

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi merupakan semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel merupakan representasi populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah segar, bersih tidak busuk, tidak terlalu tua dan muda dipanen saat musim kering agar kandungan kadar air tidak tinggi dalam rimpang.

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

##### **1. identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah identifikasi dari sampel ekstrak jahe merah.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah ekstrak jahe merah fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksana dan fraksi air yang akan diuji aktifitasnya terhadap sel kanker hati HepG2.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah indeks selektivitas ekstrak jahe merah dan fraksi , etil asetat, *n*-heksana dan air terhadap sel vero.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel, yaitu : variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas merupakan variabel yang sengaja diubah atau direncanakan untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak jahe merah, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi air yang diujikan terhadap sel kanker hati HepG2.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik sel kanker hati HepG2 dengan menghitung sel yang mati .

Variabel terkontrol merupakan variabel yang dianggap mempengaruhi, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini meliputi : kondisi inkubator, kondisi laboratorium, lama perlakuan, konsentrasi sampel, alat-alat yang digunakan seperti kebersihannya, keadaan sel HepG2, keadaan sel vero, dan keadaan peneliti sendiri.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, jahe merah yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Ekstrak jahe merah adalah hasil remaserasi dari jahe merah dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

Kedua, fraksi *n*-heksan jahe merah adalah ekstrak kental berupa hasil fraksinasi dari ekstrak jahe merah dengan menggunakan pelarut *n*-heksan dengan metode ekstraksi cair-cair

Ketiga, fraksi etil asetat jahe merah adalah ekstrak kental berupa hasil fraksinasi dari ekstrak jahe merah dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan metode ekstraksi cair-cair.

Keempat, aktivitas sitotoksik adalah kemampuan senyawa untuk membunuh sel kanker setengah dari jumlah populasi dapat dikur dengan menggunakan nilai parameter  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ .

Kelima, sel kanker hati HepG2, adalah *continous cell line* koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kultur sel ditumbuhkan dengan menggunakan media penumbuh DMEM yang mengandung vitamin, asam amino, dan glukosa.

Keenam, sel vero merupakan *continous cell line* yang diturunkan dari sel epitel monyet hijau afrika, koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran

Universitas Gadjah Mada Yogyakarta kemudian kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh M-199 yang mengandung FBS 10 % dan penisilin-streptomisin 2% , fungison 0,5%.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, diantaranya sebagai berikut :  
Alat penyari terdiri dari maserasi, ayakan mesh 40, blender, batang pengaduk, kain flanel, corong pisah beserta klem dan batang statip, moisture balance, kertas saring, corong buchner, oven, *evaporator*, timbangan elektrik dan alat gelas.

Alat uji sitotoksik terdiri dari : tangki nitrogen cair, sentrifuge sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), inkubator 37<sup>0</sup>C aliran CO<sub>2</sub> 5% model 6200 (Napco), laminar air flow class II (Labconco), *autoclave*, spektrokolorimeter pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), *tissue culture flask* (Nunclone), tabung konikal steril (Nunclone), *mikroplate* 96 sumuran (Nunclone), neraca elektrik ( Sartorius), mikropipet 20-200 µL dan 200-1000 µL (Pipetmen), mesin vortex, lampu ultraviolet, mikroskop inverted (Axiovert-25), magnetic stirrer dan kamera digital

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:  
rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rosc*), etanol 96%, aquadest, plate, *n*-heksan, etil asetat, air, kloroform, anisaldehyd asam sulfat, FeCl<sub>3</sub>, Liberman Burchard, Dragendroff (E Merck), Mayer (E merck), Sitoborat (E merck).

Bahan untuk uji sitotoksik meliputi : sel kanker hati HepG2, sel vero, media stok : DMEM, M-199, FBS (*Fetal Browni Serum*) 10%, Penisilin-Streptomisin 2% v/v, fungison (Amphoterasin B) 0,5%, DMSO (*Dimetil Sulfoksida*). Trypsin 0,5%, MTT 10mg/ml dalam FBS, media pencuci sel, larutan PBS pH, 7,2 SDS (*Sodium Dodesil Sulfas*) 10% dalam HCl 0.1 berfungsi sebagai (*stopper*), doksorubisin sebagai kontrol positif.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi rimpang jahe merah**

Tahap pertama penelitian ini adalah memastikan kebenaran sampel rimpang jahe merah yang meliputi ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis, dengan mencocokkan morfologi yang terdapat di dalam pustaka dan dibuktikan di Laboratorium Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jawa Tengah.

