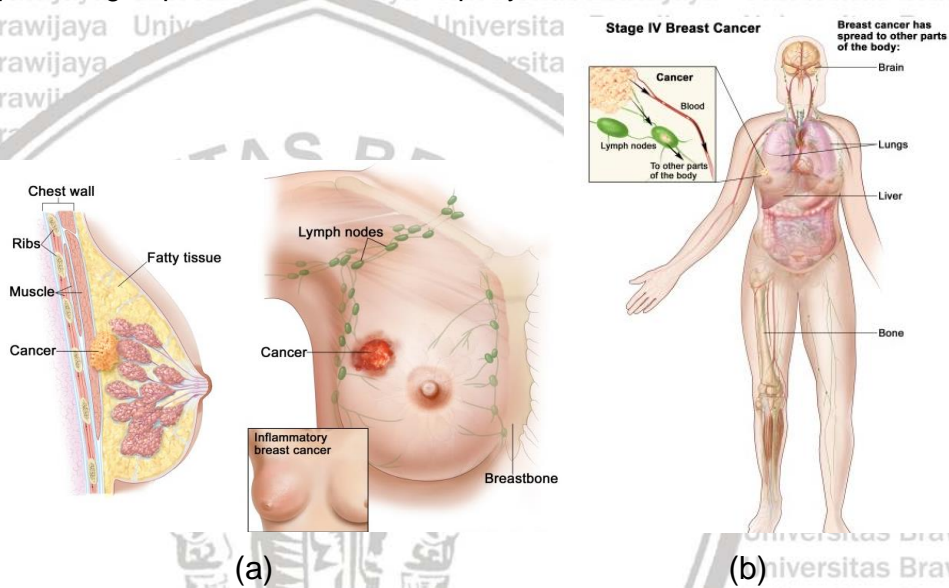
Gambar 2.5 Ilustrasi (a) Stage I dan (b) Stage IIB Kanker Payudara (National Cancer Institute, 2014)

e. Stage IIIA

Pada tahap ini, kanker ditemukan hampir melakukan penyebaran ke struktur jaringan lainnya, dimana ditemukan pada kelenjar getah bening ketiak yang melekat bersama atau dengan struktur lainnya (tulang dada).

f. Stage IIIB

Pada tahap ini (**Gambar 2.6a**), tumor dengan ukuran tertentu telah melakukan penyebaran ke struktur jaringan lainnya, baik pada dinding dada dan/atau kulit payudara. Pada tahap ini, sudah mulai terjadi peradangan pada kulit oleh karena penyebaran sel kanker.



Gambar 2.6. Ilustrasi Kanker Payudara **(a)** Stage IIIB dan **(b)** Stage IV (National Cancer Institute, 2014)

g. Stage IV

Pada tahap ini, (**Gambar 2.6b**) kanker telah menyebar atau metastasis ke bagian tubuh lainnya, kebanyakan menyerang area tulang, paru-paru, liver dan otak.

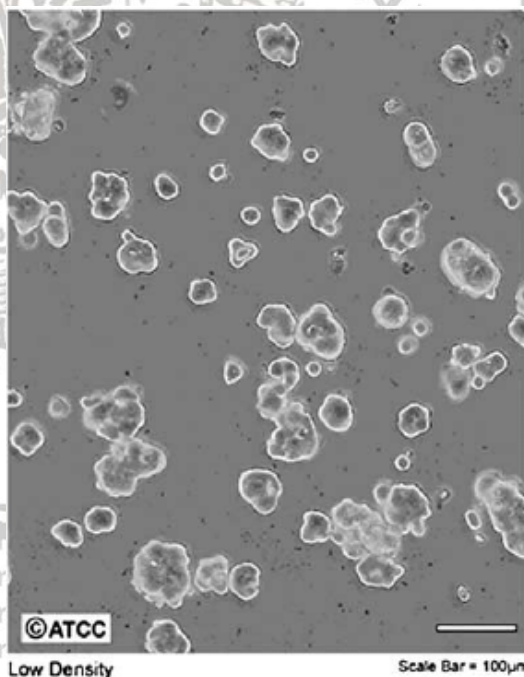
Secara umum, semakin dini kanker payudara ditemukan maka akan meningkatkan peluang kesembuhannya. Akan tetapi, sebagian besar penderita datang ketika kanker sudah menjalar dan biasanya sudah mencapai stadium III.

Hal ini terjadi karena rendahnya kepedulian masyarakat untuk melakukan deteksi dini tahap awal kanker payudara, dikarenakan pada awalnya tidak adanya tanda sakit pada tubuh atau mengacuhkan rasa sakit yang mulai dirasakan hingga

kondisi menjadi lebih serius. Faktor lain yang diduga menyebabkan pasien memeriksakan diri pada stadium lanjut, seperti masih belum efektifnya program deteksi dini, kurangnya informasi, pendidikan, kurangnya alat diagnostik (mamografi, USG) maupun keterampilan tenaga medis mendiagnosis keganasan payudara (Baruna & Manuaba, 2019; YKPI, 2018)

2.5 MCF-7

Salah satu jenis *cell line* kanker payudara yang banyak digunakan dalam melakukan penelitian adalah sel MCF-7. Menurut Lee *et al.*, (2015), sel MCF-7 bermula dari seorang peneliti Herbert D. Soule dari Michigan Cancer Foundation yang berusaha mengembangkan kultur sel kanker dengan melakukan isolasi berbagai sel kanker menggunakan substrat dan nutrisi yang berbeda. Kultur sel kanker yang akhirnya ditemukan Soule berasal dari kanker yang terdapat pada pasien wanita bernama Helen Marion pada tahun 1970. Pemberian nama MCF-7 menjelaskan bahwa isolasi sel dilakukan di Michigan Cancer Foundation, dan mewakili upaya ketujuh Soule dalam menghasilkan kultur sel kanker.



Gambar 2.7. MCF-7 *Cell Line* (perbesaran 100x) (Mostaço-Guidolin *et al.*, 2010)

Sel MCF-7 merupakan sel yang menyerupai sel epitel yang diperoleh dari *pleural effusion breast adenocarcinoma* kanker payudara. Sel MCF-7 ditumbuhkan dengan media dasar penumbuh seperti EMEM (*Eagle's Minimum Essential*

Medium)/ DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)/ RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) terformulasi yang mengandung FBS (Fetal Bovine Serum) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1%. Dalam review yang dilakukan oleh Comşa *et al.*, (2015), diketahui profil molekuler sel MCF-7 termasuk dalam sel *adherent* yang sensitif terhadap hormon esterogen dan mampu mengekspresikan reseptor ER- α dengan sangat baik dibandingkan ER- β . Sel MCF-7 tidak mampu mengekspresikan salah satu apoptosis eksekutor (caspase-3). Namun, dapat mengalami apoptosis melalui aktivitas pada protein caspases-9, -6 dan -7. Sel tersebut mengalami melakukan overekspresi Bcl-2 terkait proliferasi sel dan resisten terhadap *doxorubixin* dan *tamofixen*, mampu menginduksi apoptosis melalui TNFa, serta memiliki tingkat ekspresi yang rendah terhadap protein apoptosis p55 (TNFR1) (Kazanietz, 2010). Kelebihan penggunaan sel MCF-7 dalam penelitian adalah lebih responsif dibandingkan sel kanker payudara lainnya, sel tersebut mampu mempertahankan karakteristik sel epitel mammae *in vivo* pada manusia. Selain itu, MCF-7 mudah dikulturkan dan tumbuh sebagai sel monolayer yang mudah diamati, meskipun setelah kultur berkepanjangan dapat tumbuh membentuk nodus multilayer (Comşa *et al.*, 2015).

2.6 Apoptosis

Kematian sel merupakan salah satu proses yang terjadi secara terus-menerus pada sel. Kematian sel berdasarkan mekanismenya dibagi menjadi dua, yaitu apoptosis dan nekrosis. Kematian sel apoptosis merupakan salah satu regulasi kematian sel terprogram yang secara selektif bekerja dengan protease kompleks guna mengurangi jumlah sel, respons terhadap kerusakan DNA maupun stres, dan menjaga homeostasis sel (Ardhiansyah, 2021). Regulasi kematian apoptosis berbeda dengan nekrosis, dimana nekrosis merupakan regulasi kematian yang terjadi secara tidak terkontrol dan tidak disengaja. Perbedaan gambaran yang terjadi pada sel dapat dilihat pada **Tabel 2.4**.

Tabel 2.4 Perbandingan gambaran sel yang mengalami nekrosis dan apoptosis

Indikator	Nekrosis	Apoptosis
Stimulasi	Hipoksia dan <i>toxin</i>	<i>Phuisiologic</i> dan <i>phatologic</i>
Histologi	- Kondensasi kromatin heterogen - Terjadi <i>swelling</i> sel - Terjadi kebocoran sel	- Kondensasi kromatin homogen - Terjadi kondensasi badan apoptosis
Pemutusan DNA	Acak	<i>Intermueosomal</i> gen
<i>Tissue reaction</i>	Terjadi inflamasi	- Tidak terjadi inflamasi - Fagositosis badan apoptosis oleh fagosit
Kebutuhan ATP	Tidak (<i>Passive cell death</i>)	Ya (<i>Active cell death</i>)

Sumber : (Widjanto, 2012).

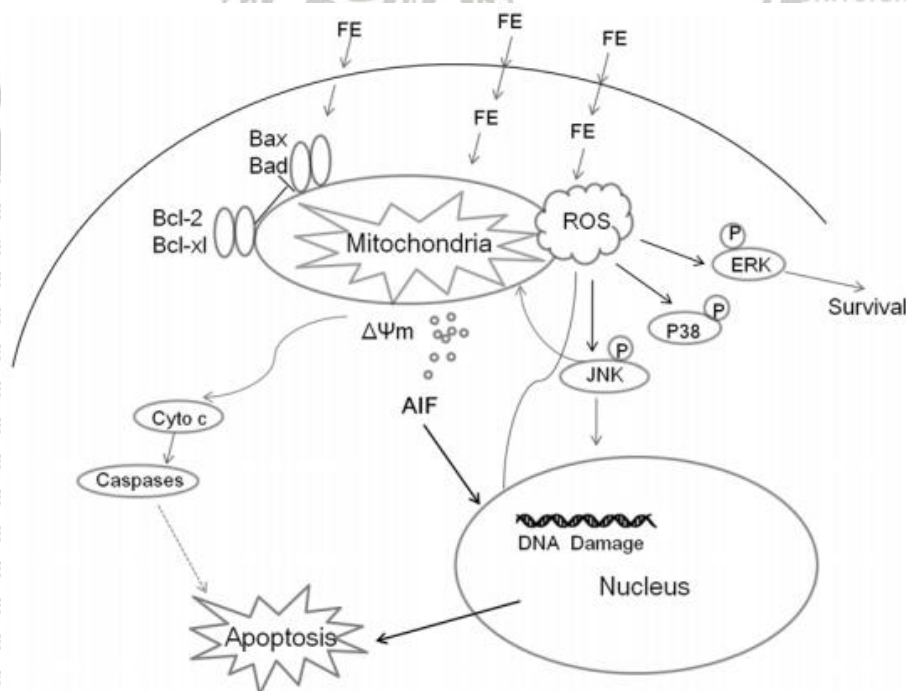
Apoptosis sering didefinisikan sebagai asambel morfologi sel, dimana terjadi perubahan morfologi seperti kondensasi kromatin, fragmentasi inti dan piknosis (pengurangan volume sel), perubahan biokimia yang mencakup aktivasi protein caspase, pemecahan DNA dan protein. Mekanisme dilakukan dengan memodifikasi permukaan membran sehingga sel yang terapoptosis (*apoptotic cell*) dapat dikenali dan ditelan oleh sel fagosit (Galluzzi & Kroemer, 2008). Kematian ini menurut Sari (2019), dipicu oleh berberbagai jalur sinyal dan diatur oleh ligan ekstrinsik dan intrinsik yang kompleks. Ligan yang berikatan dengan reseptor kematian sel akan menginduksi sel target, yang menginisiasi caspase inisiator dan selanjutnya mengaktifkan caspase lainnya, yaitu caspase eksekutor. Caspase (Cysteine ASPartate proteASEs) merupakan famili protein dalam sel yang bekerja dengan melakukan katalis proses proteolitik yang menghasilkan perubahan biokimia dan morfologi pada sel yang berhubungan dengan proses apoptosis.

Apoptosis bekerja secara sinergis pada jalur intrinsik dan ekstrinsik. Pada jalur intrinsik terjadi ketika adanya pemberian sinyal yang disebabkan oleh stress mitokondria, seperti senyawa kimia dan kehilangan factor pertumbuhan, memicu proses *mitokondria-dependent*, sehingga akan terjadi pelepasan sitokrom-c (pembawa elektron yang larut air) dan mengaktifkan caspase-9. Sedangkan, jalur ekstrinsik terjadi ketika adanya inisiasi oleh stimulasi reseptor kematian (*death receptor/DR*) seperti Fas (reseptor 1 TNF), DR4 dan DR5, yang selanjutnya akan mengaktifkan caspase-8. Apoptosis juga berperan utama dalam melakukan pencegahan penyebaran sel kanker. Namun sayangnya, sel kanker dengan baik menghindari mekanisme apoptosis dengan melakukan proliferasi atau menstabilkan protein pro dan anti apoptosis secara berlebihan (protein BCL-2). Sel kanker juga mampu mengurangi ekspresi protein caspase sebagai eksekutor

apoptosis. Selain itu juga, mampu melakukan inaktivasi dan mengganggu kerja reseptor kematian, seperti melakukan mutase pada tumor suppressor p53 (Matsuura *et al.*, 2016; Sari, 2019), sehingga sel kanker dapat berproliferasi dengan cepat ke area lainnya.

2.7 Efek Fukoidan terhadap Apoptosis Sel

Adanya senyawa asing yang masuk akan menginduksi sinyal-sinyal apoptosis pada sel kanker. Mekanisme biokimia yang terjadi terhadap salah satu jenis *cell line* kanker payudara MCF-7 setelah terinduksi sinyal apoptosis dari ekstrak fukoidan akan terjadi seperti pada **Gambar 2.8**. Mekanisme ini akan terjadi dengan melakukan pengaktifan dan pelepasan berbagai macam protein atau enzim, seperti protein caspase famili, sitokrom-c dan *apoptosis induction factor* (AIF) dari mitokondria ke sitoplasma. Selanjutnya terjadi fragmentasi DNA maupun pemecahan dan perusakan seluler sebelum terjadinya lisis. Kerusakan ini membutuhkan energi berupa ATP pada sel, sehingga menyebabkan perubahan asimetri pada membran. Pada keadaan ini juga, membran sel akan melakukan *blebbing* (tonjolan iregular) pada membran plasma. Kemudian, hasil pelisisan menghasilkan badan apoptotik yang masih mengandung protein, mikroDNA maupun DNA (Senthilkumar *et al.*, 2013; Sirait & Setyaningsih, 2019; Zhang *et al.*, 2011).



Gambar 2.8. Mekanisme kematian sel MCF-7 yang diinduksi ekstrak fukoidan (Zhang *et al.*, 2011)

Fukoidan tidak melakukan aktivitas apoptosis atau melakukan kerusakan pada sel normal, melainkan mendukung pertahanan sel lainnya, salah satunya adalah melakukan ikatan dengan reseptor glikoprotein spesifik pada membran sel makrofag dan mengaktifkan MAPK (rantai protein yang mengaktifkan mengkomunikasikan sinyal dari reseptor), sehingga akan menginduksi aktivasi faktor transkripsi sel imun lainnya. Selanjutnya, makrofag yang teraktivasi akan melakukan pelepasan sitokin seperti IL-12, yang dapat mengaktifkan sel T dan sel NK. Makrofag yang ada akan melakukan fagositosis badan apoptosis sel kanker yang terbentuk tanpa menimbulkan inflamasi. Sayangnya, dalam berbagai literatur menyebutkan bahwa ikatan rantai samping yang membentuk struktur fukoidan sangat beragam, yang menyebabkan sulitnya mengidentifikasi hubungan molekular yang terjadi antara struktur dan aktivitas biologisnya (Cumashi *et al.*, 2007; Y. Lin *et al.*, 2020).

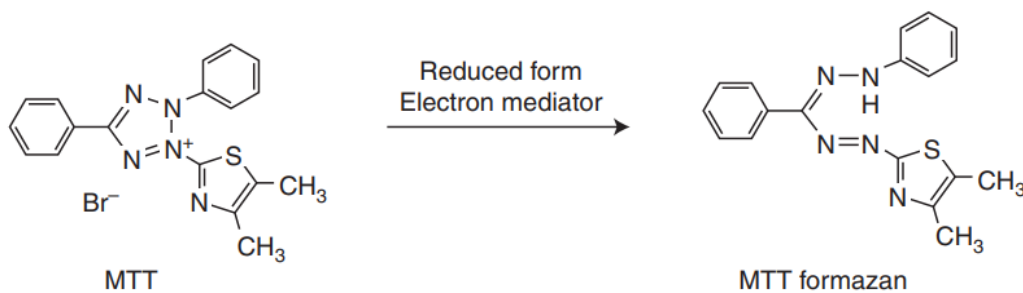
Gugus sulfat dan rantai samping sakarida yang mengikatnya berdampak pada berat molekulnya dan kelarutan fukoidan dalam melakukan induksi pada sel (Puspantari *et al.*, 2020). Tingginya berat molekul pada fukoidan menyebabkan rendahnya kelarutan sehingga dapat menghambat penetrasi fukoidan dalam melakukan induksi apoptosis sel. Sebaliknya, fukoidan dengan berat molekul rendah memiliki aktivitas biologis yang lebih tinggi. Selain itu adanya gugus ester yang membawa muatan negatif dalam molekul dapat memfasilitasi pembentukan kompleks protein fukoidan yang terlibat dalam proliferasi sel (Saepudin *et al.*, 2018).

2.8 Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT Assay

Uji sitotoksik merupakan pengujian guna melakukan evaluasi suatu bahan untuk mengetahui adanya potensi toksik (senyawa berbahaya) secara biologis terhadap sel (Bahuguna *et al.*, 2017). Salah satu pengujian yang dilakukan secara *in vitro* pada kultur sel adalah metode uji MTT. Metode ini menggunakan metode kolorimetri atau perbandingan menggunakan perbedaan warna reaksi. Perbedaan warna menggunakan reagen MTT dilakukan dengan memanfaatkan mekanisme tubuh sel (metabolisme akibat aktivitas enzim yang dihasilkan sel hidup) untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik atau kemoterapi pada senyawa sampel (Riss *et al.*, 2016).

Pengujian aktivitas sitotoksik menurut Kumar *et al.* (2018), diamati ketika reagen MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) yang merupakan garam tetrazolium berwarna kuning, diadsorpsi dan direduksi menjadi

kristal formazan yang akan memberikan perubahan warna menjadi ungu yang tidak larut air. Hal tersebut terjadi karena adanya pemecahan garam tetrazolium oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat pada jalur respirasi sel pada mitokondria, dengan melakukan pemutusan ikatan cincin tetrazolium, sehingga adanya perubahan warna yang terjadi akan membuktikan adanya sel yang masih hidup. Penambahan *stopper* seperti DMSO maupun SDS akan mengubah kompleks garam formazan yang larut air berbentuk jarum berwarna ungu. Warna ungu yang dihasilkan selanjutnya dibaca absorbansinya dan diukur menggunakan spektrofotometer maupun *microplate reader* dengan panjang gelombang 500-600 nm. Semakin besar nilai absorbansi, menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Reaksi reduksi MTT dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 2.9. Reaksi MTT Assay (Kumar *et al.*, 2018)

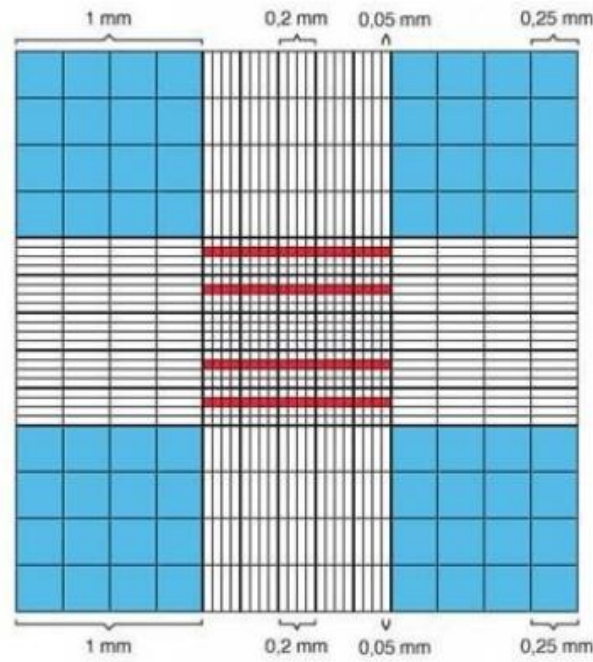
Hasil uji sitotoksik ini dapat digunakan untuk menentukan nilai konsentrasi IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan nilai konsentrasi sampel yang mampu melakukan penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50%, sehingga mampu menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel dan laju pertumbuhan yang terjadi pada sel (Stepanenko dan Dmitrenko, 2015). Menurut U.S. National Cancer Institute dalam Hameed (2012), nilai IC_{50} dapat diklasifikasikan menjadi empat kategori, yaitu kategori sangat toksik apabila nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, kategori sitotoksik moderat atau cukup aktif apabila nilai IC_{50} berada diantara 21-200 $\mu\text{g/mL}$, kategori sitotoksik lemah apabila nilai IC_{50} berada diantara 201-500 $\mu\text{g/mL}$ dan kategori tidak toksik apabila nilai $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} dari senyawa hasil ekstraksi akan dinilai selektif dan berpotensi sebagai kemopreventif apabila nilai $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$. Sedangkan, nilai batas pada senyawa murni memiliki nilai $\leq 25 \mu\text{g/mL}$. Semakin rendah nilai IC_{50} yang dihasilkan, maka senyawa tersebut bersifat makin toksik, dan begitu pula sebaliknya (Helilusiatiningsih & Sujuti, 2019;

Ismaryani *et al.*, 2018).

