

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman Krokot

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan bertujuan memperoleh kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman yang diteliti dan mencegah kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian (Faisal *et al.*, 2018). Hasil determinasi tanaman menunjukkan tanaman yang dipakai dalam penelitian ini adalah krokot (*Portulaca oleracea* L.) deskripsi lengkap dari tanaman krokot dapat dilihat pada lampiran 1. dengan no surat 222/DET/UPT-LAB/15.04.2021.

B. Hasil Pembuatan Krokot

1. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Pengambilan sampel krokot didapatkan dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah di bulan Maret 2021 sebanyak 15 kg. Sampel yang dipakai merupakan krokot segar dan sehat pada bagian batang dan daun.

Krokot yang diperoleh disortir terlebih dahulu, kemudian batang dan daun dicuci berulang-ulang dengan air bersih yang mengalir untuk memastikan kotoran tidak menempel pada batang dan daun. Sampel dirajang dan dikeringkan menggunakan oven suhu 40°C hingga kering, sehingga kadar air dalam krokot dapat berkurang untuk mencegah terjadinya perubahan kimiawi dan menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri. Data rendemen berat krokot kering terhadap krokot basah dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil rendemen berat krokot kering terhadap krokot basah

Berat basah (g)	Berat kering (g)	Rendemen (%)
15000	900	6

Hasil penelitian diperoleh rendemen sebesar 6 %. Nilai rendemen serbuk menunjukkan rendemen yang kecil dikarenakan bahan segar krokot mengandung banyak air sehingga ketika dilakukan proses pengeringan air menguap. Krokot yang telah dikeringkan, kemudian diblender hingga halus, lalu diayak dengan

ayakan no 60 dan ditimbang. Pengayakan bertujuan memperkecil ukuran bahan agar diperoleh serbuk dengan ukuran yang seragam dan memperluas permukaan partikel sehingga dapat memaksimalkan proses ekstraksi karena dengan permukaan partikel yang luas dapat meningkatkan kontak antara pelarut dan serbuk (Cannell, 1998).

2. Hasil penetapan susut pengeringan pada serbuk krokot.

Ditimbang 2 gram, lalu susut pengeringan diukur dengan alat *moisture balance* yang sebelumnya sudah diatur dan dipanaskan di suhu 105°C. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk krokot dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk krokot

Berat awal (g)	Susut pengeringan serbuk (%)
2	8,5
2	9,5
2	9,5
Rata-rata	9,167

Berdasarkan pada tabel 3, rata-rata susut pengeringan serbuk krokot sebesar 9,167 %, sehingga telah dinyatakan bahwa susut pengeringan serbuk krokot memenuhi syarat yang telah ditentukan yaitu kurang dari 10 % (Depkes RI, 2008). Konsentrasi tersebut telah dapat mengurangi proses enzimatik sehingga proses pembusukan semakin lambat.

3. Pembuatan ekstrak krokot

Ekstraksi krokot menggunakan metode maserasi. Metode maserasi digunakan karena pengerjaannya mudah, serta alat yang dipakai juga relatif sederhana dan murah. Metode ini bagus untuk zat aktif yang rentan adanya pemanasan serta cocok untuk ekstraksi simplisia yang memiliki bahan aktif dapat larut dipelarut yang sesuai. Botol maserasi yang digunakan berkaca gelap untuk menghindarkan dari sinar matahari langsung. Proses maserasi dikerjakan dengan cara simplisia direndam di botol gelap yang sudah tertutup supaya etanol tidak mengalami penguapan di suhu kamar. Serbuk krokot yang dipakai dalam proses ekstraksi sebanyak 500 gram.

Pelarut yang sesuai adalah salah satu faktor penentu proses ekstraksi berhasil (Ubay, 2011). Pelarut yang digunakan adalah etanol 70 %, dengan menggunakan pelarut etanol dalam proses maserasi ini diharapkan dapat menarik sebagian besar senyawa aktif dalam simplisia krokot. Hal ini dikarenakan pelarut etanol memiliki dua sisi yang terdiri atas gugus –OH yang bersifat polar dan gugus CH₂CH₃ yang bersifat non-polar, sehingga dapat melarutkan zat aktif seperti alkaloid, glikosida, flavonoid, dan steroid (Azis *et al.*, 2014). Sifat pelarut etanol 70 % adalah yang paling cocok untuk simplisia pada bagian akar, batang, atau bagian yang berkayu pada tanaman (Harliany, 2016). Pelarut etanol juga lebih selektif dibandingkan dengan pelarut air, karena memiliki absorpsi yang baik, dapat bergabung dengan air disemua perbandingan, kapang serta kuman sulit tumbuh, tidak beracun, dan netral (Hermawan, 2019).

