

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Identifikasi sampel rimpang temu putih dilakukan di Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Determinasi Tanaman Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan, pengeringan bahan, dan pembuatan serbuk.

Tanaman yang digunakan adalah rimpang temu putih segar yang sudah siap dipanen yang ditandai dengan ciri daunnya sudah menguning diatas tanah kemudian dilakukan sortasi basah terlebih dahulu untuk memisahkan sampel dengan pengotor tanaman lainnya. Tahap selanjutnya dilakukan pencucian untuk menghilangkan debu dan pasir yang menempel pada rimpang temu putih. Perajangan bertujuan untuk memperkecil ukuran simplisia agar mudah dalam proses pengeringan. Proses pengeringan bertujuan untuk mencegah terjadinya proses kimiawi akibat kerusakan dari bakteri dan jamur. Berat sampel basah rimpang temu putih di dapat dari proses sebelumnya sekitar 3500 gram, sedangkan sampel kering yang didapat setelah proses pengeringan yaitu sebanyak 340 gram. Hasil rendemen rimpang temu putih dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil presentase berat kering terhadap berat basah rimpang temu putih.

Berat basah (g)	Berat kering (g)	Presentase (%)
3500	340	9.7

Hasil pengeringan rimpang temu putih basah 3.5 kg yang diperoleh berat keringnya sebesar 0.35 kg sehingga rendemen yang didapat adalah 9.7%. Setelah proses pengeringan rimpang temu putih digiling dan diblender hingga halus, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 dan ditimbang.

3. Pemeriksaan organoleptis serbuk rimpang temu putih.

Pembuatan serbuk rimpang temu putih bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel sampel dan memperluas permukaan sehingga pada saat proses ekstraksi senyawa yang terkandung didalam rimpang temu putih dapat ditarik semua sesuai dengan pelarut yang digunakan. Serbuk yang diperoleh selanjutnya diperiksa secara organoleptis. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk rimpang temu putih dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk rimpang temu putih

Organoleptis	Hasil
Bentuk	serbuk
Bau	khas
Rasa	pahit
Warna	kuning

4. Hasil penetapan kandungan lembab pada serbuk rimpang temu putih.

Serbuk rimpang temu putih ditimbang sebanyak 2 g, kemudian kandungan lembab diukur dengan menggunakan alat *moisture balance*. Penetapan kandungan rimpang temu putih dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk rimpang temu putih dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk rimpang temu putih

Berat awal (g)	Kandungan lembab serbuk (%)
2	7.5
2	9.5
2	9.2
Rata rata \pm SD	8.73 \pm 1.07

Hasil pada tabel 3 rata rata kandungan lembab serbuk rimpang temu putih sebesar 8.73 % Konsentrasi tersebut sudah memenuhi syarat berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia batasanya adalah kurang dari 10% sehingga mengurangi proses enzimatik dan proses pembusukan semakin lambat.

5. Hasil penetapan kadar air ekstrak etanol rimpang temu putih.

Serbuk rimpang temu putih ditimbang sebanyak 20g, kemudian kadar air diukur dengan menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Penetapan kadar air rimpang temu putih dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Setia Budi. Hasil penetapan kadar air serbuk rimpang temu putih dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar air serbuk rimpang temu putih.

Berat awal (g)	volume air	Kandungan air serbuk (%)
20	1.1	5.5
20	1.2	6
20	1.1	5.5
Rata rata \pm SD		5.6 \pm 0.2

Hasil pada tabel 3 rata rata kandungan air serbuk rimpang temu putih sebesar 5.6 % Konsentrasi tersebut sudah memenuhi syarat berdasarkan farmakope herbal indonesia batasanya adalah kurang dari 10% sehingga mengurangi proses enzimatik dan proses pembusukan semakin lambat.

6. Hasil pembuatan ekstrak etanol rimpang temu putih.

Pembuatan ekstrak etanol rimpang temu putih menggunakan metode maserasi serbuk yang digunakan sebanyak 250 g. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% dengan menggunakan pelarut etanol dalam proses maserasi diharapkan dapat menarik sebagian besar senyawa aktif simplisia rimpang temu putih. Hasil pembuatan ekstrak etanol rimpang temu putih dapat dilihat pada tabel.

Tabel 5. Hasil pembuatan ekstrak etanol rimpang temu putih

Simplisia (g)	Ekstrak(g)	Rendemen %
250	29	11.6

Ekstrak rimpang temu putih yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan pelarut 96% adalah 29 gram dan rendemen ekstrak yang didapat 11.6%.

7. Identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak etanol rimpang temu putih.

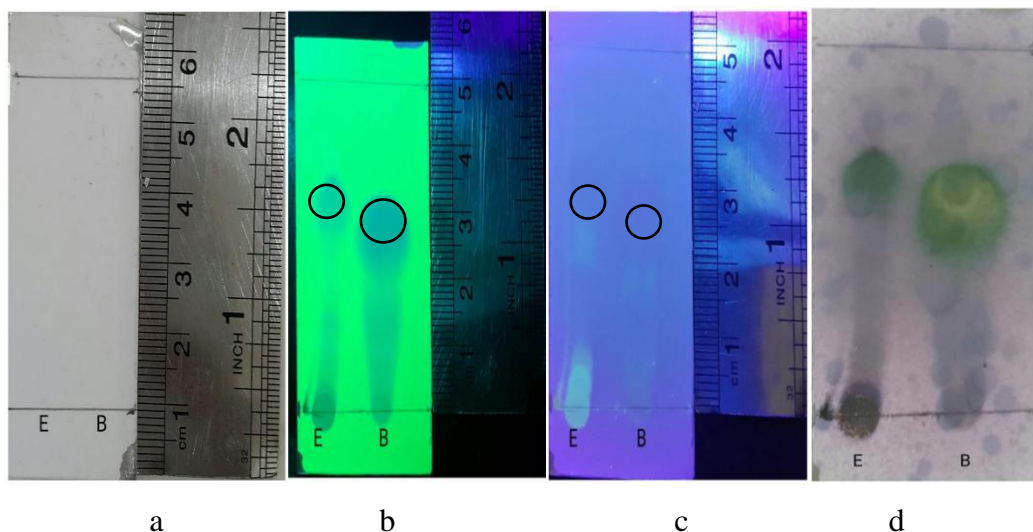
Identifikasi kandungan senyawa bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang ada pada tanaman rimpang temu putih. Identifikasi ini dilakukan dengan menambahkan serbuk dan ekstrak dengan pereaksi yang sesuai dan diamati perubahan warna yang terjadi. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk dan ekstrak etanol rimpang temu putih.

