

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI ETIL ASETAT  
HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L.)  
TERHADAP KULTUR SEL HELA**



**Oleh :**

**Desi Ratna Permatasari**

**20144258A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA**

**2018**

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI ETIL ASETAT  
HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L.)  
TERHADAP KULTUR SEL HELA**

*SKRIPSI*



*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai  
derajat Sarjana Farmasi (S.F)  
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi*

**Oleh :**

**Desi Ratna Permatasari  
20144258A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2018**

**PENGESAHAN SKRIPSI**  
berjudul

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI ETIL ASETAT  
HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L)  
TERHADAP KULTUR SEL HELA**

Oleh :

Desi Ratna Permatasari  
20144258A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal :

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi



Prof. Dr. R. A. Oetari, S.U., MM., M. Sc., Apt.

Pembimbing,



Mamik Ponco Rahayu, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping



Ghani Nurhiana Fadma Sari, M.Farm., Apt

PENGUJI :

1. Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt
2. Dr. Ika Purwidyaningrum, M.Sc., Apt
3. Dr. Ana Indrayati, M.Si
4. Mamik Ponco Rahayu, M.Sc., Apt

1)   
2)   
3)   
4) 

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 4 Desember 2018

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'D' followed by several vertical strokes and a horizontal line at the bottom.

Desi Ratna Permatasari

## **MOTTO**

Keajaiban adalah nama lain dari kerja keras.

Man jadda wa jadda. Man shabara zhafira. Man sara darbi ala washala.  
(Siapa yang bersungguh-sungguh akan berhasil. Siapa yang sabar akan beruntung.  
Siapa yang berjalan di jalan-Nya akan sampai)

My suffering became easier because my lord promised me ease, not once but  
twice (QS Ash-Sharh [94] : 5-6)

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil‘alamiin. Segala puji syukur hanyalah milik Allah SWT. Rabb Penguasa alam semesta, yang hanya kepada-Nyalah kita berserah diri. Atas karunia sehat, iman dan islam dari Allah penulis diberikan kemudahan dalam penelitian, penyusunan, hingga terselesainya skripsi ini dengan judul “Uji Aktivitas Sitotoksik Fraksi Etil Asetat Herba Kemangi (*Ocimum basilicum* L) Terhadap Kultur Sel Hela” dengan baik. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat mencapai gelar derajat Sarjana pada Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keberhasilan penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari doa, bantuan, dukungan, motivasi dan kesempatan yang diberikan kepada penulis selama penelitian hingga terselesainya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih dengan sepenuh hati. Semoga Allah memberi balasan yang baik, kepada :

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. DR. RA. Oetari, S.U., MM., MSc., Apt selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Mamik Ponco Rahayu, M.Sc., Apt selaku Pembimbing Utama dan Ghani Nurfiana Fadma Sari, M.Farm., Apt selaku Pembimbing Pendamping yang telah berkenan mengorbankan waktunya guna membimbing, memberi nasehat, dan mengarahkan penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk skripsi ini.
5. Dr. Ika Purwidyaningrum, M.Sc., Apt selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk skripsi ini.
6. Dr. Ana Indrayati, M.Si selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk skripsi ini.
7. Direktur dan staf laboratorium UGM yang telah memberikan izin penelitian dan banyak membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian.

8. Staf laboratorium USB yang telah memberikan izin penelitian dan banyak membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian.
9. Ibu dan ayah tersayang, Sri Alvini Pangestuningsih dan Gambul Wasis Prayitno yang senantiasa memberikan dukungan, motivasi, kasih sayang dan perhatian yang tiada henti serta doa yang selalu dipanjatkan kepada Allah sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini.
10. Saudara-saudara saya Lyva Kusumaningrum dan Retno Wulandari yang selalu memberikan bantuan, semangat dan motivasi bagi saya.
11. Sahabat terbaik saya Hilda, Zainab, Farha, Khiny, Febri, Ani, Ica, Kiki, Solecha, Puja, Dita, dan Fikri yang telah membantu dan memotivasi dalam menyelesaikan skripsi ini.
12. Sahabat-sahabat saya di FSTOA Sekar, Fania, Evyta, Rifky, Hadi, Alfa dan teman-teman yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu terimakasih atas dorongan dan semangat yang kalian berikan.
13. Teman-teman seperjuangan angkatan 2014 Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
14. Segenap civitas akademika dan seluruh staff dan karyawan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk meningkatkan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan tambahan ilmu dan bermanfaat bagi semua.

Surakarta, Januari 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1.Latar Belakang .....	1
1.2.Rumusan Masalah .....	2
1.3.Tujuan Penelitian .....	3
1.4.Kegunaan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Tanaman Kemangi. ....	4
1. Sistematika Tanaman. ....	4
2. Nama Daerah.....	4
3. Morfologi Tanaman.....	4
4. Kandungan Kimia .....	5
5. Kegunaan Tanaman.....	7
B. Simplisia .....	8
1. Pengertian Simplisia.....	8
2. Pengumpulan Simplisia.....	8
3. Pengeringan .....	8
4. Pembuatan Serbuk.....	9
C. Penyarian.....	9
1. Penyarian .....	9
2. Maserasi. ....	9
3. Fraksinasi. ....	10
4. Pelarut.....	10
D. Kromatografi Lapis Tipis.....	12
E. Kanker .....	13
F. Kanker Serviks .....	14
G. Obat Antikanker .....	15
H. Siklus Sel.....	17
I. Sel Hela .....	18
J. Sel Vero.....	18
K. Uji Sitotoksik .....	19
L. Metode MTT .....	20
M. Landasan Teori.....	21
N. Hipotesis.....	23
O. Kerangka Pikir Penelitian.....	23
BAB III METODE PENELITIAN.....	24

A. Populasi Sampel .....	24
B. Variabel Penelitian. ....	24
1. Identifikasi variabel utama. ....	24
2. Klasifikasi variabel utama. ....	24
3. Definisi operasional variabel utama. ....	25
C. Tempat Penelitian.....	26
D. Alat Dan Bahan .....	26
1. Alat. ....	26
2. Bahan.....	26
E. Jalannya Penelitian. ....	27
1. Determinasi tanaman kemangi. ....	27
2. Pengumpulan herba kemangi. ....	26
3. Pengeringan herba kemangi. ....	27
4. Pembuatan serbuk kemangi.....	27
5. Karakterisasi serbuk herba kemangi.. ....	27
6. Pembuatan ekstrak herba kemangi.. ....	28
7. Karakterisasi ekstrak etanol herba kemangi.....	29
8. Pembuatan fraksi etil asetat herba kemangi.. ....	30
9. Penetapan persen rendemen. ....	30
10. Uji kualitatif senyawa kimia dengan tabung.....	30
11. Identifikasi senyawa kimia menggunakan KLT.....	31
12. Uji aktivitas senyawa. ....	32
F. Analisa Data. ....	35
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	39
1. Determinasi tanaman kemangi.....	39
2. Hasil pembuatan serbuk... ..	39
3. Hasil karakterisasi serbuk. ....	40
3.1 Hasil pemeriksaan organoleptis.....	40
3.2 Hasil penetapan kadar air... ..	40
3.3 Hasil penetapan susut pengeringan.. ....	41
3.4 Hasil penetapan kadar sari larut air.. ....	41
3.5 Hasil penetapan kadar sari larut etanol... ..	42
4. Hasil pembuatan ekstrak etanol.. ....	42
5. Hasil rendemen fraksi etil asetat .....	43
6. Hasil karakterisasi ekstrak.....	43
6.1 Hasil pemeriksaan organoleptis.....	43
6.2 Hasil penetapan kadar air... ..	43
6.3 Hasil penetapan susut pengeringan.. ....	43
7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi etil asetat.. ....	44
7.1 Identifikasi dengan metode tabung (reaksi warna).. ....	44
7.2 Identifikasi dengan metode KLT.....	45
8. Hasil uji sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi.....	50
DAFTAR PUSTAKA .....	66

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Skema sederhana dasar molekular penyakit kanker.....	14
Gambar 2. Ilustrasi umum siklus sel.....	17
Gambar 3. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan.....	20
Gambar 4. Kerangka Pikiran Penelitian.....	24
Gambar 5. Skema bilik hitung dalam <i>haemocytometer</i> .....	34
Gambar 6. Skema pembuatan fraksi etil asetat herba kemangi .....	37
Gambar 7. Skema uji sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi .....	38
Gambar 8. Profil KLT pada identifikasi senyawa golongan flavonoid .....	46
Gambar 9. Profil KLT pada identifikasi senyawa golongan alkaloid.....	47
Gambar 10. Profil KLT pada identifikasi senyawa golongan tanin.....	48
Gambar 11. Profil KLT pada identifikasi senyawa gol. steroid/triterpenoid.....	49
Gambar 12. Morfologi sel HeLa dan sel Vero .....	51
Gambar 13. Morfologi sel HeLa setelah 24 jam perlakuan .....	54
Gambar 14. Morfologi sel HeLa setelah penambahan MTT pada perlakuan .....	55
Gambar 15. Morfologi sel Vero setelah penambahan MTT pada perlakuan.....	56
Gambar 16. Grafik persentase sel HeLa yang hidup.....	59
Gambar 17. Grafik nilai IC <sub>50</sub> perlakuan sel HeLa.....	61
Gambar 18. Grafik persentase nilai IC <sub>50</sub> sel Vero yang hidup .....	58

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
1. Rendemen berat herba kering terhadap berat herba basah.....	40
2. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk herba kemangi.....	40
3. Hasil penetapan kadar air serbuk herba kemangi.....	40
4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk herba kemangi.....	41
5. Hasil penetapan kadar sari larut air.....	41
6. Hasil penetapan kadar sari larut etanol... ..	42
7. Hasil rendemen ekstrak etanol herba kemangi... ..	43
8. Hasil rendemen fraksi etil asetat herba kemangi... ..	43
9. Hasil pemeriksan organoleptis ekstrak etanol herba kemangi.....	43
10. Hasil penetapan kadar air ekstrak herba kemangi.....	43
11. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak herba kemangi.....	44
12. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi etil asetat... ..	45
13. Hasil identifikasi senyawa golongan flavonoid secara KLT.. ..	46
14. Hasil identifikasi senyawa golongan alkaloid secara KLT.....	47
15. Hasil identifikasi senyawa golongan tanin secara KLT.....	48
16. Hasil identifikasi senyawa golongan steroid/ triterpenoid secara KLT.....	49
17. Hasil perhitungan % sel hidup pelarut DMSO terhadap sel Hela.....	57
18. Hasil perhitungan % sel hidup ekstrak etanol terhadap sel HeLa .....	58
19. Hasil perhitungan % sel hidup fraksi etil asetat terhadap sel HeLa .....	58
20. Hasil perhitungan % sel hidup cisplatin terhadap sel HeLa.....	59
21. Interpretasi koefisien nilai korelasi (r) .....	60
22. Hasil perhitungan % sel hidup efraksi etil asetat terhadap sel Vero.....	62

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
1. Hasil Determinasi Herba Kemangi ( <i>Ocimum basilicum</i> L.).....	72
2. Surat ijin penelitian.....	73
3. Surat keterangan selesai penelitian... ..	74
4. Foto jalannya penelitian .....	75
5. Perhitungan rendemen.....	79
6. Perhitungan kadar air serbuk.....	80
7. Perhitungan susut pengeringan serbuk.....	81
8. Perhitungan kadar sari larut air... ..	82
9. Perhitungan kadar sari larut etanol.....	83
10. Perhitungan kadar air ekstrak.....	84
11. Penetapan susut pengeringan ekstrak.....	85
12. Skrining fitokimia ekstrak & fraksi dengan metode tabung... ..	86
13. Hasil pengujian kandungan menggunakan KLT.....	88
14. Perhitungan jumlah sel menggunakan <i>haemocytometer</i> .....	91
15. Perhitungan volume panen sel ... ..	92
16. Perhitungan pembuatan larutan stok dan larutan seri.. ..	93
17. Morfologi sel HeLa setelah perlakuan .....	95
18. Perhitungan IC <sub>50</sub> .....	101
19. Perhitungan indeks selektivitas .....	106

## DAFTAR SINGKATAN

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
PBS	<i>Phospat Buffer Saline</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfoksida</i>
SDS	<i>Sodium Dodesil Sulfat</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibition concentration 50</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>

## INTISARI

**DESI, RP., 2018, UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI ETIL ASETAT HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L) TERHADAP KULTUR SEL HELA, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Kanker leher rahim merupakan salah satu penyebab kematian wanita terbesar di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dilaporkan memiliki potensi penghambatan perkembangan sel kanker melalui aktivitas apoptosis pada sel kanker leher rahim HeLa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek fraksi etil asetat herba kemangi terhadap aktivitas sitotoksik pada sel kanker leher rahim HeLa dan selektivitasnya terhadap sel Vero (normal).

Uji aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi dan cisplatin diuji dengan metode MTT. Prinsip kerja metode MTT adalah dengan mengukur aktivitas dehidrogenase mitokondria pada sel-sel hidup yang memiliki kemampuan untuk mengkonversi MTT menjadi formazan. Pengujian sitotoksik fraksi etil asetat dilakukan pada konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81  $\mu\text{g/mL}$  dan cisplatin pada konsentrasi 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56  $\mu\text{g/mL}$ .

Hasil penelitian ini menunjukkan  $\text{IC}_{50}$  fraksi etil asetat herba kemangi pada sel HeLa sebesar 169,91  $\mu\text{g/mL}$  dan nilai  $\text{IC}_{50}$  cisplatin sebesar 16,95  $\mu\text{g/mL}$ . Efek sitotoksik cisplatin lebih besar daripada efek sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi. Fraksi etil asetat herba kemangi tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel Vero dengan nilai indeks selektivitas 4.0782<sup>14</sup>. Senyawa yang diduga berperan dalam penghambatan aktivitas sitotoksik pada fraksi etil asetat adalah senyawa golongan flavonoid, fenolik dan steroid/triterpenoid.

Kata kunci : kanker serviks, sel HeLa, Kemangi (*Ocimum Basilicum* L), fraksi etil asetat herba kemangi, sitotoksik.

## ABSTRACT

**DESI, RP., 2018, THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF ETHYL ACETATE FRACTION OF BASIL (*Ocimum basilicum* L) HERBS ON HELA CELL CULTURES, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA**

Cervical cancer is one of leading cause of cancer death in women in developing countries including Indonesia. Basil (*Ocimum basilicum* L.) is reported had cytotoxic effect and caused cell death via apoptosis cervical cancer (HeLa). The aims of the study was to identify the cytotoxic activity of ethyl acetate fraction of basil herb on HeLa cancer cells and the selectivity to Vero (normal) cells.

The cytotoxic activity test of ethyl acetate fraction of basil herb and cisplatin was tested by MTT method. The principle of the MTT method is to measure the activity of mitochondrial dehydrogenase in living cells that have the ability to convert MTT into formazan. The cytotoxic test of the ethyl acetate fraction performed at concentration 500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15,625; 7.81  $\mu\text{g/mL}$  and cisplatin at concentrations 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3,125; 1.56  $\mu\text{g/mL}$ .

The results of this study showed that ethyl acetate fraction of basil herb in HeLa cell with  $\text{IC}_{50}$  value 169,9144  $\mu\text{g/mL}$  and  $\text{IC}_{50}$  cisplatin was 16,954  $\mu\text{g/mL}$ . The cisplatin cytotoxic effect is greater than the cytotoxic effect of ethyl acetate fraction of basil herb. The ethyl acetate fraction of basil herb doesn't have cytotoxic effect on Vero cell with selectivity index value of 4,078<sup>14</sup>. The ethyl acetate fraction of basil herb showed kemopreventive agent potency. The group compounds who have activity cytotoxic in ethyl acetate fraction are flavonoids, phenolic and steroid / triterpenoid.

Keywords: cervical cancer, HeLa cell, basil (*Ocimum Basilicum* L), ethyl acetate fraction of basil herb, cytotoxic.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Kanker menjadi masalah utama kesehatan di seluruh dunia dan merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia. Menurut laporan Kemenkes RI (2015), setiap tahun jumlah penderita kanker di dunia bertambah 6,25 juta orang, dua per tiga dari penderita kanker di dunia berada di negara-negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia. Di Indonesia sendiri, diperkirakan 15.000 kasus baru kanker serviks terjadi setiap tahunnya, sedangkan angka kematiannya sekitar 7.500 kasus per tahun (Emilia 2010).

Banyak faktor penyebab terjadinya kanker serviks, baik internal maupun eksternal. Faktor internal terutama keberadaan gen-gen yang berperan pada siklus sel yang telah menjadi pusat perhatian dalam hubungannya terhadap proses terjadinya pertumbuhan tumor. Dalam hubungannya dengan pertumbuhan tumor, terdapat dua golongan gen, pertama adalah kelompok pemicu terjadinya tumor yang lazim disebut tumor onkogen, kedua adalah kelompok penekan terjadinya tumor yaitu tumor *suppressor gene* dan apoptosis (Prayitno *et al.* 2005)

Faktor eksternal penyebab terjadinya kanker serviks uteri ada dua yaitu, yang telah dibuktikan dan yang diperkirakan. Faktor yang telah dibuktikan antara lain, wanita dengan pasangan seksual yang banyak dan wanita yang memulai hubungan seksual pada usia muda, memiliki pasangan seksual yang beresiko, hamil di usia muda dan jumlah kehamilan atau manajemen persalinan yang tidak tepat, infeksi *Human Papilloma Virus* dan merokok. Faktor yang diperkirakan antara lain, kontrasepsi oral, diet rendah karotenoid dan defisiensi asam folat, etnis dan faktor sosial dan pekerjaan (Rasjidi 2009)

Pengobatan terhadap kanker dapat dilakukan melalui operasi, radiasi atau dengan memberikan kemoterapi. Penggunaan antikanker yang ideal adalah antikanker yang memiliki toksisitas selektif artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel jaringan normal. Antikanker yang ada sekarang pada umumnya menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan

menimbulkan toksisitas karena menghambat pembelahan sel normal yang proliferasinya cepat antara lain sumsum tulang, mukosa saluran cerna, folikel rambut dan jaringan limfosit (Kurnijasanti 2008). Pengembangan terapi yang ideal diperlukan untuk menekan angka kematian, salah satunya menggunakan bahan alam. Hal ini dimaksudkan untuk meminimalkan terjadinya resistensi dan efek samping pengobatan

Salah satu tumbuhan yang dapat dikembangkan sebagai agen antikanker adalah kemangi. Kemangi bersifat sebagai adaptogen, di antaranya memiliki beberapa efek farmakologi seperti imunomodulator, anti-stress, hepatoprotektif, kemopreventif, dan anti-inflamasi (Niture *et al.* 2006). Senyawa kimia yang terkandung di dalam kemangi diantaranya adalah monoterpen, limonen, myrcen, terpinolen, flavonoid (kuercetin, kaempferol, rutin), fenolik (asam p-coumaric acid, asam kafeat, asam rosmarinik, asam caftaric), minyak atsiri (isoeugenol, eugenol), vitamin (A, C, E, K), steroid (Marwat *et al.* 2011; Zarlaha *et al.* 2014).

Penelitian dari Ismiyati & Nurhaeni (2016) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun kemangi dengan nilai  $IC_{50}$  209  $\mu\text{g/mL}$  memiliki potensi sebagai agen kemopreventif melalui aktivitas sitotoksik dan induksi apoptosis terhadap sel kanker leher rahim HeLa. Isolasi asam kafeat kemangi memiliki aktivitas sitotoksik pada sel HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  4,17  $\mu\text{g/mL}$  (Zarlaha *et al.* 2014). Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil isolasi dan fraksinasi memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak etanol. Rendahnya aktivitas sitotoksik dalam ekstrak etanol 96% herba kemangi dapat disebabkan karena di dalam ekstrak etanol masih terdapat senyawa polar, nonpolar, maupun semipolar yang kompleks sehingga kandungan senyawa yang memiliki efek sitotoksik sangat kecil, dan senyawa yang masih kompleks tersebut menyebabkan efek toksiknya saling mempengaruhi (Djajanegara & Wahyudi 2009).

Berdasarkan latar belakang di atas, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai uji aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel kanker serviks (sel HeLa) dan selektifitasnya terhadap sel Vero (normal), serta mengidentifikasi golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat herba kemangi yang memiliki aktivitas sitotoksik.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

Pertama, apakah fraksi etil asetat herba kemangi memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel HeLa?

Kedua, berapakah indeks selektivitas fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel Vero?

Ketiga, apakah golongan senyawa kimia yang berperan dalam aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi?

## **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah :

Pertama, untuk mendapatkan data aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi terhadap kultur sel HeLa.

Kedua, untuk mengetahui indeks selektivitas fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel Vero

Ketiga, untuk mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi etil asetat herba kemangi yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel HeLa.

## **D. Kegunaan Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang kemampuan fraksi etil asetat herba kemangi dalam aktivitas sitotoksiknya sebagai obat alternatif dalam pengobatan kanker serviks. Memberikan kontribusi terhadap ilmu pengetahuan terhadap penelitian-penelitian kanker serviks selanjutnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tanaman Kemangi (*Ocimum basilicum* L.)

##### 1. Sistematika tumbuhan

Klasifikasi tanaman kemangi adalah sebagai berikut (Bilal *et al.* 2012):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Keluarga	: Lamiaceae
Genus	: <i>Ocimum</i>
Spesies	: <i>basilicum</i>
Nama Binomial	: <i>Ocimum basilicum</i> L.

##### 2. Nama daerah

Tanaman kemangi memiliki nama yang berbeda-beda di daerah Indonesia, antara lain Sumatera : selaseh (Melayu); Jawa : solanis (Sunda), selasih (Jawa Tengah); Sulawesi : amping (Minahasa) (Hutapea 2001).

##### 3. Morfologi tanaman

Tanaman kemangi merupakan tanaman tegak, bercabang banyak, tanaman semusim, herbal aromatik yang tingginya dapat mencapai 0,3-1 meter. Batang dan cabangnya berbentuk segi empat, berwarna hijau kekuningan dan terdapat bulu pada batang terutama pada bagian batang muda (Siemonsma & Pileuk 1994).

Bentuk daun sederhana dan saling berhadapan silang dengan ujung daun ber bentuk runcing serta panjang tangkai daun mencapai 2 cm. Helai daun berbentuk bulat panjang dengan ukuran panjang daun mencapai 5 cm dan lebar daun mencapai 2,5 cm (Hadipoentyanti & Wahyuni 2008).

Bunga kemangi merupakan bunga majemuk yang panjangnya dapat mencapai 15 cm, tersusun berhadapan silang dengan 6 bunga membentuk lingkaran (kerangka semu) yang masing-masing terpisah dengan jarak mencapai 3 cm, berbentuk sederhana atau bercabang. Ibu tangkai bunga dan porosnya berbentuk segi empat. Panjang daun pelindung pada bunga adalah 2-3 mm berbentuk bulat panjang serta berbulu. Panjang tangkai bunga mencapai 4 mm, sangat bengkok pada bagian atas. Kelopak bunga berbelah dua dengan panjang 2-2,5 dan berbulu putih pada bagian luarnya serta berwarna putih. 8 Mahkota bunga berbentuk tabung berbibir dua dengan ukuran 4 mm dan berwarna putih. Terdapat 4 benang sari yang berbentuk ramping dengan 2 benang sari yang lebih panjang. Putik dengan 4 bakal biji dan 4 bakal buah serta 2 kepala putik (Siemonsma & Piluek 1994).

#### **4. Kandungan kimia**

Beberapa bahan kimia yang terkandung pada seluruh bagian tanaman kemangi diantaranya 1,8 sineol, anhol, apigenin, stigmasterol, triptofan, tanin, sterol, dan boron (Hariana 2007). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kemangi mengandung monoterpen, limonen, myrcen, terpinolen, flavonoid (quercetin, kaempferol, rutin), fenolik (asam p-coumaric acid, asam kafeat, asam rosmarinik, asam caftaric), minyak atsiri (isoeugenol, eugenol), vitamin (A, C, E, K), steroid (Marwat *et al.* 2011; Zarlaha *et al.* 2014). Menurut Peter (2002) dan Meyer *et al.* (1982), daun kemangi mengandung tannin (4,6%), flavonoid, steroid/triterpenoid, minyak atsiri (2%), asam heksauronat, pentosa, xilosa, asam metil homoanisat, molludistin, dan asam ursolat. Senyawa  $\beta$ -sitosterol, asam rosmarinik, apigenin, luteolin dan asam karnosik juga dilaporkan terkandung dalam tanaman kemangi (Baliga *et al.* 2013).

**4.1. Tanin.** Tanin merupakan suatu zat kompleks yang terdapat campuran polifenol yang sukar dipisahkan, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit, sehingga dapat digunakan menjadi pertahanan bagi tumbuhan, pembantu mengusir hewan pemangsa tumbuhan, mempunyai aktifitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tunas dan dapat mendenaturasi protein. Tanin dapat larut air tapi tidak larut dalam pelarut organik (Robinson 1995).

**4.2. Flavanoid.** Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Berbagai jenis senyawa, kandungan dan aktivitas antioksidatif flavonoid sebagai salah satu kelompok antioksidan alami yang terdapat pada sereal, sayur-sayuran dan buah telah banyak dipublikasikan. Kemampuan flavonoid sebagai antioksidan telah banyak diteliti belakangan tahun ini, dimana flavonoid memiliki kemampuan untuk merubah atau mereduksi radikal bebas dan juga sebagai anti radikal bebas sehingga antioksidan penting dalam memelihara kesehatan. Menurut Sunarni (2005), radikal bebas yang berlebih dalam tubuh dapat menyebabkan proses pembentukan kanker. Oleh karena itu, pemberian sumber antioksidan dari luar perlu dilakukan untuk membantu tubuh mengatasi stress oksidatif.

Flavonoid berperan dalam inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, inhibisi angiogenesis, dan pembalikan resistensi multi-obat atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Ren *et al.* 2003). Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Pelarut polar seperti etanol, metanol, etilasetat, atau campuran dari pelarut tersebut dapat digunakan untuk mengekstrak flavonoid dari jaringan tumbuhan (Rijke 2005).

**4.3. Steroid.** Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Dahulu sering digunakan sebagai hormon kelamin, asam empedu, dll. Tetapi pada tahun-tahun terakhir ini makin banyak senyawa steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan. Tiga senyawa yang biasa disebut fitosterol terdapat pada hampir setiap tumbuhan tinggi yaitu : sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Harborne 1987; Robinson, 1995).

**4.4. Asam Ursolat.** Asam ursolat adalah suatu asam triterpen pentasiklik, yang biasanya digunakan dalam kosmetika, juga mampu menghambat berbagai jenis sel kanker dengan menghalangi jalur aktivasi STAT3 dan sel-sel fibrosarkoma dengan mengurangi ekspresi matriks metalloproteinase-9 yang bertindak melalui reseptor glukokortikoid. Asam ini juga mengurangi proliferasi sel-sel kanker dan menginduksi apoptosis. Asam ursolat diketahui memiliki

aktivitas antikanker dengan menghambat peristiwa karsinogenesis, promosi kanker, induksi differensiasi sel kanker, dan angiogenesis (Shishodia *et al.* 2003).

**4.5. Asam Kafeat.** Asam kafeat atau *kafeate acid* adalah senyawa fenolik yang terdapat dalam ekstrak kemangi. Asam kafeat pada tanaman kemangi telah menunjukkan aktivitas sitotoksiknya pada 4 sel kanker yaitu sel HeLa, sel FemX, sel K562 dan sel SKOV3 dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 4,17±0,26 ; 5,46±1,91 ; 13,11±0,12 ; 4,89±3,43 µg/ml (Zarlaha *et al.* 2014).

**4.6. Asam Rosmarinik.** Asam rosmarinik adalah senyawa fenolik, yang memberikan kontribusi banyak untuk dunia kesehatan. Asam rosmarinik telah menunjukkan beberapa aktivitas biologis, seperti hepatoprotektif, anti-inflamasi, antiangiogenic, antitumor, antidepresan, *antineurodegenerative*, minhibitor HIV-1 dan antioksidan (Furtado *et al.* 2009). Asam rosmarinik pada tanaman kemangi telah menunjukkan aktivitasnya pada 4 sel kanker yaitu sel HeLa, sel FemX, sel K562 dan sel SKOV3 dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 41,29±1,28 ; 53,24±3,24 ; 29,51±0,72 ; 59,24±1,06 µg/ml (Zarlaha *et al.* 2014).

**4.7. Eugenol.** Eugenol merupakan salah satu komponen minyak atsiri yang telah sejak lama digunakan untuk tujuan pengobatan. Penelitian sebelumnya menyebutkan eugenol pada tanaman kemangi dapat menghambat pertumbuhan 4 sel kanker yaitu sel HeLa, sel FemX, sel K562 dan sel SKOV3 dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 16,26±3,44 ; >200 ; 10,18±2,77 ; 27,84±0,88 µg/ml (Zarlaha *et al.* 2014).

## **5. Kegunaan tanaman**

Tanaman kemangi berkhasiat sebagai antidiabetes, antifungi, antimikroba, kardioprotektif, antiemetik, antispasmodik, analgesik dan antikanker (Prakash & Gupta 2005). Kemangi juga dilaporkan memiliki aktivitas radioprotektif, antipiretik, dan antikoagulan (Kalyan *et al.* 2012). Bunga, buah, daun, batang, dan akar tanaman kemangi dapat bermanfaat antara lain sebagai ekspektoran, antiasma, antimuntah, hipotensi dan hipolipidemik (Singh 2010). Penelitian lain menyebutkan bahwa kemangi memiliki aktivitas antidepresan, antioksidan, antifertilitas, antiulser, antikatarak dan antikoagulan (Pandey & Madhuri 2010).