Penguapan pelarut dilakukan dengan *rotary evaporator*. Salah satu faktor yang mempengaruhi proses *evaporasi* yaitu penguapan menggunakan tekanan agar menurunkan titik didih cairan sehingga proses penguapan semakin cepat (Haryanto dan Masyithah, 2006). Suhu 50°C dan proses pemanasan dalam jangka waktu lama untuk tetap menjaga stabilitas zat aktif. Ekstrak kental ditampung di gelas kaca lalu di oven untuk mendapatkan ekstrak kental dengan bobot yang konstan. Data rendemen ekstrak krokot dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak krokot

Sampel	Berat awal (g)	Berat akhir (g)	Rendemen (%)
Ekstrak	500	85	17

Berdasarkan pada perhitungan hasil rendemen ekstrak selama 48 jam yang didapatkan kecil yaitu 17 %. Penelitian Andayani *et al.*, (2015) menggunakan serbuk krokot 250 g dengan metode maserasi direndam dengan pelarut etanol 70 % selama 7 hari memperoleh nilai rendemen herba krokot sebesar 41,18 %. Hasil rendemen ini berbeda jauh disebabkan oleh perbedaan lamanya perendaman serbuk simplisia yaitu lamanya kontak antara pelarut dan simplisia sampai batas tidak ada yang terekstraksi yang dapat mempengaruhi hasil rendemen.

4. Pembuatan fraksi krokot

Proses fraksinasi ekstrak menggunakan metode ekstraksi cair-cair berdasarkan pada perbedaan kepolaran pelarut. Masing-masing pelarut secara khusus akan memisahkan golongan zat kimia, pada mulanya disari menggunakan pelarut non-polar lalu disari menggunakan pelarut kurang polar dan terakhir disari menggunakan pelarut polar (Harbone, 1987). Prinsip metode ekstraksi cair-cair yaitu memisahkan bagian dari dua pelarut yang tidak saling bercampur (Soebagio *et al.*, 2003). Pelarut yang digunakan adalah n-heksan, etil asetat dan air. Data rendemen ekstrak dan fraksi krokot dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil rendemen fraksi krokot

Sampel	Berat awal (g)	Berat akhir (g)	Rendemen (%)
Fraksi n-heksan	30	2	6,67
Fraksi etil asetat	30	3	10
Fraksi air	30	22,5	75

Berdasarkan pada perhitungan hasil rendemen fraksi n-heksan, fraksi etil asetat diperoleh hasil yang kecil yaitu masing-masing 6,67 % dan 10 %. Nilai rendemen fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan lebih kecil dibandingkan fraksi air. Hal ini dapat terjadi karena senyawa yang tertarik lebih banyak bersifat polar seperti flavonoid, tanin, dan saponin. Keberhasilan proses fraksinasi dapat dilihat dari jumlah persentase antara fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air yaitu 91,67 %. Proses fraksinasi yang tidak sempurna dapat disebabkan adanya sampel yang ikut menempel di alat sehingga mengurangi hasil rendemen.

Nilai rendemen yang diperoleh dapat berbeda setiap tanaman karena beberapa faktor, yaitu lama waktu ekstraksi, ukuran partikel sampel, metode ekstraksi yang digunakan, jenis pelarut, kondisi, waktu penyimpanan, dan perbandingan jumlah sampel terhadap jumlah pelarut yang digunakan (Salamah *et al.*, 2008).

