

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc.)

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah identifikasi rimpang jahe merah yang dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta. Tujuan dilakukan determinasi adalah untuk mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman yang diteliti, mengetahui kebenaran sampel yang digunakan, menghindari kesalahan pada saat pengumpulan bahan, serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Hasil identifikasi berdasarkan nomor 226/UN27.9.6.4/lab/2018 dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc.) Hasil determinasi rimpang jahe merah dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengumpulan, pengeringan, pengayakan dan pembuatan serbuk

Rimpang jahe merah yang digunakan dalam penelitian didapat dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan November 2018. Pengeringan menggunakan oven dengan suhu 40-50°C dimaksudkan menghindari tumbuhnya kapang, jamur dan khamir yang dapat menyebabkan pembusukan serta mencegah terjadinya perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu serta khasiat dari rimpang jahe merah. Pengayakan serbuk bertujuan untuk mempermudah proses ekstraksi karena semakin kecil ukuran serbuk maka akan semakin besar luas permukaan sehingga proses penyarian akan semakin efektif.

Hasil penimbangan berat basah rimpang jahe merah sebanyak 10.000 gram didapatkan berat kering rimpang jahe merah sebanyak 2400 gram, sehingga diperoleh presentase rendemen sebesar 24%.

Tabel 1. Hasil pengeringan serbuk rimpang jahe merah

Simplisia	Berat Basah (g)	Berat Kering (g)	Rendemen (%)
Rimpang jahe merah	10.000	2400	24

3. Penetapan susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah

Penetapan susut pengeringan dalam penelitian ini dilakukan pada serbuk rimpang jahe merah dilakukan dengan menggunakan *Moisture Balance*. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui hasil dari serbuk rimpang jahe merah diperoleh memenuhi persyaratan sesuai dengan standart yang telah ditetapkan dan memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Penetapan susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah diperoleh sebesar 9,56 %. Hal ini menunjukkan susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah memenuhi monografi jahe merah pada Farmakope Herbal Indonesia (FHI) yaitu tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 2008). Hasil susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah dapat dilihat pada tabel 2 dan perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 2. Hasil susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah

Berat awal (g)	Berat akhir (g)	Kadar susut pengeringan (%)
2,06	1,92	9,8
2,02	1,87	9,5
2,07	1,85	9,4
Rata-rata		9,56

4. Penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah

Penetapan kadar air rimpang jahe merah menggunakan alat *Sterling bidwell* dengan cairan pembawa toluen jenuh air. Penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah diperoleh rata-rata 8,64%. Penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah juga bertujuan untuk menjaga kualitas, khasiat dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga akan mempengaruhi stabilitas. Hasil penetapan kadar air yang diperoleh memenuhi syarat monografi jahe merah pada Farmakope Herbal Indonesia (FHI) yaitu kurang dari 11% (Depkes 2008). Kadar air kurang dari 11% dapat menghentikan reaksi enzimatik dan pertumbuhan jamur. Hasil penetapan kadar air dapat dilihat pada tabel 3 dan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah

Replikasi	Berat awal (g)	Volume air (ml)	Kadar (%)
1	20,051	1,8	8,97
2	20,032	1,7	8,48
3	20,042	1,7	8,48
Rata-rata			8,64

5. Pembuatan ekstrak etanol rimpang jahe merah

Metode yang digunakan dalam pembuatan ekstrak rimpang jahe merah menggunakan metode remaserasi. Serbuk rimpang jahe merah yang telah jadi ditimbang sebanyak 500 gram. Pelarut yang digunakan adalah pelarut etanol 96%. Pemilihan metode remaserasi dilakukan dengan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya. Keuntungan dari metode ini adalah cara pengerjaannya dan peralatan yang digunakan sederhana serta mudah digunakan. Sedangkan kerugiannya adalah membutuhkan larutan penyari yang lebih banyak (Gati *et al.* 2015)

Pemilihan eranol 96% merupakan pelarut yang bersifat universal artinya pelarut yang efektif dan netral karena kapang dan jamur sulit tumbuh. Hasil randemen pembuatan ekstrak etanol rimpang jahe merah dapat dilihat pada tabel 4 dan hasil perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 4. Hasil randemen ekstrak rimpang jahe merah

Berat simplisia (g)	Berat ekstrak (g)	Randemen (%)
500	56, 8486	11,36

Hasil randemen ekstrak rimpang jahe merah sebesar 11,36%, hal ini sudah sesuai persyaratan dimana syarat randemen dari ekstrak rimpang jahe merah tidak kurang dari 6,6% (Depkes 2008)

6. Pembuatan fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air rimpang jahe merah

Ekstrak etanol rimpang jahe yang didapat dari hasil remaserasi kemudian ditimbang sebanyak 10 gram lalu difraksinasi dengan menggunakan corong pisah atau dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Fraksinasi tersebut menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Prinsip metode fraksinasi berdasarkan pada perbedaan tingkat kepolaran dan perbedaan bobot jenis antara dua fraksi. Tujuan fraksinasi adalah untuk memisahkan senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar sedangkan senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar.

Pelarut *n*-heksan bersifat nonpolar yang dapat melarutkan senyawa seperti lemak, steroid, tirterpenoid dan karetonoid dan minyak atsiri (Depkes 1979). Pelarut etil asetat bersifat semi polar yang dapat melarutkan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan minyak atsiri (Artini *et al.* 2013) dan pelarut air bersifat polar dapat melarutkan alkaloid, tanin, saponin, gula, gom, pati, protein, enzim, zat warna dan asam organik. Data hasil randemen fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dapat dilihat pada tabel 5. Selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 5. Hasil randemen fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air rimpang jahe merah

Replikasi	Berat ekstrak (gram)	Berat fraksi (gram)		
		<i>n</i> -heksan	Etil asetat	Air
1	10,1121	1,1039	1,2659	1,0686
2	10,0295	0,7804	0,8099	0,7410
3	10,1090	0,8012	0,9114	0,6027
Total	30,2506	2,6855	2,9872	2,4123
	Rendemen (100%)	8,87	9,87	7,97

Perhitungan rendeman tiga fraksi menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Fraksi *n*-heksan memiliki rendemen sebesar 8,87%, fraksi etil asetat sebesar 9,97% dan fraksi air 7,97%. Fraksi etil asetat memiliki berat dan nilai rendemen terbesar. Hal ini kemungkinan bahwa senyawa yang tertarik dari ekstrak dalam pelarut etil asetat lebih banyak dibanding pelarut *n*-heksan dan air. Nilai rendemen terkecil dimiliki oleh pelarut air hal ini kemungkinan disebabkan karena sedikitnya senyawa polar yang tertarik dalam pelarut air. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4.