Senyawa	Hasil identifikasi	pustaka	Kesimpulan
Flavonoid	Tidak ada perubahan warna	Terbentuknya warna merah kuning atau jingga	Negatif
Fenolik	Biru	Ditandai warna hijau sampai biru kehitaman	Positif
Tanin galat	Biru kehitaman	Biru kehitaman tanin galat	Positif
Steroid	Hijau	Biru sampai hijau	Positif
Glikosida antrakinon	Filtrat kuning	Filtrat berwarna kuning	Positif
Saponin	Terdapat buih	Ditandai dengan adanya buih	positif

8. Identifikasi kualitatif senyawa dengan metode KLT

8.1 Senyawa minyak atsiri. Identifikasi kualitatif senyawa kimia minyak atsiri pada ekstrak etanol rimpang temu putih dilakukan pengujian dengan metode keromatografi lapis tipis (KLT). Pengujian ini dilakukan bertujuan untuk memisahkan senyawa yang terkandung berdasarkan perbedaan kecepatannya senyawa yang dibawa oleh fase gerak dan ditahan oleh secara selektif oleh fase diam. Pengujian kualitatif ini menggunakan silica gel GF254. Pengujian ini menggunakan fase gerak dengan perbandingan toluen : etil asetat (93:7). Pola pemisahan ini ditandai dengan adanya deteksi bercak pada sinar UV 254 dan 366 nm. penyemprotan dilakukan dengan pereaksi anisaldehyd. Hasil identifikasi klt dapat dilihat pada (Gambar 8).



Gambar 6. a) Sebelum penotolan, b) Deteksi dengan sinar UV254, c) Deteksi dengan sinar UV 366, d) setelah penyemprotan anisaldehyd. Keterangan; E: ekstrak etanol rimpang temu putih, B; baku sinamaldehyd.

Tabel 7. Hasil identifikasi ekstrak rimpang temu putih secara KLT

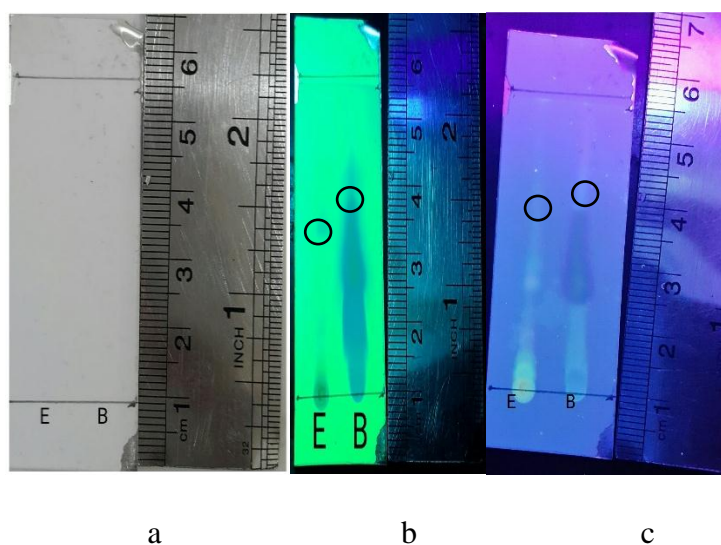
Kandungan senyawa	Fase gerak	Rf ekstrak	Rf baku kurcumin	Setelah penyemprotan
Minyak Atsiri	toluen : etil asetat (93:7)	1.42 cm	1.4 cm	Berwarna kuning kemerahan

Hasil kromatogram pada ekstrak etanol rimpang temu putih pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan pelarut toluen:etilasetat (97:7) pada penyinaran lampu UV pada panjang gelombang 366nm dan 254 nm (Gambar 8). Pereaksi semprot yang digunakan adalah anisaldehyd pereaksi ini bertujuan untuk mengetahui kandungan minyak atsiri memberikan perubahan warna menjadi kuning kemerahan yang bersifat polar kemudian bercak yang terbentuk dilakukan perhitungan Rf.

Hasil yang didapatkan berupa Rf ekstrak sebesar 1.42 cm dan Rf baku sinamaldehyd sebesar 1.4 cm. Berdasarkan hasil perhitungan nilai Rf antara ekstrak dan baku berdekatan maka adanya kandungan senyawa minyak atsiri dalam ekstrak etanol rimpang temu putih dilihat dari proses pemisahannya.

8.2 Senyawa kurkumin. Identifikasi kualitatif senyawa kurkumin pada ekstrak etanol rimpang temu putih dilakukan pengujian dengan metode keromatografi lapis tipis (KLT). Pengujian ini dilakukan bertujuan untuk

memisahkan senyawa yang terkandung berdasarkan perbedaan kecepatannya senyawa yang dibawa oleh fase gerak dan ditahan oleh secara selektif oleh fase diam. Pengujian kualitatif ini menggunakan silica gel GF254. Pengujian ini menggunakan fase gerak dengan perbandingan kloroform: etanol: asam asetat glacial (94:5:1). Pola pemisahan ini ditandai dengan adanya deteksi bercak pada sinar uv 254 dan 366 nm. Hasil identifikasi klt dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 7. a) Sebelum penotolan, b) Deteksi dengan sinar UV, c) 254 Deteksi dengan sinar UV 366, d) setelah penyemprotan x. Keterangan; E: ekstrak etanol rimpang temu putih, B; baku kurkumin.

Tabel 8. Hasil identifikasi ekstrak rimpang temu putih secara KLT

Kandungan senyawa	Fase gerak	Rf ekstrak	Rf baku kurcumin
kurkumin	kloroform: etanol: asam asetat glacial (94:5:1)	2.14 cm	1.93 cm

Hasil kromatogram pada ekstrak etanol rimpang temu putih pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan pelarut kloroform : etanol : asam asetat glacial (94:5:1) dengan penyinaran lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dan 254 nm. Rf yang didapatkan berupa ekstrak sebesar 2.14 cm dan Rf baku sinamaldehyd sebesar 1.93 cm. Berdasarkan hasil perhitungan nilai Rf antara ekstrak dan baku berdekatan maka adanya kandungan senyawa

kurkumin dalam ekstrak etanol rimpang temu putih dilihat dari proses pemisahannya.