C. Hasil Karakterisasi Serbuk dan Ekstrak Krokot

1. Identifikasi organoleptis serbuk dan ekstrak krokot.

Uji organoleptis serbuk dan ekstrak krokot meliputi : bentuk, warna, dan bau. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk dan ekstrak krokot dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil pemeriksaan organoleptis krokot

Pengujian	Serbuk	Ekstrak
Bentuk	Serbuk agak kasar-halus	Kental
Warna	Hijau kecoklatan	Coklat kekuningan
Bau	Khas	Khas

Pemeriksaan organoleptis bertujuan menunjukkan gambaran serbuk yang dilihat dengan panca indera seperti bentuk, bau, rasa, dan warna. Data organoleptis untuk mengetahui selama proses penyimpanan terjadi perubahan fisik serbuk atau tidak (Ulfa dan Ema, 2015). Berdasarkan pada penelitian Hartati (2019) hasil organoleptis krim dengan menggunakan ekstrak krokot memiliki warna hijau-coklat muda seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak. Hasil organoleptis herba krokot yang diperoleh tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya.

2. Hasil kadar air ekstrak krokot.

Ekstrak krokot dilakukan uji penetapan kadar air menggunakan alat kurs atau biasa disebut metode gravimetri. Uji penetapan kadar air bertujuan mengetahui jumlah kadar air dalam bentuk persentase yang dimiliki ekstrak krokot. Menurut BPOM (2014), kadar air yang baik adalah kurang dari 10 %. Kadar air yang tinggi dapat berpotensi tumbuhnya bakteri dan jamur yang tidak diinginkan dan akan mengganggu hasil penelitian.

Penentuan kadar air metode gravimetri menggunakan sampel ekstrak sebanyak 10 g. Kurs kosong terlebih dahulu ditimbang, kemudian masukkan ekstrak sebanyak 10 g ke kurs yang kosong. Oven pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25 %. Kadar air

dihitung dalam % b/b (Kemenkes, 2017). Hasil kadar air ekstrak dapat dilihat di tabel 7.

Tabel 7. Hasil kadar air ekstrak etanol krokot

Berat ekstrak (g)	Kadar air (%)
10	5,791
10	5,448
10	5,793
Rata-rata	5,678

Berdasarkan pada tabel 7, rata-rata kadar air ekstrak krokot didapatkan 5,678 % sehingga kadar air ekstrak krokot memenuhi syarat yang telah ditentukan yaitu kurang dari 10 % (BPOM, 2014). Menurut penelitian oleh Husnawati *et al.*, (2020) kadar air bagian tanaman krokot memiliki hasil rata-rata paling tinggi pada bagian batang muda yaitu 6,97 %, bagian daun 6,09 %, bagian batang tua 4,69 % dan paling rendah pada bagian bunga yaitu 2,84 %.

Kekurangan dari metode gravimetri membutuhkan waktu pengerjaan yang lama karena lamanya proses pemanasan di oven, pengukuran kadar digunakan untuk komponen yang besar sedangkan untuk jumlah sampel yang kecil tidak valid (Alaerts, 2004).

D. Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak dan Fraksi Krokot

1. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol krokot metode pereaksi warna

Identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol krokot secara kualitatif dikerjakan dengan menguji adanya perubahan warna, terjadinya buih atau endapan dengan tujuan mengetahui kelompok zat di dalam ekstrak. Identifikasi dilakukan dengan menambahkan ekstrak dengan pereaksi yang sesuai dan dilihat ada atau tidaknya perubahan. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil uji tabung kandungan senyawa ekstrak etanol krokot

Senyawa	Hasil identifikasi	Pustaka	Kesimpulan
Flavonoid	Kuning di lapisan amil alkohol.	Terbentuk warna merah atau kuning atau jingga di lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1980).	(+)

Alkaloid	Pereaksi mayer,tidak terbentuk endapan.	Terbentuk endapan putih kekuningan ketika diberi pereaksi Mayer (Depkes RI, 1977).	(-)
Alkaloid	Pereaksi bouchardat, terbentuk endapan coklat muda.	Terbentuk endapan coklat ketika diberi pereaksi bouchardat (Depkes RI, 1979)	(+)
Alkaloid	Pereaksi dragendrof, terbentuk endapan coklat.	Terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam ketika diberi pereaksi dragendrof, (Depkes RI, 1977)	(+)
Saponin	Busa stabil pada penambahan HCl 2 N busa tidak hilang	Terbentuknya buih setinggi 1-10 cm dan stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Buih tidak hilang ketika ditambah HCl 2 N (Depkes RI, 1977)	(+)
Tanin	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman (Harbone, 1987)	(+)

Keterangan: (+) = mengandung senyawa golongan

(-) = tidak mengandung senyawa golongan

2. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dan fraksi metode KLT

Prinsip analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yaitu pemilihan fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen) sangat menentukan serta terjadinya adsorpsi dan partisi pada saat pemisahan komponen kimia. Kandungan kimia bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan pada tingkat kepolarannya saat terjadi daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia sehingga kandungan kimia bergerak naik saat elusi (Alen *et al.*, 2017).

