

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker kolorektal merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas secara global. Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), kanker kolorektal menempati peringkat ketiga jenis kanker tersering dan peringkat kedua penyebab kematian akibat kanker di seluruh dunia dengan lebih dari 1,9 juta kasus baru dan 935.000 kematian pada tahun 2020 (Sung et al., 2021). Menurut data dari Kementerian Kesehatan tahun 2024, sehubungan dengan peringatan hari kanker dunia pada 4 Februari 2024 *World Health Organization* (WHO), melalui lembaga riset kanker *International Agency for Research on Cancer* (IARC), merilis data bahwa kanker kolorektal merupakan kasus terbanyak ke-3 di dunia (Kemenkes, 2024). Pada tahun 2020, Indonesia mencatat 34.189 kasus kanker kolorektal yang mewakili 8,6% dari total kasus kanker (Sanjaya dkk., 2023). Data dari Unit Pelayanan Kesehatan Indonesia tahun 2023 menunjukkan bahwa kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian, salah satunya didominasi oleh kanker kolorektal (Kemenkes, 2023). Kanker kolorektal dipengaruhi oleh variabel seperti jenis kelamin, ras, usia, polip usus besar, dan riwayat penyakit radang usus kronis pada individu atau keluarga (Siregar dan Mustika, 2024). Kanker kolorektal ditandai dengan pertumbuhan ganas pada lapisan usus besar atau rektum, dengan ciri khas berupa proliferasi sel yang tidak terkontrol, diferensiasi sel yang berlebihan, serta invasi dan metastasis sel (Husnah dkk., 2024).

Beberapa metode pengobatan kanker saat ini meliputi pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Penggunaan kemoterapi sering kali menghadapi kendala seperti toksisitas pada sel-sel normal, efek samping yang merugikan, serta resistensi obat. Selain itu, kemoterapi dapat mengurangi kekuatan sistem kekebalan tubuh pasien (Permatasari dkk., 2022). Di samping itu, kemoterapi berbasis *nutraceuticals* juga dapat menimbulkan efek samping berupa komplikasi jantung (Ruhyanudin dkk., 2022). Salah satu cara mengatasi kanker yaitu dengan menginduksi sistem kekebalan tubuh yang berfungsi sebagai penekan awal serta perkembangan kanker, maupun sebagai pendorong proliferasi, infiltrasi, dan metastasis. Dalam hal ini, sistem imun memiliki peranan krusial dalam menghancurkan sel kanker hingga terjadi apoptosis yaitu kematian sel terprogram (Hack et al., 2020). Salah satu cara untuk menjaga sistem imun tetap optimal adalah dengan menggunakan imunomodulator, yaitu senyawa khusus yang dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tubuh (Kotala dan Kurnia, 2022). Oleh karena itu, dilakukan eksplorasi dan pengembangan dari sumber tanaman karena senyawa tanaman cenderung memiliki efek samping yang lebih rendah dibandingkan obat-obatan dan kemoterapi.

Salah satu sumber daya hayati laut di Indonesia adalah rumput laut (alga). Alga adalah penghasil polisakarida yang efisien dan semakin menarik perhatian karena berbagai fungsi biologisnya, seperti antikanker, aktivitas imunomodulator dan antioksidan. Sejauh ini, riset terhadap polisakarida dari alga hijau secara signifikan

lebih sedikit dibandingkan alga coklat dan merah (Cao dkk., 2022). Ciri paling menonjol dari polisakarida sulfat dari *Caulerpa racemosa* adalah struktur dan bioavailabilitas yang kaya dan beragam (Le dkk., 2022).