9. Uji Residu Etanol

Ekstrak etanol rimpang temu putih dilakukan uji untuk mengetahui apakah ada sisa pelarut etanol didalam ekstrak . Hasil test menunjukkan bahwa tidak ada bau ester (etil asetat) sehingga hal ini berarti sudah tidak ada pelarut etanol dalam ekstrak hal ini bertujuan agar sampel yang didapatkan ketika diujikan pada sel yang diuji senyawa yang toksik bukan pelarutnya melainkan sampel ekstrak temu putih.

10. Uji Sitotoksik

Pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak etanol rimpang temu putih terhadap kultur sel T47D penelitian ini dilakukan Universitas Gadjah Mada Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Departemen Parasitologi, Gedung Prof Drs. R. Radiopoetro l.t. IV Sayap Timur. Sekip. Yogyakarta pada bulan maret 2019. Sel kanker payudara yang digunakan berupa kultur sel kanker T47D. Pengujian sitotoksik secara garis besar dibagi menjadi empat tahapan.

Pengujian sitotoksik yang pertama melakukan kultur sel kanker payudara T47D dengan cara mengambil sel yang inaktif dari incubator CO₂ kemudian tabung di rendam di atas penangas air dengan suhu 37 °C atau dengan cara digosok dengan tangan sampai isi didalam tabung mencair. Kemudian dipindahkan cairan tersebut secara aseptis kedalam *clonical* baru yang berisi media DMEM lalu di sentrifius diambil sel bagian bawahnya dan supernatannya di buang. Sel ditransfer kedalam petridis yang berisi media DMEM kemudian diinkubasi menggunakan inkubator CO₂ selama 2-3 hari sampai sel konfluen.

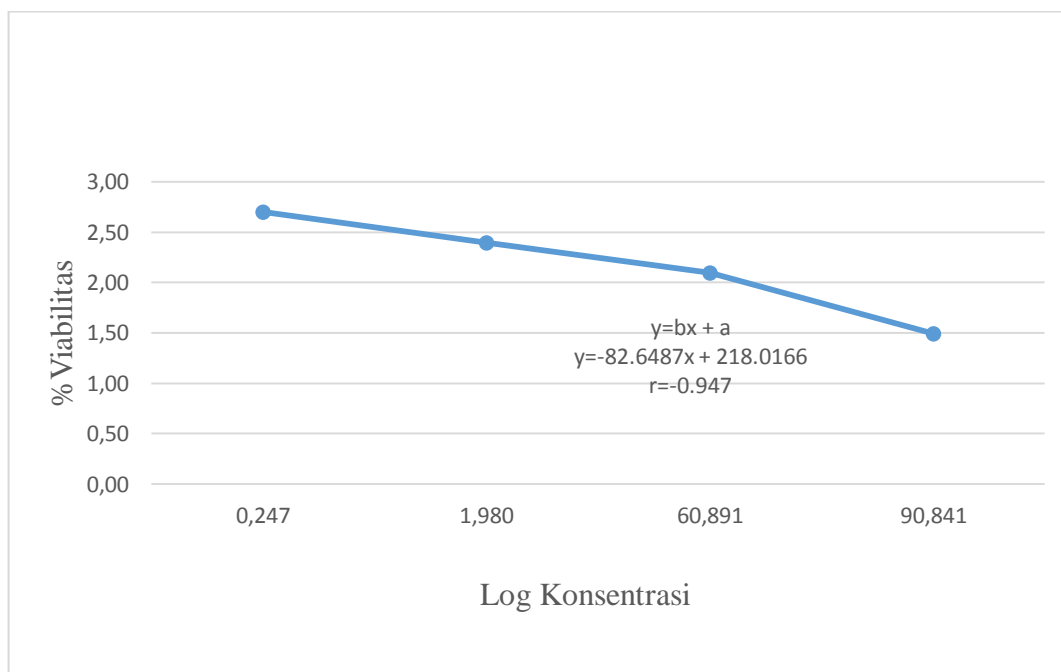
Sel yang konfluen maka bisa dilakukan panen sel sebelumnya dicuci terlebih dahulu dengan pbs kemudian ditambahkan tripsin inkubasi selama 3 menit yang bertujuan untuk melepaskan sel yang mengerombol untuk menginaktifkan tripsinnya ditambahkan media DMEM kemudian di sentrifius agar sel nya memisah dan terlihat menempel dibagian bawah *clonical tube*, kemudian bisa dilakukan dengan menghitung sel dibawah mikroskop inverted

dengan menggunakan alat *hemocytometer*. Pada penghitungan yang dilakukan jumlah sel kanker payudara T47D yang dapat dilakukan kultur sebanyak 225×10^4 dan sel normal Vero yang dapat dilakukan kultur sebanyak 90×10^4 . Kemudian sel tersebut di tambahkan media DMEM sebanyak 10 ml hal ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi kedua sel kedalam 96 sumuran dimana tiap sumuran mengandung sel 100 μ l/sumuran.

Pengujian sitotoksik yang kedua adalah dilakukan treatment sampel menggunakan sampel ekstrak etanol rimpang temu putih. Pelarut yang digunakan saat melarutkan sampel adalah DMSO (dimetil sulfoksida) pelarut ini tidak membahayakan dan tidak bersifat toksik digunakan secara meluas baik senyawa polar maupun non polar seri konsentrasi yang digunakan untuk ekstrak mulai dari 500 μ g/ml; 250 μ g/ml; 125 μ g/ml; 62.5 μ g/ml; 31.2 μ g/ml. Dan seri konsentrasi untuk kontrol positif doksorubisin 50 μ g/ml; 25 μ g/ml; 12.5 μ g/ml; 6.25 μ g/ml 3.125 μ g/ml 1.56 μ g/ml 0.781 μ g/ml

Pengujian sitotoksik yang ke tiga adalah MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) reaksi MTT merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium yang berwarna kuning. Sel sel yang hidup akan menghasilkan enzim mitokondria reduktase yang bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan yang berwarna ungu. Kristal formazan ini tidak larut air dan bersifat impermeable sehingga perlu penambahan sds stopper yang bertujuan untuk melarutkan kristal formazan ungu tersebut.

Pengujian sitotoksik yang ke empat adalah membaca well plate 96 dengan menggunakan Elisa Reader dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil yang didapatkan dilakukan penyajian hubungan antara % viabilitas sel terhadap konsentrasi. Hasil data absorbansi yang diperoleh dari masing masing sel yaitu kultur sel kanker payudara T47D terhadap ekstrak, kultur sel kanker payudara T47D terhadap kontrol positif doksorubicin, kultur sel normal Vero terhadap ekstrak, dan kultur sel normal Vero terhadap doksorubicin. Hasil presentase grafik hubungan % Viabilitas kultur sel kanker payudara T47D terhadap konsentrasi ekstrak rimpang temu putih.