Analisis KLT dilakukan dengan cara menotolkan ekstrak yang telah dilarutkan pelarut yang sesuai pada plat KLT agar terjadi elusi saat dimasukkan kedalam fase gerak yang berbeda sesuai dengan senyawa yang ingin diidentifikasi. Hasil yang didapatkan dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm.

Flavonoid menghasilkan peredaman fluoresensi saat dilihat di bawah sinar UV 254 nm, sedangkan berfluoresensi kuning, biru, hijau serta bercak glikosida flavon dan bercak glikosida flavonoid yang khas membentuk warna

ungu tua saat dilihat di bawah sinar UV 366 nm (Markham, 1988). Hasil uji KLT menunjukkan positif flavonoid setelah diberi reagen semprot sitoborat berwarna hijau kekuningan saat dilihat di bawah sinar UV 366 nm. Pereaksi semprot sitoborat adalah pereaksi spesifik yang sangat peka mendeteksi flavonoid dan spesifik untuk gugus orto dihidroksi (Murwanto dan Santosa, 2012).

Uji KLT flavonoid pada penelitian menggunakan fase gerak kloroform:metanol (8,5:1,5) yang dijenuhkan di dalam *chamber*. Fase diam silika gel GF 254 ditotolkan ekstrak, fraksi, dan baku kuersetin untuk melihat pemisahan senyawa berdasarkan pada kepolaran dan deteksi bercak. Hasil dari elusi fase diam kemudian dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm untuk menghitung nilai Rf dari setiap sampel yang ditotolkan. Hasil KLT flavonoid dapat dilihat di tabel 9.

Tabel 9. Hasil identifikasi flavonoid KLT ekstrak dan fraksi krokot

Sampel	Rf (cm)	Sinar tampak	UV 254	UV 366	Pereaksi (Sitoborat)	Pustaka	kesimpulan
Ekstrak	0,48	Coklat	Peredaman	Coklat	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	+
Fraksi n-heksan	0,45	Coklat	Peredaman	Coklat	Coklat	Hijau kekuningan	+
Fraksi etil asetat	0,41	Coklat	Peredaman	Hijau	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	+
Baku kuersetin	0,34	Coklat	Peredaman	Coklat	Hijau kekuningan	Hijau kekuningan	+

Uji KLT alkaloid plat yang disemprot dengan pereaksi dragendrof menghasilkan bercak coklat jingga berlatar belakang kuning (Harborne, 1996). Penelitian Marlina, Suryanti, dan Suyono (2005) bercak kuning muda saat dilihat di bawah sinar tampak, berwarna kuning saat dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan berwarna hijau muda saat dilihat di bawah sinar UV 366 nm.

Uji KLT alkaoid menggunakan fase gerak etil asetat:metanol:air (90:9:1) yang dijenuhkan di dalam *chamber*. Fase diam silika gel GF 254 ditotolkan ekstrak, fraksi, dan baku piperin untuk melihat pemisahan senyawa berdasarkan kepolaran dan deteksi bercak. Hasil dari elusi lempeng KLT kemudian dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm untuk menghitung nilai Rf dari setiap

sample yang ditotolkan. Hasil KLT alkaloid dapat dilihat di tabel 10.

Tabel 10. Hasil identifikasi alkaloid KLT ekstrak dan fraksi krokot

Sampel	Rf (cm)	Sinar tampak	UV 254	UV 366	Pereaksi (Dragendrof)	Pustaka	kesimpulan
Ekstrak	0,73	Coklat	Coklat	Coklat	Coklat	Coklat	+
Fraksi n-heksan	0,95	Coklat	Coklat	Coklat	Coklat	Coklat	+
Fraksi etil asetat	0,71	Coklat	Coklat	Hijau	Coklat	Coklat	+
Baku piperin	0,92	Coklat	Coklat	Coklat	Coklat	Coklat	+

