

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil determinasi tanaman sisik naga

Hasil determinasi tanaman sisik naga dilakukan di Laboratorium Morfologi Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat & Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Berdasarkan hasil determinasi tersebut dinyatakan bahwa sampel yang diteliti adalah benar-benar tanaman sisik naga *Drymoglossum piloselloides* (L). Presl. Hasil determinasi dapat dilihat dilampiran 1.

2. Hasil pengumpulan, pengeringan dan pembuatan serbuk

Daun sisik naga diperoleh di Tawangmangu, Karanganyar. daun sisik naga yang akan digunakan adalah daun tua dan segar. Daun sisik naga yang sudah bersih dioven suhu 40°C hingga kering. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, mencegah terjadinya perubahan kimiawi, reaksi enzimatik yang dapat menurunkan mutu, menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri, dan memudahkan dalam proses pembuatan serbuk. Daun sisik naga kering diperoleh 1300 g. Hasil presentase bobot kering terhadap bobot basah daun sisik naga dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Presentase bobot kering terhadap bobot basah daun sisik naga

Simplisia	Bobot Basah (g)	Bobot Kering (g)	Rendemen (%)	LOD (%)
Daun Sisik Naga	8000	1300	16,25	83,75

3. Organoleptis serbuk daun sisik naga

Uji organoleptis serbuk daun sisik naga meliputi : bentuk, bau, rasa, dan warna. Hasil uji organoleptis serbuk daun sisik naga dapat dilihat dari tabel no 2.

Tabel 2. Hasil uji organoleptis daun sisik naga

Pengujian	Serbuk
Bentuk	Serbuk
Bau	Khas
Rasa	Asam
Warna	Coklat keputihan

4. Hasil penetapan susut pengeringan

Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun sisik naga menggunakan alat *Moisture balance* dapat dilihat dari tabel 3.

Tabel 3. Hasil susut pengeringan serbuk daun sisik naga

No	Berat serbuk (g)	Bobot penyusutan (g)	Kadar (%)
1	2	1,82	8,7
2	2	1,87	6,5
3	2	1,85	7,5
Kadar air rata rata ± SD		7,56 ± 1,11	

Penetapan susut pengeringan serbuk daun sisik naga menggunakan alat *Moisture balance*. Perbandingan antara berat serbuk sebelum dipanasi dengan serbuk yang sudah dipanasi oleh *Moisture balance* menjadi pengukuran susut pengeringannya. Rata rata hasil kadar susut pengeringan dalam serbuk daun sisik naga diperoleh 7,56% susut pengeringan dengan nilai dibawah 10% dapat mengurangi potensi pembusukan simplisia.

5. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun sisik naga

Pembuatan ekstrak etanol daun sisik naga menggunakan metode masersi yang dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi Surakarta. Metode ini yang dipilih sebagai metode pembuatan ekstrak karena mudah dalam pengjerjannya, selain itu alat yang digunakan seerhana. Metode ini cocok digunakan untuk senyawa aktif yang tidak tahan pemanasan dan biasanya digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung bahan aktif mudah larut dalam pelarut dan tidak mudah mengembang dalam cairan penyari. wadah maserasi yang digunakan berkaca gelap untuk menghindarkan dari sinar matahari langsung. Pelarut yang digunkan adalah etanol 70% karena etanol merupakan pelarut universal yang mampu menarik senyawa polar dan non polar. Serbuk daun sisik naga yang digunakan pada pembuatan ekstrak etanol sebesar 500 g dengan hasil ekstraksi berwarna coklat. Alat penguap pelarut yang digunakan adalah *rotary evaporator*, memiliki prinsip yaitu penguapan dengan tekanan sehingga dapat terjadi penguapan dibawah titik didih suhu yang digunakan pada saat penguapan yaitu 50⁰ C. Penguapan yang dilakukan pada suhu stabil bertujuan untuk menjaga stabilitas senyawa aktif pada saat proses pemanasan berlangsung

dengan jangka waktu yang lama. Ekstrak kental yang telah pekatk dalam oven diperoleh sebanyak 78,702 g. Hasil presentase rendemen ekstrak daun sisik naga dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Presentase rendemen ekstrak daun sisik naga