Metode MTT Assay tidak hanya dapat digunakan sebagai uji sitotoksik, namun juga dapat menguji aktivitas sitostatik dari agen obat potensial dan bahan beracun. Sayangnya, MTT Assay memiliki kekurangan seperti biaya yang relatif mahal dibandingkan metode lainnya. Selain itu, reagen MTT mudah menguap, sehingga pada literatur tercatat bahwa warna formazan terlarut asam-isopropanol akan tetap stabil selama beberapa jam pada suhu kamar. Reagen MTT juga sensitif terhadap cahaya, sehingga proses pengujian harus dilakukan dalam keadaan gelap (Mazloun-Ardakani *et al.*, 2019).

2.9 Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode *Direct Counting*

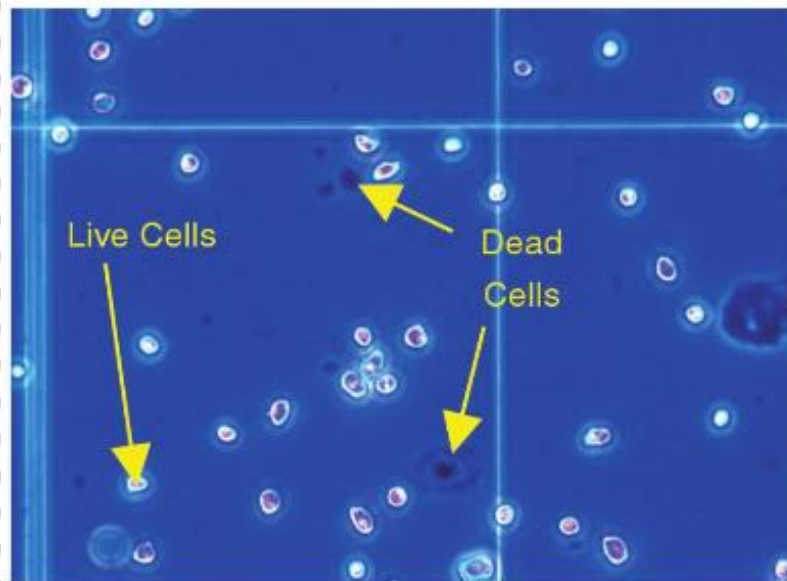
Pengujian aktivitas sitotoksitas dapat dilakukan dengan perhitungan langsung secara manual pada sel. Pengujian ini dilakukan sebagai bentuk konfirmasi aktivitas sitotoksik pada sel. Perhitungan sel dilakukan dengan menggunakan bantuan *haemocytometer* yang merupakan salah satu alat bantu enumerasi sel yang ditemukan oleh Louis Charlez Malassez pada pertengahan abad ke-19 (Khan *et al.*, 2012). *Haemocytometer* juga dikenal sebagai *counting chamber* yang dapat digunakan untuk menghitung berbagai jenis mikroskopis, seperti darah, sperma, bakteri, jamur dll. *Haemocytometer* merupakan glass slide yang memiliki dua set ruangan yang direkayasa dengan garis presisi berbentuk persegi pada masing-masing dua permukaan glass slide sebagai tempat melakukan perhitungan sel (Ng & Schantz, 2010). Representasi visual *haemocytometer* digambarkan pada **Gambar 2.10**, dimana terdapat 9 buah kotak yang memiliki ukuran yang berbeda-beda berukuran 1 x 1 mm. Dalam kotak ini terdapat persegi yang berada di tengah yang terdiri atas dua puluh lima persegi yang berukuran 0,2 x 0,2 mm. Kotak ini sering digunakan untuk menghitung trombosit dan sel darah merah. Kotak lainnya, berisi enam belas kotak yang terdiri atas grid berukuran 0,05 x 0,05 mm, yang biasanya digunakan untuk menghitung eritrosit. Kotak yang paling besar berisi enam belas kotak yang berukuran 0,25 x 0,25 mm. Kotak ini biasa digunakan untuk menghitung berbagai jenis sel.



Gambar 2.10. Representasi *Haemocytometer* (Khan et al., 2012)

Haemocytometer digunakan untuk mempermudah pengamatan dan perhitungan di bawah *microskop inverted*. Pada metode ini, sel diperlakukan pengecatan untuk dapat mempermudah menghitung sel baik sel yang hidup maupun yang mati. Pewarna yang dapat digunakan seperti *Trypan blue*, Methylene Blue, ErythrosinB, Nigrosin, dan Saffrarin; namun penggunaan *Trypan blue* lebih sering digunakan dalam *haemocytometer* dengan warna biru (Vembadi et al., 2019). Pada **Gambar 2.11**, sel hidup yang diberi warna *trypan blue* ditandai dengan sel yang berbentuk bulat, berinti, dilindungi oleh dinding sel yang jernih dan bersinar dibawah mikroskop. Sedangkan, sel yang mati akan ditandai dengan warna biru, karena sel mati telah mengalami kerusakan pada membran selnya. Protein yang rusak akan melakukan ikatan dengan *trypan blue*, sehingga warna yang tampak dari sel mati adalah berwarna biru gelap (Ng & Schantz, 2010). Sel yang dihitung adalah sel yang berada dalam 4 daerah kotak yang sedang. Jumlah sel yang hidup terhitung setelah perlakuan pada masing-masing kadar dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah Sel / mL} = \frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik}}{4} \times 10^4 \text{ sel / mL}$$



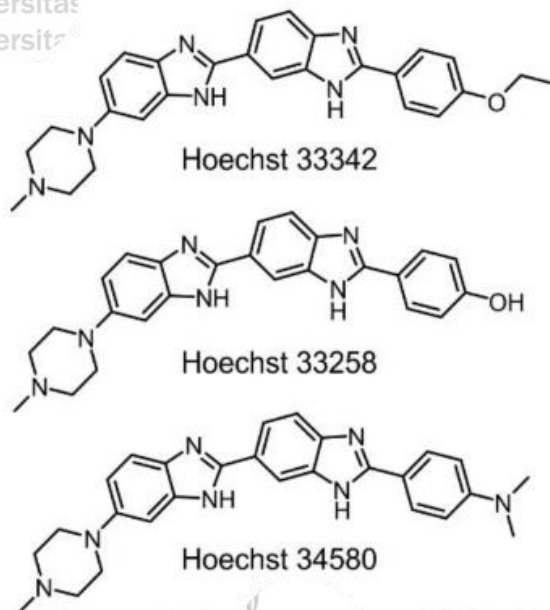
Gambar 2.81. Perbedaan Sel Hidup dan Sel Mati dengan *Trypan blue* pada *Haemocytometer* (Ng & Schantz, 2010)

Meskipun sering digunakan dalam penelitian berbasis sel, karena mudah dan relatif murah, metode ini memiliki beberapa kekurangan. Tercatat dalam Vembadi (2019), penggunaan *haemocytometer* yang bergantung pada penghitungan manual oleh analis akan meningkatkan *human error* yang tinggi dalam berbagai tahapan proses seperti proses pencampuran dan pengenceran, *handling*, serta pembacaan. Jika analis tidak memiliki tingkat keahlian tertentu dalam menggunakan *haemocytometer* akan menyebabkan akurasi yang kurang dan kesalahan antar analis yang tinggi. Oleh karena itu diperlukan penghitungan sampel berganda untuk memastikan hasil konsisten (menghindari error) yang mewakili sampel asli. Kekurangan lain antara lain proses penghitungan manual yang membutuhkan banyak waktu sehingga tidak efisien apabila diterapkan pada pengujian skala besar.

2.10 Uji Aktivitas Apoptosis dengan Metode Hoechst

Pengujian aktivitas apoptosis dapat dilakukan dengan bantuan metode Hoechst menggunakan mikroplate fluorescent. Apoptosis merupakan kematian sel secara terprogram pada kondisi fisiologis maupun patologis (Maples, 2014). Sel apoptosis dapat dideteksi secara mikroskopi dengan bantuan pewarna fluoresen Hoechst (Crowley *et al.*, 2016). Pengujian ini menggunakan reagen Hoechst yang akan muncul oleh bantuan sinar ultraviolet dengan memancarkan fluoresensi biru

pada panjang gelombang 460-490 nm. Penggunaan Hoechst banyak dipilih dalam berbagai penelitian karena mudah dilakukan dan biaya yang rendah. Selain itu, Hoechst lebih disukai, karena memiliki kemampuan permeabilitas pada sel yang lebih besar dan sitotoksitas yang lebih rendah pada sel. Reagen Hoechst dalam pekerjaannya, akan memberikan warna ketika melakukan pengikatan ke basa nitrogen DNA sel yang termasuk dalam purin yaitu adenin-timin (A-T), sehingga akan menunjukkan spektrum warna fluoresensi yang berbeda bergantung pada rasio pasangan basanya (Bucevičius *et al.*, 2018).



Gambar 2.92. Struktur kimia dari jenis Hoechst dye (Bucevičius *et al.*, 2018)

Beberapa jenis pewarna Hoechst yang sering digunakan yaitu Hoechst 33342, 33258 dan 34580 dengan struktur kimia pada **Gambar 2.12**. Ketiga pewarna Hoechst ini memiliki fungsi yang sama dan dapat digunakan dalam aplikasi serupa, namun ketiganya memiliki sifat yang sedikit berbeda. Dibandingkan dengan Hoechst 33258, Hoechst 33342 secara signifikan lebih permeabel dan fleksibel apabila berinteraksi dengan sel. Hal ini dikarenakan adanya gugus etil lipofilik pada Hoechst 33342 dan biasanya lebih sering digunakan sebagai reagen dalam pewarnaan sel hidup. Hoechst 34580 memiliki gugus dimetilamina non-fenol, sehingga memiliki emisi maksimum yang lebih besar (490 nm), apabila dibandingkan dengan emisi maksimum Hoechst 33258 dan Hoechst 33342 (461 nm) (Bucevičius *et al.*, 2018).

2.11 Hipotesis Penelitian

Diduga ekstrak fukoidan fraksi HCl dari *Sargassum filipendula* memiliki aktivitas antikanker dengan kemampuan sitotoksik serta melakukan induksi apoptosis sehingga memengaruhi pertumbuhan sel MCF-7.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 4 bulan yaitu Februari-Mei 2021.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cryotube/ampul (Iwaki), waterbath (AquaBath), timbangan analitik (Sartorius BSA224S-CW), LAF (*Laminar Air Flow*) (Thermo Scientific HERASAFE KS), sentrifuge (LW Scientific), cawan petri 6 cm (Pyrex), *Tissue Culture Flask* (SPL), Oven (Memmert), membrane filter 0,22 um (Minisart), spuid syring 10 cc (Onemed), beaker glass (Iwaki), labu ukur 250 mL (Iwaki), *conical tube* 15 mL (SPL), *conical tube* 50 mL (Gamma Biotek), inkubator CO₂ (Thermo Scientific HERACELL 1501), *Haemocytometer* (Assistent Germany), Object glass (Sail Brand), botol schott 100 dan 250 mL (Duran), kulkas 4 °C dan 20 °C (Samsung), *deep freezer* -80 °C (By Bio), Microplate 96-well (Costar), Microplate 24-well (SPL), Microplate Reader (Spectrostar nano), Mikropipet 1000 µL, 200 µL dan 50 µL (VITLAB dan SOCOREX), *Blue And Yellow tip* (Gamma Biotek), Olympus Digital Camera, mikroskop *inverted* (Olympus IX71), Mikroskop *fluorescence* (Olympus IX71 ISO 200 70MS), autoclaf (TOMY), Magnetic stirrer (Cimarec), Vortex (Thermo Scientific 88880018), Mr. Frost (Nalgene), tabung falcon, rak tabung, *cover glass*, microtube, pinset, cover slip 24x60 cm.

3.2.2 Bahan

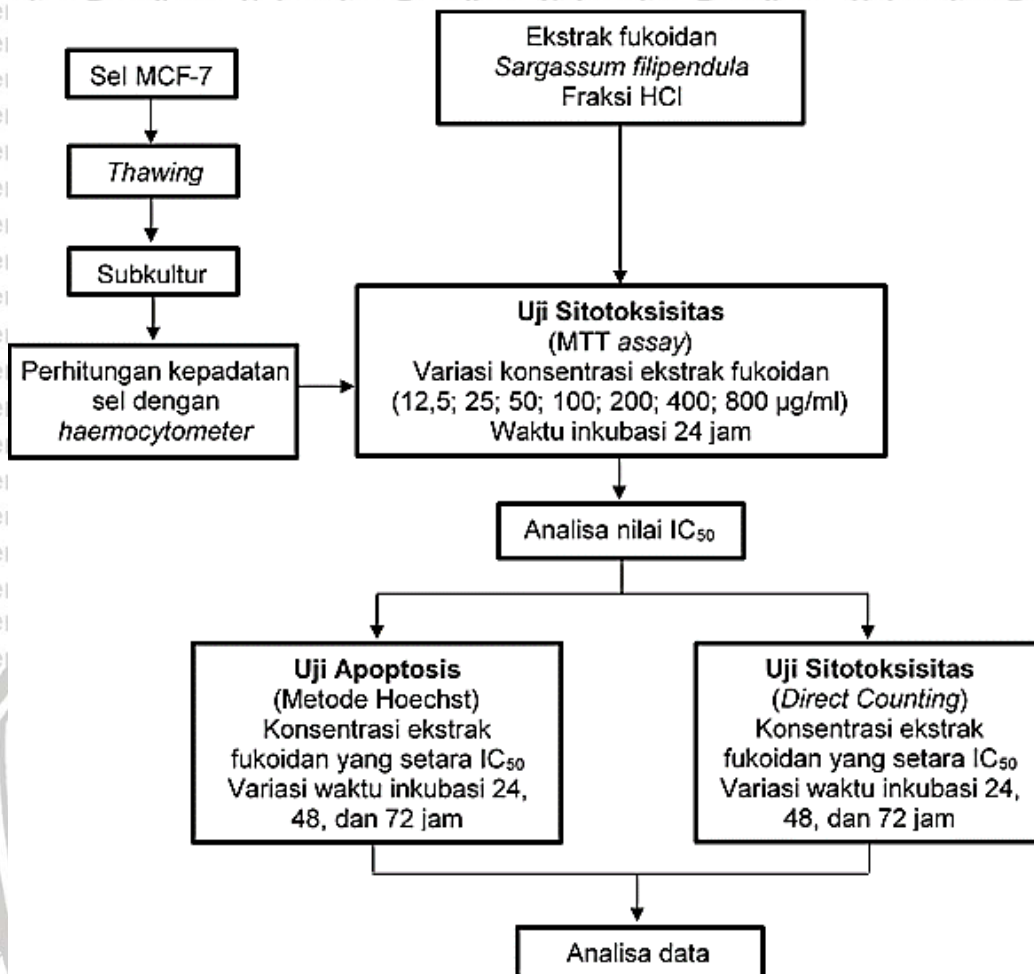
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Ekstrak fukoidan *Sargassum filipendula* fraksi HCl (proses ekstraksi pada **Lampiran 1**) dan *cell line* MCF-7 yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Sentra Ilmu Hayati (LSIH), standar fukoidan (*Fucus vesiculosus*), media kultur Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco) dan Eagle's Minimum Essential

Medium (EMEM), FBS SA (Fetal Bovine Serum South Africa South Africa) (Gibco) 10% (v/v), *penicillin-streptomycin* 1% (v/v), alkohol 70%, PBS (Phosphate Buffered Saline) (-Na), Trypsin-EDTA 5%, NaHCO₃, larutan MTT ([3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium bromide]), larutan DMSO (Merck), DPBS, larutan Hoechst (Thermo Scientific), *steril water* (Widatra Bhakti), trypan blue 0,4% (Thermo Scientific), thypol, DPX mounting, tissue, aluminium foil, alkohol 70%.

3.3 Metode

Pelaksanaan penelitian dilakukan dalam 2 tahapan utama, yaitu persiapan dan penumbuhan kultur *cell line* MCF-7 serta pengujian aktivitas senyawa antikanker fukoidan fraksi HCl *Sargassum filipendula* secara *in vitro* terhadap *cell line* MCF-7. Metode yang digunakan adalah deskriptif, eksploratif dan analisa statistika (RAL 1 faktor dengan 3 variasi waktu inkubasi). Kegiatan penelitian eksploratif dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, dimana kerangka penelitian disusun sebagai berikut:





Gambar 3.1. Kerangka Penelitian

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Persiapan dan Pemeliharaan Kultur MCF-7 (Modifikasi American Type Culture Collection, 2012)

Sel yang digunakan adalah sel MCF-7 koleksi LSIH UB. Diambil sel dalam ampul (*cryotube*) dari *cryogenic freezing* (suhu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) dan dicairkan dengan suhu kamar atau dalam *waterbath* $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hingga tepat mencair. Selanjutnya, disiapkan media kultur dalam *conical tube* steril berupa Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) yang mengandung Fetal Bovine Serum (FBS) 10% dan $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ *penicillin-streptomycin* untuk pertumbuhan sel. Suspensi sel yang sudah *thawing*, diambil dan dipindahkan ke dalam *conical tube* steril berisi media yang sudah dibuat. Kegiatan transfer kultur dilakukan di dalam LAF dengan peralatan disterilkan menggunakan alkohol 70%.

Langkah selanjutnya, *conical tube* ditutup rapat dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan, dibuang dan dilakukan resuspensi pelet terbentuk menggunakan 4 ml media kultur yang baru hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan pada 2 buah *tissue culture dish* (masing-masing sebanyak 1 mL). Sel diinkubasi dalam inkubator CO_2 pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan atmosfer CO_2 5%. Setelah 24 jam inkubasi, kondisi sel diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop (bentuk), namun secara visual apabila terjadi perubahan warna pada media merupakan kemungkinan terjadinya kontaminasi. Setelah itu, media yang sudah terdapat pada *tissue culture dish* dibuang perlahan menggunakan mikropipet dan ditambahkan 4 mL media kultur baru, lalu dihomogenkan dan kembali disimpan dalam inkubator CO_2 .

Apabila kondisi sel belum 80% sel monolayer konfluen. Media selanjutnya diganti dengan media baru, dengan mengeluarkannya secara perlahan menggunakan mikropipet. Sel kemudian dicuci sebanyak 2x menggunakan PBS berjumlah $1/2$ dari volume media awal (3 mL). Selanjutnya, sel ditambahkan media kultur baru sebanyak 5 mL dan dilakukan inkubasi dalam inkubator CO_2 .

3.4.2 Pemanenan dan Cryopreservation Sel Kultur MCF-7

Sel MCF-7 diambil dari inkubator CO_2 dan diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*. Sel MCF-7 dapat dipanen apabila didapatkan sebanyak 80% sel monolayer konfluen. Media selanjutnya diganti

dengan media baru, dengan mengeluarkannya secara perlahan menggunakan mikropipet. Sel kemudian dicuci sebanyak 2x menggunakan PBS berjumlah 1/2 dari volume media awal (3 mL). Selanjutnya, sel ditambahkan larutan trypsin EDTA 0,25% sebanyak 2 mL untuk melepas sel dari *tissue culture dish* dan dilakukan inkubasi selama 2 menit dalam inkubator CO₂ suhu 37 °C. Media kultur baru ditambahkan ke dalam *tissue culture dish* dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *tissue culture dish*. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru. Selanjutnya, *conical tube* ditutup rapat dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Tahapan berikut dipisahkan menjadi dua kondisi, yaitu:

3.4.2.1 Pemanenan Sel Kultur

Sel yang akan diberi perlakuan maka dilakukan pemanenan sel kultur. Supernatan yang dihasilkan dari sentrifugasi, dibuang, dan dilakukan resuspensi pelet menggunakan 4 mL media kultur yang baru hingga homogen. Kegiatan dilakukan secara steril di dalam LAF. Selanjutnya, diambil sebanyak 10 µl suspensi sel menggunakan mikropipet pada wadah steril, kemudian ditambahkan 10 µl larutan *trypan blue* 0,5%. Dihomogenkan suspensi larutan yang terbentuk dan sesegera mungkin (±2 menit) diambil larutan sampel kemudian dihitung sel yang hidup menggunakan *haemocytometer* dengan bantuan mikroskop *inverted*. Selanjutnya, dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan. Jumlah sel dihitung dengan cara:

$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik}}{4} \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

3.4.2.2 Cryopreservation Sel Kultur

Apabila sel tidak digunakan saat kondisi sel sudah 80% konfluen, maka sel dapat dilakukan penyimpanan suhu dingin sebagai persediaan yang dapat digunakan dikemudian waktu. Supernatan yang dihasilkan dari sentrifugasi, dibuang dan dilakukan resuspensi pelet menggunakan 4 mL media pembekuan hingga homogen. Media pembekuan terdiri dari larutan DMSO 10%, FBS 20% dan Media Kultur (RPMI) Lengkap. Suspensi sel diambil 1 mL menggunakan mikropipet kemudian dipindahkan kedalam ampul. Ampul kemudian disimpan kedalam *cryogenic freezing* (suhu -80 °C), yang terlebih dahulu disimpan dalam Mr. Frost (berisi isopropanol) guna

menurunkan suhu perlahan pada sel agar tidak rusak.

