

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktifitas sitotoksik golongan senyawa steroid yang terkandung dalam tanaman *E.cinereum* diawali dari proses ekstraksi menggunakan metode *ultrasound-assisted extraction*, proses fraksinasi menggunakan metode *vacuum liquid chromatography*, proses isolasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis preparatif, dan dilanjutkan dengan pengujian sitotoksik isolat steroid terhadap sel T47D dan sel Vero menggunakan metode MTT *Assay*. Penelitian ini juga telah mendapatkan kelayakan etik dari Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang pada tanggal 14 September 2018 No.341/IX/2018/Komisi Bioetik (Lampiran 1).

4.1. Hasil Ekstraksi Tanaman Rumput Gong

Rumput Gong yang digunakan dalam penelitian ini berbentuk simplisia herba yang sudah dikeringkan dan disimpan pada suhu ruangan dalam wadah kaca yang tertutup rapat dan kering untuk menghindari tumbuhnya jamur yang dapat merusak kualitas dari simplisia. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode *ultrasound-assisted extraction*. Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah *n*-heksan dan etil asetat. Penggunaan pelarut bertingkat bertujuan untuk memperoleh senyawa-senyawa yang sesuai dengan kepolarannya. Ekstrak disari terlebih dahulu menggunakan pelarut *n*-heksan agar senyawa-senyawa yang bersifat non-polar tidak ikut tersari pada ekstrak etil asetat. Kemudian, ampas ekstrak disari kembali dengan pelarut etil asetat yang memiliki sifat semi polar. Setelah memperoleh ekstrak etil asetat cair kemudian dilakukan pemisahan antara pelarut dari ekstrak murni yang kental dengan cara penguapan pelarut menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Prinsip dari alat *vacuum rotary evaporator* yaitu penguapan pelarut dibawah titik didihnya dengan bantuan tekanan yang membantu mempercepat penguapan dan putaran untuk meningkatkan luas permukaan, uap yang terbentuk kemudian mengalir menuju kondensor pendingin

untuk diubah menjadi embun yang akan dikumpulkan dalam labu pengumpul (Carl *et al.*, 2016).

Ekstrak murni kental yang diperoleh disimpan dalam desikator untuk menjaga stabilitas, kemurnian, serta kontaminasi dari bahan lain. Hasil ekstrak kental etil asetat yang diperoleh seberat 1,4107 gram. Kemudian dilakukan perhitungan persen rendemen terhadap berat simplisia awal seberat 100,2 gram, sehingga nilai rendemen ekstrak yang dihasilkan sebesar 0,704% b/b yang berarti dari 100 gram simplisia Rumput Gong diperoleh bobot ekstrak kental sebanyak 1,4107 gram. Besarnya nilai rendemen menunjukkan komponen yang terekstrak selama proses ekstraksi.

4.2. Hasil Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat Tanaman Rumput Gong

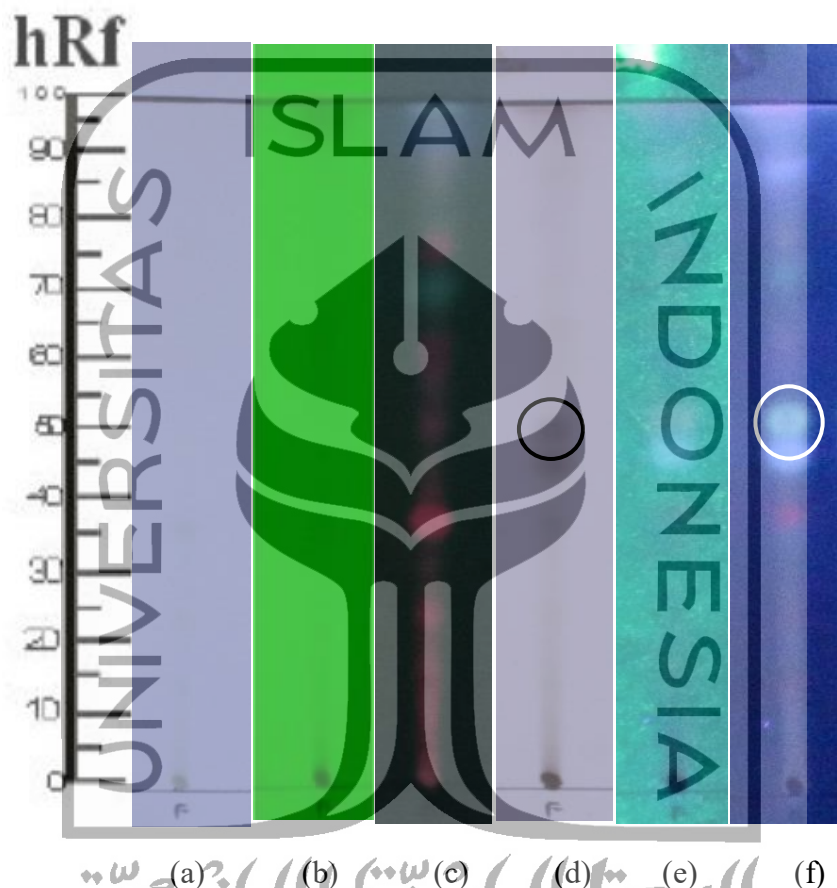
Proses fraksinasi dilakukan menggunakan metode *vacuum liquid chromatography* (VLC). Fraksinasi menggunakan VLC dipilih karena prosesnya cepat, substansi yang diperoleh relatif banyak dan menggunakan peralatan yang sederhana. Fase diam yang digunakan pada kolom kromatografi yaitu silika gel 60 GF₂₅₄ yang dikemas kering dengan kerapatan yang maksimum. Fase gerak yang digunakan yaitu pelarut diklorometana sebanyak 100 ml. Setelah diperoleh fraksi diklorometana, kemudian fraksi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga membentuk ekstrak kering berwarna hijau kehitaman. Fraksi diklorometana yang sudah kering disimpan dalam desikator untuk menjaga stabilitas dan kontaminasi dari bahan lain.