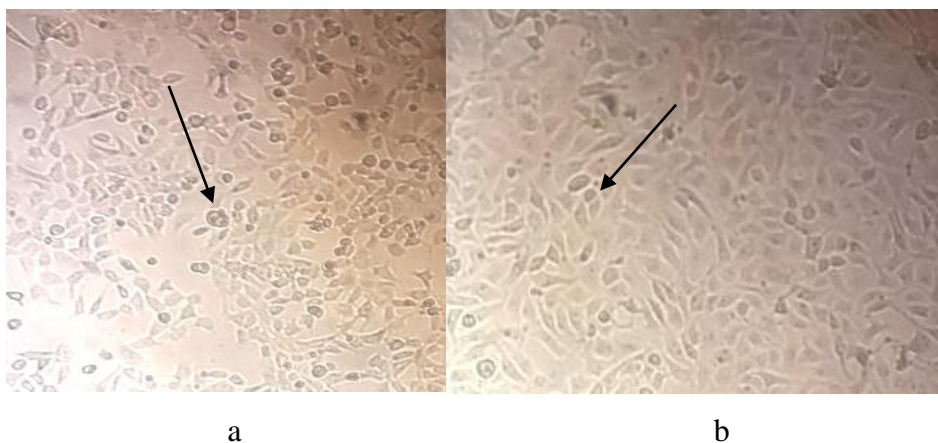
Gambar 8. Hasil presentase grafik hubungan % Viabilitas kultur sel kanker payudara T47D terhadap konsentrasi ekstrak rimpang temu putih. Nilai IC_{50} didapatkan dari perhitungan regresi linier konsentrasi dibandingkan dengan % viabilitas sel.

Hasil dari gambar 10 menyatakan semakin tinggi konsentrasi ekstrak rimpang temu putih maka semakin kecil presentase kehidupan sehingga ekstrak rimpang temu putih dapat digunakan sebagai antikanker kultur sel kanker payudara T47D. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak rimpang temu putih mampu menghambat atau menurunkan aktivitas sel T47D karena terlihat banyak sel T47D yang mati. Sel yang mati terlihat adanya sel yang lisis dan terlihat pecah pecah ketika diamati di mikroskop inverted, pembentukan kristal formazan juga semakin sedikit.

Aktivitas sitotoksik dibagi menjadi tiga berdasarkan nilai IC_{50} yaitu $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ merupakan sitotoksik potensial, $100 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ adalah sitotoksik moderat dan tidak memiliki aktivitas sitotoksik jika $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ (Prayong et al 2008). Menurut National Cancer Institute (NCI) Suatu ekstrak dinyatakan aktif memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$, moderat aktif apabila memiliki nilai $IC_{50} > 30 \mu\text{g/ml}$, dan $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$, dan dikatakan tidak aktif apabila nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$.

Nilai IC_{50} ekstrak rimpang temu putih terhadap kultur sel kanker payudara T47D menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan kematian sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Suatu ekstrak dianggap toksik jika memiliki nilai IC_{50} kurang dari 1000 ppm. (Amalina 2008 :16). Nilai IC_{50} yang didapatkan sebesar 107 $\mu\text{g/ml}$, semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Berdasarkan hal tersebut maka ekstrak temu putih dengan nilai IC_{50} sebesar 107 ppm dengan persamaan $y = -82.6487x + 218.0166$ tergolong ekstrak yang bersifat toksik / Sitotoksik moderat terhadap sel T47D.

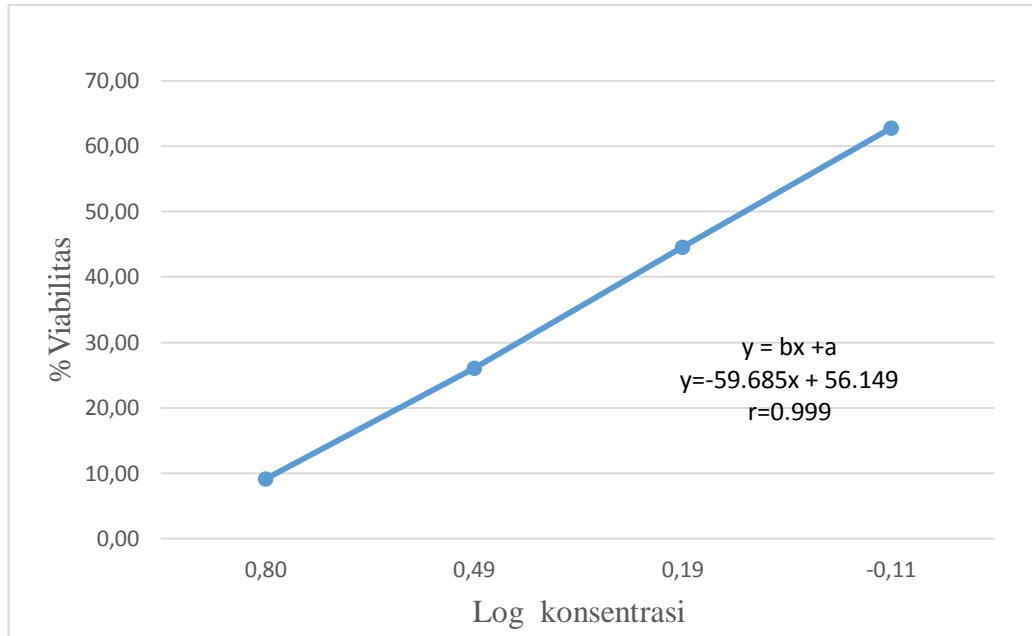
Pengujian pada tahap ini ekstrak rimpang temu putih menyebabkan sel T47D mengalami perubahan morfologi yaitu sel terdapat bercak bercak dan pecah, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal.



Gambar 9. Hasil perlakuan ekstrak etanol terhadap sel t47d pengamatan dilakukan pengamatan dibawah mikroskop inverted dengan pembesaran 100x. (a) 500 $\mu\text{g/ml}$ (b) kontrol sel.

Profil morfologi sel akibat perlakuan ekstrak etanol rimpang temu putih. Perlakuan ini menyebabkan perubahan morfologi pada sel T47D yaitu inti sel mengerut dan pecah, terlihat sel yang mengalami kematian, dan jumlah sel berkurang, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal.

