

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil determinasi rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc Var. *Rubrum*)

Determinasi tanaman merupakan langkah awal yang penting dalam melakukan penelitian berupa sampel tanaman. Determinasi tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran sampel tanaman yang akan digunakan penelitian dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman dengan pustaka acuan, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan serta mencegah tercampurnya bahan dengan tanaman yang lainnya. Determinasi tanaman jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc Var. *Rubrum*) yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Program Studi Biologi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Hasil determinasi nomor 226/UN27.9.6.4/Lab/2018 dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Hasil pencucian, penyiapan dan pembuatan serbuk rimpang jahe merah

Rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc Var. *Rubrum*) didapat dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan November 2018. Bahan yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 10 kg. Bahan yang telah dikeringkan dirajang dan kemudian digiling dengan alat penggiling simplisia, sehingga diperoleh serbuk rimpang jahe merah sebanyak 2,4 kg yang berwarna coklat. Proses pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, sehingga dapat mencegah penurunan mutu simplisia. Pembuatan serbuk dan pengayakan bertujuan untuk mempermudah proses ekstraksi karena semakin kecil ukuran serbuk maka akan semakin besar luas permukaan sehingga proses penyarian akan relatif semakin efektif. Tabel 1 menunjukkan hasil rendemen simplisia dan perhitungan rendemen simplisia dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 1. Rendemen berat kering terhadap berat basah rimpang jahe merah

Sampel	Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
Rimpang jahe merah	10000	2400	24

3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah

Tujuan penetapan susut pengeringan adalah untuk mengetahui hasil dari serbuk rimpang jahe merah yang diperoleh memenuhi persyaratan sesuai dengan standart yang telah ditetapkan. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Presentase rata-rata susut pengeringan rimpang jahe merah adalah 9,56%. Nilai tersebut memenuhi persyaratan yaitu <10% (Depkes RI 2008). Data hasil penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada tabel 2 dan perhitungan lengkap susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk rimpang jahe merah

Berat awal (gram)	Berat akhir (gram)	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. Hasil penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah

Penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali dengan menggunakan cairan pembawa toluen jenuh air. Penetapan kadar air bertujuan untuk memberikan batasan maksimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan (Depkes RI 2000). Penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah dimaksudkan agar kualitas dan khasiat rimpang jahe merah terjaga, persyaratan kadar air serbuk rimpang jahe merah tidak lebih dari 11% (Depkes RI 2008). Hasil penetapan kadar air dapat dilihat pada tabel 3 dan lampiran 6.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air serbuk rimpang jahe merah

No.	Bobot serbuk (gram)	Volume terukur (mL)	Kadar air (%)
1.	20,042	1,7	8,48
2.	20,051	1,8	8,97
3.	20,032	1,7	8,48
Rata – rata			8,64

Hasil perhitungan kadar air serbuk rimpang jahe merah diperoleh rata-rata sebesar 8,64% hal ini menunjukkan bahwa serbuk rimpang jahe merah memenuhi persyaratan kadar air karena kurang dari 11%.

5. Hasil pembuatan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat rimpang jahe merah

Ekstrak jahe merah yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak yang diperoleh dari proses remaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Pelarut etanol tidak dapat menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut dan menghambat kerja enzim (Voigt 1995). Serbuk jahe merah yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 500 gram. Hasil ekstraksi dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* suhu 50⁰C, sehingga diperoleh ekstrak sebanyak 56,8486 gram. Ekstrak yang diperoleh kental, berwarna coklat dan berbau khas. Pemekatan pada suhu tersebut bertujuan untuk menjaga stabilitas senyawa aktif dari proses pemanasan dalam jangka waktu lama. Data rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4 dan lampiran 4.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol rimpang jahe merah

Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
500	56,8486	11,36

Ekstrak etanol rimpang jahe merah menghasilkan rendemen 11,36%. Ekstrak sebanyak 10 gram kemudian di fraksinasi menggunakan corong pisah dengan metode ekstraksi cair-cair. Tujuan fraksinasi untuk memisahkan senyawa yang non polar, semi polar dan polar (Tengo *et al.* 2013). Prinsip kerja dari fraksinasi yaitu adanya kesetimbangan senyawa antara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Sifat pelarut *n*-heksana yaitu non-polar yang diharapkan dapat melarutkan senyawa-senyawa seperti terpenoid dan minyak atsiri secara maksimal. Pelarut etil asetat merupakan pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa saponin, flavonoid, tanin, minyak atsiri, dan glikosida (Artini *et al.* 2013). Sedangkan air merupakan pelarut polar yang dapat melarutkan senyawa seperti fenolik dan tanin. Data hasil rendemen fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dapat dilihat pada tabel 5 dan lampiran 4.

Tabel 5. Hasil rendemen fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat rimpang jahe merah

Replikasi	Berat ekstrak (gram)	Berat ekstrak (gram)		
		<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Air
1	10,1121	1,1039	1,2659	1,1595
2	10,0295	0,7804	0,8099	0,7430
3	10,1090	0,8012	0,9114	0,6027
Total	30,2506	2,6855	2,9872	2,4120
	Rendemen (%)	8,87	9,87	7,97

Fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air rimpang jahe merah masing-masing menghasilkan rendemen 8,87%, 9,87% dan 7,97%. Fraksi etil asetat memiliki berat dan nilai rendemen yang terbesar. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang tertarik dalam pelarut etil asetat lebih banyak dibanding *n*-heksana dan air. Nilai terkecil rendemen yang dimiliki oleh fraksi air karena sedikitnya senyawa polar dari ekstrak yang tertarik pada pelarut air. Nilai rendemen yang berbeda juga dapat dipengaruhi oleh waktu pemisahan yang terlalu lama saat fraksinasi dapat mengurangi nilai rendemen karena senyawa yang kembali larut. Hasil perhitungan terlampir pada lampiran 4.