Fraksi diklorometana ekstrak etil asetat dilakukan perhitungan persen rendemen terhadap berat ekstrak awal 0,7 gram, fraksi diklorometana kental yang diperoleh seberat 0,2414 gram dengan nilai persen rendemen sebesar 34,3% b/b. Besarnya nilai persen rendemen menunjukkan banyaknya senyawa yang dapat tersari selama proses fraksinasi.

4.3. Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa Steroid Fraksi Diklorometana

Fraksi diklorometana yang diperoleh dari ekstrak etil asetat Rumput Gong kemudian dilakukan identifikasi untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa yang steroid dan nilai R_f senyawa steroid. Fraksi diklorometana ditotolkan pada plat

silika gel 60 GF₂₅₄ dan dielusi menggunakan perbandingan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (8 : 2). Setelah selesai dielusi plat disemprot menggunakan pereaksi semprot LB (Liebermann Burchard). Analisis hasil dilakukan secara visual dengan melihat perubahan warna yang terbentuk setelah dilakukan penyemprotan menggunakan pereaksi semprot LB pada sinar tampak, dan UV₃₆₆.



Gambar 4.1. Hasil identifikasi senyawa dari fraksi diklorometana ekstrak etil asetat Rumput Gong menggunakan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (8:2)

Keterangan :

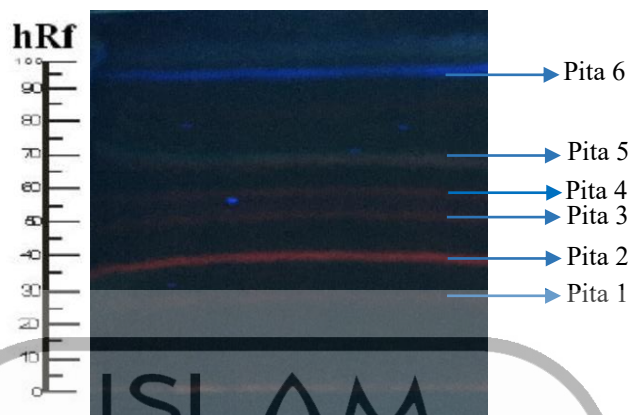
- (a) Hasil elusi fraksi diklorometana pada cahaya tampak;
 - (b) Hasil elusi fraksi diklorometana pada UV₂₅₄ nm;
 - (c) Hasil elusi fraksi diklorometana pada UV₃₆₆ nm;
 - (d) Hasil setelah disemprot dengan pereaksi *Liebermann Burchard* pada cahaya tampak;
 - (e) Hasil setelah disemprot dengan pereaksi *Liebermann Burchard* pada UV₂₅₄ nm;
 - (f) Hasil setelah disemprot dengan pereaksi *Liebermann Burchard* pada UV₃₆₆ nm.
- Bagian yang dilingkari pada gambar adalah bercak golongan senyawa steroid yang mengalami perubahan warna.

