

**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI KURKUMINOID PADA
RIMPANG KUNYIT PUTIH (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) SEBAGAI
ANTIANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

Oleh:
EDVIRA FAHMA ADNINA
NIM. 13630035



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI KURKUMINOID PADA
RIMPANG KUNYIT PUTIH (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) SEBAGAI
ANTIANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

Oleh:
EDVIRA FAHMA ADNINA
NIM. 13630035

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

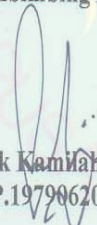
**UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI KURKUMINOID PADA
RIMPANG KUNYIT PUTIH (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) SEBAGAI
ANTI KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

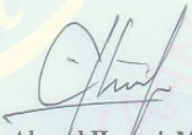
Oleh:
EDVIRA FAHMA ADNINA
NIM. 13630035

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 22 Maret 2018

Pembimbing I


Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP.19790620 200604 2002

Pembimbing II


Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia

Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2002

UJI AKTIVITAS DAN IDENTIFIKASI KURKUMINOID PADA
RIMPANG KUNYIT PUTIH (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) SEBAGAI
ANTIKANKER PAYUDARA T47D

SKRIPSI

Oleh:
EDVIRA FAHMA ADNINA
NIM. 13630035

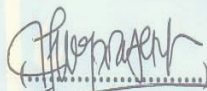
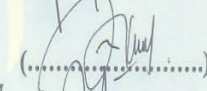
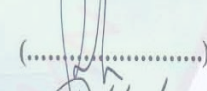
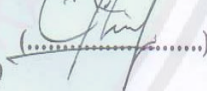
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan
Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana
Sains (S.Si)
Tanggal: 22 Maret 2018

Penguji Utama : Dr. Anton Prasetyo, M.Si
NIP. 19770925 200604 1 003

Ketua Penguji : Dewi Yuliani, M.Si
NIDT. 19880711 20160801 2 067

Sekretaris Penguji : Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2002

Anggota Penguji : Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069


.....

.....

.....

.....



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2002

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Edvira Fahma Adnina
NIM : 13630035
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : “Uji Aktivitas dan Identifikasi Kurkuminoid pada Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) sebagai Antikanker Payudara T47D”

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 11 Mei 2018
Yang membuat pernyataan,



Edvira Fahma Adnina
NIM. 13630035

MOTTO

“Man Jadda WaJada”

Artinya: “Barang siapa bersungguh-sungguh pasti akan mendapatkan hasil”

Bukan yang paling tajam, tetapi barang siapa yang tekun dalam mencari dan mengamalkan ilmu pasti akan sukses dunia akhirat



PERSEMBAHAN

Alhamdulillah Puji Syukur saya ucapkan kepada Allah SWT yang telah menganugerahkan segala rizky dan hidayah hingga skripsi ini selesai.
Skripsi ini Saya Persembahkan Untuk :

Ayahanda Drs. Edi Indrasiono dan Ibunda Dra. Sofiani Arba'ati tercinta yang telah tiada henti memberi semangat, dukungan serta doa. Serta ayahanda yang telah memberikan dana hingga akhir.

Teruntuk Almh. Eyang Putri (Hj. Mariyati) tercinta yang selalu memberikan doa, semangat dan motivasi kepada penulis.

Bapak dan Ibu Dosen yang telah melimpah Ilmunya dan Nasehat yang Engkau Berikan.

Adik-Adikku tercinta beserta keluarga besarku.

Untuk, seseorang yang ku semogakan terimakasih atas motivasi dan semangatnya dalam penulisan skripsi ini hingga selesai.

Teman- temanku tercinta Kiki, Lilik, Fifty, Dina, Rofa, Ana, Nida, Nor Ayni, Muchsin dan Zaky dan teman-teman kimia Angkatan 2013. Serta semua pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu. Terimakasih dukungan dan semangatnya, semoga ilmu yang kita dapatkan hingga akhir ini bermanfaat bagi Nusa dan Bangsa dan semoga Allah membalas segala kebaikan kalian semua, Aamiin.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada hamba-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas dan Identifikasi Kurkuminoid pada Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma Zedoaria* (Christm.) Berg) sebagai Antikanker Payudara T47D”** dengan tepat waktu, meskipun masih jauh dari kesempurnaan. Shalawat dan salam tak lupa penulis sampaikan kepada junjungan nabi Muhammad SAW serta keluarga, sahabat dan para pengikutnya yang setia hingga akhir zaman, karenanya mendapat pencerahan menuju jalan yang lurus dan jalan yang diridhoi.

Selama proses menyelesaikan skripsi ini, penulis mengerjakan dengan semaksimal mungkin dan tentunya tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Maka penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyesuaian tugas akhir ini kepada:

1. Kedua orang tua, adik-adikku yang telah memberi kasih sayang dan semangat tiada henti.
2. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan dan dosen pembimbing Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan bimbingan, saran, serta motivasi yang membangun dan sangat bermanfaat bagi penulis.
3. Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku konsultan yang telah memberikan semangat, saran, serta motivasi yang membangun dan sangat bermanfaat bagi penulis.
4. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku pembimbing agama yang telah memberikan pengarahan religi dalam penulisan skripsi.
5. Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si selaku penguji utama yang telah memberikan semangat dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi.
6. Rekan-rekan mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya Tim Biofarmaka angkatan 2013 yang telah memberikan semangat, motivasi dan pengalaman yang tak terlupakan.

Penulis menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Namun demikian dengan segala keterbatasan dan

kemampuan yang ada, penulis telah berusaha untuk menyelesaikan skripsi. Akhir kata semoga skripsi penelitian ini dapat diambil manfaatnya oleh semua pihak, khususnya bagi pembaca. Amin Ya Rabbal Alamin.

Malang, 11 Mei 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ABSTRAK	xiv
 BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
 BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pemanfaatan Tanaman sebagai Obat dalam Perspektif Islam	8
2.2 Tanaman Kunyit Putih	9
2.3 Kurkuminoid	10
2.4 Metode Pemisahan Kurkuminoid	12
2.4.1 Ekstraksi Maserasi	12
2.4.2 Ekstraksi cair-cair	12
2.4.3 Kromatografi Lapis Tipis	13
2.5 Uji Fitokimia Kurkuminoid	15
2.6 Identifikasi Kurkuminoid pada Rimpang Kunyit Putih	15
2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis	15
2.6.2 Spektrofotometer FTIR	16
2.7 Sel Kanker Payudara	16
2.8 Sel Vero	17
2.9 Analisis dengan ELISA Reader	18
2.10 Metode MTT	19
 BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	21
3.2 Alat dan Bahan.....	21
3.2.1 Alat	21
3.2.2 Bahan	22
3.3 Tahapan Penelitian	22
3.4 Pelaksanaan Penelitian	23
3.4.1 Preparasi Sampel	23
3.4.2 Analisis Kadar Air	23
3.4.3 Ekstraksi Senyawa Kurkuminoid Rimpang Kunyit Putih	