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

Rimpang jahe merah diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu Karanganyar. Rimpang jahe merah diambil dalam keadaan bersih dan segar, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, tidak membusuk, pemanenan rimpang jahe merah pada saat musim kemarau atau musim kering, hal ini dikarenakan supaya kadar air dalam rimpang jahe merah tidak mengandung kadar air yang tinggi. Rimpang jahe merah yang telah dipanen kemudian dicuci dan dibersihkan, diopotong tipis-tipis dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C.

Jahe merah yang telah kering kemudian digiling atau diblender, lalu diayak dengan menggunakan ayakan nomor *mesh* 40. Serbuk yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup rapat..

### **3. Penetapan susut pengeringan serbuk**

Penetapan susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 2 gram serbuk jahe merah, kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan menggunakan alat *moisture balance* O'haus MB23 pada suhu 105°C, kemudian dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Susut pengeringan memenuhi syarat bila suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Tahap ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi (Kemenkes 2011).

### **4. Penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah**

Penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell* dengan memasukkan serbuk sebanyak 20 gram, lalu serbuk dimasukkan ke dalam labu destilasi dan menambahkan pelarut toluen jenuh air kurang lebih 200 ml hingga terendam. Memasang alat *Sterling-Bidwell* dan memanaskan dengan menggunakan pembakar spirtus. Pemanasan

dihentikan jika pada penampung tidak menetes lagi dan dilanjutkan dengan mengukur kadar air dengan melihat volume pada skala (Depkes 2008). Penetapan kadar air serbuk dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

#### **5. Pembuatan ekstrak etanol jahe merah**

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode remaserasi, pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Serbuk rimpang jahe merah ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam wadah gelap dan ditambah dengan etanol 96% sebanyak 5 L. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian wadah didiamkan selama 18 jam. Proses remaserasi harus terlindung dari cahaya matahari langsung. Setelah 18 jam maserat disaring dengan kain flanel, ampas dilakukan maserasi kembali dengan cara yang sama yaitu ditambah 5 L pelarut etanol 96%. Maserat dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan vakum evaporator suhu 50°C untuk menghilangkan pelarut etanol hingga diperoleh ekstrak kental. Diperoleh ekstrak kental jahe merah, (Kemenkes 2013).

#### **6. Pembuatan fraksinasi**

Fraksi ekstrak pekat rimpang jahe merah dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair, kemudian dilakukan partisi dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Partisi ekstrak dilakukan bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Sebanyak 10 gram ekstrak kental rimpang jahe merah yang diperoleh dilarutkan dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 15 ml kemudian disuspensi dengan air sebanyak 60 ml dan dipartisi dengan menggunakan 75 ml *n*-heksan pada corong pisah, lalu dikocok selama beberapa menit, akan terbentuk bidang 2 lapisan yaitu lapisan atas adalah lapisan *n*-heksan sedangkan lapisan bawah adalah lapisan air. Dilakukan pemisahan lapisan yaitu dengan mengambil lapisan atas untuk ditampung sedangkan lapisan air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut *n*-heksan yang baru. Partisi dilakukan dengan cara yang sama sebanyak tiga kali.

Partisi dilakukan kembali dengan menggunakan pelarut etil-asetat dan fase air. Corong pisah dikocok dan dibiarkan beberapa menit hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas merupakan lapisan etil asetat sedangkan lapisan bawah

merupakan lapisan air. Partisi diulang sebanyak tiga kali. Lapisan etil asetat dan lapisan air dipisahkan dan ditampung

Lapisan *n*-heksan, lapisan etil asetat dan lapisan air dipekatkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian masing-masing ekstrak ditimbang (Ghani 2018). Skema Selengkapnya dapat dilihat pada (Gambar 1).

## **7. Identifikasi kandungan senyawa pada ekstrak jahe merah**

Kandungan senyawa yang terdapat dalam serbuk simplisia, ekstrak etanol jahe merah diidentifikasi dengan uji warna yaitu menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing.

