

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili seluruh populasi dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah yang diambil pada bulan November, dipanen pada musim kering agar kadar air dalam rimpang tidak tinggi.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, dan fraksi etil asetat rimpang jahe merah yang akan diuji aktivitas terhadap kultur sel kanker T47D.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel yang telah diidentifikasi pada penelitian ini diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air rimpang jahe merah yang diujikan pada sel kanker payudara T47D.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik sel kanker payudara T47D dengan menghitung jumlah sel kanker yang mati serta indeks selektivitas terhadap sel vero.

Variabel terkendali adalah variabel yang dianggap berpengaruh, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan

dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suhu, tekanan inkubator, lama inkubasi, kondisi laboratorium seperti kebersihan dari ruangan dan instrumen laboratorium, konsentrasi sampel uji, keadaan sel T47D, kerapatan T47D, dan peneliti sendiri.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, rimpang jahe merah adalah bagian rimpang dari tanaman jahe merah yang diambil saat bulan November diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah, dengan memilih rimpang yang sudah siap dipanen dan dipilih rimpang yang masih segar.

Kedua, fraksi *n*-heksana rimpang jahe yang diperoleh dari ekstrak kental berupa hasil fraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair.

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

Keempat, fraksi air rimpang jahe merah diperoleh dari hasil residu dari fraksinasi etil asetat

Kelima, aktivitas sitotoksik adalah kemampuan senyawa untuk membunuh sel kanker setengah dari jumlah populasi yang diukur berdasarkan parameter IC_{50} dengan nilai parameter $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ untuk ekstrak dan $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ untuk fraksi.

Keenam, indeks selektivitas adalah indikasi selektivitas sitotoksik yakni toksik terhadap sel kanker namun tidak toksik terhadap sel normal yang dinyatakan dengan nilai $> 3,00$.

Ketujuh, sel kanker payudara T47D merupakan *continuous cell line* koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kultur sel ditumbuhkan menggunakan media RPMI 1640 yang mengandung FBS 10%, penisilin-streptomisin (Penstrep) 2% dan *fungizone* 0,5%.

Kedelapan, sel vero merupakan *continuous cell line* yang berasal dari ginjal kera hijau afrika. Kultur sel ditumbuhkan pada media M-199 yang mengandung PBS 10% dan penisilin-streptomisin 2%, *fungizone* 0,5% dan

diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan meliputi: alat penyari terdiri dari atas bejana maserasi, kain flanel, kertas saring, corong pisah, klem & batang statip, vial, sudip, batang pengaduk, blender, grinding, *moisture balance* O'haus MB23, kertas saring, eksikator, timbangan elektrik (Shimazu, type LS-6DT), oven, *sterling bidwell*, *rotary vakum evaporator* (Heidolph WB 2000), dan alat gelas.

Alat uji sitotoksik meliputi *autoclave*, inkubator 37⁰ aliran CO₂ 5% model 6200 (Napco), tangki nitrogen cair, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), *Laminar air flow class II* (Labconco), spektrokolorimetri pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), *ependrof*, tabung konikal steril (Nunclone), *Tissue culture flask* (Nunclone), *mikroplate* 96 sumuran (Nunclone), lampu ultraviolet, neraca elektrik (Sartorius), mikropipet 20-200 µL dan 200-1000 µL (Pipetman), mesin *vortex*, mikroskop *inverted* (Axiovert-25), *magnetic stirrer* dan kamera digital.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah rimpang jahe merah yang masih segar, pelarut etanol 96% (Brataco), pelarut *n*-heksana, pelarut etil asetat, air, pereaksi Lieberman Baurchardat, pereaksi anisaldehyd asam sulfat, Dragendroff, Mayer, Sitroborat.