F. Uji sitotoksik ekstrak dan fraksi krokot dengan metode MTT assay

Uji sitotoksi dilakukan untuk melihat nilai ketoksikan dari suatu senyawa yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi herba krokot terhadap sel kanker serviks HeLa. Penelitian ini menggunakan metode MTT *assay* untuk melihat ketoksikan suatu senyawa. Metode MTT *assay* memiliki prinsip yaitu pembentukan kristal formazan yang bereaksi dengan sejumlah sel yang hidup. MTT oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang dimiliki oleh rantai pernafasan mitokondria yang hanya aktif terhadap sel hidup akan pecah menjadi formazan. Kompleks warna formazan tidak larut dalam air dan berwarna ungu, sehingga untuk menghentikan reaksi diberikan reagen *stopper* SDS (*sodium duodecyl sulphate*). Intensitas warna ungu dapat dibaca interpretasinya dengan mengetahui nilai absorbansinya dan didapatkan nilai IC₅₀ (Rahardhian dan Dwi, 2018).

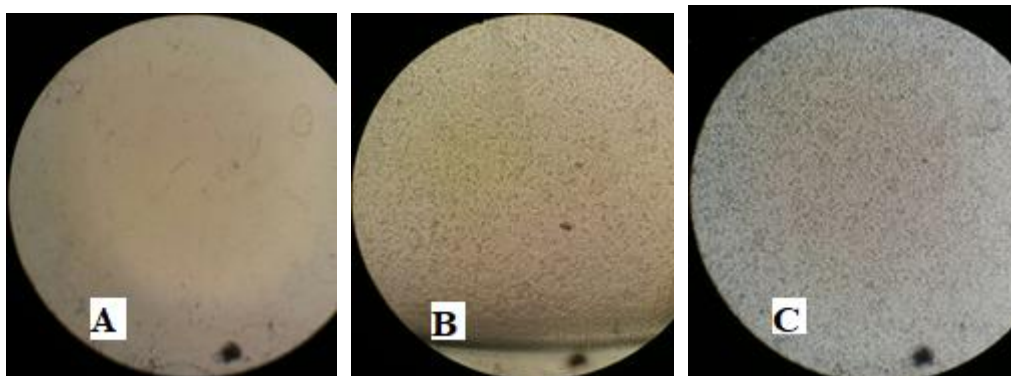
Pada penelitian ini menggunakan media RPMI untuk sel kanker serviks HeLa. Media RPMI komplit yang dibuat mengandung FBS (*Fetal Bovine Serum*), penisilin-streptomisin, dan fungizon. FBS berguna sebagai nutrisi dalam kultur sel, penstrap (Penisilin streptomisin) sebagai antibiotik dan fungizon sebagai antijamur hal ini bertujuan agar media kultur sel aseptik dan tidak terkontaminasi (Zarisman, 2006).

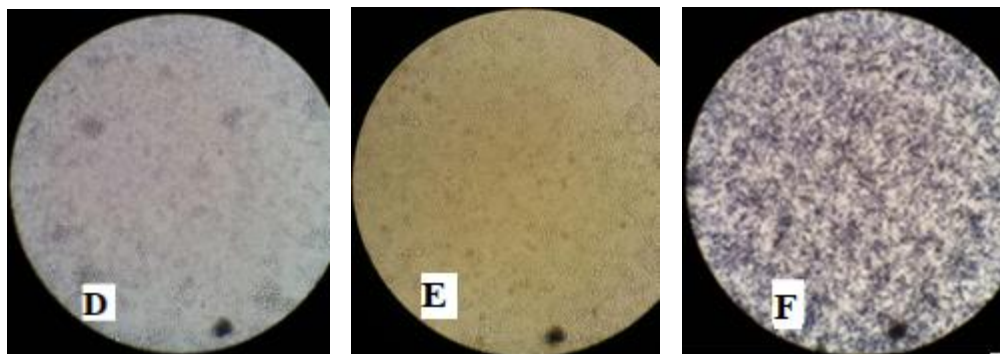
Sel HeLa dapat diperbanyak secara *in vitro* dengan mengambil jaringan atau memperbanyak sel. Kultur sel memiliki keuntungan seperti kemampuan replikasi yang tidak terbatas, mudah dalam penangannya, jika terjadi

kontaminasi mudah diganti dengan *frozen stock* dan homogenitas yang tinggi.