**7.1. Identifikasi flavonoid.** Sampel sebanyak 0,1 gram ditambahkan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit. Kemudian disaring. Filtrat yang didapat kemudian ditambahkan 0,5 gram serbuk mg, 1 ml HCl pekat dan amil alkohol. Campuran dikocok kuat, sampel dinyatakan positif apabila timbul warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harbone 1987)

**7.2. Identifikasi alkaloid.** Sampel dilarutkan dengan HCl encer, kemudian disaring. Identifikasi dengan reagen mayer bila positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan kuning, identifikasi dengan reagen Dragendorff hasil positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan warna merah (Tiwari *et al* 2011).

**7.3. Identifikasi terpenoid.** Ekstrak dilarutkan dalam 2 ml kloroform pada tabung reaksi kering. Ditambahkan 10 tetes anhidrida asetat dan 3 tetes asam sulfat pekat. Apabila terbentuk larutan warna jingga maka sampel dinyatakan positif mengandung terpenoid (Harbone 1987 ).

**7.4. Identifikasi tanin.** Sampel sebanyak 0,1 gram dididihkan dalam 20 ml air lalu disaring, filtrat ditambah FeCl<sub>3</sub> 1%, vortex hingga mengalami perubahan warna. Sampel dinyatakan positif apabila mengalami perubahan warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Edoga *et al* 2005).

## **8. Identifikasi kandungan senyawa dengan menggunakan kromatografi lapis tipis**

Kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi jahe merah diidentifikasi dengan uji warna yaitu menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing.

**8.1. Identifikasi kandungan senyawa flavonoid.** Pengujian kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel GF 254. Sampel dan baku ditotolkan dengan jarak 1 cm dari bawah dengan menggunakan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan menggunakan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (8:2). Dengan penampakan noda uap amoniak UV 254 nm memberikan peredaman. UV 366 dengan warna ungu gelap, berfluoresensi biru, kuning dan setelah diuapi amonia warna berubah menjadi kuning (Zirconia *et al* 2015)

**8.2. Identifikasi kandungan senyawa alkaloid.** Pengujian kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel GF 254. Sampel dan baku ditotolkan dengan jarak 1 cm dari bawah dengan menggunakan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan menggunakan etil asetat : metanol : air (90:9:1) disempnot dengan pereaksi Dragendrof. Penampakan noda terlihat peredaman pada UV 254 nm, sebagian alkaloid berfluoresensi biru atau kuning (Harbone 1996).

**8.3. Identifikasi kandungan senyawa terpenoid.** Pengujian kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel GF 254 . sampel dan baku ditotolkan dengan jarak 1 cm dari bawah dengan menggunakan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan menggunakan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1:1). Plat KLT silika gel GF 254 hasil positif jika diamati sinar UV 366 terdapat fluoresensi hijau atau warna merah ungu atau biru dengan pereaksi asam sulfat pekat 10% dalam metanol (Harbone 1996).

**8.4. Identifikasi tanin.** Pengujian kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel GF 254. Sampel dan baku ditotolkan dengan jarak 1 cm dari bawah dengan menggunakan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan menggunakan *n*-butanol : asam asetat: air (4:1:5). Setelah diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dapat berfluoresensi warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Lestari 2013).

**8.5. Identifikasi minyak atsiri.** Menimbang 1 gram sampel, direndam sambil dikocok diatas penangas air dengan 10 ml pelarut. Masukkan filtrat ke dalam labu terukur 10 ml ditambahkan pelarut sampai tanda batas. Identifikasi minyak atsiri menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub> nm dan fase gerak toluen : etil asetat (93:7) dengan larutan pembanding eugenol 1% dalam etanol. Deteksi

menggunakan anisalsehid-asam sulfat, dipanaskan lempeng pada suhu 100°C selama 5-10 menit (Depkes 2008). Bila dengan pereaksi memberikan noda berwarna biru, violet, merah atau coklat pada sinar tampak maka positif mengandung minyak atsiri, beberapa senyawa berfluoresensi dibawah sinar UV 366 nm.