Hasil presentase grafik hubungan % Viabilitas kultur sel kanker payudara T47D terhadap Doxorubicin.



Gambar 10. Hasil presentase grafik hubungan % Viabilitas kultur sel kanker payudara T47D terhadap Doxorubicin. Nilai IC_{50} didapatkan dari perhitungan regresi linier konsentrasi dibandingkan dengan % viabilitas sel .

Hasil dari gambar 12 menyatakan semakin tinggi konsentrasi Doxorubicin maka semakin kecil presentase kehidupan sehingga doxorubicin dapat digunakan sebagai antikanker kultur sel kanker payudara T47D. Doxorubicin disini sebagai kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa doxorubicin mampu menghambat atau menurunkan aktivitas sel T47D karena terlihat banyak sel T47D yang mati. Sel yang mati terlihat adanya sel yang lisis dan terlihat pecah pecah ketika diamati di mikroskop inverted, pembentukan kristal formazan juga semakin sedikit. Sensitivitas sel T47D terhadap Doxorubicin relatif tinggi dengan nilai IC_{50} 1.25 μ g/ml dan bersifat dosedependen dengan persamaan $Y = -59.685x + 56.149$ dan $r = -0.999$. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa sel T47D sensitif terhadap doxorubicin (Zampieri *et al.* 2002) doxorubicin tingkat sensitifitasnya lebih tinggi terhadap sel T47D dibandingkan sel MCF-7 (Stokia *et al.* 2008) dengan IC_{50} 467 nM (CCRC unpublished data).

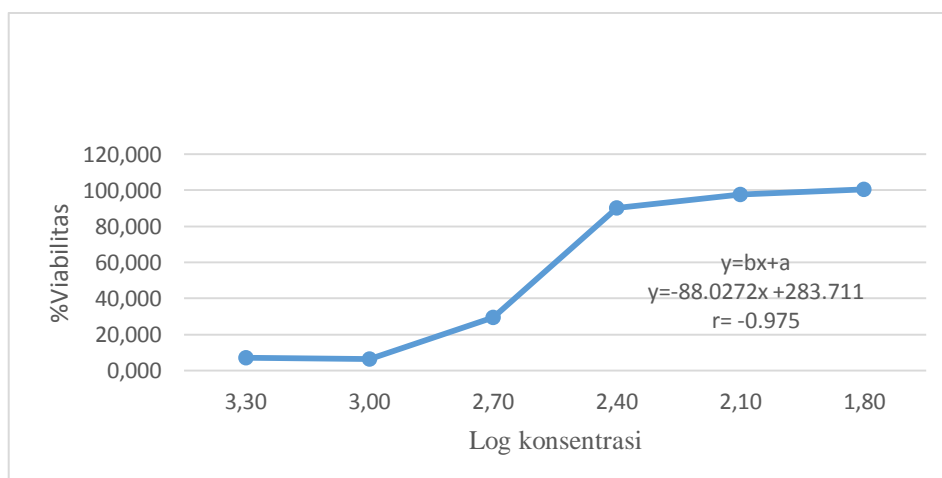
Pengujian pada tahap ini ekstrak rimpang temu putih menyebabkan sel T47D mengalami perubahan morfologi yaitu sel terdapat bercak bercak dan pecah, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal.



Gambar 11. Hasil perlakuan doxorubicin terhadap sel t47d pengamatan dilakukan pengamatan dibawah microskop inverted dengan pembesaran 100x. (a) 50µg/ml (b) kontrol sel.

Profil morfologi sel akibat perlakuan kontrol positif doxorubicin. Perlakuan ini menyebabkan perubahan morfologi pada sel T47D yaitu inti sel mengerut dan pecah, terlihat sel yang mengalami kematian, dan jumlah sel berkurang, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal.

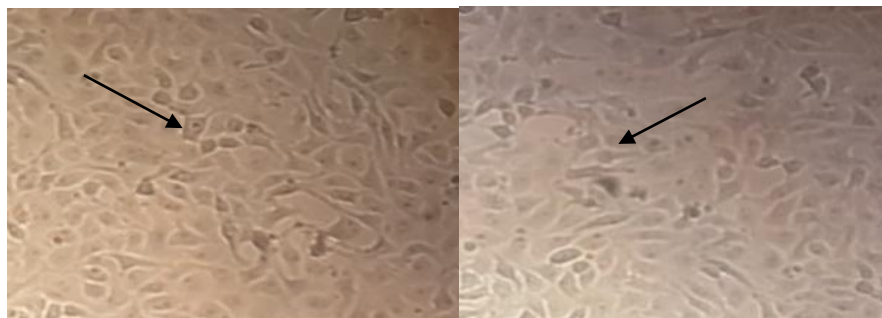
Hasil presentase grafik hubungan % viabilitas kultur sel Vero terhadap konsentrasi ekstrak rimpang temu putih.



Gambar 12. Hasil presentase grafik hubungan % Viabilitas kultur sel Vero terhadap ekstrak rimpang temu putih. Nilai IC_{50} didapatkan dari perhitungan regresi linier konsentrasi dibandingkan dengan % viabilitas sel .

Hasil dari gambar 14 menyatakan bahwa efek sitotoksis ekstrak rimpang temu putih terhadap sel Vero berdasarkan nilai IC₅₀ 451.844 μ g/ml dengan persamaan $y = -88,0272x + 283,711$ dan $r = -0.975$ profil morfologi sel menunjukkan efek yang lebih rendah jika dibandingkan dengan efeknya terhadap sel T47D. Sel menunjukkan adanya perubahan morfologi yang dimungkinkan karena protein yang berperan dalam perlekatan sel tidak mengalami polimerisasi sehingga ikatan sel terlepas dan membran lipid akan membulat. Penurunan viabilitas sel dan kepadatan sel terlihat pada semakin tinggi dosis yang digunakan, serta dengan perubahan morfologi yang mengalami pengerutan merupakan penanda sel yang menuju kematian.