menggunakan Maserasi.....	24
3.4.4 Uji Kualitatif Ekstrak Kurkuminoid dengan Reagen	25
3.4.5 Pemisahan Senyawa Kurkuminoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	25
3.4.5.1 Pemisahan Senyawa Kurkuminoid dengan KLT Analitik (KLTA)	25
3.4.5.2 Pemisahan Senyawa Kurkuminoid dengan KLT Preparatif (KLTP).....	27
3.4.6 Uji Aktivitas menggunakan Metode MTT	28
3.4.6.1 Penyiapan Sel Kanker dan Sel Vero	28
3.4.6.2 Perhitungan Sel Kanker dan Sel Vero	29
3.4.6.3 Peletakan Sel pada <i>Plate</i>	29
3.4.6.4 Pembuatan Larutan Sampel pada Pemberian Larutan Sampel Pada <i>Plate</i> 96-well	29
3.4.6.5 Pemberian Larutan MTT	30
3.4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif	31
3.4.7.1 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Spektrofotometer UV-Vis	31
3.4.7.2 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Spektrofotometer FTIR	31
3.5 Analisis Data	31
 BAB IV. PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Sampel	33
4.2 Kadar Air	33
4.3 Ekstraksi Kurkuminoid dengan Metode Maserasi dan Partisi	34
4.4 Uji Fitokimia Kunyit Putih dengan Reagen NaOH 5%	35
4.5 Pemisahan Kurkuminoid menggunakan KLT Analitik	36
4.6 Pemisahan Senyawa Kurkuminoid menggunakan KLT Preparatif	38
4.7 Uji Aktivitas Antikanker Metode MTT	39
4.8 Identifikasi Kurkuminoid dari Isolat hasil KLTP menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	43
4.9 Identifikasi Kurkuminoid dari Isolat hasil KLTP menggunakan Spektrofotometer FTIR	45
4.10 Pemanfaatan Kunyit Putih dalam Perspektif Islam.....	47
 BAB V. PENUTUP	49
 DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Kunyit putih	10
Gambar 2.2	Struktur kurkuminoid	11
Gambar 4.1	Reaksi kurkuminoid dengan NaOH	35
Gambar 4.2	Hasil KLT Analitik fraksi air senyawa kurkuminoid	37
Gambar 4.3	Morfologi sel kanker payudara T47D dan Vero	39
Gambar 4.4	Reaksi reduksi MTT	40
Gambar 4.5	Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian sampel	41
Gambar 4.6	Spektra FTIR Isolat 1, 2 dan 5	45
Gambar L.4.1	Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel T47D pada ekstrak kasar	71
Gambar L.4.2	Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel T47D pada Isolat 1	72
Gambar L.4.3	Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel T47D pada Isolat 2	72
Gambar L.4.4	Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel T47D pada Isolat 5	73
Gambar L.4.5	Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel Vero pada ekstrak kasar	73
Gambar L.4.6	Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel Vero pada Isolat 5.....	74
Gambar L.5.1	Serbuk rimpang kunyit putih.....	75
Gambar L.5.2	Morfologi (a) sel kanker payudara T47D dan (b) sel Vero konfluen 80%.....	75
Gambar L.5.3	Warna sampel pada <i>plate</i> sebelum pemberian MTT dan stopper SDS	75
Gambar L.5.4	Warna sampel pada <i>plate</i> setelah pemberian MTT dan stopper SDS	76
Gambar L.5.5	Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian sampel	76
Gambar L.5.6	Hasil noda pada KLTP di bawah pengamatan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm	78
Gambar L.5.7	Hasil spektra UV-Vis Isolat 1 pada rentang panjang gelombang 200-800 nm	79
Gambar L.5.8	Hasil spektra UV-Vis Isolat 2 pada rentang panjang gelombang 200-800 nm	80
Gambar L.5.9	Hasil spektra UV-Vis Isolat 5 pada rentang panjang gelombang 200-800 nm	81

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Sifat fisiko kimia kurkuminoid.....	11
Tabel 2.2	Sifat kelarutan kurkuminoid.....	11
Tabel 2.3	Variasi eluen pada berbagai sampel.....	14
Tabel 3.1	Daftar fase gerak	26
Tabel 4.1	Data penampakan noda senyawa kurkuminoid hasil KLT Analitik	37
Tabel 4.2	Hasil pemisahan KLT preparatif senyawa kurkuminoid	38
Tabel 4.3	Data nilai IC ₅₀ dan SI terhadap sel kanker T47D dan Vero	42
Tabel 4.4	Data hasil bilangan gelombang menggunakan FTIR	45
Tabel L.4.1	Berat cawan kosong pada ulangan perlakuan.....	66
Tabel L.4.2	Berat cawan kosong dan sampel pada ulangan perlakuan.....	66
Tabel L.4.3	Hasil kadar air pada sampel kering rimpang kunyit putih.....	67
Tabel L.4.4	Hasil randemen ekstrak pekat dan fraksi air	67
Tabel L.4.5	Rata-rata absorbansi kontrol sel dan kontrol media pada sel T47D	69
Tabel L.4.6	Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada ekstrak kasar.	69
Tabel L.4.7	Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada Isolat 1.....	69
Tabel L.4.8	Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada Isolat 2.....	70
Tabel L.4.9	Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada Isolat 5.....	70
Tabel L.4.10	Rata-rata absorbansi pada kontrol sel dan kontrol media pada sel Vero.....	70
Tabel L. 4.11	Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada ekstrak kasar	70
Tabel L.4.12	Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada isolat 5	71
Tabel L.4.13	Hasil resolusi berbagai eluen pada KLT Analitik	74
Tabel L.5.1	Hasil KLT Analitik fraksi air ekstrak rimpang kunyit putih pada berbagai eluen	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian..... 59

Lampiran 2. Skema Kerja..... 60

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan..... 64

Lampiran 4. Data dan Perhitungan Hasil Penelitian..... 66

Lampiran 5. Dokumentasi..... 75



ABSTRAK

Adnina, E.F. 2018. **Uji Aktivitas dan Identifikasi Kurkuminoid pada Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) sebagai Antikanker Payudara T47D**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Hanapi, M.Sc; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si.

Kurkuminoid merupakan salah satu senyawa dalam rimpang kunyit putih yang dapat dimanfaatkan sebagai obat. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kurkuminoid pada kunyit putih mampu berperan sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fraksi etanol (ekstrak kasar) dan isolat kurkuminoid terhadap sel kanker payudara T47D dan sel Vero. Sampel kunyit putih diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol kemudian dipartisi menggunakan *n*-heksana. Fraksi etanol yang diduga mengandung senyawa kurkuminoid diuji fitokimia dan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen terbaik. Fraksi etanol (ekstrak kasar) dan isolat yang diduga senyawa kurkuminoid dilakukan uji aktivitas menggunakan metode MTT (*Microculture tetrazolium*). Isolat kurkuminoid dilakukan identifikasi gugus fungsi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Berdasarkan pemisahan menggunakan KLT didapatkan 3 dari 5 isolat kurkuminoid yaitu isolat 1, 2 dan 5. Hasil uji aktivitas didapatkan nilai IC_{50} fraksi etanol (ekstrak kasar) sebesar 153,3 $\mu\text{g/mL}$ yang ditunjukkan hasil indeks selektivitas sebesar 2,4, sedangkan nilai IC_{50} isolat kurkuminoid sebesar 6222,2; 173,8; dan 2528,9 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi etanol (ekstrak kasar) lebih efektif menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dibandingkan isolat kurkuminoid. Analisis UV-Vis menunjukkan bahwa ketiga isolat mempunyai panjang gelombang 357,9-359,0 nm. Hasil FTIR pada ketiga isolat kurkuminoid mengandung gugus fungsi yang khas dalam senyawa kurkuminoid pada bilangan gelombang 3467-3468 cm^{-1} dan 1632-1638 cm^{-1} . Puncak serapan yang muncul sesuai dengan serapan gugus regangan O-H dari ikatan hidrogen dan C=O pada spektra isolat kurkuminoid.