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

Identifikasi kandungan senyawa bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 6 dan lampiran 7.

Tabel 6. Hasil identifikasi senyawa

Senyawa	Hasil identifikasi		Pustaka	Kesimpulan	
	Serbuk	Ekstrak		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Orange	Kuning	Orange, merah, kuning pada lapisan amil alkohol (Harbone 1996)	(+)	(+)
Alkaloid	Endapan putih	Endapan putih	Endapan putih/kuning (Harbone 1996)	(+)	(+)
	Endapan coklat	Endapan orange	Endapan coklat-hitam (Depkes RI 1977)		
Tanin	Biru kehitaman	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman, biru kehitaman (Edoga <i>et al.</i> 2005)	(+)	(+)
Terpenoid	Merah	Cincin merah	Cincin merah-ungu (Tiwari <i>et al.</i> 2011).	(+)	(+)

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

Hasil identifikasi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa serbuk dan ekstrak rimpang jahe merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin dan terpenoid yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna sesuai dengan pustaka pada masing-masing golongan senyawa tersebut.

7. Hasil identifikasi fraksi rimpang jahe merah paling aktif dengan KLT

Analisis kualitatif dilakukan pada fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat yang mempunyai aktivitas sitotoksik paling aktif yang dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil identifikasi fraksi rimpang jahe merah paling aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel	Pengujian	<i>Rf</i> <i>baku</i>	<i>Rf</i>	Hasil			Ket
				UV 254 nm	UV 366 nm	Setelah disemprot	
Fraksi etil asetat	Alkaloid	0,78	0,76	Peredaman	Berfluoresensi biru	Kuning kecoklatan	(+)
	Tanin	0,96	0,94	Hitam	Berfluoresensi biru kehitaman	Hitam	(+)
	Minyak atsiri	0,96	0,86	Kuning	Berfluoresensi kuning	Hitam	(-)
	Terpenoid	-	0,96	Kuning	Tidak berfluoresensi	-	(-)
	Flavonoid	0,98	0,96	Peredaman	Berfluoresensi kuning	Kuning	(+)
Fraksi <i>n</i> -heksan	Alkaloid	0,82	-	-	-	-	(-)
	Tanin	0,96	0,78	Kecoklatan	Berfluoresensi kuning	Hitam	(-)
	Minyak atisiri	0,92	0,92	Biru	Berfluoresensi hitam	Biru	(+)
	Terpenoid	-	0,94	Hitam	Berfluoresensi biru	coklat	(+)
	Flavonoid	0,7	0,8	Biru	Berfluoresensi biru	-	(-)

Keterangan : (+) = ada kandungan golongan senyawa tersebut

(-) = tidak ada kandungan golongan senyawa tersebut

Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis golongan senyawa alkaloid dengan standar baku 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). Hasil identifikasi bercak pada fraksi etil asetat menunjukkan hasil yang positif bila dideteksi dengan sinar UV 254 nm maupun UV 366 nm dan setelah disemprot Dragendroff menunjukkan adanya bercak kuning kecoklatan. Hasil positif juga terlihat berdasarkan nilai *Rf* sampel fraksi

etil asetat sebesar 0,76 hampir setara dengan nilai R_f standar baku senyawa piperin sebesar 0,78, sehingga disimpulkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa alkaloid. Hal ini berbeda dengan fraksi *n*-heksana yang tidak dapat terelusi.

Hasil identifikasi golongan senyawa tanin secara KLT dengan standar baku 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). Berdasarkan nilai R_f yang setara dengan baku pembanding ialah fraksi etil asetat dengan nilai R_f sebesar 0,94 dan R_f baku pembanding sebesar 0,96, sedangkan bercak pada fraksi *n*-heksana sebesar 0,78. Identifikasi pada fraksi etilasetat saat dideteksi dengan sinar tampak berwarna hitam dan UV 366 nm berfluoresensi biru, sehingga fraksi etil asetat menunjukkan positif mengandung tanin.

Hasil identifikasi Kromatografi Lapis Tipis golongan senyawa minyak atsiri dengan standar baku 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. Berdasarkan deteksi dengan penyemprot anisaldehyd hasil positif terlihat pada bercak fraksi *n*-heksana yang menunjukkan warna biru, sedangkan pada fraksi etil asetat berwarna kuning. Nilai R_f yang setara dengan baku pembanding ialah bercak pada fraksi *n*-heksan dengan nilai R_f sebesar 0,92 dan nilai R_f baku pembanding juga sebesar 0,92, sehingga dapat disimpulkan fraksi *n*-heksan positif mengandung minyak atsiri.

Hasil identifikasi senyawa terpenoid dengan standar baku stigmasterol sebagai baku pembanding. Hasil positif bila diamati sinar UV 366 terdapat fluoresensi hijau atau warna merah ungu atau biru (Harbone 1996). Nilai R_f sampel fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksan sebesar 0,96 dan 0,94, sedangkan standar baku stigmasterol pada lempeng fraksi etil asetat dan pada lempeng fraksi *n*-heksana tidak terelusi. Berdasarkan hasil penelitian fraksi *n*-heksana menunjukkan berfluoresensi warna biru pada UV 366 nm, namun fraksi etil asetat

diamati pada UV 366 nm tidak berfluoresensi. Sehingga disimpulkan bahwa fraksi *n*-heksana positif mengandung senyawa terpenoid.