7. Hasil Identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak rimpang jahe merah

Identifikasi kandungan senyawa rimpang jahe merah dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak rimpang jahe merah dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak rimpang jahe merah

Kandungan kimia	Pustaka	Hasil		Keterangan
		Serbuk	Ekstrak	
Flavonoid	Warna merah/ kuning/ jingga pada lapisan amil alkohol (Harbone 1987)	Warna jingga pada lapisan amil	Warna merah	(+)
Alkaloid	Terjadi endapan putih kekuningan (reagen Mayer), endapan warna merah hingga jingga (reagen Dragendroff) (Harbone 1987)	Endapan putih kekuningan	Endapan putih kekuningan	(+)
Terpenoid	Terbentuk larutan warna jingga (Harbone 1987)	Warna jingga	Warna jingga	(+)
Tannin	Warna coklat kehitaman atau biru kehitaman (Harbone 1987)	Warna biru kehitaman	Warna biru kehitaman	(+)

Berdasarkan hasil identifikasi yang telah dilakukan menunjukkan serbuk dan ekstrak rimpang jahe merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, terpenoid dan tanin. Identifikasi kandungan senyawa serbuk dan ekstrak etanol rimpang jahe merah dilakukan dengan melihat adanya perubahan warna atau adanya endapan yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa di dalam ekstrak maupun serbuk. Identifikasi dilakukan dengan menambahkan serbuk maupun ekstrak dengan pereaksi yang sesuai dan diamati perubahannya. Hasil identifikasi golongan senyawa dapat dilihat pada lampiran 7.

8. Hasil identifikasi fraksi teraktif dengan metode kromatografi lapis tipis

Identifikasi golongan senyawa dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dimaksudkan untuk mengetahui komponen kimia fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan dari ekstrak rimpang jahe merah yang berpotensi sebagai antikanker. Pengujian KLT dilakukan untuk memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan kecepatan migrasi komponen atau senyawa yang dibawa oleh fase gerak lalu ditahan oleh fase diam. Fase diam yang digunakan

adalah silika gel GF₂₅₄. Identifikasi senyawa tersebut dilakukan menggunakan fase gerak sesuai dengan senyawa yang diuji. Deteksi penampak bercak menggunakan sinar UV 254 dan UV 366 nm. Penyemprot yang digunakan adalah pereaksi Sitroborat, Dragendroff, FeCl₃, Libermann-Burchard. Hasil identifikasi KLT dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel	Pengujian	Rf baku	Rf	Hasil			Ket
				UV 254 nm	UV 366 nm	Sinar tampak	
Fraksi etil asetat	Flavonoid	0,98	0,96	Hitam	Berfluoresensi kuning	Uap ammonia & sitroborat : kekuningan	(+)
	Alkaloid	0,78	0,76	peredaman	Berfluoresensi biru	Dragendrof : Kuning kecoklatan	(+)
	Tanin	0,96	0,94	Hitam	Berfluoresensi biru kehitaman	FeCl ₃ : Hitam	(+)
	Minyak atsiri	0,96	0,86	Kuning	Berfluoresensi kuning	Anisaldehyd asam sulfat : kuning	(-)
	Terpenoid	-	0,96	Hitam	Berfluoresensi kuning	Liberman Burchard : Kuning	(-)
Fraksi <i>n</i> -heksan	Flavonoid	0,70	0,80	Biru	Berfluoresensi biru	Uap amonia & Siroborat (-)	(-)
	Alkaloid	0,82	-	-	-	-	(-)
	Tanin	0,96	0,78	Kecoklatan	Berfluoresensi kuning	FeCl ₃ : Hitam	(-)
	Minyak atsiri	0,92	0,92	Biru	Berfluoresensi biru	Anisaldehyd asam sulfat : biru	(+)
	Terpenoid	-	0,94	Hitam	Berfluoresensi biru keunguan	Liberman Burchard : biru	(+)

Keterangan : (+) = ada kandungan golongan senyawa tersebut
 (-) = tidak ada kandungan golongan senyawa tersebut

Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) golongan senyawa flavonoid dengan standar baku kuersetin sebagai baku pembanding. Hasil positif flavonoid bila dengan penampakan noda uap amoniak UV 254 nm memberikan peredaman dan UV 366 dengan warna ungu gelap, berfluoresensi biru, kuning serta pada sinar tampak berwarna kuning (Zicronia *et al* 2015). Fraksi etil asetat

dideteksi dideteksi dalam sinar UV 254 nm hitam pada sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi kuning dan pada sinar tampak menunjukkan adanya bercak kekuningan. Nilai R_f pada sampel fraksi etil asetat sebesar 0,96 sedangkan pada standar baku senyawa kuersetin sebesar 0,98. Deteksi bercak dikarenakan karena adanya peraksi sitroborat yang menyebabkan bercak berwarna kuning Deteksi pada fraksi *n*-heksan dalam sinar UV 254 nm menunjukkan peredaman pada sinar UV 366 menunjukkan fluoresensi biru. Nilai R_f pada fraksi *n*-heksan sebesar 0,8. Sedangkan pada standar baku senyawa kuarsetin untuk fraksi *n*-heksan sebesar 0,7, namun tidak menunjukkan adanya penampak bercak ketika disemprot dengan pereaksi sittroborat. Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa hasil identifikasi fraksi etil asetat positif mengandung golongan senyawa flavonoid dan pada fraksi *n*-heksan tidak menunjukkan adanya flavonoid. Hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid dapat dilihat pada lampiran 8 dan 9.