Kata Kunci: Rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg), kurkuminoid, Sel Kanker T47D.

ABSTRACT

Adnina, E. F. 2018. **Anticancer Assay on T47D cell and Identification of Curcuminoid on White Turmeric Rhizomes (*Curcuma zedoaria* (Christm.)Berg)**. Thesis. Department of Chemistry Faculty of Science and Technology State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor of Religion: Ahmad Hanapi, M.Sc; Consultant: DewiYuliani, M.Si.

Curcuminoid is a compound in white turmeric rhizome that can be used as a medicine. Several researches showed that curcuminoid in rhizome is utilized as anticancer. The aim of this research was to determine the activity of ethanol fraction (crude extract) and isolates of curcuminoid on T47D breast cancer and vero cells. White turmeric rhizome was extracted by maceration with 96% ethanol and partitioned with *n*-hexane. Ethanol fraction that expected curcuminoid compound was analyzed by phytochemical test and thin layer chromatography (TLC). Ethanol fraction (crude extract) and the isolates (expected curcuminoid) was determined anticancer activity by MTT (*Microculture tetrazolium*) method. Curcuminoid isolate was identified by UV-Vis and FTIR. Based on the TLC, there were three of five isolates (isolate 1, 2 and 5) that positive curcuminoid. The anticancer activity result had IC₅₀ value of ethanol fraction (crude extract) about 153,3 µg/mL with selectivity index 2,4. The IC₅₀ value of the three of isolate (1, 2 and 5) was 6222,2; 173,8; and 2528,9 µg/mL. The result of activity study showed that ethanol fraction (crude extract) more effectively inhibited the growth of T47D breast cancer cells than isolates. The UV-Vis data showed that the isolates had a wavelength 357,9 to 359,0 nm. The FTIR spectra showed a typical functional group in the curcuminoid compound at wave numbers 3467-3468 cm⁻¹ and 1632-1638 cm⁻¹. The absorption peaks from analyzed according to the absorption of the O-H stretching group from the hydrogen bond and C = O of carbonyl in the curcuminoid isolate spectra.

Keywords: White turmeric rhizome (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg), curcuminoid, T47D Cancer Cells.

ملخص البحث

عدنينا، E. F. ٢٠١٨. اختبار نشاط وتحديد كوركومينويد على جذور الكوركوم الأبيض (*Curcuma Zedoaria*) (كريستم بيرغ) كمكافح سرطان الثدي T47D. رسالة. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة الأولى: إلوك كميلة هياتي، M.Si؛ المشرف الثاني: أحمد حنفي، M.Sc؛ المستشارة: ديوي يولياني، M.Si.

تحتوي جذور الكوركوم الأبيض على كثير من المركبات، منها كوركومينويد يمكن اتخاذه مادة للدواء. وأما هذا البحث يهدف إلى تحديد نشاط المستخلص الحشن ومغزول كوركومينويد ضد خلايا سرطان الثدي T47D وخلايا فيرو. ويختار في هذا البحث الاستخراج باستخدام طريقة التقطيع والتقسيم مع ٩٦٪ من الإيثانول المذيبيات II-الهكسان. ويتم تحقيق جزء الإيثانول المتشابه بمركب كوركومينويد عن طريق اختبار فيتوكيمياء و KLT الاستعدادي الذي له أفضل الشايطات مما تم تحصيله من KLT التحليلي. وذلك الاختبار بقصد تحصيل مغزول كوركومينويد المحض. ثم ينفذ اختبار النشاط لهذا المغزول المزعوم بأنه كوركومينويد. ويجري اختبار النشاط ضد السرطان MTT (*Microculture tetrazolium*). ويتم تحديد مغزول كوركومينويد من ناحية المجموعة الوظيفية باستخدام التحليل الطيفي UV-Vis و FTIR. وتظهر نتائج اختبار النشاط أن المستخلص الحشن من كوركومينويد أكثر فعالية في إعاقه نمو خلايا سرطان الثدي T47D مع وصول قيمة IC₅₀ إلى ١٥٣،٣ µg/ml، ويشير إلى ذلك مؤشر انتقائي ٢،٤. وتشير قيمة IC₅₀ إلى أن الجزء المائي أكثر فعالية باعتباره مكافحا لسرطان الثدي T47D من مغزول كوركومينويد إلى حد ٢٥٢٨،٩؛ ١٧٣،٨؛ ٦٢٢٢،٢؛ ١٧٣،٨ µg/ml. ويظهر تحليل UV-Vis أن المغزولات لها من طول الموجة من ٣٥٧،٩ إلى ٣٥٩،٠ nm. من حين أن نتائج FTIR تحتوي على مجموعة وظيفية مميزة في مركب كوركومينويد بين هذه أرقام الموجة ٣٤٦٨-٣٤٦٧ cm⁻¹ و ١٦٣٢-١٦٣٨ cm⁻¹. وتظهر قمة الامتصاص وفقا لامتصاص مجموعة سلاطة O-H من رابطة الهيدروجين و C=O في أطيايف مغزول كوركومينويد.

الكلمات الرئيسية: جذور الكوركوم الأبيض، *Curcuma zedoaria* (كريستم بيرغ)، كوركومينويد، خلاية سرطان T47D.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan tidak normalnya pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh sehingga mengakibatkan kematian dengan jumlah penderita yang terus bertambah setiap tahun (Mangan, 2009). Menurut Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, kematian akibat kanker di dunia pada tahun 2012 mencapai sekitar 8,2 juta. Jenis kanker yang dapat mengakibatkan kematian yaitu kanker paru, hati, perut, usus besar, dan kanker payudara dengan prosentase 11,1; 5,1; 6; 7-8 dan 12,9%.

Salah satu jenis kanker yang mengakibatkan kematian tertinggi berdasarkan Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI tahun 2012 yaitu kanker payudara. Kanker payudara merupakan penyakit yang disebabkan pertumbuhan sel yang tidak terkendali pada jaringan payudara yang berasal dari jaringan epitel (Kementrian Kesehatan, 2012). *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (2012) menyatakan bahwa penderita kanker payudara mempunyai persentase sebesar 43,3% di dunia. Hasil riset Rumah Sakit Kanker Dharmais pada tahun 2010-2013 menunjukkan bahwa penderita penyakit kanker terbanyak adalah kanker payudara dengan jumlah rata-rata penderita 777 orang.