Berdasarkan uraian tersebut, diperlukan penelitian untuk menilai potensi sitotoksik ekstrak polisakarida sulfat *Caulerpa racemosa* terhadap sel kanker kolorektal WiDr menggunakan metode MTT assay. Penelitian ini penting sebagai dasar pengembangan terapi alternatif berbasis bahan alam yang lebih aman dan berpotensi digunakan sebagai terapi komplementer kanker kolorektal. Penelitian ini merupakan pengembangan dari studi pendahuluan (PKM-RE) yang telah mengonfirmasi potensi awal secara kualitatif. Pada skripsi ini, dilakukan pendalaman melalui uji sitotoksik kuantitatif (IC_{50}) untuk memvalidasi potensi *Caulerpa racemosa* sebagai agen kemopreventif yang terukur.

1.2 Teori

1.2.1 Kanker Kolorektal Sel WiDr

Kanker kolorektal merupakan kanker dengan insidensi dan mortalitas tinggi secara global. Berdasarkan *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) Tahun 2020, penyakit ini menempati urutan ketiga kanker tersering dan kedua penyebab kematian akibat kanker di seluruh dunia (Sung et al., 2021). Kanker kolorektal ditandai dengan pertumbuhan ganas pada lapisan usus besar atau rektum, dengan ciri khas berupa proliferasi sel yang tidak terkontrol, diferensiasi sel yang berlebihan, serta invasi dan metastasis sel (Husnah dkk., 2024). Induksi apoptosis adalah salah satu pendekatan terapi yang menjanjikan untuk pengobatan kanker. Proses ini memicu sel kanker untuk meningkatkan kemampuan apoptosisnya dan menghambat proliferasi sel kanker. Apoptosis adalah proses kematian sel yang terprogram secara teratur. Ketika pengaturan apoptosis terganggu, sel kanker dapat bertahan lebih lama dan mengumpulkan mutasi yang dapat meningkatkan kemampuannya untuk menyebar selama perkembangan tumor. Metode pengobatan kanker yang umum saat ini termasuk pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Namun, kemoterapi sering kali menghadapi tantangan seperti toksisitas terhadap sel normal, efek samping yang merugikan, dan resistensi obat. Penelitian menunjukkan bahwa *Caulerpa racemosa*, yang mengandung metabolit bioaktif seperti polisakarida sulfat, memiliki potensi sebagai agen antikanker dengan aktivitas proapoptosis dan anti-proliferatif pada sel kanker (Permatasari dkk., 2022).

Dalam respons terhadap agen sitotoksik, sel WiDr dapat mengaktifkan berbagai mekanisme adaptif termasuk upregulasi protein anti-apoptosis (Bcl-2 dan survivin), aktivasi jalur survival seperti PI3K/AKT/mTOR, serta induksi *autophagy* sebagai mekanisme protektif untuk mengatasi stres metabolik dan oksidatif (Chen et al., 2024). Namun demikian, sel WiDr tetap menunjukkan sensitivitas terhadap berbagai kelas agen antikanker termasuk senyawa bioaktif alami yang bekerja melalui mekanisme seperti induksi stres oksidatif, disfungsi mitokondria, atau modulasi jalur signaling spesifik. Studi menunjukkan bahwa agen yang dapat

menginduksi kerusakan mitokondria, meningkatkan produksi ROS, atau menghambat jalur survival seperti PI3K/AKT cenderung efektif dalam menginduksi apoptosis pada sel WiDr (Ghasemi et al., 2021).

Dalam konteks penelitian ini, penurunan viabilitas sel WiDr yang diamati setelah perlakuan ekstrak polisakarida sulfat mengindikasikan bahwa ekstrak tersebut mampu mengatasi sebagian mekanisme survival sel dan menginduksi kematian sel melalui jalur yang kemungkinan melibatkan stress oksidatif dan disfungsi mitokondria, sebagaimana tercermin dari penurunan aktivitas dehidrogenase mitokondria yang diukur melalui MTT assay. Perubahan morfologi yang teramati seperti cell rounding, shrinkage, dan detachment konsisten dengan proses apoptosis awal yang dipicu oleh agen sitotoksik (Chen et al., 2024).