Pengujian identifikasi Kromatografi Lapis Tipis yang kedua pada golongan senyawa alkaloid dengan menggunakan piperin sebagai baku pembanding. Hasil positif bila dideteksi pada sinar UV 254 nm peredaman, pada sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi hitam atau biru dan pada sinar tampak menunjukkan adanya bercak kekuningan (Harbone 1996). Fraksi etil asetat dideteksi dengan menggunakan sinar UV 254 nm menunjukkan peredaman pada sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi warna biru sedangkan pada sinar tampak menunjukkan warna kuning. Fraksi *n*-heksan tidak menunjukkan penampakan bercak kuning. Nilai R_f pada fraksi etil asetat sebesar 0,76 sedangkan pada baku standarnya sebesar 0,78, hal ini juga dapat ditunjukkan dengan adanya pereaksi semprot Dragendrof yang dapat memberikan berwarna bercak kuning sedangkan pada baku *n*-heksan sebesar 0,82 tidak memberikan bercak kuning walaupun telah disemprot dengan pereaksi Dragendrof. Hasil tersebut disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa alkaloid sedangkan pada fraksi *n*-heksan diduga tidak mengandung senyawa tersebut, hal ini dibuktikan dengan tidak adanya senyawa yang terelusi. Hasil identifikasi golongan senyawa alkaloid dapat dilihat pada lampiran 8 dan 9.

Pengujian ketiga identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terhadap golongan senyawa tanin dengan menggunakan baku standar asam galat sebagai baku pembanding. Hasil positif tanin bila dideteksi pada sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Lestari 2013). Fraksi etil asetat dideteksi dengan menggunakan sinar UV 254 nm berwarna hitam, pada sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi warna biru dan pada sinar tampak menunjukkan warna hitam. Nilai R_f pada fraksi etil asetat sebesar 0,94 dengan baku standarnya sebesar 0,96, hal ini juga dibuktikan dengan adanya reaksi penyemprot dengan menggunakan $FeCl_3$ yang dapat menimbulkan bercak berwarna biru kehitaman. Fraksi *n*-heksan dideteksi dengan menggunakan sinar UV 254 nm nampak coklat sedangkan pada sinar UV 366 nm nampak berfluoresensi kuning dan sinar tampak berwarna hitam. Nilai R_f pada *n*-heksan sebesar 0,78 dengan baku standarnya sebesar 0,9, namun saat diberikan reaksi penyemprot tidak menimbulkan bercak berwarna biru kehitaman. Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa tanin sedangkan fraksi *n*-heksan diduga tidak terdapat senyawa tanin. Hasil identifikasi golongan senyawa tanin dapat dilihat pada lampiran 8 dan 9.

Pengujian selanjutnya identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada golongan senyawa minyak atsiri dengan menggunakan baku standar sinamaldehyd sebagai baku pembanding. Hasil positif minyak atsiri bila disemprot pereaksi anisaldehyd memberikan noda berwarna biru, violet, merah atau coklat pada sinar tampak dan beberapa senyawa berfluoresensi dibawah sinar UV 366 nm. Fraksi etil asetat dideteksi menggunakan sinar UV 254 nm berwarna kuning, pada sinar UV 366 nm menunjukkan fluoresensi warna kuning pada sinar tampak menunjukkan warna kuning meskipun telah disemprot dengan pereaksi anisaldehyd asam sulfat. Nilai R_f pada fraksi etil asetat sebesar 0,96 dengan baku standarnya sebesar 0,86. Fraksi *n*-heksan dideteksi dengan menggunakan sinar UV 254 nm berwarna biru pada sinar UV 366 fluoresensi berwarna biru dan pada sinar tampak juga berwarna biru. Nilai R_f pada fraksi *n*-heksan sebesar 0,92 dengan baku standarnya sebesar 0,92, hal ini dibuktikan pula dengan pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat yang memberikan bercak berwarna biru. Hasil tersebut

dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat diduga tidak terdapat kandungan senyawa minyak atsiri dan fraksi *n*-heksan positif mengandung golongan senyawa minyak atsiri. Hasil identifikasi golongan senyawa tanin dapat dilihat pada lampiran 8 dan 9.

Pengujian kedua identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terhadap senyawa terpenoid dengan standar baku stigmasterol sebagai baku pembandingan. Hasil positif bila diamati sinar UV 366 terdapat fluoresensi hijau atau warna merah ungu atau biru (Harbone 1996). Fraksi etil asetat dideteksi dengan sinar UV 254 nm nampak berwarna kuning sedangkan pada sinar UV 366 menunjukkan fluoresensi hitam dan pada sinar tampak tidak terlihat meskipun disemprot dengan menggunakan pereaksi Liberman Bauchard. Pada fraksi *n*-heksan dideteksi dengan sinar UV 254 nm nampak berwarna hitam dan pada sinar UV 366 nm nampak berwarna biru keunguan sedangkan pada penampak visual terlihat bercak warna biru setelah disemprot dengan menggunakan pereaksi Liberman Bauchard. Nilai *R_f* pada sampel pada fraksi etil asetat sebesar 0,96 dan pada fraksi *n*-heksan pada bercak sebesar 0,94. Nilai *R_f* pada standar baku senyawa stigmasterol pada fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan tidak terelusi hal ini disebabkan karena baku yang digunakan kurang baik sehingga tidak terelusi dengan baik. Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat diduga tidak mengandung senyawa terpenoid dan fraksi *n*-heksan positif mengandung terpenoid dibuktikan dengan reaksi penyemprot Liberman Burchard dengan memberikan bercak warna biru. Hasil identifikasi golongan senyawa terpenoid dapat dilihat pada lampiran 8 dan 9.

Hasil identifikasi kandungan fraksi teraktif dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, tanin dan alkaloid, sedangkan pada fraksi *n*-heksan mengandung senyawa terpenoid dan minyak atsiri.

9. Uji sitotoksik

Pengujian sitotoksik terhadap sel kanker hati HepG2 dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada pada

bulan Mei 2019. Sel kanker hati yang digunakan berupa kultur sel kanker hati HepG2. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik seperti bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker. Parameter yang digunakan adalah nilai IC_{50} yang menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa terhadap sel (Haryoto *et al* 2013).