Bahan untuk uji sitotoksisitas: *cell line* T47D, cell vero, doxorubicin, media RPMI 1640 (Gibco), natrium bikarbonat dan HEPES (Sigma), media kultur sel: media RPMI 1640 (Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS) 10% v/v (Gibco), Dimethyl sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, MTT 5 mg/ml dalam PBS; media pencuci sel; larutan PBS (Phospat Buffered Saline) Ph 7,2; Natrium Dodsasil Sulfat 10% dalam HCl 0,1 N sebagai stopper.

Sel kanker payudara T47D yang digunakan adalah koleksi laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Umum Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Kultur sel ditambahkan dalam media penumbuh Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco) yang mengandung Foetal Bovine Serum (FBS) 10% v/v (Gibco), penisilin-streptomisin 1% (Gibco).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Penelitian ini diawali dengan menetapkan kebenaran jahe merah yang berkaitan dengan ciri-ciri secara makroskopis dan mikroskopis yang dilakukan di laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pencucian, penyiapan dan pembuatan serbuk rimpang jahe merah

Rimpang jahe merah diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar. Pengambilan rimpang jahe merah dilakukan pada saat bagian atas tanaman mengering. Rimpang jahe merah yang didapat kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan cemaran dan kotoran kemudian ditiriskan. Rimpang jahe merah yang sudah dibersihkan, kemudian dirajang untuk memperkecil ukuran sehingga cepat kering, selanjutnya dilakukan pengeringan dengan oven suhu 50⁰C. Rimpang jahe merah yang sudah kering, digiling dan kemudian diayak dengan ayakan nomor mesh 40. serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah kering tertutup rapat dan dilakukan pemeriksaan secara organoleptis.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan serbuk jahe merah dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk jahe merah. Selanjutnya diukur susut pengeringan serbuk dengan menggunakan alat *moisture balance* O'haus MB23 pada suhu 105⁰C, lalu dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Kadar susut pengeringan memenuhi syarat apabila suatu serbuk tidak boleh lebih dari 10% (Depkes RI 2000). Penetapan susut pengeringan ini dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasetika Universitas Setia Budi.

4. Penetapan kadar air serbuk

Analisa kadar air bahan menggunakan metode *Sterling Bidwell* dengan cara memasukkan serbuk 20 gram dalam labu destilasi dan menambahkan ± 200

ml toluen jenur air, kemudian memasang labu distilasi dan pendingin balik. Labu distilasi dipanaskan dengan menggunakan pembakar spiritus. Pemanasan dihentikan jika pada penampung tidak menetes lagi dan dilanjutkan dengan mengukur kadar air dengan melihat volume pada skala alat. Penetapan kadar air dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Kemenkes 2008).

5. Pembuatan Ekstrak etanol jahe merah

Pembuatan ekstrak etanol dari rimpang jahe merah dilakukan dengan cara remaserasi dengan pelarut etanol 96%. Proses ini dilakukan dengan merendam 1 bagian serbuk kering simplisia dengan 10 bagian pelarut. Sebanyak 500 gram serbuk rimpang jahe merah dimasukkan dalam bejana gelap ditambah dengan 5 liter etanol 96%. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian bejana didiamkan selama 18 jam. Setelah 18 jam, maserat dipisahkan sari dan ampasnya. Ampas dilakukan penyarian kembali dengan cara yang sama yaitu 2,5 liter etanol 96%. Proses remaserasi harus terlindung dari cahaya matahari langsung. Kumpulkan semua maserat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* suhu 50⁰C sampai terbentuk ekstrak kental (Kemenkes RI 2013).

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

Ekstrak etanol rimpang jahe merah sebanyak 10 gram dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 15 ml dan disuspensi dengan air sebanyak 60 ml lalu dipartisi dengan pelarut *n*-heksana 75 ml sebanyak tiga kali pada corong pisah. Lapisan *n*-heksan selanjutnya dikumpulkan dan dipekatkan dengan *vaccum evaporator*, sari kering *n*-heksan disebut fraksi *n*-heksan. Lapisan berair sisa partisi dengan *n*-heksan kemudian dipartisi lagi dengan 75 ml etil asetat sebanyak tiga kali. Lapisan etil asetat dipisahkan dan dipekatkan dengan *vaccum evaporator* dan diperoleh fraksi etil asetat, lapisan air dipisahkan dan dipekatkan (Ghani 2018). Skema selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1.