Berat serbuk (g)	Ekstrak (g)	Rendemen (%)
500	78,702	15,74

6. Hasil uji kadar air

Ekstrak etanol daun sisik naga dilakukan uji kadar air untuk menjamin tidak adanya kontaminasi bakteri bahkan jamur pada ekstrak, pelarut yang digunakan etanol 70 % dimana kandungan air pada pelarut tersebut sebesar 30 % sehingga ekstrak yang sudah melalui proses pemekatan di dalam oven hingga didapatkan bobot konstan perlu dilakukan pengecekan kadar air pada ekstrak tersebut untuk mencegah penurunan kualitas ekstrak akibat pertumbuhan jamur dan bakteri. Pengujian kadar air ekstrak digunakan metode *Sterling Bidwell* karena prosesnya relatif cepat dan data yang dihasilkan akurat, sedangkan kelemahan metode ini adalah penggunaan alat yang rumit sehingga dibutuhkan operator yang terampil. Hasil kadar air ekstrak daun sisik naga dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil kadar air ekstrak daun sisik naga

Berat awal (g)	Kadar air (%)
6	8,3
6	6,6
6	6,6
Rata-rata ± SD	7,2 ± 0,824

7. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun sisik naga

Hasil identifikasi golongan senyawa kimia dengan reaksi warna. Ekstrak daun sisik naga sebelum dilakukan penelitian dilakukan identifikasi kandungan untuk mengetahui adanya golongan senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Identifikasi senyawa ini dapat diketahui dengan melihat adanya perubahan warna, terjadinya buih atau endapan yang di timbulkan dari masing masing golongan senyawa. Identifikasi pada ekstrak dengan pereaksi yang sesuai diamati perubahannya. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol daun sisik naga

Senyawa	Pereaksi	Hasil identifikasi	Pustaka	Kesimpulan
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl _(p)	Merah	Merah, kuning, jingga, terbentuk endapan	+
Tanin	FeCl ₃ 1%	Biru kehitaman	Biru, biru hitam, hijau, biru hijau	+
Saponin	Metode Forth	Busa	Busa > 10 menit setinggi 1-10 cm	+
Triterpenoid	CHCl ₃ +CH ₃ COOH+ H ₂ SO _{4(p)}	Terbentuk cincin coklat	Cincin coklat/ violet (terpenoid)	+

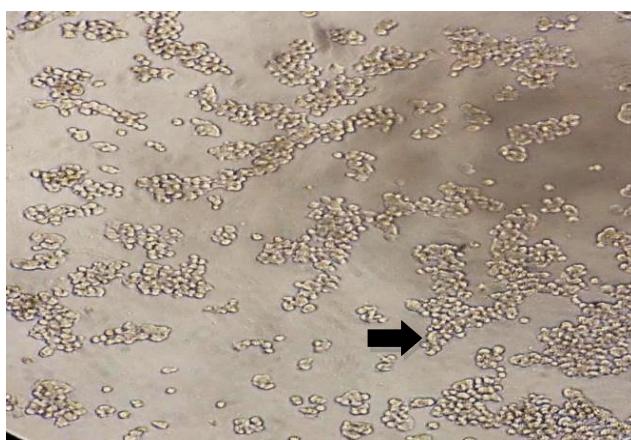
8. Hasil uji sitotoksik ekstrak daun sisik naga dengan metode MTT assay