Hasil identifikasi 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). Nilai *R_f* sampel fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana sebesar 0,96 dan 0,8, sedangkan nilai *R_f* standar baku pada lempeng fraksi etil asetat sebesar 0,98 dan *R_f* kuersetin pada lempeng fraksi *n*-heksana sebesar 0,7. Berdasarkan nilai *R_f*, fraksi etil asetat hampir setara dengan *R_f* kuersetin sehingga dapat disimpulkan positif. Fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid juga terbukti setelah bereaksi dengan uap amonia menunjukkan pada UV 366 nm berfluoresensi kuning dan pada sinar tampak berwarna kuning. Fraksi *n*-heksana menunjukkan hasil negatif karena setelah bereaksi dengan uap amonia pada sinar tampak tidak menunjukkan adanya bercak dan diamati UV 254 nm menunjukkan warna biru dan UV 366 nm juga berfluoresensi biru.

Hasil identifikasi kandungan senyawa pada fraksi teraktif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan bahwa senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi *n*-heksana mengandung minyak atsiri dan terpenoid, sedangkan fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, tanin dan alkaloid. Hasil identifikasi golongan senyawa fraksi teraktif dapat dilihat pada Lampiran 8 dan 9.

8. Uji sitotoksik

Pengujian sitotoksik bertujuan untuk mengetahui adanya sifat ketoksikan dari sampel terhadap sel kanker. Pengujian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada pada bulan Mei 2019. Sel kanker yang digunakan ialah sel kanker payudara T47D. Parameter yang digunakan untuk uji sitotoksik yaitu nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

Pengujian sitotoksik diawali oleh kultur sel dengan cara sel kanker payudara T47D ditumbuhkan dalam media RPMI 1640. Kultur sel merupakan teknik yang biasa digunakan untuk mengembangkan sel diluar tubuh (*in vitro*). Keuntungan kultur sel ialah lingkungan tempat hidup sel dapat dikontrol dan diatur semirip mungkin dengan lingkungan awal di dalam tubuh sehingga kondisi fisiologis dari kultur konstan supaya sel tumbuh dengan baik. Kelemahan teknik ini adalah kemungkinan sel mengalami mutasi saat dikultur sehingga sel mengalami perubahan sifat (Zairisman 2006). Pertumbuhan sel memerlukan pH \pm 7,4. Suhu dipertahankan 37⁰C dan CO₂ 5%. Suhu harus dijaga karena suhu dapat mempengaruhi pH lingkungan.

Media RPMI 1640 merupakan media penumbuh yang baik untuk menumbuhkan sel kanker T47D untuk jangka waktu pendek. Media tersebut mengandung FBS 10% yang digunakan sebagai suplemen peningkat pertumbuhan, melindungi sel dan memberi nutrisi. Medium RPMI juga ditambahkan penisilin-streptomisin yang bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi bakteri. Penisilin-Streptomisin adalah antibiotik yang tidak bersifat toksik, memiliki spektrum antimikroba luas dan ekonomis (Zairisman 2006).



Gambar 3. Profil morfologi sel T47D pada perbesaran 40x

Perlakuan diawali dengan persiapan kultur sel T47D yang ditumbuhkan hingga konfluen dalam medium RPMI 1640. Jumlah sel yang telah konfluen terlihat menempel rapat di dasar *flask*. Sel yang hidup terlihat bulat-bulat, jernih dan bersinar seperti kenampakan (Gambar 3). Media kultur sel dibuang untuk memudahkan pemanenan dan perhitungan sel. Pencucian dengan PBS yang bertujuan untuk menghilangkan sel-sel yang tidak sehat dan menghilangkan

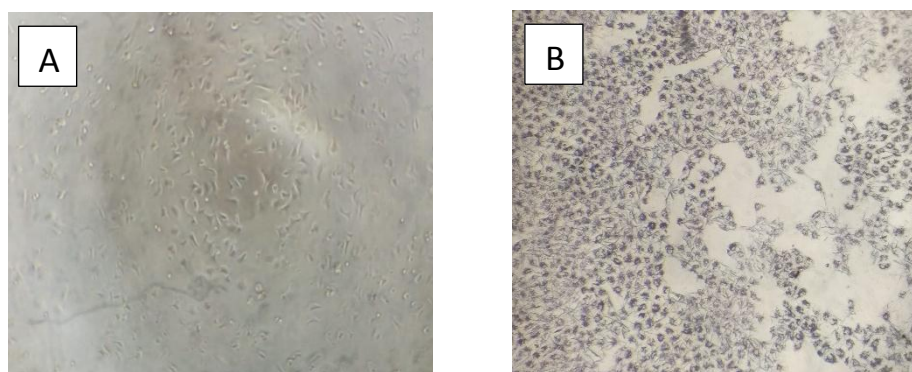
kandungan zat dalam media RPMI yang tertinggal, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin (Maulana 2010). Sel akan kehilangan kemampuan untuk melekat pada dasar *flask* dan terlihat mengapung setelah penambahan tripsin, hal tersebut terjadi karena sel telah berpenetrasi dengan tripsin. Pemberian tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara glikoprotein dan proteoglikan dengan permukaan *flask* (Doyle *et al.* 2000).