Uji sitotoksik dimulai dengan menumbuhkan kultur sel HepG2 dalam medium DMEM dan diinkubasi dalam inkubator CO_2 pada suhu $37^{\circ}C$ dengan aliran CO_2 5 ml/menit, suhu yang digunakan merupakan suhu normal pada tubuh manusia dan dengan 5% CO_2 juga sesuai dengan CO_2 yang diperlukan untuk sel agar dapat mengubah makanan dari medium menjadi energi sehingga sel dapat memperbanyak diri. Media DMEM mengandung serum FBS 10% yang berfungsi untuk meningkatkan pertumbuhan sel line yang akan ditumbuhkan sehingga sel yang dikultur dengan penambahan FBS akan mengalami proliferasi sel yang cepat dan dengan waktu inkubasi pula akan didapat jumlah sel tertentu pada saat dipanen. Media DMEM juga mengandung streptomisin yang berfungsi untuk menghindari adanya kontaminasi bakteri atau jamur yang dapat tumbuh pada medium sehingga yang tumbuh hanyalah sel yang diinginkan (Anisa & Yuni 2006). Sebelum dilakukan perlakuan, dilakukan persiapan terhadap kultur sel. Sel HepG2 ditumbuhkan hingga konfluen dalam medium DMEM. Jumlah sel yang telah konfluen akan terlihat menempel di dasar *flask*. Media kultur sel dibuang untuk memudahkan pemanenan dan perhitungan sel. Morfologi sel HepG2 akan terlihat berbentuk lonjong dengan inti sel yang nampak jelas.



Gambar 4. Profil morfologi sel kanker hati HepG2 normal dilihat dibawah mikroskop perbesaran 40x

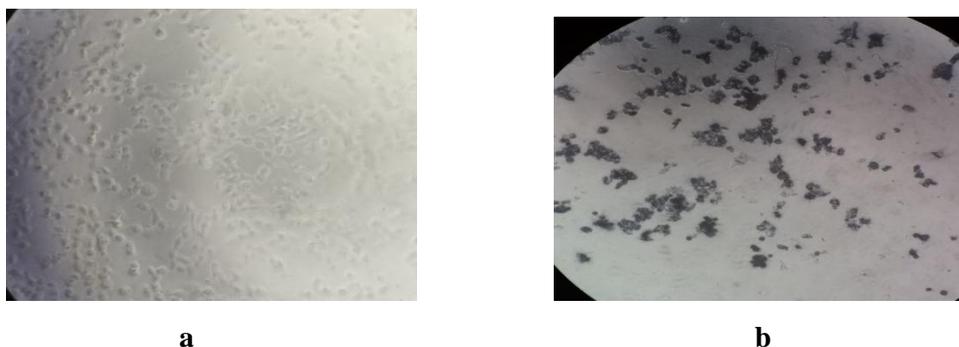
Sel yang telah dipanen kemudian dilakukan perhitungan sel dengan *hemocytometer* dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sesuai dengan kebutuhan. Pada penelitian ini jumlah sel kanker hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur adalah 116×10^4 sel /1000 μ l. Kemudian dilakukan pengenceran suspensi untuk mendapatkan konsentrasi sel kanker hati HepG2 untuk 96 sumuran dimana tiap sumuran tersebut sebanyak 100 μ / sumuran. Jumlah sel tersebut diharapkan agar sel dapat bertahan hidup melewati siklus hidupnya dengan baik dalam waktu inkubasi 24 jam yang berfungsi untuk mencegah berkurangnya ketersediaan nutrisi yang dikonsumsi oleh sel. Medium DMEM akan berfungsi maksimal dalam mengkultur sel HepG2 selama 24 jam.

Sebanyak 10 mg ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari rimpang jahe merah dilarutkan dengan DMSO 100 μ l dalam ependrof. Larutan DMSO berfungsi sebagai *buffer* agar ekstrak dapat larut dengan baik karena DMSO dapat melarutkan senyawa polar atau non polar dan tidak bersifat toksik. Selanjutnya ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dibuat seri konsentrasi 500 μ g/ml; 250 μ g/ml; 125 μ g/ml; 62,5 μ g/ml; 31,2 μ g/ml; 15,6 μ g/ml; 7,8125 μ g/ml. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui signifikan peningkatan konsentrasi dengan efek proliferasi sel yang dihasilkan. Perlakuan uji digunakan kontrol positif doksorubisin dengan seri konsentrasi 2 μ g/ml; 1 μ g/ml; 0,5 μ g/ml; 0,25 μ g/ml; 0,125 μ g/ml; 0,0625 μ g/ml; 0,3125 μ g/ml kontrol negatif berupa kontrol sel dan kontrol media DMEM untuk sel HepG2 dan media M199 untuk sel vero.

Penelitian uji sitotoksik terhadap sel HepG2 dilakukan dengan menggunakan metode MTT essay. Sel yang telah diberi MTT diinkubasi selama 2-4 jam dalam inkubator hingga terbentuk garam formazon. Setelah garam formazon terbentuk ditambahkan dengan SDS 10% dalam 0,1 N HCl, penambahan SDS ini berfungsi sebagai reagen stoper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ungu yang kemudian diinkubasi semalam ditempat gelap pada suhu ruang dan akan diukur absorbansinya menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Metode MTT essay merupakan

metode yang dapat digunakan untuk mengukur proliferasi dan sitotoksik terhadap sel. Ujinya cukup cepat, sensitif, dan akurat.

Prinsip metode ini dengan perhitungan sel setelah pewarnaan. Uji ini berdasarkan kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam tertazolium atau MTT(3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromid) yang berwarna kuning dan larut menjadi kristal formazon yang berwarna biru-ungu dan tidak larut. Reduksi garam tetrazolium terjadi di intrasel dan melibatkan enzim di retikulum endoplasma dan mitokondria (Siregar dan Hadijono 2000). Pada konsentrasi tertinggi ekstrak, fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat menunjukkan warna kuning. Hal ini mengindikasikan tidak adanya sel kanker yang hidup pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$. Namun konsentrasi selanjutnya yang lebih rendah menunjukkan peningkatan intensitas warna ungu. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi *n*-heksan dan fraksi etil asetat rimpang jahe merah tidak mempunyai potensi dalam penghambatan sel kanker HepG2. Pada kelompok fraksi air tidak menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker hati HepG2, dimana pada kelompok perlakuan fraksi air tidak menunjukkan perubahan warna kuning (adanya hambatan pertumbuhan sel).