## 9. Sterilisasi alat

Alat-alat berupa gelas yang akan digunakan harus dalam keadaan steril. Alat dicuci dan dikeringkan dalam oven. Alat-alat yang telah kering dibungkus dengan kertas, kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoclaf dengan suhu 121°C selama 15-30 menit. Pengerjaan dilakukan secara aseptis di dalam Laminar *Air Flow Hood* (LAF) yang telah di sterilisasi dengan sinar UV selama 30 menit kemudian disemprot etanol 96% dan dilap (CCRC 2008).

## 10. Pembuatan reagen

**10.1. Pembuatan media stok DMEM dan media penumbuh sel HepG2.** Larutan DMEM dibuat dengan melarutkan DMEM ke dalam aquadest steril, kurang lebih 1 L, ditambah 2,0 gram NaHCO<sub>3</sub> dan 2,0 gram *hepes*. Larutan tersebut diaduk dengan *stirrer* sampai homogen, kemudian ditambahkan buffer dengan menggunakan HCL 1 N atau NaOH hingga pH 7,2-7,4 lalu diukur dengan menggunakan pH meter. Kemudian larutan disaring dengan menggunakan filter polietilensulfon steril 0,2 µm secara aseptis. Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan larutan DMEM steril dengan menggunakan FBS 10% dan penisilin-streptomisin 1% dan fungison 0,5% secara aseptis di dalam LAF (CCRC 2008).

**10.2. Pembuatan media stok (M199) dan media penumbuh sel vero.** Sebanyak 9,5 gram media M199, 2,5 gram NaHCO<sub>3</sub> 2 gram *hepes* di masukkan ke dalam beaker glass 1 L. Ditambahkan 950 ml *aquadestilata* lalu diaduk dengan menggunakan *stirrer* hingga homogen. Ditambahkan larutan dapar NaOH 1 M atau HCl 1 M ) hingga pH larutan mencapai 7,2-7,4. Ditambahkan *aquadestilata* kembali hingga mencapai volume 1 L kemudian disterilkan dengan penyaring filter polietilen sulfon 0,22 µm ke dalam botol steril (di dalam LAF), media M-199 untuk membuat medium tumbuhnya ditambah dengan FBS 10%, penisilin

streptomycin 2% dan fungison 0,5%. Disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C dan diberi penanda (CCRC 2008).

**10.3. Pembuatan larutan uji.** Sebanyak 10 mg ekstrak, fraksi etil-asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi air ditimbang, kemudian dilarutkan dengan 100 µl DMSO dalam *ependrof* dan disimpan sebagai larutan stok yang akan digunakan untuk pengujian. Larutan ini dijadikan larutan induk dengan konsentrasi 100.000 µg/ml Konsentrasi dibuat dalam berbagai macam seri konsentrasi yaitu, ekstrak rimpang jahe merah fraksi etil asetat, *n*-heksan dan air dengan seri konsentrasi 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml; 62,5 µg/ml; 31,2 µg/ml; 15,6 µg/mg; 7,8125 µg/ml dengan mengencerkan beberapa µl dari larutan induk Pembuatan larutan stok dan seri kadar larutan untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF (CCRC 2008).

## 11. Preparasi sampel

**11.1. Pengktifan sel.** Sel HepG2 yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan pada suhu 37°C, ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan dipindahkan ke dalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah 1 ml media pembunuh DMEM yang mengandung 10% FBS, resuspensi perlahan hingga homogen, sel ditumbuhkan dalam berbagai *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO<sub>2</sub>, setelah 24 jam media diganti dan sel ditumbuhkan kembali hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian (CCRC 2009)

**11.2. Panen dan perhitungan sel.** Media dalam *tissue culture flask* dibuang kemudian dicuci dengan PBS (*phospat buffer saline*) sebanyak 2 kali, lalu ditambah dengan 2 ml tripsin secara merata. Diinkubasi selama 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Diamati pelepasan sel dari dasar flask dengan mikroskop. *Culture flask* dipindahkan kedalam LAF ditambah media kultur HepG2 sebanyak 2 ml untuk menghentikan kerja tripsin. Diambil 10 µl dan dipipet ke hemositometer, kemudian sel dihitung dibawah mikroskop *inverted*.