Pengobatan kanker dan tumor yang umum dilakukan di Indonesia adalah kemoterapi (Nurhayati dan Lusiyanti, 2006). Kemoterapi merupakan pengobatan kanker dengan radiasi mampu membunuh tumor lokal, tetapi dapat menimbulkan resistensi sel kanker. Kelemahan kemoterapi yaitu harga pengobatan mahal dan radiasi dapat membunuh sel normal (Lockhsin dan Zakeri, 2007).

Tingginya angka kematian akibat kanker dan kelemahan dari pengobatan yang ada mendorong manusia untuk menemukan suatu keajaiban yang diciptakan oleh Allah SWT. Salah satu keajaiban ciptaan Allah yang akan diteliti yaitu pencegahan terhadap kanker dengan bahan alam. Pencegahan penyakit kanker dengan bahan alam juga memiliki keuntungan yaitu biayanya relatif lebih murah, mudah, dan tidak toksik. Salah satu keuntungan pencegahan dengan bahan alam yaitu mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh, memperbaiki sel-sel, jaringan, serta organ tubuh yang rusak (Zuraida, 2015).

Tumbuhan yang bermacam-macam diciptakan Allah SWT dengan berbagai macam manfaat. Al-Jazairi (2007) dalam tafsir al-Qur'an al-Aisar menyatakan bahwa hendaknya mereka memikirkan ciptaan Allah SWT terhadap turunnya air dari langit, sehingga tanah yang tadinya tandus menjadi subur. Tumbuh-tumbuhan dengan berbagai macam tumbuh dengan subur dari tanah yang dihidupkan Allah SWT dengan air hujan. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Al-Quran surat an Nahl ayat 11:

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ ۚ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (١١)

Artinya: "Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu dengan tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan."

Bahan alam yang digunakan dalam penelitian kanker payudara adalah rim pang tanaman kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg). Lobo R., dkk. (2009) menyatakan bahwa tanaman kunyit putih mengandung senyawa aktif

seperti senyawa-senyawa arilheptanoid (kurkuminoid), minyak atsiri dengan bermacam-macam monoterpen dan seskuiterpen, flavonoid, saponin, glikosida dan fenol. Penelitian Hudaya, dkk. (2015) menunjukkan adanya senyawa saponin, fenolik dan flavonoid yang mempunyai efek sitotoksik pada ekstrak kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe) terhadap sel kanker payudara T47D. Variasi pelarut yang digunakan pada penelitian Hudaya, dkk. (2015) yaitu etanol dan air. Nilai IC_{50} ekstrak air kunyit putih sebanyak 28,24 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan nilai IC_{50} ekstrak etanol kunyit putih sebanyak 13,71 $\mu\text{g/mL}$.

Senyawa kurkuminoid seperti kurkumin, demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin pada rimpang kunyit putih mempunyai efek sitotoksik terhadap kanker. Penelitian Syu, dkk. (1998) menunjukkan bahwa senyawa kurkuminoid pada rimpang kunyit putih mampu berperan sebagai pengobatan kanker mulut rahim atau OVCAR-3 dengan CD_{50} sebesar 4 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian Malek, dkk. (2011) menunjukkan bahwa senyawa kurkuminoid pada kunyit mangga mampu menghambat sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} sebesar $8,7 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$. Penelitian ini akan dilakukan perbandingan uji aktivitas antara ekstrak kasar dengan isolat kurkuminoid terhadap sel vero dan sel kanker payudara T47D. Pemisahan kurkuminoid pada kunyit putih dilakukan dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol.

Etanol merupakan pelarut universal yang biasa digunakan dalam ekstraksi. Penggunaan etanol sebagai pelarut karena mampu mengisolat senyawa yang diinginkan, baik senyawa yang bersifat polar, semi polar, maupun non polar. Penelitian Indriani (2007) dan Oktaviani (2010) menunjukkan kadar kurkuminoid menggunakan pelarut etanol dengan metode ekstraksi maserasi sebesar 0,214%

dan 0,422%. Ekstrak etanol dilakukan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-heksana, sehingga hasil ekstraksi cair-cair berupa fraksi etanol merupakan ekstrak kasar kurkuminoid. Penelitian Sari, dkk. (2013) menunjukkan kadar total kurkuminoid menggunakan ekstraksi cair-cair dengan pelarut n-heksana sebesar 22,14%.

Pemisahan ekstrak kasar kurkuminoid agar mendapatkan isolat kurkuminoid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) dan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Penggunaan KLTA berfungsi sebagai penentu eluen terbaik untuk memperoleh isolat kurkuminoid pada KLTP. Campuran eluen yang digunakan umumnya bersifat non polar. Penelitian Paramapojn dan Wandee (2009) menggunakan diklorometana dan metanol menunjukkan nilai R_f isolat kurkuminoid sebesar 0,1-0,8. Penelitian Revathy, dkk. (2011) dan Ati, dkk. (2006) menggunakan eluen kloroform dan metanol menghasilkan nilai R_f 0,48-0,51. Penelitian Yusuf dan Nurkhasanah (2015); Phattanawasin, dkk. (2009) menggunakan eluen kloroform, etanol dan asam asetat glasial dengan berbagai perbandingan mampu menghasilkan nilai R_f sebesar 0,15-0,37.

Identifikasi panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer *Ultraviolet-Visible* (UV-Vis) dan *Fourier Transform InfraRed* (FTIR) pada isolat kurkuminoid. Penelitian Nursal, dkk. (2012); Sari dan Kumoro (2013) menyatakan bahwa kurkuminoid diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis mempunyai panjang gelombang maksimum sebesar 425 dan 427 nm. Penelitian Kharkwal, dkk. (2012) menyatakan bahwa identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR menghasilkan bilangan gelombang

kurkuminoid sebesar $3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$, $1625\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ dan $1520\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus fungsi fenol O-H, C=O dan aromatik C=C.