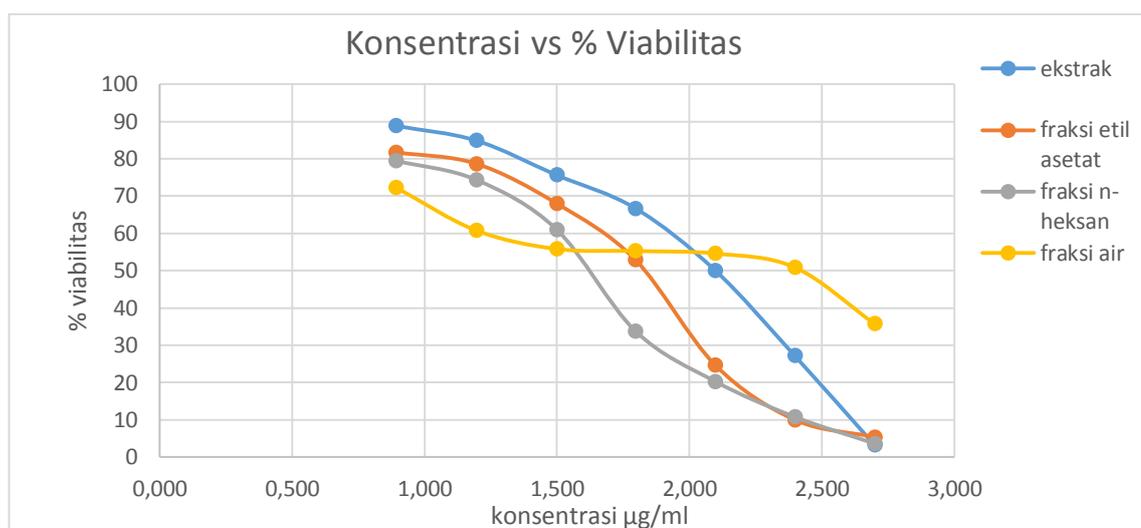


Gambar 5. a). Profil morfologi sel kanker HepG2 normal sebelum pemberian MTT, b) Profil morfologi sel kanker HepG2 setelah pemberian MTT

Kristal formazon ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan *Elisa Reader*. Serapan yang dihasilkan sebanding dengan jumlah sel hidup. Analisa hasil dibuat dalam bentuk grafik % viabilitas sel dengan konsentrasi ekstrak jahe merah, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi air. Perhitungan terhadap kematian sel dilakukan untuk

menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing perlakuan. IC_{50} merupakan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi sel.

Berdasarkan hasil uji sitotoksik yang telah dilakukan bahwa persentasi viabilitas sel menunjukkan persentasi kehidupan sel setelah dilakukan perlakuan. Persentasi viabilitas dihitung berdasarkan grafik hubungan antara log konsentrasi dengan % viabilitas. Grafik dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Grafik hasil interpretasi log konsentrasi dengan %viabilitas sel kanker HepG2

Berdasarkan grafik tersebut, aktivitas ekstrak jahe merah menunjukkan terjadinya penurunan persentasi kehidupan sel kanker pada konsentrasi (500; 250; 125) µg/ml, pada fraksi n-etil asetat juga menunjukkan terjadinya penurunan persentasi kehidupan sel pada konsentrasi (500; 250; 125;) µg/ml begitu juga dengan fraksi *n*-heksan yang menunjukkan terjadinya penurunan persentasi kehidupan sel yaitu pada konsentrasi (500; 250; 125; 62;5;) µg/ml. Hal ini menunjukkan adanya kemampuan dari senyawa yang terkandung dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan yang berperan dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker. Penghambatan proliferasi sel tersebut dimungkinkan sel mati baik karena apoptosis sel yang berarti menyebabkan kematian sel semakin banyak serta menyebabkan antiproliferasi yang menyebabkan pertumbuhan sel kanker tidak bisa dilakukan dan bisa terhenti. Pada grafik kelompok perlakuan air tidak terlihat adanya penurunan yang menunjukkan bahwa fraksi air kurang efektif

dalam penghambatan sel kanker. Persentasi kehidupan sel untuk setiap perlakuan secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 13.

Penentuan nilai IC_{50} pada penelitian ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat beserta fraksi air dilakukan dengan regresi linier pada 7 titik konsentrasi yaitu 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 $\mu\text{g/ml}$, sehingga didapatkan persamaan regresi linier sebagai berikut:

Tabel 8. Hasil persamaan regresi linier dan nilai IC_{50} pada ekstrak, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air.

Sampel	Persamaan	Nilai r	Nilai IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
Ekstrak	Y = -47,185x+141,43 50 = -47,185x+ 141,43 X = 1,938	0,9321	86,635 $\mu\text{g/ml}$,
Fraksi <i>n</i> -heksan	Y = -46,912x +124,77 50 = -46,912x +124,77 X = 1,594	0,9652	39,250 $\mu\text{g/ml}$
Fraksi etil asetat	Y = -48,620x + 133,28 50 = -48,620x + 133,28 X = 1,713	0,9548	51,627 $\mu\text{g/ml}$
Fraksi air	Y = -15,498x+82,896 50 = -15,498x +82,896 X = 2,120	0,8466	132,62 $\mu\text{g/ml}$

Berdasarkan hasil diatas nilai r merupakan koefisien kolerasi yang menunjukkan linearitas atau tidaknya data absorbansi. Nilai koefisien r sebesar 0,61-0,80 tergolong interpretasi cukup sehingga data diatas ($r= 0,9321$; $0,9548$; $0,9652$ dan $0,8466$) terintrepretasi cukup adanya hubungan variasi konsentrasi sampel uji dengan % viabilitas sel (Schelfler 1987).

