

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA
HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L.)
TERHADAP KULTUR SEL HELA**



Oleh:

**Hilda Khairunnisa Sholiqin
20144157A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA
HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L.)
TERHADAP KULTUR SEL HELA**

HALAMAN JUDUL



Oleh:

**Hilda Khairunnisa Sholiqin
20144157A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2018**

PENGESAHAN SKRIPSI
berjudul

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA
HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L)
TERHADAP KULTUR SEL HELA**

Oleh :

Hilda Khairunnisa Sholiqin
20144157A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal :

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Prof. Dr. R. A. Octaria, MM., M. Sc., Apt.

Pembimbing,

Mamik Ponco Rahayu, M.Sc., Apt

Pembimbing Pendamping

Ghani Nurfiiana Fadma Sari, M.Farm., Apt

PENGUJI :

1. Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt
2. Dr. Ika Purwidyaningrum, M.Sc., Apt
3. Dr. Ana Indrayati, M.Si
4. Mamik Ponco Rahayu, M.Sc., Apt

1) _____
2) _____
3) _____
4) _____

PERSEMBAHAN

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakan dengan sungguh-sungguh (urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap”

{ Q.S. Al Insyira : 6-8 }

Yang Utama dari segalanya Allah SWT

Taburan cinta dan kasih sayang-Mu telah memberikanku kekuatan, membekaliku dengan ilmu serta melimpahkanku dengan segala kemudahan. Sholawat dan salam selalu terlimpahkan keharibaan Rasulullah Muhammad SAW.

Yang tercinta keluagaku Ayahanda Sholiqin, Ibunda Nurul Hidayah,

Orang tuaku yang telah membesarkan dan mengasihiku dari kecil hingga saat ini.

Hanya ucapan terima kasih yang setulusnya tersirat dihati yang ingin kusampaikan atas segala usaha dan jerih payah pengorbanan untuk anakmu selama ini. Semoga ini menjadi langkah awal untuk membuat abih dan umi bahagia.

Yang tersayang adik adik ku Zia dan Afran

Tiada yang paling membahagiakan selain saat berkumpul bersama kalian, terima kasih atas do'a dan semangat yang diberikan selama ini, aku akan selalu berusaha menjadi yang terbaik.

Yang saya Hormati Abah Ibu Nyai di Kudus (Abah ibu Amin dan bapak ibu Asrori)

Kota Kecil yang selalu memberi pembelajaran terbesar dalam kehidupanku. Tanpa doa Beliau saya tak akan bisa menggapai sampai sekarang. Karena doa orang soleh adalah salah satu doa mujarap dalam kehidupan ini

Sahabat-sahabatku

Konco pondok, bidadari surgaku, teman seperjuangan, dan FST-OA angkatan 2014 yang mengangkatku ketika ku jatuh, kalianlah sahabat sejati yang hebat

Tulisan kita saat ini adalah impian kita dimasa depan, maka tulisalah mimpi itu dan berdoalah. Karena mimpi adalah awal dari kesuksesan.

{ Penulis }

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 15 Januari 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Hilda Khairunnisa S.', with a stylized flourish at the end.

Hilda Khairunnisa S.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L) TERHADAP KULTUR SEL HELA ”**. Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh derajat sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak sehingga penulis menyampaikan terimakasih kepada yang terhormat :

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Mamik Ponco Rahayu, M.Si.,Apt selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan, nasehat, dan ilmunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Ghani Nurfiana Fadma Sari, M.Farm.,Apt., selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan koreksi pada penulis.
5. Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt. Selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk skripsi ini.
6. Dr. Ika Purwidyaningrum, M.Sc.,Apt. Selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk skripsi ini.
7. Dr. Ana Indrayati, M.Si. Selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk skripsi ini.
8. Bapak, ibu, adek-adek dan semua keluarga terima kasih untuk do'a, dukungan dan semangat yang diberikan
9. Bapak ibu Pondok di Kudus terimakasih atas doa yang tak terduga dan barokah doanya.

10. Temen pondok (Pyel, MbK Alfi, MbK fitya) yang selalu memberikan doa semangat tanpa doa orang soleh saya tak akan seperti ini.
11. Konco kamar dan bidadari surgaku (Zainab, Desi, Ani, Icha, Febry, Kinny, Kiki, Putri) terima kasih untuk semangat dan bantuannya kalian terbaik.
12. Temen FSTOA 2014 dan GengK Upak-upuk (Sekar, Alfa, Desi, Kiki, Hadi, Fannia, Ika, Venin) yang telah mendukung dan mendoakan saya juga bersedia saya repotkan hingga skripsi ini selesai.
13. Kakak FSTOA teruma (mbk Siska, mbk Kiki, mbk Devina, mas Bagas, mbk Dilla) yang telah membimbing selama saya menjadi adek tingkat dan bantuannya dalam tugas kampus.
14. Segenap dosen, staff, laboran, dan asisten laboratorium, perpustakaan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan bantuan selama penelitian.
15. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari pihak terkait maka skripsi ini tidak selesai dengan baik. Penulis juga menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat berharap kritik dan saran. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh masyarakat dan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.

Surakarta, 15 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	Error! Bookmark not defined.
PERSEMBAHAN	ii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Kegunaan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Tanaman Kemangi.....	4
1. Sistematika tanaman.....	4
2. Nama daerah.....	4
3. Morfologi tanaman	4
4. Khasiat tanaman kemangi	5
5. Kegunaan kemangi	5
B. Simplisia	5
1. Pengertian simplisia	5
2. Pengumpulan simplisia.....	6

3.	Pemilihan sampel	6
4.	Pengeringan	6
C.	Ekstraksi.....	7
1.	Pengertian ekstraksi.....	7
2.	Pengertian ekstrak	7
3.	Metode ekstraksi.....	7
4.	Fraksinasi.....	8
5.	Pelarut.....	8
D.	Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	9
E.	Kanker.....	11
1.	Pengertian kanker	11
2.	Kanker serviks	11
3.	Faktor-faktor risiko terjadi kanker serviks	12
3.1	Umur.....	12
3.2	Pernikahan dan aktivitas seksual pada usia muda.	12
3.3	Kebiasaan berganti pasangan.....	12
3.4	Agen infeksius.	13
3.5	Merokok.....	13
4.	Pencegahan kanker serviks.....	13
4.1	Skrining.....	13
4.2	Infeksi visual asam asetat.	13
4.3	Pap smear.....	14
4.4	Thin Prep.	14
4.5	Kolpoxin.....	14
5.	Pengobatan kanker	14
5.1	Kemoterapi.	14
5.2	Radioterapi.....	15
5.3	Pembedahan.....	15
5.4	Imonoterapi atau bioterapi.....	15
F.	Siklus Sel	15
1.	Fase G1 (<i>Growth phase-1</i> atau <i>pasca mitosis</i>)	16
2.	Fase S (<i>Synthetic phase</i> atau <i>sintesis</i>).....	16
3.	Fase G2 (<i>Growth phase-2</i> atau <i>Pra Mitosis</i>)	16
4.	Fase M (<i>mitotic Phase</i> atau <i>Mitosis</i>).....	16
G.	Sel HeLa	17
H.	Sel Vero	18
I.	Uji Sitotoksik	19
J.	Metode Pengujian Aktivitas Sitotoksi (MTT Assay).....	20
K.	Uji Indeks Selektivitas	21
L.	Landasan Teori	22
M.	Hipotesis	23
N.	Kerangka pikir	24
BAB III METODE PENELITIAN.....		25
A.	Populasi dan sampel.....	25
B.	Variabel Penelitian.....	25

1.	Identifikasi variabel utama	25
2.	Klasifikasi variabel utama	25
3.	Definisi operasional variabel utama	26
C.	Bahan dan Alat.....	27
1.	Bahan.....	27
2.	Alat	27
D.	Jalannya Penelitian	28
1.	Determinasi tanaman kemangi	28
2.	Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan sampel herba kemangi	28
3.	Pembuatan ekstrak herba kemangi	28
4.	Pembuatan fraksi <i>n</i> -heksana.....	29
5.	Kontrol kualitas serbuk herba kemangi.....	29
5.1	Pemeriksaan organoleptis.....	29
5.2	Penetapan susut pengeringan.....	29
5.3	Penetapan kadar air dengan metode destilasi.....	29
5.4	Penetapan kadar sari yang larut dalam etanol.....	30
5.5	Penetapan kadar sari yang larut air.....	30
6.	Kontrol kualitas ekstrak herba kemangi.....	30
6.1	Pemeriksaan organoleptis.....	30
6.2	Penetapan kadar air.....	30
6.3	Penetapan susut pengeringan.....	31
7.	Identifikasi kandungan kimia sampel herba kemangi dengan metode tabung	31
7.1	Flavonoid.....	31
7.3	Minyak atsiri.....	31
7.4	Alkaloid.....	31
7.5	Tanin.....	32
8.	Identifikasi kandungan kimia sampel herba kemangi dengan KLT	32
8.1	Flavonoid.....	32
8.2	Tanin.....	32
8.3	Steroid/triterpenoid.....	32
8.4	Minyak atsiri.....	32
9.	Uji sterilisasi.....	33
9.1	Sterilisasi LAF.....	33
9.2	Sterilisasi alat.....	33
10.	Pembuatan medium kultur DMEM	33
11.	Preparasi sel.....	33
11.1	Pengaktifan sel HeLa.....	34
11.2	Pengaktifan sel Vero.....	34
12.	Pemanenan dan perhitungan sel HeLa dan sel Vero	34
13.	Pembuatan larutan uji	33
14.	Uji Sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel Vero	35
E.	Analisis Data.....	36

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	39
1. Hasil determinasi tanaman	39
2. Hasil pembuatan serbuk herba kemangi.....	39
3. Hasil pembuatan ekstrak etanol herba kemangi	40
4. Pembuatan fraksi <i>n</i> -heksana	41
5. Hasil identifikasi dan kontrol kualitas serbuk herba kemangi 41	
5.1 Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk herba kemangi. ...	41
5.2 Hasil penetapan susut pengeringan.	42
5.3 Hasil penetapan kadar air herba kemangi dengan cara destilasi.	42
5.5 Hasil penetapan kadar sari larut etanol.....	44
6. Hasil kontrol kualitas ekstrak dan fraksi herba kemangi	44
6.1 Hasil identifikasi organoleptis sampel herba kemangi....	44
6.2 Hasil identifikasi organoleptis fraksi <i>n</i> -heksana.	45
6.3 Hasil penetapan susut pengeringan.	45
6.4 Hasil penetapan kadar air.	45
7. Hasil skrining fitokimia sampel herba kemangi.....	46
8. Identifikasi kandungan senyawa herba kemangi dengan metode KLT	47
9. Uji sitotoksik ekstrak dan fraksi <i>n</i> -heksana herba kemangi ...	51
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	 61
A. Kesimpulan	61
B. Saran	61
 DAFTAR PUSTAKA	 62
 LAMPIRAN.....	 69

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Siklus Sel	16
Gambar 2. Reaksi reduksi MTT menjadi Formazan	20
Gambar 3. Diagram kerangka pikir	24
Gambar 4. Skema bilik hitung dalam haemocytometer.....	25
Gambar 5. Skema pembuatan fraksi n-heksana herba kemangi.....	37
Gambar 6. Skema uji sitotoksik.....	38
Gambar 7. Morfologi Sel HeLa (a) dan Sel Vero (b) pada media DMEM	51
Gambar 8. Morfologi sel HeLa setelah penambahan fraksi n-heksana herba kemangi sebelum diberi MTT konsentrasi 250 (a) konsentrasi 7,18 (b) dan kontrol sel (c) cisplatin (d)	53
Gambar 9. Morfologi sel Vero setelah penambahan fraksi n-heksana herba kemangi sebelum diberi MTT konsentrasi 250 (a) konsentrasi 7.8 (b)	54
Gambar 10. Morfologi Sel hidup yang membentuk kristal formazan pada mikroskop pembesaran 100 X	54
Gambar 11. Presentase sel hidup pada sel HeLa dan sel Vero pada seri konsentrasi pada sampel herba kemangi (b) dan cisplatin (b)	55
Gambar 12. Hasil uji IC50 aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel Vero	58

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rendemen berat herba kemangi berdasarkan berat basa	40
Tabel 2. Rendemen ekstrak etanol herba kemangi	41
Tabel 3. Rendemen fraksi n-heksana herba kemangi	41
Tabel 4. Hasil organoleptis serbuk herba kemangi	42
Tabel 5. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk herba kemangi	42
Tabel 6. Hasil penetapan kadar air serbuk herba kemangi	43
Tabel 7. Hasil penetapan kadar sari larut air serbuk herba kemangi	43
Tabel 8. Hasil penetapan kadar sari larut etanol serbuk herba kemangi.....	44
Tabel 9. Hasil organoleptis ekstrak etanol herba kemangi	44
Tabel 10. Hasil organoleptis fraksi n-heksana herba kemangi	45
Tabel 11. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak herba kemangi.....	45
Tabel 12. Hasil penetapan kadar air ekstrak herba kemangi	45
Tabel 13. Hasil identifikasi kandungan kimia sampel herba kemangi	46
Tabel 14. Hasil identifikasi flavonoid ekstrak dan fraksi n-heksana herba kemangi secara KLT	47
Tabel 15. Hasil identifikasi alkaloid ekstrak dan fraksi n-heksana herba kemangi secara KLT	48
Tabel 16. Hasil identifikasi triterpenoid/steroid ekstrak dan fraksi n-heksana herba kemangi secara KLT	48
Tabel 17. Hasil identifikasi tanin ekstrak dan fraksi n-heksana herba kemangi secara KLT	49
Tabel 18. Hasil identifikasi minyak atsiri ekstrak dan fraksi n-heksana herba kemangi secara KLT	50
Tabel 19. Hasil perhitungan % viabilitas sampel herba kemangi.....	55
Tabel 20. Hasil perhitungan % viabilitas cisplatin herba kemangi.....	56

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat keterangan determinasi tanaman herba kemangi.....	70
Lampiran 2. Surat ijin penelitian	71
Lampiran 3. Surat keterangan selesai penelitian	72
Lampiran 4. Alat- Alat untuk pembuatan sampel	73
Lampiran 5. Pembuatan sampel herba kemangi.....	74
Lampiran 6. Perhitungan rendemen sampel herba kemangi	77
Lampiran 7. Hasil uji susut pengeringan sampel herba kemangi.....	78
Lampiran 8. Hasil Uji kadar air sampel herba kemangi.....	79
Lampiran 9. Perhitungan kadar sari larut air herba kemangi	80
Lampiran 10. Perhitungan kadar sari larut etanol herba kemangi	82
Lampiran 11. Hasil identifikasi menggunakan preaksi warna	84
Lampiran 12. Hasil identifikasi KLT herba kemangi	86
Lampiran 13. Pola Mikroplate uji MTT.....	92
Lampiran 14. Perhitungan volume panen	94
Lampiran 15. Perhitungan seri konsentrasi fraksi herba kemangi.....	95
Lampiran 16. Degradasi warna saat sebelum pemberian sampel, sesudah pemberian sampel dan sesudah pemberian MTT	99
Lampiran 17. Morfologi sel HeLa ekstrak dan fraksi pada sel HeLa	100
Lampiran 18. Perhitungan IC50 sampel herba kemangi	102
Lampiran 19. Perhitugan nilai indeks selektivitas fraksi n-heksana herba kemangi.....	106
Lampiran 20. Alat dan bahan uji sitotoksik	107

DAFTAR SINGKATAN

MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2- <i>il</i>)-2,5-difenil tetrazolium bromida
IARC	International Agency for Research on Cancer
ELISA	Enzim-Linked Immuno-Sorbent Assay
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50
R _f	Retention factor
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
HPV	Human Papilloma Virus
RNA	Ribosa Nucleic Acid
WHO	World Helath Organization
DNA	Deribosa Nucleic Acid
IS	Indeks Selektivitas
SDS	Sodium Dodesil Sulfat
PBS	Phospat Buffer Saline
FBS	Fetal Bovine Serum
DMSO	Dimetil Sulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

INTISARI

SHOLIQIN H.K, 2018, UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA HERBA KEMANGI (*Ocimum basilicum* L) TERHADAP KULTUR SEL HELA, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA

Kanker adalah pertumbuhan sel-sel tubuh yang tidak terkontrol atau abnormal. Kanker serviks merupakan salah satu kanker penyebab kedua kematian wanita di Indonesia setelah kanker payudara. Herba kemangi (*Ocimum basilicum* L) banyak digunakan sebagai alternatif pengobatan kanker. Oleh karena itu, dilakukan penelitian efek sitotoksik herba kemangi terhadap sel HeLa dan sel Vero untuk mengetahui potensinya sebagai antikanker. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui nilai IC_{50} herba kemangi terhadap sel HeLa dan sel Vero dan mengetahui kandungan golongan senyawa kimia yang berpotensi sebagai antikanker.

Ekstraksi herba kemangi dilakukan dengan maserasi kemudian fraksinasi cair-cair dengan pelarut *n*-heksana dan dilakukan karakteristatik simplisia sebagai kontrol kualitas. Fraksi *n*-heksana diuji efeknya terhadap sel HeLa dan sel Vero menggunakan metode MTT dengan seri konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Cisplastin digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol sel sebagai kontrol negatif.

Hasil penelitian ini diketahui fraksi *n*-heksana mengandung senyawa triterpenoid, steroid, minyak atsiri dan flavonoid. Hasil pengujian aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana herba kemangi terhadap sel HeLa menunjukkan nilai IC_{50} 120,55 $\mu\text{g/ml}$ dan Vero sebesar 1515,43 $\mu\text{g/mL}$ dengan indeks selektivitas sebesar 12,57. Hal ini membuktikan bahwa fraksi *n*-heksana herba kemangi memiliki efek sebagai agen kemopreventif terhadap sel kanker serviks.

Kata kunci : herba kemangi (*Ocimum basilicum* L), Sitotoksik, fraksi *n*-Heksana, Sel HeLa, Sel Vero.

ABSTRACT

SHOLIQIN H.K, 2018, THE SYTOTOXIC ACTIVITY of *n*-HEXANE FRACTION of BASIL (*Ocimum basilicum* L) HERBS on HELA CELL CULTURES, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA

Cervical cancer is one the second leading cause of death of women in Indonesia after breast cancer. Cancer is the growth of body cells that are not controlled or abnormal. Basil herbs (*Ocimum basilicum* L) are widely used as an alternative to cancer treatment. It have to do study the cytotoxic effects of basil effect on heLa cells and Vero cells were investigated for their potency as anticancer. The purpose of this research is to know the value of Basil's herbal IC50 against HeLa cells and Vero cells and to know the chemical group compounds potentially as anticancer.

Basil herb extraction was done by maceration then liquid-liquid fractionation with n-hexane solvent and characteristic of simplicia as quality control. The *n*-hexane fractions were tested for their effect on HeLa cells and Vero cells using the MTT method with various series of 500 µg / mL; 250 µg / mL; 125 µg / mL; 62,5; µg/mL, 31,25 µg/mL; 15,625 µg/mL. Cisplatin is used as a positive control and control cell is used as a negative control.

The results of this study are known *n*-hexane fraction containing triterpenoid compounds, steroids, essential oils and flavonoids. The result of cytotoxic activity of *n*-hexane fraction of basil on HeLa cells showed IC50 value 120,55 µg / mL and Vero 1515,43µg / mL with selectivity index of 12,57. This proves that the histopathic *n*-hexane fraction has an effect as a chemopreventive agent against cervical cancer cells.

Keywords: Cytotoxic, Basil herbs (*Ocimum basilicum* L), HeLa cells, Vero cells.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker adalah kelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan dan penyebaran sel abnormal yang tidak terkendali. Pada tahun 2012, kanker menjadi penyebab kematian sekitar 8,2 juta orang dan lebih dari 70% kematian terjadi di negara miskin dan berkembang (Kemkes RI 2015). Di Indonesia kanker serviks menempati urutan kedua setelah kanker payudara yang dialami oleh wanita (Rekam Medis RS Kanker Dharmais 2012). Menurut International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012) Dilihat dari kontrol umur diketahui bahwa kanker serviks memiliki presentase tertinggi setelah kanker payudara dan kanker prostat yaitu sebesar 14 % dan presentase kematian akibat kanker serviks adalah 6,8%. Berdasarkan kondisi ini, pengatasan kanker dengan menghambat dan mematikan pertumbuhan sel kanker secara selektif perlu diupayakan.

Terapi pengobatan dan penghambatan kanker serviks telah dilakukan diantaranya dengan menggunakan terapi bedah, radioterapi, dan kemoterapi maupun kombinasi ketiganya (Nakano *et al.* 2010). Antikanker yang ada sekarang umumnya menekan pertumbuhan sel tetapi menimbulkan toksisitas karena menghambat pembelahan sel normal yang proliferasinya sangat cepat. Minat masyarakat terhadap penggunaan obat tradisional akhir-akhir ini cenderung meningkat. Hal ini disebabkan adanya kekhawatiran efek samping yang ditimbulkan oleh obat-obat konvensional dan juga dengan alasan obat tradisional mudah didapat dan murah harganya (Kurnijasanti *et al.* 2008).

Tanaman kemangi merupakan spesies dari genus *Lamiaceae* yang telah dilaporkan memiliki banyak kandungan senyawa kimia yang berpotensi sebagai antikanker. Penelitian Ismiyati dan Nurhaeni (2016) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kemangi memiliki efek kemoprefentif pada sel HeLa dengan nilai IC₅₀ adalah 209 µg/mL. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak etanol kemangi menunjukkan efek sitotoksik pada sel kanker kolon (*WiDr cell line*) dengan nilai IC₅₀ adalah 85µg/mL dan fraksi aktif kloroform IC₅₀ 25 µg/mL (Haryanti &

Katno2011). Ekstrak etanol kemangi menunjukkan efek sitotoksik pada sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} adalah 6,95 $\mu\text{g/mL}$ (Amalia 2016). Isolat minyak atsiri daun kemangi memiliki nilai IC_{50} 60 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel MCF-7 (Selvi *et al.* 2015). Ekstrak etanol daun kemangi dapat digunakan sebagai agen kemopreventif karena dapat menginduksi apoptosis sel kanker paru (A549) melalui mitokondria dengan nilai IC_{50} 176 $\mu\text{g/mL}$ (Magesh *et al.* 2009).

Beberapa kandungan senyawa kimia dalam tanaman kemangi adalah tanin (4,6%), flavonoid, steroid atau triterpenoid, minyak atsiri (2%), asam heksa ursonat, pentosa, xilosa, asam metil homoanisat, molludistin serta asam ursolat (Peter 2002; Meyer *et al.* 1982). Senyawa terbesar yang aktif terkandung dalam kemangi adalah eugenol (70-80%) (Wijayakusuma 2008). Eugenol yang terdapat pada minyak atsiri kemangi telah dilakukan penelitian tentang antiproliferatif secara *in vitro* pada sel HeLa dengan nilai IC_{50} 16,26 $\mu\text{g/mL}$ (Zarlaha 2014). Selain eugenol senyawa yang dapat menarik pelarut nonpolar adalah steroid (asam ursolat). Penelitian mengungkapkan bahwa kemangi memiliki efek antiproliferatif terhadap sel MCF-7 yang sebagian disebabkan oleh asam ursolat (Qamar *et al.* 2010).

Senyawa metabolit sekunder pada tanaman memiliki sifat kepolaritasan yang berbeda diantaranya senyawa terpenoid yang memiliki sifat nonpolar dan senyawa fenolik memiliki sifat polar. Perbedaan kepolaran ini berpengaruh pada metode fraksinasi serta pelarut yang digunakan untuk menarik senyawa aktif. Penggunaan metode fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana yang merupakan pelarut bersifat nonpolar ini diharapkan mampu menarik senyawa yang bersifat nonpolar pada kemangi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian uji sitotoksisitas fraksi *n*-heksana terhadap sel kanker serviks dan untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi *n*-heksana. Penelitian uji sitotoksisitas dilakukan menggunakan metode [3-(4,5-dimetiltiazol-2-*il*)-2,5-difenil tetrazolium bromida (MTT) pada kultur sel HeLa yang ditunjukkan dengan parameter IC_{50} . Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan bagi dunia farmasi sehingga tanaman kemangi dapat dimanfaatkan sebagai salah satu

sumber daya alam untuk alternatif pengobatan kanker dalam rangka pengembangan obat tradisional.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

Pertama, apakah fraksi *n*-heksana herba kemangi memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel HeLa dan sel Vero?

Kedua, berapakah indeks selektivitas fraksi *n*-heksana herba kemangi terhadap sel Vero (sel normal)?

Ketiga, golongan senyawa kimia apakah yang berperan dalam aktivitas sitotoksik herba kemangi terhadap kultur sel HeLa dan sel Vero?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan:

Pertama, untuk mengetahui aktivitas efek sitotoksik fraksi *n*-heksana herba kemangi terhadap kultur sel HeLa dan sel Vero.

Kedua, untuk mengetahui indeks selektivitas fraksi *n*-heksana herba kemangi terhadap sel Vero.

Ketiga, untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang berperan dalam aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana herba kemangi terhadap kultur sel HeLa dan sel Vero.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan ilmu pengetahuan bagi penelitian dalam hal penggunaan fraksi *n*-heksana herba kemangi memiliki terapi sitotoksik yang lebih rasional. Membarikan dasar penelitian selanjutnya khususnya pengembangan penelitian sitotoksik dan obat herbal lainnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Kemangi

1. Sistematika tanaman

Adapun klasifikasi dari kemangi adalah sebagai berikut :

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonea</i>
Bangsa	: <i>Tubiflorea</i>
Suku	: <i>Lamiaceae</i>
Marga	: <i>Ocimum</i>
Jenis	: <i>Ocimum basilicum</i> L (Depkes RI 2001).

2. Nama daerah

Kemangi di Jawa Tengah sering dikenal dengan nama selasih. Nama asingnya dikenal dengan sebutan holy basil. Kemangi juga dikenal sebagai kecarum atau carum (Bali), tulusi (India), balakama (Manado), klampes atau lampes (Sunda), kemangen (Jawa), kemanghi, ko-roko (Madura), lufe-lufe (Ternate) dan kemangi utan (Melayu) (Kurniasih 2014).

3. Morfologi tanaman

Kemangi merupakan tanaman tegak, bercabang banyak, semak, semusim, dengan tinggi 130-150 cm. batangnya berkayu, segi empat, beralur, bercabang, berbulu, hijau. Daunnya tunggal dan berwarna hijau, tepi bergerigi, dan bertulang daun menyirip. Bunga majemuk berbentuk tandan memiliki bulu tangkai pendek berwarna hijau, mahkota bunga berbentuk bulat telur dengan warna keunguan. Buah berbentuk kotak dan berwarna coklat tua, bijinya berukuran kecil, tiap buah terdiri dari empat biji berwarna hitam akarnya tunggang dan berwarna kotor (Depkes RI 2001).

Kemangi tahan terhadap cuaca panas dan dingin. Apabila ditanaman ditempat dingin daunnya lebih lebar dan lebih hijau, sedangkan didaerah panas daunnya kecil, tipis dan berwarna lebih pucat. Kemangi tidak menuntut syarat

tumbuh yang rumit, sehingga dapat ditanam diberbagai daerah. Kemangi tumbuh pada tepi-tepi jalan, landing dan sawah-sawah kering dalam hutan jati, dan disemaikan di kebun-kebun. Tanaman ini dapat ditemukan di seluruh pulau Jawa pada ketinggian 450-1100 m diatas permukaan laut (Kharisma 2002).

4. Khasiat tanaman kemangi

Kemangi secara tradisional banyak dimanfaatkan masyarakat Indonesia untuk mengobati perut kembung atau masuk angin, demam, melancarkan ASI, rematik dan sariawan (Umar 2011). Di Jawa bijinya biasanya dicampur dengan beberapa macam buah-buahan atau dengan sirup dalam minuman dingin. Biji ini mempunyai khasiat mendinginkan, karena itu dipakai di dalam ramuan obat tradisional. Daunnya bila diremas berbau harum yang tajam dan biasanya digunakan dalam obat-obatan tradisional juga dimanfaatkan sebagai desinfektan. Abu daun dan batangnya digunakan sebagai obat (Kurniasih 2014).