## **B. Simplisia**

### **1. Pengertian simplisia**

Simplisia adalah bahan alam digunakan sebagai obat, belum mengalami pengolahan apapun juga, kecuali dinyatakan lain berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia nabati adalah simplisia berupa tanaman utuh, bagian tanaman, dan eksudat tanaman dengan tingkat kehalusan tertentu. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan, bagian hewan atau zat yang dihasilkan hewan yang masih belum berupa zat kimia murni (Ditjen POM 1979).

### **2. Pengumpulan simplisia**

Waktu panen sangat erat dengan pembentukan senyawa aktif di dalam bagian tanaman yang dipanen. Waktu panen yang tepat pada saat bagian tanaman tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah yang besar. Beberapa simplisia perlu mengalami proses perajangan ini dimaksudkan untuk mempermudah proses pengeringan dari bahan simplisia, pengepakan serta penggilingan. Semakin tipis bahan simplisia yang dirajang maka pengeringan semakin cepat penguapan airnya. Irisan yang terlalu tipis juga dapat menyebabkan berkurangnya atau hilangnya zat berkhasiat yang mudah menguap, sehingga mempengaruhi komposisi, bau dan rasa yang diinginkan.

### **3. Pengeringan**

Pengeringan adalah suatu cara pengawetan atau pengolahan pada bahan dengan cara mengurangi kadar air, sehingga proses pembusukan dapat terhambat. Pengeringan dapat mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama, dalam proses ini, kadar air dan reaksi-reaksi zat aktif dalam bahan akan berkurang, sehingga suhu dan waktu pengeringan perlu diperhatikan. Suhu pengeringan tergantung pada jenis bahan yang dikeringkan (Depkes RI 1985). Pengeringan bertujuan untuk membuat simplisia tidak mudah rusak atau terurai oleh enzim yang terdapat pada bahan baku. Enzim yang masih ada dengan adanya air akan menguraikan bahan berkhasiat yang ada, sehingga bahan kimia tersebut rusak.

#### **4. Pembuatan serbuk**

Pembuatan serbuk dari herba kemangi bertujuan untuk mempermudah proses ekstraksi. Karena semakin kecil bentuknya semakin besar luas permukaannya, sehingga proses penyarian akan semakin efektif.

### **C. Penyarian**

#### **1. Penyarian**

Penyarian adalah penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Sistem penyarian yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel 1989).

Metode penyarian yang akan digunakan tergantung dari wujud dan kandungan bahan yang akan disari. Metode dasar penyarian adalah infundasi, maserasi, perkolasi dan sokletasi. Pemilihan metode penyarian disesuaikan dengan kepentingan untuk memperoleh kandungan kimia yang diinginkan (Harborne 1987). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu maserasi.

#### **2. Maserasi**

Maserasi berasal dari bahasa Latin *macerare*, yang artinya merendam. Maserasi merupakan proses penyarian dengan cara serbuk direndam sampai meresap atau melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut. Dalam proses maserasi, simplisia yang akan diekstraksi biasanya ditempatkan pada wadah atau bejana yang bermulut lebar, bejana ditutup rapat dan isinya dikocok berulang-ulang, lamanya berkisar 2-14 hari. Pengocokan memungkinkan pelarut segar mengalir berulang-ulang, masuk ke seluruh permukaan dari serbuk simplisia yang sudah halus. Maserasi biasanya dilakukan pada temperatur 15-20<sup>0</sup>C dalam waktu selama 5 hari sampai bahan-bahan yang larut melarut (Ansel 1989).

Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi mengikuti syarat farmakope, yaitu bahan tumbuhan dihaluskan dengan cara dipotong-potong atau diserbuk

kasarkan, kemudian disatukan dengan bahan pengestraksi (Voigt 1994). Semakin kecil ukuran partikel dari bahan, maka akan semakin mudah cairan pengestrak menarik senyawa kimia yang terkandung dalam bahan tersebut (Sudarmadji *et al.* 1989).

Proses maserasi selesai bila keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk ke dalam cairan telah tercapai maka proses difusi segera berakhir. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengestraksi akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Voigt 1994).

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah pekerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan (Depkes 1986). Ekstrak hasil maserasi dipisahkan ampasnya dengan menyaring atau menyari dimana ampas yang telah dibilas bebas dari ekstrak dengan penambahan cairan penyari melalui ayakan atau saringan ke dalam seluruh ekstrak dalam wadahnya (Ansel 1989).

### **3. Fraksinasi**

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama lain merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula-mula ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula akan disari dengan pelarut non polar, kemudian disari dengan pelarut kurang polar, dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harborne 1987).

### **4. Pelarut**

Beberapa pertimbangan yang penting dalam memilih pelarut adalah daya larutnya tinggi sehingga diperoleh senyawa yang diinginkan semaksimal mungkin dan pelarut tersebut tidak berbahaya atau tidak bersifat racun. Aspek lain yang menjadi pertimbangan jenis pelarut yang digunakan dalam pemisahan adalah tingkat kepolaran pelarut. Pelarut polar dapat melarutkan senyawa polar,

sedangkan senyawa non polar akan melarutkan senyawa yang non polar (Pasto 1992).

Pemilihan larutan penyari juga harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara kimia dan fisika, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif dalam penarikan zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Cairan penyari atau pelarut ada tiga macam yaitu pelarut polar, semipolar dan nonpolar. Contoh cairan penyari adalah air, etanol, etanol-air dan air (List & Schamidt 2000).

Etanol 96% merupakan larutan penyari yang mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, selektif, tidak beracun, bereaksi netral, absorpsinya baik, tidak mempengaruhi zat berkhasiat, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan (Depkes 1986). Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel, dapat memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut, dapat dihasilkan suatu bahan aktif yang optimal dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil turut dalam cairan pengestraksi (Voigt 1994). Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antraknon, flavonoid, steroid, damar, klorofil, lemak, malam, tanin, dan saponin hanya sedikit larut. Zat pengganggu yang larut dalam etanol hanya terbatas (Depkes 1986).

*n*-heksana adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih, terdiri atas campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, bersifat mudah terbakar, baunya khas, tidak dapat larut dalam air, dapat larut dalam alkohol, benzene, kloroform dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, sterol, dan fenil propanoid (Tiwari *et al.* 2011).

Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tidak berwarna bau seperti buah. Etil asetat larut dalam 15 bagian air. Etil asetat dapat tercampur dengan eter, etanol dan kloroform. Etil asetat adalah pelarut yang bersifat semipolar, mudah terbakar dan menguap, maka penyimpanan sebaiknya dilakukan dalam wadah tertutup rapat serta terhindar dari panas. Senyawa yang larut dalam pelarut ini

adalah flavonoid, alkaloid, senyawa-senyawa fenolik seperti fenol-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, antrakinon dan xanton (Harborne 1987).

Air adalah pelarut serba guna. Kemampuan air dalam melarutkan zat tersimpan dalam polaritas yang dimiliki oleh air. Air dapat melarutkan zat-zat yang bersifat ionik dan polar saja (Tiwari *et al.* 2011). Air dimanfaatkan sebagai penyari karena murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap dan terbakar, tidak beracun serta alamiah. Air dapat melarutkan gula, gom, pati, protein, enzim, lender, lilin, lemak peptida, minyak menguap, garam alkaloid, zat warna, dan asam organik (Depkes 1986).

#### **D. Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi adalah teknik pemisahan senyawa atas dasar perbedaan kecepatan migrasi analit yang dibawa oleh fase gerak menelusuri fase diam. Pada perjalanannya analit ditahan secara selektif oleh fase diam. Banyak cara mengelompokkan jenis kromatografi, namun secara formal mengelompokkannya atas dasar keadaan fase gerak dan fase diamnya. Pada pemisahan senyawa dan tanaman obat lazim digunakan kromatografi kolom, menggunakan fase diam silika gel atau alumina dan fase gerak pelarut bukan air. Jadi mekanisme pemisahannya adalah adsorpsi bila menggunakan fase gerak campuran pelarut nonpolar dan sedikit air maka mekanisme pemisahannya adalah partisi. Sedangkan mekanisme pemisahan secara eksklusi digunakan manakala campuran terdiri dan hanya beberapa senyawa yang berbeda signifikan bobot molekulnya (Riyanto 2011).

Pendeteksian bercak hasil pemisahan dapat dilakukan dengan beberapa cara. Untuk senyawa tak berwarna cara yang paling sederhana adalah dilakukan pengamatan dengan sinar ultraviolet. Beberapa senyawa organik bersinar atau berfluorosensi jika disinari dengan sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm), jika dengan cara itu senyawa tidak dapat dideteksi maka harus dicoba disemprot dengan pereaksi yang membuat bercak tersebut tampak (Gritter *et al.* 1991; Stahl 1985). Identifikasi golongan senyawa dilakukan dengan penampak bercak di antaranya : alkaloid (reagen dragendorff),

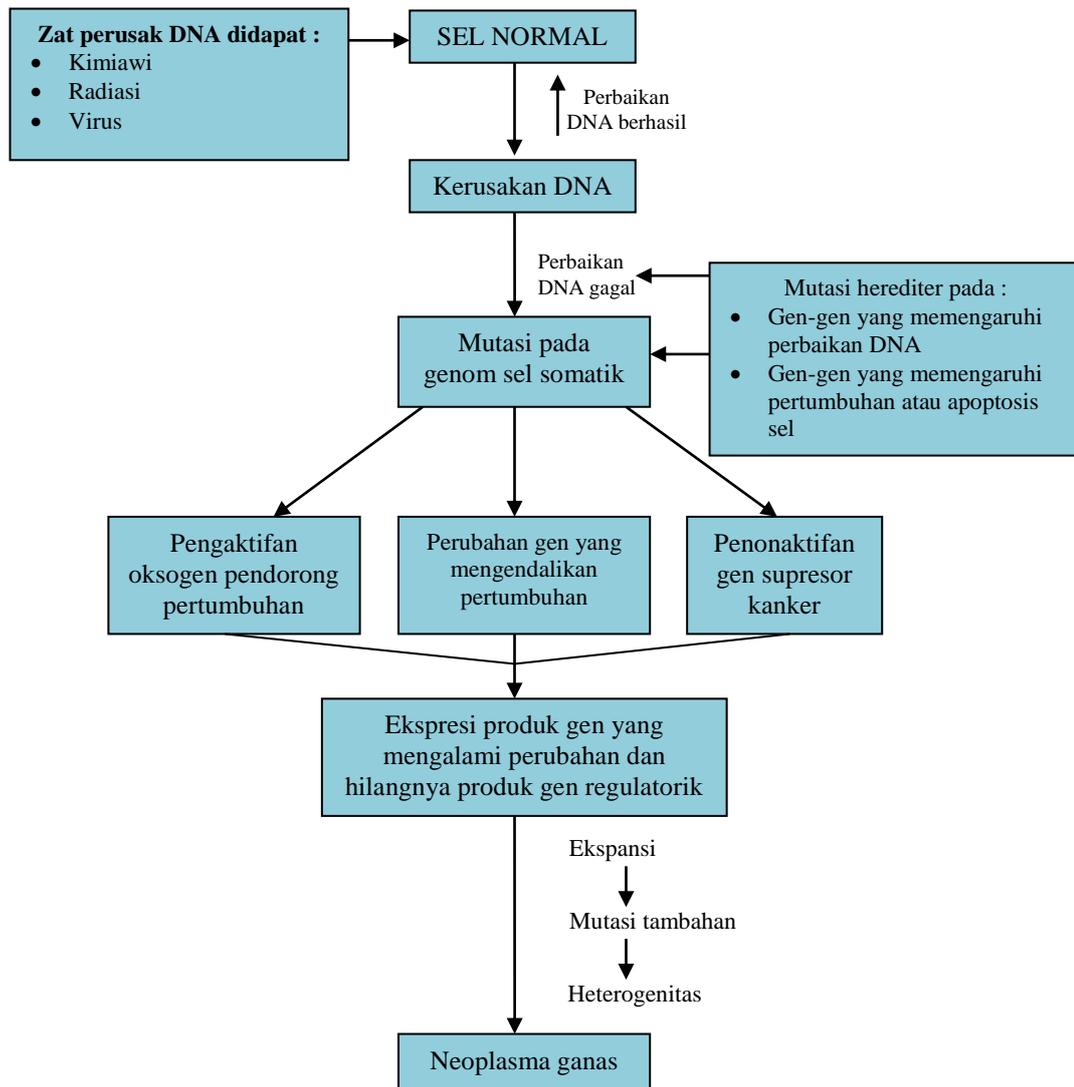
flavonoid (uap ammonia dan pereaksi sitroborat), steroid dan terpenoid (reagen lieberman burchard), tanin (peraksi  $\text{FeCl}_3$ ), saponin dan minyak atsiri (pereaksi anisaldehyda).

### **E. Kanker**

Kanker adalah segolongan penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (invasi) atau dengan migrasi sel (metastasis) ke tempat yang lebih jauh (Tjay & Rahardja 2002).

Menurut Franks dan Teich (1998), sel kanker itu timbul dari sel normal tubuh kita sendiri yang mengalami transformasi menjadi ganas, karena adanya mutasi spontan atau induksi karsinogen (bahan/agen pencetus terjadinya kanker). Transformasi sel itu terjadi karena mutasi gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel, yaitu proto-onkogen dan atau suppressor gen (anti onkogen). Paparan karsinogen antara lain berbagai jenis virus, bahan kimia, radiasi dan ultraviolet. Sebagian besar karsinogen tersebut memiliki sifat biologis yang sama yaitu dapat mengakibatkan kerusakan pada DNA. Kesamaan sifat ini menimbulkan dugaan bahwa DNA sel merupakan sasaran utama semua bahan karsinogenik dan bahwa kanker disebabkan perubahan DNA sel (Kresno 2013).

Apabila perbaikan DNA karena adanya perubahan DNA tersebut gagal, maka terjadi mutasi genom. Adanya mutasi mengakibatkan pengaktifan onkogen pendorong pertumbuhan, perubahan gen yang mengendalikan pertumbuhan, serta penonaktifan gen supresor kanker. Ketiga hal tersebut mengakibatkan timbulnya neoplasma ganas atau lebih dikenal dengan kanker (Kumar *et al.* 2005). Adapun ciri-ciri sel kanker secara khusus yang membedakan dengan sel normal (Kumar *et al.* 2005), antara lain : sel kanker mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri, sel kanker tidak sensitif terhadap sinyal antiproliferatif, sel kanker mampu menghindar dari mekanisme apoptosis.



**Gambar 1.** Skema sederhana dasar molekular penyakit kanker (Sticker dan Kumar 2008)

## F. Kanker Serviks

Kanker serviks atau karsinoma serviks uterus merupakan jenis kanker yang kedua terbanyak pada perempuan di seluruh dunia setelah kanker payudara. Namun, di Indonesia kanker serviks menduduki peringkat pertama. Kanker serviks yang sudah masuk ke stadium lanjut sering menyebabkan kematian dalam jangka waktu relatif cepat. Kanker ini merupakan salah satu jenis kanker yang dapat ditemukan pada stadium dini. Cara menemukannya dengan pap-smear (pemeriksaan contoh sel yang diambil dari lendir leher rahim) (Dalimartha 1999).

Kanker serviks adalah tumor ganas yang mengenai lapisan permukaan (epitel) dari leher rahim atau mulut rahim, dimana sel-sel permukaan (epitel) tersebut mengalami penggandaan dan berubah sifat tidak seperti sel yang normal. Sel yang membelah secara abnormal itu dapat membentuk tumor terkadang luka dan menjadi borok, yang memberi keluhan atau gejala keputihan yang berbau atau perdarahan. Sifat lain dari sel ganas ini dapat menyebar baik secara langsung di sekitar panggul maupun menyebar jauh lewat saluran getah bening atau pembuluh darah, misalnya ke paru, hati atau tulang (Sarwono 2006).

Faktor kanker serviks diantaranya : HPV (Human Papilloma Virus) yaitu virus penyebab kutil genitalis yang ditularkan melalui hubungan seksual, merokok dapat merusak sistem kekebalan dan mempengaruhi kemampuan tubuh untuk melawan infeksi HPV pada serviks, hubungan seksual pada usia dini, berganti-ganti pasangan seksual, pemakaian DES (Diethylbestrol) pada wanita hamil untuk mencegah keguguran, gangguan sistem kekebalan, pemakaian pil KB dan infeksi herpes menahun (Labwork 2000).

### **G. Obat Antikanker**

Berdasarkan kerjanya pada siklus sel obat antikanker dibedakan antara sitostatika yang bekerja spesifik terhadap fase tertentu (bergantung pada fase), artinya hanya bekerja pada siklus sel khusus saja. Dan sitostatika yang tidak spesifik terhadap fase artinya bekerja pada keseluruhan siklus sel (Mutschler 1991).

Ditinjau dari siklus sel obat antikanker dapat digolongkan menjadi 2 golongan. Pertama adalah obat yang memperlihatkan toksisitas selektif terhadap fase-fase tertentu dari siklus sel dan disebut cell cycle specific (CCS), misalnya vinkristin, vinblastin, merkaptopurin, hidroksiurea, metotreksat dan asparaginase. Zat CCS ini terbukti efektif terhadap kanker yang berproliferasi tinggi misalnya kanker darah. Golongan kedua adalah zat cell cycle non spesifik (CCNS), misalnya zat alkilator, antibiotik, antikanker (daktinomisin, daunorubisin, plikamisin, mitomisin), cisplatin, ptokarbazin dan nitrosourea. Perbedaan kerja tersebut lebih bersifat relatif dari pada absolut karena banyak zat yang tergolong

CCNS lebih efektif terhadap sel yang berproliferasi dan terhadap sel-sel yang dalam fase-fase tertentu siklusnya (Nafrialdi & Gan 1995).

Obat antikanker (sitostatika) yang umum digunakan terbagi menjadi beberapa golongan antara lain :

### **1. Senyawa pengalkilasi**

Senyawa pengalkilasi merupakan senyawa reaktif yang mampu mengalkilasi DNA, RNA dan enzim-enzim tertentu (Siswandono & Sukardjo 2000). Mekanisme kerja senyawa ini berdasarkan gugusan alkilnya yang sangat reaktif dan menyebabkan cross linking (saling mengikat) dengan rantai-rantai DNA dalam inti sel, sehingga penggandaan DNA terganggu dan pembelahan sel dirintangi (Tjay & Rahardja 2002). Obat yang termasuk dalam golongan ini antara lain kelompok nitrogen mustard (siklofosamid dan klorambusil) serta kelompok lain (tiotepa dan busulfan) (Schunack *et al.* 1990).

### **2. Antimetabolit**

Antimetabolit yang telah mengalami biotransformasi menjadi produk aktifnya dapat bekerja dengan salah satu dari sejumlah mekanisme berbeda untuk menghambat proliferasi sel (Katzung 1992). Mekanisme obat ini adalah mengganggu sintesa DNA dengan berperan sebagai antagonis kompetitif, karena rumus kimia obat ini mirip dengan metabolit tertentu yang penting bagi fisiologis sel antara lain asam folat, purin dan pirimidin (Tjay dan Rahardja, 2002). Obat antimetabolit terbagi menjadi 3 yaitu antagonis folat (metrotreksat), antagonis purin (merkaptopurin, tioguanin) dan antagonis pirimidin (fluorourasil, sitarabin, azasitidin) (Katzung 1992).

### **3. Antikanker produk alam**

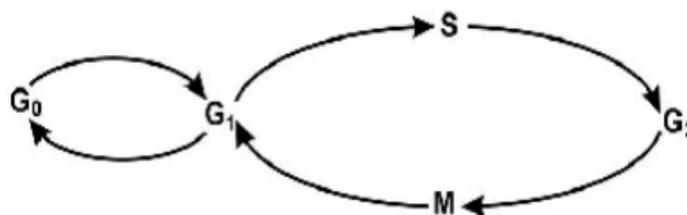
Antikanker produk alam terbagi menjadi 3 kelompok yaitu antibiotik antikanker (antrasiklin, aktinomisin, bleomisin, mitomisin, mitramisin), antikanker produk tanaman (vinkristin, vinblastin, podophyllotoxin) dan antikanker produk hewan (antineoplaston, interferon  $\alpha$ -2b, avaron) (Siswandono & Sukardjo 2000).

#### 4. Hormon

Beberapa neoplas dapat dikontrol baik oleh hormon-hormon seks seperti androgen, progestin dan estrogen, serta hormon adrenokortikoid. Mekanisme kerjanya melalui pengikatan khas reseptor pada sitoplasma dan mengubah struktur reseptor. Bentuk kompleks hormon reseptor tersebut menuju inti bereaksi dengan sisi akseptor dan mempengaruhi proses transkripsi (Siswandono & Sukardjo 2000).

#### H. Siklus Sel

Siklus sel merupakan proses vital dalam kehidupan setiap organisme. Secara normal, siklus sel menghasilkan pembelahan sel. Pembelahan sel terdiri dari 2 proses utama, yaitu replikasi DNA dan pembelahan kromosom yang telah digandakan ke 2 sel anak. Secara umum, pembelahan sel terbagi menjadi 2 tahap, yaitu mitosis (M) (pembelahan 1 sel menjadi 2 sel) dan interfase (proses di antara 2 mitosis). Interfase terdiri dari fase gap 1 (G1), sintesis DNA (S), gap 2 (G2). Sel tumor dapat berada dalam 3 keadaan yaitu sedang membelah (siklus proliferasi), dalam keadaan istirahat (tidak membelah, G0), dan dalam keadaan yang secara permanen tidak membelah. Sel dalam fase G0 yang masih potensial untuk berproliferasi disebut sel klonogenik atau sel induk (stem cell). Jadi yang menambah jumlah sel kanker ialah sel yang dalam siklus proliferasi dan dalam fase-G0 (Nafrialdi & Gan 1995).



Gambar 2. Siklus Sel (Nafrialdi & Gan 1995).

Sel kanker yang dalam keadaan interfase dibagi menjadi 3 fase yaitu :

##### 1. Fase-G1 (growth 1)

Fase ini merupakan interval antara akhir dari fase-M dan permulaan replikasi DNA. Pada fase-G1 terutama disintesis asam ribonukleat, sel akan tumbuh, dan struktur sitoplasma tertentu akan berdiferensiasi (Mutschler 1999).

## 2. Fase-S

Fase ini merupakan saat terjadinya replikasi asam desoksiribonukleat (DNA), jumlah kromosom akan berlipat dua dan dengan ini pembelahan sel akan dipersiapkan (Mutschler 1999).

## 3. Fase-G2

Fase-G2 merupakan fase pertumbuhan pasca sintesis. Selama G2 replikasi DNA dipantau untuk memastikan telah terbentuk double DNA. Disini kromosom sudah ada dalam bentuk kromatida (Mutschler 1999).

### I. Sel HeLa

Kultur sel HeLa merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (serviks) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951. Kultur sel HeLa memiliki sifat semi melekat dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler. Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (Labwork 2000). Sel HeLa dapat digunakan untuk tes antitumor, transformasi, uji tumorigenesis, biologi sel dan invasi bakteri. Sel ini secara morfologi merupakan sel epitelial yang sudah dimasuki oleh Human Papiloma Virus (HPV) tipe 18. Sel ini bersifat immortal dan sangat agresif sehingga mudah untuk dikultivasi tetapi sel ini mudah menginvasi kultur sel lain (Doyle & Griffiths 2000).

### J. Sel Vero

Sel Vero ATCC CCL-81 merupakan sel epitel non kanker. Sel vero diperoleh dari ginjal kera Afrika hijau (*Cercopithecus*) oleh Y.Yasumura dan Y.Kawakita di Chiba University Jepang. Sel ini digunakan karena sensitif terhadap infeksi beberapa jenis virus seperti SV-40, SV-5, poliovirus, arbovirus, influenza virus. Sel ini tidak memproduksi interferon dan dapat mengalami cytopathic effect (CPE) yaitu perubahan morfologi di dalam sel ketika terinfeksi virus (Sheets 2000). Sel Vero merupakan sel monolayer berbentuk poligonal dan pipih, sel ini immortal, non tumorigenic

fibroblastic cell. Sel ini melekat erat pada substrat yang berbahan polistirena dengan membentuk ikatan kovalen. Pengujian sel Vero dilakukan untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksitas dan transformasi sel yang di induksi oleh berbagai senyawa kimia (Goncalves *et al.* 2006).

### **K. Uji Sitotoksik**

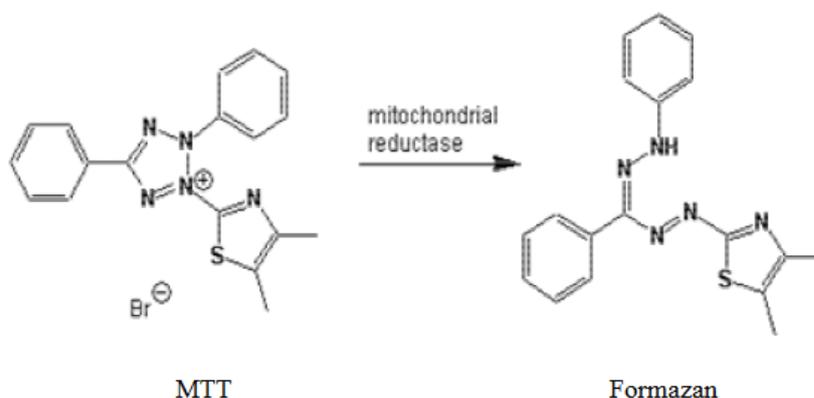
Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas anti neoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksitas pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Freshney 1986).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel 16 (Meiyanto 2002). Nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitostatik. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Uji sitotoksik sebagian besar masih menggunakan hewan percobaan meskipun terdapat kesulitan untuk diekstrapolasikan pada manusia. Metode *in vitro* merupakan alternatif pengganti metode hewan uji. Uji mempunyai relevansi cukup baik yang bertujuan untuk mendeteksi potensi ketoksikan suatu obat pada manusia (Doyle & Griffiths 2000).

Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel tumor secara *in vitro* dan jika toksisitas ini ditransfer menembus sel tumor *in vivo* senyawa tersebut mempunyai aktivitas antitumor (Evans 2002). Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle & Griffiths 2000).

## L. Metode MTT

Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode *3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide* (MTT). Metode MTT adalah salah satu uji sitotoksitas yang bersifat kuantitatif. Uji sitotoksitas dilakukan secara *in vitro* yaitu untuk menentukan potensi sitotoksik suatu senyawa seperti obat antikanker (Kupcsik & Stoddart 2011). Metode MTT memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Doyle & Griffiths 2000; Padmi 2008). Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium (MTT) menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup. MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria dari warna kuning menjadi formazan yang terlarut dalam *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) berwarna ungu (Doyle & Griffiths 2000; Padmi 2008). Reaksi reduksi MTT dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



**Gambar 3. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Mosmann 1983)**

Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berkorelasi langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme, sehingga berkorelasi dengan hidup sel sel. Konsentrasi formazan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosmann 1983; Padmi 2008). Persentase hidup sel dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi media kontrol}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi media kontrol}} \times 100\%$$

Intensitas warna ungu yang terbentuk dimana semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup.

Uji sitotoksik ini digunakan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*). Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitostatik. (Padmi 2008).

### M. Landasan Teori

Kemangi berkhasiat sebagai antidiabetes, antifungi, antimikroba, kardioprotektif, antiemetik, antispasmodik, analgesik, dan antikanker (Prakash & Gupta 2005). Penelitian Magesh *et al.* (2009) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun kemangi dapat digunakan sebagai calon kemopreventif karena dapat menginduksi apoptosis sel kanker paru (A549) melalui caspase mitokondria dan dapat menekan pertumbuhan sel kanker paru Lewis (LLC). Aktivitas sitotoksik daun kemangi terhadap sel MCF-7 memiliki  $IC_{50}$  sebesar 6,95  $\mu\text{g/mL}$  (Amalia & Haryoto 2016). Penelitian lain menunjukkan bahwa biji kemangi memiliki aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap beberapa sel kanker manusia, seperti sel neuroblastoma (IMR-32), sel kanker kolon (HT-15 dan HT-29) dan sel kanker paru (A-549) (Sundaram *et al.* 2011). Ekstrak etanol dan fraksi kloroform herba kemangi memiliki aktivitas sitotoksik sel kanker kolon WiDr dengan  $IC_{50}$  sebesar 85  $\mu\text{g/mL}$  dan 25  $\mu\text{g/mL}$  (Haryanti & Katno 2011).

Aktivitas antikanker suatu tanaman dapat dievaluasi dari efek sitotoksiknya secara *in vitro* pada sel kanker. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kemangi mengandung monoterpen, limonen, myrcen, terpinolen, flavonoid (quercetin, kaempferol, rutin), fenolik (asam p-coumaric acid, asam kafeat, asam rosmarinik, asam caftaric), minyak atsiri (isoeugenol, eugenol), vitamin (A, C, E, K), steroid (Marwat *et al.* 2011; Zarlaha *et al.* 2014). Penelitian Ikhlas (2013)

menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak kemangi dan etil asetat memiliki  $IC_{50}$  sebesar 21,8989, dan 44,5145  $\mu\text{g/ml}$ . Antioksidan sangat penting dalam menetralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan juga merusak biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat memicu penyakit degeneratif seperti kanker. Antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa fenolik berupa flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik polifungsional (Isnindar *et al.* 2011). Flavonoid berperan dalam inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, inhibisi angiogenesis, dan pembalikan resistensi multi-obat atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Ren *et al.* 2003).