1.2.2 Anggur Laut (*Caulerpa racemosa*)

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki garis pantai yang sangat panjang. Wilayah pesisir di Indonesia menyimpan berbagai sumberdaya alam yang memiliki nilai komersial tinggi yaitu salah satunya rumput laut (alga) (Rizkaprilisa dkk., 2023). Salah satu alga yang umum namun masih kurang diteliti dalam hal sifat antikankernya adalah *Caulerpa racemosa*, atau dikenal sebagai anggur laut karena bentuknya yang menyerupai anggur. Alga ini termasuk dalam kelompok rumput laut yang dapat dimakan, dengan *thallus* yang menjalar panjang, lunak, dan berwarna hijau muda serta banyak bercabang pendek. Biasanya ditemukan di perairan dangkal dengan substrat pasir dan karang (Qurniasih dkk., 2022).

Polisakarida sulfat dari *Caulerpa racemosa* umumnya tersusun dari unit monosakarida seperti galaktosa, glukosa, dan manosa, dengan gugus sulfat yang terikat pada posisi tertentu sehingga memengaruhi struktur tiga dimensinya dan menentukan aktivitas biologisnya (Magdugo et al., 2020). Dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan, kedudukan tanaman *Caulerpa racemosa* diklasifikasikan sebagai berikut (Pattarach et al., 2025):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Chlorophyta
Kelas	: Ulvophyceae
Ordo	: Bryopsidales
Famili	: Caulerpaceae
Genus	: <i>Caulerpa</i>
Spesies	: <i>Caulerpa racemosa</i>



Gambar 1. *Caulerpa racemosa* (Pattarach et al., 2025)

1.2.2 Polisakarida Sulfat dari *Caulerpa racemosa*

Polisakarida sulfat dari *Caulerpa racemosa* diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis penting, termasuk antioksidan, antiinflamasi, imunomodulator, dan antikanker (Akter et al., 2024). Polisakarida sulfat ini meningkatkan aktivitas imunostimulan dan ditemukan dalam jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan alga merah. Selain itu, polisakarida dengan kandungan gugus sulfat yang tinggi menunjukkan bioaktivitas yang lebih baik. Ciri khas dari polisakarida sulfat dalam *Caulerpa racemosa* adalah struktur dan bioavailabilitasnya yang kaya serta bervariasi (Le dkk., 2022). Efek imunomodulator polisakarida sulfat bersifat *biphasic* dan *context-dependent*: pada kondisi immunosupresi (seperti pada kemoterapi atau infeksi), polisakarida sulfat dapat meningkatkan proliferasi dan aktivasi sel imun termasuk makrofag, sel *Natural Killer Cell* (NK) (Cheng et al., 2021). Mekanisme antikankernya melibatkan kemampuan polisakarida melalui berbagai mekanisme molekuler, terutama dengan menginduksi apoptosis, menghambat proliferasi sel tumor, serta memodulasi jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam kelangsungan hidup dan progresi kanker. Senyawa ini dilaporkan mampu menurunkan ekspresi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Survivin, sekaligus meningkatkan aktivasi caspase, sehingga mendorong terjadinya kematian sel terprogram. Selain itu, polisakarida sulfat juga diketahui menghambat jalur *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) dan *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) yang berperan penting dalam regulasi proliferasi dan resistensi apoptosis pada sel kanker (Bhuyan et al., 2023).

Menariknya, polisakarida sulfat dari alga laut termasuk *Caulerpa racemosa* juga diketahui tidak bersifat toksik terhadap sel normal, bahkan menunjukkan efek protektif melalui peningkatan aktivitas antioksidan dan pemeliharaan integritas membran sel normal (Akter et al., 2024). Selain itu, polisakarida sulfat dapat mengganggu *autophagy flux* dengan menghambat fusi *autophagosome-lysosome*, menyebabkan akumulasi *autophagosome* yang disfungsi dan mengalihkan sel dari survival *autophagy* menuju *autophagic cell death* (Chen et al., 2024).