Identifikasi senyawa steroid menggunakan pereaksi LB ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehijauan pada UV_{366} setelah plat KLT dipanaskan menggunakan oven dengan suhu $100^{\circ}C$ selama 5-10 menit (Wagner *et al.*, 1983). Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan terdapat bercak yang berwarna biru-hijau pada R_f 0,5. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi diklorometana mengandung golongan senyawa steroid yang apabila diamati di bawah sinar UV_{366} menunjukkan warna biru-hijau (Wagner *et al.*, 1983). Hasil pengamatan dapat dilihat pada **Gambar 4.1.**

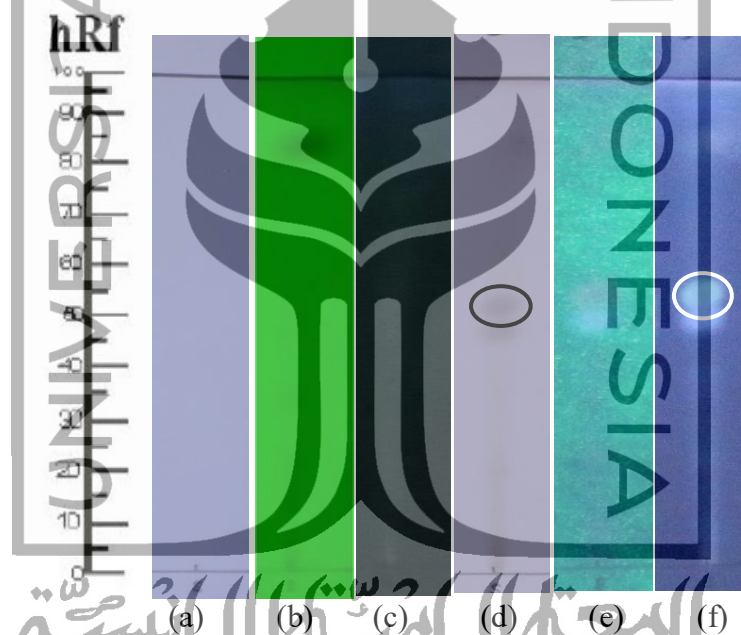
4.4. Hasil Pemisahan Golongan Senyawa Steroid

Isolasi golongan senyawa steroid dari fraksi diklorometana ekstrak etil asetat menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLT-P). Fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60G dengan ketebalan 0,5 mm dan fase gerak *n*-heksan : til aasetat (8 : 2). Plat yang sudah siap digunakan diberi batas atas dan bawah kemudian ditotolkan fraksi diklorometana berbentuk pita memanjang, dan dilanjutkan dengan proses elusi. Untuk mengetahui bercak pita setelah elusi yang akan dikerok, plat diamati menggunakan sinar UV_{366} , pada isolasi golongan senyawa steroid dari fraksi diklorometana hasil dari elusi pada plat KLT-P terbentuk sebanyak 6 pita, dapat dilihat pada **Gambar 4.2.**

Pita yang teramati dibawah UV_{366} dihitung nilai R_f -nya, dari hasil pengamatan dipilih dan dikoleksi pita 3 karena memiliki nilai R_f yang mirip dengan nilai R_f golongan senyawa steroid (R_f 0,5) pada identifikasi fraksi diklorometana. Selain itu dari hasil pemisahan dilakukan identifikasi kembali terhadap semua pita yang terbentuk menggunakan pereaksi semprot LB. Hasil identifikasi pita yang terbentuk menunjukkan pada pita 3 terjadi perubahan warna biru-hijau sehingga dapat disimpulkan bahwa pita 3 mengandung golongan senyawa steroid (**Gambar 4.3f**). Serbuk hasil koleksi pita 3 dilarutkan menggunakan pelarut diklorometana dan disaring menggunakan kertas saring. Hasil dari penyaringan diuapkan dan diperoleh isolat golongan senyawa steroid kering. Pada penelitian ini proses isolasi dilakukan menggunakan 22 plat KLTP dengan fase diam silika gel 60G dan menghasilkan serbuk golongan senyawa steroid seberat 2,1 mg.