Jumlah sel kanker yang hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur pada penelitian ini ialah $101,75 \times 10^4$ sel. Kemudian dilakukan pengenceran suspensi untuk mendapatkan konsentrasi sel kanker T47D untuk 96 sumuran dimana tiap sumuran sebanyak 100 μ l/sumuran. Sel tersebut kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam diharapkan jumlah sel T47D tersebut dapat bertahan hidup melewati siklus hidupnya dengan baik. Penentuan waktu 24 jam dikarenakan untuk mencegah berkurangnya ketersediaan nutrisi yang dikonsumsi oleh sel.

Sampel uji dilarutkan dengan DMSO (*Dimetil sulfoksida*) yang digunakan secara luas untuk melarutkan senyawa polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan doxorubicin. Doxorubicin merupakan agen kemoterapi yang umum dipakai untuk terapi kanker payudara, namun efektivitas menjadi terbatas karena munculnya masalah resistensi sel kanker dan adanya efek toksik pada jaringan normal tubuh (Smith *et al.* 2006). Perlakuan uji digunakan pula kontrol negatif berupa kontrol sel dan kontrol media RPMI untuk sel T47D dan media M199 untuk sel vero.

Pengujian sitotoksik pada tahap selanjutnya yaitu pengujian dengan MTT *Assay*. Pengujian didasarkan untuk mengukur jumlah sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. Kemampuan sel yang hidup akan mereduksi garam MTT sehingga menjadi formazan yang berwarna biru-ungu dan tidak larut (Gambar 4B). Warna ungu tersebut akan bertambah pekat dengan menurunnya konsentrasi sampel uji (Lampiran 13). Konsentrasi tertinggi menunjukkan warna kuning, hal ini berarti bahwa tidak ada sel yang hidup pada konsentrasi 500 μ g/ml, namun konsentrasi selanjutnya yang lebih rendah menunjukkan peningkatan intensitas warna ungu. Kristal formazan tidak dapat larut dalam air

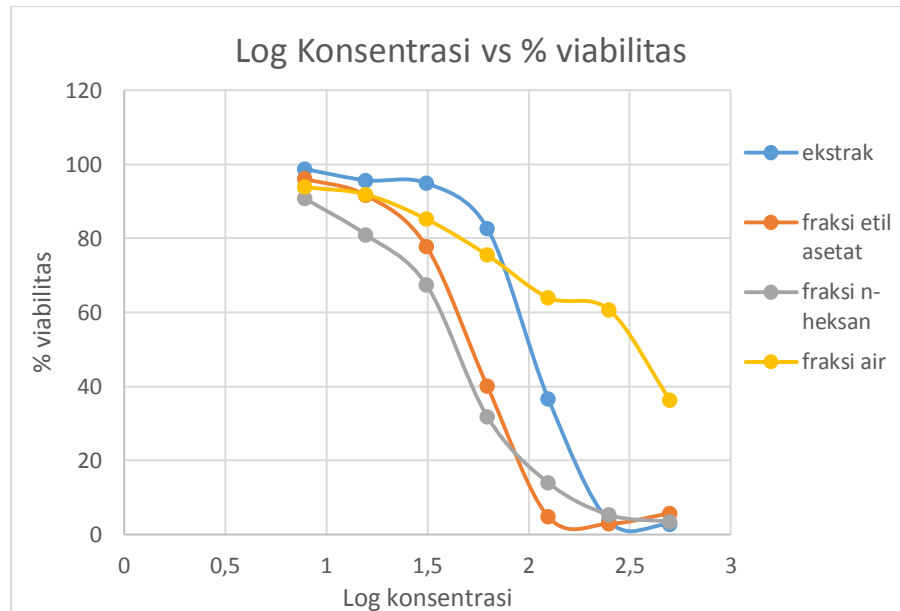
sehingga perlu ditambahkan zat tambahan berupa pelarut SDS yang bertujuan untuk melarutkan kristal formazan ungu tersebut. SDS juga berfungsi untuk menghentikan reaksi antara MTT dengan enzim mitokondria reduktase karena reaksi tersebut merupakan reaksi enzimatik yang berlangsung berkelanjutan.



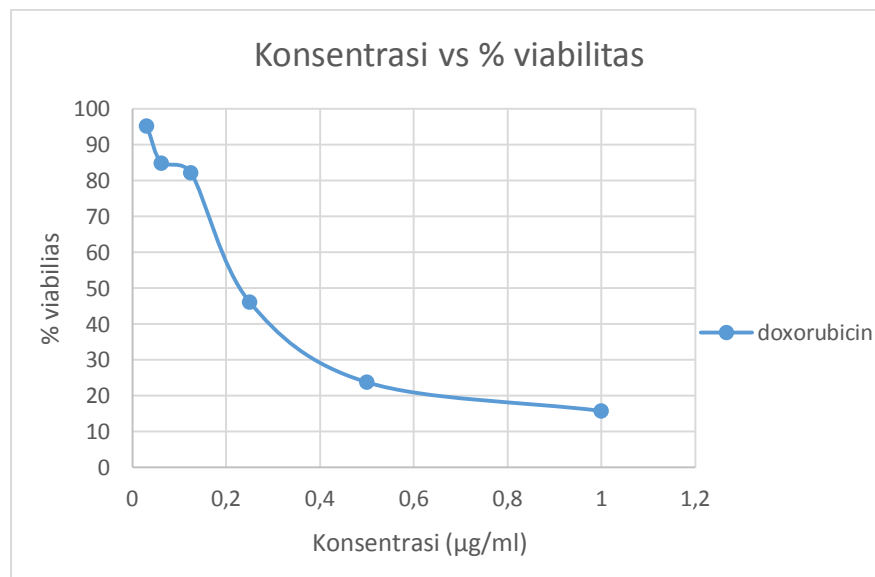
Gambar 4. (A) Morfologi sel T47D pada perbesaran 40x setelah pemberian sampel, (B) morfologi sel T47D pada perbesaran 40x setelah pemberian MTT