Pengujian sitotoksik pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ketoksikan ekstrak etanol daun sisik naga terhadap kultur sel kanker hati (HepG2) dan selektifitas terhadap sel vero. Sifat sitotoksik merupakan langkah awal utama dalam dasar uji sitotoksik dimana kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik. Aktivitas sitotoksik dapat diketahui dengan nilai IC₅₀ dimana nilai IC₅₀ ditunjukan dengan nilai konsentrasi yang dihasilkan dari hambatan 50% sel dan menunjukan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Uji sitotoksik dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan sel yang digunakan yaitu sel kanker hati (HepG2). Sel dikultur dalam media DMEM dan diinkubasi pada inkubator CO₂ dengan suhu 37⁰C. Kultur sel merupakan teknik untuk mengembangkan sel yang ada di luar tubuh atau secara *in vitro*. Kultur sel memiliki keuntungan yaitu lingkungan tempat hidup sel dapat dikontrol dan diatur sehingga kondisi fisiologis relatif konstan. Kelemahan pada kultur sel yaitu sel yang dikultur dapat mengalami perubahan sifat karena perkembangbiakan sel di dalam tubuh (*in vivo*) bekerja secara terintegrasi dalam suatu jaringan, sedangkan dalam kultur sel terpisah-pisah. Kondisi di lingkungan kultur sel harus dibuat semirip mungkin dengan lingkungan di dalam tubuh agar sel dapat tumbuh dengan baik.

Media penumbuh yang digunakan untuk menumbuhkan sel kanker hati (HepG2) secara optimal adalah DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Media ini memiliki konsentrasi asam amino tinggi, vitamin, dan glukosa. Media ini mengandung FBS 10%, Penisillin-Streptomisin 1%, Fungizon (Amphotericin B) dimana kandungan FBS (*Fetal Bovine Serum*) dalam media bekerja sebagai

suplemen peningkat pertumbuhan efektif untuk sel kanker tersebut, karena kompleksitas dan nutrisi yang dikandungnya, streptomisin bekerja sebagai pencegah pertumbuhan bakteri yang dapat mengkontaminasi media penumbuh sehingga secara spesifik media hanya menumbuhkan sel kanker saja. Fungizon bekerja sebagai pencegah tumbuhnya jamur dan kapang yang juga dapat mengkontaminasi media penumbuh sel kanker. Media ini dapat digunakan untuk menumbuhkan sel lainnya seperti sel HepG2, HaCat, HuCCT-1, sel line kanker pankreas (HPAF-II, HPAC), sel B92 (Triputra 2016).

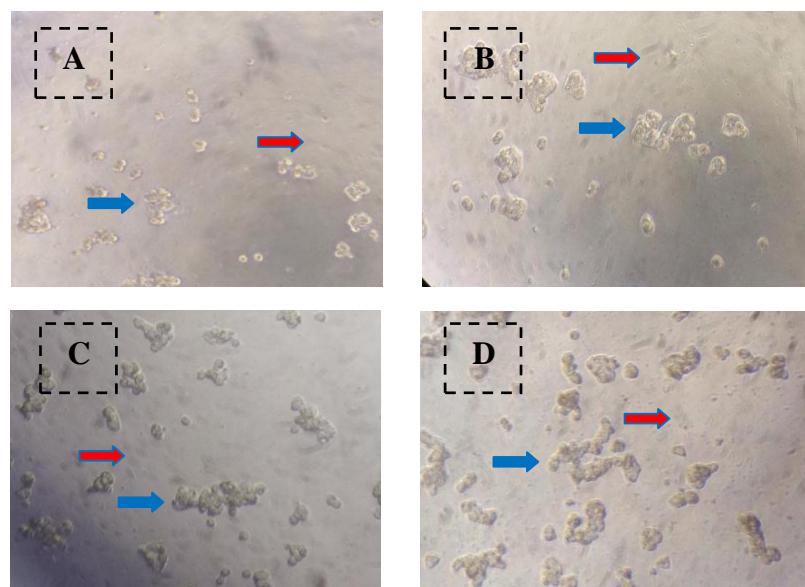
Preparasi sel kanker hati (HepG2) yaitu sel ditumbuhkan hingga sel tumbuh merata dalam media DMEM, jumlah sel yang telah merata terlihat menempel di dasar *plate*. Media kultur sel dibuang untuk memudahkan pemanenan sel dan ditambahkan 5 ml PBS (*Phospat Buffer Saline*) sebanyak dua kali untuk mencuci sel dari sisa media yang masih menempel pada *plate*. Sel yang telah dicuci ditambahkan tripsin 0,1 % sebanyak 2 ml untuk melepaskan sel yang menempel pada dasar *plate*. Sel HepG2 yang telah lepas dari dasar *plate* akan terlihat dengan bentuk bulat (Gambar 6).