3.4.3 Preparasi Larutan Uji

Sampel fukoidan *S. filipendula* yang digunakan adalah hasil ekstraksi menggunakan fraksi atau pelarut HCl dimana proses ekstraksi dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Selanjutnya, ditimbang sampel fukoidan sebanyak 10 mg dan dipindahkan ke dalam *conical tube*. Dilarutkan dalam *sterile water* 5 mL sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 2000 µg/ml. Larutan induk selanjutnya diencerkan dengan pengenceran bertingkat dalam media kultur sehingga diperoleh konsentrasi untuk pengujian yaitu 12,5 µg/ml; 25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml; 200 µg/ml; 400 µg/ml; dan 800 µg/ml. Perhitungan pengenceran dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Kegiatan dilakukan secara steril di dalam LAF.

3.4.4 Uji Aktivitas Sitotoksitas dengan Metode MTT Assay (Modifikasi Haryanti & Widiyastuti, 2017)

Aktivitas sitotoksik antikanker dapat diuji menggunakan metode MTT Assay. Metode ini berperan menguji aktivitas sel dan kerusakan sel, adanya sel aktif dapat melakukan *bioreduction* garam tetrazolium menjadi garam formazan, dan dapat diamati melalui perubahan warna. Sel MCF-7 ditanam pada *microplate* 96-well dengan media RPMI sebanyak 100 µL/sumuran dimana berisi 1×10^4 sel/well. Setiap perlakuan dilakukan resuspensi agar sel tetap homogen. Sel diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂. Selanjutnya, setiap sel dicuci menggunakan 100 µL/well PBS sebanyak 1x. Sel kemudian dilakukan pergantian media dengan pemberian perlakuan berupa penambahan sampel uji dalam media kultur. Konsentrasi sampel uji fukoidan ditambahkan dengan variasi 12,5 µg/ml; 25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml; 200 µg/ml; 400 µg/ml; dan 800 µg/ml. Dibuat kontrol negatif yaitu kontrol sel (sel tanpa pemberian sampel), kontrol pelarut (larutan sampel tanpa sel), kontrol media sebagai pembanding. Denah *well plate* dapat dilihat pada **Lampiran 3a**.

Langkah selanjutnya yaitu larutan perlakuan ditambahkan sebanyak 100 µL/well dengan masing-masing perlakuan dibuat sebanyak 5 sumuran (sebagai ulangan). Sel dilakukan inkubasi dengan suhu 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak fukoidan

dibuang kemudian sel dicuci dengan 100 μL /well PBS (Phosphate Buffered Saline) sebanyak 2 kali. Pembuangan larutan dilakukan dengan membalikkan *well plate* diatas tissue kering secara cepat namun hati-hati. Selanjutnya, pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100 μL reagen MTT. Sel diinkubasi kembali selama 2-4 jam dalam inkubator CO_2 5% suhu 37°C . Adanya sel hidup akan terjadi perubahan warna menjadi ungu. Reaksi MTT selanjutnya dihentikan dengan pemberian DMSO sebanyak 100 μL . Selanjutnya dilakukan shaker *well plate* selama 5 menit sebelum dilakukan pembacaan. Serapan kristal formazan dideteksi menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai IC_{50} pada **Metode 3.5.1**.

3.4.5 Uji Aktivitas Sitotoksitas dengan Menggunakan Metode *Direct Counting*

Aktivitas sitotoksik antikanker dapat diuji menggunakan metode perhitungan langsung. Pengujian ini dilakukan dengan variasi waktu inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Sel MCF-7 (1×10^4 sel/well) didistribusikan ke dalam 96-*well plate* dan dilakukan inkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, dilakukan pergantian media sel dengan melakukan pencucian dengan PBS 100 μl sebanyak 1x. Selanjutnya, ditambahkan 100 μl /well senyawa uji (fukoidan) yang setara dengan nilai IC_{50} . Dibuat kontrol negatif yaitu kontrol sel (sel tanpa pemberian sampel). Denah *well plate* dapat dilihat pada **Lampiran 3b**. *Well plate* kemudian diinkubasi dalam inkubator CO_2 suhu 37°C atmosfer 5% sesuai dengan variasi inkubasi yang digunakan, yaitu selama 24, 36 dan 48 jam. Setelah diinkubasi, sel selanjutnya dilakukan pemanenan. Sel kemudian dicuci sebanyak 2x menggunakan PBS berjumlah 1/2 dari volume media awal (3 mL).

Langkah selanjutnya, sel ditambahkan larutan trypsin EDTA 0,25% 2 mL untuk melepas sel dari *well plate* dan dilakukan inkubasi selama 2 menit dalam inkubator CO_2 suhu 37°C . Media kultur baru ditambahkan ke dalam *well plate*, dan sel resuspensi hingga terlepas semua dari *well plate*. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru. Selanjutnya, *conical tube* ditutup rapat dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan, dibuang, dan dilakukan resuspensi pelet terbentuk menggunakan 4 mL media kultur yang baru hingga

homogen. Diambil sebanyak 10 µl suspensi sel menggunakan mikropipet pada wadah steril, kemudian ditambahkan 10 µl larutan *trypan blue* 0,5%. Dihomogenkan suspensi dan sesegera mungkin (± 2 menit) diambil seluruh larutan sampel, dan dihitung sel yang hidup menggunakan *haemocytometer* dengan bantuan mikroskop *inverted*.

3.4.6 Uji Aktivitas Apoptosis dengan Metode Hoechst (Crowley *et al.*, 2016)

Apoptosis dideteksi menggunakan metode pewarnaan Hoechst. Sel MCF-7 ditanam ke dalam 24-well plate sebanyak 3×10^4 sel/well dalam media RPMI, yang mana setiap well sudah dimasukkan cover slip, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Setelah diinkubasi, sel dalam *well plate* di cuci menggunakan PBS 300 µl/well. Selanjutnya, ditambahkan 300 µl senyawa uji (fukoidan) yang setara dengan nilai IC_{50} . Dibuat kontrol negatif yaitu kontrol sel (sel tanpa pemberian sampel). Denah *well plate* dapat dilihat pada **Lampiran 3c**. *Well plate* kemudian diinkubasi dalam inkubator CO_2 suhu $37^\circ C$ atmosfer 5% sesuai dengan variasi inkubasi yang digunakan, yaitu selama 24, 48 dan 72 jam. Pada akhir inkubasi dilakukan fiksasi sel guna menjaga sel agar tetap mempertahankan keadaan "*life-like state*". Proses fiksasi dilakukan dengan membuang media kultur terlebih dahulu dan diberi perlakuan berupa penambahan larutan PFA 4% sebanyak 300 µl selama 10 menit.

Langkah selanjutnya, PFA 4% dibuang dan dicuci kembali dengan 300 µl PBS dingin selama 5 menit sebanyak 2 kali. Setiap well dicuci kembali menggunakan 300 µl DPBS. Setelah pencucian dilakukan proses pewarnaan menggunakan 200 µl larutan Hoechst 1 µg/mL dalam ruangan gelap selama 5 menit. Setelah inkubasi, setiap well kembali dicuci menggunakan 200 µl DPBS. Selanjutnya, objek *cover glass* disiapkan dan diberi label nama. Coverslip diambil dari *well plate* dan diberi larutan *mounting* sebanyak 1 tetes diatas objek glass. Cover slip diletakkan dengan posisi terbalik diatas *cover glass*. Coverslip diatas *cover glass* dilakukan pengeringan selama semalam pada suhu ruang untuk memastikan DPX mounting sudah kering, dan dilakukan pembacaan pada akhir menggunakan mikroskop *fluorescence* olympus dengan panjang gelombang 460 nm.

3.5 Pengamatan dan Analisis Data

3.5.1 Aktivitas Sitotoksitas dengan Metode MTT Assay

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran kemudian dikonversi ke dalam persen viabilitas. Persentase viabilitas sel dapat dihitung menggunakan rumus:

Apabila absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel maka hitung persentase sel hidup dengan rumus berikut:

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

Apabila absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dengan kontrol sel maka hitung persentase sel hidup dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Dari data yang diperoleh dari perhitungan, nilai IC_{50} dapat diketahui dengan melakukan perhitungan menggunakan kalkulator IC_{50} dari AAT Bioquest® (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator/>). Pada kalkulator ini akan muncul persamaan setelah memasukkan viabilitas terhitung dan nilai $y = 50$. Selanjutnya, persamaan kalkulator akan memunculkan nilai x sebagai hasil antilog konsentrasi tersebut, dan diperoleh nilai IC_{50} . Grafik yang tercantum dibuat menggunakan aplikasi GraphPad Prism 9 guna melihat alur penghambatan pertumbuhan sel setiap konsentrasi yang diberikan.

3.5.2 Aktivitas Sitotoksitas dengan Metode *Direct Counting*

Jumlah sel hidup dari masing-masing sumuran (perlakuan dan kontrol) dalam plate dihitung langsung di bawah *inverted microscope*. Jumlah sel yang hidup setelah perlakuan pada masing-masing perlakuan dihitung untuk menentukan jumlah sel hidup dengan rumus:

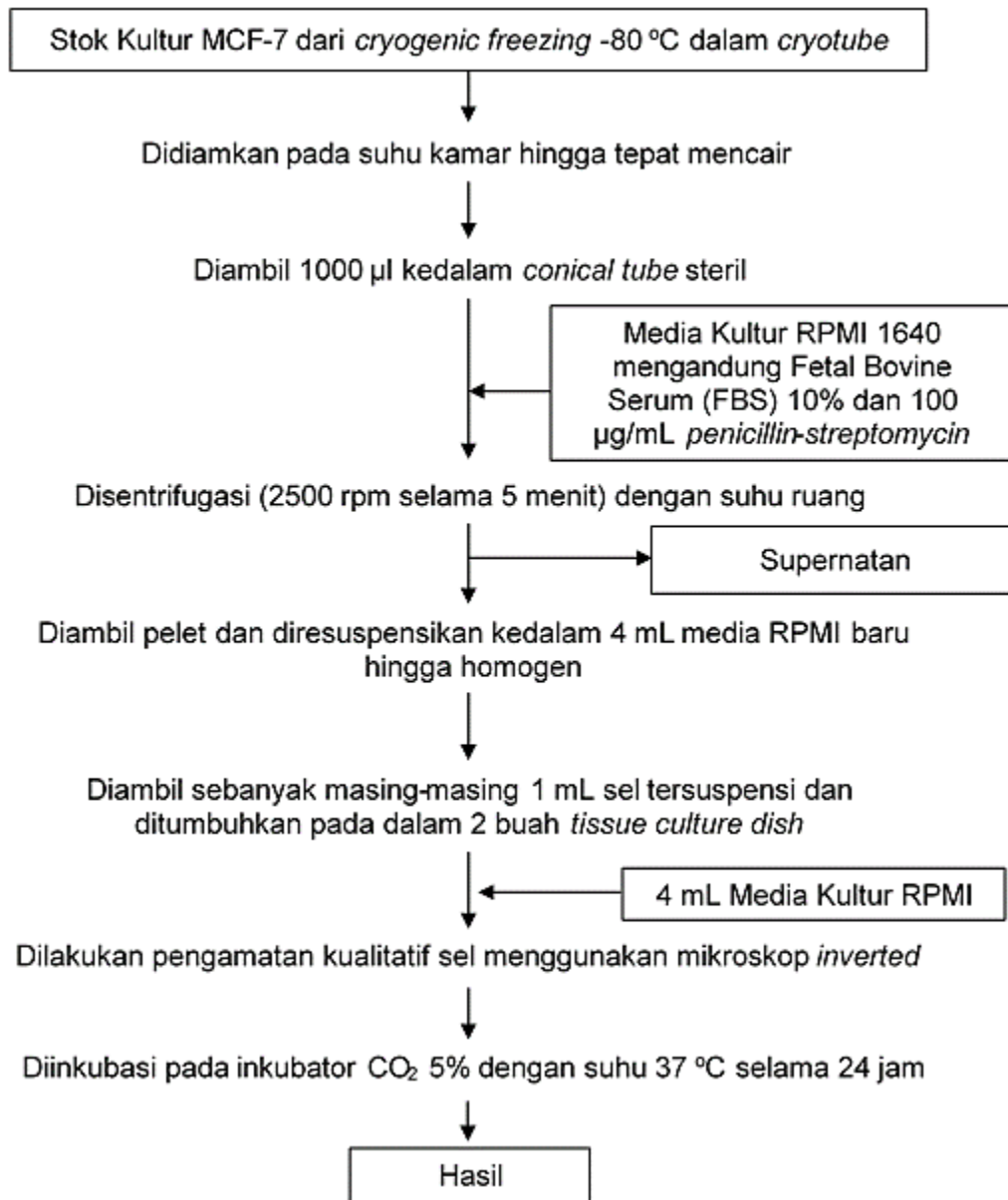
$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik}}{4} \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

Analisis varian (ANOVA) satu arah digunakan untuk mengetahui perbedaan bermakna nilai IC_{50} terhadap ketiga variasi perlakuan waktu yang digunakan. Bila menunjukkan perbedaan bermakna, dilanjutkan dengan uji Tukey dengan tingkat kepercayaan 95%. Grafik yang tercantum dibuat menggunakan aplikasi GraphPad Prism 9 guna melihat alur penghambatan pertumbuhan sel setiap waktu inkubasi.



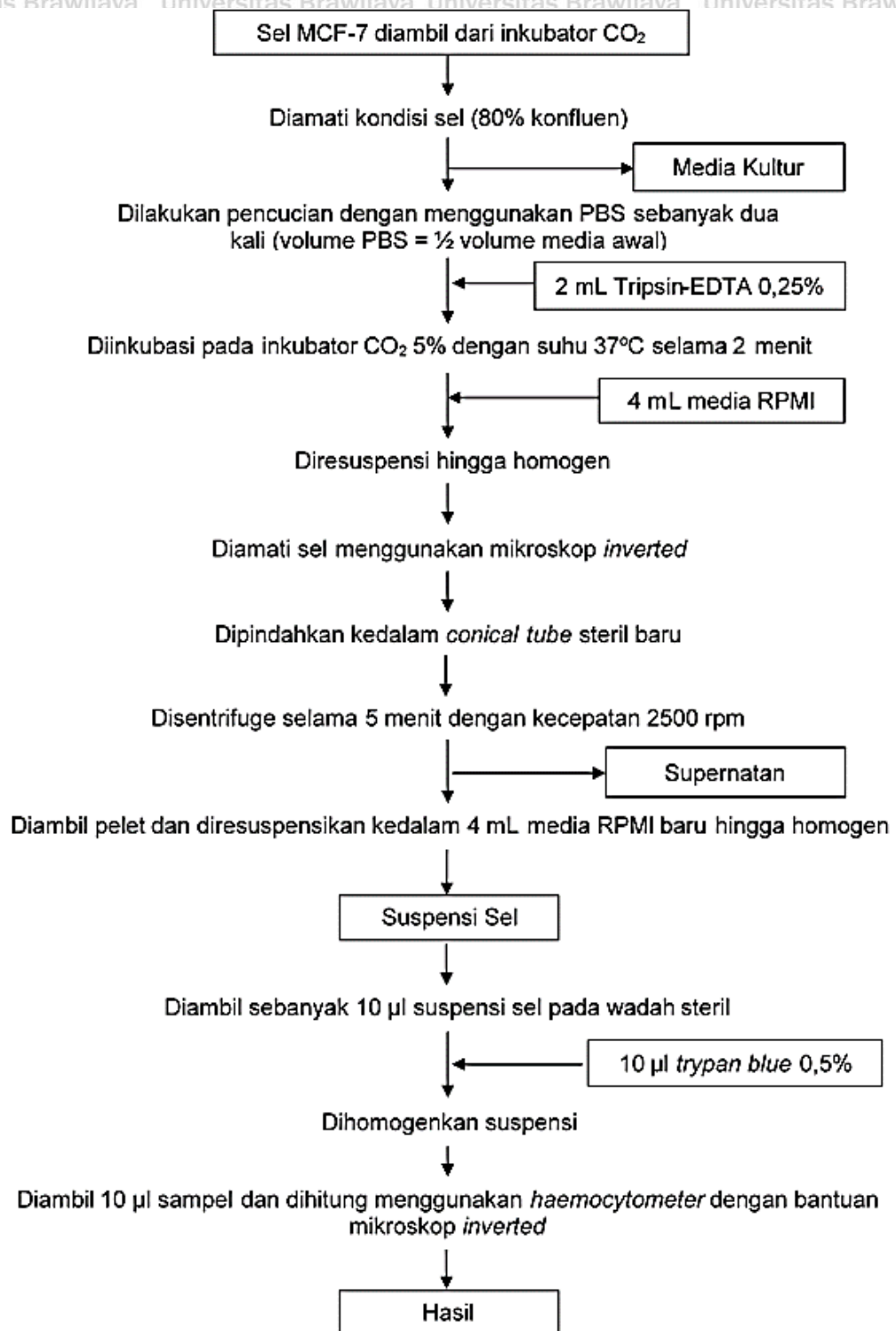
3.6 Diagram Alir

3.6.1 Persiapan dan Pemeliharaan Kultur MCF-7



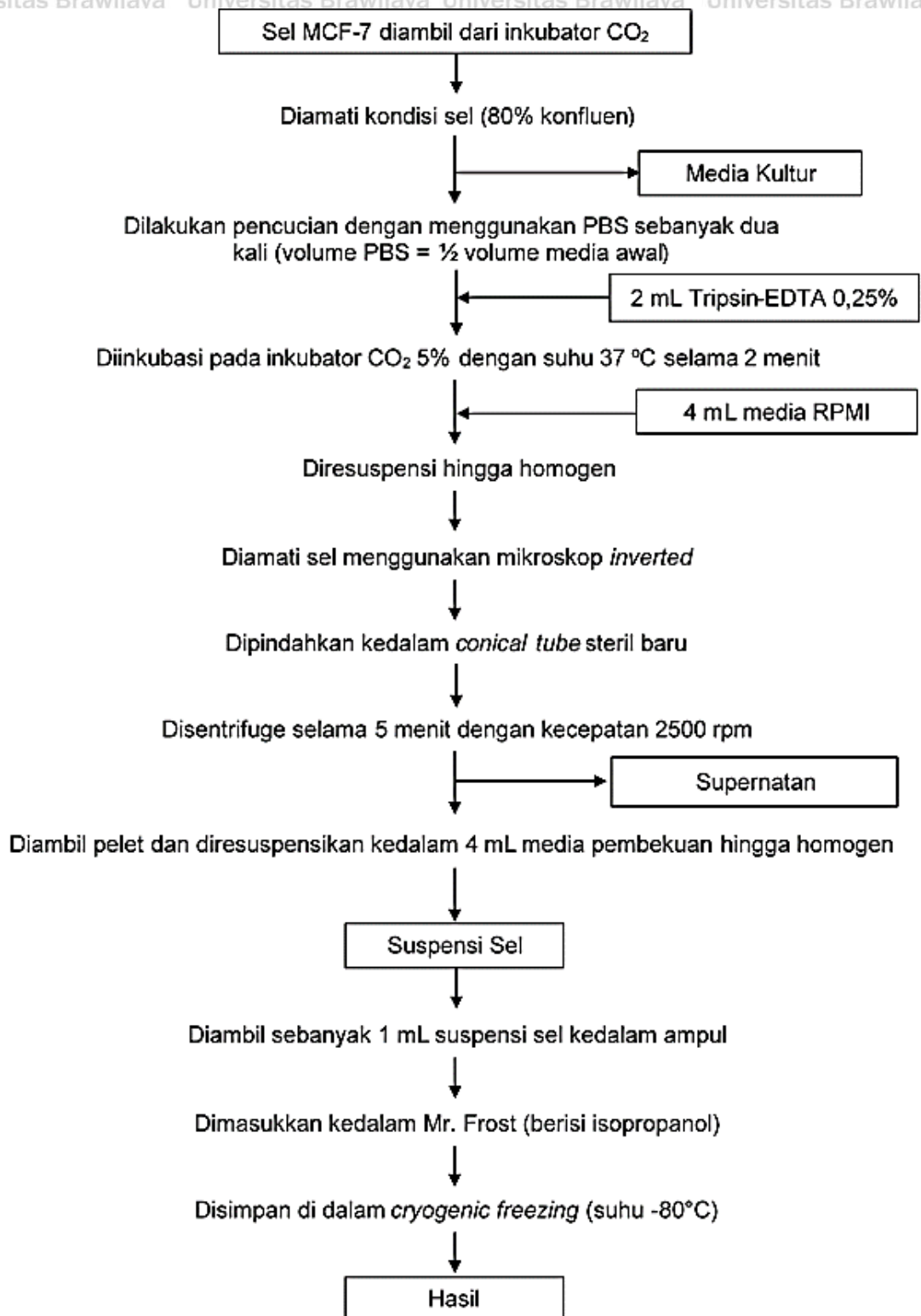
Gambar 3.2. Persiapan dan Pemeliharaan Kultur MCF-7