Penelitian dari ismiyati & Nurhaeni (2016) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun kemangi memiliki potensi sebagai agen kemopreventif melalui aktivitas sitotoksik dan induksi apoptosis terhadap sel kanker leher rahim HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  209  $\mu\text{g/mL}$ . Penelitian lainnya menunjukkan uji sitotoksik dari asam kafeat tanaman kemangi memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 4,17  $\mu\text{g/ml}$  (Zarlaha *et al.* 2014).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel HeLa. Pemilihan fraksi etil asetat yang bersifat semi polar, dikarenakan pelarut ini dapat menyari senyawa fenolik dan flavonoid yang terkandung pada herba kemangi. Metode penelitian yang digunakan yaitu MTT (Microculture Tetrazolium) pada kultur sel kanker HeLa yang ditunjukkan dengan parameter  $IC_{50}$  dan selektivitas sel Vero yang ditunjukkan dengan indeks selektivitas. Suatu ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel apabila memiliki  $IC_{50}$  kurang dari 100  $\mu\text{g/ml}$  (Mustarichie *et al.* 2011). Rentang nilai  $IC_{50}$  menurut NCI (National Cancer Institute), suatu ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas antikanker tinggi apabila nilainya  $< 30 \mu\text{g/ml}$ , memiliki aktivitas antikanker moderat apabila memiliki nilai  $30 \mu\text{g/ml} \leq IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$  dan tidak aktif apabila nilai  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$  (Zheng *et al.* 2000). Suatu ekstrak dikatakan bersifat selektif apabila mempunyai indeks selektivitas  $>10$  (Wahyuningsih *et al.* 2014).

## N. Hipotesis

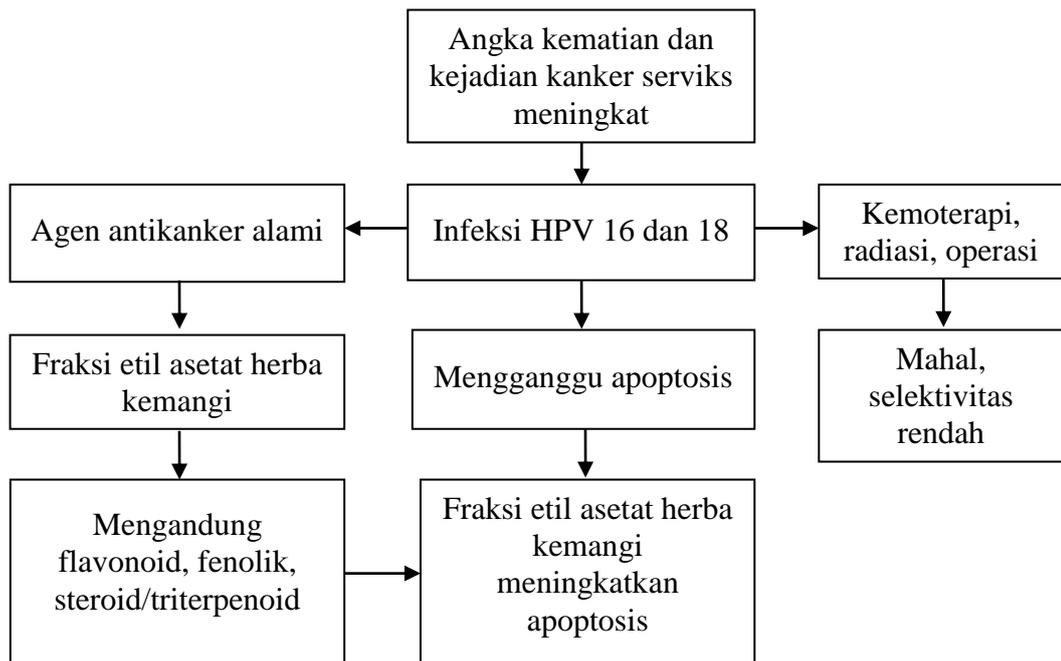
Berdasarkan landasan teori yang ada, disusun suatu hipotesa dalam penelitian ini adalah :

Pertama, fraksi etil asetat dari ekstrak etanol herba kemangi memiliki aktivitas antikanker terhadap sel HeLa dengan nilai  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ .

Kedua, nilai indeks selektivitas fraksi etil asetat herba kemangi dari sel HeLa terhadap sel Vero lebih besar dari 10.

Ketiga, golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol herba kemangi yaitu flavonoid, fenolik, tanin dan terpenoid. Golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat herba kemangi adalah flavonoid dan fenolik.

## O. Kerangka Pikir Penelitian



Gambar 4. Kerangka pikir penelitian

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba kemangi yang dijual di pasar Mangu Boyolali.

Sampel adalah representasi populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Jadi sampel merupakan bagian populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia herba kemangi. Sampel dibeli pada bulan Mei tahun 2017 di Boyolali yang diperoleh dalam keadaan bersih, kering, dan tidak busuk.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat herba kemangi terhadap aktivitas kultur sel HeLa.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas yang dimaksud adalah variabel utama yang diubah-ubah untuk diteliti pengaruh terhadap variabel tergantung berkaitan dengan perubahan-perubahan yang dilakukan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi herba kemangi.

Variabel tergantung adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah parameter-parameter yang diamati dengan uji sitotoksik terhadap sel HeLa dari fraksi herba kemangi.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang dengan penelitian lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah, kondisi peneliti, kondisi laboratorium yang digunakan

termasuk alat-alat, bahan, suhu dan tekanan inkubator, lama waktu inkubasi serta jumlah sel tiap sumuran dan media yang digunakan dalam penelitian.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, herba kemangi adalah bagian daun, batang, dan bunga dari tanaman kemangi yang diperoleh dari Boyolali, Jawa Tengah pada bulan Mei.

Kedua, serbuk herba kemangi adalah herba kemangi yang diambil kemudian dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel setelah itu dikeringkan dengan pemanas buatan yaitu di oven pada suhu 50°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 50.

Ketiga, ekstrak etanol 96% herba kemangi adalah hasil ekstraksi serbuk herba kemangi dengan pelarut etanol 96% secara maserasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak etanol 96% herba kemangi yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapat fraksi *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari residu *n*-heksana dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, sel HeLa adalah salah satu model sel kanker serviks yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari sel epitel kanker leher rahim (serviks) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951.

Ketujuh, uji MTT merupakan suatu metoda uji sitotoksik secara kolorimetri untuk menentukan jumlah sel yang hidup berdasarkan perubahan larutan MTT yang berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna ungu oleh mitokondria yang aktif pada sel hidup.

Kedelapan, nilai IC<sub>50</sub> adalah nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

Kesembilan, indeks selektivitas adalah kemampuan suatu senyawa memmbunuh sel kanker HeLa secara selektif dibandingkan dengan sel Vero.

### C. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### D. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat pembuatan sampel dan identifikasi sampel terdiri atas bejana maserasi, corong pisah, cawan porselen, corong butchner, corong pisah (Pyrex), blender (Miyako), *rotary vacum evaporator* (Heidolph laborata 400), ayakan nomor 40, peralatan gelas (Pyrex), neraca analitik (Sartorius), lampu UV.

Alat uji sitotoksik meliputi *laminar air flow class II/ biological safety cabinet*, inkubator 37<sup>0</sup>C, tangki nitrogen cair, mikroplate 96 sumuran (Nunclone), *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), autoklaf (Hirayama), aliran CO<sub>2</sub> 5% model 6200 (Napco), Spektrokolorimeter pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), tabung endrof, tabung konikal steril (Nunclone), mikropipet 20-200 dan 200-1000 (Pipetman), mesin vortex, mikroskop inverted (Axiovert-25), dan *magnetic stirer*.

#### 2. Bahan

Bahan pembuatan sampel dan identifikasi sampel adalah tanaman kemangi, Etanol 96% (Brataco), *n*-heksana (Brataco), etil asetat (Brataco), aquadest, kain flanel, kertas saring, plat KLT Silica GF 254, Natrium Bikarbonat, toluena, asam formiat, dietil amin, metanol, petroleum eter, kloroform, xylene, larutan mayer LP, logam Mg, pereaksi semprot : (FeCl<sub>3</sub>, anisaldehyd asam-sulfat, sitoborat, dragendrof).

Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel HeLa (Koleksi Laboratorium Parasitologi UGM), sel Vero (Koleksi Laboratorium Parasitologi UGM), medium DMEM (Sigma), *Dimethyl sulfoxide* (Gipco), tripsin 0,25%, Fungison (Gipco),

MTT (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (Gipco), Cisplatin (Kalbe), *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS), dan bahan lainnya yang dibutuhkan dalam pengujian efek sitotoksik secara *in vitro*.

## **E. Jalan Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman kemangi**

Determinasi dilakukan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian sesuai dengan tanaman yang dimaksud yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologinya dengan petunjuk determinasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

### **2. Pengumpulan herba kemangi**

Pengumpulan herba kemangi yang digunakan dalam penelitian ini di ambil secara acak dari Boyolali, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba kemangi yang sudah dibersihkan dari jamur dan kotoran.

### **3. Pengeringan herba kemangi**

Simplisia kemangi diambil dalam keadaan bersih, kering dan tidak busuk, kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel. Setelah itu dikeringkan dengan alat pengering (oven) pada suhu 40-50<sup>0</sup>C selama 5 hari. Suhu yang terlalu rendah tidak akan mengeringkan dengan sempurna, akibatnya sampel akan cepet membusuk. Sedangkan suhu yang terlalu tinggi akan merusak senyawa yang terkandung dalam tanaman tersebut.

### **4. Pembuatan serbuk herba kemangi**

Herba kemangi yang sudah kering dibuat serbuk dengan menggunakan alat blender, kemudian diayak dengan ayakan mesh nomor 40. Tujuan pembuatan serbuk adalah untuk memperkecil ukuran luas partikel.

### **5. Karakterisasi serbuk herba kemangi**

**5.1. Pemeriksaan organoleptis.** Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari serbuk herba kemangi. Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

**5.2. Penetapan kadar air.** Penetapan kadar air serbuk kemangi dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya yaitu menimbang

serbuk kemangi 20 gram, dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xylene 100 mL sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, lalu dipanaskan dengan api kecil, setelah mendidih apinya dibesarkan. Pemanasan dihentikan apabila pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes. Kadar airnya diukur dengan melihat volume pada skala yang terdapat pada alat *Sterling-Bidwell*. Kadar airnya baik apabila kadarnya tidak lebih dari 10%.

**5.3. Penetapan susut pengeringan.** Pemeriksaan susut pengeringan pada serbuk herba kemangi menggunakan alat *moisture balance*, yakni dengan cara menimbang 2 gram serbuk kemudian dimasukkan dalam alat *moisture balance* pada suhu 105<sup>0</sup>C. Nilai susut pengeringan muncul dalam satuan persen.

**5.4. Penetapan kadar sari larut dalam air.** Serbuk dikeringkan di udara, dimaserasi 5 gram serbuk dengan 100 mL air jenuh kloroform selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105<sup>0</sup>C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI 1980).

**5.5. Penetapan kadar sari larut etanol.** Serbuk dikeringkan di udara, dimaserasi 5 gram serbuk dengan 100 mL etanol 95% menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol 95%, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105<sup>0</sup>C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 95%, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI 1980).

## **6. Pembuatan ekstrak etanol herba kemangi**

Pembuatan ekstrak dengan perbandingan 10 bagian simplisia dalam 100 bagian pelarut. Sebanyak 1 kg serbuk kemangi dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan 7,5 L etanol 96%, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari

terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari, maserat dipisahkan antara sari dan ampasnya. Ampas yang diperoleh ditambahkan cairan penyari sebanyak 2,5 L, diaduk disaring, sehingga diperoleh filtrat 100 bagian. Setelah itu, wadah disimpan selama 2 hari dalam ruangan yang terhindar dari cahaya matahari (Depkes RI 1986). Filtrat ditampung dan dipekatkan dengan rotary evaporator serta disempurnakan pengeringannya di dalam oven suhu 50°C sehingga didapat ekstrak etanol awal.

## **7. Karakterisasi ekstrak herba kemangi**

**7.1. Pemeriksaan organoleptis.** Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari ekstrak herba kemangi. Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

**7.2. Penetapan kadar air.** Penetapan kadar air ekstrak herba kemangi dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya yaitu menimbang ekstrak sebanyak 10 gram, dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xylene 100 mL sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, lalu dipanaskan dengan api kecil, setelah mendidih apinya dibesarkan. Pemanasan dihentikan apabila pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes. Kadar airnya diukur dengan melihat volume pada skala yang terdapat pada alat *Sterling-Bidwell*.

**7.3. Penetapan susut pengeringan.** Pemeriksaan susut pengeringan pada ekstrak herba kemangi menggunakan alat *moisture balance*, yakni dengan cara menimbang 2 gram ekstrak kemudian dimasukkan dalam alat *moisture balance* pada suhu 105°C. Nilai susut pengeringan muncul dalam satuan persen.

## **8. Pembuatan fraksi etil asetat**

Ekstrak kental etanol herba kemangi difraksinasi menggunakan pelarut air suling, *n*-heksana dan etil asetat. Pertama ekstrak dipartisi dengan sedikit etanol lalu ditambah dengan air suling dengan perbandingan 1:10 (7,5 g : 75 ml) untuk melarutkan ekstrak, kemudian dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan *n*-heksana, perbandingan pelarut yang digunakan antara *n*-heksana : air adalah 1:1 sebanyak 3 kali. Campuran antara *n*-heksana dan air di ekstraksi cair-cair hingga terbentuk 2 lapisan. Fase *n*-heksana dan fase air dipisahkan, fase air yang

terbentuk selanjutnya diekstraksi cair-cair kembali dengan pelarut etil asetat 75 ml sebanyak 3 kali. Fase etil asetat yang didapat dipekatkan dengan evaporator sehingga menjadi fraksi etil asetat herba kemangi.

### 9. Penetapan persen rendemen

Persen rendemen ekstrak diperoleh dari menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk herba kemangi kering dan dikalikan 100%.

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{berat serbuk herba kemangi}} \times 100\%$$

Persen rendemen fraksi diperoleh dari menimbang hasil dari fraksi kemudian dibagi berat ekstrak awal yang digunakan untuk fraksinasi dan dikalikan 100%.

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

### 10. Uji kualitatif senyawa kimia dalam ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi

**10.1. Flavonoid.** Sampel dilarutkan dengan pelarut secukupnya diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Jika terjadi warna merah sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid, sedangkan jika warna kuning menunjukkan adanya flavon, kalkon, auron (Robinson 1995).

**10.2. Fenolik.** Sebanyak 0,5 gram sampel dilarutkan dengan pelarut secukupnya kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditunjukkan dengan dengan terbentuknya warna hijau, biru, merah, ungu, atau hitam pekat yang menunjukkan adanya kandungan fenolik (Harborne 1987).

**10.3. Alkaloid.** Sebanyak 0,5 gram sampel dalam 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air, panaskan diatas penangas air selama 2 menit. Dipipet 3 tetes filtrat pada dua kaca arloji dan tambahkan 2 tetes larutan mayer LP, jika pada mayer LP terbentuk endapan warna putih atau kuning dan dengan larutan Bouchardat terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam maka kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes RI 1980).

**10.4. Saponin.** Ditimbang 0,5 gram sampel, dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan kemudian

kocok kuat-kuat selama 10 detik. (Jika zat yang diperiksa berupa sediaan cair, encerkan 1 mL sediaan yang diperiksa dengan 10 mL air dan kocok kuat-kuat selama 10 menit); sehingga terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetesan asam klorida 2 N, buih tidak hilang (Farnsworth 1969).

**10.5. Tanin.** Sampel sebanyak 2 gram ditambahkan 100 mL air, dididihkan selama 15 menit, dinginkandan disaring dengan kertas saringdan filtrat dibagi dua bagian. Kedalam filtrat pertama ditambahkan Ferri (III) klorida 1%, terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Kedalam filtrat yang kedua ditambahkan 15 ml pereaksi Stiasny (Formaldehid 30% : HCl pekat = 2 : 1), dipanaskan di atas penangas air, terbentuk endapan merah muda menunjukkan adanya tanin katekuat. Selanjutnya endapan disaring, filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat, ditambahkan beberapa tetes larutan Ferri (III) klorida 1%, terbentuk warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat (Fransworth 1969).

**10.6. Steroid/triterpenoid.** Sampel sebanyak 1 gram dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam (dalam wadah dengan penutup rapat), disaring dan diambil filtratnya. 5 mL dari filtrat tersebut diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu/sisa. Kedalam residu tersebut ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (perekasi Libermann-Buchard), terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Fransworth 1966).

## **11. Identifikasi senyawa kimia dalam ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi menggunakan KLT**

**11.1. Identifikasi flavonoid.** Sampel dilarutkan dengan sedikit pelarutnya, lalu ditotolkan pada fase diam silika gel GF 254. Baku pembanding yang digunakan untuk identifikasi flavonoid adalah kuersetin. Elusi plat KLT menggunakan fase gerak *n*-heksana: etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Fase diam dikeringanginkan, dilihat pada UV 254 nm dan 366 nm kemudian di semprot

menggunakan pereaksi bercak yaitu sitoborat, hasil positif bila terbentuk bercak berwarna kuning cepat pudar (Depkes RI 1987).

**11.2. Identifikasi alkaloid.** Sampel dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya, diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menotolkan ekstrak cair pada fase diam silika gel GF 254. Elusi plat KLT menggunakan fase gerak toluena : etil asetat : dietil amin (7:2:1), dan reagen untuk deteksi bercak menggunakan Dragendrof. Fase diam dikeringanginkan, dilihat pada UV 254 nm dan 366 nm kemudian di semprot menggunakan pereaksi bercak yaitu Dragendorff hasil positif bila terbentuk bercak berwarna merah bata (Harborne 1987)

**11.3. Identifikasi tanin.** Sampel dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya, diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menotolkan ekstrak cair pada fase diam silika gel GF 254. Baku pembanding yang digunakan untuk identifikasi tanin adalah asam galat. Elusi plat KLT menggunakan fase gerak *n*-heksana : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Fase diam dikeringanginkan, kemudian dibaca di UV 254 nm dan 366 nm, kemudian disemprot menggunakan pereaksi FeCl<sub>3</sub>, hasil positif bila terbentuk bercak berwarna hijau tua kehitaman (Harbone 1987).

**11.4. Identifikasi steroid/triterpenoid.** Sampel dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya, diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menotolkan ekstrak cair pada fase diam silika gel GF 254. Baku pembanding yang digunakan adalah stigmasterol. Elusi plat KLT menggunakan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (4:1). Fase diam dikeringanginkan, kemudian dibaca di UV 254 nm dan 366 nm, kemudian disemprot menggunakan pereaksi lieberman-burchard, hasil positif ditunjukkan dengan bercak berwarna merah keunguan pada senyawa terpenoid dan terbentuk warna biru atau ungu menandakan adanya senyawa steroid (Harborne 1987).

## 12. Uji Aktivitas Senyawa

**12.1. Sterilisasi *laminar air flow* (LAF).** Sterilisasi LAF dengan menyalakan lampu ultraviolet (UV) selama 15 menit sebelum digunakan

kemudian pintu LAF ditutup. Kemudian lampu dimatikan, pintu dibuka, lalu hidupkan lampu LAF dan permukaan LAF disterilkan dengan etanol 70%.

**12.2. Sterilisasi alat.** Alat-alat gelas yang akan digunakan harus dalam keadaan steril, dapat dicuci dengan deterjen atau antiseptik, lalu dibilas dengan air bersih mengalir dan direndam dalam aquadest selama 1 jam kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam. Setelah kering, alat-alat tersebut diberi tanda dan dimasukkan ke dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

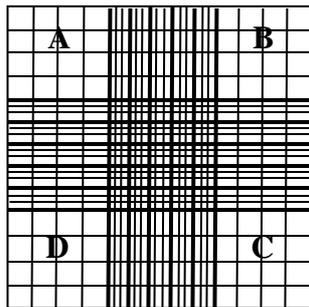
**12.3. Pembuatan medium kultur DMEM.** Medium kultur dibuat dari 20 mL fetal bovine serum (FBS) 10% yang dimasukkan dalam botol steril dan ditambahkan 2 mL penisilin-streptomisin 1%, 1 mL fungison 0,5% dan 100 mL medium DMEM murni untuk sel HeLa dan sel Vero. Medium kultur dibuat dalam LAF dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C (CCRC 2009).

**12.4. Propagasi sel HeLa.** Kultur sel HeLa diambil dari stok yang disimpan dalam tangki cair yang diletakkan dalam lokator pada suhu -196°C. Ampul yang berisi sel dicairkan dalam air  $\pm 37,7^{\circ}\text{C}$ , kemudian ampul disemprot dengan alkohol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung conical steril yang berisi 10 mL medium DMEM. Suspensi sel disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama  $\pm 5$  menit. Supernatan dibuang, pellet ditambah 1 mL medium penumbuh DMEM yang mengandung FBS 10%. Lalu diresuspensikan perlahan sampai homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa (2-3) buah *tissue culture flask* kecil dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO<sub>2</sub> dan 95% O<sub>2</sub>. Setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan sampai konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian (CCRC 2009).

**12.5. Pemanenan sel HeLa dan sel Vero.** Ambil sel dari inkubator CO<sub>2</sub>, amati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Buang media dengan menggunakan mikropipet atau pipet pasteur steril Cuci sel diulang 2 kali dengan PBS (volume PBS adalah  $\pm \frac{1}{2}$  volume media awal). Jika media pada kultur sel 7 mL maka PBS yang diberikan adalah 3,5 mL. Tambahkan tripsin-EDTA (trypsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Tambahkan media  $\pm 5$  mL untuk menginaktifkan tripsin. *Centrifuge*

dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Buang supernatan, kemudian pellet sel ditambahkan media penumbuh DMEM sebanyak  $\pm 5$  mL (CCRC 2009).

**12.6. Perhitungan sel HeLa dan sel Vero.** Ambil 10  $\mu$ l panen sel dan pipetkan ke hemasitometer. Hitung sel di bawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya) dengan *counter*. Lihat prosedur penghitungan sel di bawah.



**Gambar 5. Skema bilik hitung dalam haemocytometer**

*Haemocytometer* terdiri dari empat bilik hitung. Tiap bilik hitung terdiri dari 16 kotak. Sel yang gelap (mati), sel yang berada di batas luar sebelah atas, dan sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung. Lalu dihitung sel-sel per ml dengan rumus :

$$\text{Jumlah sel terhitung/ml} = \frac{\text{Jumlah sel di A} + \text{sel di B} + \text{sel di C} + \text{sel di D}}{4} \times 10^4$$

Dihitung volume pemanenan sel (dalam mL) dengan rumus :

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/mL}}$$

Diambil volume pemanenan sel, ditransfer ke konikel baru dan ditambahkan medium sampai total volume yang diperlukan. Setelah itu hitung jumlah suspensi sel yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar  $1 \times 10^4$  sel/100  $\mu$ l. Sel didistribusikan dalam microplate sumuran 96 dengan konsentrasi  $1 \times 10^4$  sel tiap sumuran kemudian diinkubasi selama 24 jam pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan (Doyle & Griffiths 2000).

**12.7. Pembuatan larutan uji.** Sampel sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100  $\mu$ l DMSO dalam tabung Ependrof dan disimpan sebagai larutan stok yang digunakan dalam uji. Pembuatan larutan stok dilakukan secara aseptis di dalam

LAF *cabinet*. Selanjutnya dibuat larutan sampel dalam media DMEM dengan variasi konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81  $\mu\text{g/mL}$ . Masing-masing variasi konsentrasi dipipet 100  $\mu\text{L}$  dimasukkan dalam tiap sumuran dengan 3x pengulangan untuk tiap konsentrasi

**12.8. Uji sitotoksik terhadap sel HeLa.** Uji dilakukan terhadap sel HeLa dan sel Vero. Media dalam microplate dibuang lalu dimasukkan sebanyak 100  $\mu\text{L}$  larutan uji yaitu fraksi etil asetat yang dilarutkan dengan DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan konsentrasi tertentu (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81)  $\mu\text{g/mL}$  tiap sumuran. Kontrol media pada penelitian ini hanya menggunakan larutan komplet DMEM, kontrol sel menggunakan larutan komplet DMEM yang ditambah dengan kultur sel, dan sebagai kontrol pelarut menggunakan larutan DMSO yang ditambah dengan kultur sel dengan konsentrasi 1% dan 2%. Kontrol positif yang digunakan adalah cisplatin dengan tujuh serial konsentrasi (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562)  $\mu\text{g/mL}$  dan sebagai kontrol negatif digunakan sel tanpa penambahan larutan uji (kontrol sel). Sel tersebut diinkubasikan pada inkubator  $\text{CO}_2$  5% pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Setelah 24 jam media sel dibuang, lalu Siapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara ambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5mg/mL), encerkan dengan MK ad 10 mL (untuk 1 buah 96 *well plate*). Buang media sel, cuci PBS 1x dan tambahkan reagen MTT 100  $\mu\text{L}$  ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator sel hidup akan beraksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dalam 0,01  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , diinkubasikan selama 24 jam pada suhu kamar dan serapan dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

## F. Analisa Data

Dengan menggunakan data absorban yang diperoleh dari pengukuran, dapat ditentukan persentase hidup sel dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ hidup sel} = \frac{\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi media kontrol}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi media kontrol}} \times 100\%$$

Kemudian dilakukan perhitungan  $IC_{50}$  dengan menggunakan persamaan regresi linier yang menggambarkan hubungan antara persen(%) hidup sel HeLa maupun sel Vero dengan log konsentrasi sampel uji.