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak jahe merah secara kualitatif dengan metode tabung

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol rimpang jahe merah. Identifikasi senyawa yang terkandung meliputi senyawa flavonoid, alkaloid, tanin,

fenolik, dan triterpenoid. Identifikasi senyawa diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing seperti berikut:

7.1. Identifikasi flavonoid. Ekstrak ditambahkan serbuk Mg, lalu ditambahkan asam klorida pekat dan 1 ml amil alkohol. Apabila terbentuk warna orange, merah, atau kuning, berarti positif flavonoid. (Harbone 1996).

7.2. Identifikasi alkaloid. Ekstrak ditambahkan 1 mL HCl 2 N, dipanaskan selama 5 menit, disaring, kemudian tabung pertama ditambahkan 5 tetes pereaksi Dragendorff. Hasil positif adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat/hitam (Depkes RI 1977). Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer. Hasil positif akan terbentuk endapan putih atau kuning yang menandakan positif adanya alkaloid (Harbone 1996).

7.3. Identifikasi tanin. Simplisia dididihkan dengan 20 mL air lalu disaring, ditambahkan beberapa tetes feriklorida 1% dan terbentuknya warna coklat kehijauan, biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Edoga et al., 2005).

7.4. Identifikasi terpenoid. Ekstrak diuapkan sampai kering ditambahkan CH_3COOH anhidrat, ditambahkan CHCl_3 ditambah $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{p})$ melalui dinding tabung, terpenoid positif jika terdapat cincin warna ungu-merah (Tiwari *et al.* 2011).

8. Identifikasi fraksi rimpang jahe merah paling aktif secara kromatografi lapis tipis (KLT)

8.1. Identifikasi 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).

8.2. Identifikasi 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) disemprot dengan pereaksi dragendrof. Penampakan noda terlihat peredaman pada UV 254 nm, sebagian alkolid berfluoresensi biru atau kuning (Harbone 1996).

8.3. Identifikasi 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 (Harbone 1987).

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. Identifikasi minyak atsiri menggunakan fase diam silika gel GF 254 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. 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 (Kemenkes 2008).

9. Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan harus keadaan steril, alat dapat dicuci menggunakan antiseptik atau detergen kemudian dibilas dengan air bersih mengalir dan direndam dalam aquadestilata dalam 1 jam kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam. Kemudian alat-alat tersebut diberi tanda dan dimasukkan ke dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

10. Prosedur kerja

10.1 Pembuatan media kultur RPMI (*Roswell Park Memori Institute*).

Medium kultur dibuat dengan melarutkan 10,4 g bubuk RPMI ke dalam aquadestilata 800 ml, kemudian ditambahkan 4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazine ethanesulfonic acid (HEPES) dan Na HCO₃. Aquadestilata ditambahkan sampai volume 1 L. Campuran dihomogenkan dengan cara diaduk kemudian pH diukur 7,2-7,4 dengan cara penambahan 1 M NaOH atau 1 M HCl. Sterilisasi dilakukan dengan cara menyaring saringan membran 0,2 µm selanjutnya ditambah fungison 0,5%, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% dan streptomisin 2%, lalu disimpan dalam lemari es suhu 4⁰C dan diberi label.

10.2 Pembuatan media M-199. Media M-199 digunakan untuk menumbuhkan sel vero, dilakukan dengan cara serbuk media M-199 dilarutkan dengan aquades kurang lebih 800 ml dengan beker glass 1 L, kemudian ditambahkan 2,2 g sodium bikarbonat dan 2 g (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES). Semua bahan tersebut diaduk dengan stirrer sampai bahan larut. Larutan diatur pHnya sampai 7,2 dengan menambahkan NaOH 1 M atau HCl 1 M. Larutan dibuat 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter 0,2 µm ke dalam botol tertutup steril. Medium disimpan dalam lemari pendingin suhu 4⁰C dan diberi label. Media M199 untuk membuat medium tumbuhnya ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, Penicillin Streptomycin (Penstrep) 2% dan fungison 0,5% hingga volume 100 ml.