Kristal formazan ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya dan disajikan dalam bentuk grafik % viabilitas sel terhadap log C (Gambar 5). Persentasi viabilitas sel menunjukkan persentasi kehidupan sel setelah perlakuan. Hasil pemberian larutan uji pada konsentrasi rendah yaitu 7 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan populasi sel yang hidup masih banyak berkisar 85-100%, sedangkan dengan meningkatnya konsentrasi, sel yang hidup semakin berkurang. Hal ini menunjukkan adanya kemampuan senyawa yang terkandung dalam ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana yang berperan dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker. Namun pada grafik perlakuan fraksi air pada konsentrasi tertinggi yaitu 500 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan populasi sel yang hidup masih banyak berkisar 30-40%, berbeda dengan sampel lainnya, hal ini menunjukkan bahwa dengan perlakuan fraksi air kurang efektif dalam penghambatan sel kanker. Berdasarkan grafik kelompok ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana serta kontrol positif tersebut menunjukkan persentasi viabilitas sel berkurang seiring bertambahnya konsentrasi sampel. Namun hal ini hanya terjadi pada ekstrak dan fraksi *n*-heksana serta kontrol positif doxorubicin, sedangkan pada fraksi etil asetat persentasi viabilitas konsentrasi II (250 $\mu\text{g/ml}$) lebih kecil daripada persentasi viabilitas pada konsentrasi terbesar yaitu I (500 $\mu\text{g/ml}$). Hal ini bisa

disebabkan pada saat pendistribusian sel kedalam *well* tidak homogen. Maka dari itu akan diidentifikasi menggunakan perhitungan lebih lanjut pada nilai IC_{50} yang dapat dilihat pada Lampiran 14.



Gambar 5. Grafik hasil interpretasi konsentrasi sampel (ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksana) dengan % viabilitas sel T47D



Gambar 6. Grafik hasil interpretasi konsentrasi kontrol positif (Doxorubicin) dengan % viabilitas sel T47D

IC_{50} merupakan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi sel. Analisa hasil dibuat dalam grafik persamaan linier antara % kehidupan sel dengan log konsentrasi. Penentuan nilai

IC₅₀ pada penelitian terhadap ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksana masing-masing dilakukan dengan regresi linier pada 7 titik konsentrasi yaitu (500; 250, 125; 62,5; 31,2; 15,6 dan 7,8) µg/ml dan penentuan nilai IC₅₀ pada kontrol positif doxorubicin dilakukan dengan regresi linier pada 6 titik konsentrasi yaitu (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; dan 0,03) µg/ml (Gambar 6).

Tabel 8. Hasil uji sitotoksik

Bahan uji	Nilai r	IC₅₀ (µg/ml)
Ekstrak	0,8729	87,794
Fraksi air	0,9442	162,536
Fraksi etil asetat	0,8983	52,991
Fraksi <i>n</i> -heksana	0,9412	44,730
Doxorubicin	0,8073	1,532

Nilai *r* merupakan koefisien korelasi yang menunjukkan linieritas atau tidaknya data absorbansi. Harga koefisien nilai *r* sebesar 0,61-0,90 tergolong interpretasi cukup sehingga data yang terdapat pada tabel 8 menunjukkan interpretasi cukup adanya hubungan variasi konsentrasi sampel uji dengan % viabilitas sel (Scheffler 1987).

Senyawa dinyatakan memiliki aktivitas sitotoksik apabila memiliki nilai IC₅₀ di bawah 100 µg/ml (Ueda *et al.* 2002), sedangkan berdasarkan *National Cancer Institute* (NCI) menyatakan IC₅₀ < 30 µg/ml sangat aktif memiliki aktivitas antikanker, IC₅₀ ≥ 30 µg/ml moderate aktif dan IC₅₀ < 100 µg/ml, dan dikatakan tidak aktif apabila IC₅₀ > 100 µg/ml. Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa fraksi air rimpang jahe merah memiliki nilai IC₅₀ yang paling besar daripada ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana, yaitu nilai IC₅₀ fraksi air sebesar 162,536 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi air tidak mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D.

Ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana memiliki nilai IC₅₀ yang masuk dalam kriteria aktivitas antikanker yang moderate aktif, dimana nilai IC₅₀ ekstrak sebesar 87,794 µg/ml, fraksi etil asetat nilai IC₅₀ sebesar 52,991 µg/ml dan fraksi *n*-heksana nilai IC₅₀ sebesar 44,730 µg/ml. Sedangkan doxorubicin yang digunakan sebagai senyawa pembanding mempunyai nilai IC₅₀ lebih rendah dari rimpang jahe merah yaitu 1,532 µg/ml lebih rendah dari 30 µg/ml. Hasil tersebut berbeda jauh dengan nilai IC₅₀ ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-

heksana rimpang jahe merah dikarenakan masing-masing memiliki aktivitas yang berbeda dan sampel yang digunakan merupakan obat herbal sehingga proses dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker lebih lama. Nilai IC_{50} belum menjelaskan penyebab kematian sel yang dikarenakan sel mengalami kematian akibat apoptosis atau nekrosis.