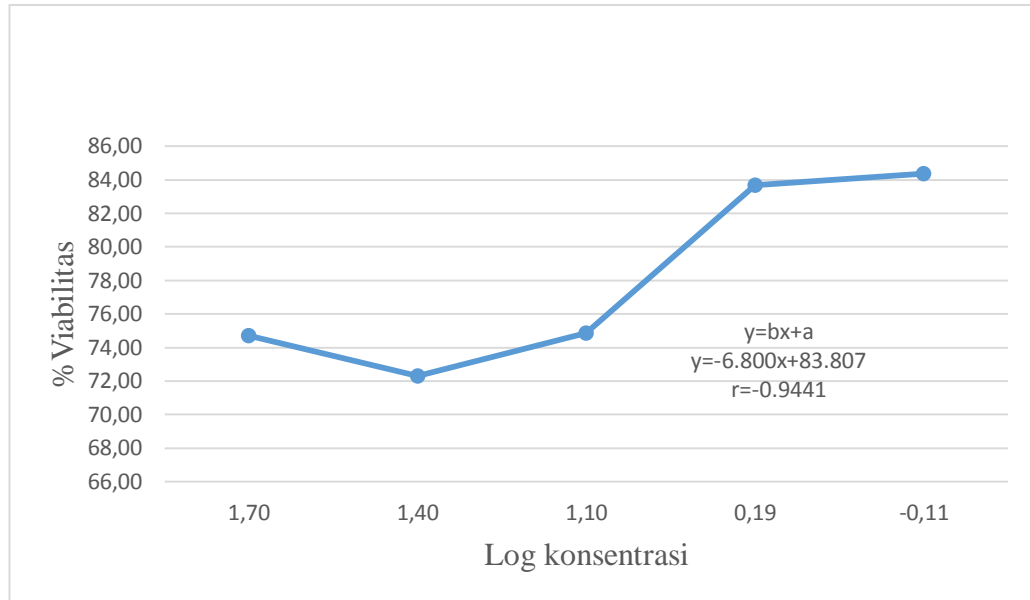
Pengujian pada tahap ini ekstrak rimpang temu putih menyebabkan sel Vero kurang mengalami perubahan morfologi yaitu sel terdapat masih berbentuk utuh dan tidak pecah, sehingga pada pengujian pada sel vero hampir menyerupai kontrol sel, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal.



Gambar 13. Hasil perlakuan ekstrak etanol terhadap sel vero pengamatan dilakukan pengamatan dibawah mikroskop inverted dengan pembesaran 100x. (a) 500 μ g/ml (b) kontrol sel.

Profil morfologi sel akibat perlakuan ekstrak rimpang temu putih terhadap kultur sel Vero. Perlakuan ini tidak menyebabkan perubahan morfologi pada sel Vero yaitu inti sel kelihatan membulat dan tidak pecah, sedikit sel yang mengalami kematian, dan jumlah sel sebanding dengan kontrol sel yang ada, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal.

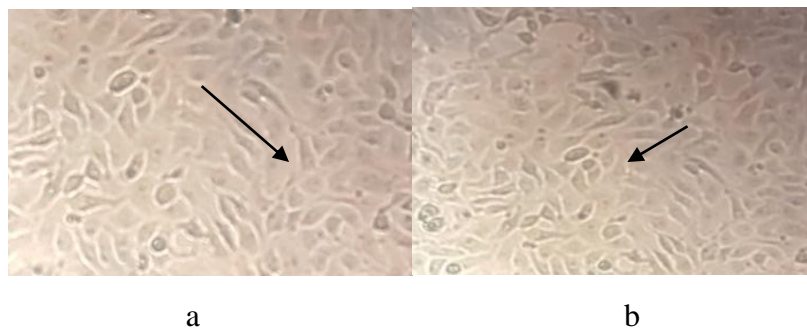
Hasil presentase grafik hubungan % Viabilitas kultur sel Vero terhadap Doxorubicin.



Gambar 14. Hasil presentase grafik hubungan % Viabilitas kultur sel Vero terhadap doxorubicin. Nilai IC_{50} didapatkan dari perhitungan regresi linier konsentrasi dibandingkan dengan % viabilitas sel

Hasil dari gambar 16 menyatakan bahwa Efek sitotoksik doxorubicin terhadap sel Vero nilai IC_{50} 1.06 μ g/ml dengan persamaan $y = -6.80032x + 83.80739$ dan $r = -0.9441$ hal ini membuktikan bahwa jika dilihat IC_{50} doxorubicin terhadap sel normal tidak selektif efek sampingnya mempengaruhi sistem metabolisme yang berlangsung cepat.

Pengujian pada tahap ini doxorubicin menyebabkan sel Vero kurang mengalami perubahan morfologi yaitu sel terdapat masih berbentuk utuh dan tidak pecah, sehingga pada pengujian pada sel vero hampir menyerupai kontrol sel, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal.



Gambar 15. Hasil perlakuan ekstrak etanol terhadap sel vero pengamatan dilakukan pengamatan dibawah mikroskop inverted dengan pembesaran 100x. (a) 500µg/ml (b) kontrol sel.

Profil morfologi sel akibat perlakuan doxorubicin terhadap kultur sel Vero. Perlakuan ini tidak menyebabkan perubahan morfologi pada sel Vero yaitu inti sel kelihatan membulat dan tidak pecah, sedikit sel yang mengalami kematian, dan jumlah sel sebanding dengan kontrol sel yang ada, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal.

11. Indeks selektivitas

Kriteria dalam memilih senyawa antikanker adalah dengan memperhatikan potensi sitotoksik, selektivitasnya terhadap sel normal, dan ketersediaan bahan baku. Potensi antikanker dapat dilihat dari nilai IC_{50} . Semakin kecil nilai IC_{50} maka potensi sitotoksiknya semakin besar. Parameter nilai indeks selektivitas suatu senyawa ditetapkan untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal. Nilai indeks selektivitas diperoleh dengan membagi nilai IC_{50} pada sel jenis Vero dengan sel jenis T47D. Nilai indeks selektivitas yang disyaratkan adalah >3 , yang menandakan bahwa ekstrak atau fraksi mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal, dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen kemopreventif.