5. Kegunaan kemangi

Tanaman kemangi di beberapa negara telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan untuk pengobatan tradisional. Salah satunya di India kemangi yang dikenal dengan nama tulsi atau holy basil yang telah digunakan sebagai bahan obat lebih dari 2000 tahun yang lalu. Di India tumbuhan ini selalu menyertai jenazah orang-orang Hindu yang saleh pada waktu upacara pemakamannya. Di Jawa Tengah kemangi dibawa orang ke makam pada waktu berziarah. Selain itu, kemangi pernah menjadi tanaman kerajaan di Perancis dan Italia. Bunga dari tanaman ini dipilih untuk menyatakan cinta (Kurniasih 2014). Berbagai bagian tanaman (daun, batang, bunga, akar, dan bunga) telah digunakan dalam pengobatan bronchitis, asma, malaria, disentri, penyakit kulit, artritis, dan gigitan serangga (Prakash & Gupta 2004).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain. Suhu

pengeringan simplisia tidak lebih dari 60°C. Simplisia segar adalah bahan alam yang belum dikeringkan (Kemkes RI 2013).

Simplisia dibagi menjadi 3 macam yaitu pertama simplisia nabati berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman; kedua simplisia hewani adalah hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni; ketiga simplisia pelikan (mineral) yang belum diolah dengan cara-cara yang sederhana dan belum berupa zat-zat kimia murni (Depkes RI 1979).

2. Pengumpulan simplisia

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia nabati dan bagian yang digunakan adalah batang, daun dan bunga. Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia berbeda-beda tergantung pada bagian yang digunakan, umur tanaman atau bagian tanaman saat dipanen, waktu panen, dan lingkungan tempat tumbuh. Senyawa aktif yang terbentuk sangat erat dengan waktu panen (Depkes RI 1985).

3. Pemilihan sampel

Proses pemilihan simplisia digunakan untuk memisahkan simplisia dari benda asing yang berbahaya atau tidak berbahaya dalam jumlah kecil atau besar yang biasanya merugikan. Simplisia nabati harus bebas dari serangga, fragmen hewan atau kotoran hewan, tidak boleh menyimpan bau, warnanya tidak boleh mengandung lendir, cendawan atau menunjukkan tanda-tanda pengotoran lain, dan tidak boleh mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya (Depkes RI 1985).

4. Pengeringan

Pengeringan bertujuan agar simplisia tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Pengurangan kadar air dalam menghentikan reaksi enzimatik akan mencegah penurunan mutu atau kerusakan simplisia. Air yang masih tersisa dalam simplisia pada kadar tertentu dapat menjadi media pertumbuhan kapang dan jasad renik lainnya (Depkes RI 1985).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi merupakan pemindahan massa zat yang semula berada didalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga terjadi perpindahan larutan zat aktif ke dalam cairan penyarian. Metode penyarian yang digunakan tergantung dari wujud dan kandungan zat dari bahan tumbuhan yang diekstraksi dan serta jenis senyawa yang diisolasi (Voigt 1994). Siplisia yang diekstraksi mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Diketuinya senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia dapat mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Atikah 2013).

2. Pengertian ekstrak

Ekstrak adalah sediaan padat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menguapkan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang ditentukan (Depkes RI 1986).

3. Metode ekstraksi

Banyak metode ekstraksi yang digunakan pada bahan alam, salah satu metode ekstraksi adalah maserasi. Maserasi merupakan proses penyarian yang paling sederhana dan banyak digunakan untuk menyari bahan obat yang berupa serbuk simplisia halus (Voigt 1994). Teknik penyarian dengan metode maserasi dilakukan dengan merendam simplisia dengan cairan penyari tertentu. Adanya perbedaan konsentrasi di luar dan di dalam sel sehingga cairan penyari dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan yang pekat didesak ke luar. Peristiwa ini terjadi berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Depkes RI 1986).

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang larut dalam cairan penyari dan tidak mengandung zat yang mudah

mengembang dalam cairan penyari. Cairan penyari yang biasa digunakan untuk maserasi adalah pelarut yang bersifat non polar, semipolar dan polar. Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan bentuk dan faktor cairan penyari yang baik. Penyari harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif (hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki), dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Keuntungan menggunakan penyarian dengan maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian menggunakan metode maserasi adalah pengerjaan yang lama dan penyariannya kurang sempurna (Depkes RI 1986).

4. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan ekstraksi cair cair yaitu pemisahan suatu komponen kimia yang tidak saling campur diantara dua macam pelarut, dimana sebagian komponen larut dalam sebagian fase pertama, dan sebagian larut dalam fase kedua. Kedua fase yang mengandung zat terdispersi dikocok, kemudian didiamkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair. Tujuan dari fraksinasi adalah untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lainnya. Senyawa yang bersifat polar masuk ke dalam pelarut yang bersifat polar dan senyawa non polar akan masuk ke dalam pelarut non polar (Harborne 1987). Fraksinasi ini umumnya dilakukan dengan menggunakan metode corong pisah atau kromatografi kolom. Corong pisah merupakan peralatan laboratorium yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran antara dua fase pelarut yang memiliki massa jenis berbeda yang tidak tercampur, dimana sebagian komponen larut pada fase pertama, dan sebagian larut pada fase kedua (Depkes RI 2000).

5. Pelarut

Pemilihan cairan penyari harus dipertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria antara lain yaitu murah, stabil, netral, tidak mudah terbakar, selektif, dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Depkes RI 1986).

Etanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, dan klorofil. Namun hanya dapat melarutkan tanin dan saponin dalam jumlah kecil (Depkes RI 1986).

Campuran alkohol-air merupakan campuran bahan pelarut yang berbeda dan sering digunakan. Cairan pengestraksi etanol 96% sangat sering didapatkan dari hasil bahan aktif yang optimal dimana bahan pengotor hanya skala kecil cairan pengestraksi (Voigt 1994). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96% karena untuk ekstraksi pendahuluan. Pemilihan pelarut ini karena etanol 96% bersifat universal sehingga dapat menarik kandungan zat aktif secara optimal, sedangkan pengotornya hanya berada pada skala kecil (Voigt 1994).

n-heksana merupakan salah satu hasil dari penyulingan minyak tanah kasar. Pelarut ini tidak digunakan untuk minyak-minyak dan lemak-lemak (Syamsuni 2007). *n*-heksana merupakan pelarut non polar berupa cairan jernih, tidak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar, mempunyai bau seperti eter lemah, praktis tidak larut dalam air tetapi larut dalam etanol, mutlak dapat bercampur dengan eter, kloroform, benzena dan sebagian besar minyak lemak, dan minyak atsiri. *n*-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa non polar seperti lemak, steroid, terpenoid, karotenoid (Depkes RI 1979).

Air melarutkan pelarut polar yang dapat menyerupai senyawa-senyawa organik polar sehingga cocok digunakan dalam fraksinasi. Penggunaan air kurang menguntungkan karena beberapa zat aktif tidak ikut tersari seperti garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, dan gula, juga melarutkan gom, pati, enzim, lilin, lemak, pektin, zat warna, dan asam organik (Depkes RI 1979). Senyawa yang larut ke dalam pelarut ini adalah saponin, glikosida, dan tanin (Harborne 1987).

D. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan campuran komponen berdasarkan distribusi komponen diantara dua

fase yaitu fase diam dan fase gerak (Stoenoiu *et al.* 2006). Zat penjerap yang digunakan untuk Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca, plastik atau logam secara merata, umumnya digunakan lempeng kaca. Lempeng yang dilapisi dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka dan pemisahan yang tercapai dapat didasarkan pada absorpsi, partisi, atau kombinasi kedua efek, yang tergantung dari jenis lempeng, cara pembuatan, dan jenis pelarut yang digunakan. KLT penukar ion dapat digunakan untuk pemisahan senyawa polar. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan bercak dengan harga R_f yang identik dan ukuran yang hampir sama, dengan menotolkan bahan uji dan pembanding pada lempeng yang sama. Pembanding visual ukuran bercak dapat digunakan untuk memperkirakan kadar secara kuantitatif. Pengukuran kuantitatif dimungkinkan, bila digunakan densitometri atau bercak dapat dikerok dari lempeng, kemudian diekstraksi dengan pelarut yang sesuai dan diukur secara spektrofotometri (Kemkes RI 2013)

Fase diam pada KLT berguna untuk mengikat komponen zat, sedangkan fase gerak berguna untuk mengangkut komponen zat lain yang tidak terikat (Suhartono 1989). Fase diam pada KLT berupa lapisan pelarut yang terjerap pada lapisan tipis alumina, silika gel, atau bahan serbuk lainnya. Prinsip KLT adalah sampel ditotolkan pada lapisan tipis kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang berisi fase gerak sehingga sampel tersebut terpisah menjadi komponen-komponennya dengan laju tertentu yang dinyatakan dengan faktor retensi (R_f) yaitu perbandingan antara jarak yang ditempuh komponen terhadap jarak yang ditempuh fase gerak. Komponen yang mempunyai afinitas lebih besar dari fase gerak atau afinitasnya lebih kecil dari fase diam akan bergerak lebih cepat dari pada komponen yang mempunyai sifat sebaliknya (Gritter *et al.* 1991).

Kromatografi Lapis Tipis umumnya digunakan untuk identifikasi, karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk senyawa yang mudah menguap. Sistem pengembangan KLT yang digunakan berdasarkan prinsip like dissolves like, yaitu memisahkan komponen bersifat polar menggunakan sistem pelarut yang bersifat polar juga ataupun sebaliknya. Deteksi hasil kromatogram dilakukan di bawah

sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, serta dapat dilakukan juga dengan pereaksi semprot (Santosa & Hertiani 2005).

E. Kanker

1. Pengertian kanker

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan mekanisme tidak normal dan tidak terkontrol yang mengatur kelangsungan hidup, proliferasi, dan diferensiasi sel. Sel yang telah mengalami transformasi neoplastik biasanya mengekspos antigen permukaan sel yang dapat menunjukkan kelainan kromosom secara kualitatif dan kuantitatif. Sekelompok sel tumor dan sel induk tumor mempertahankan kemampuan untuk menjalani proliferasi berulang serta bermigrasi ke organ lain dalam tubuh, proses ini disebut metastasis. Keberadaan kumpulan sel ini ditandai dengan kelainan kromosom yang mencerminkan ketidakstabilan genetik. Ketidakstabilan genetik ini juga dapat memungkinkan mereka menjadi resisten terhadap kemoterapi dan radioterapi. Seringkali proses metastasis dan infasif yang berhubungan dengan kanker dapat mengakibatkan kematian, kecuali neoplasma dapat diberantas dengan pengobatan (Katzung *et al.* 2009).

2. Kanker serviks

Kanker leher rahim atau serviks adalah penyakit yang disebabkan oleh proses keganasan yang terjadi pada serviks atau mulut rahim. Penyebab kanker leher rahim belum diketahui secara pasti namun diduga sekitar 95% disebabkan oleh Human Papilloma Virus (HPV) (Canava & Doshi 2000).

Ada dua jenis kanker serviks adalah kanker skuemosa dan adenokarsinoma. Kurang lebih 90% kanker serviks adalah kanker sel skuemosa pada permukaan eksoserviks. Jenis kedua adalah adenokarsinoma yang berkembang dari mukosa yang memproduksi sel glandular dari endoserviks (Megawati 2014).

Penderita dengan kanker serviks stadium awal biasanya tidak memiliki gejala kelainan sampai kanker menjadi invasif dan tumbuh berkembang di jaringan. Dalam hal ini gejala yang mungkin timbul adalah pendarahan tidak

normal dari vagina (biasanya setelah berhubungan seksual), dan rasa sakit setelah berhubungan seksual (Megawati 2014).

3. Faktor-faktor risiko terjadi kanker serviks

Faktor risiko adalah faktor yang mempermudah timbulnya penyakit kanker serviks. Adapun yang menjadi faktor risiko terjadinya kanker serviks:

3.1 Umur. Pada umumnya, Perempuan yang rawan mengidap kanker serviks adalah mereka yang berusia antara 35-50 tahun, terutama yang telah aktif secara seksual sebelum usia 16 tahun. Hubungan seksual pada usia terlalu dini bisa meningkatkan risiko terserang kanker leher rahim sebesar 2 kali dibandingkan perempuan yang melakukan hubungan seksual setelah usia 20 tahun (Canava & Doshi 2000). Penderita kanker serviks rata-rata dijumpai pada umur 45 tahun (Aziz 2006). Semakin tua seorang wanita maka makin tinggi risiko terkena kanker serviks. Tentu kita tidak bisa mencegah terjadinya proses penuaan. Akan tetapi kita bisa melakukan upaya-upaya lainnya untuk mencegah meningkatnya risiko kanker serviks.

3.2 Pernikahan dan aktivitas seksual pada usia muda. Umur pertama kali hubungan seksual merupakan salah satu faktor yang cukup penting. Makin muda seorang perempuan melakukan hubungan seksual, makin besar risiko yang harus ditanggung untuk mendapatkan kanker serviks dalam kehidupan selanjutnya (Rasjidi 2007). Risiko kanker serviks dapat meningkat pada pernikahan usia muda atau pertama kali koitus, yaitu pada umur 15-20 tahun atau pada belasan tahun serta periode laten antara pertama kali koitus sampai terdeteksi kanker serviks selama 30 tahun. Menurut Aziz (2006), wanita di bawah usia 16 tahun menikah biasanya 10-12 kali lebih besar terserang kanker serviks dari pada yang berusia 20 tahun ke atas.

3.3 Kebiasaan berganti pasangan. Hasil penelitian Indriyani (1991) ditemukan bahwa faktor koitus dengan seringnya berganti pasangan merupakan faktor yang berpengaruh untuk terjadinya kanker serviks. Kasus kanker serviks 4 kali lebih banyak pada wanita yang melakukan prostitusi

Berganti-berganti pasangan dalam hubungan seksual memperbesar kemungkinan terinfeksi HPV.

3.5 Agen infeksius. Terdapat sejumlah bukti yang menunjukkan HPV sebagai penyebab neoplasia servikal. HPV tipe 6 dan 11 berhubungan erat dengan displasia ringan yang sering regresi. HPV tipe 16 dan 18 dihubungkan dengan displasia berat, yang jarang regresi dan sering kali progresif menjadi karsinoma *insitu* (Aziz 2006). Walaupun semua virus herpes simpleks tipe 2 belum didemonstrasikan pada sel tumor, teknik hibridisasi *insitu* telah menunjukkan terdapat HSV RNA spesifik pada sampel jaringan wanita dengan displasia serviks. Infeksi trikomonas, sifilis, dan gonokokus ditemukan berhubungan dengan kanker serviks.

3.6 Merokok. Merokok dapat menurunkan daya tahan tubuh. Banyak penelitian yang menyatakan hubungan antara kebiasaan merokok dengan meningkatnya risiko seseorang terjangkit penyakit kanker serviks. Menurut Joakam Dillner (2001) zat nikotin serta “racun” lain yang masuk ke dalam darah melalui asap rokok mampu meningkatkan kemungkinan terjadinya kondisi servikal neoplasia atau tumbuhnya sel-sel abnormal pada rahim.

4. Pencegahan kanker serviks

4.1 Skrining. Skrining untuk memeriksa perubahan-perubahan leher rahim sebelum adanya gejala-gejala terjadi sangat penting. Skrining dapat membantu dokter mencari sel-sel abnormal sebelum kanker berkembang. Mencari dan merawat sel-sel abnormal dapat mencegah kebanyakan sel kanker leher rahim. Skrining membantu mendeteksi kanker secara dini, sehingga perawatan menjadi lebih efektif. Untuk beberapa dekade yang lalu, jumlah wanita-wanita yang didiagnosis setiap tahun dengan kanker leher rahim sudah menurun (Cowan *et al.* 1997).

4.2 Infeksi visual asam asetat. Metode pemeriksaan dengan mengoles leher rahim dengan asam asetat. Kemudian diamati apakah ada kelainan seperti area berwarna putih. Jika tidak ada perubahan warna, maka dapat dianggap tidak ada infeksi pada serviks. Pencegahan ini dapat diperiksakan di Puskesmas dengan harga relatif murah. Pemeriksaan ini dilakukan hanya untuk deteksi dini. Jika

terlihat tanda yang mencurigakan, maka deteksi lainnya harus dilakukan (Cowan *et al.* 1997).

4.3 Pap smear. Metode tes *Pap Smear* yang umumnya adalah dokter menggunakan pengerik atau sikat untuk mengambil sedikit sel leher rahim. Kemudian sel-sel tersebut dianalisis diLaboratorium. Tes itu dapat mengetahui apakah ada infeksi, radang, atau sel-sel abnormal. Menurut laporan WHO, dengan secara terus teratur melakukan tes *Pap Smear* telah mengurangi jumlah kematian akibat kanker leher rahim (Cowan *et al.* 1997).

4.4 Thin Prep. Metode *Thin Prep* lebih akurat dibandingkan *Pap Smear*. Jika *Pap Smear* hanya mengambil sebagian dan sel-sel serviks, maka *Thin Prep* dapat memeriksa seluruh bagian leher rahim. Metode *thin prep* hasilnya jauh lebih akurat dan tepat (Cowan & Seifer 1997).

4.5 Kolpoxsin. Jika semua hasil tes pada metode sebelumnya menunjukkan adanya infeksi atau kejanggalan, prosedur kolposkopi dapat dilakukan dengan menggunakan alat yang dilengkapi lensa pembesar untuk mengamati daerah yang terinfeksi. Tujuannya untuk menentukan apakah ada lesi atau jaringan yang tidak normal pada leher rahim. Jika ada yang tidak normal, *biopsy* pengambilan sejumlah kecil jaringan dilakukan dan pengobatan untuk kanker leher rahim segera dimulai (Cowan & Seifer 1997).

5. Pengobatan kanker

Pengobatan secara modern sekarang ini membutuhkan biaya yang tinggi, namun pengobatannya tidak spesifik dan menimbulkan efek samping yang cukup besar. Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan cara operasi, pembendahan, penyinaran, radiasi dan kemoterapi. Pengobatan ini ditujukan untuk membunuh sel-sel kanker sehingga tidak dapat berkembang dan membahayakan bagi tubuh (Diyah & Sukohardjono 2000).

5.1 Kemoterapi. Kemoterapi merupakan salah satu pengobatan yang bertujuan mematikan ataupun memperlambat pertumbuhan sel kanker. Pemberian obat-obat sitotoksik menimbulkan efek samping yang umum seperti anemia, anoreksia, ansietas, perdarahan, demam, infeksi, insomnia, nyeri, alopsia (rambut rontok). Sehingga penggunaan obat-obat ini seringkali dikombinasi dengan obat-

obat lain dengan maksud untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan (Indrawati 2009). Jenis kemoterapi yang ada meliputi penggunaan antagonis hormone reproduksi untuk melawan kanker reproduksi.

5.2 Radioterapi. Efek samping radioterapi berkaitan dengan dosis total (*centingray*), lama pemberian fraksi dari dosis tersebut yaitu dosis harian, luas atau volume bagian tubuh yang diterapi dan bagian tubuh yang diradiasi. Sel-sel yang lewat pada daerah yang diradiasi mungkin dapat mengalami perubahan dan mempengaruhi fungsi ditempat lain, misal efek samping yaitu sariawan atau faringitis, anoreksia, nyeri dan kulit menjadi terbakar. Efek samping merupakan hal yang paling umum yang terjadi pada pemberian radioterapi dan akan mereda dalam waktu 2 minggu pengobatan (Indrawati 2009).

5.3 Pembedahan. Tindakan pembedahan dilakukan untuk mengurangi ukuran tumor, meredakan nyeri, dan mencegah metastase yang dilakukan sejak dini (Indrawati 2009). Pembedahan juga digunakan untuk mengekstris bagian mayor dari tumor yang mengurangi bahan tumor dan meningkatkan respon terhadap kemoterapi atau radiasi (Corwin&Elizabeth 2009).

5.4 Imunoterapi atau bioterapi. Terapi jenis ini bekerja dengan mengaktifkan sistem imun untuk mengenali dan menghancurkan sel tumor secara spesifik, memblok enzim dan faktor pertumbuhan yang diperlukan untuk metastasis. Imunoterapi yang saat ini sedang dikembangkan yaitu stimulan imun, antibodi berlabel fluoresen, antibodi penyerang terapi gen (Corwin &Elizabeth 2009).

F. Siklus Sel

Pertumbuhan sel menunjukkan adanya perubahan ukuran sel dan merupakan hasil akhir dari proses-proses yang berpengaruh pada kehidupan sel seperti proliferasi, diferensiasi dan kematian sel. Sel kanker seringkali dikatakan sebagai sel yang berproliferasi lebih cepat dibandingkan dengan keadaan normalnya (King 2000). Sel kanker dapat berada dalam tiga keadaan yaitu sedang membelah (siklus proliferasi), dalam keadaan istirahat (tidak membelah), dan secara permanen tidak membelah (Nefrialdi & Gan 1995). Siklus sel memiliki dua

fase utama, yakni fase S (sintesis) dan fase M (Mitosis). Fase S merupakan fase terjadinya replikasi DNA kromosom dalam sel, sedangkan fase M terjadinya pemisahan 2 sel DNA kromosom tersebut menjadi 2 sel (Nurse 2000).

1. Fase G1 (*Growth phase-1 atau pasca mitosis*)

Fase ini dipersiapkan suatu interval dalam proses pembelahan sel dan dimulai dengan sintesis Asam Deoksiribo Nukleat (DNA) (Mulyadi 1997). Pada fase G1 sel anak baru berupa untai tunggal DNA yang terbentuk setelah mitosis tumbuh menjadi sel dewasa membentuk protein, enzim, dan sebagainya. Sel yang berhenti tumbuh kemudian masuk ke fase G₀ (Sukardja 2000).

2. Fase S (*Synthetic phase atau sintesis*)

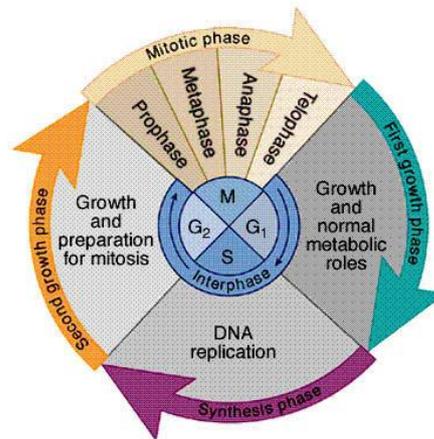
Pada fase ini dibentuk untai DNA yang baru melalui proses replikasi. Replikasi DNA terjadi dengan bantuan enzim DNA-polimerase, dengan dibentuknya DNA baru maka rantai tunggal DNA menjadi rantai ganda. Selama fase S juga berlangsung perbaikan DNA yang dapat mencegah berkembangnya generasi kanker. Fase ini kira-kira berlangsung selama 6-8 jam (Mulyadi 1997).

3. Fase G2 (*Growth phase-2 atau Pra Mitosis*)

Fase G2 terjadi proses pembentukan RNA, protein, enzim dan sebagainya untuk persiapan fase M. Sel yang telah masuk dalam fase pra mitosis ini memiliki ciri sel berbentuk tertraploid, mengandung dua kali lebih banyak DNA (Nefrialdi & Gan 2007).

4. Fase M (*mitotic Phase atau Mitosis*)

Proses mitosis ini terjadi pengurangan sintesis protein dan RNA secara tiba-tiba, berlangsung pemisahan sel menjadi dua sel anakan dengan sifat dan karakteristik yang sama dengan induknya (Nefrialdi & Gan 2007). Berdasarkan morfologinya proses ini dapat dibagi menjadi 4 sub fase, adalah profase, metafase, anafase, dan telofase. Fase ini berlangsung sekitar 30-60 menit (Mulyadi 1997).



Gambar 1. Siklus Sel (Berek &Natarajan 2007)

G. Sel HeLa

Kultur sel HeLa merupakan *Countinous cell Line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim seseorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951 (Depkes 2006). Kultur sel HeLa memiliki sifat semi melekat dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler. Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (Labwork 2000).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah RPMI 1640-serum. Media RPMI 1640-serum didalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney 1992).

Sel HeLa telah mengalami transformasi akibat Infeksi HPV 18 dan berbeda dengan sel leher rahim yang normal. Sel HeLa adalah sel kanker leher rahim akibat infeksi HPV sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat

menyebabkan sifat imortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang imortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin & Dimio 2000).

Protein E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur daur sel. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. Protein E6 juga menstimulasi aktivitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk cell cycle progression (Goodwin & DiMio 2000).

H. Sel Vero

Sel Vero merupakan sel yang didapatkan dari ginjal *African Green Monkey* oleh peneliti Jepang pada tahun 1962. Sel Vero berfungsi sebagai kontrol positif yang mewakili sel normal pada manusia (Philips 2013). Sel Vero merupakan sel Monolayer berbentuk poligonal dan pipih, immortal, non tumorigenic fibroblastic cell. Sel ini melekat erat pada substrat yang berbahan polistiren dengan membentuk ikatan kovalen. Pengujian sel Vero dilakukan untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksik, dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia (Goncalves *et al.* 2008).

Sel Vero dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media DMEM 1640-serum. Didalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan yaitu asam amin, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu mengacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport.

Sel Vero dapat disimpan dalam nitrogen cair atau pada suhu 80°C dalam waktu lama. Stock beku ini membutuhkan pengembangbiakan terlebih dahulu

sebelum dilakukan eksperimen. Sel Vero merupakan sel yang tak dapat berkembang apabila berada dalam suspensi (Ammerman *et al.*2009).

Sel Vero bukan merupakan sel kanker, mekanisme pertumbuhan dan penghambatannya sama dengan sel normal. Oleh karena itu, terdapat pula mekanisme penghentian pertumbuhan. Sel Vero yang terus berkembang semakin lama akan memenuhi luas area media yang digunakan. Kemudian terjadi kontrak antara sel yang mengakibatkan sel menerima sinyal untuk menghentikan pertumbuhan (Sheer 1996).

I. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik merupakan perkembangan untuk mengidentifikasi obat sitotoksik baru atau deteksi obat dengan aktivitas antitumor. Dasar dari percobaan ini antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel. Informasi yang diperoleh dari kurva seharusnya berhubungan dengan efek *in vivo* dari obat sitotoksik yang sama (Burger 1970).

Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel tumor secara *in vitro* dan jika toksisitas ini ditransfer menembus sel tumor *in vivo* senyawa tersebut mempunyai aktivitas antitumor (Evans 2002). Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle & Griffiths 2000).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto 2002). Nilai IC_{50} yang menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitostatik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Uji sitotoksik sebagian besar masih menggunakan hewan percobaan meskipun terdapat kesulitan untuk diekstraporasikan pada manusia. Metode *in vitro*

merupakan alternatif pengganti metode hewan uji. Uji sitotoksitas mempunyai relevansi cukup baik yang bertujuan untuk mendeteksi potensi ketoksikan suatu obat pada manusia (Doyle & Griffiths 2000).

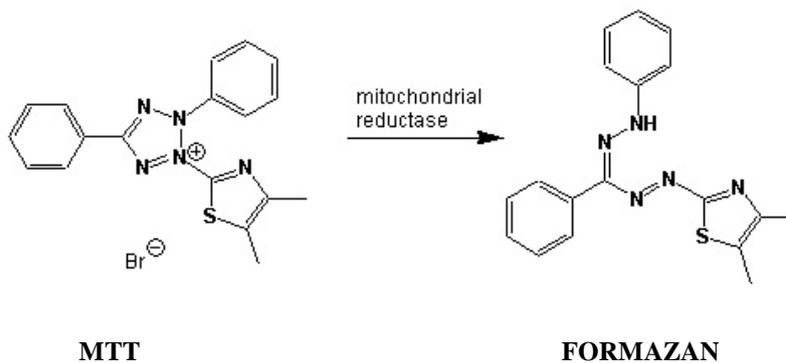
J. Metode Pengujian Aktivitas Sitotoksi (MTT Assay)

Metode *Tetrazolium Bromide* (MTT) atau dapat disebut metode 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) digunakan untuk menetapkan jumlah sel pada uji sitotoksi. Metode MTT merupakan salah satu metode uji sitotoksitas yang bersifat kuantitatif. Uji sitotoksik dilakukan secara *in vitro* adalah untuk menentukan potensi sitotoksik suatu senyawa, contoh potensi sitotoksik suatu senyawa adalah antikanker (Kupcsik & Stoddart 2011). Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan. Metode perubahan warna tersebut digunakan untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Sel yang mengalami proliferasi mitokondria akan menyerap MTT sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu akibatnya terbentuk kristal tetrazolium formazan (Depamade & Rosyidi 2009).