1.2.4 Studi *In vitro* dalam Penemuan Obat Anti Kanker

Studi *in vitro* merupakan tahap fundamental dalam *pipeline* penemuan obat antikanker yang memungkinkan evaluasi sistematis terhadap aktivitas sitotoksik senyawa kandidat secara terkontrol. Pendekatan ini menjadi langkah skrining awal yang esensial karena menawarkan efisiensi waktu, biaya yang lebih rendah dibandingkan uji *in vivo*, serta kemampuan untuk mengontrol variabel eksperimental dengan presisi tinggi. Dalam konteks pengembangan terapi antikanker berbasis bahan alam, uji *in vitro* memungkinkan identifikasi cepat senyawa bioaktif yang memiliki potensi sitotoksik sebelum dilanjutkan ke tahap pengujian yang lebih kompleks (Sanjai et al., 2024). Uji sitotoksitas *in vitro* berfungsi sebagai gerbang pertama dalam proses seleksi senyawa antikanker potensial. Metode ini memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan atau menginduksi kematian sel kanker pada kondisi terkontrol. Keunggulan utama pendekatan *in vitro* mencakup kemampuan untuk melakukan pengujian *throughput* tinggi terhadap banyak senyawa secara simultan, fleksibilitas dalam memodifikasi parameter uji seperti konsentrasi dan waktu paparan, serta kemudahan dalam melakukan analisis mekanistik pada tingkat seluler dan molekuler (Ghasemi et al., 2021).

Dalam konteks penemuan obat dari sumber alam seperti alga laut, uji *in vitro* sangat penting karena ekstrak alami umumnya mengandung campuran kompleks berbagai senyawa bioaktif. Pengujian *in vitro* memungkinkan evaluasi aktivitas sitotoksik total ekstrak sebelum dilakukan fraksinasi dan isolasi senyawa aktif spesifik. Data yang diperoleh dari tahap ini, terutama nilai IC_{50} dan pola konsentrasi-respon, memberikan informasi krusial untuk menentukan apakah suatu ekstrak atau senyawa layak dikembangkan lebih lanjut dalam proses penemuan obat (Kamiloglu et al., 2020).

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan melalui pengujian eksperimental selama ± 4 bulan yang mulai pada bulan April hingga Juli 2024. Proses preparasi sampel dilakukan di Laboratorium Terpadu dan Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Ekstraksi sampel di Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Uji kualitatif dan analisis FTIR di Laboratorium Kimia Terpadu fakultas MIPA Universitas Hasanuddin. Adapun uji sitoksisitas antikanker secara *in vitro* dilakukan di HUM-RC (*Hasanuddin University Medical Research Center*).

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi oven pengering dan blender yang digunakan pada tahap preparasi *Caulerpa racemosa* menjadi simplisia. Pada tahap ekstraksi, digunakan microwave untuk metode MAE, *centrifuge*, cawan porselen, dan *waterbath* untuk memperoleh ekstrak polisakarida sulfat. Selanjutnya, analisis dilakukan menggunakan spektrofotometer FTIR, sedangkan uji sitotoksisitas menggunakan laminar *air flow*, inkubator CO₂, mikroskop *inverted*, *haemocytometer*, *microplate* 96-well, dan *ELISA Reader* sebagai alat pembaca absorbansi MTT.