3.6.2 Pemanenan Kultur MCF-7



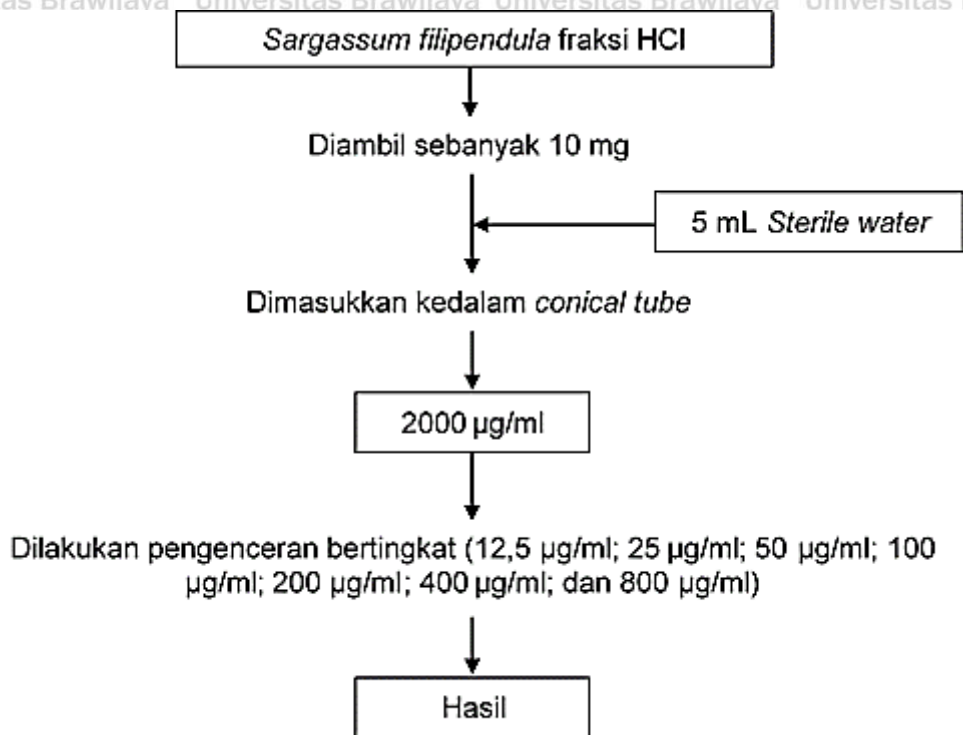
Gambar 3.3. Pemanenan Kultur MCF-7

3.6.3 Cryopreservation Sel Kultur



Gambar 3.4. Cryopreservation Sel Kultur

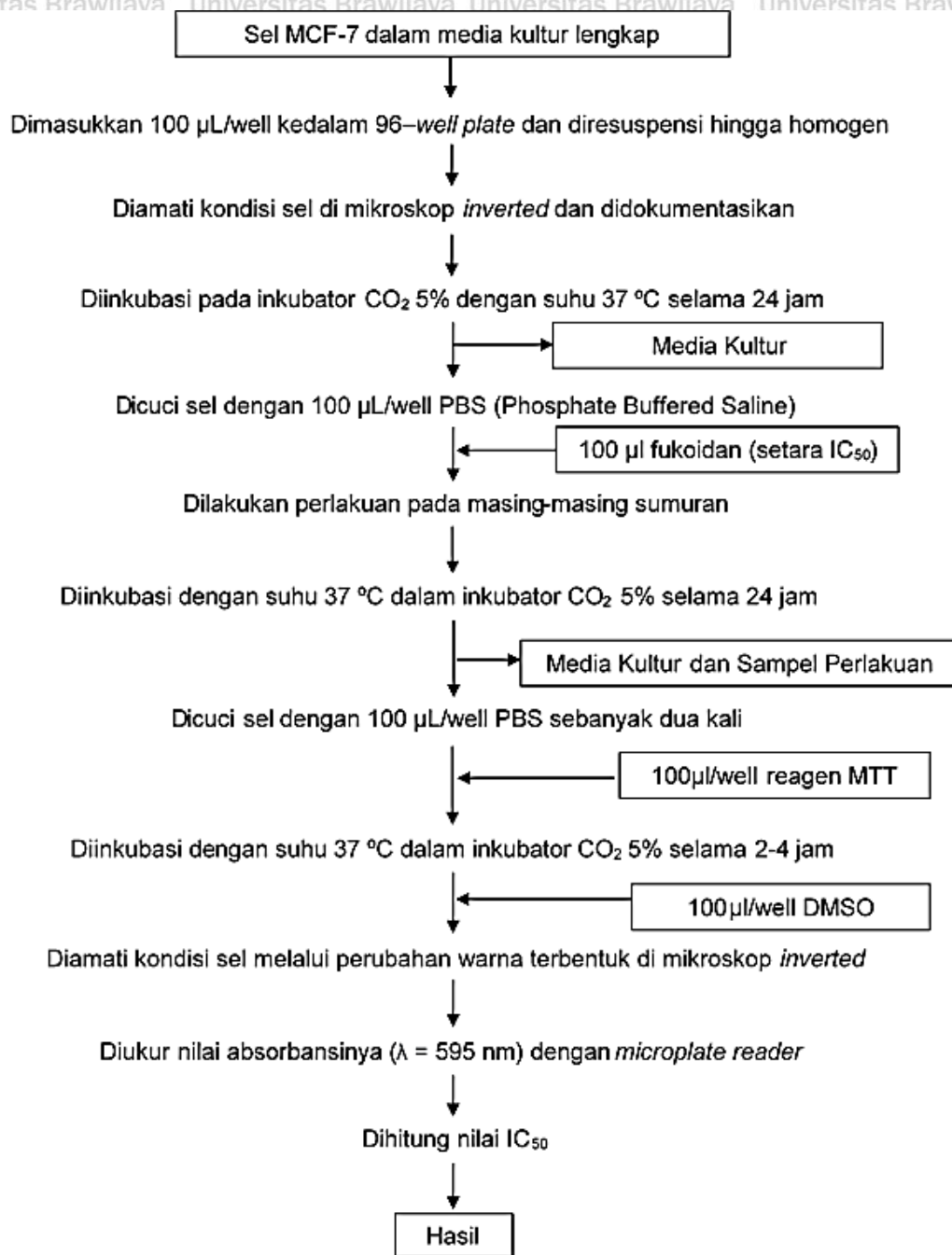
3.6.4 Preparasi Larutan Uji



Gambar 3.5. Preparasi Larutan Uji

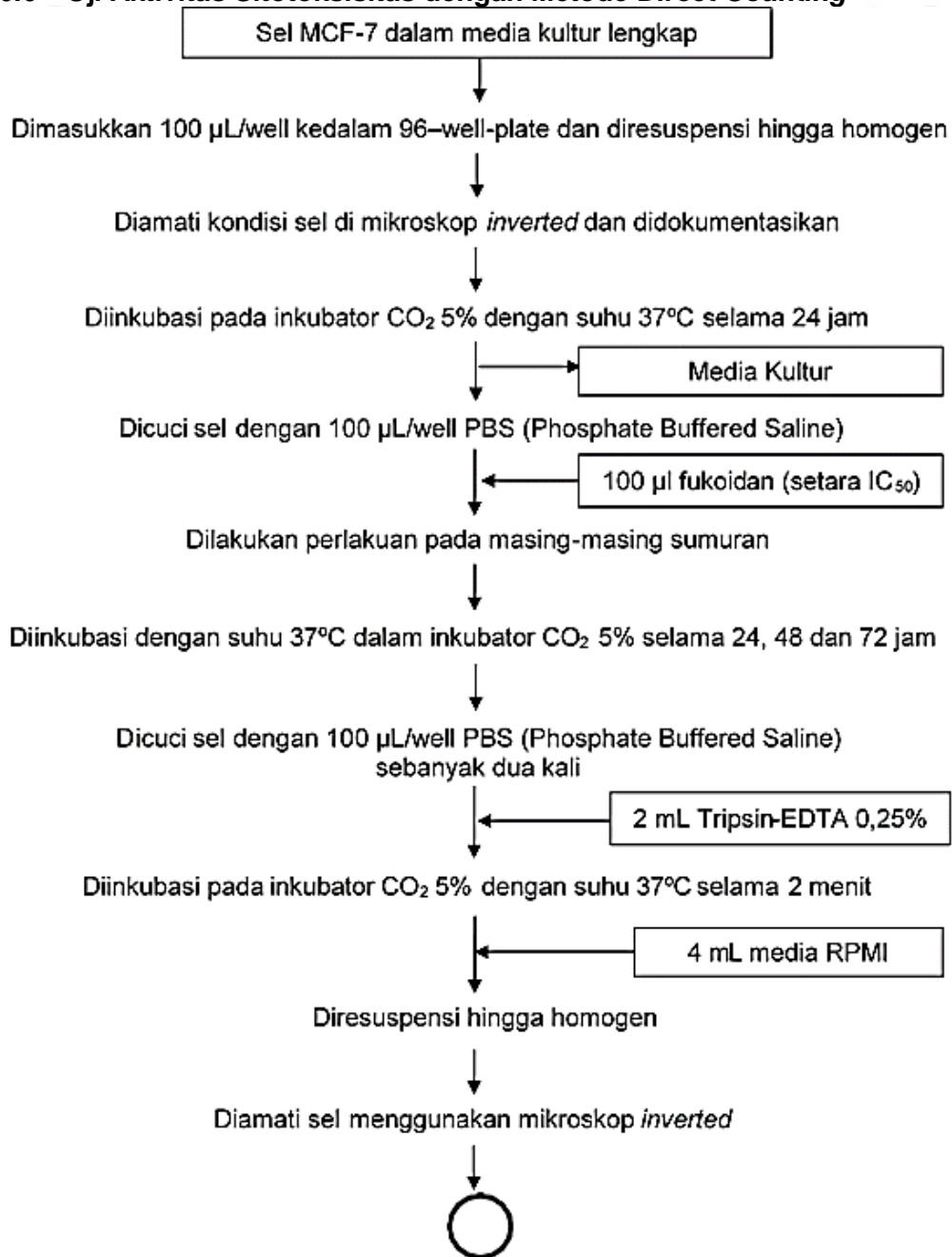


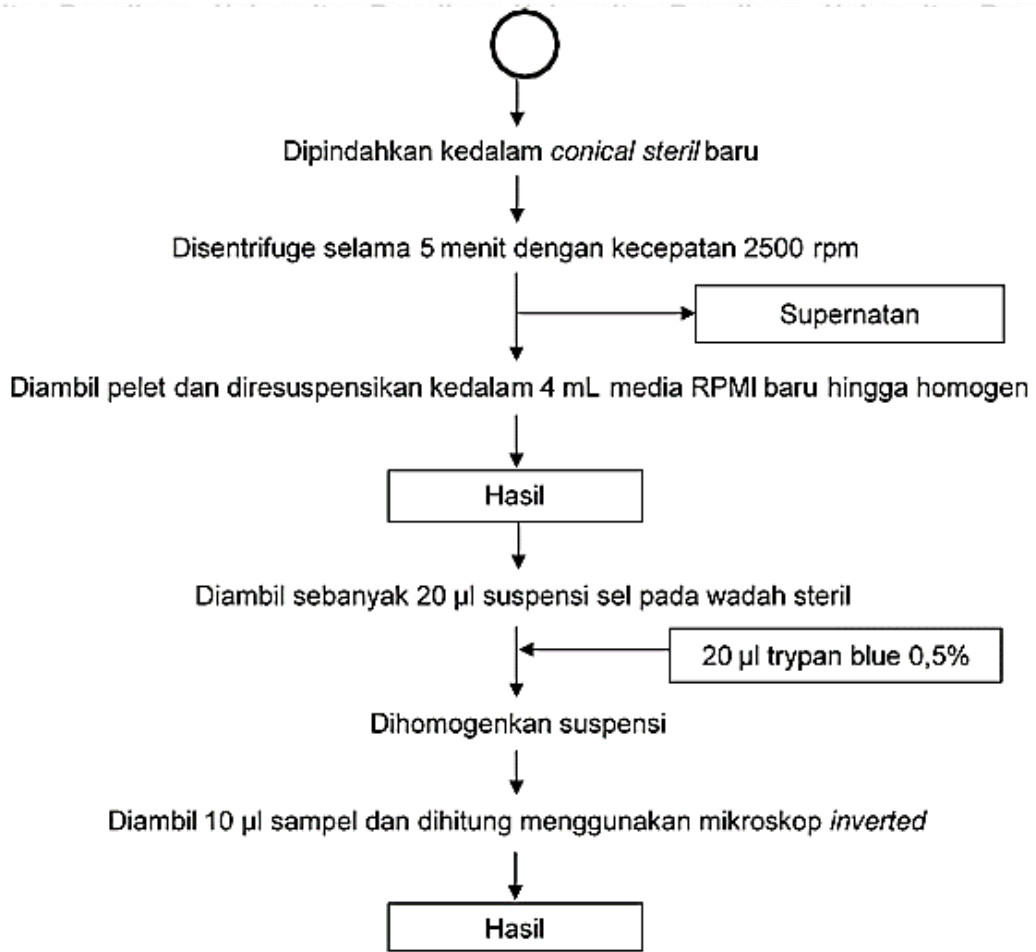
3.6.5 Uji Aktivitas Sitotoksitas dengan Metode MTT



Gambar 3.6. Uji Aktivitas Sitotoksitas dengan Metode MTT

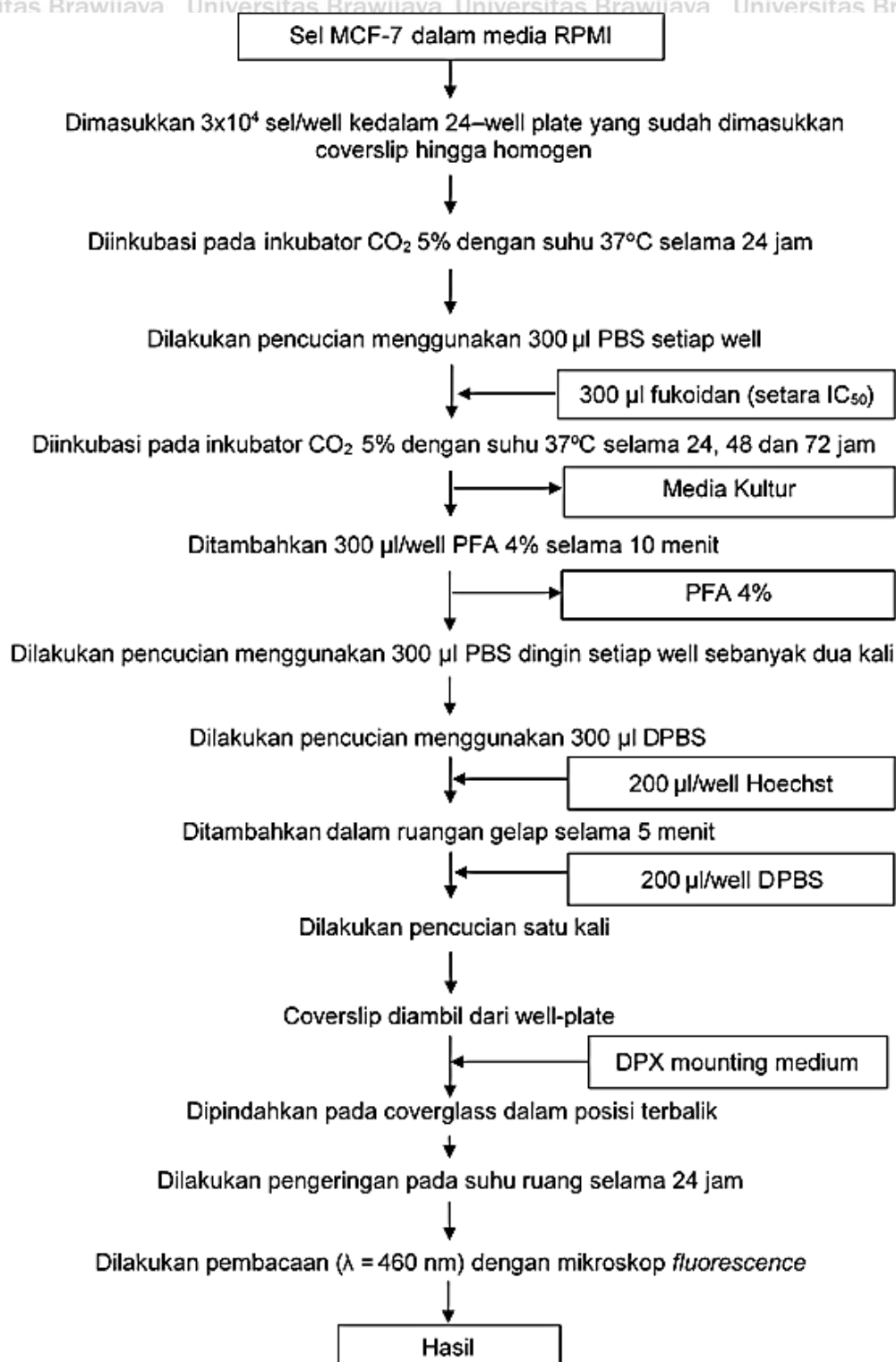
3.6.6 Uji Aktivitas Sitotoksitas dengan Metode *Direct Counting*





Gambar 3.7. Uji Aktivitas Sitotoksitas dengan Metode *Direct Counting*

3.6.7 Uji Aktivitas Apoptosis Sel dengan Metode Hoechst



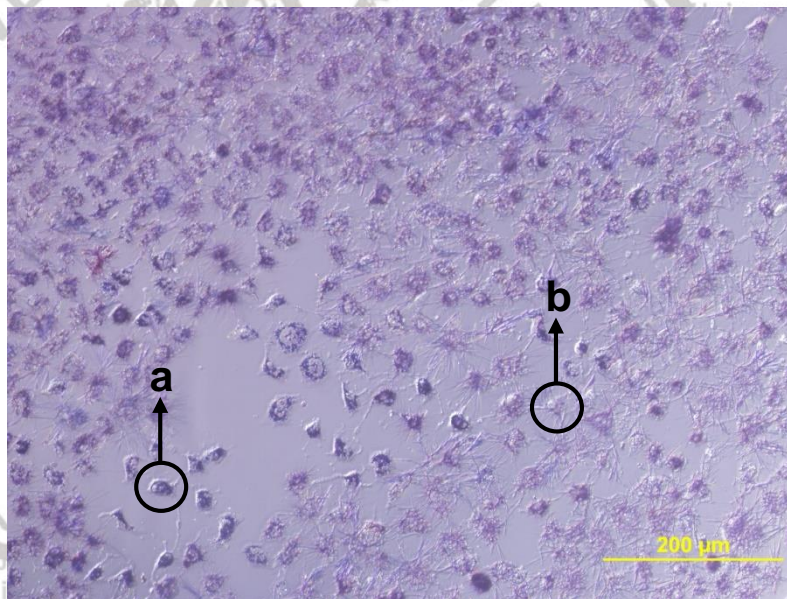
Gambar 3.8. Uji Aktivitas Apoptosis dengan Metode Hoechst

BAB IV

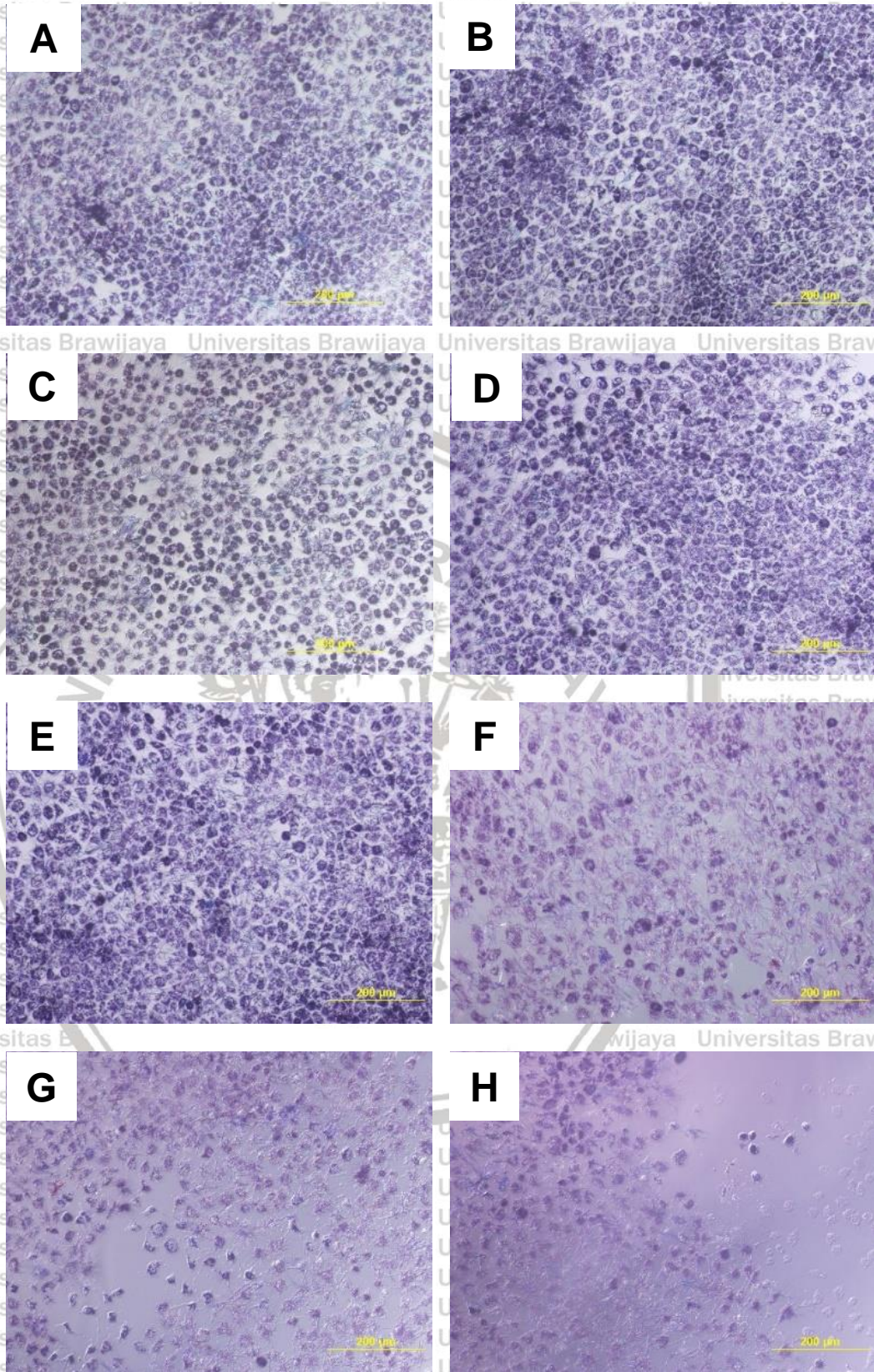
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisa Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT Assay

Uji aktivitas sitotoksik ini dilakukan untuk mengetahui potensi penghambatan pertumbuhan sel akibat pemberian senyawa sampel fukoidan fraksi HCl dari *S. filipendula*. Pengamatan menggunakan mikroskop *inverted* menunjukkan bahwa adanya perbedaan warna sel hidup dan sel mati, dimana sel hidup (**Gambar 4.1a**) akan membentuk kristal formazan berwarna ungu karena kemampuannya mereduksi MTT reagen. Hal berbeda diamati pada keberadaan sel mati (**Gambar 4.1b**) yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna, karena sel mati tidak mampu menghasilkan enzim yang dapat mereduksi MTT reagen.