10.3 Pembuatan larutan PBS (*Phosfat Buffer Saline*). Dinatrium hidrogen fosfat (Na₂HPO₄) ditimbang 2,16 g, selanjutnya ditambahkan 0,2 g Kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), 8 g natrium klorida larutkan dalam aquades steril hingga 1 L, kemudian disterilkan dengan autoklaf.

10.4 Pembuatan larutan MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazolium bromida). Serbuk MTT sebanyak 50 mg/ml dalam PBS. Kemudian disterilisasi dengan filtrasi ukuran pori 0,2 µm.

10.5 Pembuatan larutan uji. Ekstrak uji (ekstrak rimpang jahe merah, fraksi *n*-heksana, fraksi eti asetat dan fraksi etanol) ditimbang masing-masing 10

mg kemudian dilarutkan dengan 100 µg DMSO, lalu disentrifus sampai homogen dan disimpan dalam ependrof. Larutan ini dijadikan larutan induk dengan konsentrasi 100.000 µg/ml (larutan induk), lalu dibuat sampel uji dengan seri 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,625 µg/ml, dan 7,8125 µg/ml dengan mengencerkan beberapa µl dari larutan induk. Doxorubicin dibuat dengan seri konsentrasi 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,0625 µg/ml, dan 0,0312 µg/ml. Pembuatan larutan stok maupun seri kadar sampel untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF.

11. Persiapan kultur sel T47D

11.1 Pengaktifan sel. Sel T47D yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan dicairkan pada suhu 37⁰C selanjutnya vial disemprot etanol 70%. Sel T47D ditambahkan dimasukkan dalam tabung sentrifuge lalu disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah media penumbuh RPMI 1640 dengan FBS 10%, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (2-3 buah) dan diamati perkiraan jumlah sel dilakukan di bawah mikroskop. Sel yang hidup terlihat bulat-bulat, jernih, dan bersinar. Flask dimasukkan dalam kontrol beraliran CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selam 24 jam.

11.2 Panen dan perhitungan sel. Media dalam culture flask dibuang lalu dicuci dengan PBS (phosphat buffer saline) sebanyak 7 ml (\pm 0,5 volume media awal), pencucian minimal 2 kali, kemudian ditambah 3,5 ml tripsin secara merata. Selanjutnya diinkubasi selama 3-5 menit, lalu diamati pelepasan sel dari dasar flask dengan mikroskop. *Culture flask* dipindahkan ke dalam LAF ditambahkan media kultur RPMI kedalam *culture flask* sebanyak 2-3 ml untuk menghentikan kerja tripsin, selanjutnya diambil 10 µl dan dipipetkan ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted* dengan *counter*.

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung (A, B, C dan D), setiap kamar terdiri dari 16 kotak. Dihitung sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri dan bawah. Sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan dan atas tidak dihitung. Dihitung jumlah sel per ml dengan rumus (Nugroho *et al.* 2012) :

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

Dihitung volume panen sel yang diperlukan (dalam ml) dengan rumus :

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung tiap ml}}$$

Diambil volume panen sel, ditransfer ke konikel baru dan ditambahkan medium sampai total volume yang diperlukan.

Sel didistribusikan ke dalam microplate sumuran 96 dengan konsentrasi sel sebesar 40×10^4 sel/sumuran dalam 100 μl , selanjutnya di inkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampel sel siap untuk diberi perlakuan.