Peningkatan konsentrasi DMSO 1-10 % dapat merusak viabilitas sel, integritas mitokondria dan ekspresi transporter glutamat pada kultur sel astrosit (Yuan *et al.*, 2014). Sampel ekstrak dan fraksi masing-masing ditimbang 10 mg kemudian dilarutkan dengan 100 μL DMSO 0,1 % v/v. DMSO digunakan sebagai buffer atau solvent agar ekstrak dapat larut dengan sempurna (BPOM, 2010). DMSO (dimetil sulfoksida) dipilih karena bersifat tidak toksik dan tidak mengganggu aktivitas sel serta banyak digunakan untuk kultur sel. Larutan DMSO 0,1 % termasuk dalam konsentrasi kecil digunakan untuk mencegah interaksi yang dapat berpengaruh pada sel kultur uji sitotoksik. Pembuatan larutan uji dilakukan secara aseptis di dalam BSC level 2. Konsentrasi sampel yang dibuat adalah 250; 125; 62,5; 31,25; 15,75; 7,81; 3,75; 1,875 $\mu\text{g/ml}$ dengan tiga kali replikasi dibuat dalam media RPMI.

Pengamatan hasil uji sitotoksik MTT *assay* dengan melihat morfologi sel dilakukan di bawah mikroskop. Sel HeLa diberi perlakuan konsentrasi yang berbeda dan diinkubasi selama 24 jam. Sel HeLa yang normal berbentuk poligonal atau bulat dengan sitoplasma yang luas. Sel HeLa yang mati mengalami pengkerutan, sitoplasma menghilang sehingga sel menjadi lebih kecil. Kerusakan sel mengakibatkan morfologi sel menjadi bulat dan warna yang lebih gelap (Utami dan Ryan, 2018).





Gambar 11. Kontrol media RPMI (A), kontrol pelarut (B), kontrol sel HeLa sebelum perlakuan (C), kontrol sel HeLa setelah uji MTT (D), sel sesudah diberi perlakuan (E), sel yang diberi perlakuan uji MTT (F)

Sel HeLa yang hidup bereaksi dengan MTT dipecah oleh enzim dehidrogenase menjadi formazan yang tidak larut. Jumlah sel yang hidup akan berbanding lurus dengan kristal formazan yang terbentuk. Pembentukan kristal formazan memiliki intensitas warna yang tinggi seiring dengan pemberian konsentrasi yang semakin kecil. Proses MTT dapat dihentikan dengan menggunakan reagen stopper SDS untuk melarutkan kristal formazan. SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) berfungsi sebagai detergen yang dapat melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein (Winarno, 2011). Jika tidak diberi SDS proses MTT akan terus berlanjut.

Tabel 11. Hasil perhitungan % viabilitas sel ekstrak krokot

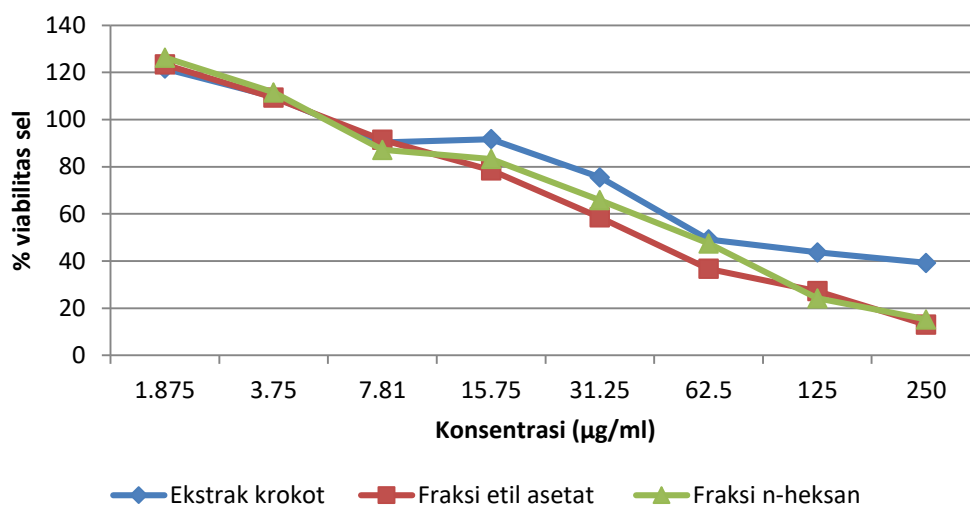
Konsentrasi uji (C) $\mu\text{g/ml}$	Log konsentrasi (Log C)	Absorbansi ekstrak krokot					Rata-rata % viabilitas sel
		Kontrol sel	Kontrol media	Perlakuan			
				1	2	3	
250	2,397	0,7035	0,0498	0,318	0,332	0,268	39,1922
125	2,096	0,7035	0,0498	0,414	0,275	0,317	43,6795
62,5	1,795	0,7035	0,0498	0,417	0,359	0,338	49,1866
31,25	1,494	0,7035	0,0498	0,5	0,555	0,575	75,4984
15,75	1,197	0,7035	0,0498	0,666	0,603	0,678	91,6628
7,81	0,892	0,7035	0,0498	0,674	0,601	0,646	90,3370
3,75	0,574	0,7035	0,0498	0,794	0,726	0,784	109,6516
1,875	0,273	0,7035	0,0498	0,829	0,875	0,831	121,6459