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung yaitu (A, B, C, D), setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Sel dihitung pada 4 kamar hemositometer, sel yang gelap (mati), sel yang berada di batas luar disebelah kiri dan pada bagian atas tidak ikut dihitung. Sel pada batas kanan dan bawah ikut dihitung. Dihitung jumlah sel per ml dengan rumus (CCRC 2009)

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

Dihitung volume pemanenan sel yang diperlukan (dalam ml) dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{volume pemanenan sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/ml}}$$

Diambil volume pemanenan sel, ditransfer pada konikel baru lalu ditambahkan medium sampai total volume yang diperlukan.

Jumlah suspensi sel yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan dihitung untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar  $40 \times 10^4$  sel / 100  $\mu\text{l}$ . Sel didistribusikan kedalam *microplate* 96 sumuran, lalu diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% (37°C) selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan ekstrak, fraksi etil asetat dan *n*-heksan dan fraksi air dari rimpang jahe merah. .

**11.3. Uji sitotoksik (pemberian ekstrak, fraksi dan MTT).** Sumuran – sumuran yang telah berisi suspensi sel ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  larutan uji masing-masing ekstrak, fraksi etil asetat, *n*-heksan dan air rimpang jahe merah yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi 500  $\mu\text{g/ml}$ ; 250  $\mu\text{g/ml}$ ; 125  $\mu\text{g/ml}$ ; 62,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 31,2  $\mu\text{g/ml}$ ; 15,6  $\mu\text{g/ml}$ ; 7,8125  $\mu\text{g/ml}$ . Doksorubisin sebagai kontrol positif dibuat dalam seri konsentrasi 2  $\mu\text{g/ml}$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,25 $\mu\text{g/ml}$ ; 0,125  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,0625  $\mu\text{g/ml}$ , 0,0325 $\mu\text{g/ml}$ . Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambah media pembunuh DMEM untuk sel HepG2 dan media penumbuh M-199 untuk sel vero. Sel tersebut diinkubasi dengan inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam. Akhir inkubasi medium masing-masing sumuran dibuang dengan cara plate atau dibalikan 180° C di atas tempat buangan kemudian plate ditekan yang

berfungsi untuk meniriskan sisa cairan, selanjutnya dicuci dengan PBS hingga tidak berwarna. Ditambahkan 100  $\mu$ l, MTT 0,3% dalam PBS. Mikroplate diinkubasi kembali selama 4 jam dengan inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37° C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazon berwarna ungu, untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazon maka ditambahkan dengan 100  $\mu$  SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* kemudian dibungkus menggunakan kertas alumunium foil kemudian diinkubasi selama semalam pada suhu kamar, Serapan dapat dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat Elisa *reader* dengan panjang gelombang 595 nm (CCRC 2013).

**11.4. Uji indeks selektivitas.** Sel vero dalam media M-199 sebanyak 100  $\mu$ l dimasukkan dalam 96 *well plate*, dilakukan pengulangan 3 kali replikasi dan diinkubasi selama 24 jam. Media dibuang lalu ditambahkan 100  $\mu$ l larutan sampel uji ekstrak dan fraksi etil asetat dan *n*-heksan rimpang jahe merah dengan 7 seri konsentrasi. Microplate diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C selama 24 jam. Akhir inkubasi senyawa uji dalam plate dibuang dan diganti dengan 100  $\mu$ l media kultur (M-199) mengandung MTT 1mg/ml dan diinkubasi dengan inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT ditandai dengan terbentuknya kristal formazon berwarna ungu. Reaksi MTT kemudian dihentikan dengan menambahkan reagen SDS (*Sodium Dodecyl Suldate*) 10% dalam 0,1% HCl sebanyak 100  $\mu$ l, *plate* dibungkus dengan menggunakan *alluminium foil* dan diinkubasi pada suhu kamar di tempat gelap selama semalam, setelah itu serapan dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* panjang gelombang 595 nm.