$$y = a + bx$$

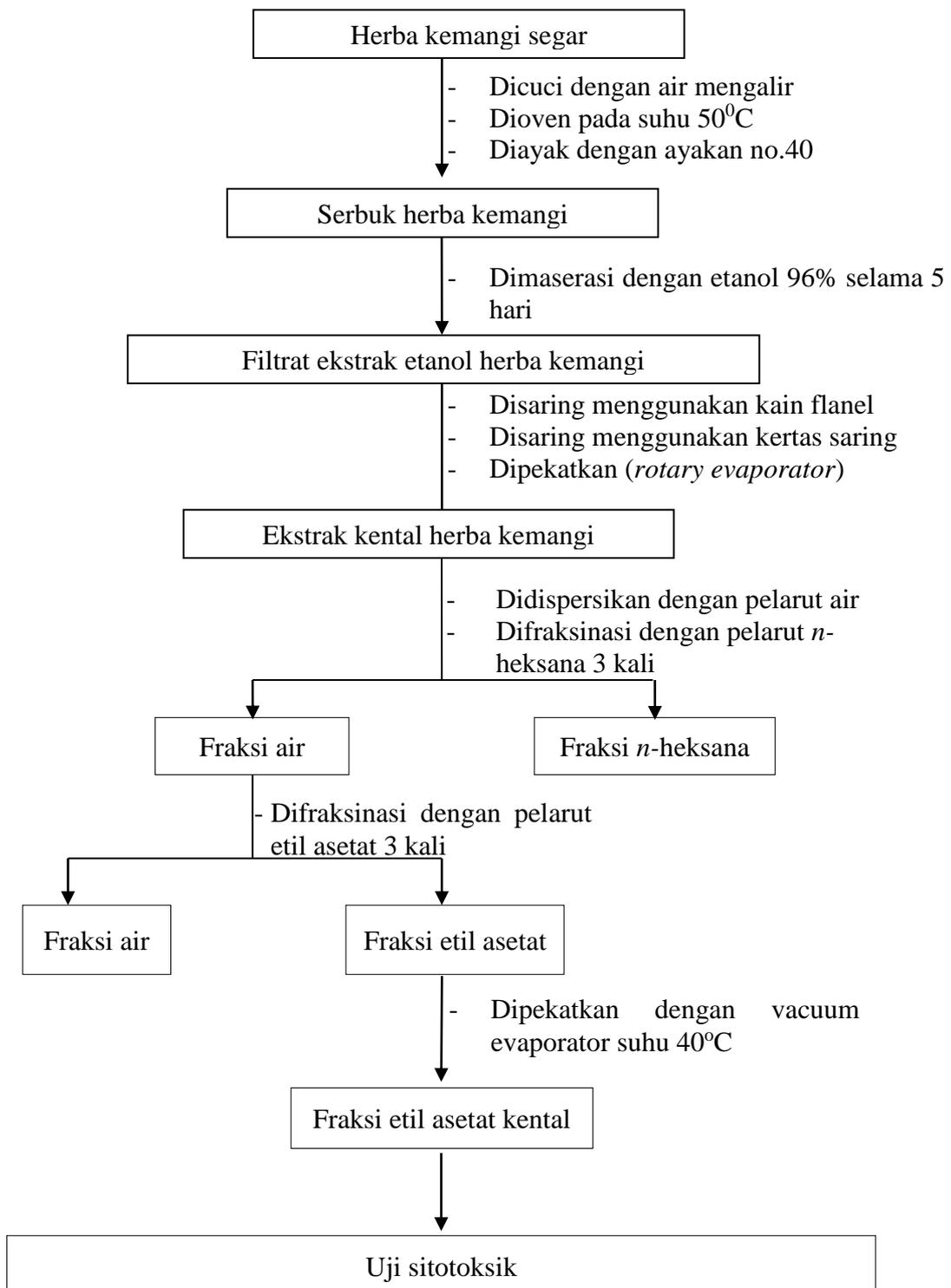
keterangan :

x = log konsentrasi senyawa

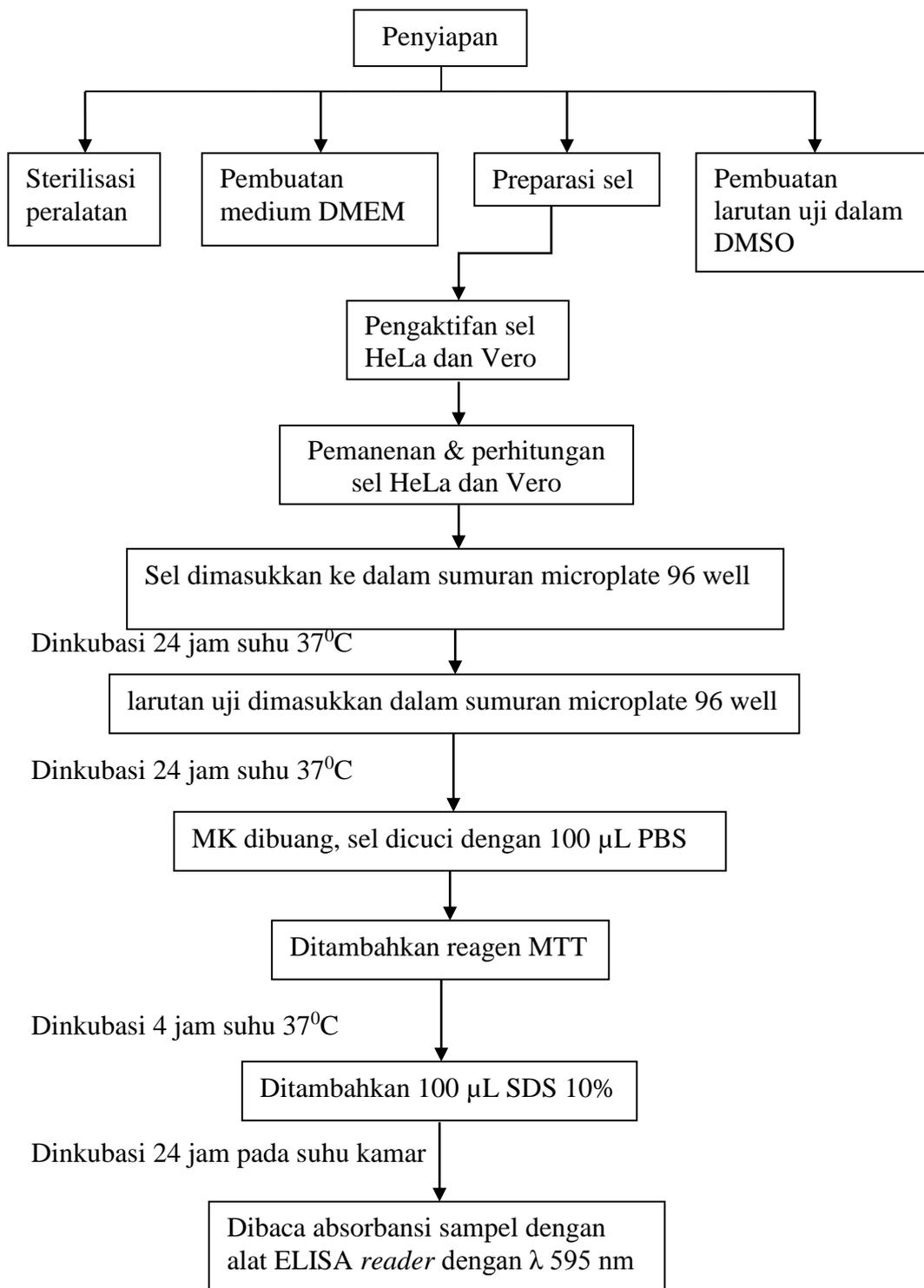
y = persen hidup sel

$IC_{50}$  merupakan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% populasi sel HeLa dan sel Vero. Hasil antilog x dari persamaan di atas, merupakan nilai  $IC_{50}$ . Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  dari masing-masing sampel selanjutnya dilakukan perhitungan indeks selektivitas fraksi etil asetat. Indeks selektivitas diperoleh dari rasio  $IC_{50}$  sel Vero dibandingkan dengan sel kanker yang diuji. Sampel dikatakan bersifat selektif apabila mempunyai selektivitas >10 (Wahyuningsih *et al.* 2014). Indeks selektivitas dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{indeks selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ sel Vero}}{IC_{50} \text{ sel HeLa}}$$



Gambar 6. Skema pembuatan fraksi etil asetat herba kemangi (*Ocimum basilicum* L)



Gambar 7. Skema uji sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi (*Ocimum basilicum L*)

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman pada penelitian ini bertujuan untuk mencocokkan ciri morfologis yang terdapat pada tanaman yang diteliti dengan kunci determinasi, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Determinasi tanaman kemangi dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Universitas Setia Budi Surakarta.

Berdasarkan hasil determinasi tanaman bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kemangi (*Ocimum basilicum* L). Hasil determinasi tanaman kemangi dengan kunci determinasi adalah sebagai berikut : 1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14b – 16a. Golongan 10. 239b – 243b – 244b – 249b – 250b – 266b – 267a – 268b – 271b. Familia 110. Labiatae. 1a – 2b – 4b – 6b – 7b. 8. Ocimum. *Ocimum basilicum* L. Deskripsi lengkap dari tanaman kemangi dapat dilihat pada lampiran 1.

#### **2. Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan serbuk**

Tanaman kemangi yang digunakan berupa daun, batang, dan bunga disortir terlebih dahulu. Tanaman yang diambil diusahakan memiliki umur yang relatif sama sehingga kadar senyawa aktifnya tidak berbeda signifikan. Tanaman kemangi disortir, dicuci dengan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada tanaman. Tanaman kemangi yang diperoleh seberat kg. Selanjutnya, tanaman kemangi yang sudah bersih dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50<sup>0</sup>C hingga kering. Tujuan dari proses pengeringan adalah untuk mencegah terjadinya proses kimiawi yang terjadi dan mencegah kerusakan yang disebabkan adanya bakteri dan jamur. Herba kering yang diperoleh sebanyak gram. Data rendemen berat herba kemangi kering terhadap herba kemangi basah dapat dilihat pada tabel 1 dan perhitungan lengkap rendemen herba kering dapat dilihat pada lampiran 6.

**Tabel 1. Rendemen berat herba kering terhadap berat herba basah.**

Berat basah herba kemangi (g)	Berat kering herba kemangi (g)	Rendemen (%)
20000	1681	8,405

Setelah pengeringan, herba kemangi digiling dan di blender hingga halus, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 dan ditimbang. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan, memperluas permukaan partikel sehingga memaksimalkan proses ekstraksi karena dengan permukaan partikel yang semakin luas dapat meningkatkan kontak antara cairan penyari dan serbuk.

### 3. Hasil karakterisasi herba kemangi (*Ocimum basillicum* L.)

**3.1. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk.** Pemeriksaan organoleptis serbuk bertujuan untuk mengetahui sifat fisik dan karakterisasi dari serbuk baik bentuk, warna, bau, dan rasa. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk herba kemangi dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk herba kemangi**

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Serbuk
Warna	Hijau
Bau	khas kemangi
Rasa	Khelat

**3.2. Hasil penetapan kadar air serbuk herba kemangi.** Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell* menggunakan pelarut xylene. Hasil penetapan kadar air serbuk herba kemangi dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil penetapan kadar air serbuk herba kemangi**

No	Penimbangan (g)	Volume pada skala (ml)	Kadar air %
1	20	1,4	7
2	20	1,5	7,5
3	20	1,4	7
Rata-rata			7,17

Berdasarkan tabel 3 hasil hitungan kadar air herba kemangi yang dilakukan 3 kali replikasi, didapatkan persentase kadar air 7,17 %. Kadar air tidak boleh melebihi 10%, karena kadar air yang tinggi dapat merubah komposisi kimia dari simplisia sehingga menurunkan kualitas simplisia tersebut. Air merupakan media tumbuhnya mikroorganisme yang dapat merusak simplisia. Berdasarkan dari hasil penetapan kadar air serbuk herba kemangi dapat disimpulkan bahwa serbuk herba kemangi ini memenuhi syarat karena persentase kadar air serbuk

tidak lebih dari 10%. Perhitungan penetapan kadar air serbuk herba kemangi dapat dilihat di lampiran 7.

**3.3. Hasil penetapan susut pengeringan pada serbuk herba kemangi.** Penetapan susut pengeringan dalam penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan (Depkes RI 2000). Penetapan susut pengeringan dengan menggunakan alat *moisture balance* dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Hasil penetapan susut pengeringan menggunakan *moisture balance* sebesar 9,6%, perhitungan dapat dilihat pada lampiran 8.

**Tabel 4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk herba kemangi**

No	Penimbangan (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	9,3
2	2	10,2
3	2	9,5
Rata-rata		9,6

Hasil antara kadar susut pengeringan selalu lebih besar daripada hasil kadar air, hal ini dikarenakan pada kadar air parameter yang dihitung hanya kandungan air yang ada di dalam suatu simplisia/sampel, namun jika kadar susut pengeringan yang dihitung bukan hanya kandungan air tetapi bahan lain yang mudah menguap dalam suhu tinggi misal minyak atsiri.

**3.4. Hasil penetapan kadar sari larut air.** Penetapan kadar sari larut dalam air dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang dapat tersari dengan pelarut polar (air) dari suatu simplisia (Depkes RI 2000). Pelarut yang digunakan untuk penetapan kadar sari larut air harus air jenuh kloroform dimana 1 L air dapat dijenuhkan dengan 1 mL kloroform. Hasil penetapan kadar sari yang larut air adalah sebesar 7,3%. Menurut Depkes RI (1989) kadar sari yang larut dalam air untuk serbuk herba kemangi tidak kurang dari 5%. Hasil Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 9.

**Tabel 5. Hasil penetapan kadar sari larut air serbuk herba kemangi**

No	Penimbangan (g)	Bobot sari (g)	Kadar sari larut air (%)
1	5	0,0661	6,61
2	5	0,0938	9,38
3	5	0,0591	5,91
Rata-rata			7,3

**3.5. Hasil penetapan kadar sari larut etanol.** Penetapan kadar sari larut dalam etanol dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang dapat tersari dengan pelarut etanol dari suatu simplisia (Depkes RI 2000). Menurut Depkes RI (1989) kadar sari yang larut dalam etanol untuk serbuk herba kemangi tidak kurang dari 3,5% dan pada penelitian ini kadar sari larut etanol pada herba kemangi memenuhi syarat karena nilainya 25,22%. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 10.

**Tabel 6. Hasil penetapan kadar sari larut etanol serbuk herba kemangi**

No	Penimbangan (g)	Bobot sari (g)	Kadar sari larut etanol (%)
1	5	0,2361	23,61
2	5	0,2976	29,76
3	5	0,2229	22,29
		Rata-rata	25,22

#### **4. Pembuatan ekstrak maserasi herba kemangi**

Pembuatan ekstrak etanol herba kemangi menggunakan metode maserasi yang dilakukan di laboratorium fitokimia Universitas Setia Budi Surakarta. Metode ini dipilih sebagai metode pembuatan ekstrak karena mudah dalam pengerjaannya, selain itu alat yang digunakan juga sederhana. Metode ini cocok untuk senyawa aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan dan biasanya digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung bahan aktif yang mudah larut dalam pelarut dan tidak mudah mengembang dalam cairan penyari (Voigt 1994). Wadah maserasi yang digunakan berkaca gelap untuk menghindarkan dari sinar matahari langsung. Proses maserasi ini dilakukan dengan cara merendam simplisia dalam keadaan tertutup agar etanol tidak menguap pada suhu kamar. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Penggunaan etanol 96% dikarenakan etanol merupakan pelarut universal yang mampu menarik senyawa polar dan non polar.

Serbuk herba kemangi yang digunakan pada pembuatan ekstrak etanol adalah sebesar 1000 g ditambah dengan 7,5 liter etanol 96% selama 5 hari dengan penggojokkan 3 kali sehari. Penggojokkan bertujuan untuk menjamin keseimbangan konsentrasi serbuk dalam cairan penyari. Hasil maserasi disaring dengan menggunakan kain flanel dan kertas saring, ampas hasil maserasi dicuci dengan menggunakan sisa etanol 96% sebanyak 2,5 liter kemudian didiamkan

selama 3 hari. Setelah 3 hari lakukan kembali penyaringan dengan menggunakan kain flanel dan kertas saring lalu tampung maserat yang dihasilkan. Pencucian bertujuan untuk mengambil zat aktif yang masih tertinggal.

Hasil maserasi kemudian diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50<sup>0</sup>C dengan kecepatan 45 rpm sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan sebanyak 63,553 gram dengan rendemen ekstrak sebesar 6,35 %. Data hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel 7 dan lampiran 6.

**Tabel 7. Hasil rendemen ekstrak etanol herba kemangi**

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
1000	63,553	6,35

## 5. Hasil rendemen fraksi etil asetat

Persen rendemen fraksi diperoleh dari menimbang hasil dari fraksi kemudian dibagi berat ekstrak awal yang digunakan untuk fraksinasi dan dikalikan 100%. Dari 15 gram ekstrak dihasilkan fraksi etil asetat sebanyak 1,7 gram dengan rendemen fraksi etil asetat sebesar 11,33 %. Data hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel 8 dan lampiran 6.

**Tabel 8. Hasil rendemen fraksi etil asetat herba kemangi**

Berat ekstrak (g)	Berat fraksi (g)	Rendemen (%)
15	1,7	11,33

## 6. Hasil karakterisasi ekstrak herba kemangi

**6.1. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak.** Pemeriksaan organoleptis ekstrak bertujuan untuk mengetahui sifat fisik dari ekstrak baik bentuk, warna, bau, dan rasa. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak herba kemangi dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol herba kemangi**

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	Hijau kehitaman
Bau	khas kemangi
Rasa	Pahit

**6.2. Hasil penetapan kadar air ekstrak herba kemangi.** Kadar air merupakan salah satu parameter non spesifik yang tujuannya menetapkan residu air yang terkandung setelah proses pengentalan atau pengeringan. Penetapan

kadar air pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell* menggunakan pelarut xylene. Hasil penetapan kadar air ekstrak herba kemangi dapat dilihat pada tabel 10.

**Tabel 10. Hasil penetapan kadar air ekstrak herba kemangi**

No	Penimbangan (g)	Volume pada skala (ml)	Kadar air %
1	10	2,4	24
2	10	2	20
3	10	2,6	26
Rata-rata			23,3333

Ada beberapa jenis ekstrak yakni : ekstrak cair, ekstrak kental dan ekstrak kering. Ekstrak cair jika hasil ekstraksi masih bisa dituang, biasanya kadar air lebih dari 30%. Ekstrak kental jika memiliki kadar air antara 5-30%. Ekstrak kering jika mengandung kadar air kurang dari 5% (Voigt 1994). Ekstrak etanol herba kemangi ini merupakan ekstrak kental sehingga kadar air yang terkandung harus kurang dari 30%. Berdasarkan tabel 9 kadar air ekstrak herba kemangi diperoleh kadar sebesar 23,3333%. Hasil ini memenuhi kriteria dimana ekstrak kental harus memiliki kadar air kurang dari 30%. Perhitungan kadar air ekstrak dapat dilihat pada lampiran 11.

### 6.3. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak herba kemangi.

Susut pengeringan merupakan salah satu parameter non spesifik yang tujuannya mendapatkan persentase senyawa yang mudah menguap atau menghilang selama proses pemanasan, tidak hanya menggambarkan air yang hilang tetapi juga senyawa lain, misalnya minyak atsiri. Penentuan parameter susut pengeringan pada ekstrak etanol herba kemangi di dapatkan nilai susut pengeringan sebesar 26,3667%. Tabel 11 menunjukkan hasil penetapan susut pengeringan dengan *moisture balance*.

**Tabel 11. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak herba kemangi**

No	Penimbangan (g)	Kadar air (%)
1	2	26,7
2	2	25,3
3	2	27,1
Rata-rata		26,3667

## 7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol dan fraksi etil asetat herba kemangi

### 7.1. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia dengan reaksi warna.

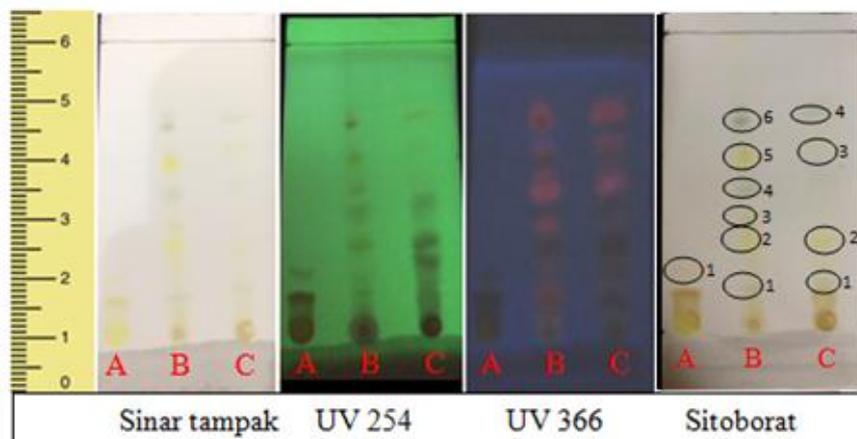
Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi

bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan metabolit sekunder. Identifikasi dilakukan dengan melihat adanya perubahan warna atau terjadinya endapan setelah diberikan pereaksi khusus kemudian dibandingkan dengan pustaka acuan yang ada. Berdasarkan hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol herba kemangi positif mengandung senyawa golongan flavonoid, fenolik, tanin, steroid/triterpenoid. Hasil identifikasi kandungan kimia fraksi etil asetat herba kemangi positif mengandung senyawa golongan flavonoid, fenolik, dan tanin. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 12.

**Tabel 12. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi etil asetat**

Golongan senyawa	Hasil		Kesimpulan		Pustaka
	Ekstrak	Fraksi	Ekstrak	Fraksi	
Flavonoid	Merah pekat	Merah pekat	(+)	(+)	Warna merah sampai ungu pada lapisan amil alkohol (Depkes RI 1979).
Fenolik	Hitam	Hitam	(+)	(+)	Warna hijau, biru, merah, ungu, atau hitam pekat (Harbone 1987)
Alkaloid	Tidak terbentuk endapan baik pada mayer & bouchardat	Tidak terbentuk endapan baik pada mayer & bouchardat	(-)	(-)	Terbentuk endapan warna putih kuning pada mayer, endapan berwarna coklat sampai hitam pada bouchardat (Depkes RI 1980).
Saponin	Tidak terbentuk buih	Tidak terbentuk buih	(-)	(-)	Terbentuk busa > 10 menit setinggi 1-10 cm (Fransworth 1969)
Tanin	Biru tinta	Biru tinta	(+)	(+)	Endapan merah muda (tanin katekuat), warna biru tinta (tanin galat) (Fransworth 1969)
Steroid/ Triterpenoid	Terbentuk cincin biru dan coklat	Tidak terbentuk cincin	(+)	(-)	Steroid cincin biru, triterpenoid cincin coklat/violet (Ciulei 1984)

**7.1. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak etanol dan fraksi etil asetat herba kemangi secara KLT.** Identifikasi senyawa ini digunakan untuk mengetahui senyawa golongan flavonoid, alkaloid, tanin, steroid/terpenoid pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat herba kemangi dengan metode KLT. Perhitungan Rf secara rinci dapat dilihat pada lampiran 13.



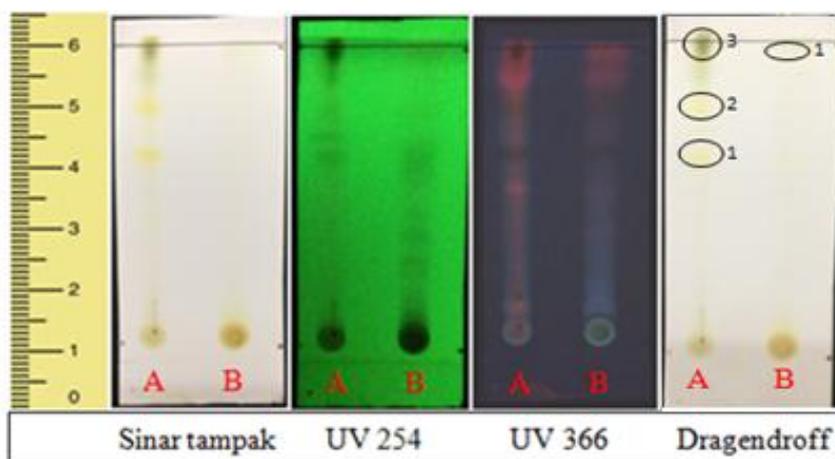
**Gambar 8.** Profil KLT identifikasi flavonoid pada ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Baku kuersetin (A), ekstrak etanol (B), fraksi etil asetat (C)

**Tabel 13.** Hasil identifikasi flavonoid secara KLT terhadap ekstrak & fraksi etil asetat

Sampel	Kode Bercak	Rf	UV 254	UV 366	Pereaksi sitoborat	Pustaka (Depkes RI 1987)	Ket
Kuersetin	A1	0,2	Peredaman	Flouresensi Coklat muda	Kuning	Kuning	
Ekstrak	B2	0,3	Peredaman	Flouresensi Coklat muda	Kuning	Kuning	+
	B5	0,6	Peredaman	Flouresensi Coklat muda	Kuning	Kuning	+
Fraksi	C2	0,3	Peredaman	Floresensi Coklat muda	Kuning	Kuning	+
	C3	0,6	Peredaman	Floresensi Coklat muda	Kuning	Kuning	+

Pemeriksaan kandungan kimia senyawa golongan flavonoid menggunakan fase gerak *n*-heksana : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2) dan fase diam silika gel GF254, pereaksi untuk deteksi bercak yang digunakan adalah sitoborat serta pembanding yang digunakan adalah kuersetin. Hasil identifikasi kuersetin pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman, UV 366 menunjukkan bercak flouresensi berwarna coklat muda, dan setelah disemprot dengan sitoborat terdapat bercak berwarna kuning dengan nilai Rf sebesar 0,2. Hasil identifikasi ekstrak dan fraksi etil asetat pada UV 254 juga menunjukkan adanya peredaman,

pada UV 366 menunjukkan fluoresensi berwarna coklat muda, dan setelah disemprot dengan pereaksi sitoborat terdapat bercak berwarna kuning dengan nilai Rf sebesar 0,3 dan 0,6. Nilai Rf yang berbeda antara baku kuersetin, ekstrak dan fraksi etil asetat menunjukkan bahwa di dalam ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi tidak terdapat senyawa kuersetin tetapi mengandung senyawa golongan flavonoid. Hal ini dibuktikan dengan adanya bercak berwarna kuning pada ekstrak dan fraksi etil asetat setelah disemprot dengan sitoborat.



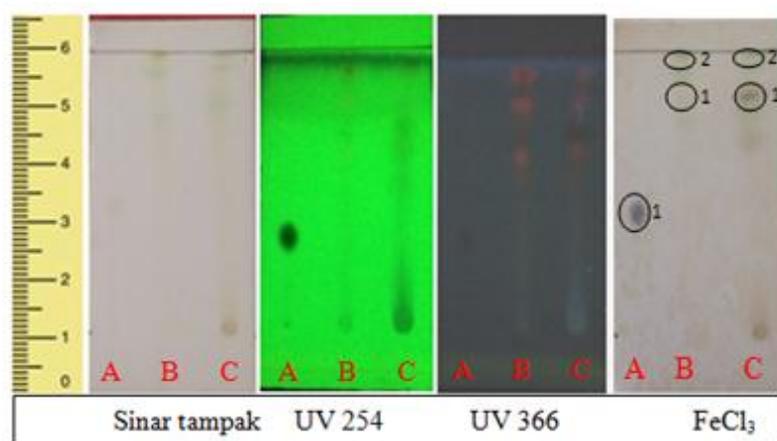
**Gambar 9.** Profil KLT identifikasi alkaloid pada ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi dengan fase gerak toluen : etil asetat : dietil amin (7:2:1). ekstrak etanol (A), fraksi etil asetat (B)

**Tabel 14.** Hasil identifikasi alkaloid secara KLT terhadap ekstrak dan fraksi etil asetat

Sampel	Kode Bercak	Rf	UV 254	UV 366	Pereaksi dragendorf	Pustaka (Meiyanto 2002)	Ket
Ekstrak	A1	0,615	Peredaman	Flouresensi	Tidak mengalami perubahan	Merah bata	-
	A2	0,77	Peredaman	Flouresensi	Tidak mengalami perubahan	Merah bata	-
	A3	0,96	Peredaman	Flouresensi	Tidak mengalami perubahan	Merah bata	-
Fraksi	B1	0,94	Peredaman	Flouresensi	Tidak mengalami perubahan	Merah bata	-

Identifikasi kandungan kimia senyawa golongan alkaloid menggunakan fase gerak toluen : etil asetat : dietil amin (7:2:1) dan fase diam silika gel GF254, pereaksi untuk deteksi bercak yang digunakan adalah dragendroff. Hasil identifikasi ekstrak dan fraksi etil asetat pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman dan UV 366 menunjukkan adanya flouresensi, kemudian setelah

disemprot dengan pereaksi dragendroff tidak dihasilkan warna merah bata (tidak terjadi perubahan). Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa alkaloid pada ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi dinyatakan negatif alkaloid karena tidak terdapat kesesuaian hasil pengamatan dengan pustaka.



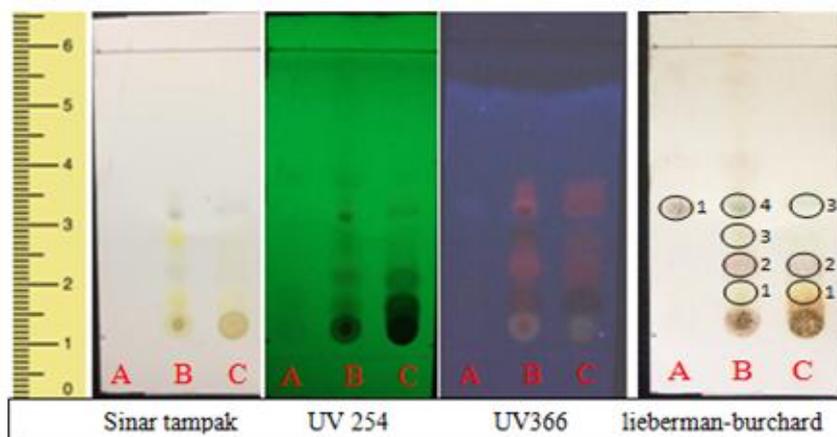
**Gambar 10.** Profil KLT identifikasi tanin pada ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Baku asam galat (A), ekstrak etanol (B), fraksi etil asetat (C)

**Tabel 15.** Hasil identifikasi tanin secara KLT terhadap ekstrak dan fraksi etil asetat

Sampel	Kode Bercak	Rf	UV 254	UV 366	Pereaksi FeCl <sub>3</sub>	Pustaka (Harbone 1987)	Ket
Asam galat	A1	0,46	Peredaman	Flouresensi	Hitam	Hijau tua kehitaman	
Ekstrak	B1	0,86	Peredaman	Flouresensi	Biru kehitaman	Hijau tua kehitaman	+
Fraksi	C1	0,86	Peredaman	Flouresensi	Biru kehitaman	Hijau tua kehitaman	+

Pemeriksaan kandungan kimia senyawa golongan tanin menggunakan fase gerak *n*-heksana : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2) dan fase diam silika gel GF254, pereaksi untuk deteksi bercak yang digunakan adalah FeCl<sub>3</sub> serta pembanding yang digunakan adalah asam galat. Hasil identifikasi asam galat pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman hitam, UV 366 menunjukkan adanya flouresensi senyawa, dan setelah disemprot dengan FeCl<sub>3</sub> terdapat bercak berwarna hitam dengan nilai Rf sebesar 0,46. Hasil identifikasi ekstrak dan fraksi etil asetat pada UV 254 dan juga UV 366 menunjukkan adanya peredaman dan flouresensi, setelah disemprot dengan pereaksi FeCl<sub>3</sub> terdapat bercak berwarna biru kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,86. Nilai Rf yang berbeda antara baku

asam galat, ekstrak dan fraksi etil asetat menunjukkan bahwa di dalam ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi tidak terdapat senyawa asam galat tetapi mengandung senyawa golongan tanin.