Prinsip uji MTT adalah untuk mengukur aktivitas seluler berdasarkan kemampuan enzim mitokondria reduktase pada mitokondria dalam mereduksi garam Methylthiazol Tertrazolium membentuk kristal formazan berwarna biru. Konsentrasi formazan yang berwarna biru dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduktase hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel mitokondria aktif (Mosman *et al.* 1989). Persentase viabilitas dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$\% \text{ hidup} = \frac{\text{absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi media}}{\text{absorbansi media sel} - \text{absorbansi media}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

Intensitas warna ungu yang terbentuk dimana semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Reaksi reduksi MTT dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Reaksi reduksi MTT menjadi Formazan

Nilai parameter uji sitotoksik ditentukan dengan menghitung nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang menghasilkan hambatan poliferasi sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji kinetika sel. Semakin rendah nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin toksik (Meiyantoet *al.* 2003). Rentang nilai IC_{50} untuk uji sitotoksik apabila nilai $< 10 \mu\text{g/mL}$ dikatakan berpotensi sangat aktif sebagai senyawa sitotoksik, $10\text{-}20 \mu\text{g/mL}$ aktif dan $> 20 \mu\text{g/mL}$ dikatakan kurang aktif, namun bila nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ masih memiliki kompensif kepada sel kanker (Gritter *et al.* 1985).

Metode MTT digunakan karena relatif cepat, sensitif, akurat, dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah banyak dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Freshney 2009). Metode ini juga mempunyai kelemahan yaitu tidak dapat menggambarkan morfologi sel, sehingga apabila terdapat kelainan morfologi akan tetap dihitung sebagai sel hidup, walaupun perubahan morfologi dari suatu sel dapat dikategorikan sebagai akibat dari toksisitas suatu bahan (Doyle & Griffiths 2000).

K. Uji Indeks Selektivitas

Uji pada penelitian ini digunakan sebagai indeks selektivitas sitotoksik (tingkat keamanan) dari ekstrak terhadap sel normal yaitu toksik terhadap sel kanker namun tidak toksik terhadap sel normal (Furqon 2014).

Tingkat selektivitas senyawa dapat dinyatakan dengan Indeks Selektivitas (IS). Apabila nilai IS tinggi (> 10) menunjukkan senyawa memberikan toksisitas selektif terhadap sel-sel kanker. Sedangkan senyawa $IS < 10$ dianggap dapat

memberikan toksisitas umum dan juga menyebabkan toksisitas pada sel normal (Wahyuningsih *et al.* 2013).

L. Landasan Teori

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol diikuti dengan proses invasi ke jaringan sekitar dan penyebaran (metastasis) ke bagian tubuh yang lain. Perkembangan sel kanker dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya sehingga dapat menyebabkan kematian (Sheer 1996). Kanker serviks merupakan masalah kesehatan perempuan dengan angka kejadian dan angka kematian yang tinggi. Kanker leher rahim atau serviks merupakan penyakit yang disebabkan oleh proses keganasan yang terjadi pada serviks atau mulut rahim. Penyebab kanker leher rahim belum diketahui secara pasti namun diduga sekitar 95% disebabkan oleh Human Papilloma Virus (HPV) (Canava & Doshi 2000).

Pengobatan secara modern sekarang ini menimbulkan biaya tinggi, dan menimbulkan efek samping yang cukup besar. Pengobatan penyakit kanker sering dilakukan dengan cara operasi, pembedahan, penyinaran atau radiasi dan kemoterapi, yang sekarang berkembang menjadi imunoterapi. Pengobatan ini ditunjukkan untuk membunuh sel-sel kanker sehingga tidak berkembang dan membahayakan bagi tubuh (Diyah & Sukohardjono 2000).

Penelitian terhadap penanganan kanker saat ini mulai diarahkan pada pengujian potensi bahan alam sebagai agen komopreventif yang berpotensi sebagai agen pendamping kemoterapi. Salah satu bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan anti kanker adalah kemangi. Kandungan kimia yang terkandung dalam tanaman kemangi adalah tanin (4,6%), flavonoid, steroid/triterpenoid, minyak atsiri (2%), asam heksa ursonat, pentosa, xilosa, asam metil homoanisat, molludistin serta asam ursolat (Peter 2002; Meyer *et al.* 1982). Kandungan senyawa aktif terbesar yang terkandung dalam kemangi adalah eugenol (70-80%) (Wijayakusuma 2004). Eugenol pada kemangi memiliki khasiat sebagai antikanker. Flavonoid diduga mampu menghambat proliferasi pada berbagai sel kanker pada manusia, namun tidak toksik terhadap sel normal manusia (Ren *et al.* 2003). Tanin mempunyai aktivitas sebagai antiproliferatif

pada sel kanker yang bekerja pada tingkat sel dengan menghambat fase “S” dari siklus sel (Khanbabae & Ree 2011). Senyawa alkaloid bersifat antineoplastik sehingga ampuh menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Agoes 2010).

Banyak penelitian yang membuktikan kemangi berpotensi sebagai antikanker. Menurut penelitian Ismiyati dan Nurhaeni (2016) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kemangi memiliki efek sitotoksik pada sel HeLa dengan nilai IC_{50} adalah 209 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak etanol kemangi menunjukkan efek sitotoksik pada sel kanker kolon (*WiDr cell line*) dengan nilai IC_{50} adalah 85 $\mu\text{g/mL}$ dan fraksi aktif kloroform IC_{50} 25 $\mu\text{g/mL}$ (Haryanti & Katno 2011). Selain itu, penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak etanol kemangi menunjukkan efek sitotoksik pada sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} adalah 6,95 $\mu\text{g/mL}$ (Amalia 2016). Penelitian lain menunjukkan bahwa minyak atsiri daun kemangi memiliki nilai IC_{50} 60 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel MCF-7 (Selvi *et al.* 2015).

Berdasarkan hasil penelitian-penelitian dan terdapatnya kandungan metabolit sekunder yang mendukung, maka peneliti ingin mengetahui lebih lanjut potensi sitotoksitas herba kemangi apabila dibuat dalam fraksi *n*-heksana terhadap sel HeLa dan sel Vero. Dalam penelitian ini uji sitotoksitas dilakukan menggunakan metode MTT pada kultur sel HeLa yang ditunjukkan dengan parameter IC_{50} . Sel HeLa merupakan salah satu sel kanker turunan dari sel epitel leher rahim (kanker serviks) manusia yang cukup aman digunakan dan merupakan sel manusia yang digunakan untuk kepentingan kultur sel. Nilai parameter uji sitotoksik ditentukan dengan mengitung nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang menghasilkan hambatan poliferasi sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel (Meiyanto *et al.* 2003). Rentan nilai IC_{50} bila <10% $\mu\text{g/mL}$ sangat aktif, 10-20 $\mu\text{g/mL}$ aktif dan >20 $\mu\text{g/mL}$ dinyatakan kurang aktif, namun nilai IC_{50} 50-100 $\mu\text{g/mL}$ terapi berpotensi terhadap sel kanker (Freshney 2000).

M. Hipotesis

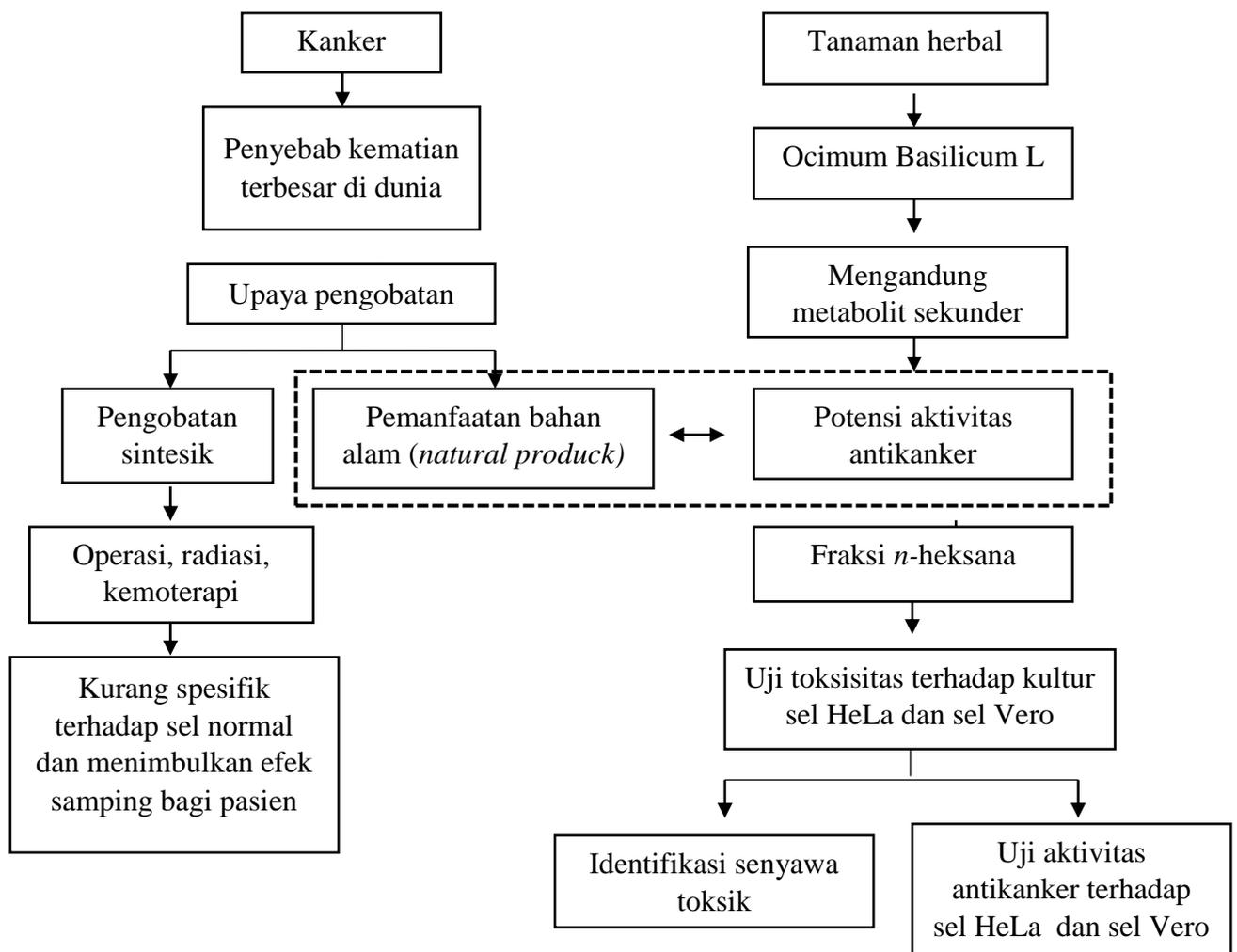
Berdasarkan landasan teori yang ada, disusun suatu hipotesa dalam penelitian ini adalah:

Pertama, fraksi *n*-heksana herba kemangi memiliki aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel HeLa dan memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$.

Kedua, nilai indeks selektivitas fraksi *n*-heksana herba kemangi dari sel HeLa dan sel Vero lebih dari 10.

Ketiga, golongan senyawa kimia yang berperan dalam aktivitas sitotoksik herba kemangi terhadap kultur sel HeLa adalah triterpenoid (eugenol) dan steroid (asam ursolat).

N. Kerangka pikir



Gambar 3. Diagram kerangka pikir penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman herba kemangi yang diperoleh dari Boyolali.

Sampel adalah representasi populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Jadi sampel merupakan bagian populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba kemangi yang diperoleh dari Boyolali diperoleh dalam keadaan bersih, segar, dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksanayang akan diuji aktivitas sitotoksisitas herba kemangi terhadap kultur sel HeLa dan sel Vero.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas yang dimaksud adalah variabel utama yang diubah-ubah untuk diteliti pengaruh terhadap variabel tergantung berkaitan dengan perubahan-perubahan yang dilakukan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi *n*-heksana herba kemangi yang akan diujikan pada sel HeLa dan sel Vero.

Variabel tergantung adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik sel HeLa dan sel Vero dengan menghitung sel yang mati.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang dengan penelitian lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kondisi peneliti, kondisi laboratorium yang digunakan termasuk alat-alat, bahan, suhu, tekanan inkubator, lama waktu inkubasi serta jumlah sel tiap sumuran, dan media yang digunakan dalam penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, herba kemangi adalah seluruh bagian dari tanaman kemangi kecuali akar yang didapat di Boyolali, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak herba kemangi adalah serbuk dari daun, batang, dan bunga kemangi yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Ketiga, fraksi *n*-heksana herba kemangi adalah ekstrak kental berupa hasil fraksinasi dari ekstrak etanol herba kemangi menggunakan pelarut *n*-heksana dengan metode ekstraksi cair-cair.

Keempat, aktivitas sitotoksik adalah kemampuan senyawa untuk membunuh sel kanker setengah dari jumlah populasi yang diukur berdasarkan parameter IC_{50}

Kelima, nilai IC_{50} adalah nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

Keenam, sel HeLa adalah *cell line* koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh.

Ketujuh, sel Vero adalah jalur sel (*continuous cell line*) yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*). Monyet ini merupakan salah satu jenis mamalia yang biasanya digunakan dalam penelitian biologi molekuler dan mikrobiologi.

Kedelapan, MTT *assay* adalah metode uji sitotoksitas untuk menentukan jumlah Sel HeLa yang hidup pada masing-masing konsentrasi.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah tanaman kemangi, etanol 96% (Bratacem), *n*-heksana (Brataco), aquadest, Silika GF₂₅₄, Natrium bikarbonat, Toluena, NaOH, HCl encer, asam nitrat, etil asetat, Anisaldehyd, Asam Galat, Quersetin, asam formiat, xilena, dimetil amin, Stiqmasterol, Dragendrof, serbuk Mg, reagen Mayer, Asam Sulfat Pekat, dan Sitroborat.

Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel HeLa (ATCC) dan sel Vero (ATCC), (Koleksi Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran UGM), media penumbuh sel (media kultur), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma), MTT (Sigma), Fungison 0,5% (Gibco), FBS (Fetal Bovine Serum) 10% (Gibco), dan penisilin-streptomisin 1% (Gibco). Sel dipanen dari tissue culture disk dengan tripsin-EDTA 0,025%. Pelarut sampel: DMSO (Dimetil Sulfoxida), larutan stopper: SDS (Sodium Dodesil Sulfat) 10% dalam HCl 0,1N, larutan pencuci: PBS (Phospat Buffer Saline), dan lainnya yang dibutuhkan dalam pengujian efek sitotoksik secara *in vitro*.

2. Alat

Alat pembuatan sampel yang digunakan meliputi oven, bejana maserasi, corong pisah (Pyrex), cawan porselen, blender (Miyako), ayakan nomor 40, pisau, flanel, kertas saring, corong buchner, *moisture balance* (Ohaus-MB 23), corong pisah (Pyrex), evaporator (Heidolph laborata 400), peralatan gelas (Pyrex), neraca analitik, lampu UV, *Sterling-Bidwel* (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), dan alat pengaduk.

Alat uji sitotoksik adalah *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), vortex (Brandstead, USA), Autoclav (Hirayama), filter 0,2 m, mikropipet (pipetman), tangki nitrogen cair, lemari pendingin, pipet tetes, inkubator CO₂5% model 6200 (Napco), *laminar air flow* (Labconco), *microplate* 96 (Nuclone), mikroplate 96 sumuran (Nunclone), pipet endrof, *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), tabung konikel steril (Nunclone), *Tissue cultur flask* (Nuclone), mikroskop inverted (Axiovert-25), inkubator, neraca

elektrik(Sartorius), dan tabung ependrof, ALISA *reader* (SLT 240 ATC), dan kamera digital (Canon, Japan).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman kemangi

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel tanaman kemangi, dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada herba kemangi terhadap kepustakaan yang telah dibuktikan di bagian Laboratorium Morfologi Sistemik Tumbuhan Universitas Setia Budi, Surakarta. Pedoman yang digunakan adalah buku Flora of Java (*Spermatophytes only*) karangan Backer, C, A dan Brink R, C, B tahun 1965.

2. Pengumpulan, pengeringan dan pembuatan sampel herba kemangi

Pengumpulan tanaman kemangi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga, batang, dan daun kemangi yang diperoleh dari Boyolali. Kemangi yang diambil adalah kemangi yang masih segar dan tidak busuk.

Tanaman herba kemangi dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir, yang bertujuan untuk menghilangkan tanaman yang busuk dan kotoran yang masih menempel pada kemangi. Kemangi yang telah bersih diiris besar besar, kemudian dikeringkan dengan alat pengering (oven) pada suhu 40-50⁰ C selama 5 hari. Suhu yang terlalu rendah tidak akan mengeringkan dengan sempurna, akibatnya sampel akan cepet membusuk. Sedangkan suhu yang terlalu tinggi akan merusak senyawa yang terkandung dalam tanaman tersebut.

Simplisia kemangi yang telah kering dibuat serbuk menggunakan alat penggiling dan diayak dengan ayakan nomor 40. Tujuan pembuatan serbuk adalah untuk memperkecil ukuran partikel.

3. Pembuatan ekstrak herba kemangi

Serbuk kering herba kemangi ditimbang sebanyak 10 bagian atau 1000 gram, dimaserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 7,5 L pada suhu kamar selama 5 x 24 jam ke dalam bejana sampai semua sampel terendam oleh pelarut, terlindungi dari cahaya matahari. Setelah 5 hari maserat disaring dan diperoleh ekstrak kental. Ampas sisa maserasi di ditambahkan cairan penyari 2,5 L kemudian direndam selama 2 hari tanpa pengojokan. Seluruh ekstrak yang didapat

ditampung dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 45 rpm sehingga didapatkan ekstrak pekat (Depkes RI 1986).

4. Pembuatan fraksi *n*-heksana

Fraksinasi dari ekstrak etanol kemangi dilakukan secara partisi dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak etanol kemangi sebanyak 7,5 gram dilarutkan 5 mL etanol, kemudian dipartisi menggunakan pelarut *n*-heksana:air (70 mL : 75 mL). Campuran di ekstraksi cair-cair hingga terbentuk 2 lapisan dan dipisahkan fase-fase yang terbentuk. Dilakukan cara yang sama hingga fase dari larutan penyari yang ditambahkan jernih (tidak ada zat yang tersari). Larutan penyari diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator*.

5. Karakterisasi serbuk herba kemangi

5.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari serbuk herba kemangi. Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

5.2 Penetapan susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan simplisia dilakukan dengan *moisture balance*. Serbuk kemangi dengan cara ditimbang 2 gram serbuk dimasukkan ke dalam cawan yang ada dalam alat *Moisture Balance*, kemudian diukur kelembapannya dan ditunggu sampai alat menunjukkan hasil kadar dengan persen satuan.

5.3 Penetapan kadar air dengan metode destilasi. Herba kemangi dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dengan menimbang sampel herba kemangi sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xilen 200 mL sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*, tahap selanjutnya dipanaskan. Cairan pembawa yang digunakan adalah xilen karena xilen memiliki titik didih lebih tinggi dari pada air, berat jenis lebih rendah dari pada air dan tidak bercampur dengan air sehingga memudahkan dalam penetapan kadar air. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi (kurang lebih 1 jam), kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung % air dari berat sampel (Depkes 2008).

5.4 Penetapan kadar sari yang larut dalam etanol. Bahan uji dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 95% dalam labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam dan disaring. cepat dengan menghindarkan penguapan etanol, diuapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa suhu pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 95 % dihitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI 1980).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{bobot sari}}{\text{bobot bahan yang dimaserasi}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \dots\dots(3)$$

5.5 Penetapan kadar sari yang larut air. Bahan uji dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform (0,25 mL kloroform dalam akuades sampai 100 mL) dalam labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam dan disaring. Filtrat sebanyak 20 mL diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan dan ditara. Sisa dipanaskan pada suhu 105⁰C sampai bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI 2008).

6. Karakterisasi ekstrak herba kemangi

6.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari ekstrak kental. Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa.

6.2 Penetapan kadar air. Ekstrak herba kemangi dilakukan penetapan kadar air dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Caranya dengan menimbang sampel ekstrak etanol herba kemangi sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut xilen 200 mL sampai serbuk terendam. Alat *Sterling-Bidwell* dipasang, kemudian dipanaskan dengan api kecil. Cairan pembawa yang digunakan adalah xilen karena xilen memiliki titik didih lebih tinggi dari pada air, berat jenis lebih rendah dari pada air dan tidak bercampur dengan air sehingga memudahkan dalam penetapan kadar air. Pemanasan dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi (kurang lebih 1 jam),

kemudian diukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung % air dari berat sampel (Depkes 2008).

6.3 Penetapan susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan alat *moisture balance*. Herba kemangi ditimbang 2 gram, diukur dengan alat *maisture balance* pada suhu 105⁰C, kemudian dilakukan pembacaan sampai muncul angka persen.

7. Identifikasi kandungan kimia sampel herba kemangi dengan metode tabung

Berdasarkan penelitian, kandungan kimia yang terkandung dalam tanaman kemangi adalah tanin, flavonoid, steroid atau triterpenoid, minyak atsiri:

7.1 Flavonoid. Larutan uji 0,5 gram disari dengan 10 mL metanol selama 10 menit diatas penangas air, dicegah agar pelarut tidak terlalu banyak menguap dan disaring selagi masih panas. Filtrat dincerkan dengan 10 mL air dan pindahkan ke corong pisah, ditambahkan 5 mL petroleum eter. Setelah didiamkan beberapa saat, dipisahkan fase metanolnya. Fase metanol diuapkan hingga kering, residu yang tersisa dilarutkan dalam etil asetat. Sebanyak 1 mL larutan residu etil diupkan hingga kering, sisa dilarutkan dalam 1 mL etanol 96% dan tambahkan logam Mg dan 10 mL HCl pekat. Jika terjadi warna merah sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid, sedangkan jika warna kuning menunjukkan adanya flavon, kalkon, auron (Depkes RI 1980).

7.2 Steroid dan triterpenoid. Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan porselen. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform kemudian ditambahnka 0,5 mL asam asetat anhidrat. Asam sulfat pekat sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada pembatasan larutan menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan adanya positif steroid (Fransworth 1966).

7.3 Minyak atsiri. Larutan uji sebanyak 1 mL dipipet kemudian diuapkan diatas cawan porselin hingga diperoleh residu. Hasil positif minyak atsiri ditandai dengan bau khas yang dihasilkan oleh residu tersebut (Ciulei 1984).

7.4 Alkaloid. Larutan uji ditimbang 500 mg dalam 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air. Panaskan di atas penangas air selama 2 menit. Dipipet 3 tetes filtrat

pada dua kaca arloji dan tambahkan 2 tetes larutan Mayer LP terbentuk endapan warna putih atau kuning dan dengan larutan Bouchardat terbentuk endapan warna coklat sampai hitam maka kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes RI 1980).

7.5 Tanin.Sampel ditambahkan dengan 10 mL air panas kemudian didihkan selama 15 menit dan saring. Filtrat yang diperoleh diambil sebanyak 5 mL lalu tambah dengan pereaksi besi (III) klorida 1 %. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman (Robinson 1998).

8. Identifikasi kandungan kimia sampel herba kemangi dengan KLT

Senyawa metabolit sekunder yang diduga terdapat pada kemangi adalah Tanin, Flavonoid, Steroid, Triterpenoid, Minyak Atsiri:

8.1 Flavonoid.Sampel dilarutkan dalam etanol, kemudian ditotolkan pada fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dengan fase gerak *n*-heksana:etilasetat:asam formiat (6:4:0,2), kemudian diuji kromatografi lapis tipis dibaca pada UV 254 nm dan 366 nm dan reagen untuk deteksi bercak menggunakan Sitroborat, hasil positif memberikan warna kuning yang cepat pudar dengan pembanding Quersetin (Harborne 1987).

8.2 Tanin.Sampel dilarutkan dengan etanol, lalu ditotolkan pada fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dengan fase gerak etilasetat:asam formiat:toluene:air (6:1,5:3:0,5) kemudian, diuji kromatografi lapis tipis dibaca pada UV 254 nm dan 366 nm dan reagen pereaksi FeCl₃.Tanin akan memberikan hasil warna hijau tua kehitaman (Harborne 1987).

8.3 Steroid/triterpenoid.Sampel dilarutkan dalam etanol, diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan cara menotolkan ekstrak cair pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan menggunakan fase gerak *n*-heksana:etil asetat (4:1) dan baku pembanding menggunakan Stigmasterol. Kromatogram yang sudah disemprot dengan Liberman burchardat.dibaca pada UV 254 nm dan 366 nm secara visibel hasil positif bila terbentuk bercak berwarna merah keunguan jika steroid dan hijau untuk triterpenoid (Harborne 1987).

8.4 Minyak atsiri.Sampel dilarutkan dalam etanol kemudian diuji dengan kromatografi lapis tipis dengan menotolkan ekstrak cair pada fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan menggunakan fase gerak toluena:etilasetat (93:7) dan baku

pembanding menggunakan eugenol, dibaca pada UV 254 nm dan 366 nm. Kromatogram disemprot dengan AnisaldehydAsam Sulfat secara visibel hasil positif bila terbentuk bercak berwarna kuning kehijauan (Harborne 1987).

8.5 Alkaloid. Sampel dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya, diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menotolkan ekstrak cair pada fase diam silika gel GF 254. Elusi plat KLT menggunakan fase gerak toluena:etil asetat:dietil amin (7:2:1), dan reagen untuk deteksi bercak menggunakan Dragendrof. Fase diam dikeringanginkan, dilihat pada UV 254 nm dan 366 nm kemudian di semprot menggunakan perekasi bercak yaitu Dragendrof hasil positif bila terbentuk bercak berwarna merah bata (Harborne 1987).

9. Uji sterilisasi

9.1 Sterilisasi LAF. Sterilisasi LAF dilakukan dengan cara menyalakan ultraviolet (UV) selama 15 menit sebelum digunakan kemudian pintu LAF ditutup. Selanjutnya lampu UV dimatikan dan pintu LAF dibuka. Hidupkan lampu LAF kemudian permukaan LAF disterilkan dengan etanol 70%.

9.2 Sterilisasi alat. Alat-alat gelas yang akan digunakan harus dalam keadaan steril, dapat dicuci dengan deterjen atau antiseptik, dibilas dengan air bersih mengalir dan direndam dalam aquadest selama 1 jam. dikeringkan dalam oven selama 24 jam. Setelah kering, alat-alat tersebut diberi tanda dan dimasukkan ke dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

10. Pembuatan medium kultur DMEM

Medium kultur dibuat dari 20 mL *Fatet Bovine Serum* (FBS) 10% yang dimasukkan kedalam steril, ditambahkan 2 mL penisilin, stropotomisin 1%, 1 mL fungizon 0,5%, dan 200 mL medium DMEM murni. Medium kultur dibuat didalam LAF dan disimpan didalam lemari pendingin pada suhu 4°C (Nurulita & Mahdalena 2006).

11. Pembuatan larutan uji

Sampel sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 µL DMSO dalam ependrof dan disimpan sebagai larutan stok yang digunakan dalam uji. Pembuatan larutan stok dilakukan secara empiris didalam LAF. Selanjutnya dibuat larutan sampel dalam media DMEM masing-masing seri konsentrasi 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125

$\mu\text{g/mL}$; 62,5 $\mu\text{g/mL}$; 31,25 $\mu\text{g/mL}$; 15,6 $\mu\text{g/mL}$; 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing konsentrasi dipipet 100 μL . Dimasukkan dalam tiap sumuran dengan 3x pengulangan untuk tiap konsentrasi (Wahyuni 2015).