Fraksi etanol (ekstrak kasar) dan isolat kurkuminoid dilakukan uji antikanker menggunakan metode MTT secara *in vitro*. Metode MTT bertujuan untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur jaringan (Siregar dan Akbar, 2007). MTT didasarkan pada perubahan larutan reagen MTT yang berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna ungu (Mosmann, 2000). Penelitian Da'I, dkk. (2007) menguji stabilitas dan aktivitas analog kurkumin pentagamavunon-0 (PGV-0) dan pentagamavunon-1 (PGV-1) menggunakan metode MTT mempunyai aktivitas antikanker $2,5\text{ }\mu\text{M}$.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas, maka rumusan masalah pada penelitian adalah:

1. Apa eluen terbaik untuk mendapatkan isolat kurkuminoid dari rimpang kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg)?
2. Bagaimana uji aktivitas pada fraksi etanol (ekstrak kasar) dan isolat kurkuminoid dari rimpang kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) terhadap sel kanker payudara T47D dan sel vero?
3. Bagaimana hasil identifikasi kurkuminoid dari rimpang kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) pada spektrofotometer UV-Vis dan FTIR?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui eluen terbaik untuk mendapatkan isolat kurkuminoid.
2. Mengetahui aktivitas fraksi etanol (ekstrak kasar) dan isolat kurkuminoid dari rimpang kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) terhadap sel kanker payudara T47D dan sel vero.
3. Mengetahui hasil identifikasi kurkuminoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Sampel yang digunakan adalah rimpang kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) diperoleh dari Desa Banjarrejo Kecamatan Pakis Kabupaten Malang.
2. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol, kemudian dipartisi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana.
3. Pemisahan senyawa kurkuminoid dengan KLTP menggunakan eluen terbaik dari KLTA.
4. Sel yang digunakan untuk penelitian adalah sel kanker payudara T47D dan sel vero.
5. Uji antikanker dilakukan secara *in vitro* dengan metode MTT (*microtetrazolium*).
6. Identifikasi kurkuminoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

1.5 Manfaat Penelitian

Berdasarkan penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat. Informasi yang diberikan mengenai aktivitas antikanker fraksi etanol (ekstrak kasar) dan isolat kurkuminoid pada rimpang kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) dalam menghambat pertumbuhan kanker payudara T47D menggunakan metode MTT secara *in vitro*. Hasil uji yang paling baik dapat dikembangkan menjadi obat kanker.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Tanaman sebagai Obat dalam Perspektif Islam

Makhluk hidup beserta isinya diciptakan Allah SWT dengan segala rahmat, tidak ada yang sia-sia, melainkan diciptakan dengan suatu hikmah-hikmah tertentu. Segala sesuatu yang ada di bumi berhak dimanfaatkan oleh manusia dengan sebaik-baiknya. Sebagaimana firman Allah dalam Al-Quran Surat Thaha ayat 53 yang berbunyi:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَّكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً
فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ ثَبَاتٍ شَتَّىٰ

“Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam.” (QS. Thaha:53).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa terdapat tumbuh-tumbuhan dengan berbagai macam jenis yang dapat tumbuh di bumi dengan adanya air hujan, ada tumbuhan yang digolongkan tingkat rendah yaitu tidak jelas bagaimana perbedaan akar, batang, dan daunnya. Tumbuhan juga ada yang digolongkan tingkat tinggi yaitu jelas bagian akar, batang dan daunnya (Savitri, 2008). Menurut tafsir al-Maraghi (1993), bahwa tumbuh-tumbuhan dalam berbagai jenis diciptakan Allah SWT untuk mengeluarkan berbagai manfaat dalam bentuk aroma, bentuk dan warna. Bagian tumbuh-tumbuhan juga bermanfaat sebagai obat yaitu bagian

daun, akar, rimpang, bunga, buah maupun bijinya, sebagaimana dalam Q.S. Asy-Syu'ara: 7.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”. (QS. Asy-Syu'ara 7).

Tafsir al-Maraghi menyatakan bahwa kata كَرِيم bermakna mulia dari segala sesuatu yang berarti diridai dan dipuji dari-Nya (al-Maraghi, 1993). Kata كَرِيم pada ayat di atas bermakna baik atau mulia, yang artinya ayat tersebut menjelaskan bahwa tumbuhan yang bermacam-macam diciptakan Allah SWT, sehingga manusia bisa memanfaatkannya (al-Qurthubi, 2009). Menurut Khadem (2005), tumbuhan memiliki berbagai kandungan yang bermanfaat bagi manusia baik kepentingan kesehatan maupun industri. Zaman Rasul mengenalkan penyembuhan metode pengobatan klasik yang dapat dipercaya dengan menggunakan tanaman.

2.2 Tanaman Kunyit Putih

Tanaman kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) merupakan anggota suku Zingiberaceae yang tumbuh di daerah tropis mulai dari dataran rendah sampai 750 mdpl (meter di atas permukaan laut). Tinggi tanaman ini mencapai 2 m dengan batang semu berwarna hijau atau coklat tua. Rimpang kunyit putih bermanfaat sebagai pengobatan tradisional, salah satunya sebagai obat kanker. Rimpang kunyit putih mempunyai kandungan senyawa aktif seperti arilheptanoid (kurkuminoid), minyak atsiri, polisakarida, saponin dan fenol yang diduga dapat digunakan sebagai antimikroba, antifungal, antikanker, antialergi,

antioksidan, dan analgesik (Lobo, R., dkk., 2009). Gambar tanaman kunyit putih ditampilkan pada Gambar 2.1 (BPOM RI, 2010).

Kingdom : Plantae
 Divisi : Spermatophyta
 Subdivisi : Angiospermae
 Classis : Monocotyledonae
 Ordo : Zingiberales
 Familia : Zingiberaceae
 Genus : Curcuma
 Spesies : (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg).

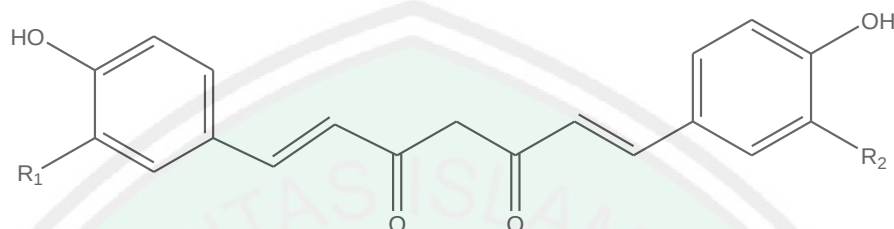


Gambar 2.1 Kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg)

2.3 Kurkuminoid

Salah satu senyawa aktif pada kunyit putih adalah kurkuminoid. Kurkuminoid merupakan golongan senyawa fenolik mempunyai sifat sedikit larut dalam air pada pH asam dan cepat menghidrolisis dalam larutan alkali (Joe, dkk., 2004). Schieffer (2002) menyatakan bahwa kurkuminoid mudah terurai saat terkena cahaya terang, suhu tinggi atau kondisi oksidatif. Kadar kurkuminoid dalam rimpang tanaman suku *curcuma* sekitar 3-5% (Basnet dan Skalko, 2011). Kurkuminoid terdiri dari senyawa kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Pada salah satu senyawa kurkuminoid yaitu kurkumin, berperan sebagai pigmen utama dari ketiga golongan kurkuminoid dan mengalami

degradasi di bawah kondisi asam, basa, pengoksidasian, dan pencahayaan (Cahyono, dkk., 2011). Struktur dan sifat kurkuminoid ditampilkan pada Gambar 2.2 dan Tabel 2.1.



Gambar 2.2 Struktur kurkuminoid. Senyawa Kurkumin (1) R_1 OCH_3 dan R_2 OCH_3 ; Demetoksikurkumin (2) R_1 H dan R_2 OCH_3 dan Bisdemetoksikurkumin (3) R_1 H dan R_2 H (Cahyono, dkk. 2011).