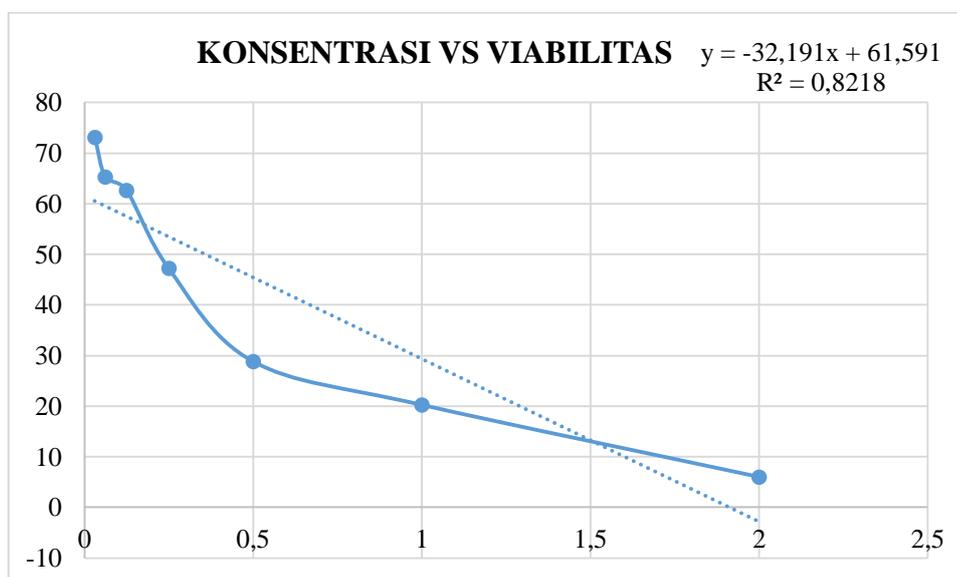
Berdasarkan uji sitototoksik diatas hasil ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan memiliki nilai moderate aktif karena nilai IC_{50} lebih dari $30\mu\text{g/ml}$ dan kurang dari $100 \mu\text{g/ml}$. Suatu senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik moderat dapat dimanfaatkan sebagai agen komprevensi yaitu yang mampu mencegah dan menghambat pertumbuhan dari sel kanker. Menurut National Cancer Institute (NCI) suatu ekstrak yang dinyatakan aktif memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki rentan nilai $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ dikatakan sitotoksik potensial, jika moderate aktif apabila memiliki nilai $IC_{50} 30 \geq \mu\text{g/ml}$ dan nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ dan dikatakan tidak aktif apabila nilai $IC_{50} >100 \mu\text{g/ml}$. Sedangkan pada fraksi air didapatkan nilai IC_{50} sebesar $132,62 \mu\text{g/ml}$ hal ini menandakan

bahwa pada kelompok fraksi air tidak menunjukkan aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker hati HepG2.

Doxorubisin sebagai kontrol positif mempunyai IC_{50} jauh lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi air, hal tersebut dikarenakan doxorubisin merupakan obat kanker yang telah teruji aktivitasnya (Nurul *et al.* 2017). Nilai IC_{50} adalah sebesar 2,29 $\mu\text{g/ml}$. Perhitungan nilai IC_{50} pada doxorubisin dilakukan dengan menggunakan 7 titik seri konsentrasi yaitu 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 $\mu\text{g/ml}$; 0,03125 $\mu\text{g/ml}$. Sehingga akan didapatkan persamaan regresi linier dan nilai IC_{50} sebagai berikut :

Tabel 9. Hasil persamaan regresi linier dan nilai IC_{50} pada kontrol positif doxorubisin

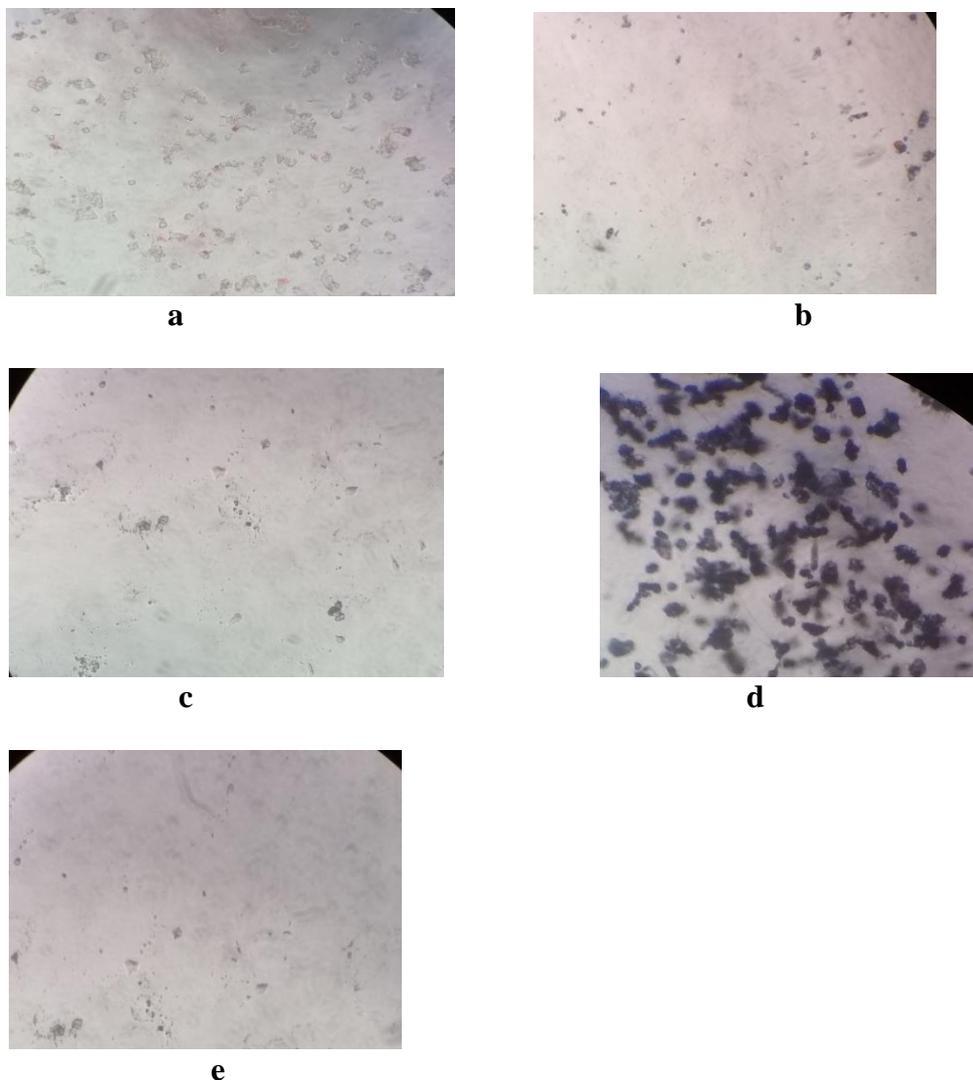
Sampel	Persamaan	Nilai r	Nilai IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
Doksorubisin	$Y = -32,191x + 61,591$ $50 = -32,191x + 61,591$ $X = 0,360$	0,8218	2,29 $\mu\text{g/ml}$,



Gambar 7. Grafik hasil Interpretasi log konsentrasi dengan % viabilitas sel kanker terhadap kontrol positif doxorubisin

Konsentrasi kontrol positif dan bahan uji ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan terhadap presentasi sel hidup kanker hati HepG2 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin sedikit sel kanker hati HepG2 yang hidup. Berdasarkan data yang diperoleh ekstrak tidak cukup kuat

menunjukkan aktivitas sitotoksik, hal ini kemungkinan disebabkan karena dalam ekstrak yang tersebut masih terdapat beragam senyawa baik yang bersifat polar, semi polar maupun nonpolar sehingga efek toksiknya saling mempengaruhi (Ismiyati *et al* 2015). Fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat dikarenakan fraksi-fraksi tersebut telah mengalami pemisahan senyawa yang berada dalam ekstrak. Pada fraksi air Tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik, hal ini dibuktikan dengan adanya kepadatan sel yang masih banyak.