12. Propagasi sel

12.1 Pengaktifan sel HeLa. Sel yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segar dicairkan dalam water bath (suhu 37°C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Sel HeLa dimasukkan dalam tabung sentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambahkan media penumbuh DMEM dengan FBS 10%. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue cultur Flask* kecil (2-3 buah) dan diamati dibawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel. Sel hidup kelihatan bulat, jernih dan bersinar. Flask dimasukkan dalam inkubator beraliran CO₂ 5 % pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian.

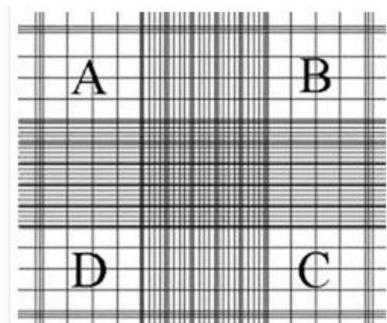
12.2 Pengaktifan sel Vero. Persiapan alat dan kondisi bahan pada ruangan, diambil 10 mL PBS pada tabung konikel, diambil ampul dari *Freezer* - 85°C (sel Vero) atau tangki nitrogen dan dicairkan pada suhu 37°C, diambil suspensi sel dalam ampul, dimasukkan tetes demi tetes ke dalam PBS yang telah disiapkan. Sentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit, dibuang supernatan kemudian ditambahkan media DMEM dan resuspensi hingga homogen. Dipindahkan ke dalam *flask* atau *petridish culture* dan ditambahkan media penumbuh DMEM.

13. Pemanenan dan perhitungan sel HeLa dan sel Vero

Media dalam kultur ditambahkan 5 mL PBS serta dihomogenkan kemudian dibuang kembali, ditambahkan tripsin secara merata dan diinkubasi selama 3 menit, ditambahkan media DMEM hingga volume 5 mL untuk mengaktifkan sel serta dilakukan resuspensi, diamati dibawah mikroskop *inverted*, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

Kultur sel HeLa yang telah konfluen dipanen dengan tripsin. Sel dipindah ke dalam tabung *conical steril* dan ditambah media DMEM 1640 hingga volume 10 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan

dibuang, ditambahkan 3 mL media dan diresuspensikan. Diambil 10 μL dan dipipetkan ke *haemocytometer* lalu sel dihitung di bawah mikroskop *inverted*.



Gambar 4. Skema bilik hitung dalam *Haemocytometer*

Haemocytometer terdiri dari 4 bilik hitung (A, B, C dan D). Setiap kamar dihitung 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. Jumlah sel yang diperoleh dari keempat bidang diambil nilai rata-ratanya, kemudian dikalikan dengan pengeceran sebesar 10 kali dan faktor koreksi dari *Haemocytometer* 10^4 . Dihitung jumlah sel per mL dengan rumus:

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{\text{Jumlah sel di A} + \text{sel di B} + \text{sel di C} + \text{sel di D}}{4} \times 10^4 \dots\dots(4)$$

Dihitung volume pemanenan sel yang diperlukan (dalam mL) dengan rumus:

$$\text{Volume pemanen sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung/mL}} \times 10^4 \dots\dots\dots(5)$$

Jumlah suspensi sel yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan dihitung untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar 2×10^4 sel/ $100\mu\text{L}$. Sel didistribusikan ke dalam *microplate* sumuran 96 dengan konsentrasi 2×10^4 sel/sumuran dalam $100 \mu\text{L}$ kemudian diinkubasi dalam inkubator 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran.

14. Uji Sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel Vero

Sebanyak $100 \mu\text{L}$ larutan uji disuspensikan dengan $100 \mu\text{L}$ sel dalam medium DMEM untuk sel HeLa dan sel Vero (kepadatan 2×10^4 sel/sumuran). Sampel dimasukkan kedalam *microplate* 96. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 5 %. Sampel masuk dalam *plate* dengan lima serial konsentrasi ($500 \mu\text{g/mL}$; $250 \mu\text{g/mL}$; $125 \mu\text{g/mL}$; $62,5 \mu\text{g/mL}$; $31,25 \mu\text{g/mL}$; $15,6 \mu\text{g/mL}$; $7,8 \mu\text{g/mL}$) dan untuk kontrol positif menggunakan Cisplatin dengan lima serial

konsentrasi (100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 7,125 µg/mL; 3,5625 µg/mL) dan kontrol negatif menggunakan kontrol sel. Selanjutnya *plate* diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % suhu 37⁰C selama 24 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu (formazan). Lalu dibuang media sel, ditambahkan 100 µL reagen MTT ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Setelah diinkubasi selama 4 jam, ditambahkan 100 µL SDS 10 % untuk menghentikan reaksi antara sel hidup. Pada akhir inkubasi serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

E. Analisis Data

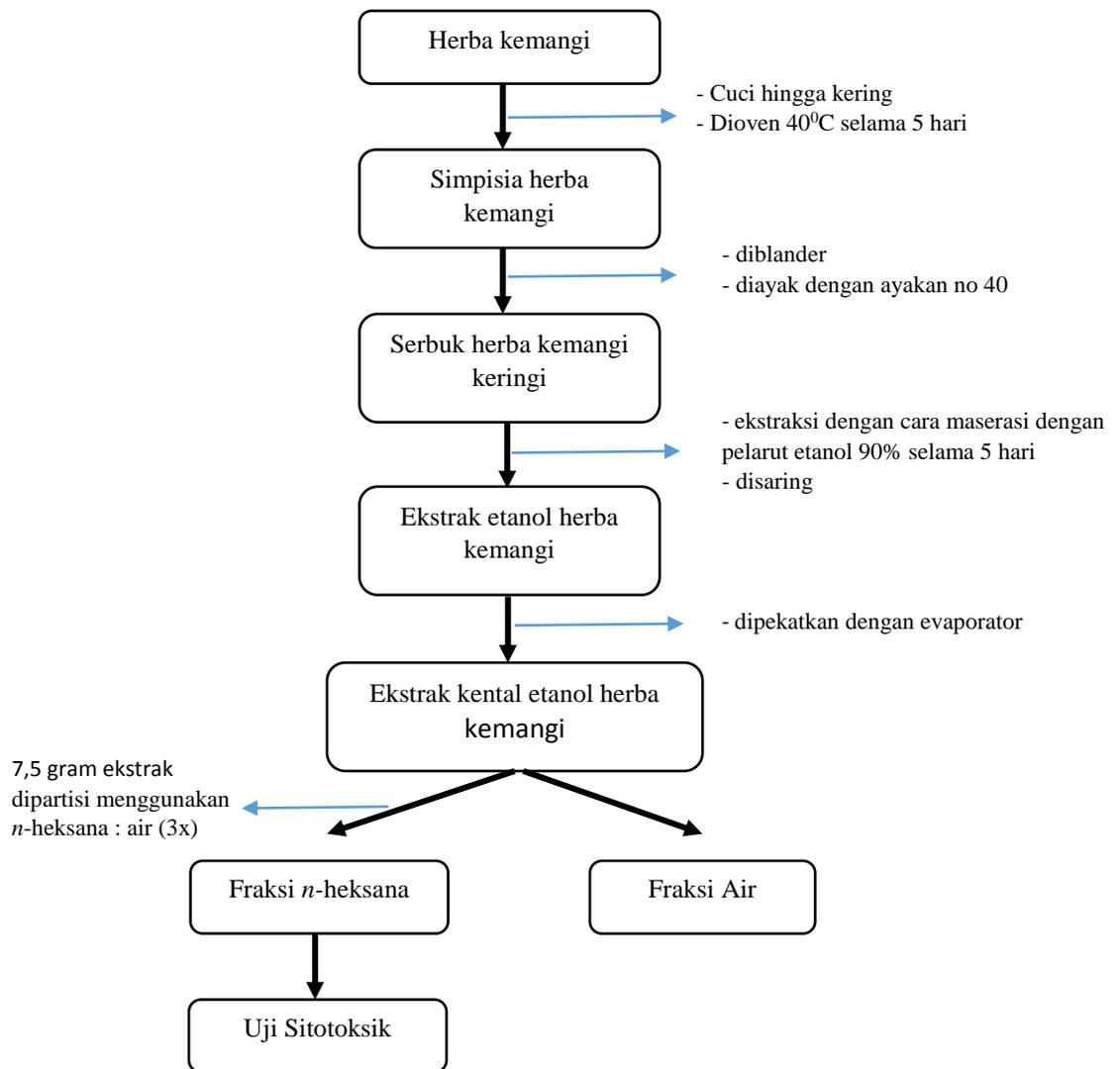
Hasil uji sitotoksik pada sel HeLa dan sel Vero didapatkan data absorpsi dicari hubungan regresi linier antara log konsentrasi dengan persen sel hidup menghasilkan persamaan $y=bx+a$, IC₅₀ dihitung dengan cara mensubstitusi nilai 50 pada Y sehingga diperoleh nilai x dan nilai IC₅₀ merupakan antilog x. Berikut adalah rumus perhitungan % sel hidup yang digunakan :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(\text{absorpsi perlakuan} - \text{absorpsi kontrol media})}{(\text{absorpsi kontrol sel} - \text{absorpsi kontrol media})} \times 100 \% \dots\dots (6)$$

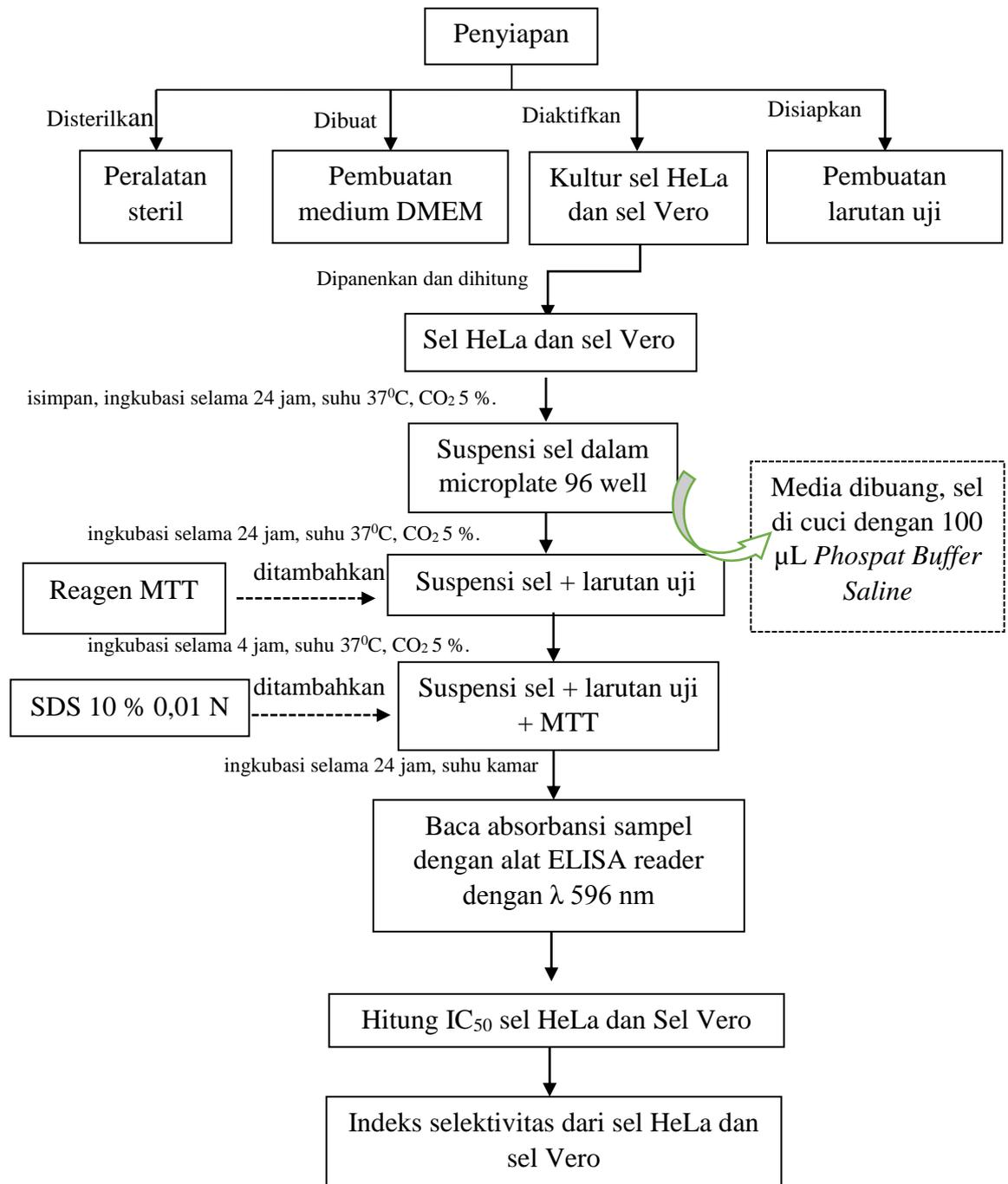
Indeks selektivitas diperoleh dari rasio IC₅₀ sel Vero dengan sel kanker yang diuji. Suatu sampel dikatakan bersifat selektif apabila mempunyai indeks selektivitas >10 (Wahyuningsih *et al.* 2013). Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Indeks selektivitas} : \frac{\text{IC}_{50} \text{ Sel Vero}}{\text{IC}_{50} \text{ sel HeLa}} \dots\dots\dots (7)$$

Analisis kandungan kimia dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif baik terhadap pemeriksaan dengan pereaksi kimia maupun kromatografi lapis Tipis.



Gambar 5. Skema pembuatan fraksi n-heksana herba kemangi



Gambar 6. Skema uji sitotoksik herba kemangi (*Ocimum basilicum L*)

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Hasil determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, mencocokkan ciri morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi dan menghindari kesalahan pengumpulan bahan.

Determinasi dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistematika Tumbuhan Universitas Setia Budi di Surakarta. Hasil determinasi berdasarkan buku acuan *Flora of java (Spermatophytes. Only)*. Hasil determinasi dinyatakan bahwa sampel yang digunakan adalah benar-benar kemangi (*Ocimum basilicum* L.) yang dimaksudkan, sehingga kemangi ini yang akan digunakan selanjutnya dalam penelitian. Data mengenai kebenaran hasil determinasi dapat dilihat pada kunci determinasi dibawah ini :

1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b_____10.

239b-243b-244b-248b-249b-250b-266b-267b-268b-271b_____110.

Labiatae. 1a-2b-4b-6b-7b_____ *Ocimum*

basilicum L. Hasil dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Hasil pembuatan serbuk herba kemangi

Herba kemangi yang masih segar dan berwarna hijau disortir dan dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel pada herba kemangi kemudian ditiriskan. Setelah itu herba kemangi dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50⁰C. Pengeringan tanaman ini bertujuan untuk mengurangi kandungan air pada tanaman dan menghentikan reaksi enzimatik yang dapat terjadi pada tanaman, selain itu kadar air yang terlalu tinggi dapat menjadi media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme yang akan menyebabkan pembusukan pada tanaman. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan dan memperluas permukaan partikel sehingga dapat meningkatkan kontak antara cairan penyari dan serbuk sehingga dapat

memaksimalkan hasil ekstraksi. Herba kemangi yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan no 40. Data rendemen berat herba kemangi dapat dilihat seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen berat kering herba kemangi berdasarkan berat herba basah

Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendemen (%)
20000	1680	8,4

Dari data dapat dilihat simplisia herba kemangi rendemen yang didapat adalah 8,4 %. Hasil rendemen yang didapat banyak mengalami penyusutan hal ini dikarenakan banyak senyawa yang menguap. Untuk perhitungan rendemen secara rinci dapat dilihat pada lampiran 6. Simplisia yang didapat kemudian dilakukan maserasi.

3. Hasil pembuatan ekstrak etanol herba kemangi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dengan metode maserasi. Metode ini bertujuan untuk penyarian yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam larutan penyari serta mencegah terjadinya kerusakan pada senyawa-senyawa termolabil. Keuntungan dari proses ekstraksi dengan maserasi adalah bahan yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam pelarut sampai meresap dan akan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan terlarut, maserasi dilakukan dalam beberapa kali penggojokkan. Penggojokkan bertujuan untuk menjamin keseimbangan konsentrasi serbuk dalam cairan penyari. Pembilasan dilakukan untuk mengambil zat aktif yang tertinggal. Pemilihan pelarut berdasarkan keamanan dan kemudahan menguap dari pelarut tersebut. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Penggunaan pelarut ini sifat etanol yang tidak beracun dan mudah menarik keluar senyawa aktif dari dalam sel dan dapat bercampur dengan air sebagai perbandingan, disamping itu etanol memiliki titik didih rendah sehingga mudah dan cepat diuapkan (Depkes 1986).

Maserat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak belum terlalu pekat kemudian dipekatkan dengan pengangas air. Pemekatan berarti peningkatan jumlah senyawa terlarut secara penguapan menjadi kental dan pekat (Depkes RI 2000). Data hasil pembuatan ekstrak etanol herba kemangi dapat dilihat seperti ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rendemen ekstrak etanol herba kemangi

Berat serbuk(gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
1000	63,5	6,35

Dari data dapat dilihat rendemen yang didapat pada ekstrak herba kemangi adalah 6,35%. Untuk perhitungan rendemen secara rinci terdapat pada lampiran 6. Ekstrak yang didapat kemudian dilakukan fraksinasi cair-cair.

4. Pembuatan fraksi *n*-heksana

Pembuatan fraksi *n*-heksana herba kemangi dilakukan menggunakan metode ekstraksi cair-cair yaitu dengan menggunakan corong pisah. Prinsip kerja dari metode ekstraksi cair-cair yaitu adanya kesetimbangan senyawa diantara dua pelarut yang tidak saling bercampur. *n*-heksana merupakan pelarut yang diharapkan dapat melarutkan senyawa-senyawa non polar seperti terpenoid atau steroid dan minyak atsiri secara maksimal. Data hasil pembuatan fraksi *n*-heksana herba kemangi dapat dilihat seperti ditunjukkan pada Tabel 3 perhitungan rendemen secara rinci ditunjukkan pada Lampiran 6.

Tabel 3. Rendemen fraksi *n*-heksana herba kemangi

Berat ekstrak (g)	Berat fraksi (g)	Rendemen (%)
15	11,13	74,23

5. Hasil identifikasi dan karakteristik serbuk herba kemangi

Pada penelitian ini terlebih dahulu dilakukan pengujian parameter spesifik dan non spesifik dari serbuk herba kemangi, tujuannya agar nantinya simplisa berstandar dapat digunakan sebagai obat yang mengandung kadar senyawa yang konstan dan dapat dipertanggungjawabkan serta terjamin mutu ekstrak tanaman obat.

5.1 Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk herba kemangi.

Pemeriksaan organoleptis bertujuan untuk mengetahui sifat fisika dan kontrol kualitas dari serbuk baik dari bentuk, warna, bau, dan rasa. Hasil penelitian ini dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil organoleptis serbuk herba kemangi

Pengujian	Hasil
Bentuk	Serbuk
Warna	Hijau kecoklatan
Bau	Khas aromatis
Rasa	Pahit

5.2 Hasil penetapan susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Depkes RI 2000). Metode yang digunakan untuk penetapan susut pengeringan yaitu dengan *moisture balance*. Perhitungan dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 7 dan Tabel 5 menunjukkan hasil penetapan susut pengeringan dengan *moisture balance*.

Tabel 5. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk herba kemangi

Perlakuan	Kadar (%)
Kadar 1	9,3
Kadar 2	10,2
Kadar 3	9,5
Rata-rata \pm SD	9,6 \pm 0,47

Dari data diatas hasil penetapan susut pengeringan *moisture balance* adalah 9,6 %. Nilai Persentase rata-ratasusut pengeringan menunjukkan bahwa serbuk herba kemangi memenuhi syarat, yaitu senyawa yang hilang pada proses pengeringan tidak lebih dari 10%.

5.3 Hasil penetapan kadar air herba kemangi dengan cara destilasi. Penetapan kadar air herba kemangi menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Penetapan kadar air sangat penting untuk memberikan batasan maksimal kandungan air di dalam simplisia, karena jumlah air yang tinggi dapat menjadi media tumbuhnya bakteri dan jamur yang dapat merusak senyawa yang terkandung didalam simplisia (Depkes RI 2000). Cairan pembawa yang digunakan adalah xilen jenuh air karena xilen memiliki titik didih lebih tinggi dari pada air dan tidak bercampur dengan air sehingga memudahkan dalam penetapan

kadar air. Data penetapan kadar air dengan cara destilasi dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil penetapan kadar air serbuk herba kemangi

Berat serbuk (gram)	Volume pada skala (mL)	Kadar (%)
20,0	1,4	7
20,0	1,5	7,5
20,0	1,4	7
Rata-rata \pm SD	1,43	7,17 \pm 0,289

Dari hasil penetapan kadar air serbuk simplisia herba kemangi dapat dilihat bahwa simplisia herba kemangi memiliki kadar air 7,17 %. Hasil perhitungan dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 8. Hasil penetapan kadar air yang memenuhi persyaratan adalah kurang dari 10%. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui ketahanan suatu bahan selama penyimpanan agar terhindar dari pengaruh aktivitas mikroorganisme. Kandungan air pada suatu bahan yang terlalu tinggi dapat membuat bahan tidak tahan terhadap penyimpanan dalam jangka waktu yang lama karena kemungkinan kerusakan bahan akibat jamur.

5.4 Hasil penetapan kadar sari larut air. Penetapan kadar sari larut air dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang dapat disari dengan pelarut air dari suatu simplisia (Depkes 2000). Sehingga diketahui berapa banyak metabolit primer yang tersari seperti karbohidrat, amilum, gula, dll yang memiliki BM yang tinggi. Hasil penetapan kadar sari yang larut air adalah sebesar 7,3 %. Hasil penetapan kadar sari air dapat dilihat seperti ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil penetapan kadar sari larut air serbuk herba kemangi

Berat awal	Berat sari (gram)	Kadar (%)
5	0,06	6,61
5	0,09	9,38
5	0,06	5,91
Rata-rata \pm SD		7,3 \pm 1,835

Menurut Depkes (1995) kadar sari yang larut air untuk serbuk herba kemangi lebih dari 5 %. Hasil kadar sari yang larut dalam air memenuhi syarat

karena lebih dari 5 %.Perhitungan kadar sari larut air dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 9.

5.5 Hasil penetapan kadar sari larut etanol. Penetapan kadar sari larut dalam etanol dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang dapat disari dengan pelarut etanol dari suatu simplisia (Depkes 2000). sehingga diketahui berapa banyak metabolit sekunder yang tersari seperti flavonoid, fenolat, alkaloid. Tabel 8 menunjukkan bahwapenetapan kadar sari yang larut etanol adalah sebesar 25,22%.

Tabel 8. Hasil penetapan kadar sari latut etanol serbuk herba kemangi

Bobot awal (gram)	Bobot sari (gram)	Kadar (%)
5	0,24	23,61
5	0,29	29,76
5	0,23	22,29
Rata-rata±SD		25,22 ± 3,987

Menurut Depkes (1995) kadar sari yang larut etanol untuk herba kemangi yaitu lebih dari 3.5 %. Hasil kadar sari yang larut dalam etanol memenuhi syarat karena lebih dari 3.5 %. Perhitungan kadar sari larut air dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 9.

6. Hasil kontrol kualitas ekstrak dan fraksi herba kemangi

6.1 Hasil identifikasi organoleptis sampel herba kemangi. Pemeriksaan organoleptis bertujuan untuk mengetahui sifat fisik dari ekstrak kental herba kemangi dan sebagai kontrol kualitas ekstrak yang akan digunakan. Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak herba kemangi dapat dilihat seperti yang ditunjukka pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil organoleptis ekstrak etanol herba kemangi

Pengujian	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	coklat kehitaman
Bau	Khas aromatis
Rasa	Pahit

6.2 Hasil identifikasi organoleptis fraksi *n*-heksana. Uji organoleptis fraksi *n*-heksanameliputi : bentuk, warna, bau, dan rasa. Hasil uji organoleptis dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil organoleptis fraksi *n*-heksana herba kemangi

Pengujian	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	Hijau kehitaman
Bau	Khas aromatis
Rasa	Pahit

6.3 Hasil penetapan susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan merupakan salah satu persyaratan yang harus dipenuhi dalam standarisasi tanaman yang berkhasiat obat. Susut pengeringan dapat memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Depkes RI 2000). Hasil penetapan susut pengeringan dengan *moisture balanced* dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak herba kemangi

Berat ekstrak (g)	Kadar (%)
2	26,7
2	25,3
2	27,1
Rata-rata ± SD	26,367±0,945

6.4 Hasil penetapan kadar air. Penetapan kadar air ekstrak herba kemangi bertujuan untuk memberikan batasan maksimal atau rentang besarnya kandungan air, nilai maksimal yang diperoleh terkait dengan kemurnian dan kontaminasi (Depkes RI 2000). Data penetapan kadar air ekstrak dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Hasil penetapan kadar air ekstrak herba kemangi

Penimbangan (g)	Volume pada skala (mL)	Kadar (%)
10	2,4	24
10	2,0	20
10	2,6	26
Rata-rata± SD		23,33 % ± 3,055

Hasil penetapan kadar air ekstrak sebesar 23,33 %. Persyaratan kadar air ekstrak etanol tidak lebih dari 30% (Depkes 2000) sehingga memenuhi syarat kadar air. Perhitungan dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 8.

7. Hasil skrining fitokimia sampel herba kemangi.

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan yang terdapat dalam herba kemangi. Sampel herba kemangi yang diperoleh diidentifikasi kandungan kimia yang terkandung di dalamnya. Hasil identifikasi kandungan kimia herba kemangi dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Tabel 13.

Tabel 13. Hasil identifikasi kandungan kimia sampel herba kemangi

Senyawa	Hasil		Keterangan	
	Ekstrak	Fraksi	ekstrak	Fraksi
Tanin	Hijau kehitaman	Hijau	(+)	(-)
Steroid	Cicin hijau	Cincin hijau	(+)	(+)
Flavonoid	Merah	Coklat	(+)	(-)
Minyak atsiri	bau khas	bau khas	(+)	(+)
Alkaloid	Coklat kehijauan	Coklat kehijauan	(-)	(-)
	Coklat kehijauan	Coklat kehijauan	(-)	(-)

Keterangan :

(+) : ada senyawa

(-) : tidak ada senyawa

Berdasarkan pengujian tersebut, ekstrak herba kemangi mengandung tanin, steroid, minyak atsiri dan flavonoid. dan fraksi *n*-heksana herba kemangi mengandung minyak atsiri, steroid. Hasil ini sesuai dengan Depkes RI (1989) menyatakan bahwa di dalam herba kemangi terkandung tanin 4,6%, flavonoid, steroid/triterpenoid, minyak atsiri 2%. Hasil gambar dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada lampiran 11.

8. Identifikasi kandungan senyawa herba kemangi dengan metode KLT

Kandungan kimia dalam sampel herba kemangi juga dapat diketahui dengan uji kualitatif secara KLT. Pengujian ini dilakukan untuk memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi komponen atau senyawa-senyawa yang dibawa oleh fase gerak dan ditahan secara selektif oleh fase diam. Senyawa yang diidentifikasi antara lain flavonoid, tanin, steroid, triterpenoid, minyak atsiri, dan alkaloid.

8.1 Identifikasi senyawa flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Fase diam pada identifikasi ini dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄ dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat : asam formiat (6:4:0,2). Pereaksi semprot yang digunakan adalah Sitoborat dengan pembanding quersetin. Bercak yang terjadi diamati di UV 254 dan UV 366.