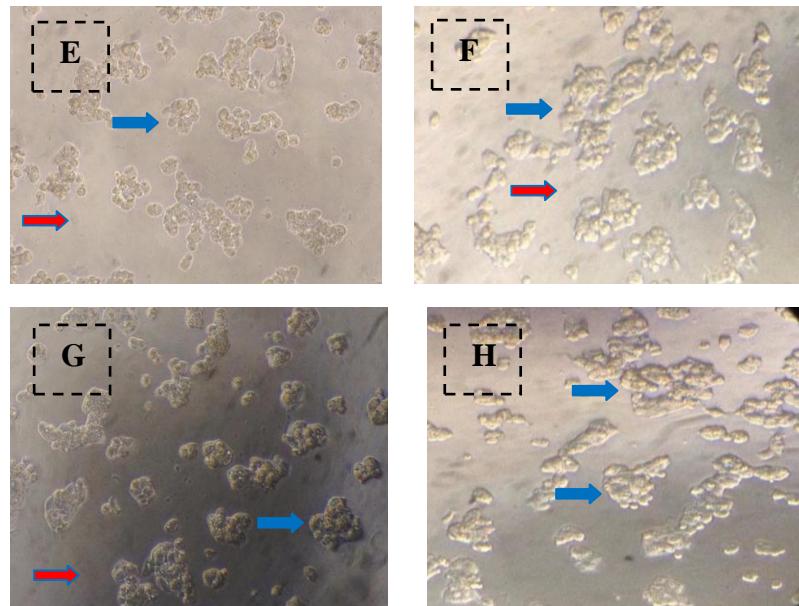


Gambar 6. Morfologi sel HepG2 pada perbesaran 400x setelah pemberian tripsin 0,1 %
(→ sel HepG2 hidup)

Tripsin 0,1 % sebagai enzim protease yang mampu melepaskan interaksi antara molekul glikoprotein dan proteoglikan dengan permukaan *plate*, sehingga sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada permukaan *plate* (Triputra 2016).

Sel kanker HepG2 yang hidup dalam suspensi sel stok dalam penelitian ini sekitar 50×10^4 sel/3000 μl . Setelah itu dilakukan pengenceran terhadap suspensi sel HepG2 untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10×10^4 sel/ml dan ditambahkan media sampai 10 ml sehingga satu *plate 96 well* dapat terisi rata dan cukup, dimana dalam satu *well* mempunyai konsentrasi 1×10^4 sel/100 μl . Sel HepG2 yang hidup ini diharapkan mampu bertahan hidup dengan baik melewati siklus hidupnya selama diinkubasi dalam 24 jam, waktu 24 jam diperlukan untuk mencegah berkurangnya nutrisi yang dibutuhkan sel untuk hidup karena media DMEM akan berfungsi secara maksimal untuk mengkultur sel HepG2 selama 24 jam. Ekstrak kental daun sisik naga diambil sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan 100 μl DMSO dalam ependrof. DMSO berfungsi sebagai *buffer* sehingga ekstrak dapat larut dengan baik. Pelarut DMSO (*dimetil sulfoksida*) digunakan untuk membuat larutan uji sampel, karena DMSO dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar, tidak bersifat toksik serta tidak memberikan aktifitas apapun. Larutan tersebut digunakan untuk melarutkan ekstrak daun sisik naga dalam pembuatan larutan stok sampel uji, dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6) $\mu\text{g/ml}$. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui signifikansi peningkatan konsentrasi sampel uji dengan efek anti proliferasi sel yang dihasilkan.