**Gambar 11.** Profil KLT identifikasi steroid/triterpenoid pada ekstrak dan fraksi etil asetat herba kemangi dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (6:4). Baku stigmasterol (A), ekstrak etanol (B), fraksi etil asetat (C)

**Tabel 16.** Hasil identifikasi steroid/triterpenoid secara KLT terhadap ekstrak & fraksi etil

Sampel	Kode Bercak	Rf	UV 254	UV 366	Pereaksi lieberman burchard	Pustaka (Harbone 1987)	Ket
Stigmasterol	A1	0,46	Tidak ada peredaman	Flouresensi	Biru	Steroid merah-ungu, triterpenoid hijau-biru	
Ekstrak	B2	0,24	Peredaman	Flouresensi	Merah ungu	Steroid merah-ungu, triterpenoid hijau-biru	+
	B4	0,46	Peredaman	Flouresensi	Hijau kebiruan	Steroid merah-ungu, triterpenoid hijau-biru	+
Fraksi	C2	0,24	Peredaman	Flouresensi	Merah ungu	Steroid merah-ungu, triterpenoid hijau-biru	+
	C3	0,46	Peredaman	Flouresensi	Hijau pudar	Steroid merah-ungu, triterpenoid hijau-biru	+

Identifikasi kandungan kimia senyawa golongan steroid/triterpenoid menggunakan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (6:4) dan fase diam silika gel GF254, pereaksi untuk deteksi bercak yang digunakan adalah lieberman burchard (LB). Hasil identifikasi stigmasterol pada UV 254 tidak menunjukkan adanya peredaman, UV 366 menunjukkan adanya fluoresensi senyawa, dan setelah disemprot dengan lieberman burchard (LB) terdapat bercak berwarna biru dengan nilai Rf sebesar 0,46. Hasil identifikasi ekstrak dan fraksi etil asetat pada UV 254 dan juga UV 366 menunjukkan adanya peredaman, dan setelah disemprot dengan pereaksi lieberman burchard (LB) terdapat bercak berwarna merah ungu (triterpenoid) dengan nilai Rf sebesar 0,16 dan bercak berwarna hijau-kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,46. Nilai Rf yang sama antara baku stigmasterol dan ekstrak menunjukkan bahwa di dalam ekstrak herba kemangi terdapat senyawa stigmasterol, dan senyawa golongan triterpenoid.

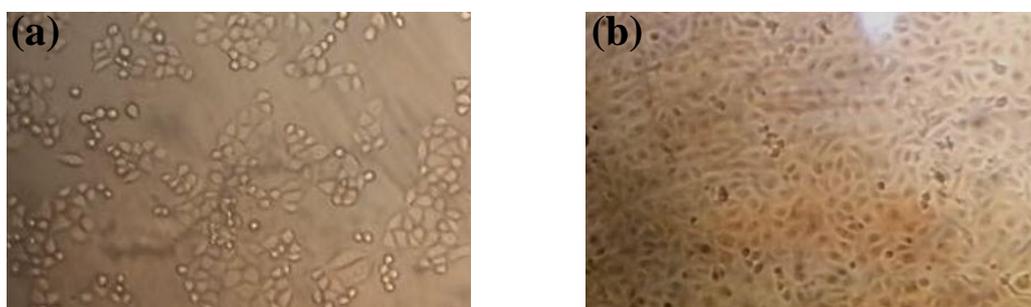
#### **8. Hasil uji sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi dengan metode MTT**

Pengujian sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel Vero dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Uji sitotoksik pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ketoksikan fraksi etil asetat herba kemangi terhadap kultur sel HeLa dan selektivitasnya terhadap sel Vero. Uji sitotoksik digunakan sebagai skrining tahap awal untuk mengetahui pengaruh suatu bahan dalam menghambat pertumbuhan sel tumor. Aktivitas sitotoksik dapat diketahui dengan nilai *inhibition concentration* 50% (IC<sub>50</sub>) dimana nilai IC<sub>50</sub> ditunjukkan dengan nilai konsentrasi yang dihasilkan dari hambatan 50% sel dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

Uji sitotoksik dimulai dengan menumbuhkan kultur sel HeLa dan sel Vero dalam media penumbuh. Kebanyakan, media pertumbuhan yang digunakan merupakan media kimiawi, ditambahkan dengan serum 5-20% yang mengandung faktor pertumbuhan (stimulan) yang penting untuk pembelahan sel misal FBS (*Fetal Bovine Serum*). Selain mengandung serum, media juga diperkaya dengan antibiotik (biasanya penicillin dan streptomisin) dan antijamur (fungison) untuk

membantu mencegah kontaminasi bakteri ataupun jamur. Media tumbuh juga membutuhkan penyangga karena terjadinya dua kondisi, yaitu penggunaan flask terbuka menyebabkan masuknya O<sub>2</sub> dan meningkatnya pH, dan konsentrasi sel yang tinggi menyebabkan diproduksinya CO<sub>2</sub> dan asam laktat sehingga menyebabkan turunnya pH. Umumnya pertumbuhan sel yang baik terjadi pada pH 7,0-7,4.

Penumbuhan kultur sel HeLa dan sel Vero dilakukan dalam medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Medium ini merupakan medium kultur berupa buffer bikarbonat yang didesain untuk pH 7,2–7,4 pada keadaan 5% CO<sub>2</sub> dan 95% udara (Hogan *et al.* 1994). Medium ini mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, glukosa dan fenol red (Mather & Roberts 1998). Keberadaan fenol red digunakan sebagai indikator pH yang akan berwarna merah pada pH 7,4; orange pH 7,0; kuning pH 6,5; kebiru-biruan pH 7,6; dan ungu pH 7,8. Kultur sel yang telah konfluen dapat digunakan untuk pengujian atau disubkultur. Sel yang telah konfluen terlihat menempel rapat di dasar *flask*.



**Gambar 12. Morfologi sel HeLa (a), morfologi sel Vero (b)**

Morfologi sel yang diamati dengan *microscop inverted* menunjukkan bahwa sel HeLa berbentuk poligonal dengan intisel yang tampak jelas (gambar 12a) dan sel Vero berbentuk lonjong dan ramping (gambar 12b). Proses pengambilan sel yang telah konfluen disebut panen sel. Poin utama dari panen sel adalah melepaskan ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matrik tanpa merusak sel itu sendiri. Media kultur sel dibuang untuk mempermudah proses pemanenan sel, kemudian sel yang berada di dalam petri *dish/flask* dicuci 2x dengan menggunakan PBS (volume ½ dari volume media awal) lalu baru ditambahkan

100  $\mu$ l tripsin selama 3 menit agar sel lepas dari dasar *flask*. Pencucian dengan PBS berfungsi untuk menghilangkan serum dalam media DMEM yang tertinggal, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin (Freshney 2010). Pemberian tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara molekul glikoprotein dan proteoglikan dengan permukaan *flask*, akibatnya sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada permukaan *flask* dan terlihat mengapung (Doyle *et al.* 2000). Kerja tripsin diinaktifkan dengan penambahan media penumbuh yang sesuai dengan volume awal.

Sel yang telah dipanen kemudian dilakukan perhitungan sel. Perhitungan jumlah kepadatan sel dilakukan dengan menggunakan alat *Haemocytometer*, Syarat penghitungan sel dengan metode hemositometri adalah sel harus berdiri sendiri-sendiri/tidak menggerombol. Sel yang telah diinkubasi ditambahkan *tripanblue* dengan pengenceran 10x kemudian dilihat di bawah mikroskop. Syarat jumlah kepadatan sel yang digunakan dalam tiap sumuran dalam penelitian ini adalah  $1 \times 10^4$  sel/100 $\mu$ l. Adapun jumlah kepadatan sel yang diperoleh ialah  $1,095 \times 10^6$  sel/mL. Jumlah suspensi sel yang harus dipipetkan dalam tiap sumuran adalah sebanyak 0,91 mL/microplate kemudian ditambahkan medium DMEM berserum ad 10 mL. Perhitungan kepadatan sel dapat dilihat pada lampiran 17.

Sel yang telah sesuai jumlahnya kemudian ditambahkan medium DMEM sehingga diperoleh suspensi sel yang dapat langsung dipindahkan ke dalam *microplate*. Medium yang berisi sel didistribusikan dalam 96 sumuran masing-masing 100 $\mu$ l, dan dilakukan inkubasi selama 24 jam. Tujuan dilakukan inkubasi ini adalah untuk memulihkan kembali sel setelah proses panen. Setelah sel normal kembali, segera dibuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan. Perlakuan sel HeLa dibedakan menjadi lima kelompok perlakuan yakni sampel (medium kultur+sel+sampel), kontrol sel (medium kultur+sel), kontrol positif (medium kultur+sel+cisplatin), kontrol medium (medium kultur) dan kontrol pelarut (medium kultur+sel+DMSO). Variasi konsentrasi sampel yang digunakan adalah 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,812  $\mu$ g/ml. Cisplatin digunakan sebagai kontrol positif dengan variasi konsentrasi mulai dari 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; dan 1,562 $\mu$ g/ml.

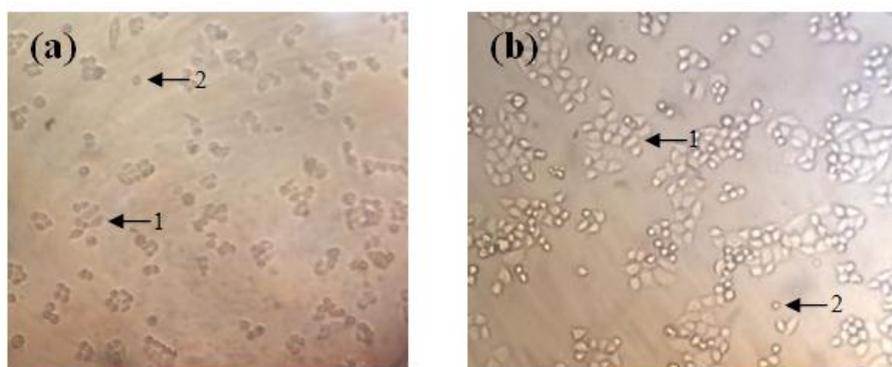
Pengujian aktivitas ini sampel uji dilarutkan dengan DMSO. Karena DMSO bersifat bipolar, sehingga dapat melarutkan ekstrak lebih sempurna bila dibandingkan dengan metanol atau pelarut lain. DMSO juga diperlukan sel sebagai *cryoprotektan* dalam proses *cryopreservasi* (Malole 1990). Konsentrasi DMSO yang digunakan adalah 1% dan 2%. DMSO digunakan sebagai kontrol pelarut dimaksudkan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut sampel (DMSO) terhadap pertumbuhan sel. Keuntungan dari dimetil sulfoksida (DMSO) yaitu bersifat tidak toksik terhadap sel pada kadar rendah, dapat melarutkan senyawa polar atau nonpolar, dapat bercampur dengan air, merupakan pelarut yang baik untuk ion anorganik maupun organik, dan tidak berwarna (Fessenden & Fessenden 1994).

Cisplatin dipakai sebagai kontrol positif karena cisplatin merupakan obat terpilih kanker yang telah banyak digunakan pada pengobatan penyakit ini. Tujuan digunakan cisplatin sebagai agen standar adalah untuk menganalisis dan mempelajari produk atau kandidat senyawa antikanker yang sedang diuji. Sitotoksisitas pemberian cisplatin dapat terjadi pada setiap tahap pengembangan siklus sel, khususnya ketika sel berada pada fase G1 dan S, sedangkan antikanker produk tanaman bekerja dengan memblokir mitosis. Kromosom akan terpecah pecah, menyebar atau berkelompok. Kromosom tidak mampu membagi dan memisah dengan benar akan menyebabkan sel menjadi mati dan perkembangan berhenti pada stadium metafase (Wahyudi 2009).

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode kolorimetrik menggunakan reagen MTT  $\{(3-(4,5\text{-dimetiltiazol-2-il})-2,5\text{-difenil tetrazolium bromid})\}$  secara in vitro. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan SDS 10% sebagai *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini sehingga tidak mencul pengendapan pada saat pengukuran absorbansi menggunakan ELISA *reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup.

Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.

Aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel HeLa dapat diamati dari perubahan morfologi sel setelah 24 jam inkubasi. Inkubasi ini bertujuan untuk memaksimalkan kerja dari sampel uji. Morfologi sel HeLa setelah di inkubasi 24 jam dengan penambahan fraksi etil asetat mengalami perubahan bentuk menjadi lebih bulat dengan kepadatan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol sel. Perubahan bentuk sel Hela dapat dilihat pada gambar 13.

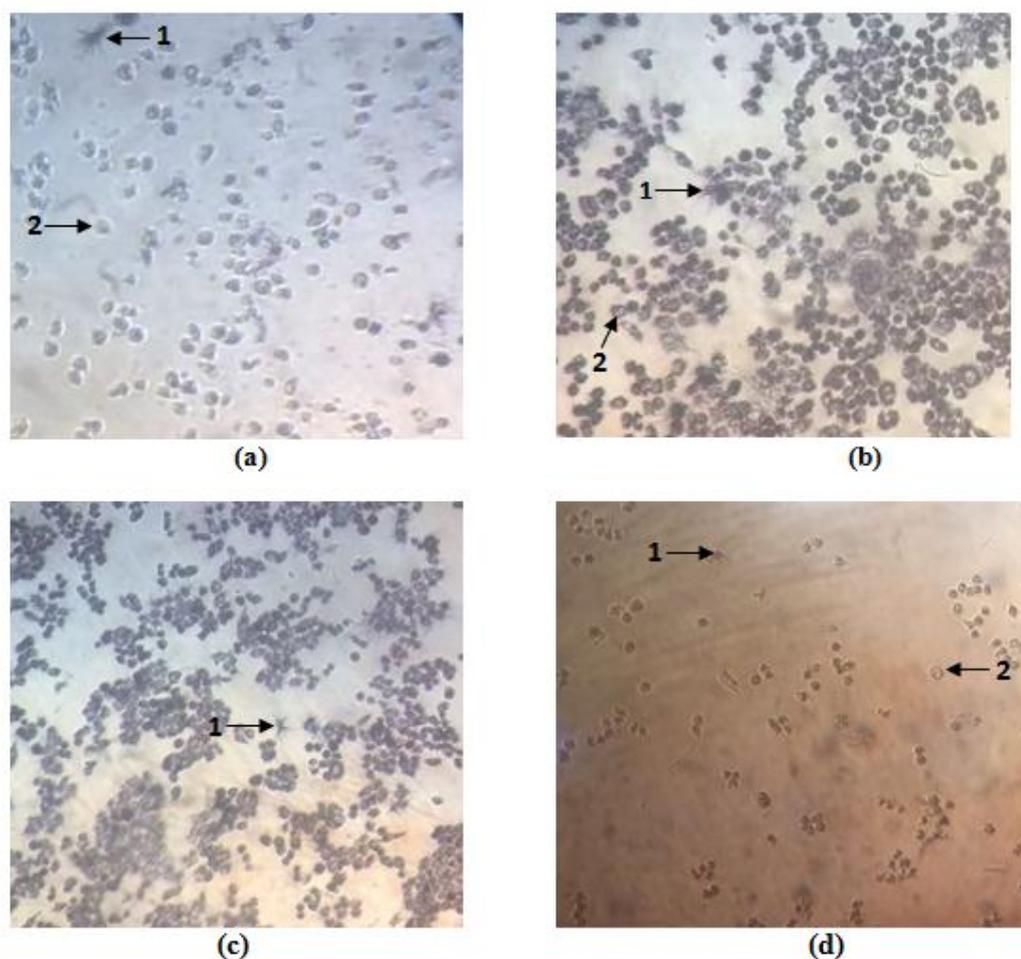


**Gambar 13. Morfologi sel HeLa setelah 24 jam pada perlakuan (a) fraksi etil asetat 500 µg/mL, (b) kontrol sel. Keterangan : (1) sel hidup, (2) sel mati**

Berdasarkan gambar 13 tampak sel HeLa pada kelompok kontrol berbentuk poligonal dengan intisel yang tampak jelas dan menempel pada tissue culture bagian bawah karena sel mampu melakukan metabolisme memanfaatkan nutrisi pada media. Kelompok fraksi etil asetat konsentrasi 500 µg/mL mempengaruhi perubahan morfologi sel menjadi lebih bulat dan berukuran kecil dengan kepadatan sel yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Sel yang mati berwarna gelap dan tidak menempel pada dasar *tissue culture* karena sel yang mati kehilangan kemampuannya untuk mempertahankan dan memberikan energi bagi fungsi metabolik serta pertumbuhan sel (Pebriana *et al.* 2008).

Sel yang telah ditambahkan reagen MTT diinkubasi selama 2-4 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> sampai terbentuk kristal formazan. Morfologi sel sebelum penambahan MTT dan sesudah penambahan MTT akan mengalami perubahan dimana sel yang hidup akan membentuk kristal jarum warna ungu karena dapat mereduksi MTT dan sel yang mati tidak membentuk kristal formazan karena tidak

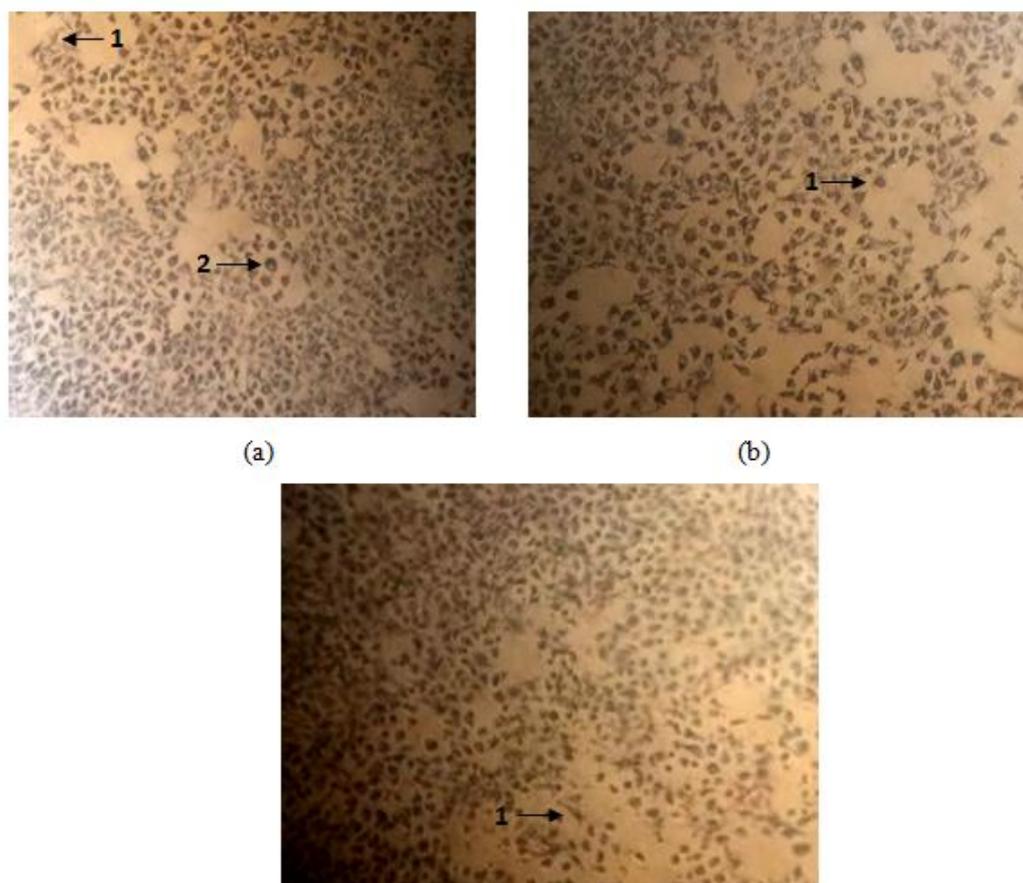
dapat mereduksi MTT. Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. MTT akan diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria dari warna kuning menjadi kristal formazan warna ungu (Doyle & Griffiths 2000). Morfologi sel HeLa setelah pemberian reagen MTT diamati dengan menggunakan mikroskop inverted perbesaran 100x setelah 4 jam inkubasi.



**Gambar 14.** Penampakan morfologi sel HeLa perbesaran 100x setelah penambahan fraksi etil asetat herba kemangi dan reagen MTT pada perlakuan (a) konsentrasi 500µg/ml , (b) konsentrasi 7,81µg/ml, (c) kontrol sel, (d) Cisplatin konsentrasi 100 µg/ml. Keterangan : (1) sel hidup, (2) sel mati

Berdasarkan gambar di atas terlihat bahwa fraksi etil asetat herba kemangi mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa tetapi tidak lebih besar dibandingkan kontrol positif (cisplatin). Hal ini terlihat pada jumlah kristal formazan yang

dihasilkan serta jumlah persentase kematian sel. Semakin besar kadar senyawa uji maka semakin besar pula jumlah persentase kematian sel. Hal itu terlihat pada fraksi etil asetat konsentrasi 500  $\mu\text{g/ml}$  yg memiliki lebih sedikit kristal formazan (sel hidup) daripada fraksi etil asetat dengan konsentrasi 7,81  $\mu\text{g/ml}$  yang memiliki banyak kristal formazan. Semakin banyak kristal formazan yang dihasilkan maka semakin banyak pula jumlah sel yang hidup, sehingga intensitas warna yang dihasilkan akan semakin ungu.



**Gambar 15.** Penampakan morfologi sel Vero perbesaran 100x setelah penambahan fraksi etil asetat herba kemangi dan reagen MTT pada perlakuan (a) konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$  , (b) konsentrasi 7,81 $\mu\text{g/ml}$ , (c) kontrol sel. Keterangan : (1) sel hidup, (2) sel mati

Berdasarkan gambar diatas menunjukkan bahwa fraksi etil asetat herba kemangi konsentrasi 500 dan 7,81  $\mu\text{g/ml}$  tidak menghambat pertumbuhan sel Vero (normal). Hal ini terlihat pada jumlah kristal formazan yang dihasilkan serta jumlah persentase kematian sel. Berdasarkan metode MTT, sel yang hidup akan

membentuk kristal formazan seperti yang terlihat pada gambar 15. Formazan merupakan zat berwarna ungu yang tidak larut dalam air sehingga dilarutkan menggunakan SDS 10%. Formazan yang terlarut dalam SDS 10% kemudian diukur serapannya secara spektrofotometri dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Intensitas warna ungu yang terbentuk dapat ditetapkan dengan spektrofotometri dan berkorelasi langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme, sehingga berkorelasi dengan viabilitas sel.

Nilai absorbansi selanjutnya digunakan untuk menghitung % sel hidup dan  $IC_{50}$  dengan menggunakan program Microsoft Excel (log konsentrasi dan regresi linier). Semakin besar nilai absorbansinya maka % sel hidup dan nilai  $IC_{50}$  senyawa juga semakin besar. Suatu senyawa memiliki nilai  $IC_{50}$  yang bagus apabila absorbansi yang dihasilkan sama atau kurang dengan kontrol blank (media). Pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel pada penelitian ini adalah *Dimethyl sulfoxide* (DMSO). Penelitian Da'i (2003) mengatakan bahwa Analisa untuk sel HeLa tanpa perlakuan dan dengan perlakuan pelarut DMSO menunjukkan profil pertumbuhan yang relatif sama. Penelitian Puji (2011) menunjukkan bahwa dengan konsentrasi DMSO sebesar 0,480 didapatkan nilai kematian sel HeLa sebesar 5,324%.

**Tabel 17. Hasil perhitungan % sel hidup pelarut DMSO terhadap sel Hela**

Absorbansi kadar 1%	Rata-rata absorbansi	% sel hidup	Rata-rata % sel hidup	Absorbansi kadar 2%	Rata-rata absorbansi	% sel hidup	Rata-rata % sel hidup
0,435		94,112		0,423		90,425	
0,429		92,268		0,418		88,889	
0,433	0,434	93,497	93,804	0,416	0,422	88,274	90,118
0,434		93,804		0,423		90,425	
0,437		94,726		0,428		91,961	
0,436		94,419		0,424		90,732	

Konsentrasi DMSO yang digunakan pada penelitian ini adalah sebesar 1% dan 2%. Hasil yang diperoleh dari perhitungan % sel hidup DMSO terhadap sel Hela menunjukkan angka sebesar 93,804% dan 90,118% pada konsentrasi 1% dan 2%. DMSO digunakan sebagai kontrol dimaksudkan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh DMSO terhadap pertumbuhan sel. Nurrochmad (2001) membuktikan konsentrasi DMSO sampai 4 % v/v tidak mengganggu proliferasi sel HeLa.

**Tabel 18. Hasil perhitungan % sel hidup oleh perlakuan ekstrak etanol herba kemangi terhadap sel HeLa**

Kadar $\mu\text{g/mL}$	log kadar $\mu\text{g/mL}$	Absorbansi rata-rata	% sel hidup rata-rata
500	2,699	0,468	46,898
250	2,398	0,606	64,655
125	2,097	0,740	81,900
62,5	1,796	0,882	100,128
31,25	1,495	0,946	105,648
15,625	1,194	0,961	110,141
7,81	0,893	0,965	108,815

Hasil yang diperoleh dari perhitungan % sel hidup oleh perlakuan ekstrak etanol herba kemangi terhadap sel HeLa menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka jumlah % sel hidup akan semakin kecil. Persentase hidup sel HeLa terendah sebesar 46.898% terdapat pada konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan persentase hidup sel HeLa tertinggi sebesar 110.141% terdapat pada konsentrasi 15.625  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak etanol hanya mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa sampai konsentrasi 125  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan pada konsentrasi rendah ekstrak etanol herba kemangi tidak memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel HeLa.

**Tabel 19. Hasil perhitungan % sel hidup oleh perlakuan fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel HeLa**

Kadar $\mu\text{g/mL}$	log kadar $\mu\text{g/mL}$	Rata-rata absorbansi	Rata-rata % sel hidup
500	2,699	0,147	5,632
250	2,398	0,232	31,644
125	2,097	0,376	75,986
62,5	1,796	0,444	96,877
31,25	1,495	0,459	101,485
15,625	1,194	0,440	95,648
7,81	0,893	0,4373	94,828

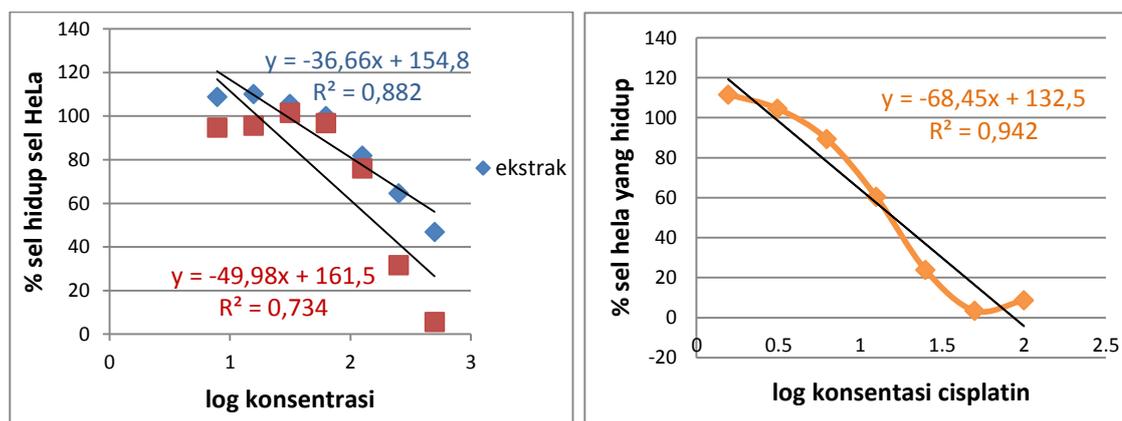
Hasil yang diperoleh dari perhitungan % sel hidup oleh perlakuan fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel HeLa menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka jumlah % sel hidup akan semakin kecil. Persentase hidup sel HeLa paling rendah sebesar 5.632% terdapat pada konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan prosentase hidup sel HeLa tertinggi sebesar 101.485% terdapat pada konsentrasi 31.25  $\mu\text{g/mL}$  setelah pemberian fraksi etil asetat. Konsentrasi fraksi etil asetat yang rendah (62,5; 31,25; 15,625; dan 7,81  $\mu\text{g/mL}$ ) tidak memiliki

kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel HeLa dan fraksi etil asetat ini hanya mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa sampai konsentrasi 125  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabel 20.** Hasil perhitungan % sel hidup oleh perlakuan kontrol positif (cisplatin) terhadap sel HeLa

Kadar $\mu\text{g/mL}$	log kadar $\mu\text{g/mL}$	Rata-rata absorbansi	Rata-rata % sel hidup
100	2	0,157	8,705
50	1,699	0,140	3,482
25	1,398	0,207	23,963
12,5	1,097	0,326	60,522
6,25	0,796	0,419	89,298
3,125	0,495	0,469	104,557
1,5625	0,194	0,492	111,623

Kontrol positif (cisplatin) menghasilkan persentase hidup sel hela yang paling rendah sebesar 3.482% pada konsentrasi 50  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan persentase hidup sel hela tertinggi sebesar 111.623% terdapat pada konsentrasi 1.562  $\mu\text{g/mL}$ . Kontrol positif (Cisplatin) masih memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel HeLa sampai pada konsentrasi 12,5  $\mu\text{g/mL}$  namun pada konsentrasi rendah (6.25; 3,124; 1.562  $\mu\text{g/mL}$ ) cisplatin sudah tidak mampu untuk menghambat pertumbuhan sel HeLa.