12. Uji sitotoksitas

Uji sitotoksik menggunakan plat kultur jaringan 96 sumuran sebagai media. Sumuran-sumuran yang berisi sel tersebut ditambahkan 100 μl larutan uji (ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air) yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi tertentu 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 31,25 $\mu\text{g/ml}$, 15,625 $\mu\text{g/ml}$, dan 7,8125 $\mu\text{g/ml}$ tiap sumuran sebanyak 3 kali ulangan. Kontrol positif doksorubisin dengan konsentrasi 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 $\mu\text{g/ml}$, dan 0,0312 $\mu\text{g/ml}$ tiap sumuran sebanyak 3 kali ulangan. Kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media komplit RPMI dan sebagai kontrol media digunakan hanya larutan uji media komplit RPMI. Sel diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 24 jam, selanjutnya media pada sumuran dibuang dengan cara *microplate* dibalikkan kemudian *plate* ditekan untuk meniriskan sisa cairan. PBS sebanyak 100 μl dimasukkan ke dalam semua sumuran, lalu PBS dibuang dengan cara membalikkan plate dan ditiriskan diatas tisu. Selanjutnya menyiapkan MTT (1 mg/ml) dengan cara mengambil 1 ml stok MTT dalam PBS (10 mg/ml) kemudian diencerkan dengan menambahkan media kultur RPMI sebanyak 10 ml untuk satu 96 *well plate*. *Microplate* diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 4 jam. Media kultur dibuang kembali

dan kemudian ditambahkan 100 µl MTT untuk setiap sumuran termasuk kontrol media. Sel kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 4 jam. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu. Reaksi sel dengan MTT dihentikan serta melarutkan formazan dengan penambahan 100 µl SDS 10% dalam 0,01 N HCl. *Microplate* dibungkus dengan aluminium foil, diinkubasi semalaman pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Uji sitotoksik dapat dilihat pada Gambar 2.

13. Uji indeks selektivitas

Sel vero dalam media M-199 sebanyak 100 µl didistribusikan ke dalam 96 sumuran, pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi dan diinkubasikan selama 24 jam. Media dibuang, selanjutnya ditambahkan 100 µl larutan sampel uji (ekstrak dan fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air rimpang jahe merah) masing-masing diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi tertentu 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,625 µg/ml, dan 7,8125 µg/ml tiap sumuran sebanyak 3 kali ulangan. Kontrol positif doksorubisin dengan konsentrasi 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,0625 µg/ml, dan 0,0312 µg/ml tiap sumuran sebanyak 3 kali ulangan. Kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media komplet M-199 dan sebagai kontrol media digunakan hanya larutan uji media komplet M-199. *Microplate* kemudian diinkubasi didalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 24 jam, setelah akhir inkubasi, senyawa uji dalam plate dibuang dan digantikan dengan 100 µl media kultur M-199 yang mengandung MTT 1 mg/ml, lalu diinkubasi lagi selama 4 jam didalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan penambahan reagen *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100 µl, selanjutnya plate dibungkus dengan aluminium *foil* dan diinkubasi pada tempat gelap dengan temperatur kamar selama semalam. Keesokan harinya dibaca serapannya dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

E. Analisis Hasil

1. Uji sitotoksik

Hasil uji sitotoksik berupa respon serapan dikonversikan ke dalam persen kehidupan sel dengan persamaan sebagai berikut:

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

Dilanjutkan analisis untuk menentukan regresi linier antara konsentrasi sampel uji (Ekstrak etanol, dan Fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air rimpang jahe merah) versus persen sel hidup menggunakan Microsoft Excel 2013, hingga akan didapatkan persamaan:

Keterangan:

$$y = a + bx$$

x = log konsentrasi sampel uji

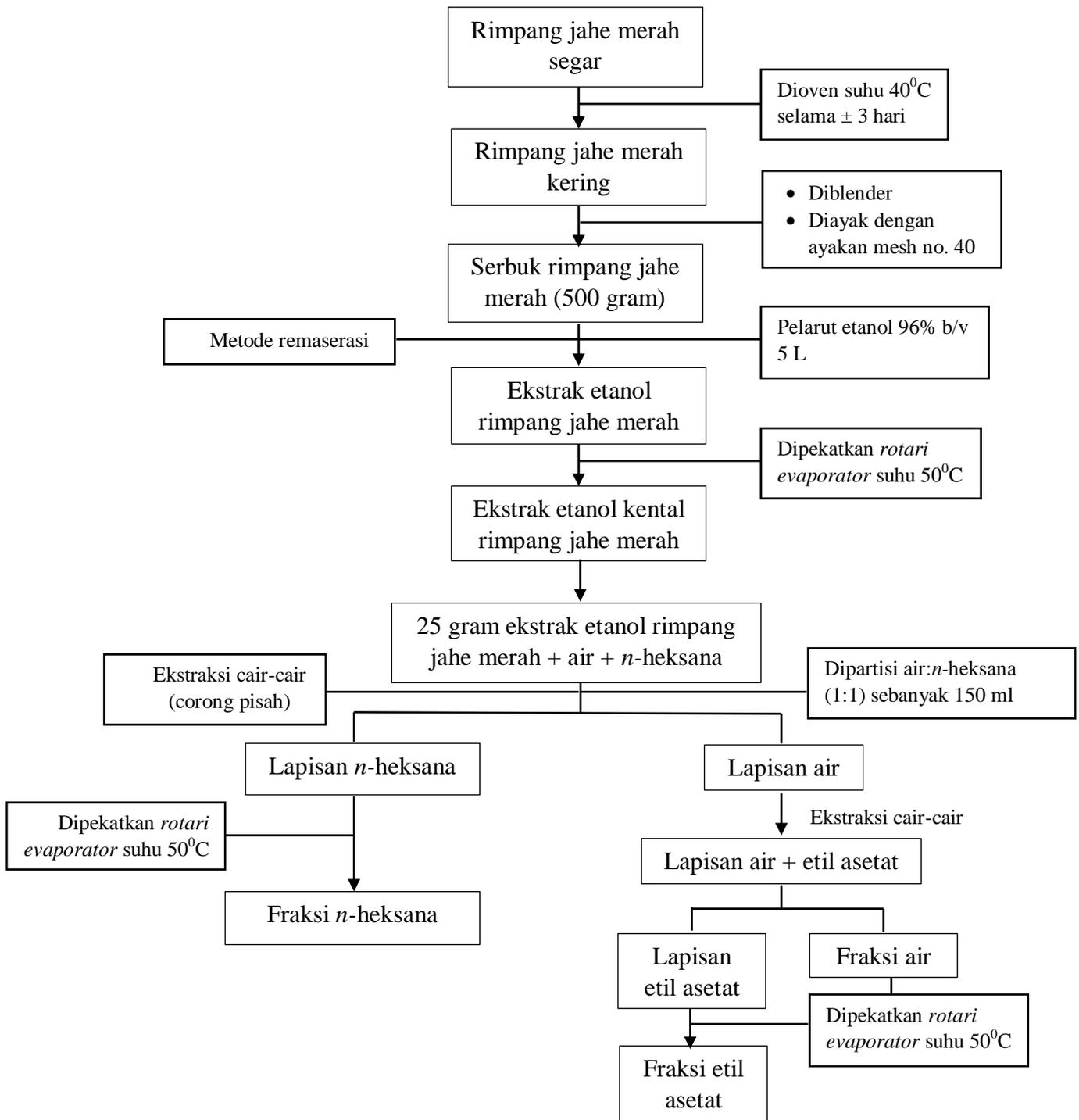
y = persen viabilitas sel

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

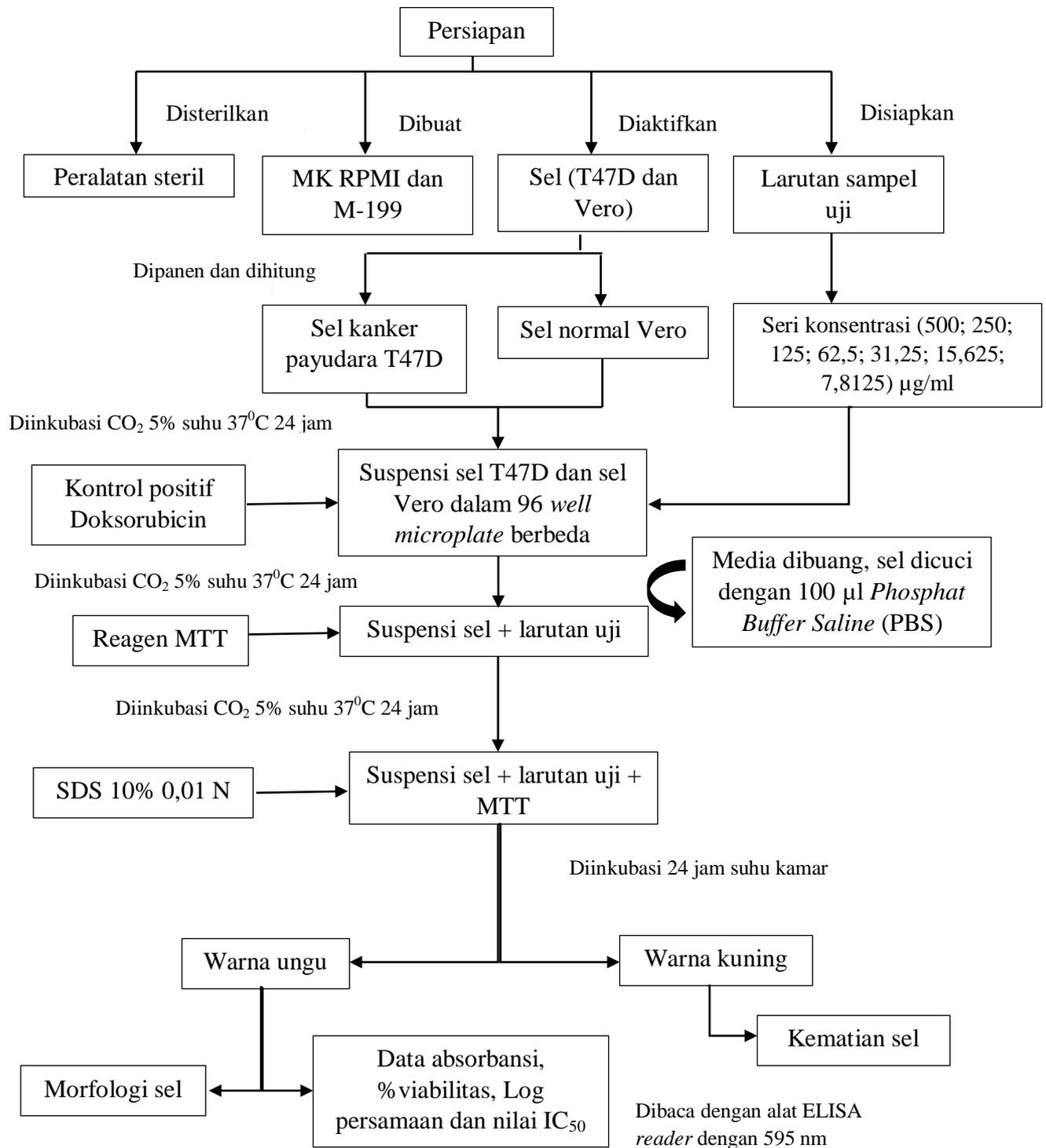
2. Uji selektivitas

Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan dibawah ini :

$$\text{Indeks Selektivitas (SI)} = \frac{IC_{50} \text{ sel vero}}{IC_{50} \text{ sel kanker}}$$



Gambar 1. Pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*)



Gambar 2. Skema uji sitotoksik ekstrak dan fraksi rimpang jahe merah terhadap T47D