Bahan penelitian terdiri dari *Caulerpa racemosa* segar sebagai sampel utama yang dikeringkan menjadi serbuk simplisia sebelum proses ekstraksi digunakan. Bahan kimia untuk ekstraksi mencakup HCl 0,1 N, CaCl₂ 2%, etanol 96%, serta *aquadest* dan larutan iodin untuk uji kualitatif polisakarida. Pada tahap kultur sel digunakan sel WiDr, media DMEM, FBS, penicillin-streptomycin, amphotericin B, PBS, tripsin, reagen MTT, serta Tris-HCl untuk pembuatan larutan uji ekstrak sebelum dilakukan pengujian sitotoksisitas.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pengambilan dan Preparasi Sampel

Caulerpa racemosa diambil dari pantai Desa Laikang, Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan. Dilakukan preparasi dan sampel dioven selama 2 hari pada suhu 60°C dan ditimbang lagi untuk mengukur berat keringnya. Setelah pengeringan, sampel dihancurkan menjadi serbuk halus (simplisia), kemudian ditimbang untuk proses ekstraksi kandungan bioaktifnya (Salanti et al., 2022).

2.3.2 Ekstraksi *Caulerpa racemosa* dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Sebanyak 33,35 g simplisia *Caulerpa racemosa* ditambah HCl 0,1 N dengan rasio penambahan 1 : 3 (g/mL). Lalu diradiasi dengan gelombang mikro sebesar 450 watt selama 8 menit (Sari et al., 2020). Filtrat yang diperoleh ditambahkan CaCl_2 2% dan didiamkan semalam pada suhu 4°C lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit (Panjaitan dan Natalia, 2021). Filtratnya kemudian ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:1 hingga terbentuk endapan kembali. Endapan ditampung dan disimpan di atas cawan porselen dan di waterbath hingga mendapatkan bubuk (Manggau et al., 2021).

2.3.3 Uji Kualitatif Polisakarida

Sampel sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 5 mL *aquadest*, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 tetes. Ditambahkan larutan iodin sebanyak 2 tetes. Perubahan warna diamati selama pemrosesan. Penambahan larutan iodin pada polisakarida akan membentuk kompleks adsorpsi warna tertentu. Pati dengan iodin akan menghasilkan warna biru (Manggau et al., 2021).

2.3.4 Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Analisis FTIR dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat pada ekstrak *Caulerpa racemosa* dengan merekam spektrum pada rentang bilangan gelombang 340–4000 cm^{-1} (Nurfitriyana et al., 2022). Identifikasi gugus fungsi dilakukan dengan mencocokkan puncak serapan pada spektrum dengan data literatur. Gugus sulfat khas polisakarida sulfat umumnya muncul pada bilangan gelombang 1200–1270 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ikatan S=O (Soto-Vásquez et al., 2023).

2.3.5 Uji Sitotoksitas dan Selektivitas Antikanker secara *In vitro*

a. Preparasi Media Kultur Sel

Media kultur disiapkan dengan mencampurkan *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) sebanyak 100 mL dengan suplementasi *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak 5 mL sebagai sumber faktor pertumbuhan, serta penambahan 2 μL penicillin–streptomycin dan 2 μL amphotericin B sebagai antibiotik dan antijamur untuk mencegah kontaminasi mikroba. Komposisi media dengan penambahan FBS dan antimikroba ini umum digunakan dalam kultur sel mamalia untuk mempertahankan viabilitas, proliferasi, serta kondisi fisiologis sel selama pemeliharaan. Media kultur yang telah homogen selanjutnya dimasukkan ke dalam

flask kultur sebanyak 5 mL dan digunakan sebagai medium pemeliharaan sel WiDr (Tavares et al., 2024).

b. Thawing dan Inkubasi Sel WiDr

Sel WiDr yang ada dalam *cryotube* dikeluarkan dari *freezer* ditambahkan media DMEM 3 mL lalu di sentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Natan sel WiDr ditambahkan media DMEM sebanyak 4 mL sentrifugasi kembali dan dipindahkan di *flask* kultur sel yang berisi media kultur lalu diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam (Sjafaraenan et al., 2019).