Gambar 4.1. Bentuk kompleks garam formazan sel MCF-7 pada perlakuan 400 µg/ml selama 24 jam: (a) Sel yang hidup akan terbentuk garam formazan (b) sel yang mati tidak terbentuk garam formazan



Gambar 4.2. Gambaran mikroskopik sel MCF-setelah pemberian larutan MTT pada setiap perlakuan: (A) Kontrol Sel, (B) 12,5 µg/ml, (C) 25 µg/ml, (D) 50 µg/ml, (E) 100 µg/ml, (F) 200 µg/ml, (G) 400 µg/ml, (H) 800 µg/ml (Perbesaran 100x)

Pada pengujian ini digunakan variasi konsentrasi sampel fukoidan yang diberikan pada sel, yaitu 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 µg/ml, yang ditreatment selama 24 jam. Dari hasil pengamatan visual maupun data kuantitas, terlihat bahwa intensitas warna ungu yang terbentuk tersebut memiliki kolerasi langsung dengan keberadaan sel yang hidup. Hal ini dapat diamati pada **Gambar 4.2** dan persentase nilai rerata viabilitas sel pada **Tabel 4.1**, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan, maka intensitas warna ungu dan rerata viabilitas sel yang dihasilkan akan semakin menurun.

Dari data dilihat bahwa persentase rerata viabilitas sel tertinggi terdapat pada kadar ekstrak fukoidan 12,5 µg/ml yaitu sebesar 94,872 ±4,269% dengan warna ungu yang nampak hampir sama dengan warna ungu pekat pada kontrol atau sel tanpa perlakuan. Seiring bertambahnya konsentrasi fukoidan yang diberikan, intensitas warna ungu terbentuk akan semakin memudar, yang mengindikasikan semakin sedikit kristal formazan yang terbentuk. Persentase rerata viabilitas sel terendah terletak pada kadar 800 µg/ml yaitu mencapai 29,622 ±1,94% dengan warna ungu yang terbentuk hampir hilang. Hal ini menunjukkan bahwa adanya variasi konsentrasi ekstrak fukoidan memberikan dampak penghambatan pertumbuhan sel yang berbeda pada setiap konsentrasi.

Tabel 4.1. Data perlakuan fukoidan terhadap viabilitas sel MCF-7

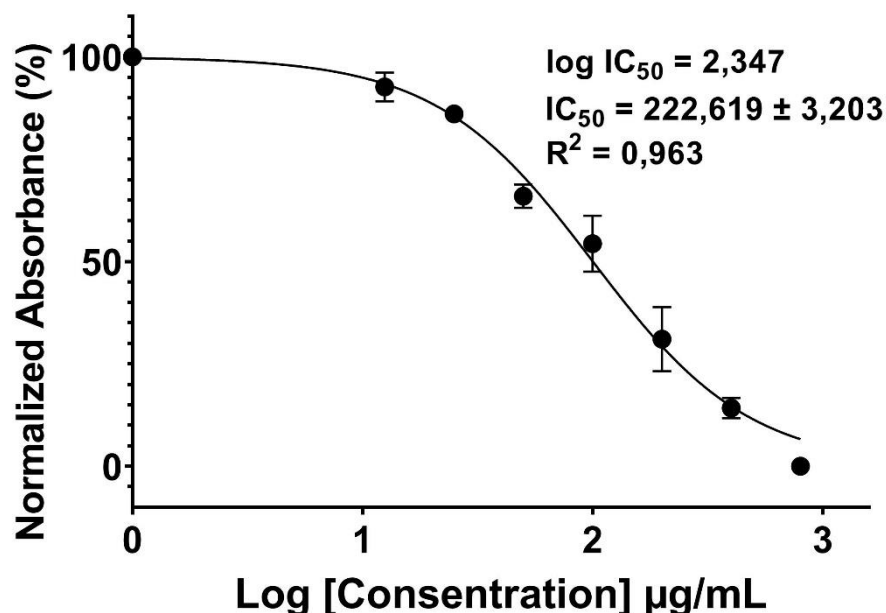
Konsentrasi Sampel Uji (µg/ml)	Antilog Konsentrasi	Rerata Viabilitas Sel (%)*
12,5	1,096	94,872 ±4,269
25	1,398	91,632 ±1,657
50	1,699	76,038 ±3,487
100	2	67,882 ±8,322
200	2,301	51,455 ±9,504
400	2,602	39,643 ±3,009
800	2,903	29,622 ±1,940

Keterangan: *) Hasil nilai viabilitas sel merupakan rerata dari 3 ulangan ± standar deviasi

Nilai absorbansi yang didapatkan dari hasil pembacaan menggunakan mikroskop *inverted*, selanjutnya dihitung untuk mendapatkan nilai viabilitas sel hidup (**Lampiran 4**). Berdasarkan persentase nilai viabilitas sel hidup pada **Tabel 4.1**, dibuat kurva viabilitas sel (**Gambar 4.3**) menggunakan GraphPad Prism 9 dengan sumbu x sebagai log konsentrasi fukoidan yang digunakan

dan sumbu y sebagai nilai normalisasi viabilitas. Nilai normalisasi akan melihat penurunan viabilitas dari 100% populasi tanpa pemberian *treatment* hingga viabilitas terendah pada konsentrasi tertinggi (800 µg/mL). Selanjutnya, dihitung nilai IC₅₀ menggunakan *webtool IC₅₀ calculator* (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) yang dapat dilihat pada

Lampiran 5.



Gambar 4.3. Kurva Viabilitas Sel Hidup dan nilai IC₅₀ Fukoidan

Berdasarkan hasil perhitungan nilai IC₅₀, didapatkan bahwa ekstrak fukoidan *S. filipendula* memiliki kemampuan sebagai antikanker dengan melakukan induksi kematian sel. Tercatat bahwa pemberian ekstrak fukoidan dari *S. filipendula* sebanyak 222,619 ±3,203 µg/mL mampu membunuh 50% populasi sel kanker MCF-7 dengan waktu inkubasi selama 24 jam. Aktivitas sitotoksik ini berkorelasi dengan hasil mikroskopik pada **Gambar 4.2**, dimana pada konsentrasi 200 µg/mL, sel mati yang terlihat semakin banyak (ditunjukkan oleh warna sel bening dan rusak), dengan rerata sel mati yang didapatkan hampir mencapai 49%. Namun keberadaan sel hidup semakin sedikit, sehingga warna ungu yang dihasilkan semakin memudar.

Standar fukoidan dipakai sebagai pembanding dalam penelitian, yang berasal dari rumput laut yang sudah banyak dikomersialkan, yaitu *Fucus vesiculosus* dengan nilai IC₅₀ yaitu 229,087 ±7,586 µg/mL. Berdasarkan nilai

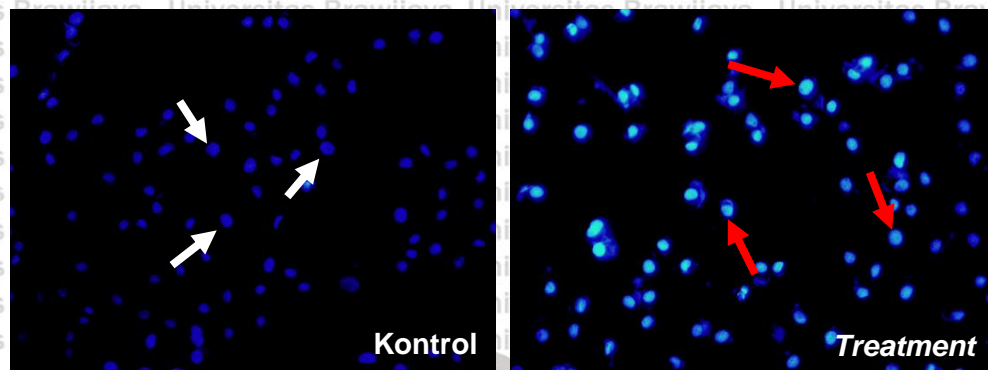
IC₅₀ yang didapatkan antara ekstrak fukoidan dari *S. filipendula* dan standar fukoidan, dapat dilihat bahwa keduanya memiliki kemampuan yang hampir sama dalam melakukan penghambatan terhadap sel, sehingga berpotensi sebagai agen kemopreventif maupun agen antikanker kategori sitotoksik moderat atau cukup aktif yang dapat dijadikan acuan pengembangan senyawa untuk menghambat pertumbuhan sel kanker (Hameed, 2012).

Kemampuan fukoidan dalam melakukan penghambatan pertumbuhan berbagai jenis sel kanker payudara tidak selalu sama. Pada berbagai penelitian, tercatat bahwa fukoidan dari *S. polycystum* memiliki kemampuan menghambat sel kanker MCF-7 dengan nilai IC₅₀ ≤ 100 µg/mL yaitu 93,62 µg/mL, dimana ekstrak ini sangat berpotensi sebagai agen kemopreventif yang sangat kuat (Priyan *et al.*, 2020). Sedangkan, pada jenis *cell line* yang sama, fukoidan dari *S. cristaefolium* hanya mampu membunuh 50% populasi pada kadar 461 µg/mL, yang masuk kedalam kategori sitotoksik lemah (Isnansetyo, 2017). Fukoidan yang didapatkan dari *Cladosiphon novae-caledoniae* Kylin tidak memiliki aktivitas sitotoksik yang baik pada *treatment cell line* MDA-MB-231 dengan kadar 820,00 µg/mL (Zhang *et al.*, 2011). Perbedaan nilai IC₅₀ sebagai nilai aktivitas sitotoksik yang dihasilkan, bergantung pada sumber fukoidan, proses ekstraksi yang menghasilkan perbedaan kemurnian, berat molekul, serta struktur fukoidan yang diekstraksi seperti kandungan dan posisi sulfat, kombinasi rasio residu monosakarida, jenis ikatan/komposisi residu gula dan lainnya (Mak *et al.*, 2014; Puspantari *et al.*, 2020; Sinurat & Kusumawati, 2017; van Weelden *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

4.2 Analisa Aktivitas Apoptosis dengan Metode Pewarnaan Hoechst

Deteksi apoptosis ekstrak fukoidan *S. filipendula* pada sel MCF-7 dapat dilakukan menggunakan pewarnaan dengan bantuan pewarna fluoresen Hoechst 33342. Hoechst merupakan senyawa yang dapat berikatan dengan inti DNA sel. Pengujian ini dilakukan pada sel tanpa *treatment* dan sel yang di-*treatment* dengan fukoidan sesuai dengan konsentrasi IC₅₀ dengan variasi waktu inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Pada **Gambar 4.4**, perlakuan dengan waktu inkubasi 24 jam menunjukkan sel tanpa *treatment* atau kontrol sel akan membentuk warna biru normal dan merata pada seluruh sel (panah berwarna putih). Sedangkan, sel dengan *treatment* akan membentuk warna biru yang

terpancar pada sel (panah berwarna merah). Warna biru yang memancar menunjukkan adanya aktivitas apoptosis oleh ekstrak fukoidan *S. filipendula* terhadap sel MCF-7.



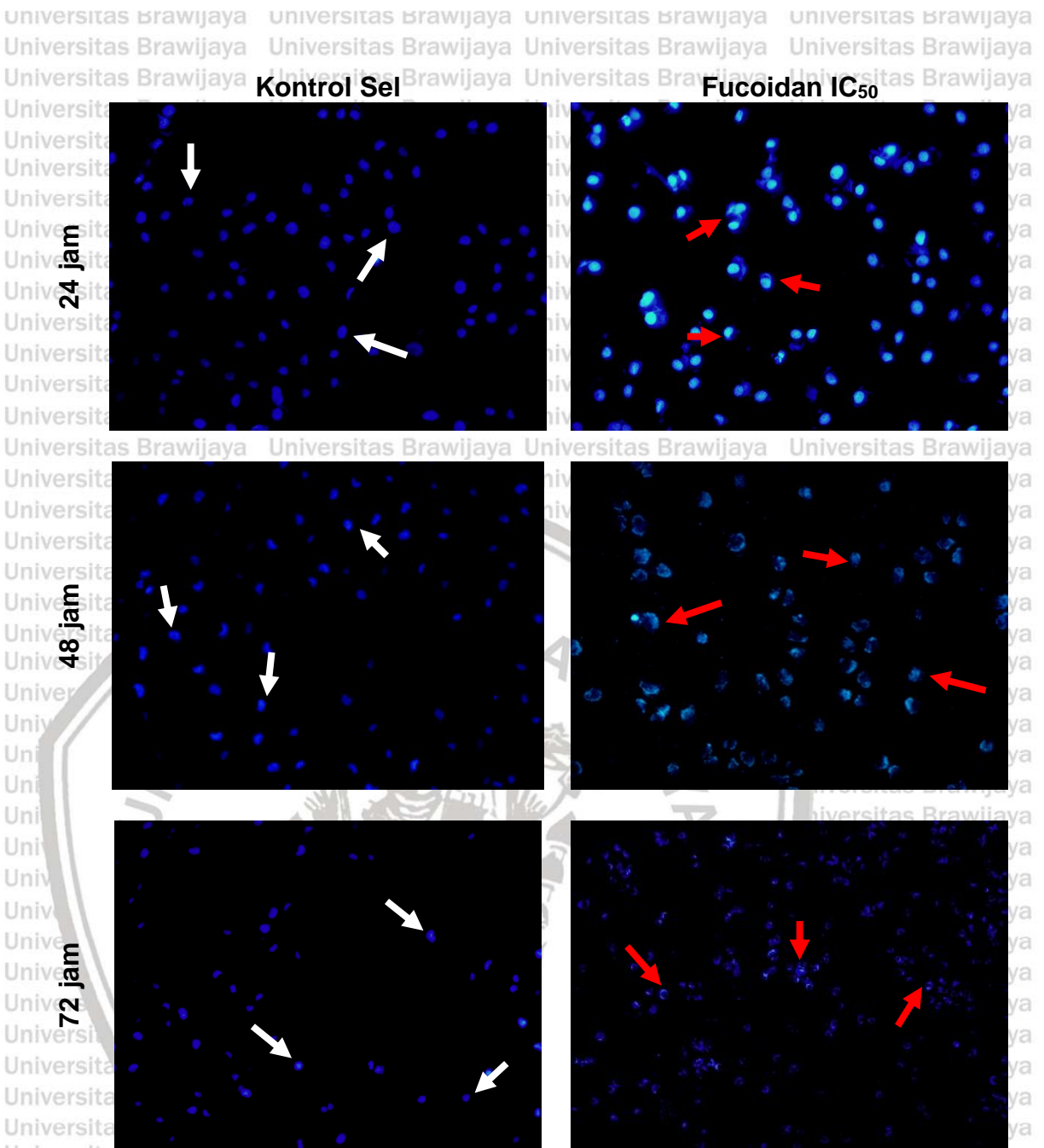
Gambar 4.4. Pewarnaan Hoechst 33342 sel MCF-7 selama 24 jam (Perbesaran 200x)

Hasil pewarnaan Hoechst 33342 oleh perlakuan konsentrasi IC_{50} dengan variasi waktu inkubasi disajikan pada **Gambar 4.5**. Sel tanpa *treatment* atau sel kontrol (panah warna putih) menunjukkan konsistensi dengan warna biru normal selama berbagai waktu inkubasi. Semakin lama waktu inkubasi, semakin mengecil pula ukuran sel, namun sel tetap mempertahankan bentuk simetris membran sel tetap bulat dan utuh (*intact*), dimana tidak mengalami disrupsi sehingga tidak terjadi kebocoran dari dalam membran keluar sel. Hal ini terjadi karena tidak terjadi penyusutan inti sel, dimana kromatin masih tersebar secara merata dan melakukan pengikatan dengan Hoechst dye dan tidak memberi warna biru berpendar (Somasundaram *et al.*, 2016; Widjajanto, 2012). Sedangkan, sel dengan perlakuan *treatment* pada waktu inkubasi 24, 48 dan 72 jam menunjukkan warna biru memancar dengan bentuk tidak simetris. Terlihat pada waktu inkubasi selama 24 jam, tampak inti sel terbentuk sangat kompak dan padat, sehingga sel menunjukkan cahaya fluoresensi biru yang kuat yang menunjukkan karakteristik apoptosis yang khas. Hal ini terjadi karena kromatin DNA yang sudah rusak dan 'berkumpul', melakukan pengikatan benza-midin pada Hoechst 33342 dengan pasangan basa A-T sel, sehingga menghasilkan cahaya fluoresen pada sel yang ter-apoptosis (Bucevičius *et al.*, 2018).

Berikutnya, hasil pewarnaan Hoechst menunjukkan pada waktu inkubasi ke 48 dan 72 jam, terlihat bahwa sel masih berpendar, namun terjadi adanya

perubahan bentuk yang sangat asimetris dan bagian inti yang menggelap. Hal tersebut terjadi karena adanya mekanisme apoptosis yang berperan dalam perubahan morfologi seluler, dimana ukuran sel menjadi tidak teratur karena kerusakan sitoskeletal dan *blebbing* membran plasma. Tahapan sederhana yang terjadi pada proses apoptosis yaitu penyusutan densitas sel, kondensasi dan fragmentasi kromatin sel serta fragmentasi inti sel, dilanjutkan terjadinya *blebbing* dan kebocoran pada membran. Hal tersebut yang menyebabkan semakin lama waktu inkubasi maka sel akan semakin rusak. Setelah terjadinya *blebbing*, pada keadaan *in vivo*, sel akan di makan oleh fagosit, namun pada keadaan *in vitro*, sel akan melakukan penyebaran hasil *blebbing* yaitu badan apoptotik seperti ditunjukkan pada sel dengan *treatment* fukoidan 72 jam (**Gambar 4.5**), serta mengalami nekrosis sekunder pada badan apoptotik terbentuk (Sari, 2019; Senthilkumar *et al.*, 2013).





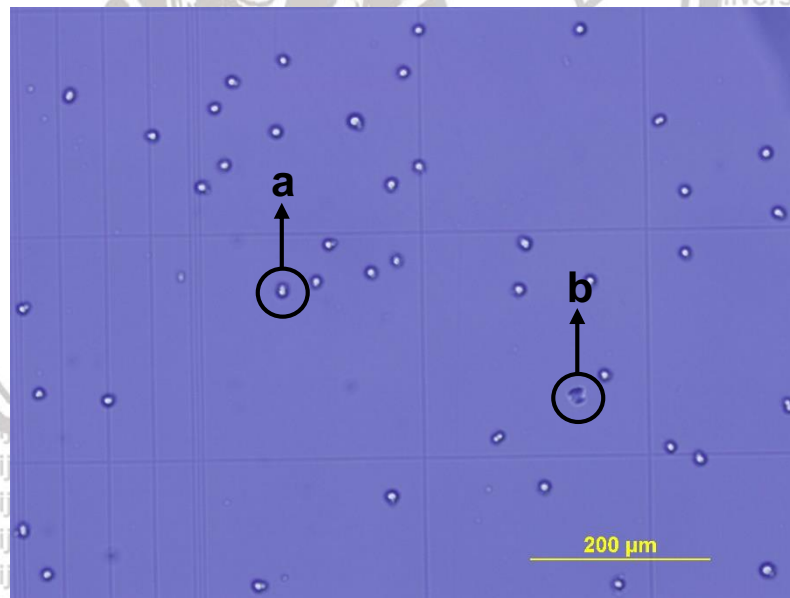
Gambar 4.5. Perbandingan Pewarnaan Hoechst 33342 sel MCF-7 pada setiap perlakuan (Perbesaran 200x)

Ekstrak fukoidan mampu melakukan induksi apoptosis sel MCF-7 dengan melakukan perubahan regulasi protein apoptosis dan anti-apoptosis seperti BCL-2 (gen anti-apoptosis), protein Caspase-3 (protein caspase eksekutor apoptosis), dan regulasi lain (fosforilasi JNK, p38, dan ERK1/2 kinase). Mekanisme apoptosis yang terjadi pada **Gambar 4.5**, bermula terjadi akibat induksi fukoidan yang mengaktifkan aktivitas pro-apoptosis protein BAX dan Gen BAK pada sel MCF-7. Kedua protein tersebut akan memicu terjadinya

MMP atau perubahan permeabilitas membrane mitokondria melalui hilangnya potensi membran mitokondria. Hal tersebut menyebabkan sel mengalami apoptosis melalui jalur *intrinsic* intraseluler, dimana gen pro-apoptosis berupa gen BAX dan BAK dapat lolos ke dalam sel dan melepaskan sinyal yang disebut sitokrom-c, ROS, serta AIF (faktor pemicu apoptosis) dari mitokondria ke sitosol. Sinyal-sinyal yang dihasilkan tersebut menyebabkan terjadinya aktivasi caspase *family* sebagai protein apoptosis dan menurunkan pertumbuhan sel kanker (Santhanam *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2011).

4.3 Analisa Aktivitas Sitotoksik dengan Metode *Direct Counting*

Uji aktivitas sitotoksik dapat dilakukan untuk mengetahui potensi penghambatan pertumbuhan sel atau viabilitas sel dan sebagai metode konfirmasi efek sitotoksik sampel. Pengujian tersebut dilakukan menggunakan perhitungan langsung atau metode *direct counting* dengan bantuan *haemocytometer* dibawah mikroskop. Penambahan *trypan blue* berperan sebagai pemberi warna untuk dapat mempermudah menghitung sel baik sel yang hidup maupun yang mati.