## E. Analisis Data

### 1. Uji sitotoksitas

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi kedalam persen sel hidup dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{(\text{abs perlakuan} - \text{abs kontrol media})}{\text{abs kontrol sel} - \text{abs kontrol media}} \times 100 \%$$

Dilanjutkan untuk menentukan regresi linier antara log konsentrasi sampel uji (ekstrak , fraksi etil asetat dan n-heksan rimpang jahe merah) versus persen sel hidup dengan menggunakan microsoft Excel 2010. Didapatkan persamaan berikut :

$$Y = bx + a$$

Keterangan :

x = Log konsentrasi sampel uji

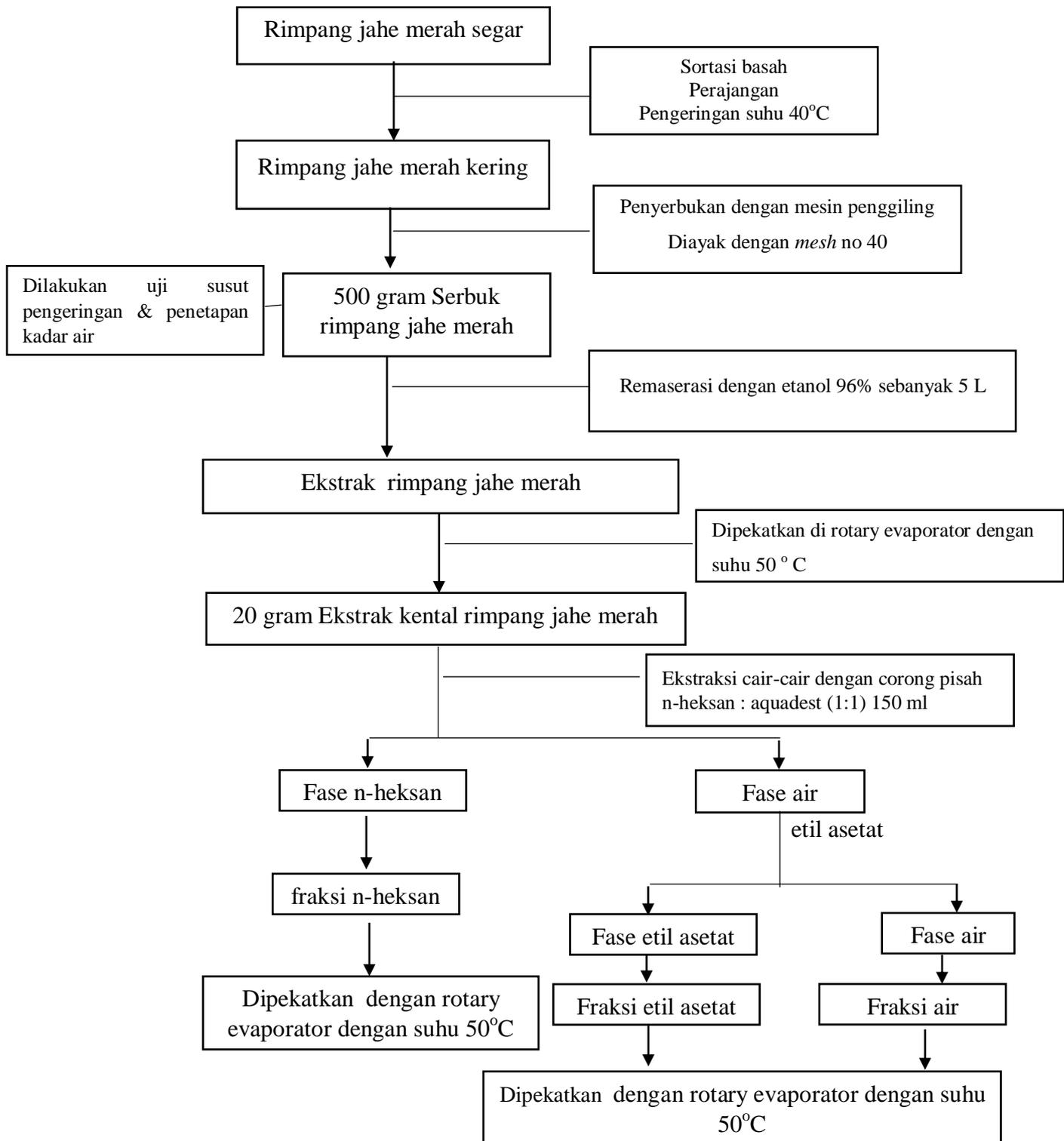
b= persen viabilitas sel.

Hasil antilog x dari persamaan merupakan nilai  $IC_{50}$ .