Tabel 2.1 Sifat fisikokimia kurkuminoid

Sifat Kimia	Kurkumin	Demetoksikurkumin	Bisdemetoksikurkumin
Rumus	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$
Titik leleh	183°C	168°C	224°C
Berat Molekul	368,385	338,395	308,333
Kristal	Jingga	Jingga-kuning	Kuning-cerah

Sumber : Parthasarathy, dkk., 2008

Tabel 2.2 Sifat kelarutan kurkuminoid

Sifat kimia	Kurkumin	Demetoksikurkumin	Bisdemetoksikurkumin
Tidak larut	Air, <i>n</i> -heksana	Air, <i>n</i> -heksana	Air, <i>n</i> -heksana
Sedikit larut	Benzena, eter, kloroform	Benzena, eter, kloroform	Benzena, eter, kloroform
Larut	Alkohol, aseton, asam asetat glasial	Alkohol, aseton, asam asetat glasial	Alkohol, aseton, asam asetat glasial
Reaksi dengan basa	Warna merah	Warna merah	Warna merah
Reaksi dengan asam	Warna kuning cerah	Warna kuning cerah	Warna kuning cerah

Sumber : Parthasarathy, dkk., 2008

2.4 Metode Pemisahan Kurkuminoid

2.4.1 Ekstraksi Maserasi

Prinsip maserasi yaitu perendaman serbuk simplisia ke dalam cairan pelarut. Dinding sel tanaman yang mengandung zat aktif akan ditembus oleh pelarut mengakibatkan perbedaan konsentrasi antara di dalam dan di luar sel sehingga larutan terpekat berupa filtrat hasil maserasi akan didesak ke luar. Larutan di dalam dan di luar sel akan terjadi keseimbangan konsentrasi setelah terjadi perbedaan konsentrasi secara berulang. Keseimbangan dan derajat perbedaan konsentrasi yang kecil antara larutan di dalam dan di luar sel dilakukan pengadukan (Baraja, 2008).

Syarat pemilihan jenis pelarut yaitu tidak berbahaya atau beracun, mempunyai daya larut yang tinggi, dan titik didih kedua bahan tidak boleh terlalu dekat (Bernasconi, dkk., 1995). Penelitian ini umumnya menggunakan metode ekstraksi maserasi pelarut etanol. Penelitian Paramapojn dan Wandee (2009) menunjukkan adanya kurkuminoid pada kunyit putih menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol yang mampu berperan sebagai antiradikal bebas. Penelitian Oktaviani (2010) menunjukkan ekstraksi temulawak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% menunjukkan kadar kurkuminoid sebesar 0,422%.

2.4.2 Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair atau partisi merupakan metode ekstraksi yang didasarkan pada sifat kelarutan komponen target dan distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagian larut pada fase kedua. Syarat pelarut untuk ekstraksi cair-cair adalah

memiliki kepolaran yang sesuai dengan bahan yang diekstraksi dan harus terpisah secara pengocokan yang ditandai dengan terbentuknya dua lapisan yang tidak saling campur (Khopkar, 2008). Dewi, dkk. (2010) menyatakan bahwa penggunaan ekstraksi cair-cair mempunyai beberapa kelebihan yaitu komponen bioaktif dapat diperoleh secara spesifik dan waktu yang secara singkat.

Penelitian Nurcholis, dkk. (2015) menunjukkan kurkuminoid diperoleh dengan ekstraksi secara bertahap menggunakan ekstraksi cair-cair dengan pelarut *n*-heksana menggunakan perbandingan 1:1. Penelitian Sari, dkk. (2013) menunjukkan kadar total kurkuminoid lebih besar yaitu sebesar 22,14%, sedangkan tanpa defatisasi sebesar 14,29% dengan menggunakan pelarut *n*-heksana untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Penelitian Rismayani, dkk. (2016) menunjukkan bahwa kurkuminoid dapat diperoleh menggunakan metode maserasi 96% kemudian difraksinasi bertingkat menggunakan pelarut air dan kloroform.

2.4.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi planar yang mempunyai lapisan seragam dengan penyerap berukuran kecil disebut Kromatografi Lapis Tipis. Penyerap tersebut merupakan fase diam dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Ukuran penyerap yang semakin kecil menunjukkan kinerja KLT yang semakin baik dengan ditunjukkan hasil resolusinya. Silika gel dan serbuk selulosa merupakan contoh penyerap yang menggunakan mekanisme adsorpsi dan partisi (Rohman, 2007).

Eluen (fase gerak) merupakan pelarut pengembang dengan kemurnian yang sangat tinggi untuk memaksimalkan pemisahan, sehingga akan

mempengaruhi daya elusi fase gerak (R_f) pada rentang 0,2-0,8. Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan radiasi UV, fluoresensi atau pereaksi warna. Bercak yang terbentuk merupakan penentuan komponen yang akan ditentukan (Rohman, 2007). Variasi eluen pada berbagai sampel ditampilkan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Variasi eluen pada berbagai sampel

Sampel	Eluen	Hasil (R_f)	Referensi
Kunyit putih pelarut <i>n</i> -heksana	Diklorometana : Metanol (95:5)	0,6-0,80	Paramapojn dan Wandee (2009)
Kunyit kuning pelarut metanol	Kloroform : <i>N</i> - Heksana : Metanol (1:1:0,1)	0,3-0,8	Phattanawasin, P., dkk. (2009)
Kunyit kuning pelarut Heksana, Kloroform, Etil asetat, Metanol, dan Aseton	Kloroform : Metanol (95:5)	Kurkumin:0.75; Demetoksikurkumin: 0.55; Bisdemetoksikurkumin: 0.27	Revathy, dkk. (2011)
Kunir asam pelarut aseton	Kloroform: Etanol: Asam asetat glasial (94:5:1)	Kurkumin: 0,51; Demetoksikurkumin: 0,36; Bisdemetoksikurkumin: 0,25	Yusuf dan Nurkhasanah (2015)
Kunyit pelarut petroleum eter	Kloroform : Etanol (98:2)	Kurkumin: 0,37; Demetoksikurkumin: 0,15; Bisdemetoksikurkumin: 0,1	Ati, dkk. (2006)

Variasi eluen yang digunakan pada berbagai sampel untuk isolasi kurkuminoid pada KLT cenderung bersifat non plar. Penelitian Ati, dkk. (2006) isolasi kurkuminoid menggunakan pelarut aseton dan etanol dengan perbandingan (3:7) menunjukkan adanya kurkuminoid. Hasil nilai R_f pada isolat kurkumin sebesar 0,29-0,37 yang ditandai dengan warna kuning, bisdemethoxycurcumin

0,09-0,10 yang ditandai dengan warna kuning kecoklatan, demethoxycurcumin 0,11-0,15 yang ditandai dengan warna kuning muda.