Tabel 9. Hasil selektivitas index Ekstrak rimpang temu putih dan Doxorubicin

Perlakuan	IC_{50} T47D (µg/ml)	IC_{50} Vero (µg/ml)	Indeks selektivitas	Keterangan
Ekstrak etanol rimpang temu putih	107	451	4.21	Selektif
Doxorubicin	1.25	1.07	0.85	Tidak selektif

Hasil dari uji sitotoksik yang pertama pada kultur sel T47D ekstrak rimpang temu putih memiliki IC_{50} sebesar 107 µg/ml dan pada kultur sel vero memiliki IC_{50} sebesar 451 µg/ml sehingga indeks selektivitas ekstrak etanol rimpang temu putih pada sel vero sebesar 4.21 > 3 terhadap kultur sel kanker payudara T47D. Kedua uji sitotoksik pada kultur sel T47D Doxorubicin memiliki

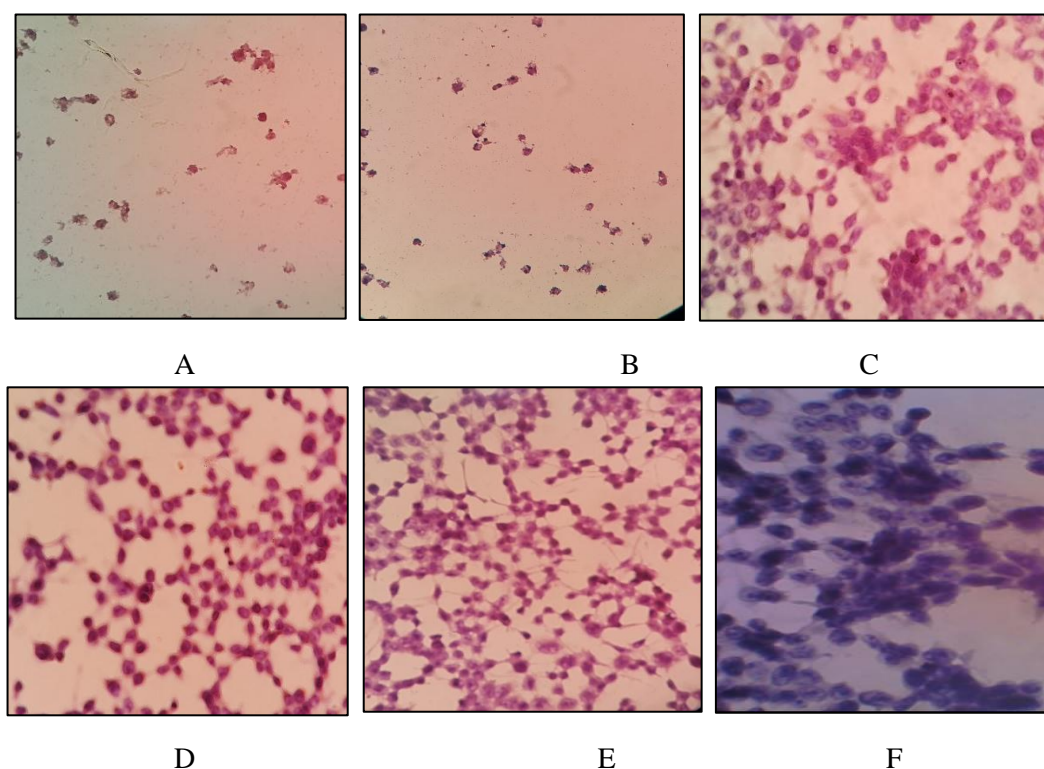
IC₅₀ sebesar 1.25 µg/ml dan pada kultur sel vero memiliki IC₅₀ sebesar 1.07 µg/ml sehingga indeks selektivitas doxorubicin pada sel vero sebesar $0.83 < 3$ terhadap kultur sel kanker payudara T47D. Dari kedua hasil indeks selektivitas bahwa ekstrak rimpang temu putih dan doxorubicin tidak selektif dalam membunuh kanker payudara T47D.

12. Imunositokimia

Pengamatan pada uji imunositokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal primer anti p53 dengan substrat DAB dikatakan bernilai positif ditandai adanya protein p53 apabila pada inti sel menghasilkan warna coklat gelap, sedangkan bila pada inti sel setelah difiksasi dengan Hematoksiklin menghasilkan warna ungu, maka menunjukkan hasil negatif adanya protein p53.

Morfologi sel pada pengujian Imunositokimia dengan konsentrasi 214; 107;53,5;26,75;13.37(µg/ml). Untuk mengetahui mekanisme yang memperantarai ekstrak rimpang temu putih dalam menghambat pertumbuhan sel T47D dengan menggunakan metode Imunositokimia dengan menggunakan ikatan antibodi spesifik metode yang digunakan adalah metode tidak langsung antibodi yang digunakan ada dua antibodo primer dan sekunder.

Kematian sel ada beberapa kemungkinan yang mempengaruhi, salah satunya adalah mekanisme antiproliferatif yang menghambat pembelahan sel kanker. Salah satu regulator proliferasi yang berperan dalam sel adalah protein p53. Untuk itu dilakukan penelusuran mekanisme dari Ekstrak rimpang temu putih terhadap ekspresi protein p53. Pengamatan jumlah protein 53 pada kultur sel T47D akibat perlakuan ekstrak rimpang temu putih memperlihatkan adanya perbedaan warna dibandingkan sel tanpa perlakuan. Pada kontrol sel atau sel T47D normal jumlah protein 53 tidak berekspresi dimana sel berwarna ungu seperti pada sel tanpa antibodi anti p53 dan protein p53 terekspresi pada inti sel. Hasil morfologi efek perlakuan ekstrak etanol rimpang temu putih terhadap jumlah protein 53 pada kultur sel T47D dapat dilihat pada gambar 17.



Gambar 17. Efek perlakuan ekstrak etanol rimpang temu putih terhadap jumlah protein 53 pada kultur sel T47D.

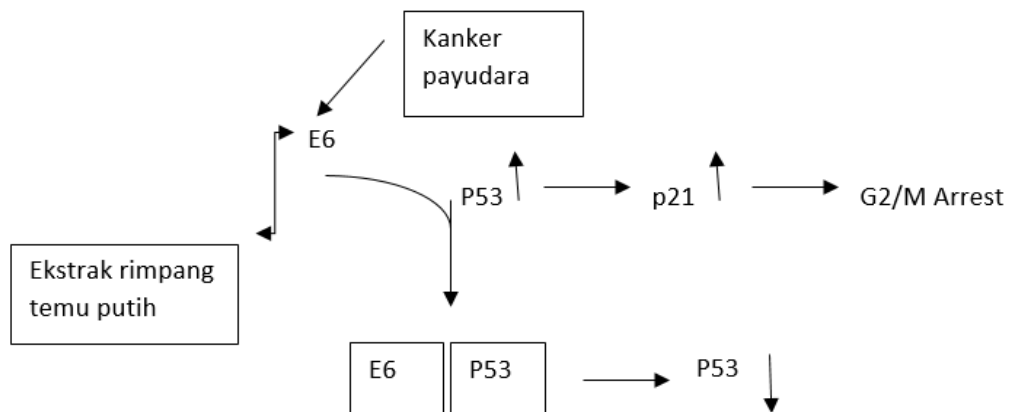
Kultur sel T47D dengan kepadatan 600×10^4 diinkubasi dalam coverslip dengan menggunakan 6 well plate selama semalam agar sel beradaptasi lalu diberi perlakuan ekstrak dan diinkubasi selama semalam kemudian dilanjutkan pengecatan menggunakan anibodi p53 dengan metode Imunositokimia. (A) Konsentrasi $2x IC_{50}$ yaitu $214 \mu\text{g/ml}$. (B) Konsentrasi $1x IC_{50}$ yaitu $107 \mu\text{g/ml}$. (C) Konsentrasi $\frac{1}{2} x IC_{50}$ yaitu $53,5 \mu\text{g/ml}$. (D) Konsentrasi $\frac{1}{4} IC_{50}$ yaitu $26.75 \mu\text{g/ml}$. (E) Konsentrasi $\frac{1}{8} IC_{50}$ yaitu $13.37 \mu\text{g/ml}$.