Ekstrak etanol rimpang jahe merah berdasarkan hasil identifikasi kandungan senyawa didapatkan hasil positif terhadap terpenoid, flavonoid, tanin, dan alkaloid. Menurut Rahman *et al.* (2011) senyawa aktif seperti flavonoid, diterpenoid, triterpenoid dan alkaloid telah terbukti memiliki aktivitas antikanker. Berdasarkan hal tersebut diharapkan ekstrak mempunyai aktivitas antikanker yang kuat karena mengandung semua senyawa yang diduga mempunyai aktivitas antikanker. Namun hasil uji sitotoksik ekstrak diperoleh nilai IC_{50} yang cukup besar dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat. Rendahnya aktivitas sitotoksik pada ekstrak etanol kemungkinan disebabkan karena dalam ekstrak tersebut terdapat beragam senyawa baik senyawa bersifat polar, semipolar dan non polar sehingga efek toksiknya saling mempengaruhi. Hal tersebut menunjukkan bahwa efek komplementer pada ekstrak akan membuat aktivitasnya lebih kecil dibanding dengan efek senyawa terpisah pada fraksi.

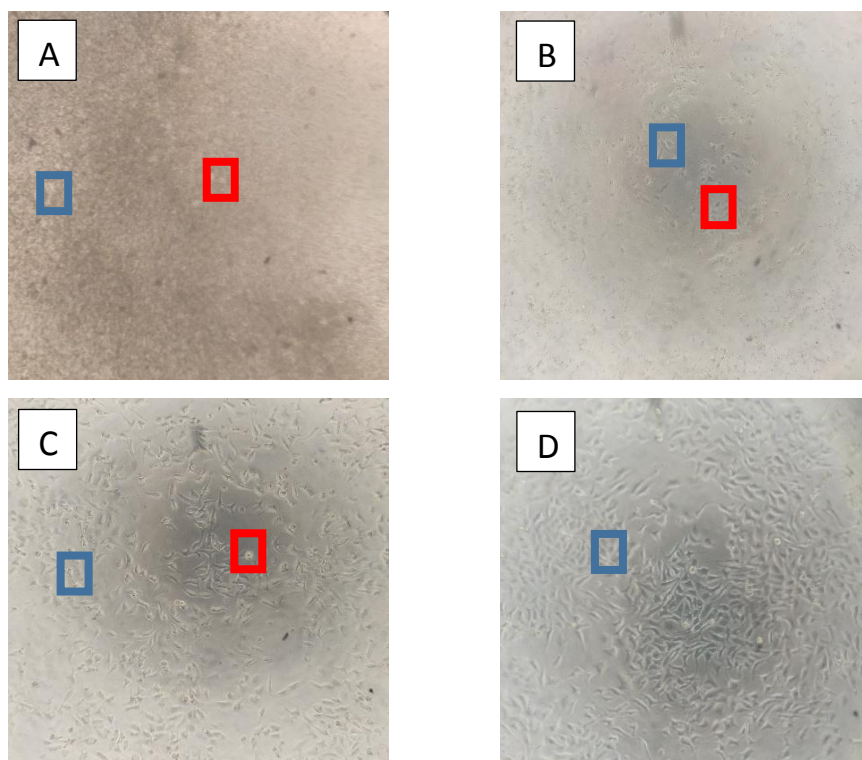
Penelitian yang dilakukan oleh Maya Fadlilah (2013) menunjukkan kandungan senyawa yang terdapat pada rimpang jahe merah dari hasil fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol pada pengujian secara *in vitro* diindikasikan mengandung senyawa terpenoid pada ekstrak dan fraksi *n*-heksana, sedangkan fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid serta fraksi metanol mengandung alkaloid. Berdasarkan pengujian kualitatif KLT positif terpenoid pada fraksi *n*-heksana dan pada fraksi etil asetat positif senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin. Fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat mempunyai nilai IC_{50} yang lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi air, hal ini mengindikasikan bahwa keberadaan senyawa aktif yang mempunyai efek sitotoksik berada pada fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat.

Senyawa terpenoid yang terkandung dalam fraksi *n*-heksan rimpang jahe merah mempunyai aktivitas antikanker. Menurut penelitian Puspitasari *et al.*

(2015), senyawa terpenoid membantu tubuh dalam pemulihan sel-sel tubuh serta senyawa terpenoid dapat memblokir siklus sel pada fase G2 dengan menstabilkan benang-benang spindle pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat. Tahap mitosis (M) sel difokuskan pada aktifitas yang diperlukan untuk pembelahan sel, sehingga bila proses mitosis dihambat sel akan mengalami kegagalan dalam membelah menjadi dua sel anak. Senyawa terpenoid dapat menginduksi apoptosis dan sebagai agen antiproliferasi melalui jalur intrinsik (Hasanuddin *et al.* 2015). Sel ganas mengalami gangguan kontrol maupun hambatan apoptosis. Kontrol apoptosis dikaitkan dengan gen yang mengatur berlangsungnya siklus sel, salah satunya melibatkan gen *p53*. Aktifitas gen *p53* berperan dalam pengrusakan DNA dengan cara menginduksi apoptosis (Hernawati *et al.* 2013).