2.5 Uji Fitokimia Kurkuminoid

Uji fitokimia merupakan uji senyawa aktif dalam tumbuhan. Senyawa aktif yang terkandung dalam tumbuhan dapat dalam bentuk metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, dan lain-lain. Penelitian Rinanto, dkk. (2009) uji kurkuminoid menggunakan reaksi warna dengan penambahan NaOH 5% dan pereaksi asam sulfat: alkohol 95% (1:1) menunjukkan adanya kurkuminoid yang ditandai dengan warna merah dan merah jingga. Penelitian Rismayani, dkk. (2016) menunjukkan adanya kurkuminoid menggunakan pereaksi asam HCl dan pereaksi basa boraks didapatkan warna kuning dan merah kecoklatan.

2.6 Identifikasi Kurkuminoid pada Rimpang Kunyit Putih menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR

2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah suatu alat atau instrumen untuk mengukur transmisi atau absorben dengan prinsip interaksi antara sinar UV atau visible, sehingga terjadi transisi tingkat elektronik suatu molekul antara orbital ikatan (*bonding*) dengan orbital non ikatan (*anti bonding*) yang dapat diukur dengan energi yang merambat berupa panjang gelombang dengan satuan nanometer (nm) (Panji, 2012). Penelitian Revathy, dkk. (2011) identifikasi kurkuminoid pada kunyit menggunakan panjang gelombang 420 nm menunjukkan adanya kurkumin, demetoksikurkumin, dan bisdemetoksikurkumin. Penelitian Ati, dkk. (2006) menunjukkan bahwa kurkuminoid mempunyai panjang

gelombang maksimum masing-masing 426 nm pada kurkumin, 424 nm pada demetoksikurkumin, dan 416 nm pada bisdemetoksikurkumin.

2.6.2 Spektrofotometer FTIR

Instrumen yang digunakan untuk identifikasi gugus fungsi suatu senyawa yaitu Spektrofotometer FTIR. Prinsip identifikasi gugus fungsi pada Spektrofotometer FTIR berdasarkan perbedaan momen dipol. Momen dipol yang berbeda dapat bervibrasi dan terbaca oleh sinar FTIR pada suatu molekul (Rohman, 2007). Penelitian Phaechamud dan Sonataphun (2010) menunjukkan gugus C=O *stretching* dan O-H pada daerah 1637 dan 3518 cm^{-1} . Penelitian Mallik, dkk. (2011) menunjukkan adanya gugus O-H pada daerah serapan 3491 cm^{-1} dan gugus C=O pada daerah 1759 cm^{-1} yang merupakan penyusun struktur senyawa kurkumin. Hasil Penelitian Kharkwal, dkk. (2012) menunjukkan penyusun struktur senyawa kurkuminoid pada gugus fungsi fenol O-H, C=O dan aromatik C=C ditunjukkan pada daerah 3500-3300 cm^{-1} , 1625-1640 cm^{-1} dan 1520-1400 cm^{-1} .

2.7 Sel Kanker Payudara

Sel-sel kultur yang sering digunakan dalam penelitian adalah sel hela dan raji, sel kanker payudara MCF-7 dan T47D, sel kanker kolon, sel kanker leher rahim (serviks) dan sel vero (sel normal dari kera) (Dwi, 2015). Sel T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berumur 54 tahun. Alasan penggunaan sel T47D atau *continuous cell line* karena homogenitas yang tinggi, penanganan yang mudah, mempunyai

replikasi yang tidak terbatas, dan sel ini mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall, dkk., 2003).

Perbedaan antara sel kanker payudara T47D dan MCF-7 terdapat pada karakteristik reseptor. MCF-7 mengekspresikan reseptor estrogen alfa, caspase-3 dan resisten terhadap doxorubin, sedangkan T47D mempunyai sensitifitas yang tinggi terhadap doxorubin serta memiliki karakteristik mutasi gen p53 yang berfungsi dalam peristiwa apoptosis (Aka dan Lin, 2012). Penelitian ini menggunakan media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 serum yang berfungsi untuk memberikan nutrisi pada sel sehingga mampu bertahan hidup bahkan berkembang biak. Media RPMI mengandung garam-garam anorganik, glukosa, vitamin dan asam amino (Amalina, 2008).

2.8 Sel Vero

Sel yang digunakan untuk perbandingan aktivitas antikanker yaitu sel vero. Sel vero merupakan sel monolayer yang didapatkan dari sel ginjal monyet hijau Afrika. Sel vero memiliki jumlah interferon lebih sedikit dibandingkan sel mamalia normal dan berbentuk poligonal dan pipih. Sel vero merupakan tipe sel *immortal* (mampu bertahan hidup) yang bersifat mudah menempel sangat kuat pada substrat berbahan polistirena dengan membentuk ikatan kovalen dan tidak memiliki kemampuan untuk mensekresikan interferon tipe 1 ketika diinfeksi oleh virus. Interferon pada sel vero memiliki kekurangan yaitu sel ini sangat sensitif jika terinfeksi oleh berbagai jenis virus (Goncalves, dkk., 2006).

Interferon sel vero memiliki kemampuan terhadap reseptor interferon alfa dan beta, sehingga mampu merespon secara normal ketika interferon dari sumber

lain ditambahkan ke dalam kultur sel. Sel vero berfungsi mempelajari sitotoksitas, pertumbuhan, diferensiasi, dan transformasi sel yang diinduksi berbagai senyawa bahan kimia. Sel vero juga berfungsi sebagai sel model dalam mempelajari karsinogenesis secara *in vitro*. Adanya sel vero memudahkan dalam mempelajari perubahan sel yang meliputi pertumbuhan dan morfologinya akibat induksi berbagai senyawa kimia (Goncalves, dkk., 2006).

2.9 Analisis dengan *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Reader*

Analisis dengan *enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) reader* merupakan instrumen yang menggunakan sumber cahaya polikromatis dengan prinsip kolorimetri yaitu tercapainya keseimbangan antara besaran warna antara larutan sampel dengan larutan standar. Metode ini berfungsi menentukan komponen zat warna atau komponen yang belum berwarna, tetapi menggunakan pewarna reagen yang sesuai. Metode ini menggunakan reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) yang berwarna ungu (Pamilih, 2009).

Output data yang dihasilkan berbanding lurus dengan kehidupan sel atau jumlah sel yang aktif dalam melakukan metabolisme, sehingga nilai absorbansi yang didapatkan dari ELISA *reader* mampu mengetahui potensi sampel dalam menghambat kanker karena semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup (Meiyanto, 1999). Hasil ELISA *reader* dengan pengukuran y mempunyai prinsip sama dengan spektrofotometer. Pengukuran nilai y yang dihasilkan dari penyerapan intensitas cahaya terhadap sampel pada panjang gelombang tertentu akan berbanding lurus, sehingga semakin besar nilai y

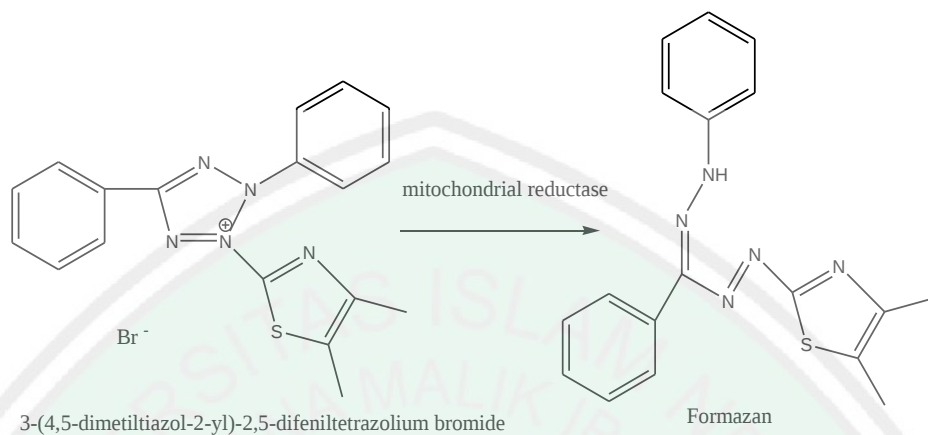
menunjukkan semakin banyak intensitas cahaya yang diserap (Crowther, 2001).