**Gambar 16.** Grafik persentase sel HeLa yang hidup pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat herba kemangi dan cisplatin

Grafik hubungan log kadar ekstrak etanol herba kemangi dengan persentase sel hela yang hidup diperoleh nilai regresi linier  $Y = -36,66x + 154,8$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) 0,943 sehingga diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar

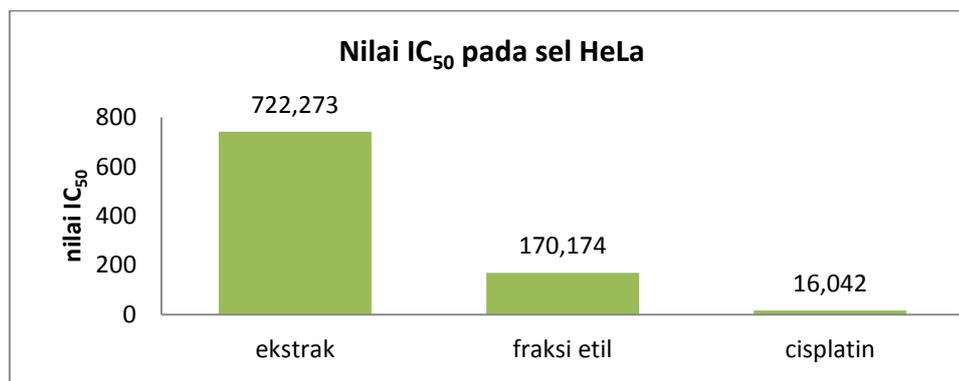
743.019 $\mu$ g/ml. Hasil uji untuk fraksi etil asetat herba kemangi pada sel HeLa menunjukkan nilai regresi linier  $Y = -49,98x + 161,5$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,857. Harga  $IC_{50}$  fraksi etil asetat terhadap sel HeLa diperoleh dengan memasukan harga persen sel hidup ( $Y$ ) = 50 kedalam persamaan regresi linier sehingga diperoleh harga  $IC_{50}$  sebesar 170,174 $\mu$ g/ml. Hasil uji untuk cisplatin pada sel hela menunjukkan nilai regresi linier  $Y = -68,45x + 132,5$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) 0,971 dan diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 16.042 $\mu$ g/ml.

Validitas suatu tes dinyatakan dengan angka koefisien korelasi ( $r$ ). Hasil perhitungan regresi linier antara log konsentrasi vs % viabilitas diperoleh grafik yang memperlihatkan deret titik pada garis linier.idealnya deretan titik tepat pada garis linier. Pengujian ini menggunakan sistem sel yang hidup, sehingga sulit didapat hasil yang linier, juga tidak selalu menghasilkan hubungan yang sempurna (Scheffler 1987). Koefisien korelasi ( $r$ ) yang diperoleh kemudian dihubungkan dengan tabel interpretasi koefisien korelasi. Menurut Usman (2002) nilai  $r$  dapat dikorelasi seperti tabel di bawah ini.

**Tabel 21. Interpretasi koefisien nilai R**

<b>R</b>	<b>Interpretasi</b>
0	Tidak berkorelasi
0,01-0,20	Sangat rendah
0,21-0,40	Rendah
0,41-0,60	Agak rendah
0,61-0,80	Cukup
0,81-1,00	Tinggi
1	Sangat tinggi

Berdasarkan hasil tabel 16 maka nilai koefisien korelasi ekstrak etanol herba kemangi yakni 0,943 menunjukkan tingkat hubungan korelasi yang tinggi. Nilai koefisien fraksi etil asetat herba kemangi menunjukkan tingkat korelasi yang tinggi dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,857. Nilai koefisien korelasi cisplatin menunjukkan tingkat hubungan korelasi yang tinggi daripada perlakuan lain dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,971.



**Gambar 17. Grafik nilai IC<sub>50</sub> perlakuan pada sel HeLa**

Gambar 17 menunjukkan bahwa nilai IC<sub>50</sub> cisplatin paling rendah dibandingkan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat herba kemangi. Hal ini menunjukkan bahwa cisplatin memiliki kemampuan membunuh sel HeLa lebih poten daripada ekstrak dan fraksi etil asetat. Ekstrak etanol memiliki nilai IC<sub>50</sub> yg besar karena pada ekstrak etanol terkandung banyak senyawa mulai dari senyawa polar, semi polar dan non polar yg menyebabkan kerja ekstrak dalam menghambat pertumbuhan sel kanker tidak maksimal karena senyawa yang terkandung dalam ekstrak terlalu kompleks. Penelitian dari Ismiyati & Nurhaeni (2016) menunjukkan bahwa ekstrak batang dan daun kemangi mampu menyebabkan kematian sel HeLa dengan IC<sub>50</sub> sebesar 209 µg/mL. Perbedaan nilai IC<sub>50</sub> antara ekstrak etanol kemangi disebabkan karena pengambilan sampel yang digunakan berbeda, kualitas ekstrak yang berbeda, serta kondisi kultur sel yang berbeda.

Rentang nilai IC<sub>50</sub> menurut NCI (National Cancer Institute), suatu ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas antikanker tinggi apabila nilainya < 30 µg/ml, memiliki aktivitas antikanker moderat apabila memiliki nilai 30 µg/ml ≤ IC<sub>50</sub> < 100 µg/ml dan tidak aktif apabila nilai IC<sub>50</sub> > 100 µg/ml (Zheng *et al.* 2000). Jika dilihat dari nilai IC<sub>50</sub> yang didapatkan, fraksi etil asetat herba kemangi masuk dalam aktivitas antikanker yang tidak aktif sedangkan nilai IC<sub>50</sub> cisplatin menunjukkan bahwa cisplatin masuk dalam kategori aktivitas antikanker yang tinggi. Penggunaan cisplatin dalam penelitian ini digunakan untuk membandingkan aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat herba kemangi dengan obat yang biasa digunakan dalam pengobatan kanker. Penggunaan ekstrak etanol herba kemangi dalam penelitian ini digunakan untuk membandingkan antara ekstrak

yang mengandung banyak senyawa kompleks dengan fraksi etil asetat yang hanya mengandung senyawa-senyawa yang bersifat semi polar.

Cisplatin sendiri mempunyai aktivitas antitumor untuk kanker genitourinaria, khususnya kanker testis, ovarium, dan kandung kemih (Katzung 2004). Penggunaan cisplatin dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, beberapa diantaranya ialah ototoksisitas, nefrotoksisitas, neurotoksisitas serta depresi sumsum tulang belakang (myelosupresi). Berdasarkan efek samping tersebut diperlukan adanya agen antikanker yang selektif. Selektif disini artinya hanya sel yang diidentifikasi sebagai sel kanker saja yang diserang sementara sel normal (Vero) tidak diserang.

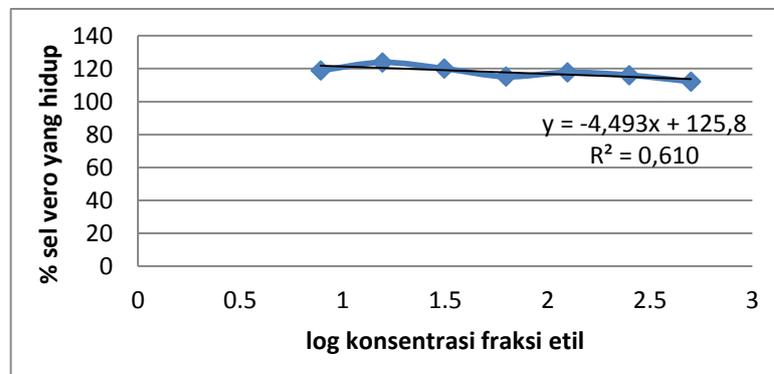
Fraksi etil asetat herba kemangi juga diuji aktivitas sitotoksiknya pada sel Vero yang merupakan sel epitel non kanker yang berasal dari organ ginjal monyet hijau Afrika. Penggunaan sel vero dalam penelitian ini adalah untuk mencari senyawa antikanker baru dengan sifat yang lebih baik. Sifat yang baik disini dimaksudkan hanya membunuh sel kanker sedangkan sel normal tidak (selektif). Selektivitas suatu obat dapat digunakan sebagai tolak ukur baik atau tidaknya suatu obat serta keamanannya. Oleh karena itu, maka perlu dilakukan penentuan nilai indeks selektivitas (IS). Indeks selektivitas dihitung dengan membandingkan  $IC_{50}$  fraksi etil asetat terhadap sel normal dan  $IC_{50}$  fraksi etil asetat terhadap sel HeLa.

**Tabel 22. Hasil perhitungan % sel hidup oleh fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel Vero**

Kadar $\mu\text{g/mL}$	log kadar $\mu\text{g/mL}$	Rata-rata Absorbansi	Rata-rata % sel hidup
500	2,699	0,679	112,200
250	2,398	0,699	116,080
125	2,097	0,707	117,790
62,5	1,796	0,694	115,159
31,25	1,495	0,719	120,092
15,625	1,194	0,738	123,841
7,81	0,893	0,713	118,908

Hasil yang diperoleh dari perhitungan % sel hidup oleh fraksi etil asetat herba kemangi terhadap sel Vero menunjukkan bahwa baik pada konsentrasi tinggi yaitu 500  $\mu\text{g/mL}$  sampai konsentrasi terendah 7,81  $\mu\text{g/mL}$  persentase sel

Vero tidak menyebabkan penurunan jumlah sel Vero (normal). Penambahan fraksi etil asetat terhadap sel vero akan menambah jumlah sel vero yang hidup.



**Gambar 18. Grafik persentase sel Vero yang hidup**

Kurva konsentrasi fraksi etil asetat terhadap viabilitas sel Vero seperti dalam Gambar 18 menunjukkan bahwa konsentrasi sel Vero meningkat dengan penambahan sampel uji, sehingga pada uji sitotoksisitas ini nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan juga semakin besar. Berdasarkan hasil regresi linier menunjukkan  $Y = -4,493x + 125,8$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) 0,781. Nilai korelasi ( $r$ ) oleh fraksi etil asetat terhadap sel vero memiliki nilai korelasi yang cukup dan diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar  $7,424 \times 10^{16} \mu\text{g/ml}$ .

Perhitungan indeks selektivitas fraksi etil asetat herba kemangi membandingkan nilai  $IC_{50}$  fraksi etil asetat sel vero dengan nilai  $IC_{50}$  fraksi etil asetat sel HeLa. Hasil perhitungan pada lampiran 20 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki nilai selektivitas yang sangat tinggi yakni  $4.363^{14} > 10$ . Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat herba kemangi tidak memiliki efek sitotoksik atau aman terhadap sel Vero. Hasil ini sesuai dengan yang diharapkan, karena salah satu kriteria senyawa anti kanker yang dapat dikembangkan sebagai obat kanker adalah yang tidak toksik terhadap sel normal.

Nilai  $IC_{50}$  yang  $> 100 \mu\text{g/ml}$  dari fraksi etil asetat disebabkan karena fraksi etil asetat mengandung banyak senyawa golongan yang bersifat semi polar, sehingga kemungkinan apabila dilakukan isolasi dari fraksi etil asetat akan didapatkan senyawa yang memiliki kemampuan menghambat sel kanker lebih besar. Tidak potennya fraksi etil asetat herba kemangi sebagai agen sitotoksik tidak menutup kemungkinan untuk mengarahkannya sebagai agen kemopreventif.

Agen kemopreventif sendiri dapat didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menghambat dan menekan proses karsinogenesis pada manusia sehingga pertumbuhan kanker dapat dicegah (Kakizoe 2003).

Efek sitotoksik suatu bahan sangat erat kaitannya dengan senyawa kimia yang terkandung dalam bahan tersebut. Depkes RI (1989) menyatakan bahwa di dalam herba kemangi terkandung tanin 4,6%, flavonoid, steroid/triterpenoid, minyak atsiri 2%. Sesuai dengan hasil identifikasi senyawa secara tabung (reaksi warna) dan KLT dari fraksi etil asetat herba kemangi, senyawa yang diduga berperan sebagai agen antikanker sel HeLa adalah flavonoid, fenolik dan steroid/triterpenoid.

Salah satu senyawa golongan flavonoid yang banyak terdapat di alam adalah kuersetin. Penelitian dari Eun *et al.* (2008) menyebutkan bahwa kuersetin secara signifikan mampu menghambat proliferasi sel dan menginduksi *cell cycle arrest* serta apoptosis pada sel kanker payudara MDA-MB-453. Contoh senyawa fenolik yang terkandung di dalam herba kemangi adalah asam kafeat. Asam kafeat sendiri memiliki kemampuan untuk menurunkan ekspresi protein antiapoptosis yaitu Bcl-2 sehingga terjadi induksi apoptosis (Kampa *et al.* 2003).

Senyawa steroid/triterpenoid yang terkandung dalam kemangi adalah asam ursolat. Asam ursolat diketahui memiliki aktivitas antikanker dengan menghambat peristiwa karsinogenesis, promosi kanker, induksi differensiasi sel kanker, dan angiogenesis. Aktivitas tersebut di antaranya diperantarai oleh kemampuan asam ursolat menghambat aktivasi salah satu faktor transkripsi, *nuclear factor-kappaB* (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B adalah salah satu protein yang meregulasi ekspresi sejumlah gen yang berperan dalam proses pembentukan kanker; termasuk gen antiapoptosis, gen yang mengatur adhesi molekul, dan gen yang mengatur siklus sel. Senyawa yang dapat menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B memiliki potensi terapeutik sebagai senyawa antikanker (Shishodia *et al.* 2003).

Senyawa-senyawa yang terkandung di dalam fraksi etil asetat herba kemangi tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat proses karsinogenesis dengan target yang spesifik. Senyawa-senyawa tersebut bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa tetapi tidak berbahaya bagi sel normal.

## **BAB V**

### **HASIL KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut

Pertama, fraksi etil asetat herba kemangi tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $170,174\mu\text{g/ml}$ .

Kedua, fraksi etil asetat herba kemangi memiliki nilai indeks selektivitas yang sangat tinggi terhadap sel Vero sebesar  $4,363 \times 10^{14}$ .

Ketiga, golongan senyawa yang diduga memiliki aktivitas sitotoksik pada fraksi etil asetat herba kemangi adalah flavonoid, fenolik, dan steroid/triterpenoid.

#### **B. Saran**

Pertama, senyawa aktif dari fraksi etil asetat herba kemangi perlu dipurifikasi lebih lanjut untuk mendapatkan informasi mengenai isolat aktifnya yang berperan dalam sitotoksik.

Kedua, perlu dilakukan penelitian dalam tahap yang lebih tinggi seperti subfraksi dan isolasi untuk mengetahui senyawa spesifik apa yang terkandung dalam herba kemangi yang berkhasiat sebagai anti-kanker.

Ketiga, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas sitotoksik herba kemangi dengan menggunakan sel kanker lainnya.

Keempat, perlu dipelajari mekanisme aksi secara molekuler dari senyawa bioaktif herba kemangi sebagai antitumor.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amalia PK. 2016. Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typonium flagelliforme* L.), Kemangi (*Ocimum sanctum* L.), dan Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Sel MCF-7 [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Ansel HC. 1989. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi Edisi IV. Penerjemah : Ibrahim F. Jakarta : Universitas Indonesia Press. Terjemahan dari : *Introduction to Pharmaceutical Dosage Form.*
- Baliga MS. 2013, *Ocimum sanctum* L (Holy Basil or Tulsi) and its phytochemicals in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition and cancer*, 65 Suppl 1, 26–35.
- Bilal A *et al.*. 2012. Phytochemical and Pharmacological Studies on *Ocimum basilicum* Linn-A Review. *IJCRR*. 4 (23) : 73-83.
- CCRC. Farmasi. 2009. Sel HeLa. UGM yoga ([http ://www.CCRC.Farmasi>UGM.ac.id](http://www.CCRC.Farmasi>UGM.ac.id)) diakses pada tanggal 14 Februari 2017.
- Da'i M. 2003. Aktivitas antiproliferatif Pentagamavunon terhadap sel Raji, Sel HeLa dan sel Myeloma [Thesis] Program Pascasarjana UGM. Yogyakarta
- Dalimartha S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Jilid 1*. Jakarta: TrubusAgriwidya.
- [Depkes RI]. 1980. *Materia Medika Indonesia Jilid IV*. Cetakan Pertama. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- [Depkes RI]. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI]. 1989. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Cetakan Pertama. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- [Depkes RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan : Jakarta.
- [Ditjen POM]. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Djajanegara I.R.A. and Wahyudi P., 2009, Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstrak Daun *Annona squamosa*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7 (1), 7–11.
- Doyle A, Griffiths JB. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York : John Wiley & Sons, Ltd.
- Emilia O. 2010. *Bebas Ancaman Kanker Serviks*. Yogyakarta : Media Pressindo.
- Evans WC. 2002. *Trease and Evans Pharmacology. fifteenth edition*. London : WB Saunders.
- Farnsworth NR. 1969. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal Pharmaceutical Science*. 55 (3) : 255-276
- Fessenden, J., & Fessenden, R., 1994, *Kimia Organik Jilid 2 Edisi Ketiga*, diterjemahkan oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka Ph.D., Erlangga, Surabaya.
- Franks LM, Teich NM. 1998. *Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Third edition. New York : Oxford University Press Inc. Hal. 4-19.
- Freshney RI. 1986. *Animal Cell culture a Practical Approach. I ed*. Washington DC : IRL Press.
- Freshney RI. 2010. *Culture of Animal Cell : A Mannual of Basic Technique*. New York : John Willey & sonc. Inc Publication
- Furtado R A, Felipe Rodrigues Rezende de Araújo, Flávia Aparecida Resende, Wilson Roberto Cunha and Denise Crispim Tavares. 2009. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *J. Appl. Toxicol* 30: 254–259.
- Goncalves EM, Ventura CA, Yano T, Macedo MLD, Ganeri SC. 2006. Morphological and growth alterations in Vero Cells Transformed by Cysplatin. *Cell Biol*. 30(6): 485-494.
- Gritter RJ, Bobbit JM, Syhwarting AE. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung : Penerbit ITB.
- Hadipoentyanti E, Wahyuni S. 2008. Keragaman selasih (*Ocimum Spp.*) berdasarkan karakter morfologi, produksi, dan mutu herba. *J Littri*. 14:141–149.

- Handayani D, Sayuti, Dachriyanus, 2008, Isolasi dan Kontrol Kualitas Senyawa Antibakteri Epidioksi Sterol dari Spon Laut *Petrosia nigrans*, Asal Sumatera Barat, *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II*.
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan Edisi Kedua*, Alih Bahasa: Padmawinata K.,ITB, Bandung
- Hariana, A. H. 2007. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Haryanti, Katno. 2011. Aktivitas Sitotoksik Kemangi (*Ocimum sanctum* L) Pada Sel Kanker Kolon WiDr, *Simposium Nasional V PERHIPA*, 1–7.
- Hutapea J R. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia Jilid 2*. Jakarta : Bakti Husada.
- Ikhlas Nur. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba Kemangi (*Ocimum americanum* Linn) dengan Metode DPPH [Skripsi]. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Ismiyati N, Nurhaeni F. 2016. Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) Sebagai Agen Kemopreventif Pada Sel Kanker Leher Rahim Hela Melalui Aktivitas Sitotoksik Dan Induksi Apoptosis. *Media Farmasi* Vol. 13 : 35-48.
- Isnindar WS, Setyowati EP. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Daun Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb) dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2 pikrilhidrazil). *Majalah Obat Tradisional*. 16 (3) : 157-164.
- Kalyan P, Kumar MR, Kavitha K, Singh J, Khan R. 2012. Pharmacological Actions of *Ocimum sacntum*–Review Article, *International Journal of Advances In Pharmacy, Biology And Chemistry* 1 (3) : 406–14.
- [Kemenkes RI]. 2015. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Kresno SB. 2013. Ilmu Dasar Onkologi Diacu Dalam Gangguan Siklus Sel dan Mutasi Gen pada Kanker Payudara Oleh Romadhon Y.A. *CDK-209/ vol. 40 no. 10*.
- Kumar V,Cotran RS, Collins T, 2005. *Neoplasia In Robins Pathologic Basis of Disease*, 7th ed. Philadelphia : W.B. Saunders, p.269-342.
- Kupcsik L, Stoddart MJ. 2011. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. New York : Humana Press.

- Kurnijasanti R, Hamid SI, Rahmawati K. 2008. Efek Sitotoksik In Vitro dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma. *J. Penelit Media Eksakta* 7:48-54
- Labwork Study Guide and Lecture Notes. 2000. Henrietta Lacks. [www.micro.msb.le.ac.uk/Labwork/Lack\\_1.html](http://www.micro.msb.le.ac.uk/Labwork/Lack_1.html)
- List PH, Schamidt PC. 2000. *Phytopharmaceuticals Technology*. Florida : CRC Press.
- Magesh V *et al.*. 2009. *Ocimum sanctum* Induces Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells and Suppresses the In Vivo Growth of Lewis Lung Carcinoma Cells. *Phytother Res* 23(10): 1385-1391.
- Marwat SK *et al.*. 2011. Interpretation and medicinal potential of Ar-Rehan (*Ocimum basilicum* L) : A-review. *Am.-Eurasian J. Agric Environ. Sci.* 10 : 478-484.
- Meyer BN *et al.*. 1982. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Drug Information Journal* 32 : 513-524.
- Meiyanto E. 2002. *Biologi Molekuler*. Yogyakarta : Fakultas Farmasi UGM.
- Mosmann T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth & Survival : Application to Proliferation & Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Method* 65:65-59.
- Mustarichie E, Udin Z, Levita J, Musfiroh I, dan Zulfricar I. 2011. Activity of leaf extracts of *Coix lachryma* Linn. and *Asparagus cochinchinensis* Linn. As breast anticancer drugs. *MHSJ* 9: 47-57
- Mutschler E. 1999. *Dinamika Obat : Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi*, diterjemahkan oleh Widiyanto MB, dan Ranti AS. Edisi Kelima. Bandung : Penerbit ITB.
- Nafrialdi, dan Gan S. 1995. *Antikanker. Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke IV. Jakarta: Farmakologi Fakultas Kedokteran Indonesia.
- Niture SK, Rao US, Srivenugopal KS. 2006. Chemopreventative strategies targeting the MGMT repair protein: Augmented expression in human lymphocytes and tumor cells by ethanolic and aqueous extracts of several Indian medicinal plants. *International Journal of Oncology* 29 (5), 1269–1278.
- Nurrochmad, A., 2001, Sintesis Kurkumin, Bisdemetoksi Kurkumin, Bisdemetoksidehidroksi Kurkumin, dan Pentagamavunon-0 serta Uji

Ketoksikannya terhadap Sel Myeloma, dan Sel Mononuklear Normal secara In Vitro, Tesis, Program Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.

- Padmi A. 2008. Uji Sitotoksik Ekastrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) Terhadap Sel HeLa [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Pandey, Madhuri. 2010. Significance of fruits and vegetables in malnutrition cancer. *Plant Arch* 10 (2) 517–522.
- Pasto DC, Johnson, Miller M. 1992. *Experients and Technique in Organic Chemistry*. New Jersey : Prentice Hall, Inc.
- Pebriana RB *et al.* 2008. Pengaruh ekstrak metanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) terhadap pemacuan apoptosis sel kanker payudara. *Pharmacon* 9:21-26.
- Peter AGM. 2002. Herbal remedies. *N Engl J Med*. 347(25): 2046-2056. <http://content.nejm.org/cgi/reprint/347/25/2046.pdf>. [2017 January 16]
- Prakash P and Gupta N.2005. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. *Indian J Physiol Pharmacol* 49: 125-131.
- Prayitno A, Darmawan R, Yuliadi I, Mudigo A. 2005. Ekspresi Protein p53, Rb, dan C-myc pada Kanker Serviks Uteri dengan Pengecatan Histokimia. *Biodiversitas*. Volume 6 nomer 3.
- Rasjidi I. 2009. Epidemiologi Kanker Serviks. *Indonesian Journal of Cancer*. Volume 3.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids : Promising Anticancer Agents. *Medicinal research Reviews* 23(4) : 519- 534.
- Rijke E. 2005. Trace-level Determination of Flavonoids and Their Conjugates Application to Plants of The Leguminosae Family[disetasi]. Amsterdam: Universitas Amsterdam.
- Riyanto S. 2011. Peran Spektroskopi Pada Identifikasi Kandungan Tanaman Obat. Di dalam : Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, 14 Desember 2011. Yogyakarta : UGM.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi (Terjemahan)*. Bandung: penerbit ITB.

- Sarwono Prawirohardjo. 2006. Kanker Serviks. In : M. Farid Azis, Andri Jono, Abdul Bari Saifuddin, editors. Buku Acuan Nasional Onkologi Ginekologi. Edisi Pertama. Jakarta : Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo ; 2006.p. 442-54
- Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB. 2003. Ursolic acid Inhibits Nuclear Factor- $\kappa$ B Kinase and p65 Phosphorylation : Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D1. *Cancer Research*.
- Siemonsma J S, Pileuk K. 1994. *Plant Resources of South-East Asia*. Bogor : Porsea
- Singh V. 2010. Ocimum Sanctum (tulsi): Bio-pharmacological Activities Ocimum Sanctum (tulsi): Bio-pharmacological Activities. *Webmed Central*. 1–7.
- Siswandono, Soekarjo B. 2000. *Kimia Medisinal Edisi II*. Surabaya: Universitas Airlangga press
- Stahl E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penerjemah : Kosasih Padmawinata. Bandung : Penerbit ITB.
- Stricker TP, Kumar V. 2008. Neoplasia. In: Kumar F., Abbas A.K., Fausto N., Aster J.C., editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease Eighth Edition. Philadelphia: *Saunders Elsevier*. p. 284292.
- Sudarmadji S, B Haryono, Suhardi. 1989. *Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta : Liberty.
- Sundaram S, Verma SK, Dwivedi P. 2011. In Vitro Cytotoxic Activity of Indian Medicinal Plants Used Traditionally To Treat Cancer. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 4 : 27–29.
- Sunarni T. 2005. Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae, *Jurnal Farmasi Indonesia* 2 : 53-61.
- Tiwari P, Bimleshk, Mandeep K, GurpreetK, Harleen K. 2011. Skrinning Fitokimia dan Ekstraksi. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1: 113-116.
- Tjay TH dan Rahardja K. 2002. *Obat obat Penting*. Edisi kelima. Jakarta : Elex Media Komputindo.
- Voigt R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi. V. Yogyakarta : Gajah Mada University Press.

- Wahyuningsih, Mae Sri et al.. 2013. Electivity of Purified Extract from the Leaves of *Tithonia diversifolia* ((HEMSLEY) A.GRAY) Against HeLa Cells. *Trad.Med.J* vol 18:22-28
- Zarlaha A, Kourkouvelis N, Stanojkovic TP, Kovala-demertzi D. 2014. Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *ocimum Basilicum* against human carcinoma cells. Molecular Docking study of isoeugenolas a potent cox and lox Inhibitor. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* Vol. 9 : 907-917

# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Surat Hasil Determinasi Tanaman



No : 167/DET/UPT-LAB/29/IV/2017  
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Desi Ratna Permatasari  
NIM : 20144258 A  
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Kemangi (*Ocimum basilicum* L.)**

Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA

1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14b – 16a. golongan 10. 239b – 243b – 244b – 248b – 249b – 250b – 266b – 267a – 268b – 271b. familia 110. Labiatae. 1a – 2b – 4b – 6b – 7b. 8. Ocimum. *Ocimum basilicum* L.

Deskripsi :

Habitus : Herba, tegak, tinggi 0,3 – 0,6 m.

Akar : Tunggang.

Batang : Percabangan monopodial, keunguan, berambut.

**Daun : Tunggal, bulat telur elips, elips, atau memanjang, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi bergerigi, bertulang menyirip, pada sebelah menyebelah ibu tulang 3 – 6 tulang cabang, panjang 3,5 – 6,5 cm, lebar 1,5 – 2 cm. Bila diremas berbau harum spesifik. Tangkai daun 0,5 – 1,9 cm.**

Bunga : Karangan semu berbunga 6, berkumpul menjadi tandan ujung. Daun pelindung elip atau bulat telur, panjang 0,5 – 1 cm. Kelopak sisi luar berambut, sisi dalam bagian bawah dalam tabung berambut rapat, panjang lk 0,5 cm; gigi belakang jorong sampai bulat telur terbalik, dengan tepi mengecil sepanjang tabung, gigi samping kecil dan runcing, kedua gigi bawah berlekatan menjadi bibir bawah yang bercelah dua. Mahkota putih, berbibir 2, panjang 8 – 9 mm, dari luar berambut; bibir atas bertaju 4; bibir bawah rata. Tangkai daun kelopak tegak dan tertekan pada sumbu dari karangan bunga, dengan ujung berbentuk kait melingkar.

Buah : Keras coklat tua, gundul. Waktu dibasahi membengkak sekali. Tangkai dari kelopak buah tegak dan tertekan pada sumbu dari karangan bunga, dengan ujung bentuk kait melingkar. Kelopak buah panjang 6 – 9 mm.

Pustaka : Steenis C.G.G.J., Bloembergen S. Eyma P.J. (1978): *FLORA*, PT PradnyaParamita. Jl. KebonSirih 46. Jakarta Pusat, 1978.



Surakarta, 29 April 2017

Tim determinasi

Dra. Karimah Wirjosoendjojo, SU.

## Lampiran 2. Surat ijin penelitian



Nomor : 2185/A10 – 4/17.04.17  
Hal : Penelitian Tugas Akhir

Surakarta, 17 April 2017

Kepada Yth. Kepala Laboratorium Parasitologi  
Fakultas Kedokteran UGM  
Jl. Sekip Yogyakarta

Dengan hormat,  
Berkaitan dengan penelitian tugas akhir (skripsi) mahasiswa Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, maka dengan ini kami mengajukan permohonan ijin bagi mahasiswa kami :

NO	NAMA	NIM	HP
1	Desi Ratna Permatasari	20144258A	085790777246
2	Hilda Khairunnisa Sholiqin	20144157A	089661123946

Untuk keperluan / memperoleh :

- **Pemelitian Uji Sitotoksik**

Mengenai prosedur dan biaya kami mengikuti sesuai prosedur dan kebijakan yang ada instansi yang Ibu /Bapak pimpin.