Gambar 4.6. Gambaran mikroskopik sel dalam *haemocytometer* (a) sel hidup dan (b) sel mati

Hasil pengamatan menggunakan mikroskop *inverted* pada Gambar 4.6, dilihat bahwa sel hidup ditandai dengan sel yang berbentuk bulat, memiliki dinding sel yang terlihat jelas, serta berwarna jernih dan bersinar dibawah

mikroskop. Sedangkan, sel yang mati akan ditandai dengan warna gelap tidak bercahaya serta berbentuk tidak beraturan. Hal tersebut disebabkan karena terjadinya penurunan integritas membran pada sel yang mati, sehingga pewarna *trypan blue* dapat terpenetrasi ke dalam sel, berikatan dan mewarnai sel, sedangkan sel yang hidup tidak berwarna dan bersinar cemerlang karena membran sel yang masih utuh (Ng & Schantz, 2010).

Tabel 4.2. Data hasil rata-rata jumlah sel hidup MCF-7 setelah pemberian ekstrak fukoidan konsentrasi IC₅₀ pada berbagai waktu inkubasi

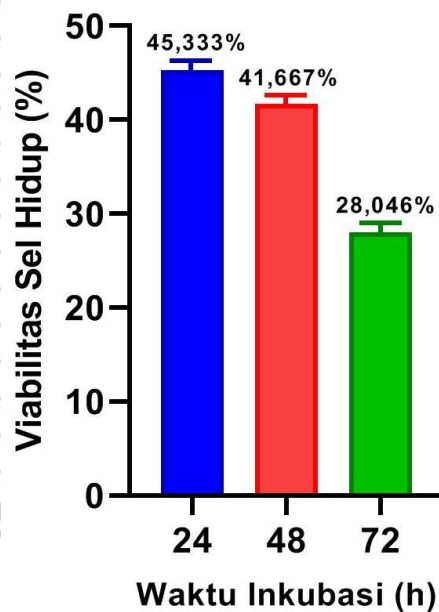
Waktu Inkubasi	Rerata Jumlah Sel Hidup (sel/mL) ¹	
	Kontrol Sel	Treatment
24 jam	62.500 ±23.849	28.333 ±6.292 ^b
48 jam	210.000 ±17.500	87.500 ±11.456 ^a
72 jam	362.500 ±25.000	101.667 ±16.266 ^a

Keterangan:

¹ Hasil jumlah sel hidup merupakan rerata dari 3 ulangan

Angka yang diikuti dengan huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata berdasarkan uji Tukey pada taraf 5% (p≤0,05)

Pengujian tersebut dilakukan dengan melakukan pemberian ekstrak fukoidan sesuai nilai IC₅₀, yaitu sebesar 222,619 ppm, terhadap pertumbuhan sel dengan perlakuan variasi waktu yaitu 24, 48 dan 72 jam. Proses pembacaan jumlah sel pada *haemocytometer* dilakukan sebanyak 3 kali guna mengurangi terjadinya eror dalam penilaian yang subjektivitas. Analisis sitotoksik dilakukan dengan menghitung persentase nilai viabilitas sel hidup dari jumlah sel terhitung yang dapat dilihat pada **Lampiran 6**. Dilihat dari jumlah sel hidup pada **Tabel 4.2**, tercatat rata-rata jumlah sel hidup pada sel dengan *treatment* dan tanpa *treatment* fukoidan memiliki perbedaan. Waktu inkubasi selama 24, 48 dan 72 jam secara berturut, menghasilkan rata-rata sel hidup tanpa *treatment* sebanyak 62.500, 210.000 dan 362.500 sel/mL, sedangkan rata-rata jumlah sel hidup dengan *treatment* sebanyak 28.333, 87.500 dan 101.667 sel/mL. Berdasarkan data yang dilihat dari kontrol sel, dapat disimpulkan bahwa sel mampu bertumbuh dengan baik, dimana semakin lama waktu inkubasi, maka semakin banyak pula jumlah sel yang hidup. Namun, perlakuan berupa pemberian fukoidan terbukti mampu melakukan penghambatan pertumbuhan sel pada berbagai variasi waktu inkubasi.



Gambar 4.7. Grafik Hubungan Antara Persentase Viabilitas Sel Hidup dengan Waktu Inkubasi

Setelah dilakukan perhitungan viabilitas sel, dapat dilihat hubungan antara persentase viabilitas sel hidup dengan waktu inkubasi pada **Gambar 4.7**. Dari 100% total sel, maka dapat dilihat bahwa kematian sel terbanyak terjadi pada inkubasi fukoidan selama 24 jam dengan membunuh hampir 55% populasi sel dan persentase sel hidup sebanyak 45%. Dengan pemberian konsentrasi ekstrak fukoidan yang sama, terdapat peningkatan persentase sel mati seiring dengan peningkatan lama inkubasi. Hal ini dapat dilihat dari persentase viabilitas sel hidup mencapai hampir 42% pada inkubasi 48 jam dan mencapai 28% pada inkubasi 72 jam. Berdasarkan data-data tersebut, semakin lama waktu inkubasi, maka semakin meningkat efektifitas kerja fukoidan dalam melakukan penghambatan pertumbuhan sel kanker.

Peristiwa ini juga dikonfirmasi oleh hasil analisis data statistik untuk melihat pengaruh masing-masing variasi waktu inkubasi terhadap viabilitas sel hidup pada **Lampiran 7**. Analisis menggunakan uji statistik *oneway* ANOVA Minitab 17 pada interval kepercayaan 95% yang menunjukkan bahwa nilai signifikansi $p=0,001$ lebih kecil dibandingkan nilai $\alpha=0,05$. Nilai tersebut menyatakan terdapat pengaruh yang signifikan dari variasi waktu inkubasi terhadap keberadaan sel. Untuk mengetahui perlakuan lama inkubasi yang memberikan pengaruh tertinggi, maka dilanjutkan dengan Uji Tukey dengan taraf signifikansi 5%. Hasil uji tersebut menunjukkan perbedaan yang nyata pada perlakuan

sebagaimana disajikan pada **Tabel 4.2** yang dinyatakan dalam notasi. Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan pengaruh antar perlakuan, sebaliknya, notasi yang sama menunjukkan pengaruh yang sama besarnya terhadap keberadaan sel. Aktivitas ekstrak fukoidan tertinggi (konsentrasi sesuai IC_{50}) ditunjukkan pada perlakuan dengan waktu inkubasi selama 24 jam dengan rerata jumlah sel hidup sebanyak 28.333 sel/mL. Sedangkan, aktivitas ekstrak fukoidan (konsentrasi sesuai IC_{50}) dengan perlakuan waktu inkubasi antara 48 dan 72 jam menunjukkan pengaruh yang tidak berbeda terhadap keberadaan sel hidup.

Kemampuan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Mak (2014), dimana pemberian konsentrasi fukoidan sebanyak 20-100 $\mu\text{g/ml}$ memberikan pengaruh penghambatan pada berbagai jenis sel kanker dengan inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Semakin lama waktu inkubasi pada setiap konsentrasi yang diberikan maka akan mendukung proses penghambatan proliferasi sel setiap dengan melakukan induksi *cell cycle arrest* (CCA). CCA menjadi sebuah kondisi dimana sel menghentikan proses pembelahan sel pada interfase ditahap G0/G1 atau S/G2. Pada sel kanker, gen pengkode *checkpoint* sudah mengalami mutasi yang menyebabkan terjadinya ekspresi berlebihan, sehingga pembelahan sel menjadi tidak terkontrol (Bower *et al.*, 2017). Dalam jurnal P. *et al.* (2019), dijelaskan bahwa penghambatan pertumbuhan sel kanker Hep-G2 terjadi karena fukoidan *Turbinaria conoides* mulai melakukan penurunan regulasi siklin (D1 dan D2) dan CDK (CDK2 dan CDK4) pada waktu inkubasi ke 24. Siklin dan CDK ((*Cyclin Dependent Kinase*) yang berperan sebagai *checkpoint*) merupakan protein yang bekerjasama melakukan proliferasi sel, sehingga apabila tingkat ekspresi diturunkan, siklus sel tidak dapat berjalan dengan baik (*inactive cell*). Fukoidan juga dapat bekerja meningkatkan regulasi protein apoptosis p21/WAF1/CIP1 pada berbagai macam kanker, dimana protein tersebut bekerja sebagai *tumor suppressor*. Protein sel yang 'diganggu' oleh fukoidan berbeda-beda berdasarkan jenis sel kanker, sehingga mekanisme penghambatan yang terjadi berbeda-beda.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Beberapa kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian yang dilakukan antara lain sebagai berikut:

1. Ekstrak fukoidan *S. filipendula* fraksi HCl memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara (MCF-7).
2. Ekstrak fukoidan *S. filipendula* fraksi HCl memiliki nilai penghambatan pertumbuhan yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 222,619 $\mu\text{g/ml}$. Nilai tersebut menandakan adanya kemampuan kemopreventif kategori moderat (cukup aktif) terhadap sel kanker.
3. Ekstrak fukoidan *S. filipendula* fraksi HCl memiliki efek apoptosis terhadap pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu:

1. Perlu diperhatikan waktu pembacaan setelah pemberian reagen, seperti pembacaan absorbansi setelah pemberian stopper MTT dan pembacaan setelah pemberian pewarna Hoechst 33342, agar tidak memengaruhi hasil analisa sampel.
2. Perlu diperhatikan kultur sel yang akan dilakukan perhitungan menggunakan *haemocytometer*, yang mana terlebih dahulu harus dihomogenisasi sebelum pembacaan.
3. Perlu dilakukan pengujian sitotoksik lanjutan dengan melakukan perbandingan senyawa fukoidan dengan obat kanker payudara (*doxorubicin* atau *tamoxifen*) menggunakan variasi konsentrasi hingga mencapai 100% kematian populasi sel.
4. Perlu dilakukan pengujian sitotoksik lanjutan fukoidan untuk melihat perbandingan penghambatan pertumbuhan sel normal (seperti sel payudara, sel otot, dll).
5. Perlu dilakukan pengujian apoptosis lanjutan untuk mengidentifikasi kematian sel baik jalur apoptosis maupun nekrosis.

DAFTAR PUSTAKA

- American Cancer Society. (2019). Breast Cancer: Treating Breast Cancer. *American Cancer Society*, 1–120. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>
- American Type Culture Collection. (2012). *MCF-7 Breast adenocarcinoma SOP: Thawing, Propagating and Cryopreserving*. 22. https://physics.cancer.gov/docs/bioresource/breast/NCI-PBCF-HTB22_MCF7_SOP-508.pdf
- Ardhiansyah, A. kta. (2021). *Surgery Mapping 1: Dasar-dasar Onkologi dan Halmark of Cancer* (2nd ed.). Airlangga University Press. https://www.google.co.id/books/edition/Surgery_Mapping_1_Ed_2_Dasar_dasar_Onkol/XFswEAAAQBAJ?hl=id&gbpv=0
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 115–118. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.30892>
- Barbosa, M., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2014). Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: Implications for neurodegenerative diseases. *Marine Drugs*, 12(9), 4934–4972. <https://doi.org/10.3390/md12094934>
- Baruna, C. A. A., & Manuaba, I. B. T. W. (2019). Ketepatan ultrasonografi dan mammografi dalam mendiagnosis wanita dengan kanker payudara di RSUP Sanglah Denpasar. *Intisari Sains Medis*, 10(3), 684–687. <https://doi.org/10.15562/ism.v10i3.489>
- Bertagnolli, C., Espindola, A. P. D. M., Kleinübing, S. J., Tasic, L., & Silva, M. G. C. Da. (2014). *Sargassum filipendula* alginate from Brazil: Seasonal influence and characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 111, 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.024>
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Thuy, T. T. T., Thanh Van, T. T., Ly, B. M., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I. (2013). Preliminary investigation of a highly sulfated galactofucan fraction isolated from the brown alga *Sargassum polycystum*. *Carbohydrate Research*, 377, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.05.016>
- Bilan, M. I., Ustyuzhanina, N. E., Shashkov, A. S., Thanh, T. T. T., Bui, M. L., Tran, T. T. Van, Bui, V. N., & Usov, A. I. (2017). Sulfated polysaccharides of the



- Vietnamese brown alga *Sargassum aquifolium* (Fucales, Sargassaceae). *Carbohydrate Research*, **449**, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.06.016>
- Bower, J. J., Vance, L. D., Psioda, M., Smith-Roe, S. L., Simpson, D. A., Ibrahim, J. G., Hoadley, K. A., Perou, C. M., & Kaufmann, W. K. (2017). Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. *Npj Breast Cancer*, **3**(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0009-7>
- Bucevičius, J., Lukinavičius, G., & Gerasimaite, R. (2018). The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. In *Chemosensors* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018>
- Camacho, O., Mattio, L., Draisma, S., Fredericq, S., & Diaz-Pulido, G. (2015). Morphological and molecular assessment of *Sargassum* (Fucales, *Phaeophyceae*) from Caribbean Colombia, including the proposal of *Sargassum giganteum* sp. nov., *Sargassum schnetteri* comb. nov. and *Sargassum* section *Cladophyllum* sect. nov. *Systematics and Biodiversity*, **13**(2), 105–130. <https://doi.org/10.1080/14772000.2014.972478>
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Research*, **35**(6), 3147–3154.
- Costa, L. S., Fidelis, G. P., Telles, C. B. S., Dantas-Santos, N., Camara, R. B. G., Cordeiro, S. L., Costa, M. S. S. P., Almeida-Lima, J., Melo-Silveira, R. F., Oliveira, R. M., Albuquerque, I. R. L., Andrade, G. P. V., & Rocha, H. A. O. (2011). Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. *Marine Drugs*, **9**(6), 952–966. <https://doi.org/10.3390/md9060952>
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., & Waterhouse, N. J. (2016). Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2016**(9), 778–781. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087205>
- Cumashi, A., Ushakova, N. A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, E., Berman, A. E., Bilan, M. I., Usov, A. I., Ustyuzhanina, N. E., Grachev, A., Sanderson, C. J., Kelly, M., Rabinovich, A., & Iacobelli, S. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Journal of Cellular Biochemistry*, **104**(1), 17(5), 541–552.

- Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B., & Hervé, C. (2017). A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydrate Polymers*, 175, 395–408. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.082>
- Di Filippo-Herrera, D. A., Hernández-Carmona, G., Muñoz-Ochoa, M., Arvizu-Higuera, D. L., & Rodríguez-Montesinos, Y. E. (2018). Monthly variation in the chemical composition and biological activity of *Sargassum horridum*. *Botanica Marina*, 61(1), 91–102. <https://doi.org/10.1515/bot-2017-0031>
- Duffy, R. (2017). *Breast Cancer: The Essential Guide*. BX.Plans Ltd.
- Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2008). Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. In *Cell* (Vol. 135, Issue 7, pp. 1161–1163). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.004>
- García-Ríos, V., Ríos-Leal, E., Robledo, D., & Freile-Pelegri, Y. (2012). Polysaccharides composition from tropical brown seaweeds. *Phycological Research*, 60(4), 305–315. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2012.00661.x>
- GBIF Secretariat. (2019). *Sargassum filipendula* C.Agardh. GBIF Backbone Taxonomy. <https://doi.org/10.15468/39omei>
- GLOBOCAN 2018. (2020). Indonesia - Global Cancer Observatory. WHO; International Agency for Research on Cancer, 2018. <https://gco.iarc.fr/Today/Data/Factsheets/Populations/360-Indonesia-Factsheets.Pdf>, 256, 1–2. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-factsheets.pdf>
- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., & Muffler, K. (2012). Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry*, 47(12), 1691–1698. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.06.016>
- Hameed, E. (2012). Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *European Journal of Medicinal Plants*, 2(2), 93–112. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2012/1040>
- Haryanti, S., & Widiyastuti, Y. (2017). Aktivitas Sitotoksik pada Sel MCF-7 dari Tumbuhan Indonesia untuk Pengobatan Tradisional Kanker Payudara. *Media Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan*, 27(4), 247–254. <https://doi.org/10.22435/mpk.v27i4.5010.247-254>

Helilusiatiningsih, N., & Sujuti, H. (2019). *Aktivitas Sitotoksik Fraksi Heksana Terung Pokak (Solanum torvum) terhadap Sel Kanker T47D Cytotoxic Activity of Hexane Fraction of Solanum torvum on Cancer Cells T47D*. 30(4), 253–258.

Irena, R. (2018). Hubungan Obesitas Dengan Kejadian Kanker Payudara Di RSUD Bangkinang. *Garuda Ristekdikti*, 2(1), 1–8.

Ismaryani, A., Salni, Setiawan, A., & Triwani. (2018). Aktivitas sitotoksik, antiproliferasi dan penginduksi apoptosis daun salung (*psychotria viridiflora reinw. ex. blume*) terhadap sel kanker serviks Hela. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 16(2), 206–213.

Isnansetyo, A., Lutfia, F. N. L., Nursid, M., Trijoko, T., & Susidarti, R. A. (2017). Cytotoxicity of fucoidan from three tropical brown algae against breast and colon cancer cell lines. *Pharmacognosy Journal*, 9(1), 14–20. <https://doi.org/10.5530/pj.2017.1.3>

Kazanietz, M. G. (2010). *Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy*. Springer Science & Business Media.

Kemendes. (2015). Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara. *Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*, 1–50. <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PPKPayudara.pdf>

Khan, S., Khan, A., Saleh Khattak, F., & Naseem, A. (2012). An Accurate and Cost Effective Approach to Blood Cell Count. *International Journal of Computer Applications*, 50(1), 18–24. <https://doi.org/10.5120/7734-0682>

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

Laeliocattleya, R. A., Yuniarta, Suloi, A. F., Gayatri, P. P., Putri, N. A., & Anggraeni, Y. C. (2020). Fucoidan Content from Brown Seaweed (*Sargassum filipendula*) and Its Potential As Radical Scavenger. *Journal of Physics: Conference Series*, 1430(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1430/1/012023>

Langkawi, P., Kaedah, K., Fukoidan, P., Hasil, T., & Fukosa, K. (2018). Effect of Extraction Methods on the Yield, Fucose Content and Purity Of Fucoidan from *Sargassum* sp. Obtained from Pulau Langkawi, Malaysia. *Malaysian Journal of Analytical Science*, 22(1), 87–94. <https://doi.org/10.17576/mjas-2018-2201-11>

- Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), 1–4. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>
- Lim, S. J., Wan Aida, W. M., Maskat, M. Y., Latip, J., Badri, K. H., Hassan, O., & Yamin, B. M. (2016). Characterisation of fucoidan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *Food Chemistry*, 209, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.058>
- Lin, Y., Qi, X., Liu, H., Xue, K., Xu, S., & Tian, Z. (2020). The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both *in vivo* and *in vitro* investigations. *Cancer Cell International*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01233-8>
- Lin, Z., Tan, X., Zhang, Y., Li, F., Luo, P., & Liu, H. (2020). Molecular targets and related biologic activities of fucoidan: A review. *Marine Drugs*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/MD18080376>
- Lutfiawan, M., Karnan, & Japa, L. (2015). Analisis Pertumbuhan *Sargassum sp.* Dengan Sistem Budidaya yang Berbeda di Teluk Ekas Lombok Timur Sebagai Bahan Pengayaan Mata Kuliah Ekologi Tumbuhan. 1–10.
- 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(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00009>
- Maples, R. D. (2014). Encyclopedia of Toxicology. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (3rd ed.). <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123864550/encyclopedia-of-toxicology#book-info>
- Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., & Kurokawa, M. (2016). Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 327). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.06.006>
- Mazloun-Ardakani, M., Barazesh, B., Moshtaghioun, S. M., & Sheikha, M. H. (2019). Designing and optimization of an electrochemical substitute for the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) cell viability assay. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51241-6>
- Morya, V. K., Kim, J., & Kim, E. K. (2012). Algal fucoidan: Structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3666-8>

Mostaço-Guidolin, L. B., Murakami, L. S., Batistuti, M. R., Nomizo, A., & Bachmann, L. (2010). Molecular and chemical characterization by Fourier transform infrared spectroscopy of human breast cancer cells with estrogen receptor expressed and not expressed. *Spectroscopy*, 24(5), 501–510.

<https://doi.org/10.3233/SPE-2010-0466>

National Cancer Institute. (2014, May 23). *Breast Cancer Treatment and Pregnancy (PDQ®) - PDQ Cancer Information Summaries - NCBI Bookshelf*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65716.1/>

Ng, K. W., & Schantz, J. (2010). *A Manual for Primary Human Cell Culture*. World Scientific Publisher.

Nguyen, T. T., Mikkelsen, M. D., Nguyen Tran, V. H., Dieu Trang, V. T., Rhein-Knudsen, N., Holck, J., Rasin, A. B., Thuy Cao, H. T., Thanh Van, T. T., & Meyer, A. S. (2020). Enzyme-assisted fucoidan extraction from brown macroalgae *Fucus distichus* subsp. *Evanescens* and *saccharina latissima*.

Marine Drugs, 18(6). <https://doi.org/10.3390/md18060296>

P., A., K., A., L., S., M., M., & K., M. (2019). Anticancer effect of fucoidan on cell proliferation, cell cycle progression, genetic damage and apoptotic cell death in HepG2 cancer cells. *Toxicology Reports*, 6(May), 556–563.

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.005>

Patton, K. T. (2016). *Anatomy and Physiology* (9th ed.). Elsevier Health Sciences.

Pierucci, S., Klemeš, J. J., Piazza, L., Ptak, S. H., Christensen, K. V, Meichlner, R., & Fretté, X. (2019). Improving Fucoidan Yield from *Fucus* Brown Algae by Microwave Extraction. *Chemical Engineering Transactions*, 74.