c. Perhitungan Sel dan Penentuan Seeding Density

Perhitungan jumlah sel dilakukan menggunakan *haemocytometer* Neubauer setelah sel didetach dengan tripsin dan disuspensikan secara homogen dalam media kultur. Suspensi sel kemudian dicampur dengan larutan *Trypan Blue* untuk membedakan sel hidup dan sel mati, karena pewarna ini hanya masuk ke sel yang kehilangan integritas membrannya¹. Jumlah sel pada empat kotak besar *haemocytometer* dihitung dan dirata-ratakan, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran serta konstanta 10⁴ untuk memperoleh konsentrasi sel dalam satuan sel/mL. Rumus perhitungan yang digunakan Adalah (Piccinini et al., 2017):

$$\text{Jumlah Sel (sel/mL)} = \text{Rata – rata hitungan kotak} \times \text{Faktor pengenceran} \times 10^4$$

Setelah konsentrasi sel dihitung, viabilitas sel ditentukan berdasarkan proporsi sel hidup terhadap total sel yang teramati. Rumus viabilitas adalah (Piccinini et al., 2017):

$$\text{Viabilitas Sel (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel hidup}}{\text{Jumlah sel hidup} + \text{sel mati}} \times 100\%$$

Suspensi sel kemudian diencerkan hingga mencapai seeding density yang diperlukan untuk uji sitotoksisitas. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi kerja 5×10^3 sel/mL, dengan volume penanaman 100 μ L (0,1 mL) per well pada *microplate* 96-well. Jumlah sel per well dihitung menggunakan rumus (Piccinini et al., 2017):

$$\text{Jumlah Sel per Well} = \text{Konsentrasi sel (sel/mL)} \times \text{Volume (mL)}$$

Dengan konsentrasi 5×10^3 sel/mL dan volume 0,1 mL, jumlah sel yang ditanam Adalah (Piccinini et al., 2017):

$$5.000 \times 0,1 = 500 \text{ sel/well}$$

Penentuan seeding density dilakukan untuk memastikan jumlah sel berada pada rentang linearitas pertumbuhan, sehingga absorbansi MTT dapat merefleksikan viabilitas secara akurat². Seeding density yang terlalu rendah dapat menghasilkan absorbansi yang tidak stabil, sedangkan jumlah sel yang terlalu tinggi dapat menyebabkan konfluensi cepat dan mengubah metabolisme sel sehingga mengganggu respon sitotoksisitas (Piccinini et al., 2017).

d. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak

Pembuatan seri konsentrasi ekstrak dilakukan untuk menyiapkan rentang konsentrasi yang digunakan pada pengujian sitotoksitas metode MTT. Tahap ini dimulai dengan menyiapkan larutan stok ekstrak polisakarida sulfat pada konsentrasi tertentu, kemudian melakukan pengenceran bertahap menggunakan medium kultur DMEM hingga diperoleh seri konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/mL. Proses pembuatan dilakukan dalam kondisi aseptik di bawah laminar air flow untuk menjaga sterilitas dan konsistensi larutan (Pascayantri et al., 2021).

Penggunaan rentang konsentrasi didasarkan oleh penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa variasi 100–500 µg/mL efektif dalam menguji sitotoksitas ekstrak tanaman terhadap sel kanker WiDr. Pada penelitian tersebut, konsentrasi bertingkat mampu menghasilkan perbedaan viabilitas sel yang signifikan, sehingga rentang ini dipandang representatif untuk mendeteksi sensitivitas sel terhadap bahan uji. Oleh sebab itu, penggunaan seri konsentrasi 100–500 µg/mL dalam penelitian ini dianggap relevan dan sesuai dengan respons biologis yang umum ditunjukkan oleh sel WiDr terhadap paparan ekstrak alami (Rahayu dan Roosmarinto, 2017).