Gambar 8. a) Profil morfologi sel kanker hati HepG2 setelah pemberian ekstrak, b) setelah pemberian fraksi etil asetat, c) setelah pemberian fraksi *n*-heksan, d) setelah pemberian fraksi air, e) setelah pemberian doxorubisin

Pada gambar diatas menunjukkan gambaran morfologi penyebaran dari sel kanker hati HepG2 setelah diberikan perlakuan dan konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, fraksi air yang berbeda-beda serta doksorubisin sebagai kontrol positif. Kelompok perlakuan menggunakan ekstrak pada konsentrasi 500 µg/ml menunjukkan kemampuan dan penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker. Kelompok fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan juga terlihat adanya penghambatan pertumbuhan sel kanker namun jumlah kepadatannya sel tidak terlalu banyak dibandingkan dengan kepadatan pada perlakuan ekstrak. Aktivitas sitotoksik ini dibuktikan juga dengan adanya perubahan ciri morfologi sel yaitu sel mengkerut dan kepadatan sel tidak terlalu banyak dan sel tidak beraturan dalam ukuran bila dilihat dengan pengamatan mikroskop inverted.

Kelompok fraksi air tidak menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan sel kanker, hal ini dimungkinkan karena sebagian besar senyawa aktif yang berperan sebagai agen sitotoksik seperti flavonoid dan tanin telah ditarik pada proses fraksinasi oleh pelarut etil asetat yang memiliki kemampuan semipolar (Meiyanto 2008), sehingga kandungan senyawa yang terdapat pada fraksi air yang diperoleh lebih sedikit dan menyebabkan sulit menghambat sel kanker. Selain itu karakteristik dan jenis kanker yang digunakan juga dapat mempengaruhi aktivitas senyawa terhadap sel kanker, senyawa yang bersifat sangat polar akan sulit menembus membran sel kanker yang bersifat nonpolar, sehingga aktivitas sel kanker akan sulit dihambat (Suci 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Maya Fadlilah (2013) menunjukkan bahwa kandungan senyawa yang terdapat pada rimpang jahe merah hasil dari fraksinasi dengan menggunakan pelarut etil asetat, n-heksan dan metanol dengan pengujian secara *in vitro* pada aktivitas sitotoksik sel HeLa, diindikasikan mengandung senyawa terpenoid pada ekstrak dan fraksi n-heksan, fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid dan fraksi metanol mengandung alkaloid. Pengujian kualitatif dengan menggunakan KLT pada fraksi n-heksan mengandung senyawa terpenoid dan pada fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin. Pengujian sitotoksik dalam fraksi tersebut dengan melihat nilai IC_{50} pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat mempunyai nilai IC_{50}

yang lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi metanol, Hal ini menunjukkan bahwa keberbedaan senyawa aktif yang mempunyai efek sitotoksik adalah pada fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan.

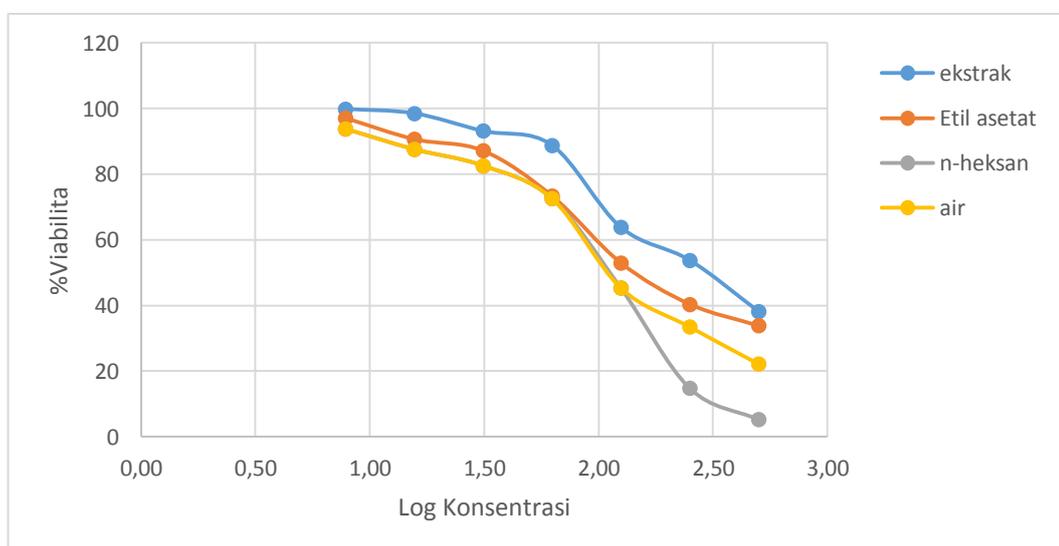
Nilai IC_{50} fraksi *n*-heksan rimpang jahe merah yang kecil yang terkandung dalam fraksi tersebut poten dalam membunuh sel kanker HepG2, berdasarkan hasil identifikasi kandungan senyawa kimia dengan menggunakan KLT pada fraksi *n*-heksan diduga positif terhadap senyawa terpenoid dan minyak atsiri. Menurut Endah *et al.* 2015, senyawa terpenoid dapat memblok siklus sel pada fase G_2/M dengan menstabilkan benang-benang spindel pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat. Senyawa terpenoid juga mampu menghambat enzim pada sel mamalia. Ada dua kelas enzim topoisomerase pada sel mamalia, tipe I yang memotong dan memecah untai tunggal dari DNA dan tipe II yang memotong dan memecah untai ganda. Inhibitor enzim topoisomerase akan menstabilkan kompleks topoisomerase dan DNA terpotong, sehingga dapat menyebabkan kerusakan DNA. Adanya kerusakan DNA dapat menyebabkan terekspresinya protein proapoptosis sehingga dapat memacu terjadinya apoptosis. Terpenoid banyak dihasilkan tumbuhan sebagai metabolit sekunder pada getah dan vakoula selnya. Contoh senyawa terpenoid adalah steroid, karoten serta penyusun banyak minyak atsiri misalnya eugenol. Zat-zat terpenoid juga dapat membantu proses pemulihan sel-sel tubuh (Fadlilah 2013).