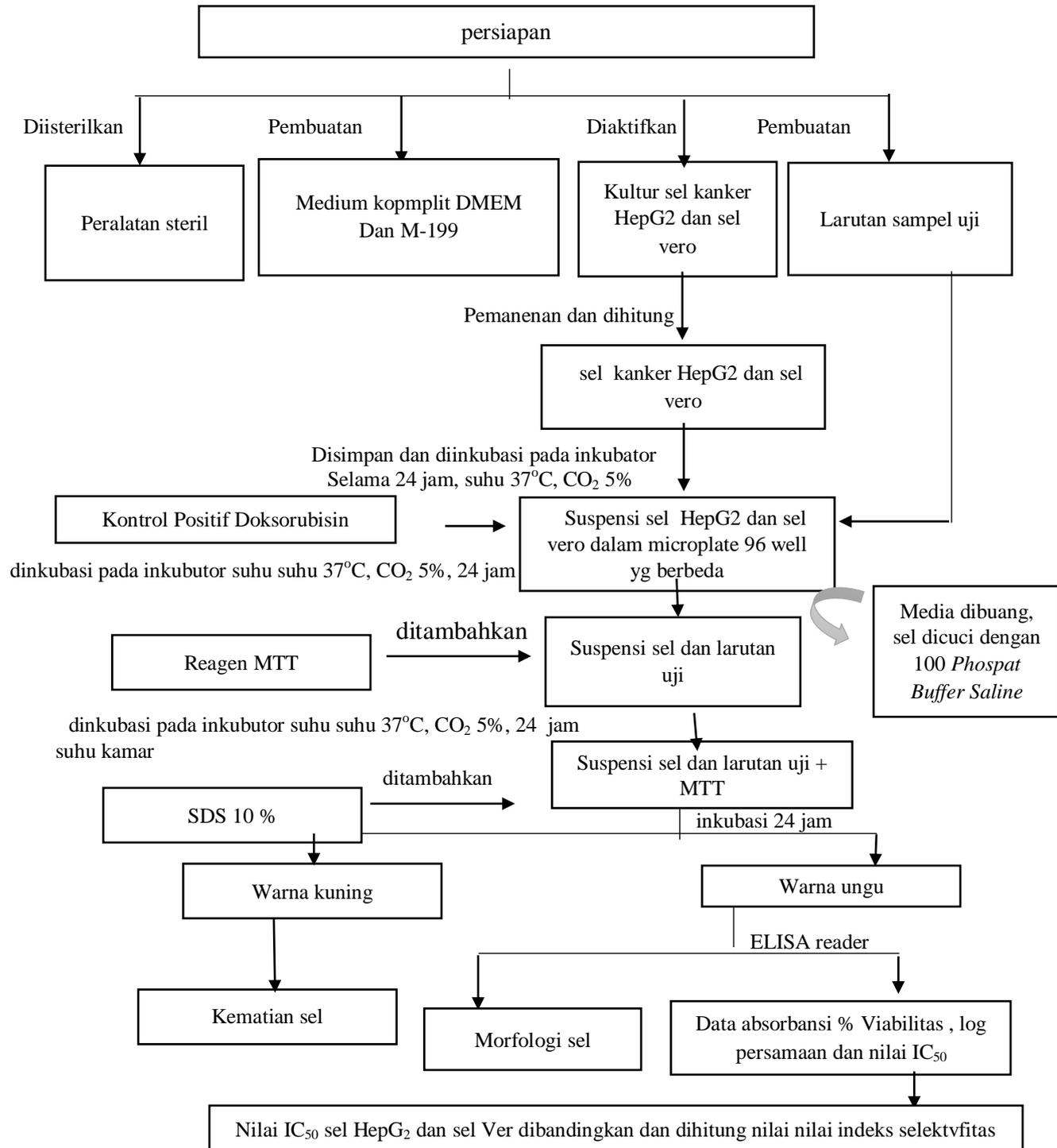
## 2. Indeks selektivitas

Indeks selektivitas dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ sel vero}}{IC_{50} \text{ sel kanker}}$$



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air dari rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Var. Rubrum)



**Gambar 3. Skema uji sitotoksik ekstrak . fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Var. *Rubrum*)**