Tabel 10. Presentase jumlah protein 53 setelah perlakuan ekstrak etanol rimpang temu putih

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah protein 53 (%)
	$2x IC_{50}$ 214	100
	$1x IC_{50}$ 107	100
Ekstrak rimpang temu putih	$\frac{1}{2} IC_{50}$ 53.5	35
	$\frac{1}{4} IC_{50}$ 26.75	67
	$\frac{1}{8} IC_{50}$ 13.37	93
	Kontrol sel	0

Hasil pengamatan kualitatif berdasarkan 6 lapang pandang hasil yang didapatkan yaitu semakin kecil konsentrasi maka jumlah protein yang terekspresi

semakin banyak pada konsentrasi $2x IC_{50}$ dan $1x IC_{50}$ semua sel mati semua sel berwarna coklat dan tidak ada yang berwarna ungu.



Gambar 16. Kemungkinan ekstrak rimpang temu putih menghambat proliferasi sel T47D.

Ekstrak etanol rimpang temu putih menghambat pembentukan E6 (*down regulation*), menghambat ikatan E6 dan p53 sehingga mengakibatkan ekspresi p53 meningkat. Protein p53 akan menginduksi p21 yang akhirnya menyebabkan G2/M Arrest (proliferasi sel berhenti).

Protein p53 merupakan kunci regulator dalam proses seluler yang meliputi *cell cycle control*, kematian sel yang terprogram, perbaikan DNA, stabilitas genom, dan diferensiasi. Protein p53 ini juga faktor transkripsi yang mengaktifasi transkripsi dari berbagai macam gen seluler seperti *p21Waf1*, *bax*, *cyclinG*, dan *Mdm2*. Pada kanker payudara, p53 mengalami penurunan fungsi karena protein E6 yang dihasilkan oleh kanker payudara akan mengikat p53, kemudian mendegradasinya. Untuk itulah pada hasil imunositokimia untuk kontrol sel pada gambar (F), protein p53 tidak terekspresi. Pada perlakuan ekstrak rimpang temu putih konsentrasi $2x IC_{50}$ dan $1x IC_{50}$ terlihat adanya peningkatan ekspresi protein p53 dan sel banyak yang mati sehingga warna ungu tidak tampak (gambar A dan B).

Konsentrasi dibawahnya seperti $\frac{1}{2} IC_{50}$, $\frac{1}{4} IC_{50}$ dan $\frac{1}{8} IC_{50}$ dapat dilihat dari hasil presentase nya semakin kecil konsentrasi yang dilakukan pengujian maka semakin banyak yang diekspresikan sehingga presentase viabilitasnya juga

semakin meningkat. Peningkatan ekspresi protein p53 inilah yang menyebabkan kematian sel T47D, yaitu melalui mekanisme antiproliferatif. Ada dua kemungkinan yang memerantari induksi ekspresi protein p53 oleh ekstrak rimpang temu putih. Kemungkinan yang pertama berkaitan dengan adanya mekanisme *down regulation* dari E6 walaupun pada penelitian ini tidak melihat level E6 secara seluler. Mekanisme *down regulation* dari E6 ini kemungkinan akibat adanya inhibisi ekstrak rimpang temu putih dalam proses transkripsi dari E6.

Peningkatan level p53 karena proses degradasi p53 oleh E6 tidak terjadi. Kemungkinan yang kedua adalah EHC menghambat terjadinya ikatan E6 dengan protein p53 yang mengakibatkan proses degradasi protein p53 menurun atau bahkan tidak terjadi. Kami menyarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat level dari E6 secara seluler sehingga dapat dilihat mekanisme hubungan E6 dengan peningkatan protein p53. Peningkatan ekspresi protein p53 akan menyebabkan terhentinya proses proliferasi sel. Protein p53 dapat menyebabkan transkripsi beberapa protein yang berperan dalam kontrol siklus sel, salah satunya adalah p21waf1/cip1 . Protein p21waf1/cip1 merupakan mediator dari p53 untuk menginduksi *growth arrest* pada fase G2/M , menghambat CDK, dan menghentikan siklus sel sehingga mencegah replikasi DNA yang rusak . Kemungkinan jalur yang terjadi adalah peningkatan ekspresi p53 menyebabkan terjadi peningkatan ekspresi p21 (*downstream* dari p53).

Ekspresi protein p21 inilah yang kami asumsikan menjadi penyebab proliferasi sel kanker tersebut berhenti pada pada fase G2/M (*growth arrest*). Perlu penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi protein p21 maupun protein-protein lain yang merupakan *downstream* dari p53. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian yang mengkaji mengenai siklus sel dengan metode *flowcytometri* untuk menjelaskan mekanisme tersebut. Berbagai mekanisme tersebut mampu menjelaskan aksi molekuler yang memperantari potensi sitotoksik Ekstrak etanol rimpang temu putih pada sel kanker payudara. Dari data – data tersebut semakin meyakinkan bahwa ekstrak rimpang temu putih berpotensi sebagai agen kemopreventif potensial pada sel kanker payudara. Perlu dilakukan

Penelitian lebih lanjut tentang aplikasi ekstrak rimpang temu putih dengan agen kemoterapi sehingga diperoleh kombinasi yang tepat untuk penanganan kanker payudara untuk menambah data data mengenai pemanfaatan tumbuhan ini. Keberhasilan dari penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan suatu alternatif pengobatan yang lebih murah dengan memanfaatkan tumbuhan liar di sekitar kita, bahkan di masa mendatang dapat menjadi fitofarmaka yang potensial dalam menunjang pengobatan kanker leher rahim.