Kelompok fraksi etil asetat memiliki aktivitas sitotoksik diduga karena adanya kandungan senyawa flavonoid, tanin dan alkaloid. Senyawa flavonoid dapat menghambat proliferasi melalui penghambatan proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker, mekanisme ini diperantarai penurunan enzim xanthin oksidase, *siklo oksigenase* (COX) dan *lipo oksigenase* (LOX) yang diperlukan dalam proses pro-oksidase sehingga menunda siklus sel (Fadlilah 2013). Kelangsungan hidup sel kanker dapat ditekan melalui penghambatan angiogenesis oleh flavonoid. Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dalam tubuh yang berperan penting dalam pertumbuhan dan penyebaran kanker. Melalui penghambatan angiogenesis sel kanker akan mengalami kematian karena tidak mendapat suplai nutrisi dan oksigen (Mater 2001). Senyawa alkaloid juga berperan penting dalam aktivitas sitotoksik. Mekanisme kerjanya sebagai antikanker adalah dengan mengikat tubulin dan menghambat pembentukan komponen mikrotubulin pada kumparan mitosis sehingga metafase berhenti (Endah *et al.* 2015). Senyawa tanin juga memiliki aktivitas antikanker, menurut Meiyanto *et al.* (2008) mekanisme tanin sebagai antikanker sejalan dengan fungsinya sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker.

Kelompok fraksi air tidak memberikan efek sitotoksik pada sel kanker payudara T47D, hal ini dimungkinkan karena sebagian besar senyawa aktif yang berperan sebagai agen sitotoksik seperti terpenoid, tanin, flavonoid dan alkaloid (Meiyanto 2007) sudah tertarik pada saat proses fraksinasi oleh pelarut etil asetat dan pelarut n-heksana. hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa yang bertanggungjawab dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker T47D merupakan senyawa yang bersifat lebih non polar. Sifat air sangat polar sehingga menyebabkan senyawa akan sulit menembus membran sel kanker yang bersifat non polar.



Keterangan : Kotak biru : sel hidup
Kotak merah : sel mati

Gambar 7. Morfologi sel T47D pada perbesaran 40x setelah pemberian fraksi n-heksana. Keterangan : fraksi n-heksana rimpang jahe merah dengan konsentrasi (A) 500 µg/ml, (B) 62,5 µg/ml, (C) 7,8 µg/ml, (D) kontrol sel

Fraksi n-heksan rimpang jahe merah memiliki nilai IC₅₀ yang paling kecil daripada fraksi lain, yang menunjukkan bahwa fraksi n-heksana merupakan fraksi yang lebih poten daripada fraksi lain terhadap sel T47D dan termasuk dalam fraksi dengan aktivitas antikanker kategori sedang. Profil morfologi sel

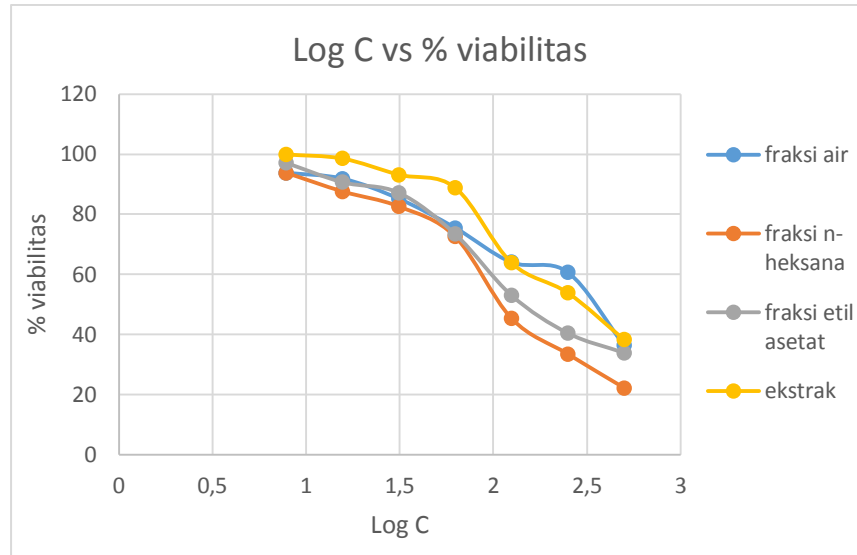
akibat perlakuan fraksi n-heksana setelah 24 jam perlakuan diamati pada perbesaran 40x. Perlakuan fraksi n-heksana menyebabkan sel T47D mengalami perubahan morfologi yaitu sel tampak mengerut, terlihat sel yang mengalami kematian dan jumlah sel berkurang (Gambar 7 a, b dan c), sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal (Gambar 7d). Gambar 7d menunjukkan populasi sel T47D pada kelompok kontrol sel yang terlihat lonjong, menempel satu dengan yang lain dan menempel di dasar *plate*, serta memiliki warna yang lebih cerah karena masih mengandung cairan sitoplasma yang dapat meneruskan cahaya dari mikroskop *inverted*. Kondisi fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat 500 µg/ml (Gambar 7a), morfologi sel T47D yang mati terlihat bulat lebih gelap, kepadatan sel berkurang, dan sel terlihat mengambang, sedangkan pada konsentrasi 7,8 µg/ml (Gambar 7c), kepadatan populasi sel mendekati kepada kontrol sel yang menandakan viabilitas sel masih tinggi.