Tabel 14. Hasil identifikasi flavonoidekstrak dan fraksi herba kemangi secara KLT

Identifikasi	Rf	UV 254	UV 366	Preaksi Semprot (Sitoborat)	Hasil
Quersetin	0,28 0,38	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan	Kuning	
Ekstrak	0,54	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan	Kuning	Positif
Fraksi	0,54	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan	Kuning	Positif

Tabel 14 menunjukkan bahwa hasil identifikasi senyawa flavonoid pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman dan UV 366 menunjukkan bercak berwarna kuning kehijauan, kemudian setelah disemprot dengan pereaksi Sitoborat menunjukkan bercak berwarna kuning yang mudah memudar. Perhitungan nilai Rf pada ekstrak dan fraksi adalah sebesar 0,54. Dilihat dari nilai Rf sampel dengan baku tidak sesuai hal ini membuktikan bahwa sampel bukan termasuk senyawa quersetin. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid ekstrak dan fraksi herba kemangi dinyatakan positif karena terdapat kesesuaian hasil pengamatan yaitu terbentuknya warna kuning yang memudar. Gambar KLT dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 12.

8.2 Identifikasi senyawa alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan KLT. Fase diam pada identifikasi ini dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄ yang bersifat polar dan penggunaan fase gerak toluen : etil asetat : dietil amin (7:2:1), pereaksi untuk deteksi bercak yang digunakan adalah Dragendroff. Bercak yang terjadi diamati di UUV 254 dan UV 366.

Tabel 15. Hasil identifikasi alkaloid ekstrak dan fraksi herba kemangi secara KLT

Identifikasi	Rf	UV254	UV 366	Preaksi Semprot (Deragendrof)	Hasil
Ekstrak	0,36 0,5	Peredaman	Flouresensi ungu padam	Kuning	Negatif
Fraksi	0,36 0,5 0,64	Peredaman	Flouresensi ungu padam	Kuning	Negatif

Tabel 15 menunjukkan bahwa hasil identifikasi senyawa alkaloid pada UV 254 mengalami peredaman dan UV 366 berflouresensi ungu padam dimana setelah disemprot dengan pereaksi Dragendroff tidak dihasilkan warna merah bata (tidak terjadi perubahan). Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa alkaloid pada ekstrak dan fraksi *n*-heksana herba kemangi dinyatakan negatif karena tidak terbentuk warna coklat. Gambar dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 12.

8.3 Senyawa triterpenoid/steroid. Identifikasi triterpenoid/Steroid dilakukan dengan menggunakan KLT. Fase diam pada identifikasi ini dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak adalah *n*-heksan : etil asetat (6:4). Pereaksi untuk deteksi bercak yang digunakan adalah Lieberman Burchard (LB) dan pembanding yang digunakan adalah stiqmasterol.

Tabel 16. Hasil identifikasi triterpenoid/steroid ekstrak herba kemangi secara KLT

Identifikasi	Rf	UV254	UV 366	Preaksi Semprot (LB)	Hasil
Stiqmastrol	0,6	Peredaman	Hijau	Hijau	
Ekstrak	0,4	Peredaman	Merah keunguan	Merah keunguan	Triterpenoid
	0,6	Peredaman	Hijau	Hijau	Steroid
Fraksi	0,4	Peredaman	Merah keunguan	Merah keunguan	Triterpenoid
	0,6	Peredaman	Hijau	Hijau	Steroid

Tabel 16 menunjukkan bahwa hasil identifikasi senyawa triterpenoid/stroid pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman dan UV 366 menunjukkan warna merah ungu, kemudian setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman burchard (LB) memberikan 2 warna noda spesifik. Noda pertama ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana memberikan warna hijau kebiruan dengan nilai Rf berturut-turut adalah 0,68 dan 0,64 sehingga positif triterpenoid. Noda warna kedua untuk ekstrak dan fraksi berwarna biru keunguan terdapat pada Rf 0,4 sehingga positif steroid sesuai dengan baku yang memberikan noda berwarna hijau kebiruan. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa triterpenoid ekstrak etanol positif mengandung triterpenoid dan steroid. Gambar KLT dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 12.

8.4 Identifikasi senyawa tanin. Identifikasi senyawa tanin dilakukan dengan menggunakan KLT. Fase diam pada identifikasi ini dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak berupa *n*-heksana : etil asetat (6:4) pereaksi untuk deteksi bercak yang digunakan adalah FeCl₃ dan pembanding yang digunakan adalah Asam Galat. Bercak yang terjadi diamati di UUV 254 dan UV 366.

Tabel 17. Hasil identifikasi tanin ekstrak herba kemangi secara KLT

Identifikasi	Rf	UV254	UV 366	Preaksi Semprot (LB)	Hasil
Asam galat	0,22	Peredaman	Flouresensi Ungu padam	Biru kehitaman	
Ekstrak	0,4	Peredaman	Flouresensi ungu padam	Biru kehitaman	positif
Fraksi	0,4	Peredaman	Flouresensi ungu padam	Tidak tampak	negatif

Tabel 17 menunjukkan bahwa hasil identifikasi senyawa tanin pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman dan UV 366 menunjukkan adanya flouresensi ungu padam, kemudian setelah disemprot dengan pereaksi FeCl₃, ekstrak menunjukkan bercak berwarna biru kehitam dengan nilai Rf sebesar

0,22 setelah disemprot terbentuk warna biru kehitaman sehingga ekstrak positif tanin dan fraksin-heksana didapatkan nilai Rf sebesar 0,22 setelah disemprot tidak terjadi perubahan warna. Berdasarkan hasil identifikasi ekstrak positif mengandung golongan senyawa tanin dan fraksi *n*-heksana negatif senyawa tanin. Gambar KLT dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 12.

8.5 Identifikasi senyawa minyak atsiri. Identifikasi minyak atsiri dilakukan dengan menggunakan KLT. Fase diam pada identifikasi ini dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄ yang dan fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana : etil asetat (6:4) pereaksi untuk deteksi bercak yang digunakan adalah Anisaldehid asam sulfat pembanding yang digunakan adalah Eugenol. Bercak yang terjadi diamati di UUV 254 dan UV 366.

Tabel 18. Hasil identifikasi minyak atsiri ekstrak herba kemangi secara KLT

Identifikasi	Rf	UV254	UV 366	Preaksi Semprot (Anisaldehyd-asam sulfat)	Hasil
Eugenol	0,54	peredaman	Fluoresensi ungu padam	Coklat kehijauan	
Ekstrak	0,5	peredaman	Fluoresensi ungu padam	Coklat kehijauan	positif
Fraksi	0,54	peredaman	Fluoresensi ungu padam	Coklat kehijauan	positif

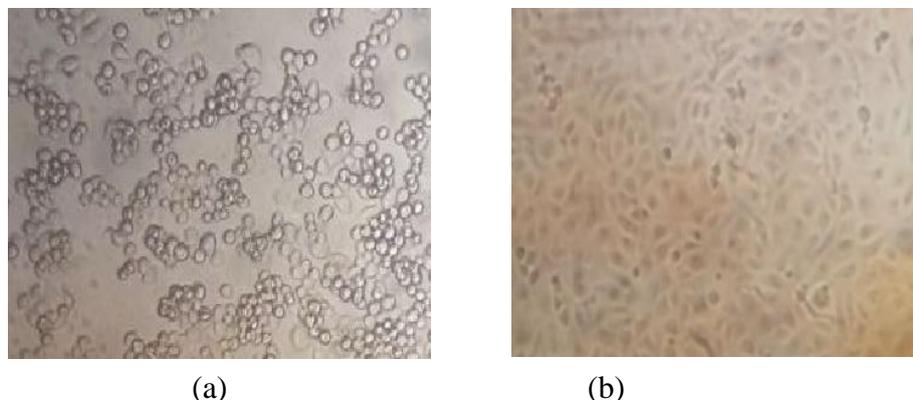
Tabel 18 menunjukkan bahwa hasil identifikasi minyak atsiri pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman dan UV 366 fluoresensi ungu padam, setelah disemprot dengan pereaksi Anisaldehyd menunjukkan bercak berwarna biru kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,54. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa minyak atsiri ekstrak dan fraksi positif minyak atsiri dilihat dari bercak yang berwarna coklat kehijauan dan Rf yang didapat 0,54. Hal ini dinyatakan positif karena terdapat kesesuaian hasil pengamatan dengan pustaka. Gambar dapat dilihat pada lampiran 12. Gambar KLT dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 12.

9. Uji sitotoksik ekstrak dan fraksi *n*-heksana herba kemangi

Uji sitotoksik pada fraksi *n*-heksana herba kemangi dilakukan terhadap sel kanker serviks (sel HeLa) dimana dilakukan menggunakan metode MTT *assay*. Uji sitotoksik dilakukan berdasarkan prinsip reduksi MTT menjadi garam formazan saat enzim reduktase dalam keadaan aktif. Pengujian dilakukan pada fraksi *n*-heksana yang diujikan pada Sel Vero dan Sel HeLa.

Sel HeLa dan Sel Vero dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media DMEM berserum. Inkubasi sel yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan inkubasi CO₂ 5%. Hal tersebut dikarenakan pada konsentrasi tersebut, buffer pada medium dapat berinteraksi dengan CO₂ sehingga meningkatkan konsentrasi ion hidroksil yang dapat menstabilkan pH menjadi pH normal yaitu 7,4. Jika pH di dalam medium terjadi penurunan maka dapat memperlambat proses produksi (Molole 1990).

Medium DMEM atau media kultur terdiri dari FBS yang berguna sebagai sumber nutrisi untuk peningkatan pertumbuhan yang efektif untuk sel kanker karena kompleksitas dan banyak faktor pertumbuhan, pertumbuhan sel dan faktor nutrisi yang dikandungnya. Antibiotik *Penicilin* dan *streptomycin* yang berfungsi melindungi sel dari bakteri dan jamur. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Jumlah sel yang telah konfluen terlihat menempel rapat didasar flask seperti ditunjukkan pada gambar 7. Morfologi sel HeLa akan terlihat berbentuk bulat dan menempel pada sumuran. Morfologi sel Vero akan terlihat lonjong dan menempel pada serum.



Gambar 7. Morfologi Sel HeLa (a) dan Sel Vero (b) pada media DMEM

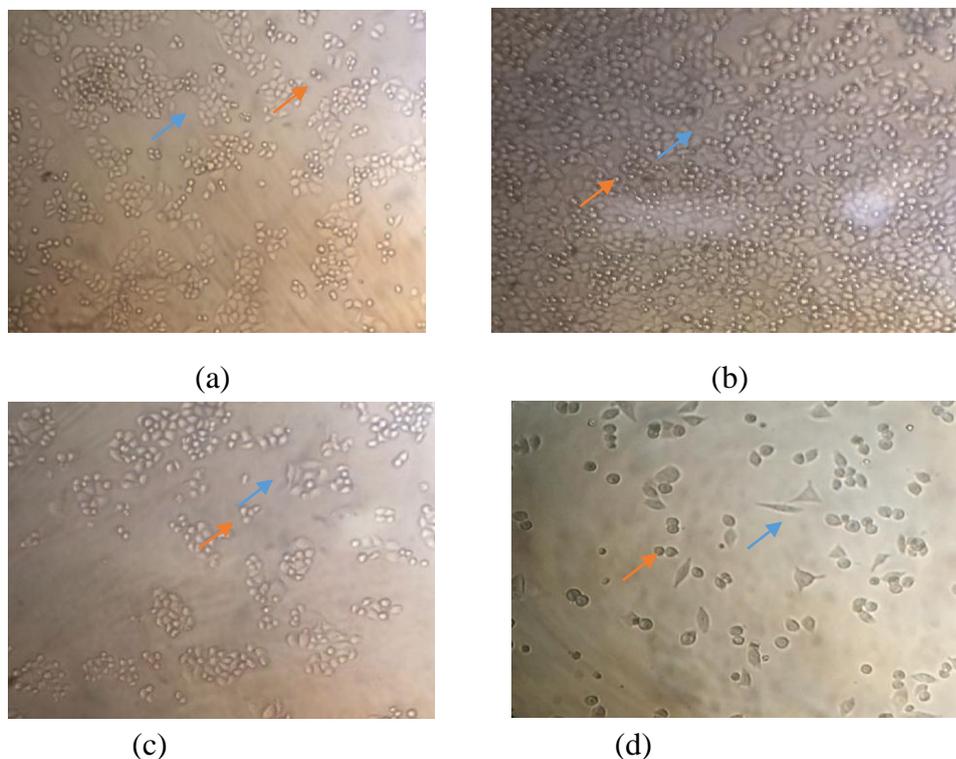
Pemanenan sel HeLa dan sel Vero dilakukan dengan metode tripsinasi. Penambahan larutan tripsin berguna untuk melepaskan ikatan antara *tissue culture flask* dengan sel HeLa atau sel Vero. Sebelum pemberian tripsin dilakukan pencucian dengan PBS yang berfungsi untuk menghilangkan serum dalam media yang tertinggal karena serum dapat menghambat kerja tripsin (Freshney 2009).

Sel di sentrifugasi dan dihitung dengan bilik hitung atau *hemocytometer* dan siap untuk disuspensikan ke sumuran. sampel yang telah siap untuk diuji sitotoksiknya ini ditumbuhkan dalam mikropate 96 sumuran dengan kepadatan sel 2×10^4 (Doyle dan Griffith 2000). Pemilihan kepadatan ini bertujuan agar jumlah sel HeLa tidak terlalu banyak dan tidak terlalu sedikit, apabila jumlah sel terlalu banyak akan mengakibatkan banyak sel yang mati akibat kekurangan nutrisi dan apabila kepadatan sel terlalu rendah maka mengakibatkan pertumbuhan sel menjadi lambat. Variasi konsentrasi yang digunakan pada fraksi *n*-heksana terhadap sel HeLa dan sel Vero adalah 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 $\mu\text{g/mL}$; 7,812 $\mu\text{g/mL}$. Dan konsentrasi cisplastin yang digunakan adalah 100 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 3,125 $\mu\text{g/mL}$; 1,5625 $\mu\text{g/mL}$.

Pada penelitian ini pelarut yang digunakan untuk melarutkan fraksi *n*-heksana adalah DMSO. Pelarut DMSO digunakan sebagai pelarut dalam uji ini karena DMSO merupakan pelarut yang baik untuk ion anorganik maupun untuk senyawa organik (Fessenden 1982). Disamping itu DMSO mempunyai pengaruh yang lebih kecil terhadap pertumbuhan sel dan relatif tidak toksik dibanding pelarut etanol. Menurut penelitian Da'i (2003) mengatakan bahwa analisa untuk sel HeLa tanpa perlakuan dan dengan perlakuan blanko DMSO menunjukkan profil pertumbuhan yang relatif sama, hal ini menunjukkan bahwa penggunaan pelarut DMSO sampai dengan kadar 1 % dalam uji tidak berpengaruh pada sel HeLa.

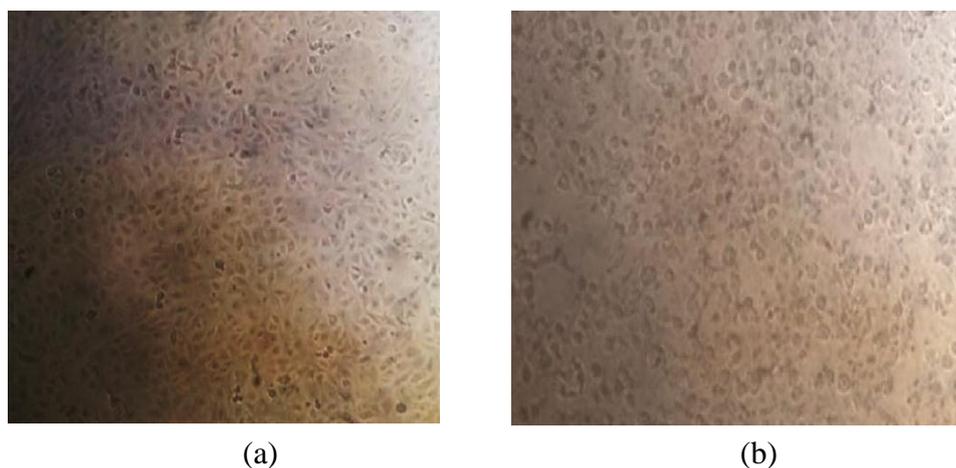
Medium yang berisi sel didistribusikan dalam 96 sumuran masing-masing 100 μL , kemudian ditambahkan variasi konsentrasi pada tiap tiap sampel. Tahap selanjutnya, *mikroplate* yang berisi sel dan sampel uji diinkubasi selama 24 jam dan dilakukan pengamatan morfologi dibawah mikroskop. Perlakuan ekstrak dari

fraksi *n*-heksana serta cisplatin sebagai kontrol positif menyebabkan perubahan morfologi pada sel HeLa dan Sel Vero. Pengamatan morfologi sel setelah perlakuan dilakukan dibawah mikroskop.



Gambar 8. Morfologi sel HeLa setelah penambahan fraksi *n*-heksana herba kemangi sebelum diberi MTT konsentrasi 500 µg/mL (a) konsentrasi 7,18µg/mL (b) dan kontrol sel (c)Cisplatin(d) Keterangan : (1) sel hidup, (2) sel mati

Berdasarkan gambar 8 dilihat dari morfologi sel HeLa pada fraksi *n*-heksana tidak banyak mengalami perubahan morfologi. Sel HeLa yang masih hidup terlihat bening, bentuknya bulat panjang, dan menempel di flask sedangkan sel HeLa yang mati terlihat keruh dan bentuknya bulat dan akan terlepas pada flask. Sel mati terdapat lebih banyak pada perlakuan dengan fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 500 µg/mL dari pada fraksi *n*-heksana konsentrasi 7,18 µg/mL. Hal ini membuktikan bahwa dengan konsentrasi tinggi mampu membunuh sel HeLa. Kontrol negatif tampak berbentuk bulat dan masih banyak yang menempel pada flask, sedangkan kontrol positif (cisplatin) terlihat banyak sel yang mati dan berwarna keruh.

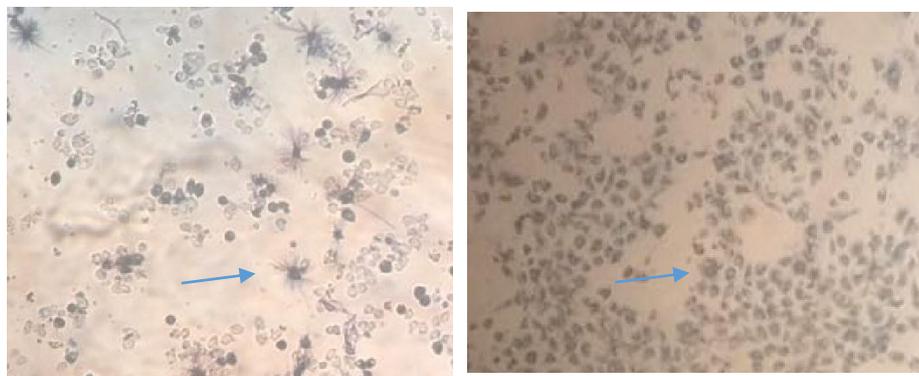


**Gambar 9. Morfologi sel Vero setelah penambahan fraksi *n*-heksana herba kemangi sebelum diberi MTT konsentrasi 500 μ g/mL (a) konsentrasi 7.18 μ g/mL (b)
Keterangan : (1) sel hidup, (2) sel mati.**

Berdasarkan gambar 9 terlihat bahwa fraksi *n*-heksana tidak mampu menghambat pertumbuhan sel Vero. Hal ini terlihat pada morfologi sel vero setelah pemberian fraksi *n*-heksana masih banyak sel vero yang menempel pada *flask* sebab sel Vero yang hidup akan melekat pada dasar sumuran sehingga ketika sumuran dibuang sel mati yang tidak melekat yang akan terbuang.

Sel HeLa dan sel Vero yang masih hidup akan menghasilkan enzim mitokondria reduktase yang selanjutnya akan bereaksi dengan cara mereduksi MTT sehingga membentuk kristal jarum formazan berwarna ungu (Gambar 10). Kristal jarum farmazan tidak larut dalam air tetapi larut dalam SDS. Kristal-kristal formazan tersebut dapat menembus membran sel dan terakumulasi di dalam sel sehat. Semakin banyak sel hidup maka semakin banyak sel yang aktif melakukan metabolisme sehingga jumlah formazan yang terbentuk juga semakin banyak. Semakin banyak jumlah produk formazan yang terakumulasi ini menyebabkan intensitas warna ungu meningkat dalam plate. Sel yang mati tidak dapat terwarnai oleh garam MTT sehingga tidak membentuk warna ungu seperti pada sel hidup.

Akibatnya sel mati tidak membentuk formazan yang berwarna ungu, tetapi tetap berwarna kuning seperti medium (Freshney1992).



(a)

(b)

Gambar 10. Morfologi sel hidup yang membentuk kristal formazan pada Sel HeLa(a), Sel Vero (b) pada mikroskop pembesaran 10 x.

Keterangan : (1) sel hidup.

Reduksi MTT dalam sel melibatkan reaksi enzimatik dengan NADPH yang dihasilkan oleh sel hidup sehingga menghasilkan endapan yang tidak larut. Pemecahan MTT terjadi pada mitokondria sel yang hidup oleh enzim suksinat dehidrogenase. Absorbansi yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi ungu formazan yang larut dalam SDS. Garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning berkurang sebagai akibat dari aktivitas metabolisme sel terutama oleh kerja enzim suksinat dehidrogenase (Doyle *et al.* 2000 ; Padmi 2008).

Nilai absorbansi yang didapatkan dari pembacaan dengan ELISA reader digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Hasil absorbansi dan perhitungan persen viabilitas dapat dilihat seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 16. Intensitas warna yang terdapat sebanding dengan jumlah sel hidup, sehingga harga absorbansi yang diperoleh dapat dikonversikan ke dalam persamaan viabilitas sel.

Tabel 19. Hasil perhitungan % viabilitas sampel herba kemangi

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Log konsentrasi	% Viabilitas ekstrak (sel HeLa)	% Viabilitas fraksi (sel HeLa)	% Viabilitas fraksi (sel Vero)
500	2,69	47,06	-5,55	34,39
250	2,39	64,88	28,47	93,19
125	2,09	82,18	44,74	92,01
62,5	1,79	100,47	82,74	105,03
31,25	1,49	108,63	102,07	121,34

15,26	1,19	110,65	112,5	124,24
7,18	0,85	111,08	141,07	117,13

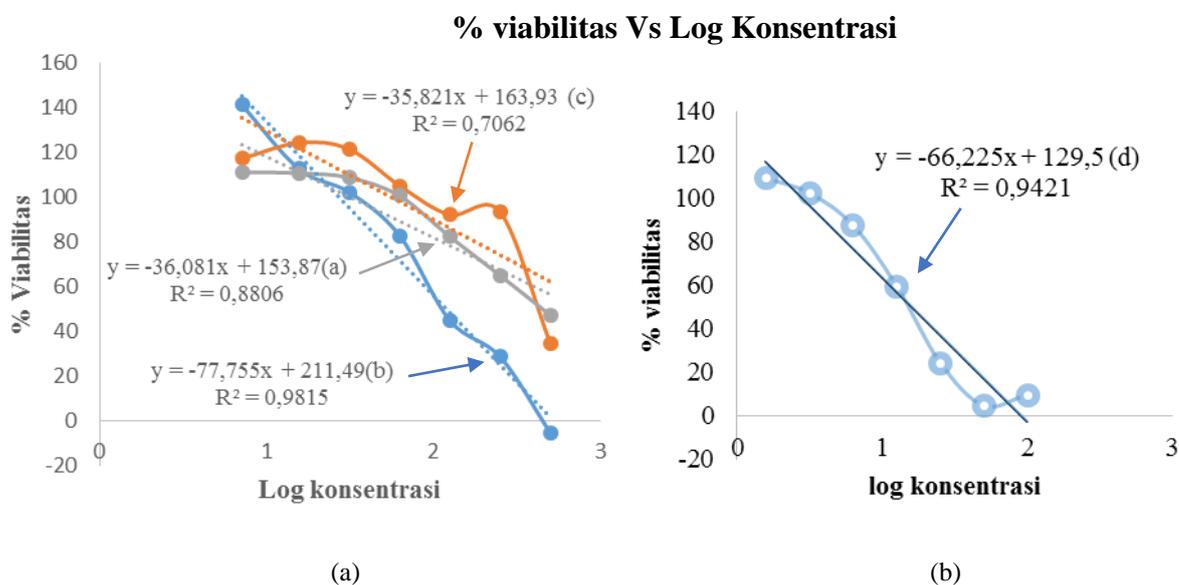
Tabel 19 menunjukkan semakin tinggi konsentrasi maka semakin kecil persen viabilitas sel HeLa. Dari data diatas fraksi *n*-heksana herba kemangi pada konsentrasi 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; dan 62,5 µg/mL persen viabilitas yang diperoleh adalah -5,55%; 28,472%; 44,742%; dan 82,738 %. Hal ini membuktikan bahwa pada konsentrasi sampai 62,5 µg/mL kemampuan sel untuk hidup kecil sehingga fraksin-heksana masih mampu untuk menghambat pertumbuhan sel HeLa. Tetapi setelah konsentrasi 31,25 %, persen viabilitas semakin tinggi bahkan mencapai 100 % sehingga fraksi *n*-heksana tidakmampu untuk menghambat pertumbuhan sel HeLa.Dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana pada sel Vero pada konsentrasi 500 µg/mL; 250 µg/mL, persen viabilitas fraksi *n*-heksana sebesar 34,39 %; 93,193 % dari hasil membuktikan bahwa fraksi *n*-heksana dengan konsentrasi tertinggi hampir membunuh sel Vero.

Tabel 20. Hasil perhitungan % Viabilitascisplatin terhadap Kultur sel Hela

Konsentrasi	Log Konsentrasi	Rata-rata absorbansi	% Viabilitas cisplastin
100	2	0,16	8,71
50	1,69	0,14	3,48
25	1,39	0,21	23,96
12,5	1,09	0,33	60,52
6,25	0,79	0,42	89,29
3,125	0,49	0,47	104,56
1,562	0,19	0,49	111,62

Tabel 20 menunjukan persen viabilitas cisplatin terhadap sel HeLa sebagai kontrol positifpada konsentrasi 100 µg/mL sebesar 8,7046 % dan pada konsentrasi 3,125 µg/mL persen viabililitas sebesar 104,56 %, hal ini menunjukkan fraksi cisplatin sampai konsentrasi 3,12 µg/mL mampu menyebabkan penurunan jumlah sel HeLa yang hidup.

Data disajikan dalam bentuk kurva hubungan log konsentrasi vs persen viabilitas sel HeLa dan sel Vero. Kurva persamaan regresi linier antara log konsentrasi dengan % viabilitas fraksi *n*-heksana terhadap sel HeLa tersaji pada gambar 11.

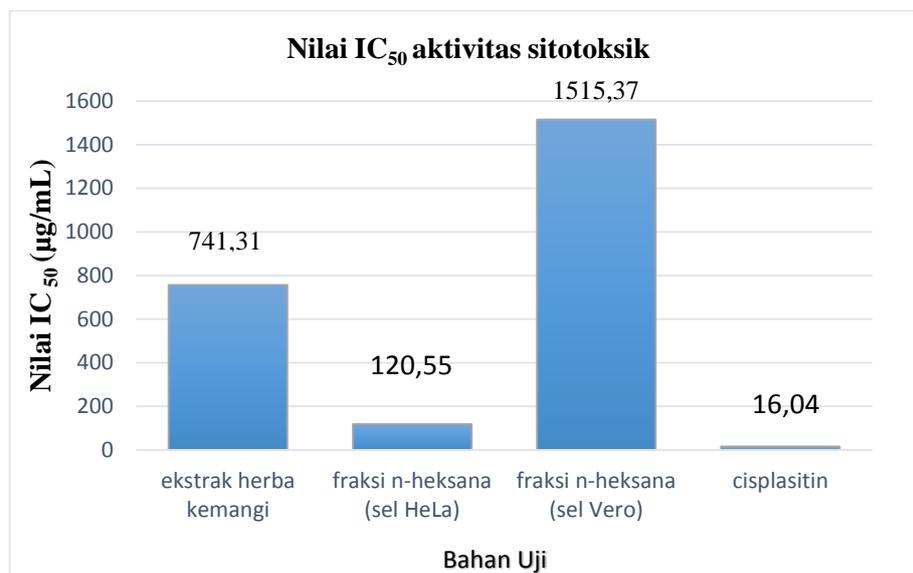


Ket : a: Ekstrak herba kemangi terhadap sel HeLa
 b: Fraksi *n*-heksana herba kemangi terhadap sel HeLa
 c: Fraksi *n*-heksana herba kemangi terhadap sel Vero
 d : cisplastin terhadap sel HeLa

Gambar 11. Presentase sel hidup pada sel HeLa dan sel Vero pada seri konsentrasi pada sampel herba kemangi (a) dan cisplastin (b)

Gambar 11 menunjukkan hasil r hitung yang didapat memenuhi syarat yaitu mendekati 1. Diketahui bahwa r hitung untuk sel HeLa ekstrak dan fraksi berturut-turut adalah 0,9384 dan 0,991. Sedangkan sel Vero fraksi *n*-heksana sebesar 0,84 dan r hitung cisplastin sebesar 0,971. Dapat dilihat r hitung yang didapat $>$ dari r tabel. Sehingga persamaan regresi linier dapat digunakan untuk analisis uji sitotoksik.