Tabel 12. Hasil perhitungan % viabilitas sel fraksi etil asetat

Konsentrasi uji (C) $\mu\text{g/ml}$	Log konsentrasi (Log C)	Absorbansi fraksi etil asetat					Rata-rata % viabilitas sel
		Kontrol sel	Kontrol media	Perlakuan			
				1	2	3	
250	2,397	0,7035	0,0498	0,098	0,152	0,154	12,9824
125	2,096	0,7035	0,0498	0,141	0,277	0,266	27,2601
62,5	1,795	0,7035	0,0498	0,351	0,395	0,321	36,7095
31,25	1,494	0,7035	0,0498	0,443	0,432	0,422	58,5181
15,75	1,197	0,7035	0,0498	0,585	0,518	0,586	78,5056
7,81	0,892	0,7035	0,0498	0,672	0,643	0,627	91,4078
3,75	0,574	0,7035	0,0498	0,775	0,741	0,777	109,3059
1,875	0,273	0,7035	0,0498	0,873	0,835	0,861	123,3797

Tabel 13. Hasil perhitungan % viabilitas sel fraksi n-heksan

Konsentrasi uji (C) $\mu\text{g/ml}$	Log konsentrasi (Log C)	Absorbansi fraksi n-heksan					Rata-rata % viabilitas sel
		Kontrol sel	Kontrol media	Perlakuan			
				1	2	3	
250	2,397	0,7035	0,0498	0,169	0,171	0,098	15,2397
125	2,096	0,7035	0,0498	0,254	0,229	0,141	24,2006
62,5	1,795	0,7035	0,0498	0,364	0,366	0,351	47,5039
31,25	1,494	0,7035	0,0498	0,421	0,576	0,443	65,8099
15,75	1,197	0,7035	0,0498	0,557	0,641	0,585	83,3001
7,81	0,892	0,7035	0,0498	0,578	0,609	0,672	87,1755
3,75	0,574	0,7035	0,0498	0,771	0,790	0,775	111,4986
1,875	0,273	0,7035	0,0498	0,858	0,895	0,873	126,2862



Gambar 12. Grafik hubungan % viabilitas sel dan konsentrasi.

Berdasarkan gambar 12 pada konsentrasi tinggi yaitu 250 µg/ml memiliki intensitas warna ungu yang memudar atau lebih sedikit membuktikan sel yang hidup lebih sedikit. Hasil intensitas warna ungu dapat dibaca menggunakan *microplate reader* panjang gelombang 595 nm untuk mengetahui absorbansinya. Nilai absorbansi yang didapatkan dapat digunakan untuk menghitung persen viabilitas. Persen viabilitas yang diperoleh berbanding terbalik dengan konsentrasi sampel. Semakin tinggi konsentrasi sampel maka persen viabilitas yang diperoleh semakin kecil atau sel yang hidup semakin sedikit. Perbandingan log konsentrasi dengan persen viabilitas digunakan untuk mencari regresi linier. Hasil dari regresi linier didapatkan persamaan $y=bx+a$ yang kemudian diperoleh nilai X, hasil antilog X merupakan nilai IC_{50} . Hasil IC_{50} dari sel HeLa dapat dilihat di tabel 14.