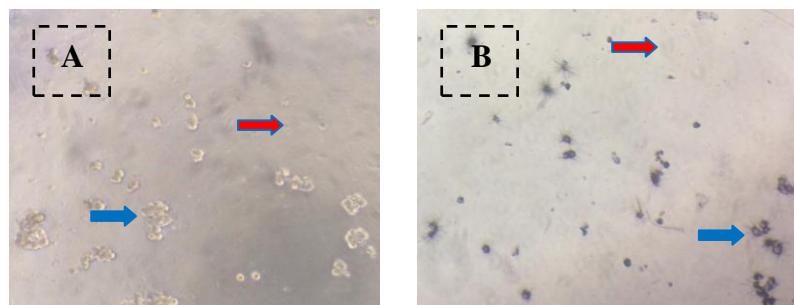




Gambar 7. Morfologi sel HepG2 pada perbesaran 400x setelah pemberian ekstrak.

Ket : Ekstrak etanol daun sisik naga (A) 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (B) 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (C) 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (D) 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (E) 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (F) 31,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (G) 15,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (H) kontrol sel.
 (→ sel HepG2 hidup, → sel HepG2 mati)

Kondisi ekstrak pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (gambar 7A) morfologi sel HepG2 yang mati terlihat sedikit gelap dan sel mengambang dipermukaan *plate*, tidak terlihat menempel pada dasar *plate* karena ikatan antara glikoprotein dan peptidoglikan yang telah hilang sehingga mengakibatkan sel yang mati tidak dapat menempel lagi pada permukaan *plate*, kemudian pada konsentrasi 15,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (gambar 7G) kepadatan populasi sel mendekati kepadatan kontrol sel yang menandakan viabilitas sel masih tinggi.



Gambar 8. Morfologi sel HepG2 sebelum dan setelah pemberian MTT.

Ket : Ekstrak etanol daun sisik naga (A) 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebelum MTT, (B) 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sesudah MTT
 (→ sel HepG2 hidup, → sel HepG2 mati)

Penelitian ini menggunakan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Salt*) secara *in vitro*. Pengujian dengan metode MTT ini berdasarkan pada konversi

garam tetrazolium yang berwarna kuning oleh enzim suksinat dihidrogenase dengan bantuan NADPH menjadi produk berwarna biru gelap yang disebut formazan. Kristal formazan yang terbentuk pada sel yang hidup akan memberikan warna ungu dimana warna tersebut akan semakin bertambah pekat intensitasnya dengan menurunnya konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi tertinggi intensitas warna ungu memudar atau rendah dengan % viabilitas sebesar 33,51% hal ini menunjukkan sel yang hidup pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sangat sedikit. Namun pada konsentrasi selanjutnya intensitas warna ungu pekat dengan % viabilitas yang lebih tinggi dari sebelumnya hal ini menandakan bahwa semakin menurunnya konsentrasi dari ekstrak etanol daun sisik naga maka efek penghambatan pertumbuhannya terhadap sel kanker juga berkurang.