9. Uji indeks selektivitas

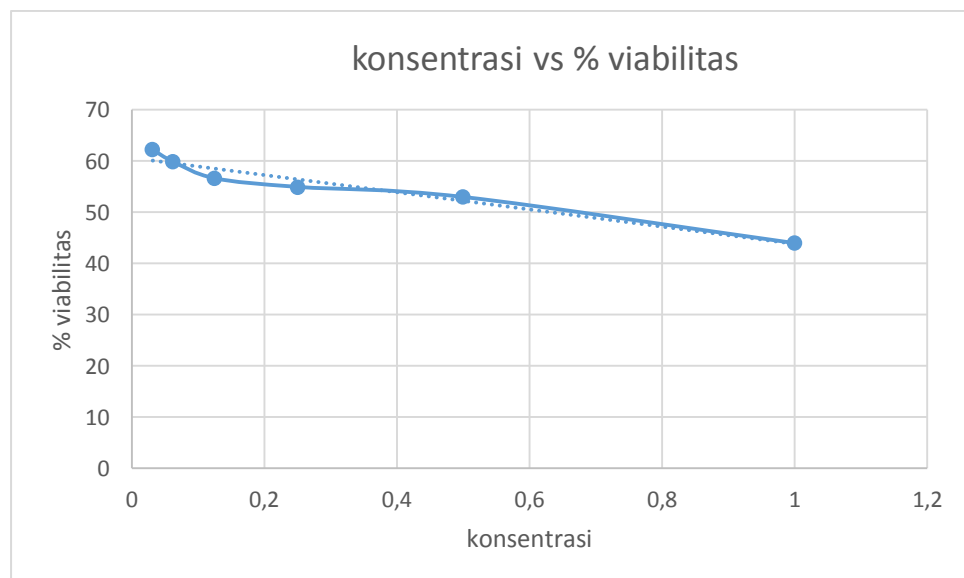
Keamanan rimpang jahe merah dievaluasi dengan mengukur indeks selektivitas yang dilakukan pada ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana rimpang jahe merah. Indeks selektivitas bertujuan mengetahui selektivitas sitotoksik (keamanan) dari sampel terhadap sel kanker *versus* sel vero (normal), yang dihitung dengan membandingkan nilai IC_{50} masing-masing sampel terhadap sel vero (normal) dengan nilai IC_{50} masing-masing sampel terhadap sel T47D. Indeks selektivitas diperoleh dengan menggunakan metode MTT yang perlu diketahui dahulu nilai IC_{50} sel vero dan IC_{50} sel T47D. Prosedur maupun konsentrasi yang digunakan pada pengujian MTT terhadap sel vero sama dengan pengujian MTT terhadap sel T47D.

Persentasi viabilitas sel menunjukkan persentasi kehidupan sel setelah perlakuan. Grafik hubungan pada kelompok perlakuan ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana menunjukkan terjadinya penurunan persentasi kehidupan sel pada konsentrasi tinggi, namun pada perlakuan fraksi n-heksana penurunan persentasi kehidupan sel yang paling rendah daripada perlakuan kelompok lain (Gambar 8). Kontrol pembanding doxorubicin pada grafik

persentasi viabilitas sel tidak menunjukkan penurunan yang drastis dari konsentrasi kecil ke konsentrasi besar (Gambar 9).



Gambar 8. Grafik hasil interpretasi konsentrasi sampel (ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksana) dengan % viabilitas sel vero



Gambar 9. Grafik hasil interpretasi konsentrasi kontrol positif (Doxorubicin) dengan % viabilitas sel vero

Nilai SI tinggi ($>3,00$) menunjukkan senyawa memberikan toksisitas selektif terhadap sel-sel kanker. Sedangkan senyawa dengan nilai SI $< 3,00$ dianggap dapat memberi toksisitas umum dan juga menyebabkan sitotoksitas di sel normal ((Prayong *et al.* 2008). Hasil uji indeks selektivitas dapat dilihat pada

tabel 8 yang menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana memiliki indeks selektivitas lebih dari 3 sehingga dapat dinyatakan bahwa ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana rimpang jahe merah memberikan toksisitas selektif pada sel T47D dan tidak menyebabkan efek sitotoksik pada sel normal. Sedangkan kontrol pembanding doxorubicin memiliki SI $2,80 < 3$ yang menunjukkan bahwa doxorubicin dapat menyebabkan toksisitas pada sel normal.

Tabel 8. Hasil uji indeks selektivitas

Bahan uji	IC₅₀ sel vero (µg/ml)	IC₅₀ sel T47D (µg/ml)	Indeks selektivitas
Ekstrak	341,964	87,794	3,89
Fraksi air	533,367	162,536	3,2
Fraksi etil asetat	182,649	52,991	3,41
Fraksi n-heksana	122,241	44,730	3,01
Doxorubicin	4,290	1,532	2,80

Tingginya selektivitas rimpang jahe merah (Tabel 8) menunjukkan adanya potensi rimpang jahe merah sebagai agen kemopreventif. Selektivitas agen kemopreventif yaitu hanya sel kanker saja yang diserang, sementara sel normal tidak diserang. Mekanisme ini sangat berbeda dengan cara kerja doxorubicin yang menyerang sel kanker dan juga sel normal. Akibatnya sel normal ikut rusak dan mati yang berakibat pada timbulnya berbagai efek samping (Putriana 2019). Mekanisme doxorubicin yaitu dengan meracuni enzim topoisomerase. Enzim topoisomerase berperan dalam proses replikasi, transkripsi dan rekombinan DNA dan juga proliferasi dan diferensiasi sel normal dan sel kanker. Penghambatan enzim topoisomerase mengakibatkan proses dalam sel akan terhenti dan akhirnya akan terjadi kematian sel tersebut (Webb dan Ebeler 2004).