Kelompok fraksi etil asetat berdasarkan hasil uji sitotoksik juga memberikan efek sitotoksik terhadap sel kanker hati HepG2. Senyawa yang dapat menarik berupa senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin. Senyawa flavonoid dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker. Mekanisme ini diperantarai penurunan enzim xantin oksidase siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX) yang diperlukan dalam proses prooksidasi sehingga dapat menunda siklus sel. Flavonoid juga berperan sebagai induksi apoptosis dengan menghambat enzim topoisomerase sehingga akan menstabilkan kompleks topoisomerase dan menyebabkan DNA terpotong dan mengalami kerusakan. Kerusakan DNA dapat menyebabkan terekspresi protein proapoptosis seperti Bax dan Bak dan menurunkan ekspresi antiapoptosis

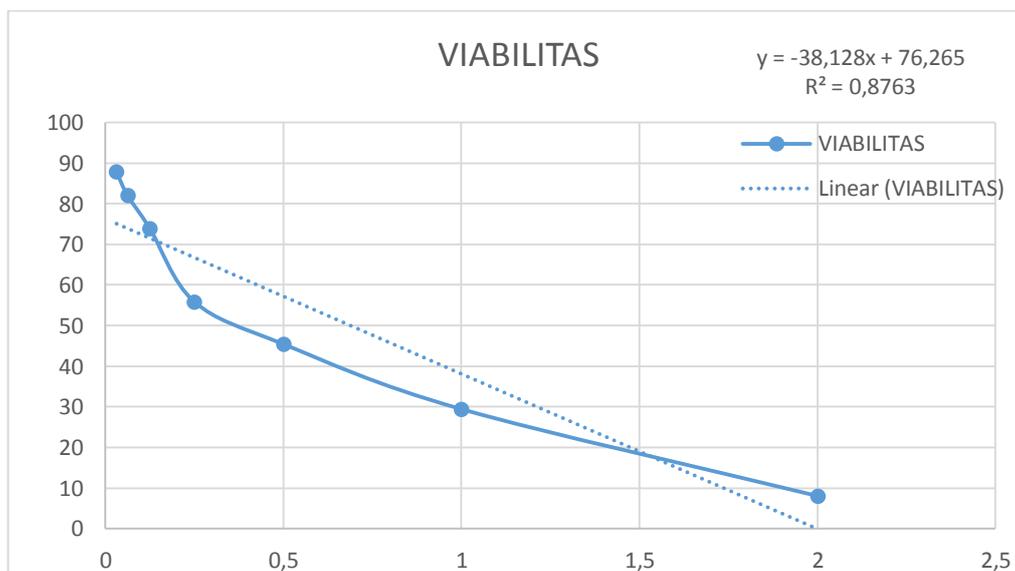
seperti Bcl₂ dan Bclx sehingga pertumbuhan kanker menjadi terhambat. Mekanisme kerja alkaloid adalah dengan mengikat tubulin dan menghambat pembentukan komponen mikrotubulin pada kumparan mitosis sehingga mertafase berhenti (Endah *et al.* 2015). Mekanisme kerja tanin dengan melalui pengaktifan jalur apoptosis sel kanker yaitu dengan menghibisi aktifitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke inti sel sehingga keganasan dari sel kanker menjadi terhambat (Meiyanto *et al* 2008).

10. Uji indeks selektivitas ekstrak, fraksi etil aseta, fraksi n-heksan, fraksi air rim pang jahe merah dan doxorubisin terhadap sel vero

Nilai indeks selektivitas suatu senyawa bertujuan untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal. Nilai indeks selektivitas yang disyaratkan adalah > 3 , yang menandakan ekstrak atau fraksi mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tapi dengan pengaruh minimal pada sel normal (Rollando *et al.* 2017). Indeks selektivitas dihitung dengan membandingkan IC₅₀ ekstrak terhadap sel normal (sel vero) dan IC₅₀ ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi air terhadap sel kanker hati HepG2.



Gambar 9. Grafik hasil interpretasi log konsentrasi dengan %viabilitas sel vero



Gambar 10. Grafik hasil Interpretasi log konsentrasi dengan % viabilitas sel kanker terhadap kontrol positif doxorubisin.

Persentasi viabilitas sel menunjukkan persentasi kehidupan sel setelah perlakuan Berdasarkan hasil grafik diatas menunjukkan aktivitas ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air terhadap sel vero menunjukkan penurunan persentasi kehidupan sel pada konsentrasi tertinggi. Doksorubisin sebagai kontrol positif juga menunjukkan penurunan persentasi kehidupan sel pada konsentrasi tertinggi. Hasil uji indeks selektivitas dapat dilihat pada tabel 8 dan perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 16.

Tabel 10. Uji indeks selektivitas ekstrak, fraksi etil asetat , fraksi n-heksan, fraksi air dan doxorubisin terhadap sel vero.

No	Sampel	IC ₅₀ vero (µg/ml)	IC ₅₀ kanker hati HepG2 (µg/ml)	Indeks selektivitas
1	Ekstrak	341,940	86,635	3,94
2	Fraksi etil asetat	121,435	51,627	3,50
3	Fraksi <i>n</i> -heksan	122,541	39,250	3,12
4	Fraksi air	533,36	132,62	4,02
5	Doxorubisin	4,885	2,29	2,13

Efek sitotoksik terhadap sel vero berdasarkan nilai IC₅₀ dan morfologi sel menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan dengan nilai indeks selektivitas (>3,00) maka dianggap dapat memberi pengaruh maksimal pada sel normal, sedangkan pada fraksi air nilai indeks selektivitas sebesar 4,02

Nilai indeks selektivitas doxorubisin sebesar 2,13 nilai indeks (<3) sehingga menyebabkan toksisitas umum dan juga menyebabkan sitotoksik pada sel normal. Perhitungan indeks selektivitas selanjutnya dapat dilihat pada lampiran 16.