Tabel 14. Hasil IC_{50} sel HeLa

Sampel		Persamaan garis ($y=bx+a$)		IC_{50} (µg/ml)
Ekstrak	1	-38,4994x + 132,1516	r= 0,9674	136,0817
	2	-41,0144x + 130,0522	r= 0,9233	89,4952
	2	-43,123x + 135,9233	r= 0,9367	91,4323
	Rata-rata			105,6697
Fraksi etil asetat	1	-58,1982x + 145,6549	r= 0,9868	44,014
	2	-51,1784x + 133,5217	r= 0,9554	42,8449
	3	-51,5458x + 138,1956	r= 0,9905	51,4043
	Rata-rata			46,0880
Fraksi n-heksan	1	-49,1684x + 134,2074	r= 0,9845	51,5940
	2	-52,0120x + 143,8494	r= 0,9555	63,7235
	3	-58,1982x + 145,6549	r= 0,9868	44,0149
	Rata-rata			53,1108

Ekstrak dan senyawa dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik dapat dibagi menjadi empat kategori, yaitu sangat aktif jika $IC_{50} < 10$ µg/ml, aktif jika IC_{50} 10-100 µg/ml, dan cukup aktif jika IC_{50} 100-500 µg/ml, dan senyawa dikatakan tidak memiliki aktivitas sitotoksik jika nilai $IC_{50} > 500$ µg/ml (Sirait *et al.*, 2019). Berdasarkan pada kategori tersebut maka ekstrak krokot memiliki aktivitas sitotoksik cukup aktif yaitu dengan nilai IC_{50} 105,6697 µg/ml, sedangkan fraksi etil asetat dan n-heksan memiliki aktivitas sitotoksik yang aktif yaitu berturut-turut dengan nilai IC_{50} 46,0880; 53,1108 µg/ml.

Uji statistik untuk melihat perbedaan nilai IC_{50} dari setiap sampel ekstrak krokot, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan menggunakan aplikasi SPSS versi 21. Uji statistik awal yaitu uji normalitas data menggunakan metode Shapiro-Wilk dengan syarat memiliki kurang dari 50 data. Data dikatakan tersebar secara normal jika memiliki nilai sig > 0,05. Data yang menunjukkan nilai sig < 0,05 maka data tidak tersebar normal. Metode ini dipilih karena banyak data yang digunakan adalah 9 data sehingga memenuhi syarat. Hasil dari uji normalitas didapatkan nilai signifikansi (sig) dari ekstrak krokot, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan secara berturut-turut yaitu 0,70; 0,241; 0,779. Berdasarkan hasil sig dapat dinyatakan masing-masing data tersebar secara normal karena nilai sig dari ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan lebih besar dari 0,05. Uji *One Way ANOVA* dan didapatkan hasil signifikansi sebesar 0,003 artinya data IC_{50} dari ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan yang diperoleh berbeda signifikan.

Fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} lebih baik dibandingkan dengan fraksi n-heksan hal ini dapat terjadi karena di dalam fraksi etil asetat terdapat senyawa yang bersifat semi polar seperti alkaloid dan flavonoid berdasarkan hasil KLT. Penelitian Chen (2019) mengenai struktur kimia flavon dari krokot ditemukan senyawa flavonoid (kuersetin, kamferol, miricetin, apigenin, luteolin). Senyawa flavonoid dan alkaloid akan lebih tertarik ke fraksi etil asetat yang semi polar yang dapat dilihat dari hasil KLT. Sablo (*Acalypha wilkesiana* Mull) mengandung senyawa flavonoid yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan cara menghambat enzim topoisomerase yang berperan pada sel kanker dalam tahap replikasi DNA, ekspresi gen pada p53 dan menginduksi terjadinya apoptosis (Karthik *et al.*, 2012). Benalu mangga (*Dendrophloe pentandra* L. Miq) mengandung senyawa flavonoid seperti kuersetin yang memiliki efek sitotoksik melalui penghambatan proses karsinogenesis yaitu dengan menghambat pembentukan enzim tirosin kinase sehingga proliferasi dapat dikendalikan (Ikawati *et al.*, 2008). Daruju (*Acanthus ilicifolius* Linn.) mengandung senyawa flavonoid seperti apigenin juga terbukti memiliki efek sitotoksik setelah dilakukan uji isolat fraksi etil asetat daun daruju menggunakan metode MTT dan dikarakterisasi dengan H-NMR (Rachmadi *et al.*, 2018).