Larutan seri konsentrasi yang telah disiapkan kemudian dimasukkan ke microtube steril dan digunakan pada hari yang sama untuk mencegah degradasi senyawa bioaktif. Pembuatan seri konsentrasi yang terstandar ini memastikan paparan konsentrasi yang konsisten pada setiap sumur, sehingga hasil pengukuran viabilitas sel dan perhitungan IC₅₀ dapat diperoleh secara valid dan reproducible.

e. Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT Assay

Uji sitotoksitas dilakukan menggunakan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) untuk mengevaluasi viabilitas sel WiDr setelah diberi perlakuan ekstrak pada berbagai konsentrasi. Prinsip uji ini didasarkan pada kemampuan enzim dehidrogenase mitokondria sel hidup dalam mereduksi MTT menjadi kristal formazan berwarna ungu. Jumlah formazan yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel yang masih hidup, sehingga absorbansi yang dihasilkan dapat digunakan sebagai indikator viabilitas sel (Ghasemi et al., 2021).

Pelaksanaan uji dimulai dengan menanam sel WiDr pada *microplate* 96-well dengan seeding density 5×10^3 sel/well dan menginkubasinya selama 24 jam untuk mencapai fase pertumbuhan eksponensial. Setelah itu, medium diganti dengan medium kultur yang mengandung ekstrak pada seri konsentrasi 100–500 µg/mL dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Setiap perlakuan dilakukan dalam tiga kali pengulangan untuk memastikan reliabilitas data dan mendapatkan nilai rata-rata absorbansi yang representatif. Setelah perlakuan, medium pada setiap well dibuang secara hati-hati dan ditambahkan larutan MTT dengan konsentrasi 0,5 mg/mL. Plate kemudian diinkubasi selama 3–4 jam hingga terbentuk endapan kristal formazan dalam sel hidup, sesuai rekomendasi durasi inkubasi MTT (Sanjai et al., 2024).

f. Perhitungan Viabilitas Sel dan IC₅₀

Perhitungan viabilitas sel dilakukan berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dari pembacaan formazan hasil reduksi MTT pada panjang gelombang 570 nm. Nilai absorbansi dari setiap perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol sel untuk menentukan persentase sel hidup. Absorbansi formazan berbanding lurus dengan jumlah sel yang masih hidup sehingga dapat digunakan sebagai indikator kuantitatif viabilitas. Persentase viabilitas sel dihitung menggunakan rumus (Benov, 2021):

$$\text{Viabilitas Sel (\%)} = \frac{A_{\text{perlakuan}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{kontrol sel}} - A_{\text{blank}}} \times 100\%$$

Ket: $A_{\text{perlakuan}}$ = absorbansi sel setelah diberi ekstrak
 A_{kontrol} = absorbansi sel tanpa perlakuan
 A_{blank} = absorbansi kontrol media (*background*)

Nilai viabilitas sel dari berbagai konsentrasi ekstrak kemudian digunakan untuk menyusun kurva konsentrasi–respon. Kurva ini menggambarkan hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak dan penurunan viabilitas sel. Nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menurunkan viabilitas sel hingga 50%, ditentukan melalui analisis regresi non-linear menggunakan model *sigmoidal concentration–response curve*. Nilai IC₅₀ merupakan parameter penting untuk menilai potensi sitotoksik suatu senyawa, di mana nilai IC₅₀ yang lebih rendah menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih kuat (Ghasemi et al., 2021).

Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak pengolah data biologis, untuk memastikan akurasi perhitungan dan visualisasi kurva konsentrasi–respon. Hasil perhitungan viabilitas dan penentuan IC₅₀ selanjutnya digunakan untuk mengevaluasi potensi ekstrak polisakarida sulfat sebagai agen sitotoksik terhadap sel WiDr.

g. Pengamatan Mikroskopis Morfologi Sel

Pengamatan morfologi sel dilakukan untuk menilai perubahan struktur sel WiDr setelah perlakuan ekstrak polisakarida sulfat pada berbagai konsentrasi. Observasi ini bertujuan untuk melihat tanda-tanda awal kerusakan sel yang tidak selalu dapat ditangkap melalui analisis kuantitatif MTT. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* pada perbesaran 100–400× untuk mendokumentasikan perubahan bentuk sel, kepadatan sel, serta pola pertumbuhan sel sebelum dan sesudah perlakuan (Kamiloglu et al., 2020).