Besar harapan kami atas terkabulnya permohonan ini yang tentunya akan berguna bagi pembangunan nusa dan bangsa khususnya kemajuan dibidang pendidikan.

Demikian atas kerja samanya disampaikan banyak terima kasih.

Dekan,



Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt.



Jl. Let. Jend. Sutoyo – Solo 57127 Telp. 0271-852518, Fax. 0271-853275  
Homepage : [www.setiabudi.ac.id](http://www.setiabudi.ac.id), e-mail : [usbsolo@yahoo.com](mailto:usbsolo@yahoo.com)

### Lampiran 3. Surat keterangan selesai penelitian



**DEPARTEMEN PARASITOLOGI**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA**  
 Gedung Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.  
 Telp. (0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitfkugm@yahoo.com

#### SURAT KETERANGAN

No. UGM/KU/Prst423/TL/04/03/08.17

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Kepala Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

Nama : DESI RATNA PERMATASARI  
 Instansi : Fakultas Farmasi  
 Universitas Setia Budi  
 Surakarta  
 NIM. : 20144258A

Telah melakukan penelitian di Departemen Parasitologi FK. UGM dengan judul :

“UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI ETIL ASETAT HERBA KEMANGI (*Ocimum bacillicum* L) TERHADAP KULTUR SEL HELA”

Dibawah supervisi laboratorium: Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK.  
 Waktu Penelitian: 2 Agustus 2017 sampai dengan 5 Agustus 2017

Urusan administrasi telah diselesaikan oleh yang bersangkutan dan fasilitas laboratorium yang dipakai telah dikembalikan, dengan demikian dinyatakan **bebas laboratorium**.

Surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 21 Agustus 2017

Kepala,

  
 dr. Tri Baskoro T. Satoto, MSc, PhD.  
 NIP. 19580412 198601 1 001.

#### Lampiran 4. Foto jalannya penelitian



Kemangi segar



proses pengayakan



Serbuk kemangi



Botol maserasi



etanol 96%



proses penyaringan



*Rotary evaporatio*



neraca analitik



ekstrak kental



Ekstraksi cair-cair  
n-heksanaa dan  
air (replikasi 1)



Ekstraksi cair-cair  
n-heksanaa dan  
air (replikasi 2)



Ekstraksi cair-cair  
n-heksanaa dan  
air (replikasi 3)



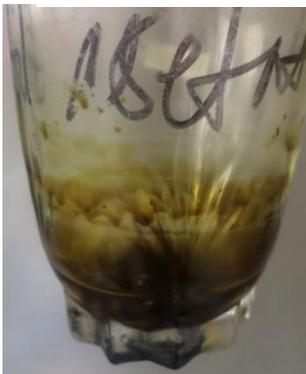
Ekstraksi cair-cair etil asetat dan air (replikasi 1)



Ekstraksi cair-cair etil asetat dan air (replikasi 2)



Ekstraksi cair-cair etil asetat dan air (replikasi 3)



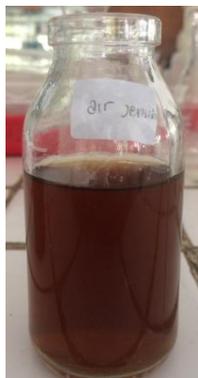
Fraksi etil asetat



Uji kadar air sterling bidwell



moisture balance



Kadar sari larut air



kadar sari larut etanol



botol timbang+sari air



Botol timbang+sari etanol



Tabung endprof



DMSO



Fraksi etil + DMSO



Vortex



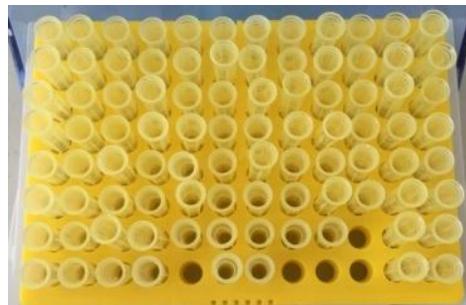
media DMEM



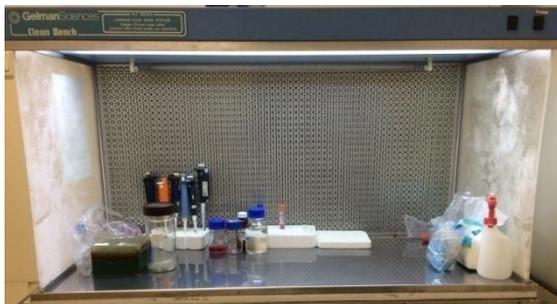
Mikropipet



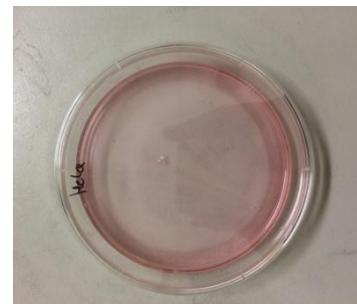
Blue tip



yellow tip



Laminar air flow



kultur sel HeLa



Kultur sel Vero



sentrifuse



mikroskop converted



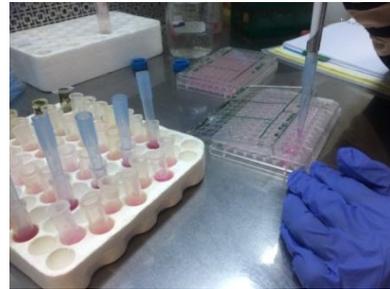
Haemocytometer



alat hitung

inkubator CO<sub>2</sub>Tabung CO<sub>2</sub>

larutan tripsin 0,25%



proses kultur sel



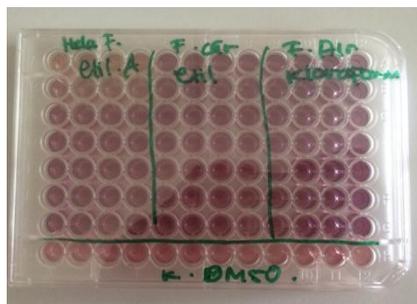
Larutan MTT



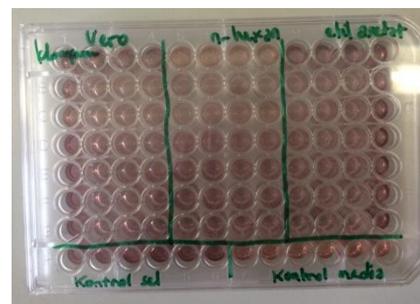
Pemberian SDS sebagai stoper



Elisa reader



Pola mikroplate di sel HeLa



Pola mikroplate di sel Vero

### Lampiran 5. Perhitungan rendemen

#### A. Rendemen berat herba basah terhadap herba kering

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\% b/b)} &= \frac{\text{berat kering}}{\text{berat basah}} \times 100\% \\ &= \frac{1681}{20000} \times 100\% \\ &= 8,405 \% \end{aligned}$$

#### B. Rendemen ekstrak herba kemangi

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\% b/b)} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{63,553}{1000} \times 100\% \\ &= 6,355 \% \end{aligned}$$

#### C. Rendemen fraksi *n*-heksana herba kemangi

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\% b/b)} &= \frac{\text{berat fraksi n-heksan}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{11,134}{15} \times 100\% \\ &= 74,227 \% \end{aligned}$$

#### D. Rendemen fraksi etil asetat herba kemangi

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\% b/b)} &= \frac{\text{berat fraksi etil asetat}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{1,7}{15} \times 100\% \\ &= 11,333 \% \end{aligned}$$

#### E. Rendemen fraksi air herba kemangi

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\% b/b)} &= \frac{\text{berat fraksi air}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{1,962}{15} \times 100\% \\ &= 13,080 \% \end{aligned}$$

## Lampiran 6. Perhitungan kadar air serbuk

### Cara sterling bidwell

#### Replikasi 1

$$\text{Berat serbuk} = 20$$

$$\text{Volume air} = 1,4$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume air}}{\text{berat serbuk}} \times 100\% \\ &= \frac{1,4}{20} \times 100\% \\ &= 7 \% \text{ v/b} \end{aligned}$$

#### Replikasi 2

$$\text{Berat serbuk} = 20$$

$$\text{Volume air} = 1,5$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume air}}{\text{berat serbuk}} \times 100\% \\ &= \frac{1,5}{20} \times 100\% \\ &= 7,5 \% \text{ v/b} \end{aligned}$$

#### Replikasi 3

$$\text{Berat serbuk} = 20$$

$$\text{Volume air} = 1,4$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume air}}{\text{berat serbuk}} \times 100\% \\ &= \frac{1,4}{20} \times 100\% \\ &= 7 \% \text{ v/b} \end{aligned}$$

No	Penimbangan (g)	Volume pada skala (ml)	Kadar air %
1	20	1,4	7
2	20	1,5	7,5
3	20	1,4	7
Rata-rata			7,1667

Perhitungan rata-rata kadar air serbuk

$$\text{Rata-rata \% kadar air} = \frac{\text{total \% kadar air}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% kadar air} = \frac{7+7,5+7}{3} = 7,1667\%$$

**Lampiran 7. Perhitungan susut pengeringan serbuk herba kemangi dengan  
*moisture balance***

No	Berat serbuk (gram)	Susut Pengeringan (%)
1	2	8,3
2	2	10,5
3	2	8,5
Rata-rata		9,1

Rata rata susut pengeringan serbuk

$$\text{Rata-rata \% susut pengeringan} = \frac{\text{total \% susut pengeringan}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% susut pengeringan} = \frac{8,3 + 10,5 + 8,5}{3} = 9,1\%$$

**Lampiran 8. Perhitungan kadar sari larut air**

Berat botol kosong + label (g)	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
	12,2909	12,5691	14.9838

Penimbangan Ke-	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1	25,0750	20,6154	23,3544
2	20,0784	15,3570	20,1361
3	12,3614	15,3596	15,5301
4	12,3562	14,3509	15,3916
5	12,3570	13,9726	15,2351
6	12,3596	13,7415	15,1461
7	12,3509	12,8278	15,1204
8		12,6631	15,0433
9		12,6629	15,0429

Perhitungan kadar sari larut air replikasi 1

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut air} &= \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot awal bahan yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= \frac{0,0661}{5} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= 6,61 \% \end{aligned}$$

Perhitungan kadar sari larut air replikasi 2

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut air} &= \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot awal bahan yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= \frac{0,0938}{5} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= 9,38 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut air} &= \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot awal bahan yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= \frac{0,0591}{5} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= 5,91 \% \end{aligned}$$

$$\text{Rata-rata \% kadar sari larut air} = \frac{\text{total \% kadar sari larut air}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% kadar sari larut air} = \frac{6,61 + 9,38 + 5,91}{3} = 7,3\%$$

**Lampiran 9. Perhitungan kadar sari larut etanol**

Berat botol kosong + label (g)	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
	13,7852	15,9237	18,2956

Penimbangan Ke-	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1	20,5519	22,8601	23,5561
2	17,0987	23,5573	22,1373
3	14,9877	19,0932	20,9532
4	14,6234	18,3325	19,6325
5	14,2333	17,6333	19,3336
6	14,2162	17,2162	18,9654
7	14,0289	16,2217	18,8761
8	14,0213	16,2213	18,7162
9			18,5189
10			18,5185

Perhitungan kadar sari larut air replikasi 1

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut etanol} &= \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot awal bahan yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= \frac{0,2361}{5} \times \frac{100}{20} \times 100\% \\ &= 23,61\% \end{aligned}$$

Perhitungan kadar sari larut air replikasi 2

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut etanol} &= \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot awal bahan yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= \frac{0,2976}{5} \times \frac{100}{20} \times 100\% \\ &= 29,76\% \end{aligned}$$

Perhitungan kadar sari larut air replikasi 3

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut etanol} &= \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot awal bahan yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} \times 100 \\ &= \frac{0,2229}{5} \times \frac{100}{20} \times 100\% \\ &= 22,29\% \end{aligned}$$

$$\text{Rata-rata \% kadar sari larut etanol} = \frac{\text{total \% kadar sari larut air}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% kadar sari larut etanol} = \frac{23,61 + 29,76 + 22,29}{3} = 25,22\%$$

## Lampiran 10. Perhitungan kadar air ekstrak

### Cara Sterling Bidwell

#### Replikasi 1

$$\text{Berat ekstrak} = 10$$

$$\text{Volume air} = 2,4$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume air}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{2,4}{10} \times 100\% \\ &= 24 \% \text{ v/b} \end{aligned}$$

#### Replikasi 2

$$\text{Berat ekstrak} = 10$$

$$\text{Volume air} = 2,0$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume air}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{2,0}{10} \times 100\% \\ &= 20 \% \text{ v/b} \end{aligned}$$

#### Replikasi 3

$$\text{Berat ekstrak} = 10$$

$$\text{Volume air} = 2,6$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{\text{volume air}}{\text{berat ekstrak}} \times 100\% \\ &= \frac{2,6}{10} \times 100\% \\ &= 26 \% \text{ v/b} \end{aligned}$$

No	Penimbangan (g)	Volume pada skala (ml)	Kadar air %
1	10	2,4	24
2	10	2	20
3	10	2,6	26
Rata-rata			23,3333

Perhitungan rata-rata kadar air ekstrak

$$\text{Rata-rata \% kadar air} = \frac{\text{total \% kadar air}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% kadar air} = \frac{24 + 20 + 26}{3} = 23,3333\%$$

**Lampiran 11. Penetapan susut pengeringan ekstrak****Cara moisture balance**

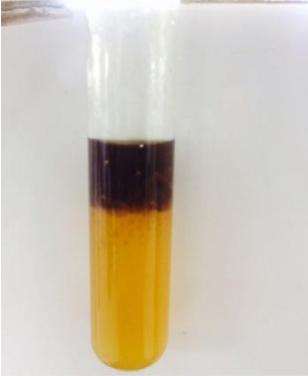
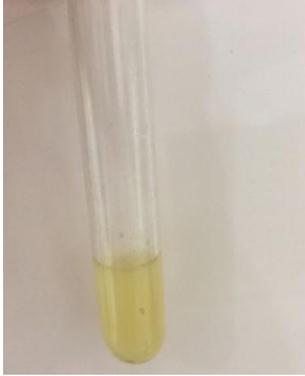
No	Penimbangan (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	26,7
2	2	25,3
3	2	27,1
Rata-rata		26,3667

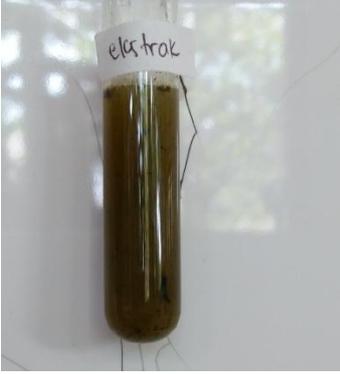
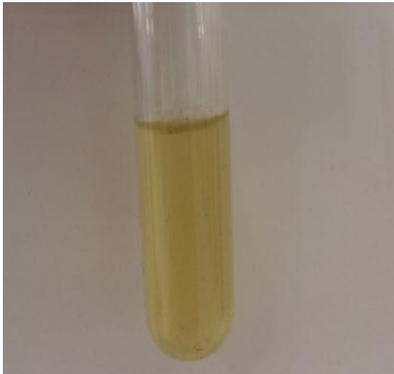
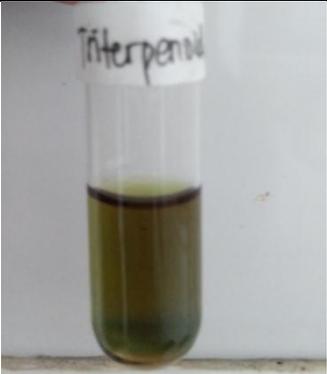
Rata rata susut pengeringan serbuk

$$\text{Rata-rata \% susut pengeringan} = \frac{\text{total \% susut pengeringan}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% susut pengeringan} = \frac{26,7 + 25,3 + 27,1}{3} = 26,3667 \%$$

**Lampiran 12. Skrining fitokimia ekstrak & fraksi dengan metode tabung**

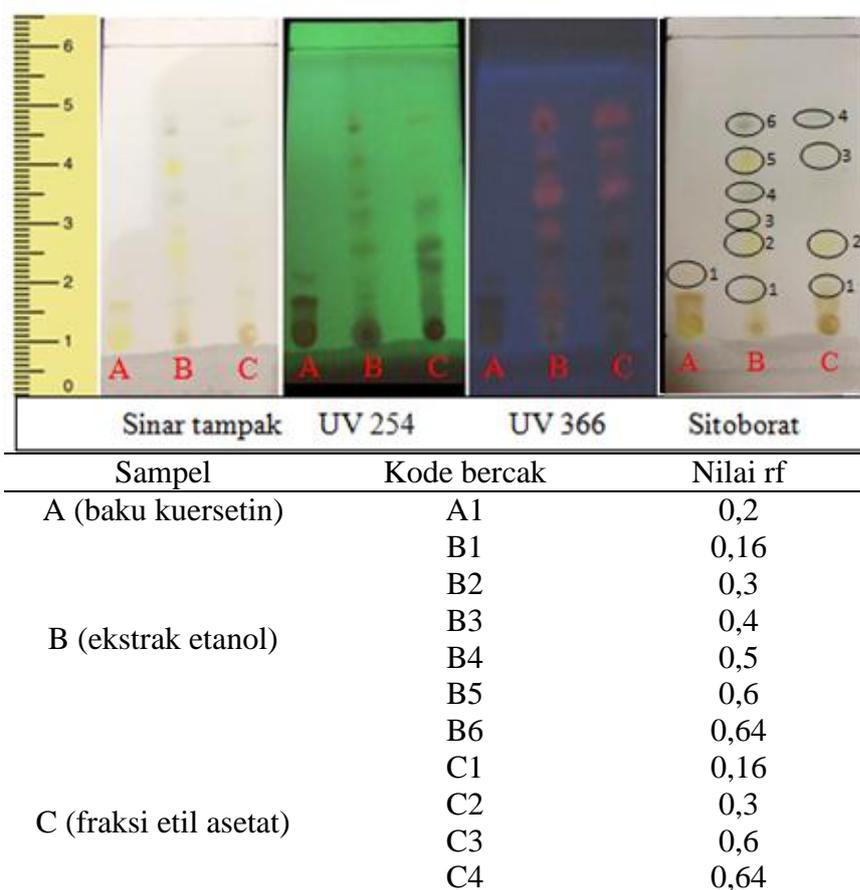
Senyawa golongan	Ekstrak etanol	Fraksi etil asetat
<b>Flavonoid</b>	 (+)	 (+)
<b>Alkaloid</b>	 (-)	 (-)
<b>Fenolik</b>	 (+)	 (+)

<b>Saponin</b>	 <p>(-)</p>	 <p>(-)</p>
<b>Tanin</b>	 <p>(+)</p>	 <p>(+)</p>
<b>Steroid/terpenoid</b>	 <p>(+)</p>	 <p>(-)</p>

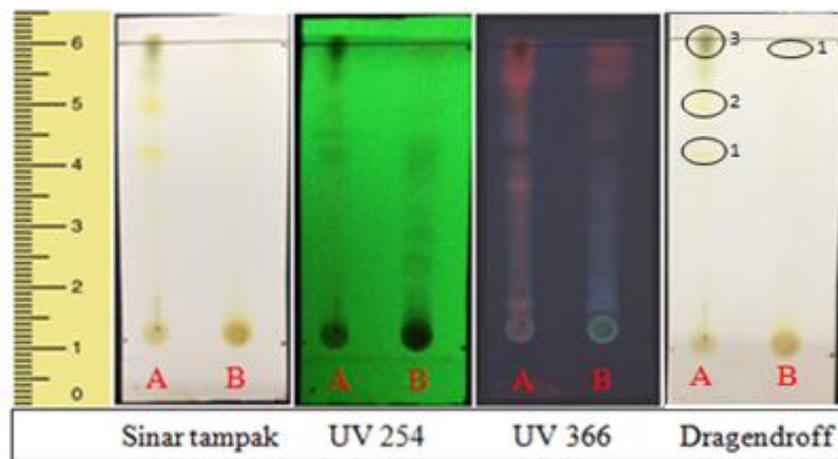
### Lampiran 13. Hasil pengujian menggunakan KLT

Senyawa	Fase Gerak	Pereaksi semprot	Hasil setelah disemprot			Keterangan	
			esktrak	Fraksi EA	pustaka	ekstrak	Fraksi EA
Flavonoid	<i>n</i> -heksana : Etil Asetat : asam formiat (6:4:0,2)	Sitroborat	kuning	kuning	kuning	+	+
Alkaloid	Etil asetat : Metanol : air (90:9:1)	Dragendorff	kuning	kuning	coklat	-	-
Tanin	<i>n</i> -heksana : Etil Asetat : asam formiat (6:4:0,2)	Anisaldehyd	Biru kehitaman	Biru kehitaman	Biru kehitaman	+	+
Steroid/ triterpenoid	<i>n</i> -heksana : Etil Asetat (5:5)	Lieberman-Buchard	Merah	kuning	Merah/ hijau	+	-

#### A. Identifikasi KLT senyawa Flavonoid

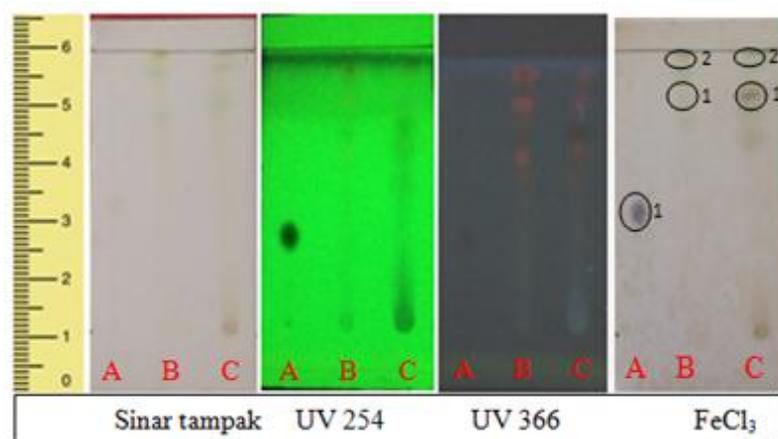


### B. Identifikasi KLT senyawa Alkaloid



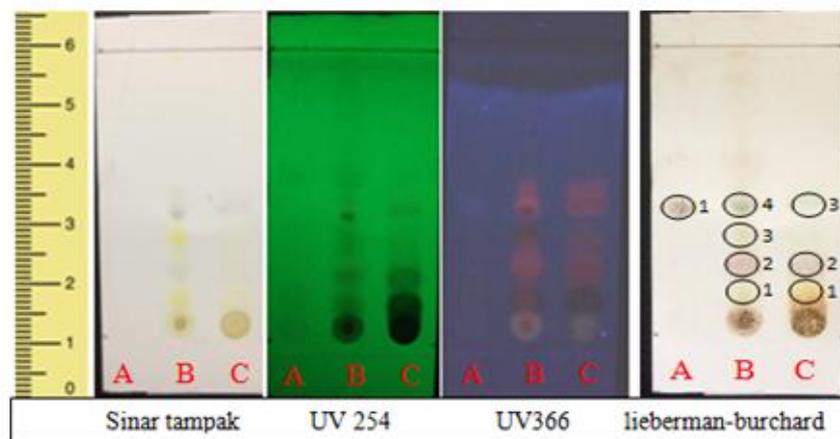
Sampel	Kode bercak	Nilai rf
A (Ekstrak etanol)	A1	0,615
	A2	0,77
	A3	0,96
B (Fraksi etil asetat)	B1	0,94

### C. Identifikasi KLT senyawa Tanin

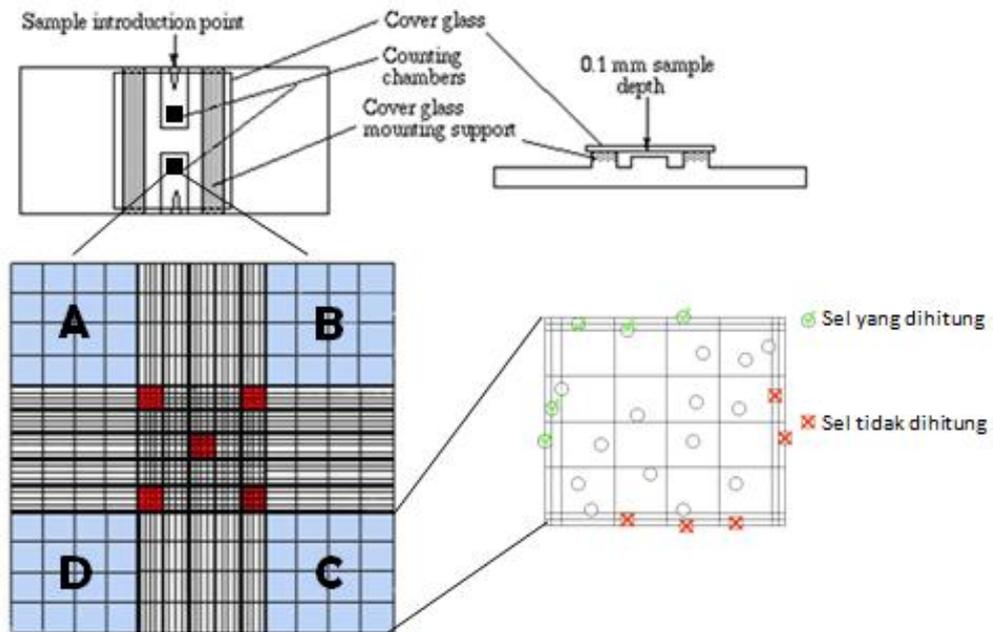


Sampel	Kode bercak	Nilai rf
A (Baku asam galat)	A1	0,46
B (Ekstrak etanol)	B1	0,86
	B2	0,96
C (Fraksi etil asetat)	C1	0,86
	C2	0,96

#### D. Identifikasi KLT senyawa Steroid/triterpenoid



Sampel	Kode bercak	Nilai rf
A (Stigmasterol)	A1	0,46
B (Ekstrak etanol)	B1	0,16
	B2	0,24
	B3	0,36
	B4	0,46
C (Fraksi etil asetat)	C1	0,16
	C2	0,24
	C3	0,46

**Lampiran 14. Perhitungan jumlah sel menggunakan *haemocytometer***

### Lampiran 15. Perhitungan volume panen sel

A. Jumlah sel HeLa terhitung dalam suspensi

$$\Sigma \text{sel} / \text{mL} = \frac{\Sigma \text{sel A} + \Sigma \text{sel B} + \Sigma \text{sel C} + \Sigma \text{sel D}}{4} \times 10^4$$

$$\Sigma \text{sel} / \text{mL} = \frac{108 + 119 + 112 + 99}{4} \times 10^4 = 109,5 \times 10^4$$

Volume jumlah panen yang ditransfer

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel yang } \frac{\text{terhitung}}{\text{mL}}}$$

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{100 \times 10^4}{109,5 \times 10^4} = 0,91 \text{ mL ad } 10 \text{ mL DMEM}$$

Jumlah sel yang ada tiap sumuran :  $1 \times 10^4 \text{ sel} / 100 \mu\text{l}$

B. Jumlah sel Vero terhitung dalam suspensi

$$\Sigma \text{sel} / \text{mL} = \frac{\Sigma \text{sel A} + \Sigma \text{sel B} + \Sigma \text{sel C} + \Sigma \text{sel D}}{4} \times 10^4$$

$$\Sigma \text{sel} / \text{mL} = \frac{76 + 64 + 69 + 81}{4} \times 10^4 = 72,5 \times 10^4$$

Volume jumlah panen yang ditransfer

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel yang } \frac{\text{terhitung}}{\text{mL}}}$$

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{100 \times 10^4}{72,5 \times 10^4} = 1,38 \text{ mL ad } 10 \text{ mL DMEM}$$

Jumlah sel yang ada tiap sumuran :  $1 \times 10^4 \text{ sel} / 100 \mu\text{l}$

### Lampiran 16. Perhitungan pembuatan larutan stok dan larutan seri

#### A. Pembuatan larutan stok

$$\begin{aligned} \text{Dibuat larutan stok dengan konsentrasi} &= 12,2 \text{ mg}/100 \text{ }\mu\text{L} \\ &= 122 \text{ mg}/\text{mL} \\ &= 122.000 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL} \text{ atau } 122.000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

#### B. Pembuatan seri konsentrasi

##### 1. Konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 500 \times 1 \text{ mL} &= V_2 \times 122.000 \\ V_2 &= 4,1 \text{ }\mu\text{L} \end{aligned}$$

Dipipet 4,1  $\mu\text{L}$  dari larutan stok + 995,9  $\mu\text{L}$  media penumbuh

##### 2. Konsentrasi 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1 \text{ mL} \times 250 &= V_2 \times 122.000 \\ V_2 &= 2,05 \text{ }\mu\text{L} \end{aligned}$$

Dipipet 2,05  $\mu\text{L}$  dari larutan stok + 997,95  $\mu\text{L}$  media penumbuh

##### 3. Konsentrasi 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1 \text{ mL} \times 125 &= V_2 \times 250 \\ V_2 &= 500 \text{ }\mu\text{L} \end{aligned}$$

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari larutan konsentrasi 1 + 500  $\mu\text{L}$  media penumbuh

##### 4. Konsentrasi 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1 \text{ mL} \times 62,5 &= V_2 \times 125 \\ V_2 &= 500 \text{ }\mu\text{L} \end{aligned}$$

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari larutan konsentrasi 2 + 500  $\mu\text{L}$  media penumbuh