<https://doi.org/10.3303/CET1974019>

Ponce, N. M. A., & Stortz, C. A. (2020). A Comprehensive and Comparative Analysis of the Fucoidan Compositional Data Across the *Phaeophyceae*.

Frontiers in Plant Science, 11(November).

<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556312>

Priyan, I., Fernando, S., Kapuge, K., Sanjeewa, A., Lee, H. G., Kim, H., Patabadige, A., Prasanna, J., Ireshika, H., Silva, C. De, Nanayakkara, C. M., & Jeon, Y. (2020). Fucoidan Purified from *Sargassum polycystum* Induces Apoptosis through Mitochondria-Mediated Pathway in HL-60 and MCF-7 Cells. *Marine Drugs*, 18(196), 1–13.

Puspantari, Kusnandar, Lioe, & N., L. (2020). Penghambatan fraksi fukoidan rumput laut cokelat (*Sargassum polycystum* dan *Turbinaria conoides*)

- terhadap α -amilase dan α -glukosidase. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(1), 122–136.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual, Md*, 1–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
- Ryan, P. D., & Goss, P. E. (2013). Breast Cancer. *European Society for Medical Oncology*.
- Saepudin, E., Qosthalani, F. A., & Sinurat, E. (2018). Fucoidan cytotoxicity against human breast cancer T47D cell line increases with higher level of sulfate ester group. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 299(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/299/1/012025>
- Sambamurty, A. (2017). *Textbook of Algae*. I. K. International Pvt Ltd. https://books.google.co.id/books/about/Textbook_of_Algae.html?id=wAJsL8y_X_kC&redir_esc=y
- Santhanam, R. C., Yahoob, S. A. M., & Venkatraman, A. (2020). Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cell line via Bcl2 and caspase3 assay in an in-vitro condition. *International Journal of Scientific and Technology Research*, 9(1), 559–561.
- Sari, L. M. (2019). *Aktivitas Antioksidan dan Sitotoksisitas Biji Pinang pada Karsinoma Sel Skuamosa Mulut*. Syiah Kuala University Press. https://www.google.co.id/books/edition/Aktivitas_Antioksidan_dan_Sitotoksisitas/scDRDwAAQBAJ?hl=id&gbpv=1
- Sedjati, S., Supriyantini, E., Ridlo, A., Soenardjo, N., & Santi, V. Y. (2018). Kandungan Pigmen, Total Fenolik Dan Aktivitas Antioksidan *Sargassum* sp. *Jurnal Kelautan Tropis*, 21(2), 137. <https://doi.org/10.14710/jkt.v21i2.3329>
- Senthilkumar, K., Manivasagan, P., Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2013). Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030>
- Shevchenko, N. M., Usol'Tseva Men'shova, R. V., Ishina, I. A., Thinh, P. D., Ly, B. M., & Ermakova, S. P. (2017). Structural characteristics and *in vitro* antitumor activity of water-soluble polysaccharides from brown algae of the Russian far east and Vietnam. *Chemistry of Natural Compounds*, 53(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-1897-3>
- Sinurat, E., & Kusumawati, R. (2017). *Optimasi Metode Ekstraksi Fukoidan dari*

Rumput Laut Cokelat *Sargassum binderi* Sonder. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 12(2), 125–134.

Sirait, P. S., & Setyaningsih, I. (2019). Aktivitas antikanker ekstrak Spirulina yang dikultur pada media walne dan media organik. *Php*, 22(1), 50–59.

Sobri, F. B., Wibisana, G., Rachman, A., Soeis, D., Wahyono, Y., Halim, O.,

Rahmaania, J., Badrudin, F., & Yuswar, P. (2020). *Cerdas Menghadapi Kanker Payudara 2*. Gramedia Pustaka Utama.

<https://books.google.co.id/books?id=fBEBEAAAQBAJ>

Somasundaram, S. N., Shanmugam, S., Subramanian, B., & Jaganathan, R. (2016). Cytotoxic effect of fucoidan extracted from *Sargassum cinereum* on colon cancer cell line HCT-15. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1215–1223.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.084>

Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>

Suparman, E., & Suparman, E. (2014). Peran Estrogen Dan Progesteron Terhadap Kanker Payudara. *Jurnal Biomedik (Jbm)*, 6(3), 141–148. <https://doi.org/10.35790/jbm.6.3.2014.6319>

Thankamma, A., & Helen, H. (2011). *Specialist Training in Oncology*. Elsevier Health Sciences.

van Weelden, G., Bobi, M., Okla, K., van Weelden, W. J., Romano, A., & Pijnenborg, J. M. A. (2019). Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. *Marine Drugs*, 17(1). <https://doi.org/10.3390/md17010032>

Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. A. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, Issue JUN, p. 147). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00147>

Verma, A., Kumar, S., & Balomajumder, C. (2019). Application of response surface methodology for the optimization of Ni²⁺ ions biosorption from aqueous solution using *Sargassum filipendula*. *Desalination and Water Treatment*, 170, 239–252. <https://doi.org/10.5004/dwt.2019.24725>

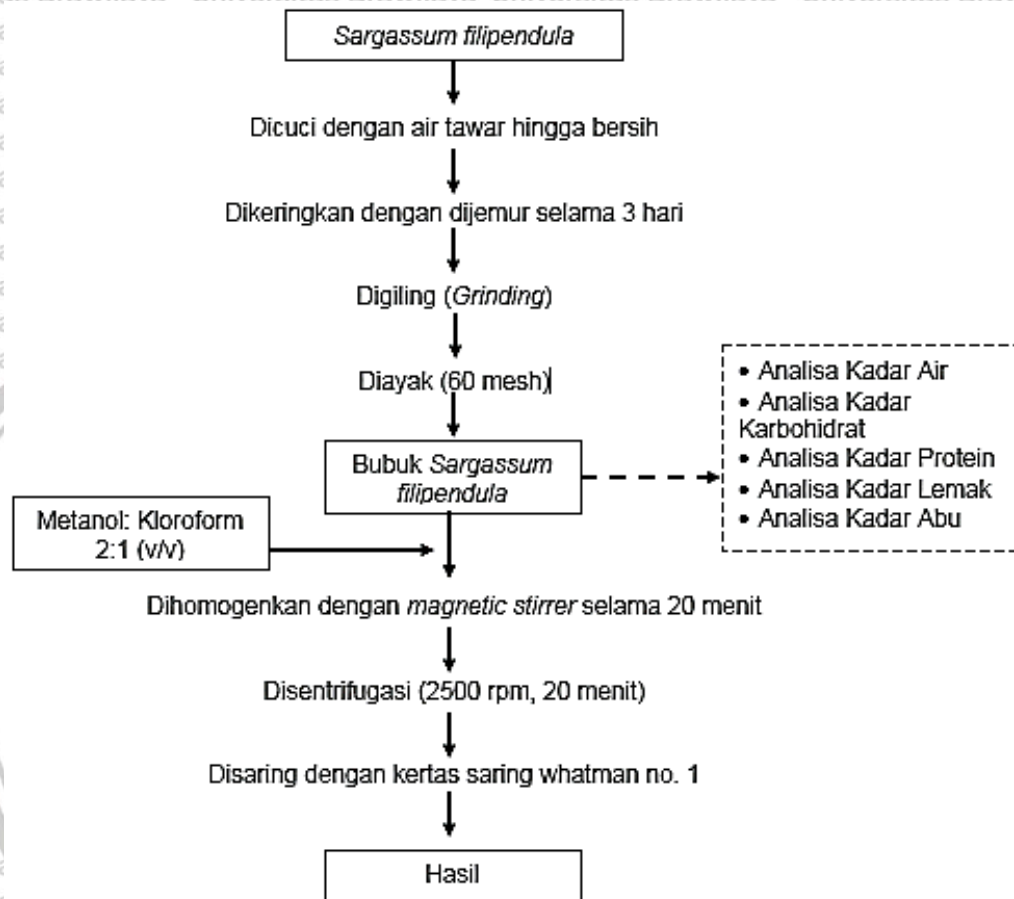
Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., & Song, S. (2019). Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent

- studies. *Marine Drugs*, 17(3), 15–17. <https://doi.org/10.3390/md17030183>
- Widjajanto, E. (2012). *Mastosit-Mast Cel*. UB Press. https://www.google.co.id/books/edition/Mastosit_Mast_Cel/fiOxDwAAQBAJ?hl=id&gbpv=1&dq=apoptosis+dan+nekrosis&pg=PA142&printsec=frontcover
- Wu, S. Y., Yan, M. De, Wu, A. T. H., Yuan, K. S. P., & Liu, S. H. (2016). Brown Seaweed Fucoidan Inhibits Cancer Progression by Dual Regulation of mir-29c/ADAM12 and miR-17-5p/PTEN Axes in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Cancer*, 7(15), 2408–2419. <https://doi.org/10.7150/jca.15703>
- Yang, W. N., Chen, P. W., & Huang, C. Y. (2017). Compositional characteristics and *in vitro* evaluations of antioxidant and neuroprotective properties of crude extracts of fucoidan prepared from compressional puffing-pretreated sargassum crassifolium. *Marine Drugs*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/md15060183>
- Yende, S., Harle, U., & Chaugule, B. (2014). Therapeutic potential and health benefits of Sargassumspecies. *Pharmacognosy Reviews*, 8(15), 1–7. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.125514>
- YKPI. (2018). 70 Persen Pasien Kanker Payudara ke Dokter Sudah Stadium Lanjut. <https://pitapink-ykpi.or.id/70-persen-pasien-kanker-payudara-ke-dokter-sudah-stadium-lanjut/>
- Zayed, A., Muffler, K., Hahn, T., Rupp, S., Finkelmeier, D., Burger-Kentischer, A., & Ulber, R. (2016). Physicochemical and biological characterization of fucoidan from fucus vesiculosus purified by dye affinity chromatography. *Marine Drugs*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/MD14040079>
- Zhang, Z., Teruya, K., Eto, H., & Shirahata, S. (2011). Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ros-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027441>

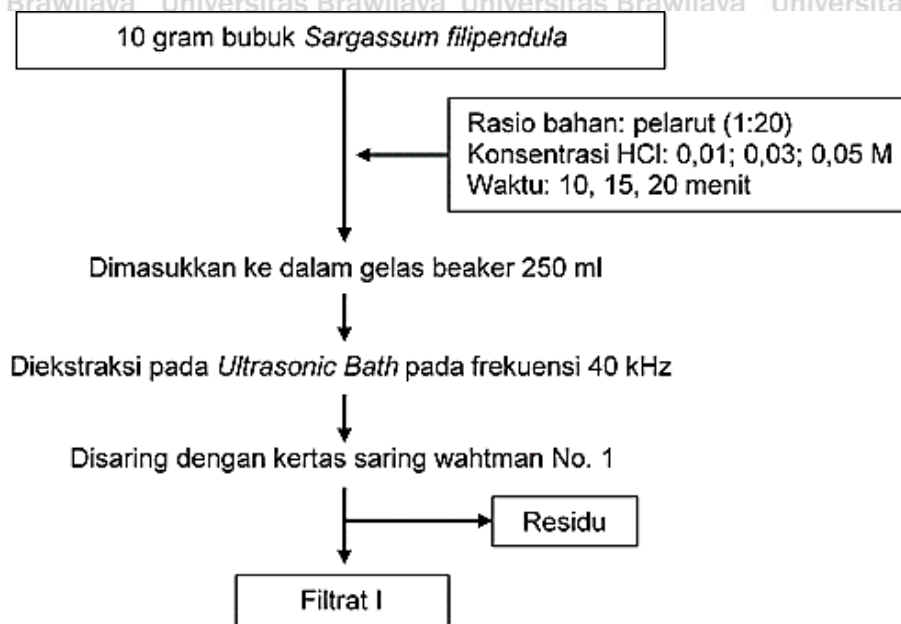
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Ekstraksi Fukoidan (dalam penelitian Laeliocattleya et al., 2020)

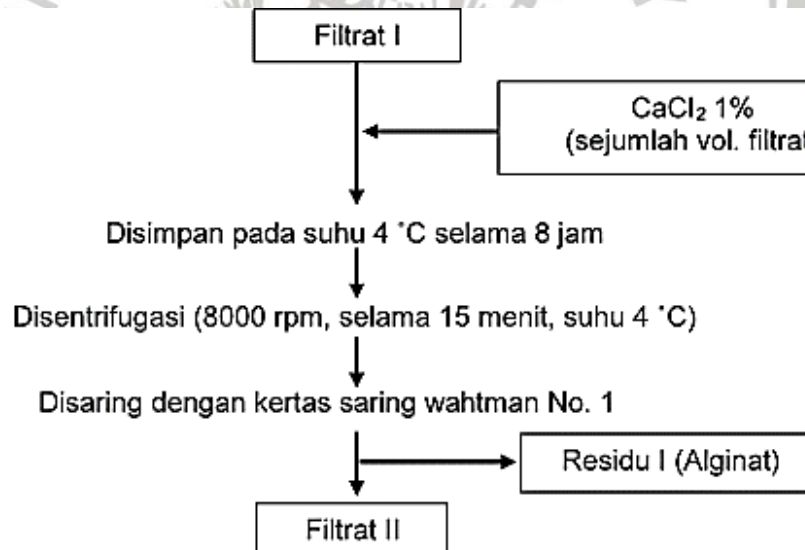
1. Persiapan Sampel dan Pre-treatment



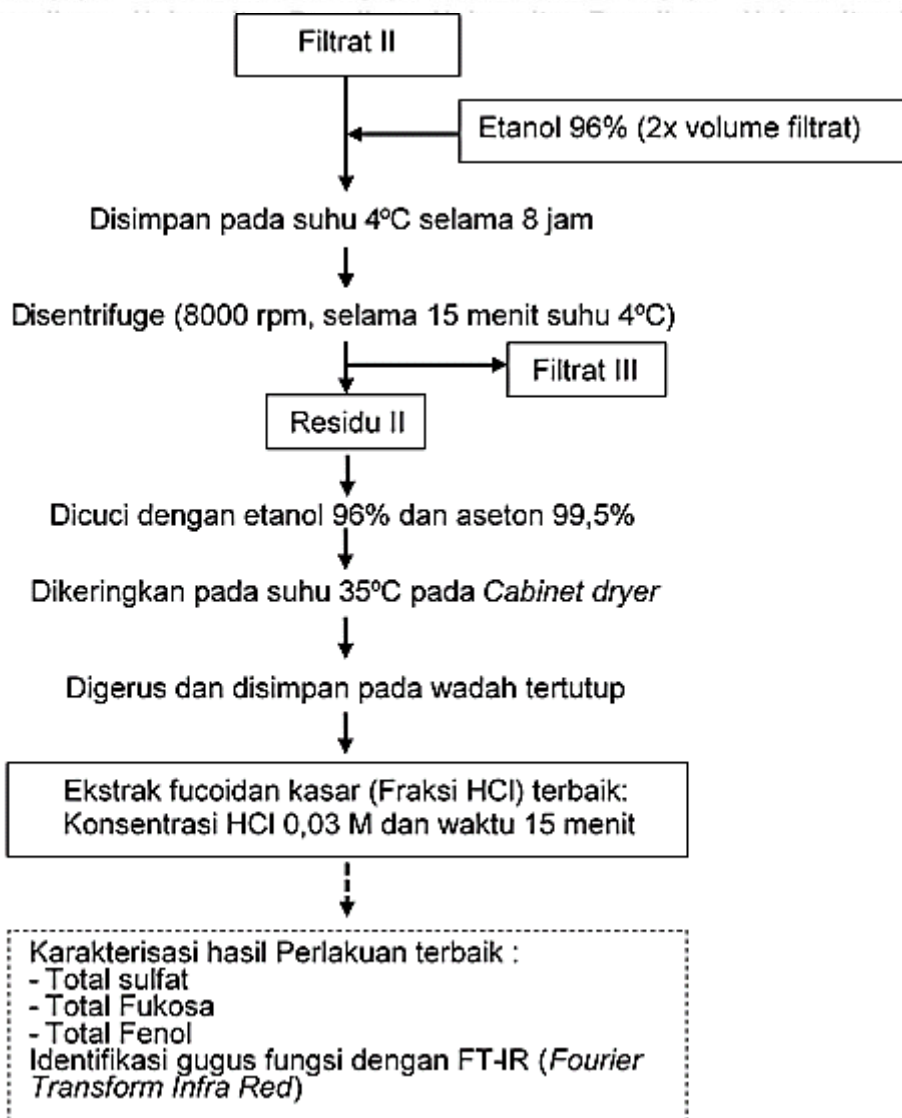
2. Ekstraksi Fukoidan menggunakan *Ultrasonic Bath*



3. Presipitasi Alginat



4. Presipitasi Fukoidan



Lampiran 2. Perhitungan Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl

1. Konsentrasi sampel yang akan digunakan

Dibuat konsentrasi sampel *range* 0-1000 µg/mL atau ppm. Rumus yang digunakan:

$$f = \sqrt[n-1]{\frac{Dt}{Dr}}$$

Keterangan:

f = angka kelipatan

n = banyaknya dosis

Dt = dosis tertinggi

Dr = dosis terendah

Perhitungan:

Dibuat sebanyak 7 sampel dengan dosis terendah 12,5 ppm

$$f = \sqrt[8-1]{\frac{1000}{12,5}}$$

$$f = \sqrt[7]{80} = 1.870122254 \approx 2$$

Sehingga konsentrasi yang digunakan (ppm): **12,5; 25; 50; 100; 200; 400; dan 800.**

2. Pengenceran bertingkat dari larutan stok Sampel Uji Ekstrak Fukoidan Fraksi HCl dari stok konsentrasi 2000 ppm. Rumus yang digunakan:

$$v_1 \times m_1 = v_2 \times m_2$$

Keterangan:

V1 = Volume larutan stok yang dibutuhkan untuk pengenceran

M1 = Konsentrasi sampel larutan stok

V2 = Volume pengenceran yang diinginkan

M2 = Konsentrasi pengenceran yang diinginkan

Perhitungan:

Untuk pembuatan 1 mL larutan total

• **800 ppm**

$$v_1 \times 2000 \text{ ppm} = (600 + 650) \mu\text{L} \times 800 \text{ ppm}$$

$$v_1 = 500 \mu\text{L} \text{ (stok fukoidan 2000 ppm)}$$

$$\text{Media Kultur RPMI} = 750 \mu\text{L}$$

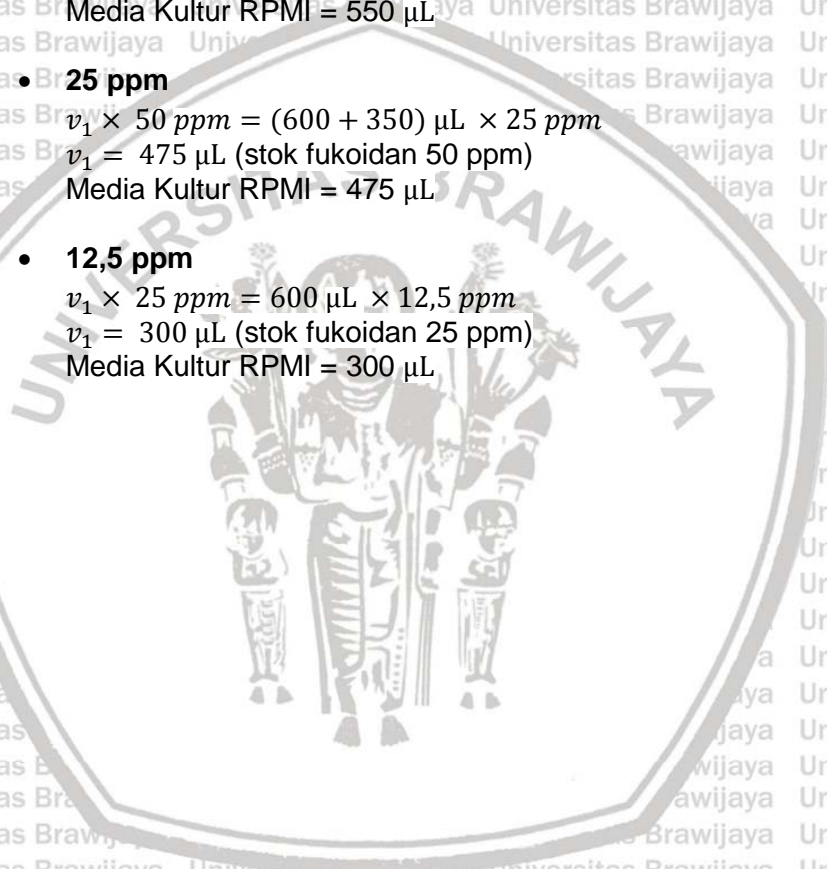
• **400 ppm**

$$v_1 \times 800 \text{ ppm} = (600 + 650) \mu\text{L} \times 400 \text{ ppm}$$

$$v_1 = 625 \mu\text{L} \text{ (stok fukoidan 800 ppm)}$$

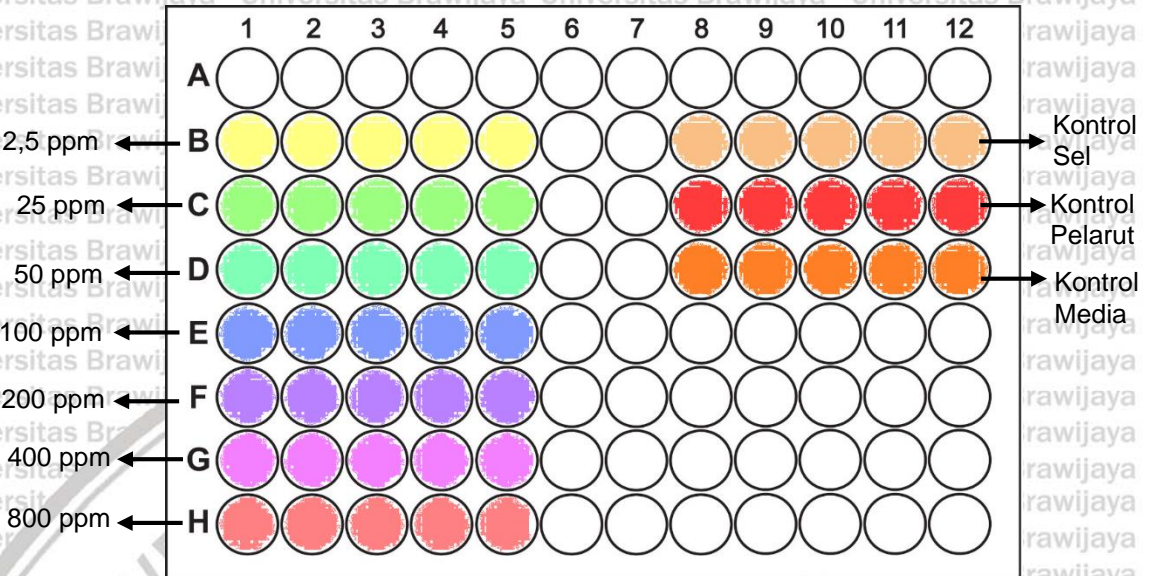
$$\text{Media Kultur RPMI} = 625 \mu\text{L}$$