Nilai IC_{50} merupakan parameter untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} dalam penelitian ini menunjukkan nilai konsentrasi ekstrak dan fraksi herba kemangi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel HeLa sebesar 50 % dari populasi. Nilai IC_{50} dihitung untuk sel HeLa dan sel Vero dengan persamaan $y = a + bx$ untuk mengetahui konsentrasi fraksi *n*-heksana herba kemangi yang menyebabkan pertumbuhan sel hingga 50%.



Gambar 12. Hasil nilai IC₅₀ aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel Vero

Gambar 12 menunjukkan nilai IC₅₀ fraksi *n*-heksana sebesar 120,55 µg/mL dan sel Vero sebesar 1515,37 µg/mL. Menurut Uede *et al* (2002) nilai IC₅₀ dibawah 100 µg/mL merupakan agen antikanker poten sedangkan nilai IC₅₀ di atas 100 µg/mL merupakan agen kemopreventif yang poten. Berdasarkan nilai tersebut kriteria IC₅₀ fraksi *n*-heksana belum menunjukkan aktivitas sitotoksik yang poten terhadap sel kanker serviks (sel HeLa). Tetapi fraksi *n*-heksana kemungkinan memiliki aktivitas kemopreventif yang poten. Agen kemopreventif merupakan agen yang akan mencegah dan menghambat proses perkembangan kanker serta membantu memulihkan kondisi kesehatan penderita kanker. Demikian pula pada persamaan linier ekstrak herba kemangi pada gambar 11 tidak menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa.

Gambar 12 menunjukkan hasil ekstrak herba kemangi memiliki IC₅₀ adalah 741,31 µg/mL yang lebih besar dibandingkan dengan harga IC₅₀ dari fraksi *n*-heksana yaitu 119,37 µg/mL. Hasil ini disebabkan karena ekstrak herba kemangi merupakan pelarut *universal* dimana hampir semua senyawa yang larut dalam fraksi non polar, semi polar, dan polar terlarut dalam pelarut etanol 96%. Sehingga menyebabkan kandungan aktif dalam ekstrak etanolik tidak tersari secara spesifik dibandingkan senyawa-senyawa yang tersari dalam fraksi *n*-heksana. Penelitian ini juga hampir sama dengan penelitian oleh Ismiyati dan

Nurheni (2016) mengatakan bahwa ekstrak kemangi mampu menyebabkan kematian sel HeLa dengan IC_{50} 209 $\mu\text{g/mL}$ yang menunjukkan bahwa ekstrak kemangi tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik melainkan sebagai agen kemopreventif.

Cisplastin dipakai sebagai kontrol positif karena merupakan obat terpilih kanker yang lebih banyak digunakan pada pengobatan penyakit ini. Sitotoksisitas pemberian cisplastin dapat terjadi pada tahap pengembangan siklus sel, khususnya ketika sel berada pada fase G1 dan S, sedangkan antikanker produk tanaman bekerja dengan memblokir mitosis. Kromosom akan terpecah-pecah, menyebar atau berkelompok. Kromosom tidak mampu membagi dan memisah dengan benar akan menyebabkan sel menjadi mati dan perkembangan berhenti pada stadium metafase (Wahyudi 2009). Cisplastin bekerja sangat efektif dalam mengobati kanker serviks sehingga dapat digunakan sebagai pembanding aktivitas fraksi *n*-heksana herba kemangi. Penggunaan kontrol positif berguna untuk mengevaluasi keberhasilan uji sitotoksisitas sebagai bukti terjadinya efek sitotoksik. Hasil penelitian terhadap kontrol positif menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik cisplastin terhadap sel HeLa cukup besar terlihat dari nilai IC_{50} cisplastin sebesar 16,04 $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 12). Hasil penelitian ini juga hampir sama dengan penelitian oleh Awik *et al.* (2011) cisplastin mampu menyebabkan kematian sel HeLa dengan LC_{50} 16,82 $\mu\text{g/mL}$. Perbandingan hasil uji sitotoksisitas terhadap sel HeLa antara fraksi *n*-heksana herba kemangi dan cisplastin menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik fraksi uji jauh lebih kecil dari pada cisplastin.

Banyak penelitian untuk mencari senyawa antikanker baru dengan sifat yang lebih baik. Selektivitas suatu obat dapat digunakan sebagai tolak ukur baik dan bukannya suatu obat serta keamanannya. Oleh karena permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan indeks selektivitas (IS). Evaluasi keamanan sampel fraksi *n*-heksana dikerjakan untuk mengukur nilai indeks selektivitas (IS). Indeks selektivitas menginduksi selektivitas sitotoksik (keamanan) dari fraksi *n*-heksana terhadap sel Vero yang dihitung dengan membandingkan IC_{50} fraksi *n*-heksana terhadap sel normal dan IC_{50} fraksi *n*-heksana terhadap sel HeLa. Dari hasil yang didapat nilai indeks selektivitas fraksi *n*-heksana adalah 12,69. Sampel yang

dikatakan bersifat selektif apabila mempunyai selektivitas >10 (Wahyuningsih *et al.* 2014). Sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi *n*-heksana memiliki indeks selektivitas yang bersifat selektif.

Data diatas dapat disimpulkan bahwa fraksi *n*-heksana ekstrak herba kemangi mempunyai potensi dalam aktivitas sebagai agen kemopreventif. Pendekatan terapi kanker menggunakan agen kemopreventif lebih menjanjikan daripada obat antikanker konvensional. Agen kemopreventif sendiri dapat didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menghambat dan menekan proses karsinogenesis pada manusia sehingga pertumbuhan kanker dapat dicegah (Kakizoe 2003). Tidak potennya fraksi *n*-heksana ekstrak herba kemangi sebagai agen sitotoksik tidak menutup kemungkinan untuk mengarahkan tanaman ini ke arah penelitiannya sebagai agen kemopreventif.

Kandungan senyawa yang diduga berperan dalam menyebabkan ketoksikan pada fraksi *n*-heksana herba kemangi adalah senyawa minyak atsiri, triterpenoid/steroid. Senyawa minyak atsiri merupakan salah satu senyawa yang berpotensi menghambat aktivitas antioksidan mempunyai peranan penting dalam menghambat proliferasi sel kanker dimana sel-sel kanker ini terbentuk karena banyaknya radikal bebas dalam tubuh. Semakin banyak gugus OH maka aktivitas penangkapan radikal bebas akan semakin kuat (Zuo *et al.* 2011). Salah satu senyawa minyak atsiri yang berperan dalam anti kanker adalah eugenol, eugenol mempunyai efek antioksidan, membersihkan radikal bebas dan mencegah pertumbuhan dan penyebaran kanker dengan cara memblok suplai oksigen dan nutrisi (Shishodia *et al.* 2015). Senyawa triterpenoid mampu menginduksi kalsium (Ca^{+}) yang dapat menstimulasi apoptosis sel kanker. Triterpenoid mampu memblok siklus sel pada fase G2/M dengan menstabilkan benang-benang spindle pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat (Pan *et al.* 2007). Senyawa golongan flavonoid yang banyak terdapat di alam adalah kuersetin. Pada penelitian Ren *et al.* (2008) menyebutkan bahwa kuersetin secara signifikan mampu menghambat proliferasi sel dan menginduksi *cell cycle arrest* serta apoptosis pada sel kanker payudara MDA-MB-453.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

Pertama, fraksi *n*-heksana herba kemangi memiliki potensi sebagai agen kemoprefentif terhadap kultur sel HeLa dan sel vero dan Nilai IC₅₀ berturut-turut adalah sebesar 120,55 µg/mL dan sebesar 1515,43 µg/mL.

Kedua, indeks selektivitas (IS) fraksi *n*-heksana herba kemangi terhadap sel Vero adalah 12,57.

Ketiga, golongan senyawa kimia yang berperan dalam aktivitas sitotoksik herba kemangi terhadap kultur sel HeLa dan sel Vero adalah minyak atsiri (eugenol) dan terpenoid (asam ursolat).

B. Saran

Pertama, perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai uji aktivitas sitotoksik herba kemangi terhadap sel kultur lain.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dari isolasi fraksi herba kemangi terhadap uji sitotoksik terhadap sel HeLa

Ketiga, perlu dilakukan pengujian apoptosis herba kemangi terhadap sel HeLa.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes A. 2010. Tanaman Obat Indonesia. Buku 2. Jakarta: Salemba Medika. Hlm 25-26.
- Amalia PK. 2016. Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Keladi Tikus (*Typonium flagelliforme* L), Kemangi (*Ocimum sanctum* L), dan Pepaya (*Carica papaya* L) terhadap Sel MCF-7 [Skripsi]. Surakarta:Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Ammerman, Nicole C, Magda, Beier-Sexton, Abdu F, Azad. 2009. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2657228/>[31 November 2017].
- Atikah N. 2013. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Herba Kemangi (*Ocimum americanum* L) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. [Skripsi]. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Awik PDN,Sukardiman, Hani Tenia Fadjri. 2011. Uji Sitotoksisitas Dan Efek Ekstrak Spons Laut Aaptos Suberitoides Terhadap Sel Kanker Serviks (Hela) Secara In Vitro. [skripsi]. Surabaya: Fakultas matematika dan Ilmu pengetahuan alam, Institut Sepuluh November.
- Aziz MF. 2006. Buku Acuan Nasional Onkologi Ginekologi. Jakarta : Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo
- Berek JS, Natarajan S. 2007. Ovarium and Fallopian Tube Cancer, in: Berek & Novak's Gynecology. 14th. Ed. California: Lippincott William & Wilkins. P.1457-1531.
- Burger A. 1970. *Medical Chemistry*, Third Edition, 681-694, Willey Interscience, New York-London Sydney-Toronto
- Canava TP dan Doshi NR. 2000. Cervical Cancer. *Physic* 16:1369 – 1376.
- Ciulei J.1984. *Methodology for Analysis of Vegetable and Drag*. Bucharest Rumania: Faculty of Pharmacy.
- Corwin dan Elizabeth J.2009. *Buku saku patofisiologi*. Edisi 3. Nike BS, penerjemah; Rgi KY, editor. Jakarta :EGC. Terjemah dari : *Hondbook Of Pathophysiology*
- Cowan BD, Seifer KA, Jarowic P, Rouse RG. 1997. Antiphospholipid Antibodies Associater With Implation Failure. *J Assist Repro Genet*.

- Da'i M. 2003. Aktivitas antiproliferatif Pentagamavunon terhadap sel Raji, Sel HeLa dan sel Myeloma [Thesis] Program Pascasarjana UGM. Yogyakarta
- [Depkes RI] Departemen kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1980. *Materia Medika Indonesia Jilid IV*. Jakarta: Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. p.77, 185
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1989. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Jakarta: Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. p.116
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Materia Medika, Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2001. *Invertans Tanaman Obat*. Ed-IV. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- [Depkes RI] Departemen kesehatan Republik Indonesia. 2006. *Inventaris tanaman obat indonesia (VI)*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia dan Kesejahteraan Sosial republik Indonesia.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Materia Medika, Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Djajanegara I.R.A. and Wahyudi P., 2009, Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstrak Daun *Annona squamosa*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7 (1), 7–11.
- Depamade SN dan Rosyidi A. 2009. Penghambatan Proliferasi limfosit mencit Balb/C oleh ekstrak testis sapi Bali:Peran TGF- β . *Media peternakan* 31:95-103.
- Diyah NW dan Sukohardjono. 2000. Penghambatan Proliferasi Limfosit mencit Balb/C oleh ekstrak testis sapi Bali Peran TGF- β . *Media Medicinal*. 32:95-103.

- Doyle A dan Griffiths JB. 2000. Cell and Tissue Culture for Medical Research Jhon Wiley & Sons.Ltd. New York 3:11-31.
- Evans CE. 2002. Trease and Evans Pharmacognosy. 15th edition, 27, 397, W.B, Saunders, Edinburg – London - New York, Philadelphia.
- Fessenden, J. 1982. Kimia Organik, Edisi ke-4, Jilid II, PenerbitErlangga: Jakarta.
- Fransworth NR.1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.* 55(3), 243-269.
- Freshney RI.1986. Animal Cell Culture, A Practical Approach 1st Ed. IRL Press Washington D.C.
- Freshney RI. 1992. Animal Cell Culture. Practical Approach. Second Edition.
- Freshney R. 2009. Cultur of Animal Cel: A manual of Basic technique % edition. A John Willet dan Sone Publication : New jersey
- Furqon M. 2014. Uji Antikanker Kombinasi Ekstrak Etil Asetat Daun Puguntana (*Picria fel-terrae* L) dengan Duksorobisin terhadap Sel Kanker Payudara secara *in vitro*. [Skripsi] Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Gritter RJ, Bobbit JM, Schwarting AE. 1985. *Inteoduction to Chromotograp Padmawinata K*. Bandung: ITB.
- Gritter RJ, Bobbit JM, Schwarting AE. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Goodwin EC dan DiMaio D. 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in Hela cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Biochemistry*.97(23).
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia; Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan ke-2.Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Bandung: ITB. Terjemahan Dari: *Phytochemical Methods*. Hlm 47-49.
- Haryanti S dan Katno. 2011. Aktivitas Sitotoksik *Ocimum sanctum* L pada Sel Kanker Kolon WiDr. *Simposium Nasional XV PERHIPBA*. Hlm 1-7.
- [IARC] International Agency for Research on Cancer. 2012. All Cancers (Excluding non-melaomaskin cancer) Estimed Incidance. Mortality and Prevelency world wide in 2012. http://globocam.iarc.fr/pages/fact_sheets_cancer.aspx. [13 Maret 2017].
- Ismiyati N dan Nurhaeni F. 2016. Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L) Sebagai Agen Kemopreventif pada Sel Kaker Leher Rahim

Hela Melalui Aktivitas Sitotoksik dan Induksi Apoptosis. *Media Farmasi* 13:35-48.

- Indrawati M. 2009. *Bahaya kanker bagi wanita dan pria*. Cetakan pertama. Jakarta: Pendidikan untuk kehidupan.
- Indriyani D. 1991. Faktor-faktor Resiko yang Berpengaruh pada Insiden Karsinoma Serviks Uteri; Study Retrospektif di RS Dr Sarjito 1989-1990. *Berita Kedokteran Masyarakat* VII (4); 234-238
- [Kemkes RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. *Farmakope Herba Indonesia*. Edisi I. Suplemen III. Jakarta : Kemmenkes RI.
- [Kemkes RI] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015. *Buletin Jendela Data dan Informasi kesehatan, semester 1*. Kepala Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
- Katzung BG, Master SB, dan Trevor AJ. 2009. *Basic and Clinical Phamacology*, 11th Edition. San Francisco: *The McGraw-Hill Companies, Inc.*
- Kharisma DP. 2002. Potensi Aktivitas Antiagregasi Platelet Lalap-Lalapan dan Pemanfaatan Pada Jeli Agar Pohpohan (*Pilea trinervia*), Kemangi (*Ocimum americanum*), dan Daun Kemang (*Mangifera kemanga*). [Skripsi] Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- King RJB. 2000. *Cancer Biology*. Edke-02. pearson Eduation limited London.
- Kurniasih. 2014. *Khasiat Dahsyat Kemangi*. Yogyakarta : Pustaka Baru Press.
- Kurnijasanti R, Hamid SI, Rahmawati K. 2008. Efek Sitotoksik In Vitro dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma. *J. Penelit Media Eksakta* 7:48-54.
- Kupcsik L dan Stoddart MJ. 2011. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. New York: Humman Press. Hal. 13-18.
- Labwork Study Guide and Lecture Notes. 2000. Henrietta Lacks. www.micro.msb.le.ac.uk/Labwork/Lack_1.htmL [15 Maret 2017].
- Magesh V, Lee JC, Ahn KS, Lee HJ. Lee EO. Shim BS. Jung HJ, Kim JS, Kim DK, Choi SH, Ahn KS, Kim SH. 2009. *Ocimum sanctum* Induces Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells and Suppresses the In Vivo Growth of Lewis Lung Carcinoma Cells. *Phytother Res* 23:1385-1391.
- Megawati L. 2014. Uji aktivitas antikanker ekstrak biji sirsak (*Anona muricata* L) terhadap beberapa sel kanker manusia secara *in vitro* [Skripsi]. Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.

- Meiyanto E. 2002. *Biologi Molekuler*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.
- Meiyanto E, Supardjan AM, And Da'i M. 2003. Anti poliferative effect of PGV_O (a curcumin analogue) againt Hela Cells, *Gama Sains*, S(3): 200-206.
- Meyer BN et al. 1982. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Drug Information Journal* 32:513-524.
- Mosman TR, Coffman RL. 1989. Th1 and Th2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review Immunology* 7: 145-73.
- Mulyadi. 1997. *Kanker : Karsinogen, karsinogenesis dan Antikanker*. Tiara Wacana Jogja. Yogyakarta. Hlm 93-94.
- Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, Suzuki Y, Takashi T. 2010. Current Advancement in Radiation Therapy for Utarine Cervical Cancer. *J Radial Res* 51:1-8.
- Nefrialdi, Gan S. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. (Cetak ulang dengan tambahan, 2012). Departemen farmakologi dan Terapeutik FKUI. Jakarta: Badan Penerbit FKUI hal 732-739.
- Nurulita NA, Mahdalena, 2006. Efek Antikanker Ekstrak Metanol-Air kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) pada Sel Kanker Payudara T47D. *Pharmacy* 04:164-176.
- Nurse P. 2000. A Long Twentieth Century of The Cell Cycle and Beyond. *Cell*. 100:71-78.
- Pan M, Chen NJ, Lin S, Ho CH, Lin JK. 2007. Tangeretin Induces Cell Cycle Through Cyclin Dependent Kinase 2 & 4 Activies as Wekkas Carsinogenesis. Oxford University Press. 23: 1677-1684.
- Padmi A. 2008. Uji Sitotoksik Ekastrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) Terhadap Sel HeLa [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Peter. 2002. Herbal remedies. <http://content.nejm.org/cgi/reprint/347/25/204>. [16 Maret 2017].
- Prakash P, Gupta N. 2005. Therapeutic Uses of *Ocimum Sanctum* Linn (Tulsi) with a Note on Eugenol and its Pharmacological Actions: A short review, *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 49:125–131.
- Qamar KA, Dar A, Siddiqui BS, Kabir N, Aslamb H, Ahmedc S, Erumc S, Habibb S, Begumb S. 2010. Anticancer Activity of *Ocimum basilicum* and

the Effect of Ursolic Acid on the Cytoskeleton of MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Letters in Drug Design & Discovery* 7:726-736.

Rasjidi I. 2007. *Panduan Penatalaksanaan kanker Ginekologi Berdasarkan Evidence Base*. Jakarta: EGC.

Rekam Medis RS Kanker Dharmais. 2012. 10 Besar Kanker Tersering RSKD Rawat Jalan tahun 2007. Statistik Kanker. <http://www.dharmais.co.id/index.php/cancer-statistic.html> [14 Maret 2017].

Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids : Promising Anticancer Agents. *Medicinal research Reviews* 23(4) : 519- 534.

Santosa CM, Hertiani T. 2005. Kandungan Senyawa Kimia dan Efek Ekstrak Air Daun Bangun-Bangun (*Coleus amboinicus* L) pada Aktivitas Fagositosis Netrofil Tikus Putih. *Farm Indones*16:141-148.

Selvi MT, Thirugnanasampandan R, Sundarammal S. 2015 Antioxidant and Cytotoxic Activities of Essential Oil of *Ocimum canum* Sims. *Journal of Saudi Chemical Society* 19:97–100.

Sheer CJ. 1996. Cencer cell cycless. *Science*. 6;274(5293):1672-7.

Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Anggarwal BB. 2003. Ursonic acid Inhibits Nuclear Factor- κ B α Kinase and p65 Phosphory : Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D1. *Cancer Research*.

Stoenoiu CM, Balbaco AD, Jantshi L. 2006. Mobile Phase Optimization for Steroid Separation. *Edical Informatics*. 18: 17-24.

Sukardja DG. 2000. *Onkologi Klinik*. Edisi 2. Surabaya: Airlangga University. Press.

Suhartono MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Pusat antar universitas Bioteknologi IPB.

Syamsuni HA. 2007. Ilmu Resep. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

Uede JY, Tesuka Y, Banskota AH, Tran QL, Hariyama Y, Saiki dan Kadota S. 2002. Antiproliforative activity of Vietmese medicinal plans. *Biology phrm*, bull. 25(6): 753-760.

Umar ANL. 2011. Perbandingan Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dengan Ketokonazol 2% dalam Menghambat Pertumbuhan *Candida* sp.pada Kandidiasis Vulvovaginalis [Skripsi]. Semarang : Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.

- Voigt R. 1994. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi edisi 5. Gajah Mada University Press, Yogyakarta,
- Wahyuni S. 2015. Uji Sitotoksik Fraksi Kloroform dari Ekstrak Metanol Daun Karandas (*Carrisa Carandas L.* Terhadap Sel HeLa secara *in vitro*. [Skripsi] Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Wahyuningsih, Mae S. 2013. Electivity pf Purified Extract from the Leaves Of *Tithonia diversifolia* (HEMSLEY)A. GRAY) Against Helacells. *Trad Med. J.* 18(1): 22-28. ISSN: 1410-5918.
- Wijayakusuma, M Hembing. 2000. *Ensiklopedia Milineum, Tumbuhan Berkhasiat Obat.* Jilid ke- 1. Jakarta : Prestasi.
- Zarlaha A, Kourkoumelis N, Stanojkovic, TP, Kovala-demertzi D. 2014. Cytotoxic activity of essential oil and extracts of *ocimum Basilicum* against human carcinoma cells. Molecular Docking study of isoeugenolas a potent cox and lox Inhibitor. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9:907-917.
- Zuo A, Yanying Y, Li J, Binbin X, Xiongying Y, Yan Q, and Shuwen C. 2011. Study on The Relation of Structure and Antioxidant Activity of Isorhamnetin, Quercetin, Phloretin, Silybin and Phloretin Isonicotinyl Hydrazone, *Free Rad. Antiox.* 1(4):39-47

L
A
M
P
I
R
A
N

Lampiran 1. Surat keterangan determinasi tanaman herba kemangi



No : 166/DET/UPT-LAB/29/IV/2017
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menerangkan bahwa :

Nama : Hilda Khairunnisa
NIM : 20144157 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Kemangi (*Ocimum basilicum L.*)**

Hasil determinasi berdasarkan : Steenis : FLORA

1b – 2b – 3b – 4b – 6b – 7b – 9b – 10b – 11b – 12b – 13b – 14b – 16a. golongan 10. 239b – 243b – 244b – 248b – 249b – 250b – 266b – 267a – 268b – 271b. familia 110. Labiatae. 1a – 2b – 4b – 6b – 7b. 8. *Ocimum. Ocimum basilicum L.*

Deskripsi :

Habitus : Herba, tegak, tinggi 0,3 – 0,6 m.

Akar : Tunggang.

Batang : Percabangan monopodial, keunguan, berambut.

Daun : Tunggal, bulat telur elips, elips, atau memanjang, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi bergerigi, bertulang menyirip, pada sebelah menyebelah ibu tulang 3 – 6 tulang cabang, panjang 3,5 – 6,5 cm, lebar 1,5 – 2 cm. Bila diremas berbau harum spesifik. Tangkai daun 0,5 – 1,9 cm.

Bunga : Karangannya semu berbunga 6, berkumpul menjadi tandan ujung. Daun pelindung elip atau bulat telur, panjang 0,5 – 1 cm. Kelopak sisi luar berambut, sisi dalam bagian bawah dalam tabung berambut rapat, panjang lk 0,5 cm; gigi belakang jorong sampai bulat telur terbalik, dengan tepi mengecil sepanjang tabung, gigi samping kecil dan runcing, kedua gigi bawah berlekatan menjadi bibir bawah yang bercelah dua. Mahkota putih, berbibir 2, panjang 8 – 9 mm, dari luar berambut; bibir atas bertaju 4; bibir bawah rata. Tangkai daun kelopak tegak dan tertekan pada sumbu dari karangan bunga, dengan ujung berbentuk kait melingkar.

Buah : Keras coklat tua, gundul. Waktu dibasahi membengkak sekali. Tangkai dari kelopak buah tegak dan tertekan pada sumbu dari karangan bunga, dengan ujung bentuk kait melingkar. Kelopak buah panjang 6 – 9 mm.

Pustaka : Steenis C.G.G.J., Bloembergen S. Eyma P.J. (1978): *FLORA*, PT PradnyaParamita. Jl. KebonSirih 46. Jakarta Pusat, 1978.

Surakarta, 29 April 2017
Tim determinasi

Dra. Kartinah Wirjosoendjojo, SU.

Lampiran 2. Surat ijin penelitian



Nomor : 2185/A10 – 4/17.04.17
Hal : Penelitian Tugas Akhir

Surakarta, 17 April 2017

Kepada Yth. Kepala Laboratorium Parasitologi
Fakultas Kedokteran UGM
Jl. Sekip Yogyakarta

Dengan hormat,

Berkaitan dengan penelitian tugas akhir (skripsi) mahasiswa Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, maka dengan ini kami mengajukan permohonan ijin bagi mahasiswa kami :

NO	NAMA	NIM	HP
1	Desi Ratna Permatasari	20144258A	085790777246
2	Hilda Khairunnisa Sholiqin	20144157A	089661123946

Untuk keperluan / memperoleh :

- **Pemelitian Uji Sitotoksik**

Mengenai prosedur dan biaya kami mengikuti sesuai prosedur dan kebijakan yang ada instansi yang Ibu /Bapak pimpin.

Besar harapan kami atas terkabulnya permohonan ini yang tentunya akan berguna bagi pembangunan nusa dan bangsa khususnya kemajuan dibidang pendidikan.

Demikian atas kerja samanya disampaikan banyak terima kasih.

Dekan,



Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt.



Jl. Let. Jend. Sutoyo – Solo 57127 Telp. 0271-852518, Fax. 0271-853275
Homepage : www.setiabudi.ac.id, e-mail : usbsolo@yahoo.com.

Lampiran 3. Surat keterangan selesai penelitian



DEPARTEMEN PARASITOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA
 Gedung Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.
 Telp. (0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitkugm@yahoo.com

SURAT KETERANGAN

No. UGM/KU/Prst/424/TL/04/03/08.17

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Kepala Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

Nama : HILDA KHAIRUNNISA SHOLIQIN
 Instansi : Fakultas Farmasi
 Universitas Setia Budi
 Surakarta
 NIM. : 20144157A

Telah melakukan penelitian di Departemen Parasitologi FK. UGM dengan judul :

“UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK n-HEKSANA HERBA KEMANGI (*Ocimum bacillicum* L) TERHADAP SEL HELA”

Dibawah supervisi laboratorium: Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK.
 Waktu Penelitian: 2 Agustus 2017 sampai dengan 5 Agustus 2017

Urusan administrasi telah diselesaikan oleh yang bersangkutan dan fasilitas laboratorium yang dipakai telah dikembalikan, dengan demikian dinyatakan **bebas laboratorium**.

Surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 21 Agustus 2017

Kepala,



[Signature]
 dr. Tri Baskoro T. Satoto, MSc, PhD.
 NIP. 19580412 198601 1 001.

Lampiran 4. Alat- alat pembuatan sampel

Timbangan analitik



Timbangan



Botol maserasi



Corong buchner



Evaporator



blender



Corong pisah



Moisture balance

Lampiran 5. Pembuatan sampel herba kemangi

Herba kemangi segar
(sortasi basah)



pengeringan oven 50°C



penyerbukan



penyaringan mass 40



maserasi



Penyaringan



Pemekatan ekstrak



Ekstrak



ECC awal



setelah fraksinasi replikasi 1



ECC (replikasi 2)



ECC (replikasi 3)



Fraksi *n*-heksana



kadar air



Kadar sari



Hasil kadar sari

Lampiran 6. Perhitungan rendemen sampel herba kemangi

1. Rendemen serbuk

Simplisia	Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendemen (%)
Herba kemangi	20000	1680	8,4 %

Perhitungan rendemen:

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat kering serbuk (gram)}}{\text{berat basah serbuk (gram)}} \times 100\% \\ \text{Rendemen} &= \frac{1680 \text{ gram}}{20000 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 8,4 \% \end{aligned}$$

2. Rendemen ekstrak

Simplisia	Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendemen (%)
Herba kemangi	1000	63,553	6,3553

Perhitungan rendemen

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat kering serbuk (gram)}}{\text{berat basah serbuk (gram)}} \times 100\% \\ \text{Rendemen} &= \frac{63,553}{1000} \times 100\% \\ &= 6,3553 \% \end{aligned}$$

3. Rendemen fraksi *n*-heksana

Simplisia	Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendemen (%)
Herba kemangi	15	11,134	74,2267

Perhitungan rendemen

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat kering serbuk (gram)}}{\text{berat basah serbuk (gram)}} \times 100\% \\ \text{Rendemen} &= \frac{11,134}{15} \times 100\% \\ &= 74,2267 \% \end{aligned}$$

Lampiran 7. Hasil uji susut pengeringan sampel herba kemangi

1. Serbuk kemangi

Cara moisture balance

No	Berat serbuk (gram)	Kadar (%)
1	2	8,3
2	2	10,5
3	2	8,5
Rata-rata ± SD		9,1 ± 1,127

Rata rata kadar air serbuk

$$\text{Rata-rata \% susut pengeringan} = \frac{\text{total \% susut pengeringan}}{3}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata rata \% kadar air} &= \frac{8,3 + 10,5 + 8,5}{3} \\ &= 9,1\% \end{aligned}$$

2. Ekstrak herba kemangi

Cara moisture balance

No	Penimbangan (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	26,7
2	2	25,3
3	2	27,1
Rata-rata		26,3667

Rata rata susut pengeringan serbuk

$$\text{Rata-rata \% susut pengeringan} = \frac{\text{total \% susut pengeringan}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% susut pengeringan} = \frac{26,7 + 25,3 + 27,1}{3} = 26,3667 \%$$

Lampiran 8. Hasil Uji kadar air sampel herba kemangi

1. Serbuk herba kemangi

Berat serbuk (g)	Volume pada skala (mL)	Kadar (%)
20,0	1,4	7
20,0	1,5	7,5
20,0	1,4	7
Rata-rata±SD	1,43	7,17 ±0,289

$$\text{Persen kadar air} = \frac{\text{air (mL)}}{\text{berat serbuk (g)}} \times 100\%$$

Serbuk herba kemangi

$$\text{Replikasi 1} = \frac{1,4 \text{ mL}}{20 \text{ g}} \times 100 \% = 7 \%$$

$$\text{Replikasi 2} = \frac{1,5 \text{ mL}}{20 \text{ g}} \times 100 \% = 7,5 \%$$

$$\text{Replikasi 2} = \frac{1,4 \text{ mL}}{20 \text{ g}} \times 100 \% = 7 \%$$

Rata rata kadar air serbuk

$$\text{Rata-rata \%kadar air} = \frac{\text{total \%kadar air}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% kadar air} = \frac{7+7,5+7}{3} = 7,17\%$$

2. Ekstrak herba kemangi

Berat ekstrak (g)	Volume pada skala (mL)	Kadar (%)
10,0	2,4	24
10,0	2,0	20
10,0	2,6	26
Rata-rata		23,33 ± 3,055

Ekstrak herba kemangi

$$\text{Replikasi 1} = \frac{2,4 \text{ ml}}{10 \text{ g}} \times 100 \% = 24 \%$$

$$\text{Replikasi 2} = \frac{2,0 \text{ ml}}{20 \text{ g}} \times 100 \% = 20 \%$$

$$\text{Replikasi 2} = \frac{2,6 \text{ ml}}{20 \text{ g}} \times 100 \% = 26 \%$$

Rata rata kadar air serbuk

$$\text{Rata-rata \%kadar air} = \frac{\text{total \%kadar air}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% kadar air} = \frac{24+20+26}{3} = 23,33\%$$

Lampiran 9. Hasil kadar sari larut air herba kemangi

1. Hasil penimbangan kadar sari larut air

	Replikasi 1 (gram)	Replikasi 2 (gram)	Replikasi 3 (gram)
Berat botol kosong + label	12,29	12,57	14,98
Berat awal	5	5	5
Berat setelah di oven			
Penimbangan 1	25,08	20,62	23,35
Penimbangan 2	15,09	15,36	20,14
Penimbangan 3	12,36	15,36	15,53
Penimbangan 4	12,357	14,35	15,39
Penimbangan 5	12,36	13,98	15,24
Penimbangan 6	12,36	13,74	15,15
Penimbangan 7	12,351	12,83	15,12
Penimbangan 8	-	12,66	15,04
Penimbangan 9	-	12,66	15,04
Berat sari	0,07	0,09	0,06

2. Perhitungan :

i. Replikasi 1

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut air} &= \frac{\text{berat sari}}{\text{berat awal yang dimaserasi}} \times \frac{100 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} 100 \% \\ &= \frac{0,07 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= 6,61 \% \end{aligned}$$

ii. Replikasi 2

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut air} &= \frac{\text{berat sari}}{\text{berat awal yang dimaserasi}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,09 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= 9,38 \% \end{aligned}$$

iii. Replikasi 3

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut air} &= \frac{\text{berat sari}}{\text{berat awal yang dimaserasi}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,06 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= 5,91 \% \end{aligned}$$

$$\text{Rata-rata \% kadar sari larut air} = \frac{\text{total \% kadar sari larut air}}{3}$$

$$\text{Rata rata \% kadar sari larut air} = \frac{6,61 + 9,38 + 5,91}{3} = 7,3\%$$

3. Hasil kadar sari larut air pada serbuk herba kemangi

Berat awal	Berat sari	Kadar (%)
5	0,0661	6,61
5	0,0938	9,38
5	0,0591	5,91
Rata-rata±SD		7,3 ± 1,835

Lampiran 10. Hasil kadar sari larut etanol herba kemangi

1. Hasil penimbangan kadar sari larut etanol

	Replikasi 1 (gram)	Replikasi 2 (gram)	Replikasi 3 (gram)
Berat botol kosong + label	13,78	15,92	18,29
Berat awal	5	5	5
Berat setelah di oven			
Penimbangan 1	20,55	22,8601	23,5561
Penimbangan 2	17,09	23,5573	22,1373
Penimbangan 3	14,98	19,0932	20,9532
Penimbangan 4	14,62	18,3325	19,6325
Penimbangan 5	14,23	17,6333	19,3336
Penimbangan 6	14,21	17,2162	18,9654
Penimbangan 7	14,03	16,2217	18,8761
Penimbangan 8	14,0213	16,2213	18,7162
Penimbangan 9	-	22,8601	18,5189
Penimbangan 10			18,5185
Berat sari	0,24	0,29	0,23

2. Perhitungan

i. Replikasi 1

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut etanol} &= \frac{\text{berat sari}}{\text{berat awal yang dimaserasi}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ gram}} 100 \% \\ &= \frac{0,24 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= 23,61 \% \end{aligned}$$

ii. Replikasi 2

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut etanol} &= \frac{\text{berat sari}}{\text{berat awal yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} 100 \% \\ &= \frac{0,29 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= 29,76 \% \end{aligned}$$

iii. Replikasi 3

$$\begin{aligned} \text{Kadar sari larut etanol} &= \frac{\text{berat sari}}{\text{berat awal yang dimaserasi}} \times \frac{100}{20} 100 \% \\ &= \frac{0,23 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times \frac{100 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \times 100 \% \\ &= 22,29 \% \end{aligned}$$

$$\text{Rata-rata \% kadar sari larut etanol} = \frac{\text{total \% kadar sari larut etanol}}{3}$$

$$\text{Rata-rata kadar sari larut etanol} = \frac{23,61 \% + 29,76 \% + 22,29 \%}{3} = 25,22 \%$$

3. Hasil kadar sari larut etanol

Bobot awal	Bobot sari	Kadar (%)
5	0,24	23,61
5	0,29	29,76
5	0,23	22,29
Rata-rata \pm SD		25,22 \pm 3,99

Lampiran 11. Hasil identifikasi kandungan kimia dengan preaksi warna

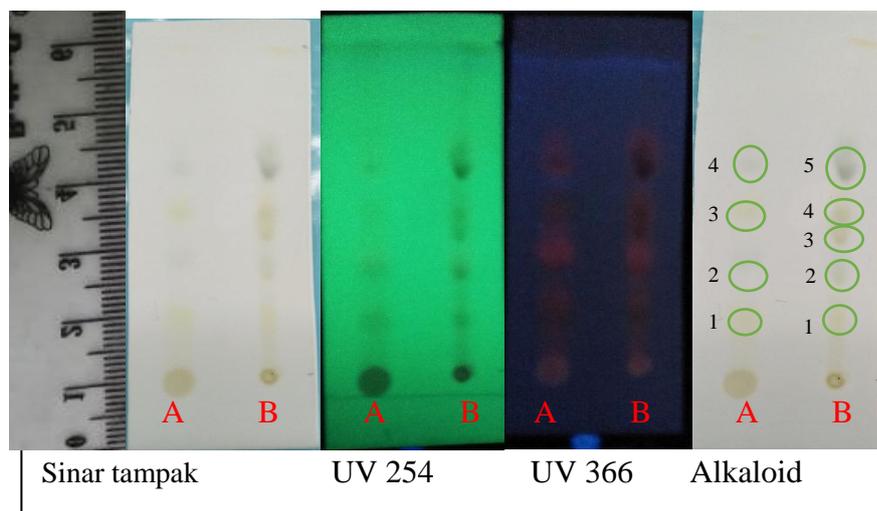
Keterangan	ekstrak	Fraksi
Triterpeoid/ Steroid	 (positif)	 (positif)
Tanin	 (Positif)	 (Negatif)
Flavonoid	 (positif)	 (negatif)

Minyak atsiri	 <p>(Positif)</p>	 <p>(positif)</p>
Alkaloid	 <p>Alkaloid ekstrak</p> <p>(Negatif)</p>	 <p>F. alkaloid meyer</p> <p>F. alkaloid krogewski</p> <p>(Negatif)</p>

Lampiran 12. Hasil identifikasi KLT herba kemangi

Senyawa	Fase Gerak	Pereaksi semprot	Hasil setelah disemprot		Keterangan	
			ekstrak	Fraksi	ekstrak	Fraksi
Flavonoid	<i>n</i> -heksana : Etil Asetat : asam formiat (6:4:0,2)	Sitroborat	kuning	kuning	+	+
Alkaloid	Etil asetat : Metanol : air (90:9:1)	Dragendorff	kuning	kuning	-	-
Tanin	<i>n</i> -heksan : Etil Asetat : asam formiat (6:4:0,2)	Anisaldehyd	Biru kehitaman	Biru kehitaman	+	+
Steroid/ triterpenoid	<i>n</i> -heksan : Etil Asetat (5:5)	Lieberman-Buchard	Hijau dan merah keunguan	Hijau dan merah keunguan	+	+
Minyak atsiri	Toluen : etil asetat (93-7)	Anisaldehyd	Hijau	hijaun	+	+

A. Identifikasi KLT senyawa Alkaloid



Sampel = A : ekstrak herba kemangi

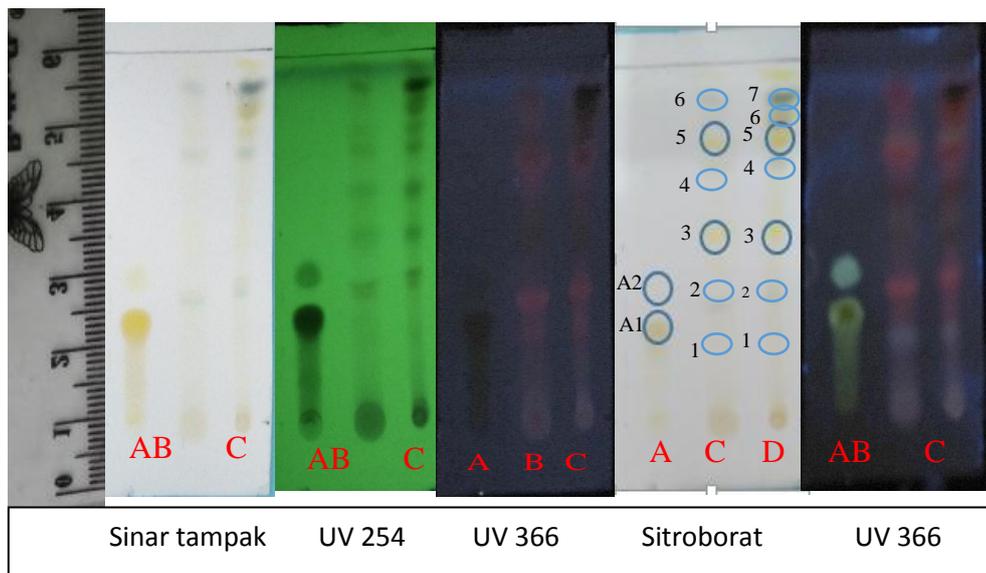
B : fraksi *n*-heksana herba kemangi

Perhitungan Rf =

Ekstrak	
A1 : $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{0,8 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,26$	A3 $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,5 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,5$
A2 : $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,6 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,32$	A5 : $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,64$

fraksi	
B1 : $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{0,8 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,16$	B4: $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,5 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,5$
B2 : $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,6 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,32$	B5 : $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,64$
B3 : $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,44$	

B. Identifikasi KLT senyawa Flavonoid



Keterangan

Sampel = A : baku
 B : fraksi
 C : ekstrak

Perhitungan Rf

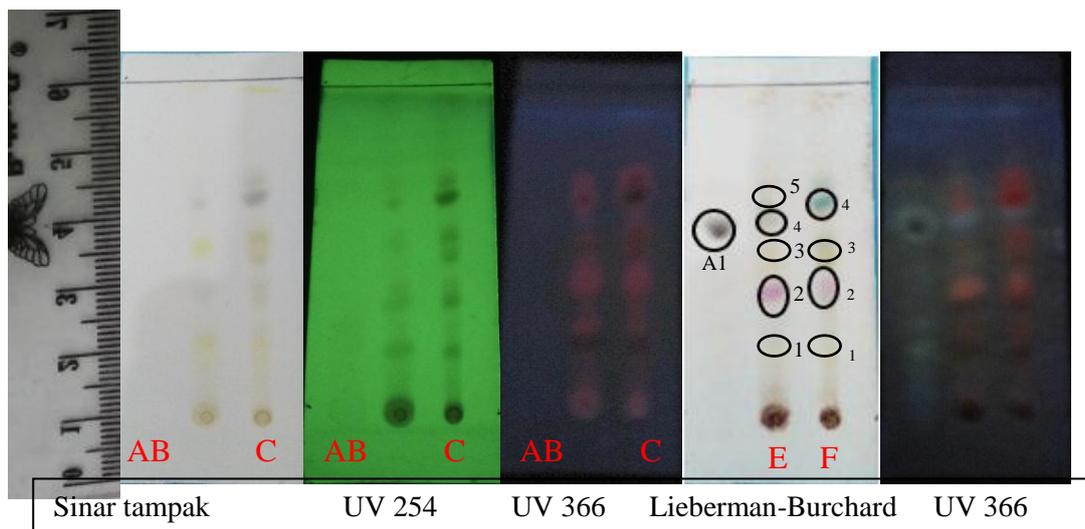
Baku quersetim	
A1 = $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,3 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,26$	A2 = $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,7 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,34$

Ekstrak	
B1 = $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,1 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,22$	B4 = $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3,5 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,7$
B2 = $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,4$	B5 = $\frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,8$

$B3 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,7 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,54$	$B6 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4,5 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,9$
---	--

Fraksi	
$C1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,26$	$C4 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,8$
$C2 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,4$	$C5 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4,4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,88$
$C3 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,8 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,54$	$C6 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4,5 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,9$
$C4 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3,6 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,72$	

C. Identifikasi KLT senyawa Terpenoid/ steroid



Keterangan :

Sampel = A : Baku stigmasterol

B : Ekstrak herba kemangi

C : Fraksi herba kemangi

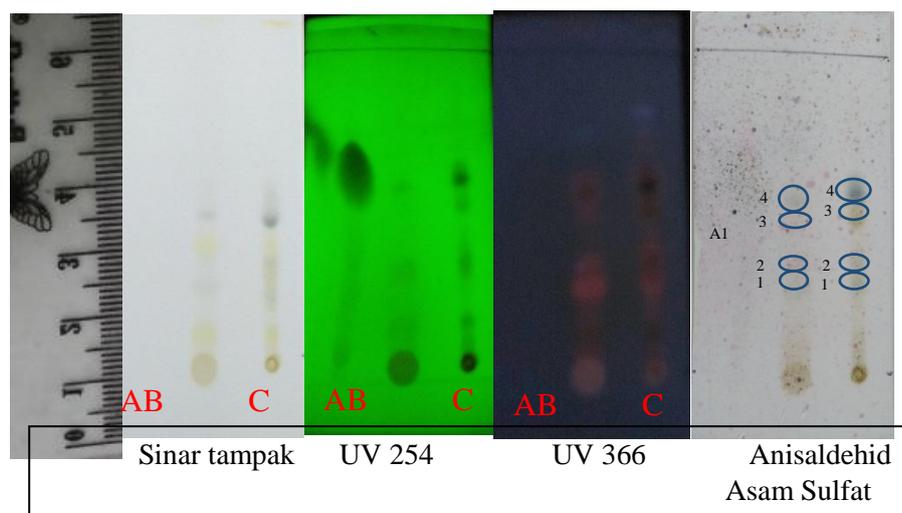
Perhitungan Rf =

Baku Stigmasterol
$A1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,6$

Ekstrak	
$B1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,24$	$B4 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,6$
$B2 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,4$	$B5 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3,4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,68$
$B3 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,15 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,43$	

Fraksi	
$C1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,1 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,22$	$C3 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3,1 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,62$
$C2 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,4$	$C4 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,64$

D. Identifikasi KLT senyawa Minyak Atsiri



Sampel = A : Baku eugenol

B : Ekstrak herba kemangi

C : Fraksi herba kemangi

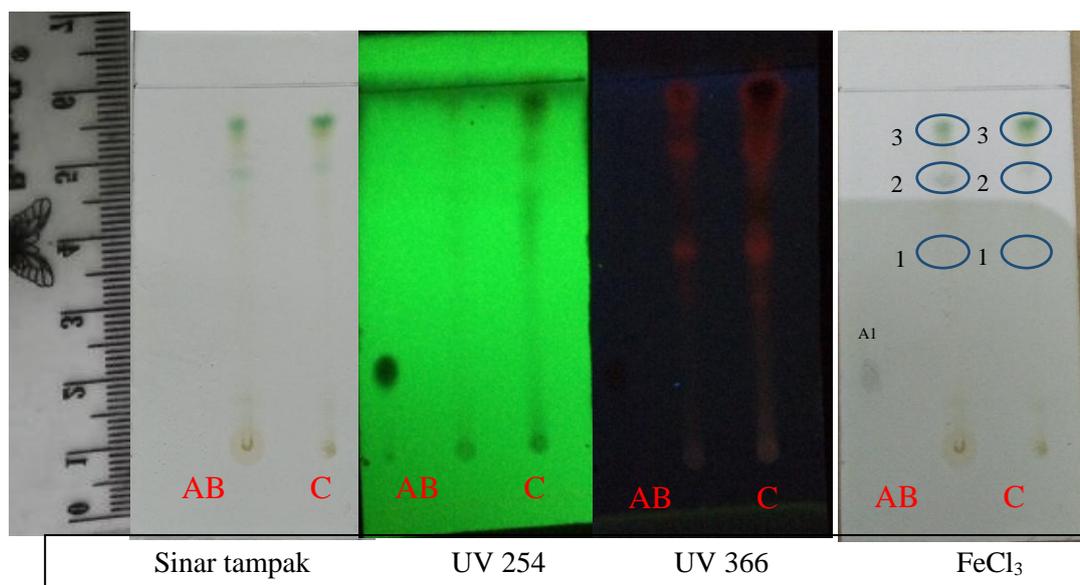
Perhitungan Rf =

Baku eugenol
$A1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3,2 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,64$

Ekstrak	
$B1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,6 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,32$	$B3 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,5 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,5$
$B2 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,8 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,36$	$B4 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,7 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,54$

Fraksi	
$C1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,6 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,32$	$C3 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{2,7 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,54$
$C2 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,8 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,36$	$C4 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,6$

E. Identifikasi KLT senyawa Tanin



Sampel = A : Baku asam galat

B : fraksi herba kemangi

C : ekstrak herba kemangi

Perhitungan Rf =

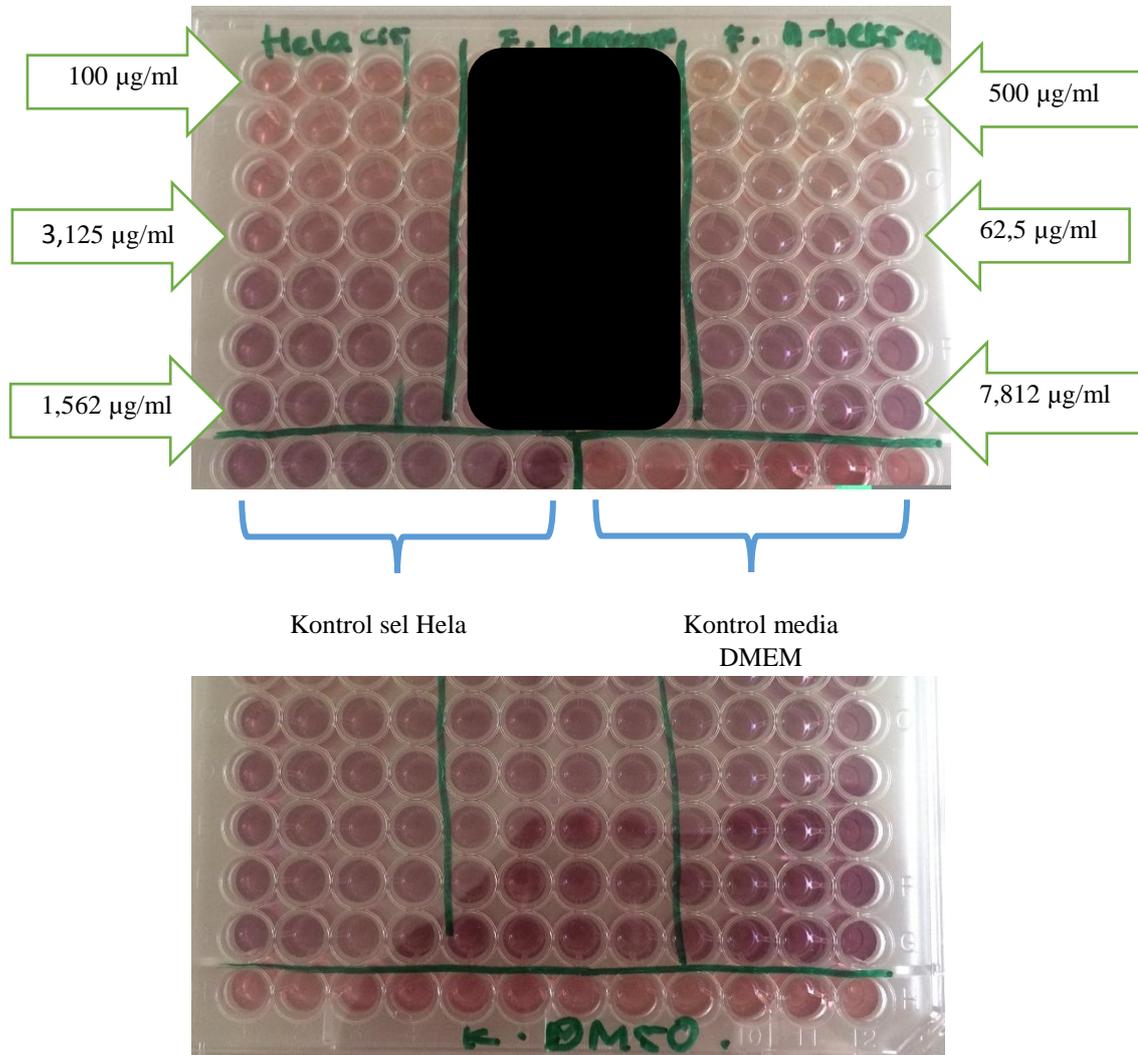
Baku asam galat
$A1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{1,1 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,22$

Ekstrak
$A1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,4$
$A2 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,8$
$A3 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4,6 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,92$

Fraksi
$A1 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{3 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,4$
$A2 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,8$
$A3 = \frac{\text{jarak noda}}{\text{jarak tempuh pelarut}} = \frac{4,6 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,92$

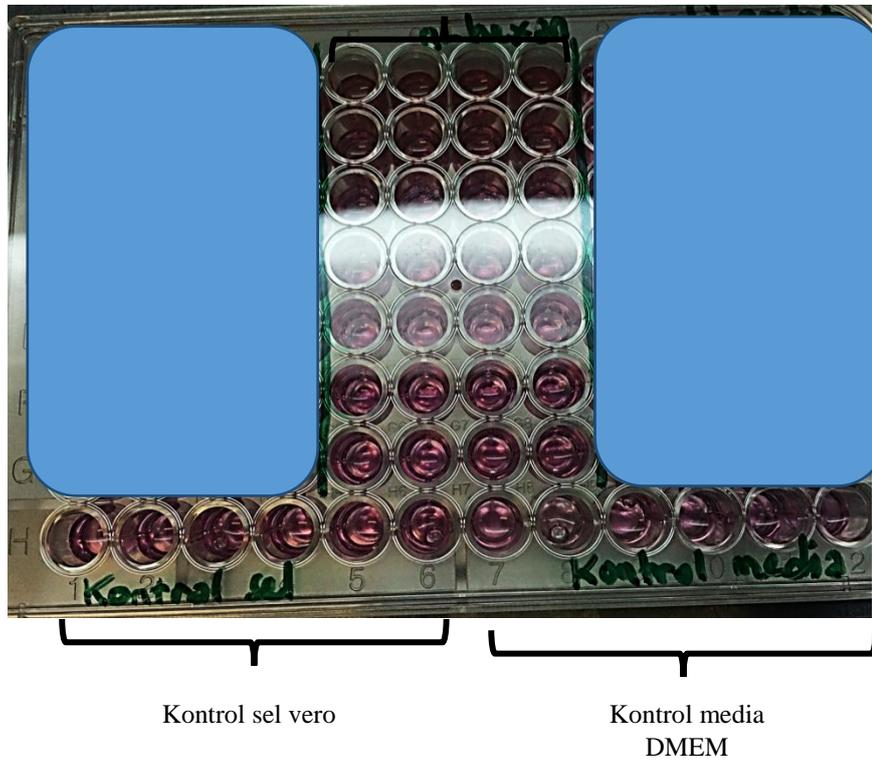
Lampiran 13. Pola Mikroplate uji MTT

1. Pola microplate pada sel HeLa



2. pola microplate pada sel Vero

Vero *n*-heksana



Lampiran 14. Perhitungan volume panen.