Sel WiDr normal umumnya menunjukkan morfologi epitelial poligonal dengan tepi sel yang jelas, menyebar merata, dan melekat kuat pada permukaan kultur. Setelah diberi perlakuan ekstrak, sel diamati mengalami perubahan morfologi seperti sel tampak lebih bulat, mengecil, kehilangan pelekatan (*rounding and detachment*), serta munculnya vakuola sitoplasmik atau fragmentasi sel, yang merupakan ciri apoptosis maupun kerusakan membran. Perubahan ini diamati secara bertahap berdasarkan peningkatan konsentrasi ekstrak untuk memastikan adanya hubungan antara konsentrasi dan respons seluler (Chen et al., 2024).

Pengamatan dilakukan sebelum penambahan MTT dan sesudah inkubasi perlakuan untuk mendukung hasil pengukuran viabilitas secara kuantitatif. Dokumentasi visual difoto menggunakan kamera mikroskop untuk digunakan sebagai data pendukung dalam interpretasi hasil sitotoksitas. Metode ini digunakan sebagai penilaian kualitatif untuk mengonfirmasi pola penurunan viabilitas sel yang diperoleh dari analisis absorbansi MTT (Kamiloglu et al., 2020).

2.4 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

2.4.1 Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan hasil pengamatan dan pengukuran pada setiap tahapan penelitian. Data morfologi sel dikumpulkan melalui pengamatan mikroskopis menggunakan mikroskop *inverted* pada perbesaran 100–400 $\times$. Observasi dilakukan terhadap perubahan bentuk, kepadatan, dan pola pertumbuhan sel WiDr setelah perlakuan ekstrak. Dokumentasi visual diambil menggunakan kamera mikroskop untuk digunakan sebagai data kualitatif pendukung.

Data kuantitatif viabilitas sel diperoleh dari pembacaan absorbansi kristal formazan hasil reduksi MTT menggunakan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 570 nm. Nilai absorbansi dicatat untuk setiap konsentrasi perlakuan serta kontrol, kemudian digunakan dalam perhitungan persentase viabilitas sel. Selain itu, data karakterisasi ekstrak diperoleh dari spektrum FTIR yang direkam pada rentang bilangan gelombang 340–4000 cm^{-1} , yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi ekstrak *Caulerpa racemosa* dan membandingkannya dengan literatur.

2.4.2 Teknik Analisis Data

Data absorbansi MTT yang diperoleh dianalisis untuk menghitung persentase viabilitas sel menggunakan rumus perbandingan absorbansi perlakuan terhadap kontrol. Persentase viabilitas tersebut kemudian digunakan untuk menyusun kurva konsentrasi–respon guna menentukan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi ekstrak yang menyebabkan penurunan viabilitas sel sebesar 50%. Penentuan IC_{50} dilakukan dengan analisis regresi non-linear menggunakan model *sigmoidal concentration–response curve* melalui perangkat lunak pengolah data seperti *GraphPad Prism*. Analisis ini memastikan hasil yang akurat dan mampu menggambarkan potensi sitotoksitas ekstrak.

Data spektrum FTIR dianalisis dengan mengidentifikasi puncak serapan yang sesuai dengan gugus fungsi tertentu berdasarkan referensi literatur, termasuk penentuan keberadaan gugus sulfat yang ditunjukkan oleh pita serapan pada bilangan gelombang sekitar 1200–1270 cm^{-1} . Data mikroskopis dianalisis secara deskriptif untuk menilai perubahan morfologi sel dan mengonfirmasi hasil uji viabilitas MTT. Semua data diintegrasikan untuk menghasilkan interpretasi komprehensif terkait potensi sitotoksik ekstrak polisakarida sulfat terhadap sel WiDr.