Gambar 4.2. Pita hasil elusi fraksi diklorometana ekstrak etil asetat menggunakan plat KLT preparatif dengan fase diam silika gel dan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (8:2) yang diamati dibawah sinar UV₃₆₆



Gambar 4.3. Hasil identifikasi golongan senyawa steroid dari fraksi diklorometana ekstrak etil asetat Rumput Gong menggunakan plat KLT dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-heksan:etil asetat (8:2)

Keterangan :

- (a) Hasil elusi isolat golongan senyawa steroid pada cahaya tampak;
 - (b) Hasil elusi isolat golongan senyawa steroid pada UV₂₅₄ nm;
 - (c) Hasil elusi isolat d golongan senyawa steroid pada UV₃₆₆ nm;
 - (d) Hasil setelah disemprot menggunakan pereaksi *Liebermann Burchard* pada cahaya tampak;
 - (e) Hasil setelah disemprot menggunakan pereaksi *Liebermann Burchard* pada UV₂₅₄ nm;
 - (f) Hasil setelah disemprot menggunakan pereaksi *Liebermann Burchard* pada UV₃₆₆ nm.
- Bagian yang dilingkari pada gambar adalah bercak golongan senyawa steroid yang mengalami perubahan warna.

4.1. Hasil Uji Aktivitas Sitotoksik

Pengujian aktivitas sitotoksik golongan senyawa steroid terhadap sel kanker payudara menggunakan metode MTT *assay* sesuai dengan protokol CCRC (*Cancer Chemopreventive Research Center*). Sampel yang digunakan berupa isolat hasil isolasi golongan senyawa steroid dari fraksi diklorometana dari ekstra etil asetat yang dipisahkan menggunakan KLT preparatif dan telah terlebih dahulu diidentifikasi bahwa fraksi diklorometana ekstrak etil asetat mengandung golongan senyawa steroid. Data hasil uji aktivitas sitotoksik berupa nilai absorbansi yang diperoleh dari pembacaan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Nilai akhir yang menjadi parameter pengujian sitotoksik adalah nilai IC_{50} . Dalam pengujian sitotoksik secara *in vitro* terdapat klasifikasi yang digunakan untuk menentukan gradasi aktivitas sitotoksik dari suatu sampel, aktivitas sitotoksik yang aktif terhadap sel kanker memiliki nilai $IC_{50} < 2 \mu\text{g/ml}$, jika suatu sampel memiliki rentang nilai IC_{50} antara 2-89 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki aktivitas sitotoksik yang sedang (*moderate*) dan suatu senyawa dikatakan tidak aktif sebagai agen sitotoksik terhadap sel kanker apabila nilai $IC_{50} > 90 \mu\text{g/ml}$ (WHO, 2019).



Gambar 4.4. Hasil sel setelah perlakuan sampel dengan konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel T47D menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 40x

Keterangan :

(a) Sel t47d normal

(b) Sel t47d setelah perlakuan dengan isolat

→ Sel viabel

↘ Sel non viabel mengalami perubahan bentuk dan ukuran

Pada pengujian sitotoksik sel yang digunakan adalah sel T47D. Isolat golongan senyawa steroid yang digunakan untuk pengujian sitotoksik dibuat dalam 5 seri konsentrasi yaitu 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; dan 125 $\mu\text{g/ml}$. Setelah dilakukan pemaparan sampel, sel diamati morfologinya dibawah mikroskop untuk melihat apakah setelah dilakukan pemaparan sampel terjadi perubahan morfologi sel. Hasil pengamatan morfologi sel dapat dilihat pada **Gambar 4.4**.

Setelah pemaparan sampel dengan 5 seri kadar, sebelum dilakukan pembacaan nilai absorbansi terlebih dahulu ditambahkan dengan reagen MTT *assay* yang bertujuan untuk pembentukan kristal formazan dari reaksi reduksi antara enzim mitokondria reduktase yang terdapat pada sel dengan garam formazan yang terdapat di reagen MTT. Pembacaan nilai absorbansi menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm menghasilkan data seperti yang ditampilkan pada **Tabel 4.1**. Dari data hasil absorbansi dapat dilihat bahwa setelah sel dipaparkan oleh sampel, adanya hubungan antara jumlah sel yang hidup dengan besarnya konsentrasi yang dipaparkan pada sampel, semakin tinggi konsentrasi yang dipaparkan maka akan memperoleh nilai absorbansi sel yang rendah, sedangkan pada konsentrasi yang rendah menunjukkan nilai absorbansi yang tinggi. Hal tersebut dipengaruhi dengan perbedaan jumlah kristal formazan yang terbentuk dari reaksi reduksi antara garam formazan dengan enzim mitokondria reduktase pada sel.