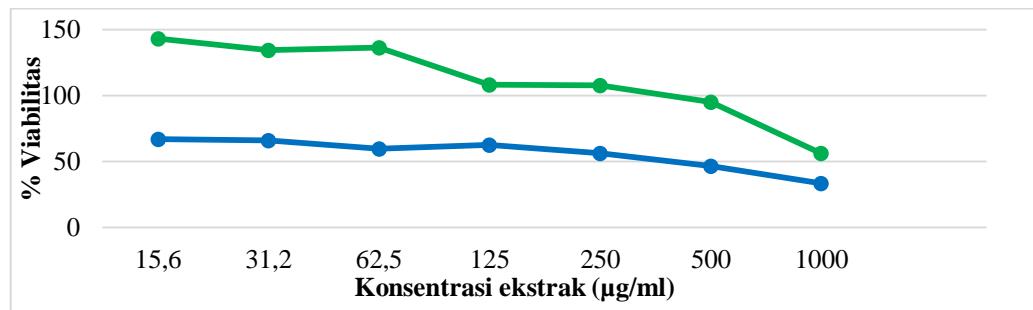
Tabel 7. Hasil perhitungan % viabilitas HepG2

Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Rata rata Abrorbansi	% Viabilitas
1000	0,326	33,51
500	0,423	46,35
250	0,498	56,40
125	0,546	62,77
62,5	0,523	59,63
31,25	0,569	65,74
15,6	0,577	66,80

Tabel 8. Hasil perhitungan % viabilitas sel vero

Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Rata rata Abrorbansi	% Viabilitas
1000	0,346	56,09
500	0,533	95,24
250	0,591	107,42
125	0,593	107,98
62,5	0,727	136,13
31,25	0,718	134,17
15,6	0,759	142,79

MTT dengan enzim suksinat dihidrogenase pada mitokondria sel dihentikan dengan penambahan SDS karena reaksi antara enzim tersebut dengan MTT berlangsung secara berkelanjutan sehingga diperlukan reagen *stopper*. Kristal formazan ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya dan disajikan dalam bentuk grafik % viabilitas sel dengan konsentrasi ekstrak etanol daun sisik naga (Gambar 9).



Gambar 9. Grafik hubungan % viabilitas sel dengan konsentrasi ekstrak etanol daun sisik naga

Ket : ■ % viabilitas HepG2, ■ % viabilitas sel vero

Berdasarkan grafik aktivitas ekstrak etanol daun sisik naga menunjukkan *dose dependent*, yaitu viabilitas sel berkurang seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak. Nilai % viabilitas merupakan kemampuan hidup dari suatu sel. Perhitungan % viabilitas bertujuan untuk mengetahui jumlah sel yang bertahan hidup setelah terpapar senyawa toksik. Dari gambar 9 dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun sisik naga menunjukkan semakin kecil % viabilitas sel kanker HepG2 dan semakin besar % penghambat dari sel kanker hati HepG2. Nilai absorbansi yang diperoleh dapat dikonversi ke dalam persamaan % viabilitas setelah itu dilakukan perhitungan untuk memperoleh nilai IC₅₀ yang diperoleh dari regresi linier antara konsentrasi vs % viabilitas sel.

Tabel 9. Hasil pengamatan pada sel HepG2

Konsentrasi (µg/ml)	% viabilitas sel HepG2	Persamaan regresi linear	Hasil IC ₅₀ (µg/ml)
1000	33,51	$y = 65,242 - 0,033x$	461,879
500	46,35	$r = 0,9659$	
250	56,49		
125	62,77		
62,5	59,63		
31,25	65,74		
15,6	66,8		

Tabel 7. Hasil pengamatan pada sel Vero

Konsentrasi (µg/ml)	% viabilitas sel Vero	Persamaan regresi linear	Hasil IC ₅₀ (µg/ml)
1000	56,09	$y = 134,23 - 0,0805x$	1046,584
500	95,24	$r = 0,915$	
250	107,42		
125	107,98		
62,5	136,13		
31,25	134,17		
15,6	142,79		

Tabel 11. Hasil pengamatan Cisplatin

Konsentrasi (μg/ml)	% viabilitas sel	Persamaan regresi linear	Hasil IC₅₀ (μg/ml)
100	31,65	$y = 62,781 - 0,2968x$	43,062
50	52,01	$r = 0,8708$	
25	53,25		
12,5	55,64		
6,25	68,35		
3,12	60,12		
1,56	59,94		

Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun sisik naga pada penelitian ini berdasarkan dari tabel diatas ditentukan dengan persamaan regresi linear dengan persamaan linier : $Y = 65,242 - 0,033x$ nilai $r = 0,9659$ didapatkan nilai IC₅₀ ekstrak terhadap HepG2 sebesar 461,879 μ g/ml. Persamaan linier ekstrak terhadap sel vero $Y = 134,23 - 0,0805x$, nilai $r = 0,915$ didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 1046,584 μ g/ml, sedangkan nilai IC₅₀ kontrol positif sebesar 43,062 μ g/ml dari persamaan linier $Y = 62,781 - 0,2968x$ dengan nilai $r = 0,8708$. Nilai r merupakan koefisien korelasi yang menunjukkan linearitas atau tidaknya data absorbansi. Menurut Rollando (2016) ekstrak yang memiliki nilai IC₅₀ di bawah 100 μ g/ml memiliki efek sitotoksik yang poten. Oleh karena itu, berdasarkan kriteria tersebut dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun sisik naga pada penelitian ini menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tidak poten terhadap sel kanker (HepG2).

Hasil penelitian sitotoksik yang dilakukan oleh Susi (2009) diperoleh hasil IC₅₀ dari ekstrak sisik naga memiliki aktivitas antikarsinogenik terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC₅₀ sebesar 83,63 μ g/mL. Anwar (2013) menyatakan ekstrak metanol daun sisik naga memiliki efek sitotoksik terhadap sel leukimia P388 yang di tunjukan dengan nilai IC₅₀ sebesar 19,32 μ g/mL. Besarnya nilai IC₅₀ yang dihasilkan oleh ekstrak etanol daun sisik naga tersebut diduga karena rendahnya kadar senyawa flavonoid yang memiliki perananan penting dalam aktivitas sitotoksik, ekstrak dengan nilai IC₅₀ yang kecil menandakan banyaknya senyawa kimia toksik yang terkandung seperti senyawa alkaloid dan flavonoid yang dapat memicu kematian sel kanker hati (HepG2). Perbedaan penggunaan pelarut dalam pengambilan senyawa aktif atau proses ekstraksi yang menyebabkan pemindahan senyawa senyawa aktif kurang maksimal sehingga menyebabkan perbedaan kadar

kandungan senyawa yang ada dalam ekstrak. Penelitian yang dilakukan oleh Susi (2009) dan Anwar (2013) penyari yang digunakan adalah metanol, dimana metanol memiliki gugus hidroksil yang lebih kuat sehingga penarikan senyawa aktif polar dapat tertarik sebaik mungkin (Siska 2015 ; Romadanan 2014).

9. Uji indeks selektivitas ekstrak etanol daun sisik naga

Nilai indeks selektivitas diketahui untuk mengukur tingkat keamanan atau selektivitas sitotoksik dari ekstrak etanol daun sisik naga terhadap sel kanker dan sel normal, dihitung dengan cara membandingkan nilai IC_{50} ekstrak dari sel normal (sel vero) dan IC_{50} ekstrak dari sel kanker hati (sel HepG2). Nilai IC_{50} ekstrak terhadap sel vero diperoleh sebesar 1046.584 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sedangkan nilai IC_{50} ekstrak terhadap sel HepG2 adalah 461.879 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sehingga diperoleh nilai indeks selektivitas sebesar 2,265. Nilai indeks selektivitas dari ekstrak tersebut, dinyatakan bahwa ekstrak daun sisik naga kurang selektif dalam menghambat pertumbuhan sel, artinya ekstrak daun sisik naga tersebut memiliki potensi sitotoksik yang lemah terhadap sel kanker dan tidak memiliki tingkat keamanan yang tinggi terhadap sel normal. Ekstrak dikatakan memiliki selektivitas yang tinggi apabila nilai indeks selektivitasnya > 3 (Sutedjo 2016).