1. Jumlah sel HeLa terhitung dalam suspensi

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

$$\sum \text{sel} / \text{mL} = \frac{108+119+112+99}{4} \times 10^4 = 109,5 \times 10^4$$

Volume jumlah panen yang ditransfer

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel yang terhitung/mL}}$$

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{100 \times 10^4}{109,5 \times 10^4} = 0,91 \text{ mL}$$

2. Jumlah sel Vero terhitung dalam suspensi

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

$$\sum \text{sel} / \text{mL} = \frac{76+64+69+81}{4} \times 10^4 = 72,5 \times 10^4$$

Volume jumlah panen yang ditransfer

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel yang terhitung/mL}}$$

$$\text{Volume pemanenan sel} = \frac{100 \times 10^4}{72,5 \times 10^4} = 1,38 \text{ mL}$$

Lampiran 15. Perhitungan seri konsentrasi

1. Dari larutan stok diambil (perhitungan untuk konsentrasi 500 µg/mL)

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 500 \mu\text{L/mL} &= V_2 \times 103.000 \mu\text{L/mL} \\
 V_2 &= \frac{500 \mu\text{L/mL} \times 1.000 \mu\text{L}}{103.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 4.85 \mu\text{L larutan stok} + 995,15 \mu\text{L media kultur}
 \end{aligned}$$

Dari larutan stok diambil (perhitungan untuk konsentrasi 500 µg/mL)

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 500 \mu\text{L/mL} &= V_2 \times 103.000 \mu\text{L/mL} \\
 V_2 &= \frac{500 \mu\text{L/mL} \times 1.000 \mu\text{L}}{103.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 4.85 \mu\text{L larutan stok} + 995,15 \mu\text{L media kultur}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 500 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 500 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 500 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 500 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 250 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 250 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 250 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 250 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 125 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 125 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 125 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 125 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 62,5 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 62,5 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 62,5 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 62,5 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 31,25 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 31,25 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 31,25 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 31,25 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 15,625 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 15,625 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 15,625 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 15,625 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 7,8 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 7,8 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 7,8 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 7,8 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

3. Perhitungan seri cisplastin

Dari larutan stok diambil (perhitungan untuk konsentrasi 100 µg/mL)

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C \\
 1.000 \mu\text{L} \times 100 \mu\text{L/mL} &= V_2 \times 1000 \mu\text{L/mL} \\
 V_2 &= \frac{100 \mu\text{L/mL} \times 1.000 \mu\text{L}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 100 \mu\text{L larutan stok} + 900 \mu\text{L media kultur}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 100 µg/mL

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1.000 \mu\text{L} \times 100 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\ C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 100 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\ &= 100 \mu\text{L/mL} \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 50 µg/mL

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1.000 \mu\text{L} \times 50 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\ C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 50 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\ &= 50 \mu\text{L/mL} \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 25 µg/mL

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1.000 \mu\text{L} \times 25 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\ C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 25 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\ &= 250 \mu\text{L/mL} \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 12,5 µg/mL

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1.000 \mu\text{L} \times 12,5 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\ C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 12,5 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\ &= 125 \mu\text{L/mL} \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 6,25 µg/mL

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 1.000 \mu\text{L} \times 6,25 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\ C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 6,25 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\ &= 6,25 \mu\text{L/mL} \end{aligned}$$

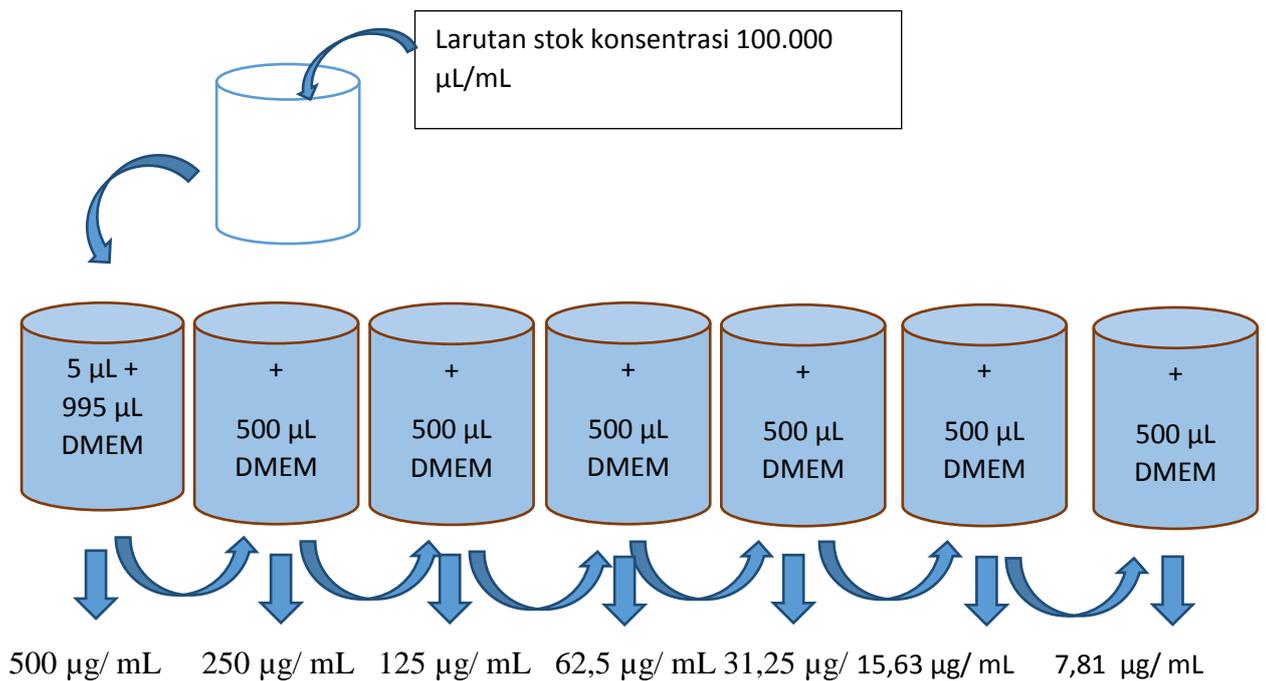
Perhitungan untuk konsentrasi 3,125 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 3,125 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 3,125 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 3,125 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

Perhitungan untuk konsentrasi 1,56 µg/mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\
 1.000 \mu\text{L} \times 1,56 \mu\text{L/mL} &= 1.000 \mu\text{L} \times C_2 \\
 C_2 &= \frac{1.000 \mu\text{L} \times 1,56 \mu\text{L/mL}}{1.000 \mu\text{L/mL}} \\
 &= 1,56 \mu\text{L/mL}
 \end{aligned}$$

Ilustrasi pembuatan seri konsentrasi

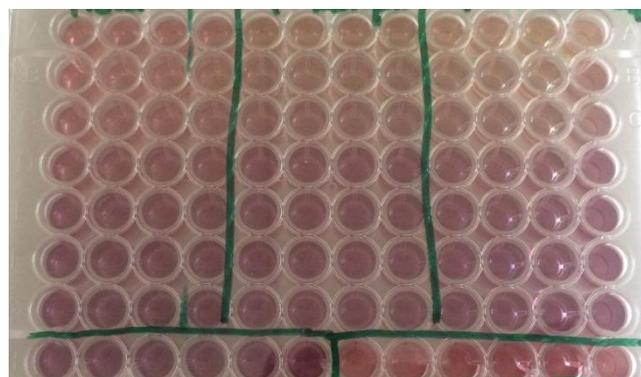


Lampiran 16. Degradasi warna saat sebelum pemberian sampel, sesudah pemberian sampel dan sesudah pemberian MTT



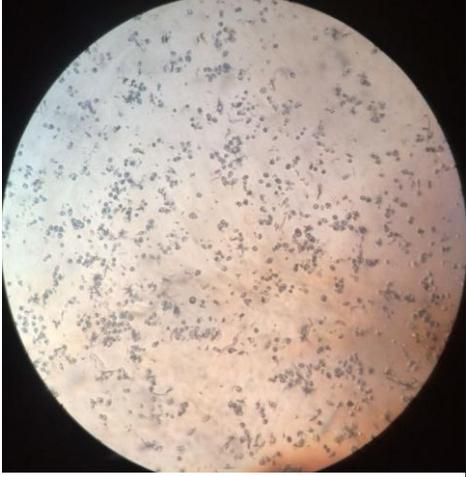
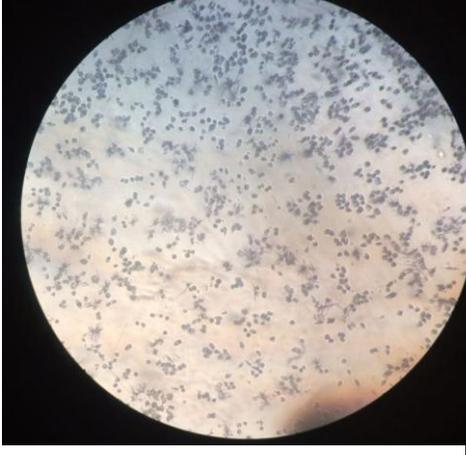
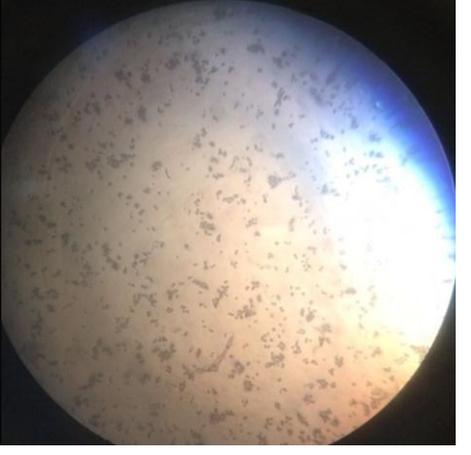
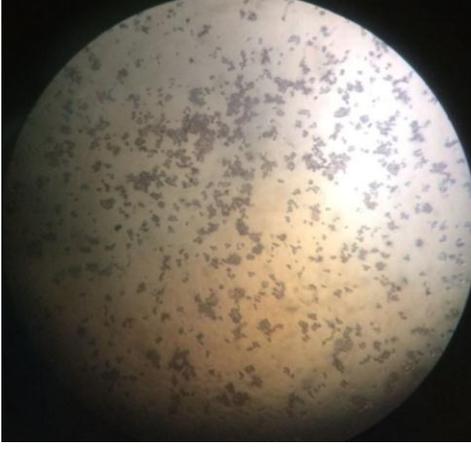
Sebelum pemberian sampel

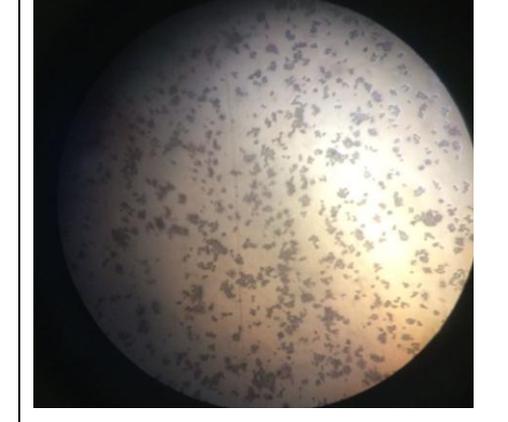
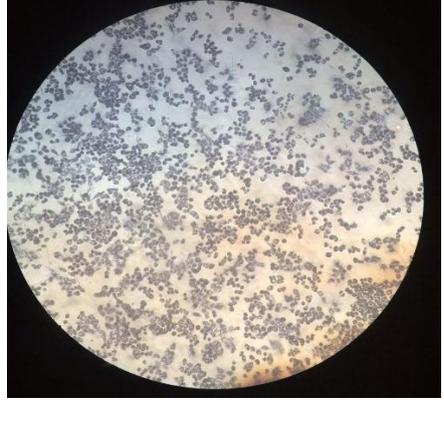
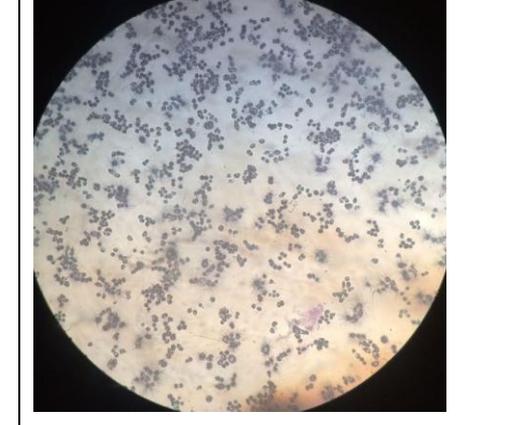
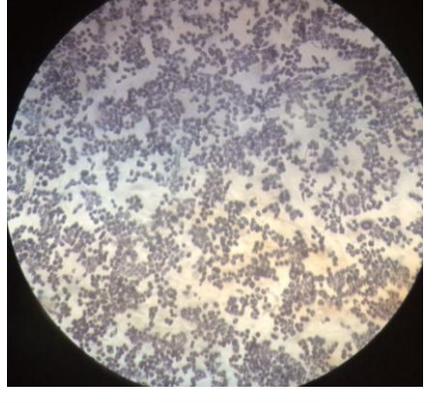
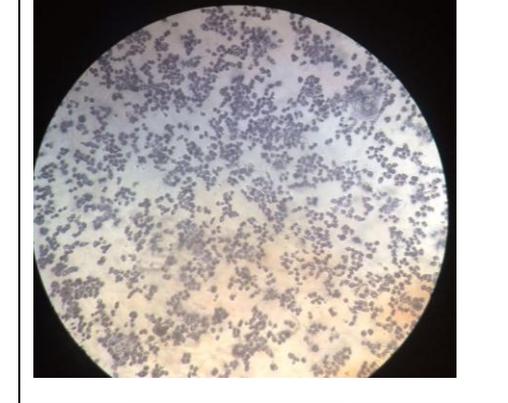
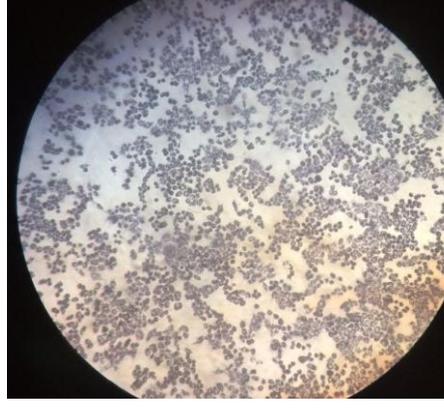
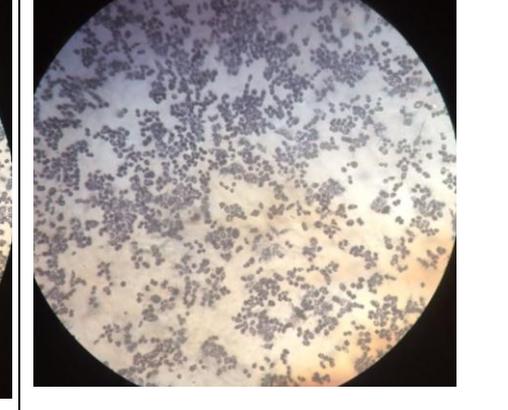
Sesudah pemberian sampel



Sesudah perlakuan MTT

Lampiran 17. Morfologi sel HeLa ekstrak dan fraksi *n*-heksana

C	ekstrak	Fraksin-heksana
500 ppm		
250 ppm		
125 ppm		

62,5 ppm		
31,25 ppm		
15,62 ppm		
7,18 ppm		

Lampiran 18. Perhitungan IC 50 sampel herba kemangi

1. Kontrol sel dan kontrol media

absornasi kontrol sel	rata2 absornasi kontrol sel	absornasi kontrol media	rata2 absornasi kontrol media	absorbansi kontrol sel - Absorbansi kontrol media
0,456	0,454	0,122	0,128	0,326
0,461		0,128		
0,464		0,125		
0,456		0,126		
0,45		0,135		
0,438		0,136		

2. Kontrol pelarut

absorbansi 1 %	rata-rata absorbansi	% sel hidup	Rata2 % sel hidup	absorbansi 2%	rata rata absorbansi	% sel hidup	% sel hidup rata-rata
0,435	0,434	92,460	92,163	0,423	0,422	88,89	88,59
0,429		90,675		0,418		87,401	
0,433		91,865		0,416		86,805	
0,434		92,163		0,423		88,889	
0,437		93,055		0,428		90,379	
0,436		92,758		0,424		89,187	

3. Ekstrak etanol 96%

Konsentrasi	Log C	Absorbansi			% Sel 1	% sel 2	% sel 3	% Viabilitas	SD
		A1	A2	A3					
500	2,69	0,475	0,472	0,456	48,01	47,62	45,57	47,06	1,32
250	2,39	0,566	0,63	0,622	59,72	67,97	66,94	64,88	4,49
125	2,10	0,714	0,778	0,729	78,79	87,03	80,72	82,18	4,31
62.5	1,79	0,838	0,914	0,895	94,76	104,55	102,11	100,472	5,09
31.25	1,49	0,899	0,987	0,951	102,62	113,95	109,32	108,63	5,69
15.63	1,19	0,902	1,003	0,979	103,01	116,02	112,93	110,65	6,79
7.125	0,85	0,946	0,987	0,961	108,67	113,96	110,61	111,08	2,67

4. Fraksi *n*-heksana

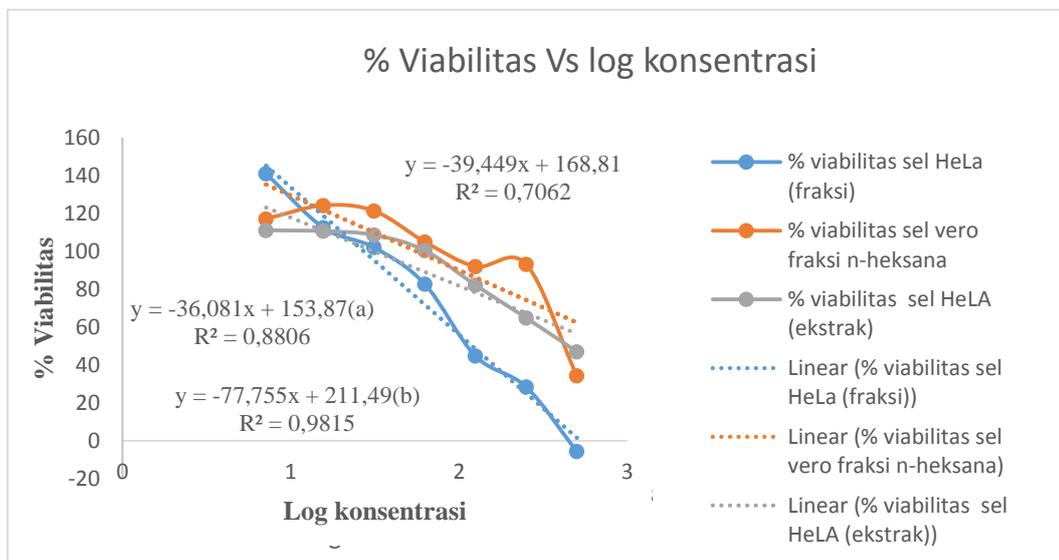
Konsentrasi	Log C	Absorbansi			% Sel 1	% sel 2	% sel 3	% Viabilitas	SD
		A1	A2	A3					
500	2,69	0,108	0,107	0,102	-4,86	-5,15	-6,65	-5,55	0,96
250	2,39	0,253	0,199	0,208	38,29	22,22	24,90	28,47	8,61
125	2,10	0,281	0,268	0,275	46,63	42,76	44,84	44,74	1,97
62,5	1,79	0,418	0,4	0,389	87,40	82,04	78,77	82,74	4,36
31,25	1,49	0,465	0,451	0,506	101,38	97,22	113,59	104,07	8,51
15,63	1,19	0,469	0,519	0,519	102,57	117,46	117,46	112,5	8,59
7,125	0,85	0,71	0,54	0,545	174,31	123,71	125,19	141,07	28,79

5. Sel Vero pada fraksi *n*-heksana

Konsentrasi	Log C	Absorbansi			% Sel 1	% sel 2	% sel 3	% Viabilitas	SD
		A1	A2	A3					
500	2,69	0,248	0,249	0,257	7,43	7,63	9,21	34,39	0,97
250	2,39	0,593	0,578	0,577	95,23	92,27	92,07	93,19	1,77
125	2,10	0,552	0,566	0,612	87,14	89,91	98,98	92,01	6,19
62,5	1,79	0,629	0,628	0,671	102,33	102,14	110,62	105,03	4,84
31,25	1,49	0,708	0,735	0,733	117,92	123,25	122,85	121,34	2,97
15,63	1,19	0,675	0,764	0,781	111,41	128,97	132,32	124,24	11,23
7,125	0,85	0,683	0,774	0,655	112,99	130,94	107,46	117,13	12,27

6. Cisplastin

C	Log C	Absorbansi			% Sel 1	% sel 2	% sel 3	% Viabilitas	SD
		A1	A2	A3					
100	2	0,16	0,154	0,157	10,615	8,829	9,7222	9,722	0,893
50	1,698	0,14	0,135	0,145	4,662	31,74	6,1507	4,662	1,488
25	1,397	0,197	0,208	0,215	21,626	24,90	26,984	24,504	2,701
12,5	1,096	0,297	0,356	0,324	51,388	68,949	59,424	59,920	8,79
6.25	0,795	0,384	0,433	0,441	77,281	91,865	94,246	87,797	9,184
3.125	0,494	0,449	0,48	0,478	96,626	105,853	105,257	102,579	5,163

Grafik IC₅₀ sampel

Sel HeLa fraksi $y = -79.171x + 214.77$ $R^2 = 0.9813$

$$50 = -77.755x + 211.49$$

$$X = 2,08$$

$$IC_{50} = 120,55 \mu\text{g/ mL}$$

Sel Vero $y = -35.821x + 163,93$ ($R^2 = 0.7062$)

$$50 = -35.821x + 163,93$$

$$X = 3,18$$

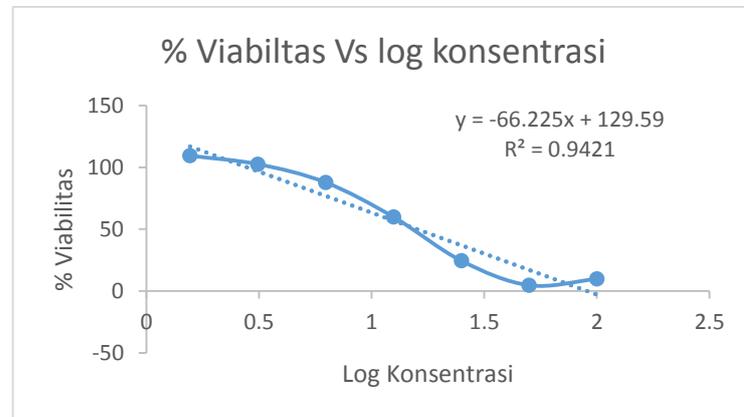
$$IC_{50} = 1513,56 \mu\text{g/ mL}$$

Sel HeLa ekstrak $y = -36.622x + 154.86$ ($R^2 = 0.89$)

$$50 = -36.081x + 153.87$$

$$X = 2.87$$

$$IC_{50} = 722,27 \mu\text{g/ mL}$$

Grafik cisplastin

$$y = -68,453x + 132,54 \quad (R^2 = 0.9424)$$

$$50 = 68,453x + 132,54$$

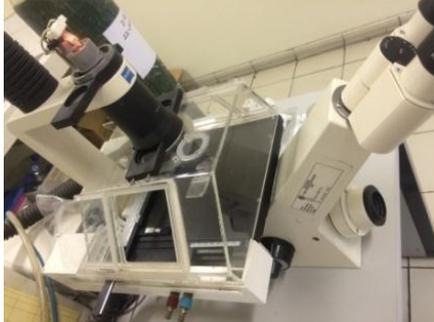
$$X = 1,205$$

$$IC_{50} = 16,042 \mu\text{g/ mL}$$

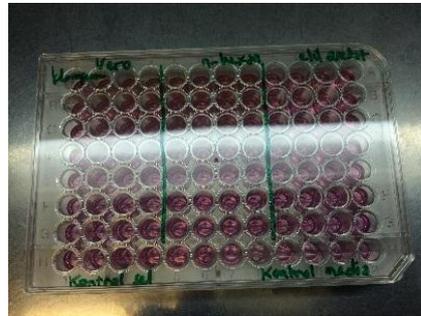
Lampiran 19. Perhitungan nilai indeks selektivitas fraksi *n*-heksana herba kemangi.

Nilai indeks selektivitas fraksi terhadap sel HeLa :

$$\begin{aligned}\text{Indeks Selektivitas} &= \frac{\text{IC50 Sel Vero}}{\text{IC50 sel HeLa}} \\ &= \frac{1515,43 \mu\text{g/ mL}}{120,55\mu\text{g/ mL}} \\ &= 12,57\end{aligned}$$

Lampiran 20. Alat dan bahan uji sitotoksik

mikroskop converted



microplate 96

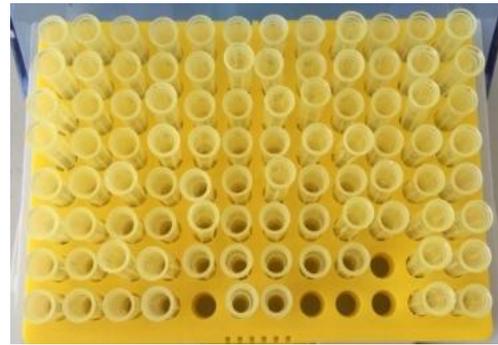
Inkubasi CO₂

Laminar Air Flow

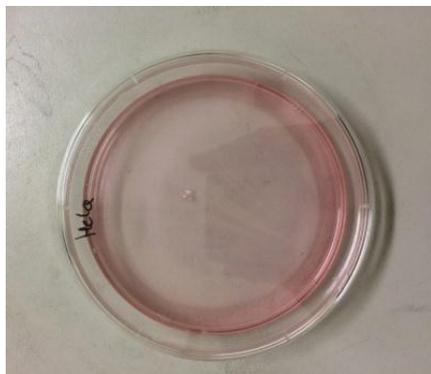
Tabung CO₂
vortek mixer



Blue tip



yellow tip



Sel HeLa



Sel Vero



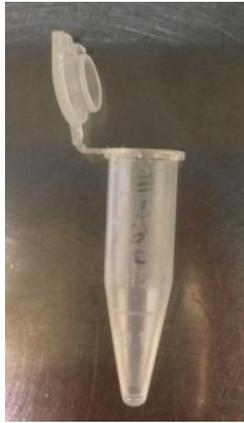
Haemocytometer



Alat hitung



ELISA Reader



Mikropipet



Ependrof



Larutan DMSO

Fraksi *n*-heksana + DMEM

Media DMEM



Proses kultur sel

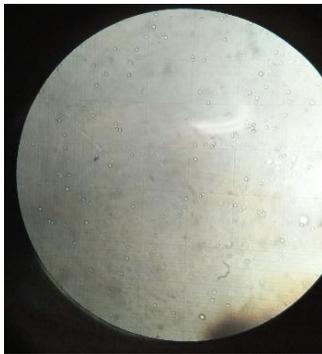
Kultur sel



Sentrifugasi



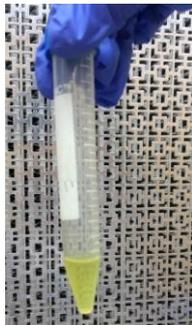
Suspensi sel



Perhitungan *Heamocytometri*



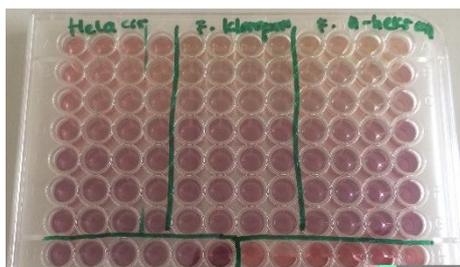
Larutan tripsin 0,25%



MTT



Pemberian SDS sebagai stoper



Setelah diberi MTT



Pembacaan ELISA reader