##### 5. Konsentrasi 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1 \text{ mL} \times 31,25 &= V_2 \times 62,5 \\ V_2 &= 500 \text{ }\mu\text{L} \end{aligned}$$

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari larutan konsentrasi 3 + 500  $\mu\text{L}$  media penumbuh

6. Konsentrasi 15,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$1 \text{ mL} \times 15,625 = V_2 \times 31,25$$

$$V_2 = 500\mu\text{L}$$

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari larutan konsentrasi 4 + 500  $\mu\text{L}$  media penumbuh

7. Konsentrasi 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

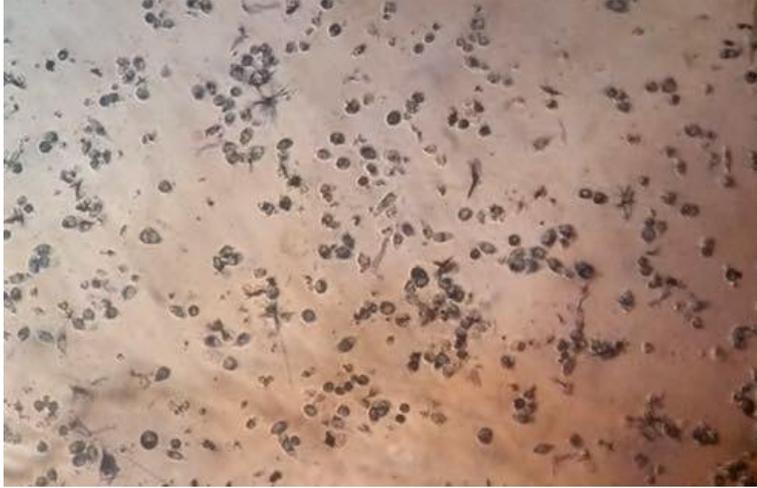
$$1 \text{ mL} \times 7,81 = V_2 \times 15,625$$

$$V_2 = 500\mu\text{L}$$

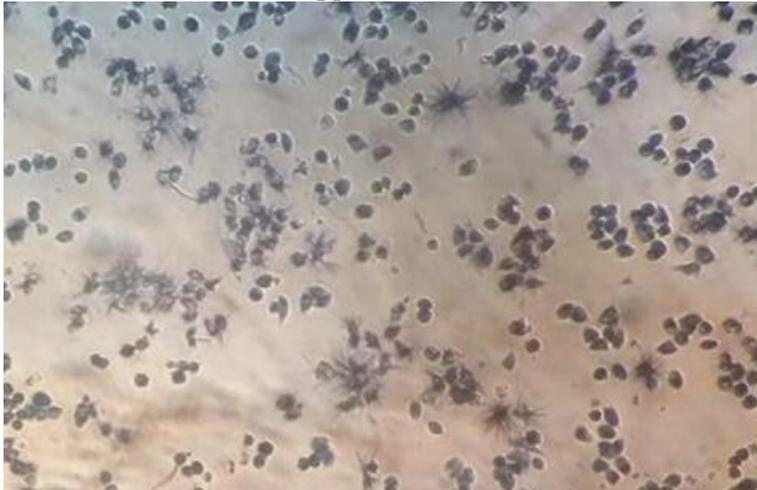
Dipipet 500  $\mu\text{L}$  dari larutan konsentrasi 5 + 500  $\mu\text{L}$  media penumbuh

**Lampiran 17. Morfologi sel hela setelah perlakuan**

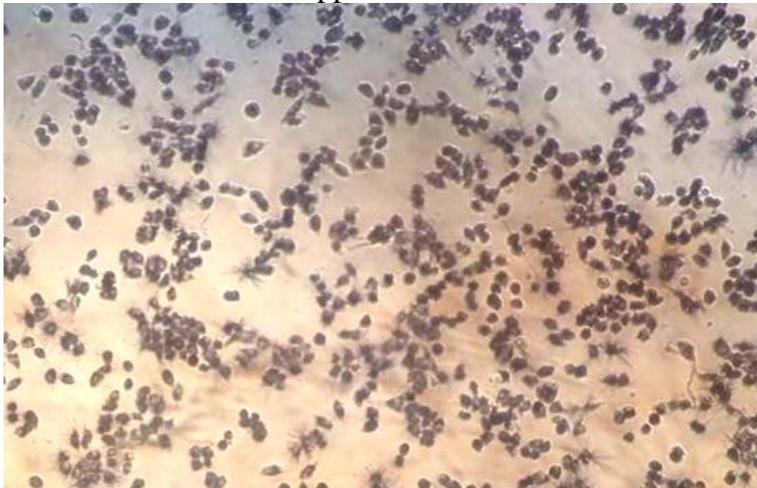
Ekstrak konsentrasi 500 ppm



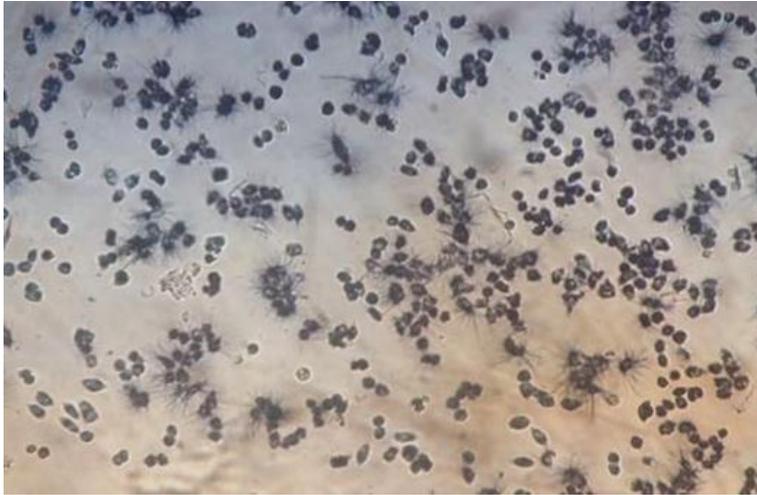
Ekstrak konsentrasi 250 ppm



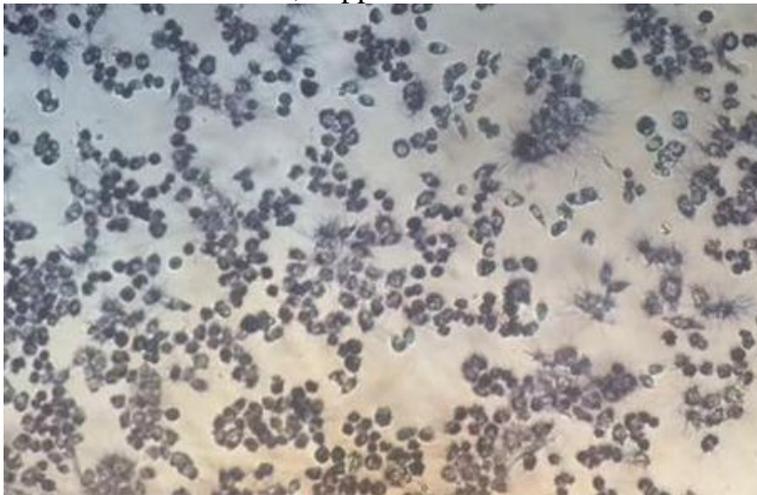
Ekstrak konsentrasi 125 ppm



Ekstrak konsentrasi 62,5 ppm



Ekstrak konsentrasi 31,25 ppm



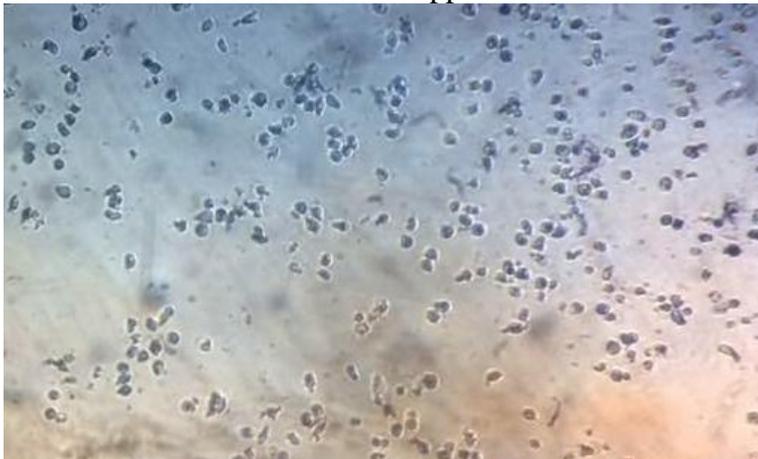
Ekstrak konsentrasi 15,625 ppm



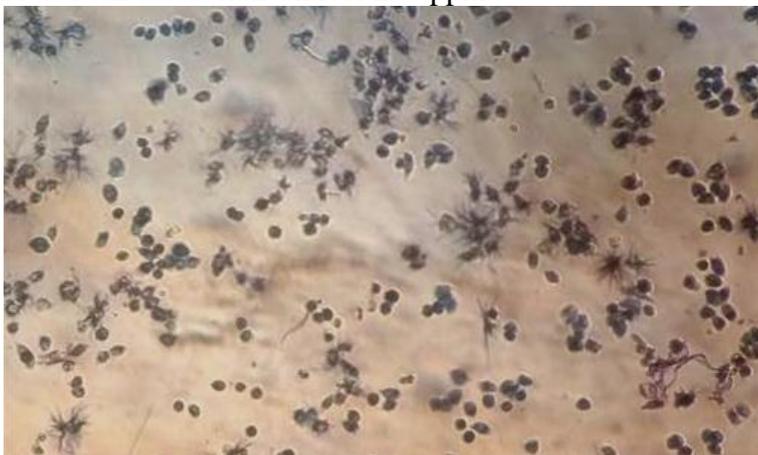
Ekstrak konsentrasi 7,25 ppm



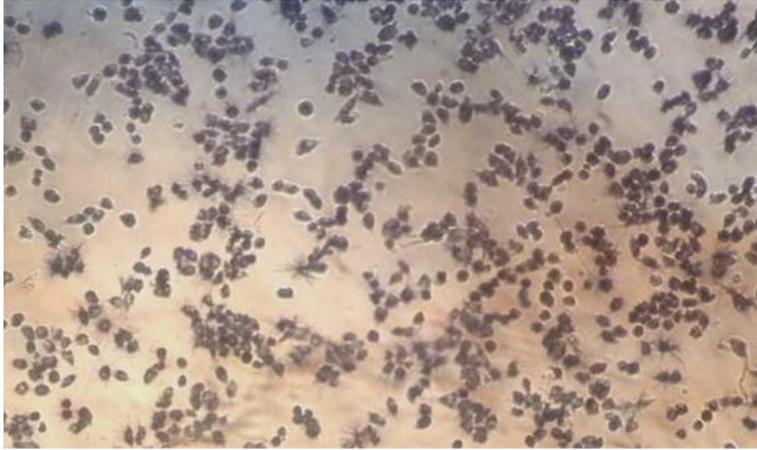
Fraksi etil asetat konsentrasi 500 ppm



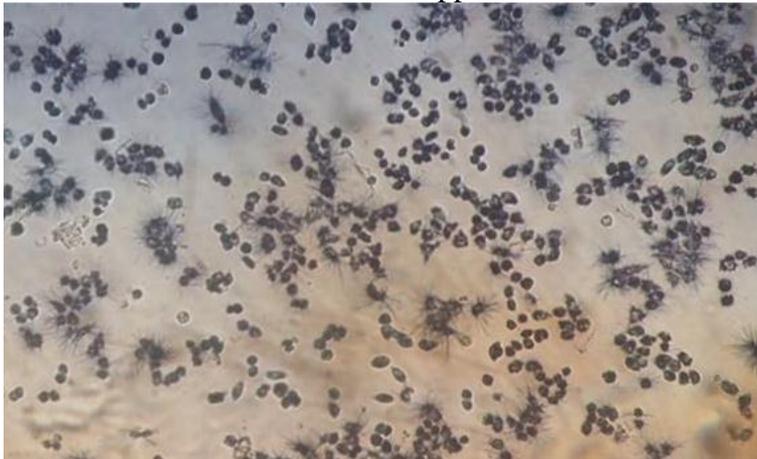
Fraksi etil asetat konsentrasi 250 ppm



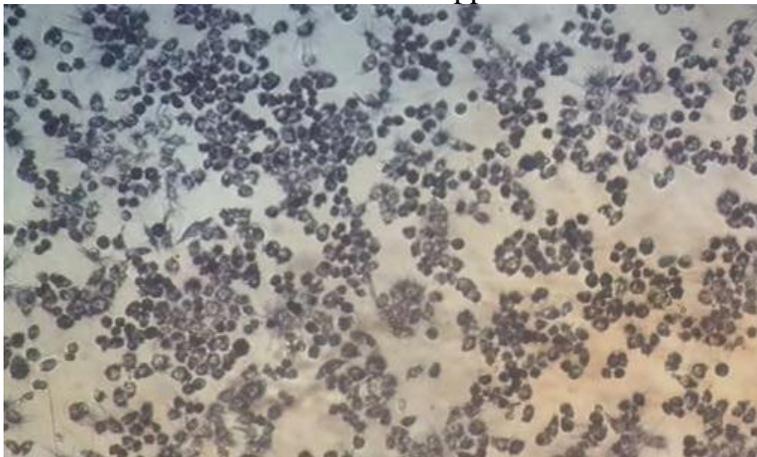
Fraksi etil asetat konsentrasi 125 ppm



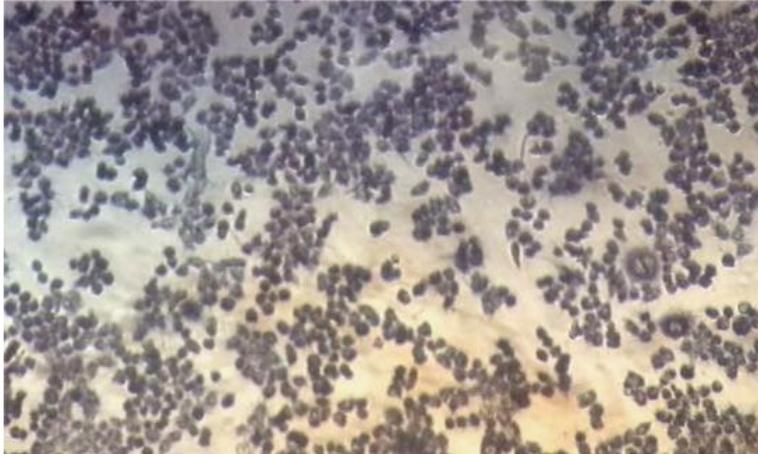
Fraksi etil asetat konsentrasi 62.5 ppm



Fraksi etil asetat konsentrasi 31.25 ppm



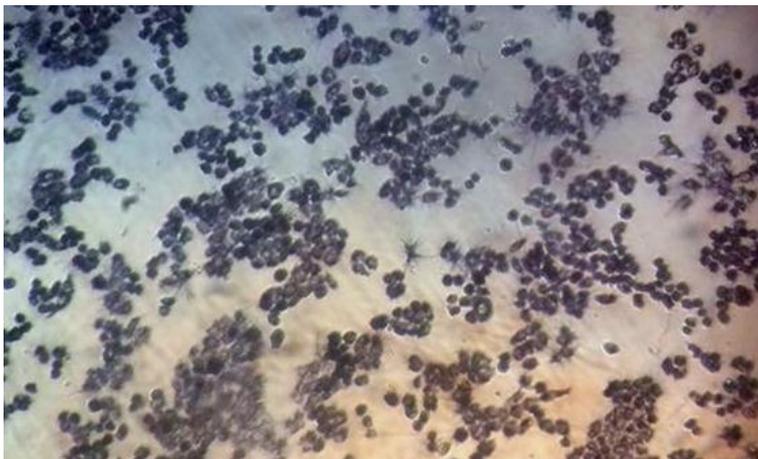
Fraksi etil asetat konsentrasi 15.625 ppm



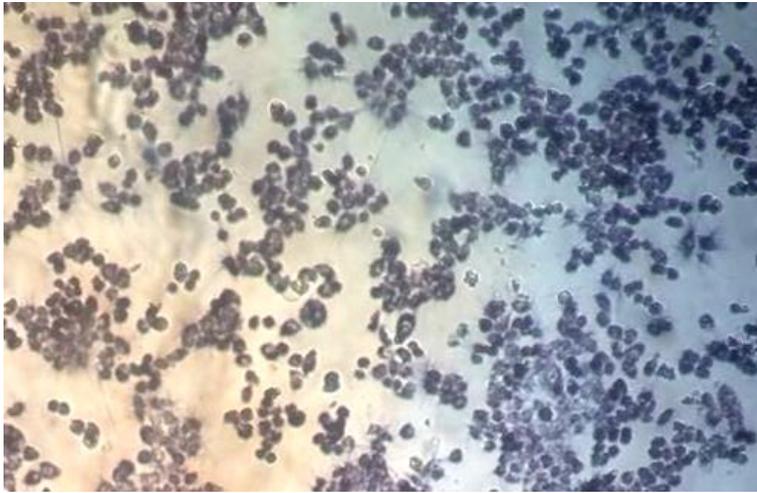
Fraksi etil asetat konsentrasi 7.8125 ppm



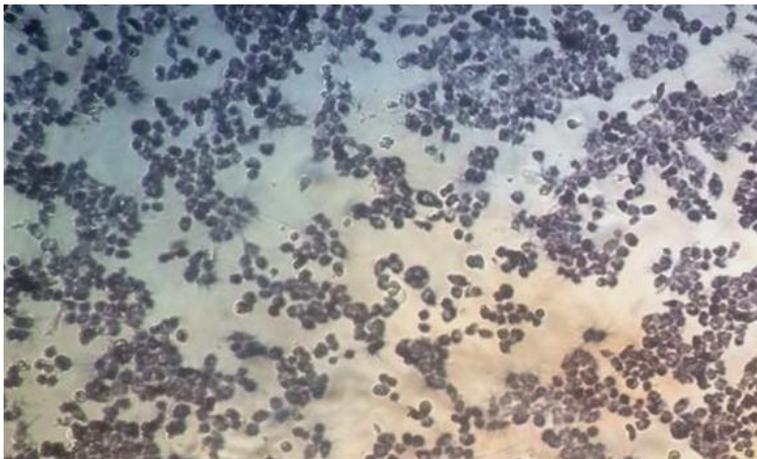
Kontrol sel



Kontrol pelarut (DMSO 1%)



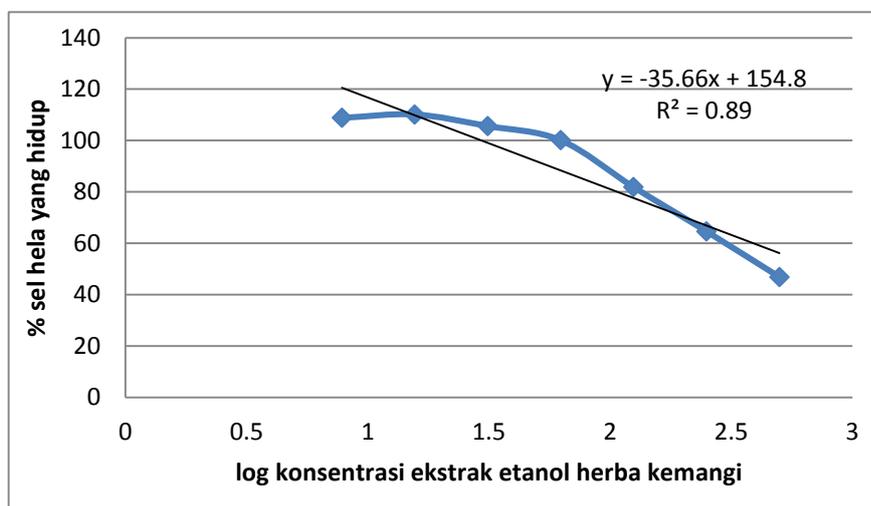
Kontrol pelarut (DMSO 2%)



## Lampiran 18. Perhitungan IC<sub>50</sub>

### A. Perhitungan IC<sub>50</sub> ekstrak etanol herba kemangi terhadap sel HeLa

Kadar µg/mL	Absorbansi			Rata- rata	KM	KS	log kadar µg/mL	rata-rata % sel hidup
	I	II	III					
500	0.475	0.472	0.456	0.468			2.699	46.983
250	0.566	0.63	0.622	0.606			2.398	64.698
125	0.714	0.778	0.729	0.74			2.097	81.900
62.5	0.838	0.914	0.895	0.882	0.102	0.881	1.796	100.128
31.25	0.899	0.987	0.951	0.946			1.495	108.344
15.625	0.902	1.003	0.979	0.961			1.194	110.270
7.81	0.946	0.987	0.961	0.965			0.893	110.783



$$a = 154,8$$

$$b = -35,66$$

$$r = 0,943$$

$$Y = a + bx$$

$$Y = -35,66x + 154,8$$

$$50 = -35,66x + 154,8$$

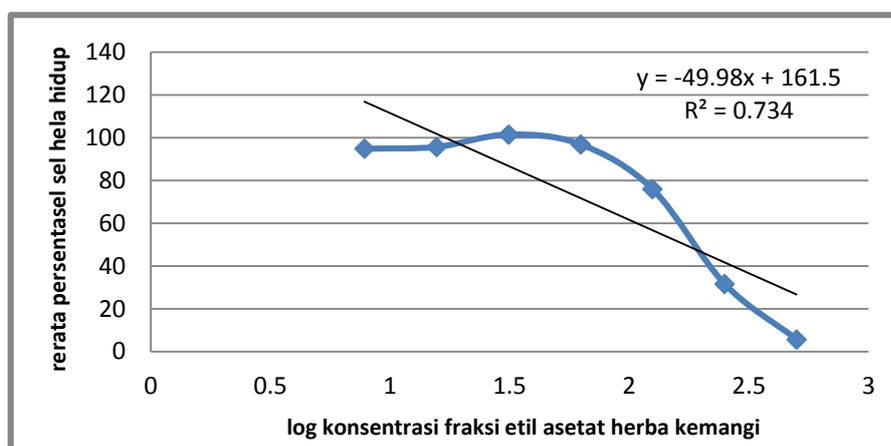
$$50 - 154,8 = -35,66x$$

$$X = 2.859$$

$$\text{Antilog } X (\text{IC}_{50}) = 722.273$$

### B. Perhitungan IC<sub>50</sub> fraksi etil asetat terhadap Sel HeLa

Kadar µg/mL	Absorbansi			Rata- rata	KM	KS	log kadar µg/mL	rata-rata % sel hidup
	I	II	III					
500	0.147	0.15	0.144	0.147			2.699	5.538
250	0.24	0.221	0.234	0.232			2.398	31.692
125	0.366	0.382	0.38	0.376			2.097	76.000
62.5	0.406	0.45	0.476	0.444	0.129	0.454	1.796	96.923
31.25	0.447	0.46	0.47	0.459			1.495	101.538
15.625	0.417	0.456	0.447	0.44			1.194	95.692
7.81	0.445	0.424	0.443	0.437			0.893	94.769



$$a = 161,5$$

$$b = -49,98$$

$$r = 0,857$$

$$Y = a + bx$$

$$Y = -49.98x + 161.5$$

$$50 = -49.98x + 161.5$$

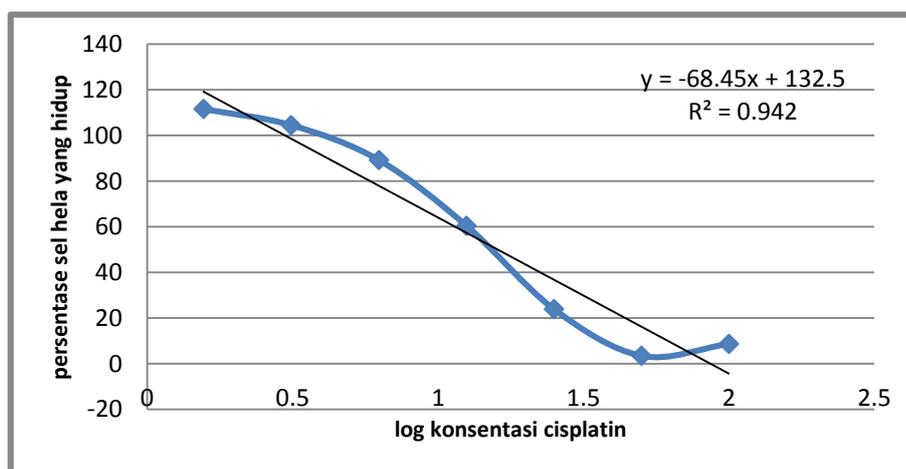
$$50 - 161.5 = -49.98x$$

$$X = 2.231$$

$$\text{Antilog } X (\text{IC}_{50}) = 170,174$$

### C. Perhitungan IC<sub>50</sub> cisplatin terhadap Sel HeLa

Kadar µg/mL	Absorbansi			Rata- rata	KM	KS	log kadar µg/mL	rata-rata % sel hidup
	I	II	III					
100.000	0.160	0.154	0.157	0.157			2.000	8.615
50.000	0.140	0.135	0.145	0.140			1.699	3.385
25.000	0.197	0.208	0.215	0.207			1.398	24.000
12.500	0.297	0.356	0.324	0.326	0.129	0.454	1.097	60.615
6.250	0.384	0.433	0.441	0.419			0.796	89.231
3.125	0.449	0.480	0.478	0.469			0.495	104.615
1.563	0.456	0.512	0.508	0.492			0.194	111.692



$$a = 132,5$$

$$b = -68,45$$

$$r = 0,971$$

$$Y = a + bx$$

$$Y = -68.45x + 132.5$$

$$50 = -68.45x + 132.5$$

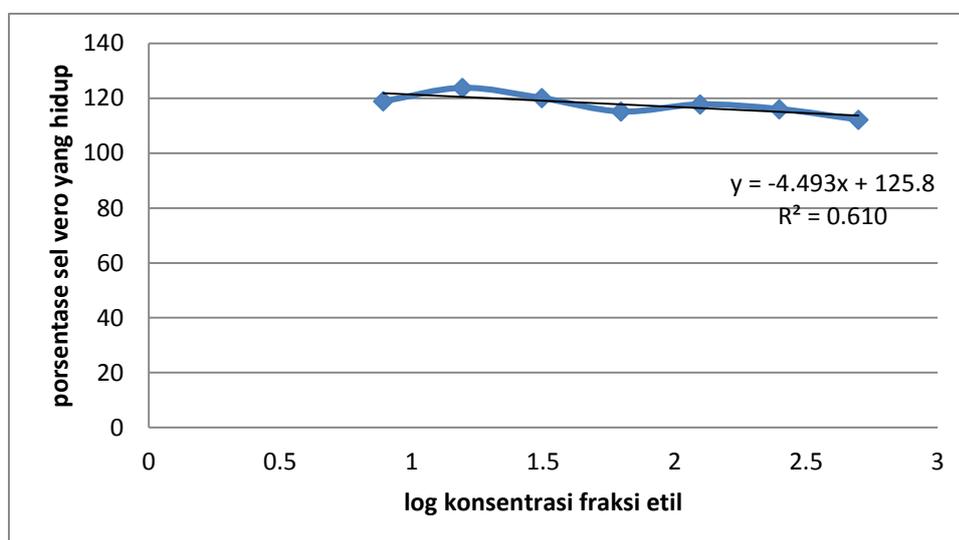
$$50 - 132.5 = -68.45x$$

$$X = 1.205$$

$$\text{Antilog } X (\text{IC}_{50}) = 16.042$$

#### D. Perhitungan IC<sub>50</sub> fraksi etil asetat herba kemangi terhadap Sel Vero

Kadar µg/mL	Absorbansi			Rata- rata	KM	KS	log kadar µg/mL	% sel hidup rata-rata
	I	II	III					
500	0.679	0.691	0.667	0.679			2.699	112.229
250	0.703	0.696	0.697	0.699			2.398	116.174
125	0.683	0.721	0.718	0.707			2.097	117.751
62.5	0.677	0.692	0.713	0.694	0.11	0.617	1.796	115.187
31.25	0.681	0.784	0.692	0.719			1.495	120.118
15.625	0.719	0.754	0.741	0.738			1.194	123.866
7.81	0.733	0.707	0.699	0.713			0.893	118.935



$$a = 125,8$$

$$b = -4,493$$

$$r = 0,781$$

$$Y = a + bx$$

$$Y = -4,493x + 125.8$$

$$50 = -4,493x + 125.8$$

$$50 - 125.8 = -4,493x$$

$$X = 16.871$$

$$\text{Antilog } X (\text{IC}_{50}) = 7.425 \times 10^{16}$$

**E. Perhitungan % sel hidup sel HeLa pada Kontrol Pelarut (DMSO)**

Absorbansi kadar 1%	Rata-rata absorbansi	% sel hidup	Rata-rata % sel hidup	Absorbansi kadar 2%	Rata-rata absorbansi	% sel hidup	Rata-rata % sel hidup
0.435		94.112		0.423		90.425	
0.429		92.268		0.418		88.889	
0.433	0.434	93.497	93.804	0.416	0.422	88.274	90.118
0.434		93.804		0.423		90.425	
0.437		94.726		0.428		91.961	
0.436		94.419		0.424		90.732	

**Lampiran 19. Perhitungan Indeks Selektivitas**

$$\text{indeks selektivitas} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ sel Vero}}{\text{IC}_{50} \text{ sel HeLa}}$$

$$\text{indeks selektivitas} = \frac{7,425^{16}}{170,174}$$

$$\text{indeks selektivitas} = 4.363 \times 10^{14}$$