- **200 ppm**
 $v_1 \times 400 \text{ ppm} = (600 + 650) \mu\text{L} \times 200 \text{ ppm}$
 $v_1 = 625 \mu\text{L}$ (stok fukoidan 400 ppm)
 Media Kultur RPMI = 625 μL
- **100 ppm**
 $v_1 \times 200 \text{ ppm} = (600 + 600) \mu\text{L} \times 100 \text{ ppm}$
 $v_1 = 600 \mu\text{L}$ (stok fukoidan 200 ppm)
 Media Kultur RPMI = 600 μL
- **50 ppm**
 $v_1 \times 100 \text{ ppm} = (600 + 500) \mu\text{L} \times 50 \text{ ppm}$
 $v_1 = 550 \mu\text{L}$ (stok fukoidan 100 ppm)
 Media Kultur RPMI = 550 μL
- **25 ppm**
 $v_1 \times 50 \text{ ppm} = (600 + 350) \mu\text{L} \times 25 \text{ ppm}$
 $v_1 = 475 \mu\text{L}$ (stok fukoidan 50 ppm)
 Media Kultur RPMI = 475 μL
- **12,5 ppm**
 $v_1 \times 25 \text{ ppm} = 600 \mu\text{L} \times 12,5 \text{ ppm}$
 $v_1 = 300 \mu\text{L}$ (stok fukoidan 25 ppm)
 Media Kultur RPMI = 300 μL

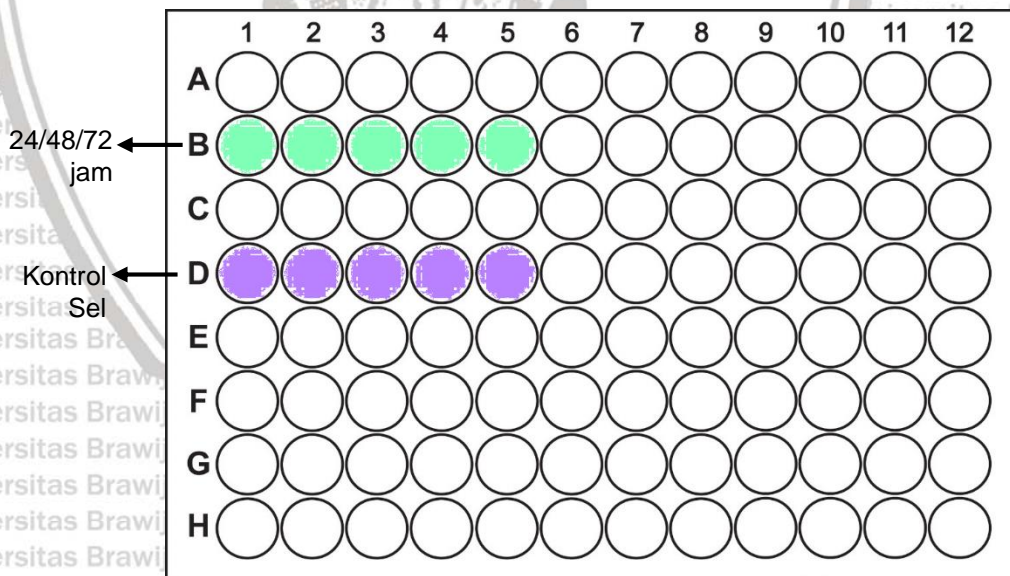


Lampiran 3. Denah Well Plate

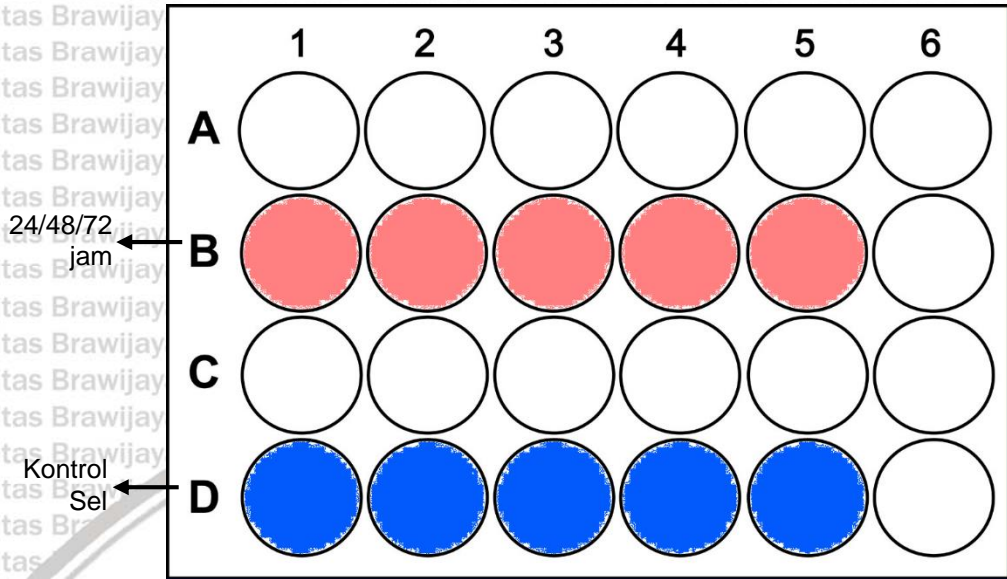
a. Denah 24-Well plate untuk Uji Sitotoksik menggunakan Metode MTT Assay



b. Denah 24-Well plate untuk Uji Apoptosis menggunakan Metode Direct Counting



c. Denah 24-Well plate untuk Uji Apoptosis menggunakan Metode Hoechst 33342



Lampiran 4. Perhitungan Persentase Viabilitas Sel MCF-7 dari MTT Assay

1. Kontrol

	Nilai Absorbansi
Kontrol Sel	1,171
Kontrol Pelarut	0,993
Kontrol Media	0,334

2. Ekstrak Fukoidan

Konsentrasi (µg/mL)	Nilai Absorbansi Ulangan			Persentase Viabilitas Sel (%) Ulangan			Rerata % Viabilitas (%)	Standar Deviasi
	1	2	3	1	2	3		
12,5	1,619	1,103	1,112	99,761	91,871	92,986	94,872	4,269
25	1,109	1,085	1,073	92,588	89,719	92,588	91,631	1,656
50	0,948	0,959	1,003	73,421	74,695	79,996	76,037	3,486
100	0,888	0,841	0,978	66,168	60,549	76,927	67,882	8,322
200	0,855	0,731	0,708	62,313	47,399	44,650	51,454	9,503
400	0,677	0,684	0,637	40,944	41,781	36,202	39,642	3,008
800	0,597	0,584	0,565	31,405	29,907	27,555	29,622	1,940

Rumus Persentase Viabilitas Sel (%) (KS>KP):

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

Perhitungan:

a. Konsentrasi 12,5 ppm

Ulangan 1

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{1,619 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 99,761\%$$

Ulangan 2

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{1,103 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 91,871\%$$

Ulangan 3

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{1,112 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 92,986\%$$

b. Konsentrasi 25 ppm

Ulangan 1

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{1,109 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 92,588\%$$

Ulangan 2

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{1,085 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 89,719\%$$

Ulangan 3

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{1,073 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 92,588\%$$

c. Konsentrasi 50 ppm

Ulangan 1

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,948 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 73,421\%$$

Ulangan 2

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,959 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 74,695\%$$

Ulangan 3

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{1,003 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 79,996\%$$

d. Konsentrasi 100 ppm

Ulangan 1

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,888 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 66,168\%$$

Ulangan 2

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,841 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 60,549\%$$

Ulangan 3

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,978 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 76,927\%$$

e. Konsentrasi 200 ppm

Ulangan 1

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,855 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 62,313\%$$

Ulangan 2

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,731 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 47,399\%$$

Ulangan 3

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,708 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 44,650\%$$

f. Konsentrasi 400 ppm

Ulangan 1

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,677 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 40,944\%$$

Ulangan 2

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,684 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 41,781\%$$

Ulangan 3

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,637 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 36,202\%$$

g. Konsentrasi 800 ppm

Ulangan 1

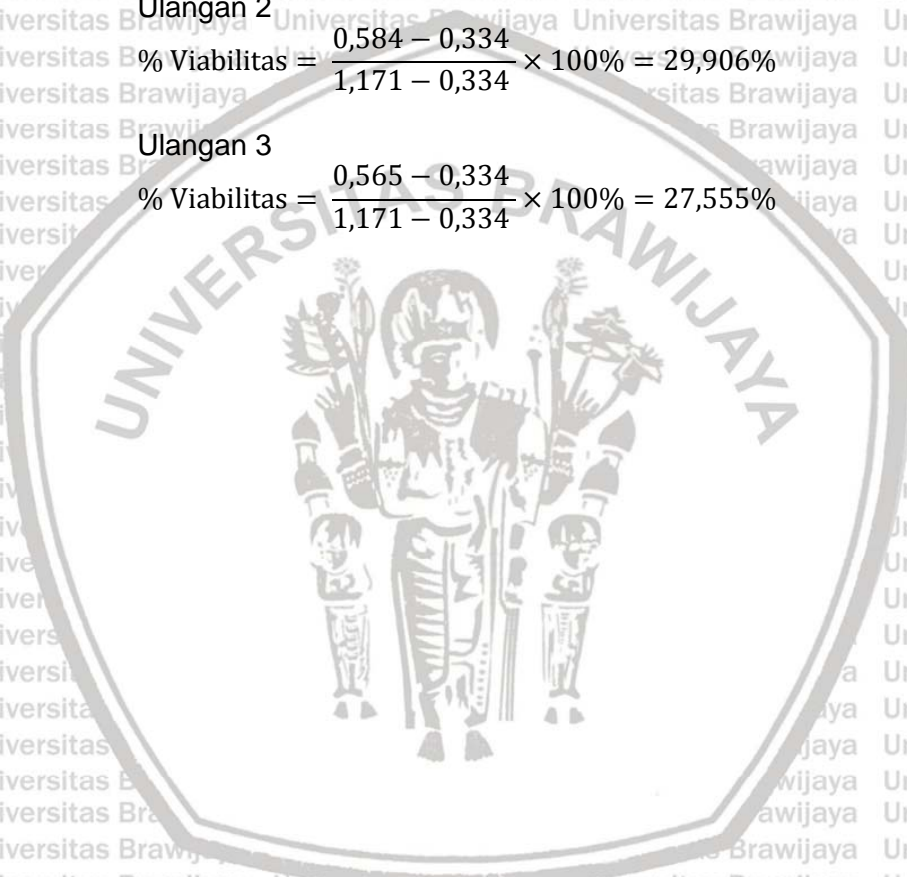
$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,597 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 31,404\%$$

Ulangan 2

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,584 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 29,906\%$$

Ulangan 3

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{0,565 - 0,334}{1,171 - 0,334} \times 100\% = 27,555\%$$



Lampiran 5. Perhitungan IC₅₀ dengan webtool IC₅₀ calculator

Setelah memasukkan data konsentrasi dan viabilitas sel ke dalam website (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>). Maka didapatkan bentuk persamaan sebagai berikut:

Bentuk Persamaan Umum

$$y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{\text{Hill coefficient}}}$$

Bentuk Persamaan

$$y = 13,8852 + \frac{105,5255 - 13,8852}{1 + \left(\frac{x}{137,2541}\right)^{0,8894}}$$

Selanjutnya memasukkan y = 50 untuk mendapatkan nilai IC₅₀. Maka didapatkan nilai IC₅₀ sebagai berikut:

X	Y
222,619 µg/m L	50

Lampiran 6. Perhitungan Nilai Viabilitas Sel dari Jumlah Sel Hidup

1. Kontrol

	24 jam Ulangan			48 jam Ulangan			72 jam Ulangan		
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3
A	2	13	10	19	30	18	16	23	25
B	6	8	2	27	17	21	30	52	57
C	3	6	5	18	20	19	40	44	45
D	4	7	9	13	24	26	49	36	18
Total	15	34	26	77	91	84	135	155	145
Jumlah Sel/mL	62500			21000			362500		

Rumus Jumlah Sel/mL:

$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik}}{4} \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

Perhitungan:

a. 24 Jam

Ulangan 1

$$\text{Jumlah sel} = \frac{15}{4} \times 10000 = 37500 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 2

$$\text{Jumlah sel} = \frac{34}{4} \times 10000 = 85000 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 3

$$\text{Jumlah sel} = \frac{26}{4} \times 10000 = 65000 \text{ sel/mL}$$

Rata-rata Jumlah Sel/mL=

$$\frac{\text{Jumlah sel setiap ulangan}}{3} = \frac{37500 + 85000 + 65000}{3} = 62500 \text{ sel/mL}$$

b. 48 Jam

Ulangan 1

$$\text{Jumlah sel} = \frac{77}{4} \times 10000 = 192500 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 2

$$\text{Jumlah sel} = \frac{91}{4} \times 10000 = 227500 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 3

$$\text{Jumlah sel} = \frac{84}{4} \times 10000 = 210000 \text{ sel/mL}$$

$$\text{Rata-rata Jumlah Sel/mL} = \frac{\text{Jumlah sel setiap ulangan}}{3} = \frac{192500 + 227500 + 210000}{3} = 210000 \text{ sel/mL}$$

c. 72 Jam

Ulangan 1

$$\text{Jumlah sel} = \frac{135}{4} \times 10000 = 337500 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 2

$$\text{Jumlah sel} = \frac{155}{4} \times 10000 = 387500 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 3

$$\text{Jumlah sel} = \frac{145}{4} \times 10000 = 362500 \text{ sel/mL}$$

$$\text{Rata-rata Jumlah Sel/mL} = \frac{\text{Jumlah sel setiap ulangan}}{3} = \frac{337500 + 387500 + 362500}{3} = 362500 \text{ sel/mL}$$

2. Ekstrak Fukoidan *Sargassum filipendula*

	24 jam			48 jam			72 jam		
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3
A	1	3	3	12	6	9	9	5	10
B	3	4	3	7	11	12	6	10	16
C	4	2	6	10	7	9	17	12	9
D	1	2	2	5	7	10	9	7	12
Total	9	11	14	34	31	40	41	34	47
Rata-rata	11,3333			35			40,66667		
Jumlah Sel/mL	28333			87500			101667		

• **Rumus Jumlah Sel/mL:**

$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik}}{4} \times 10^4 \text{ sel/mL}$$

Perhitungan:

a. 24 Jam

Ulangan 1

$$\text{Jumlah sel} = \frac{9}{4} \times 10000 = 22500 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 2

$$\text{Jumlah sel} = \frac{11}{4} \times 10000 = 27500 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 3

$$\text{Jumlah sel} = \frac{14}{4} \times 10000 = 35000 \text{ sel/mL}$$

Rata-rata Jumlah Sel =

$$\frac{\text{Jumlah sel setiap ulangan}}{3} = \frac{22500 + 27500 + 35000}{3} = 28333,33 \text{ sel/mL}$$

b. 48 Jam

Ulangan 1

$$\text{Jumlah sel} = \frac{34}{4} \times 10000 = 85000 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 2

$$\text{Jumlah sel} = \frac{31}{4} \times 10000 = 77500 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 3

$$\text{Jumlah sel} = \frac{40}{4} \times 10000 = 100000 \text{ sel/mL}$$

Rata-rata Jumlah Sel =

$$\frac{\text{Jumlah sel setiap ulangan}}{3} = \frac{85000 + 77500 + 100000}{3} = 87500 \text{ sel/mL}$$

c. 72 Jam

Ulangan 1

$$\text{Jumlah sel} = \frac{41}{4} \times 10000 = 102500$$

Ulangan 2

$$\text{Jumlah sel} = \frac{34}{4} \times 10000 = 85000 \text{ sel/mL}$$

Ulangan 3

$$\text{Jumlah sel} = \frac{47}{4} \times 10000 = 117500 \text{ sel/mL}$$

Rata-rata Jumlah Sel =

$$\frac{\text{Jumlah sel setiap ulangan}}{3} = \frac{102500 + 85000 + 117500}{3} = 101667 \text{ sel/mL}$$

3. Viabilitas Sel

Waktu Inkubasi (Jam)	Viabilitas Sel Hidup (%)	Kematian Sel (%)
24	45,333	54,667
48	41,667	58,333
72	28,046	71,953

• **Rumus Persentase Viabilitas Sel Hidup:**

$$\frac{\text{Jumlah sel/mL}}{\text{Jumlah sel Kontrol}} \times 100\%$$

Perhitungan:

a. 24 Jam

$$\% \text{Viabilitas Sel Hidup} = \frac{28333}{62500} \times 100\% = 45,333\%$$

$$\text{Kematian sel} = 100\% - 45,33\% = 54,667\%$$

b. 48 Jam

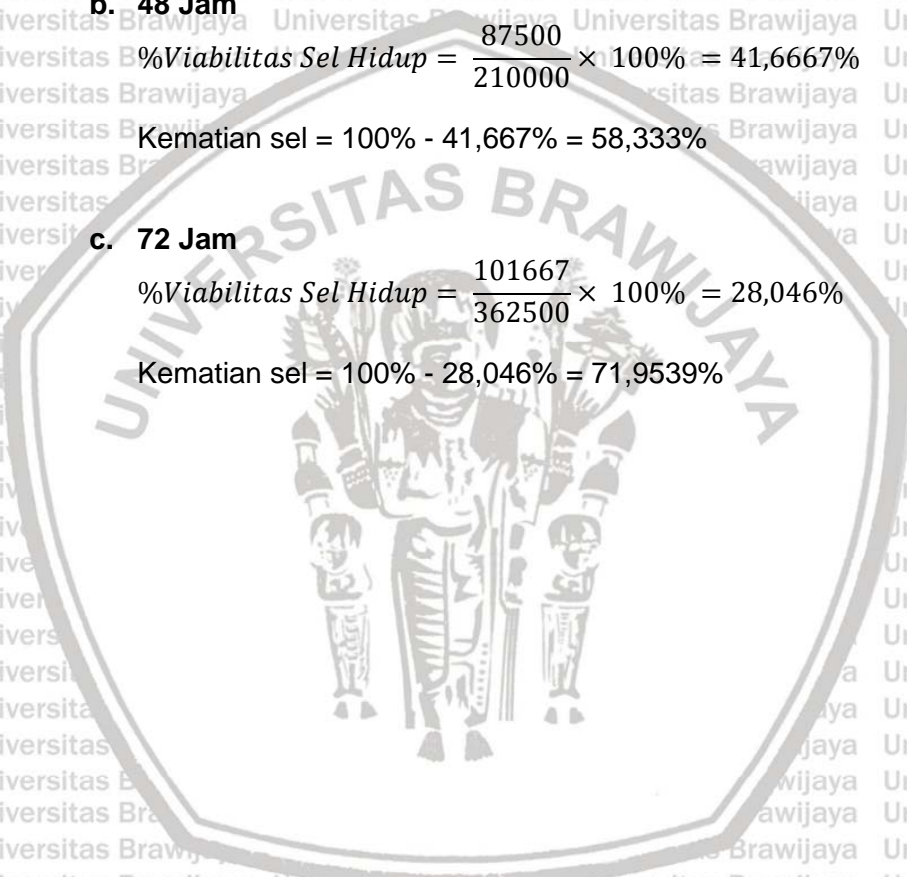
$$\% \text{Viabilitas Sel Hidup} = \frac{87500}{210000} \times 100\% = 41,6667\%$$

$$\text{Kematian sel} = 100\% - 41,667\% = 58,333\%$$

c. 72 Jam

$$\% \text{Viabilitas Sel Hidup} = \frac{101667}{362500} \times 100\% = 28,046\%$$

$$\text{Kematian sel} = 100\% - 28,046\% = 71,9539\%$$



Lampiran 7. Hasil Uji ANOVA pada Perlakuan Waktu Inkubasi dan Uji Lanjut Tukey

One-way ANOVA: Jumlah sel/ml versus Perlakuan

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Perlakuan	3	P1, P2, P3

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Perlakuan	2	9079166667	4539583333	31.28	0.001
Error	6	870833333	145138889		
Total	8	9950000000			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
12047.4	91.25%	88.33%	80.31%

Means

Perlakuan	N	Mean	StDev	95% CI
P1	3	28333	6292	(11314, 45353)
P2	3	87500	11456	(70480, 104520)
P3	3	101667	16266	(84647, 118686)

Pooled StDev = 12047.4

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Perlakuan	N	Mean	Grouping
P3	3	101667	A
P2	3	87500	A
P1	3	28333	B

Means that do not share a letter are significantly different.