Tabel 4. 1. Hasil Uji Sitotoksik Isolat Terhadap Sel T47D

Kons ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata Absorbansi		Sel Hidup (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
	Sampel	Kontrol Sel Kontrol Media		
7,813	0,646		87,584	
15,625	0,663		90,393	
31,25	0,657	0,719	89,438	136,279
62,5	0,551		71,516	
125	0,443		53,371	

Perhitungan nilai IC₅₀ menggunakan *Microsoft Excel* dengan metode regresi linear. Dari data IC₅₀ isolat terhadap sel T47D menunjukkan bahwa golongan senyawa steroid hasil pemisahan dari fraksi diklorometana tidak aktif yang

dibuktikan dengan nilai IC_{50} sebesar 136,279 $\mu\text{g/ml}$. Pada penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa saponin steroid dan gymnasterol yang merupakan jenis golongan senyawa steroid memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} yang *Moderately Cytotoxic* yaitu 14,64 $\mu\text{g/ml}$ dan 5,6 $\mu\text{g/ml}$ (Bogoriani, 2007; Gupta *et al.*, 2013). Berdasarkan nilai IC_{50} hasil uji pada penelitian ini dengan nilai IC_{50} literatur menunjukkan bahwa senyawa steroid yang terkandung dalam fraksi diklorometana memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih lemah terhadap sel kanker payudara T47D. Hal ini diduga karena kandungan jenis senyawa steroid pada fraksi diklorometana *E. cinereum* berbeda dengan senyawa steroid yang telah dilaporkan oleh Bogoriani (2007) dan Gupta *et al.* (2013).



Gambar 4.5. Hasil sel setelah perlakuan sampel dengan konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel normal Vero menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 40x

Keterangan :

(c) Sel vero normal

(d) Sel vero setelah perlakuan dengan isolat

→ Sel viabel

↪ Sel non viabel mengalami perubahan bentuk dan ukuran

Pada penelitian ini juga dilakukan pengujian sampel isolat golongan senyawa steroid terhadap sel Vero yaitu sel normal yang digunakan pada pengujian sitotoksik. Tujuan dari pengujian menggunakan sel normal Vero yaitu sebagai

pembandingan untuk mengetahui selektivitas golongan senyawa steroid terhadap sel kanker payudara T47D. Isolat golongan senyawa steroid yang diujikan pada sel kanker dibuat dalam 5 konsentrasi yaitu 3,906; 7,813; 15,625; 31,25; dan 62,5 $\mu\text{g/ml}$. Setelah dilakukan pemaparan sampel pada sel normal Vero, diamati dibawah mikroskop *inverted* kondisi morfologi sel. Hasil pengamatan morfologi sel dapat dilihat pada **Gambar 4.5**.

Pembacaan nilai absorbansi dilakukan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil pembacaan nilai absorbansi dapat dilihat pada **Tabel 4.2**. Pada pengujian terhadap sel Vero menunjukkan bahwa pada hasil perhitungan persen sel hidup terdapat angka yang melebihi 100% dan memperoleh nilai linearitas yang sangat rendah. Nilai linearitas dapat dilihat pada **Lampiran 5b**. Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa pada konsentrasi tertinggi yaitu 62,5 $\mu\text{g/ml}$ isolat golongan senyawa steroid fraksi diklorometan *E.cinereum* yang digunakan tidak mempengaruhi kehidupan sel vero yang dibuktikan dengan nilai persen sel hidup yang masih tinggi. Pada konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$ persen sel hidup justru menurun. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tidak memiliki pengaruh secara linier terhadap kehidupan sel vero. Hasil dari perhitungan nilai IC_{50} terhadap sel vero sebesar 435,534 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 4.2. Hasil Uji Sitotoksik Isolat Terhadap Sel Vero

Kons ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata Absorbansi			Sel Hidup (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	Sampel	Kontrol Sel	Kontrol Media		
3,906	0,525			106,527	
7,813	0,484			96,429	
15,625	0,476	0,498	0,092	94,581	435,534
31,25	0,475			94,212	
62,5	0,478			94,951	

Setelah diperoleh nilai IC_{50} , kemudian dibuat perhitunagn nilai selektifitas indeks (SI) dari isolat terhadap sel kanker T47D dengan cara membandingkan antara nilai IC_{50} terhadap sel Vero dan sel T47D. Suatu sampel dikatakan selektif terhadap sel kanker apabila memiliki nilai selektifitas indeks >3 , yang menandakan bahwa ekstrak, fraksi, atau isolat mempunyai aktivitas sitotoksik yang baik

terhadap sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal (Prayong *et al.*, 2008). Hasil perhitungan selektivitas indeks antara sel normal dengan sel kanker payudara yang diterapi menggunakan isolat yaitu 3,195 yang artinya bahwa isolat memiliki selektivitas yang baik terhadap sel T47D tanpa memberikan efek yang signifikan terhadap sel normal vero.