2.10 Metode MTT (*Microculture Tetrazolium*)

Metode *Microculture Tetrazolium* (MTT) adalah uji antikanker secara *in vitro* yang memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, dan tidak menggunakan radioisotop dan bertujuan untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur jaringan. Penggunaan MTT pada sel hidup bereaksi mereduksi garam 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (larutan MTT) yang berwarna kuning dan larut menjadi endapan formazan yang tidak dapat larut dan berwarna biru ungu. Reduksi garam tetrazolium terjadi antara intra sel dengan melibatkan enzim dari retikulum endoplasma dan mitokondria sehingga jumlah sel yang didapatkan dapat diukur dengan spektrofotometer sebagai konsentrasi hasil produk MTT (Siregar, dkk., 2007).

Prinsip uji MTT adalah pengukuran aktivitas seluler berdasarkan kemampuan enzim mitokondria reduktase pada mitokondria dalam mereduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide) oleh sistem reduktase. Kristal formazan yang tidak larut air dan berwarna ungu yang menunjukkan sel hidup dibentuk dalam mitokondria sel-sel oleh suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi. Reagen *stopper* (bersifat detergenik) ditambahkan dan kristal berwarna akan larut kemudian pengukuran absorbansi menggunakan ELISA reader. Jumlah sel hidup berbanding lurus dengan terbentuknya intensitas warna ungu (CCRC, 2012).

Reaksi pengubahan reagen MTT menjadi kristal formazan ditampilkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Reaksi reduksi MTT (Mosmann, 2000)

Penelitian Da'I, dkk. (2007) menunjukkan senyawa analog kurkumin pentagamavunon-0 (PGV-0) dan pentagamavunon-1 (PGV-1). Kurkumin dan senyawa analog PGV-0 dan PGV-1 pada kunyit mampu menghambat sel kanker payudara T47D dengan pengamatan pertumbuhan sel menggunakan metode MTT. Hasil yang didapatkan, apoptosis melalui aktivasi caspase-3 mampu diinduksi oleh PGV-1 sebesar 2,5 μM menunjukkan aktivitas paling kuat dalam menghambat pertumbuhan sel.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Agustus 2017 di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Riset Analitik, Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang Fakultas Sains dan Teknologi, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Umum Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan penelitian ini adalah gunting, blender, ayakan 80 mesh, oven, loyang digunakan untuk preparasi sampel. Uji kadar air menggunakan cawan penguap, desikator, neraca analitik (*kenko*), penjepit kayu, gelas arloji. Ekstraksi maserasi menggunakan erlenmeyer 500 mL (*iwaki*), *aluminium foil*, *shaker incubator*, gelas ukur 100 mL, *beaker glass* 100 mL, kertas saring, klem dan statif, pengaduk gelas, corong *Buchner*, *rotary evaporator*, botol vial. Uji fitokimia dan partisi menggunakan corong pisah, pipet ukur 10 mL, bola hisap, spatula, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, vortex, pipet ukur 5 mL, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil. Uji aktivitas menggunakan 96-well plate, *Conical Tube*, *Yellow tip*, *Blue tip*, *Culture Dish*, *Hemacytometer*, inkubator CO₂, *ELISA reader*, mikropipet 200 dan 1000 μ L. Uji KLT Analitik dan Preparatif menggunakan plat silika gel F₂₅₄, bejana pengembang. Pendeteksi noda

menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm. Identifikasi senyawa kurkuminoid menggunakan instrumen UV-Vis dan FTIR.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan penelitian ini adalah rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Berg) yang diperoleh dari Desa Banjarrejo Kecamatan Pakis Kabupaten Malang. Etanol 96%, *n*-heksana, aquades untuk bahan ekstraksi maserasi dan partisi. NaOH 5% sebagai bahan uji fitokimia. Diklorometana *p.a*, kloroform *p.a*, metanol *p.a*, etanol *p.a*, dan asam asetat *p.a* sebagai eluen KLT Analitik dan Preparatif. Media kultur *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI), media M199, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), *Phospat Buffered Saline* (PBS), *Tripsin-EDTA* 1x (tripsin 0,25%), MTT 5 mg/mL (50 mg MTT dan 10 mL PBS), *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam 0,1 M HCl, sel vero dan sel kanker payudara T47D sebagai uji aktivitas.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Preparasi sampel.
2. Analisis kadar air sampel kering.
3. Ekstraksi kurkuminoid pada tanaman kunyit putih dengan metode maserasi dan ekstraksi cair-cair.
4. Uji kualitatif ekstrak kurkuminoid dengan reagen.
5. Pemisahan kurkuminoid dengan KLTA dan KLTP.

6. Uji aktivitas antikanker fraksi etanol (ekstrak kasar) dan isolat kurkuminoid hasil KLTP terhadap sel T47D dan sel vero.
7. Identifikasi isolat kurkuminoid menggunakan instrument UV-Vis dan FTIR.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel

Sampel rimpang kunyit putih $\pm 1,5$ kg diambil, dicuci hingga bersih, dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan. Sampel dikeringkan dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 60°C selama ± 5 jam. Kemudian menghaluskan sampel yang sudah kering menggunakan dengan blender hingga halus (serbuk) dan diayak dengan ukuran 60 mesh agar terbentuk serbuk yang seragam. Serbuk yang diperoleh merupakan sampel penelitian yang kemudian ditentukan kadar airnya (Dwi, 2015; Cahyono, dkk., 2011).

3.4.2 Analisis Kadar Air

Uji kadar air dilakukan menggunakan metode penguapan untuk menguapkan air yang terdapat dalam sampel. Langkah awal metode penguapan yaitu cawan dipanaskan pada suhu 105°C selama ± 15 menit, kemudian didinginkan dalam desikator selama 10 menit dan cawan ditimbang, perlakuan diulangi hingga diperoleh berat konstan. Setelah didapatkan berat konstan pada cawan, sampel ditimbang sebanyak 5 g dan dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam untuk menguapkan air yang terkandung pada sampel. Sampel yang telah dipanaskan kemudian didinginkan dalam desikator selama ± 15 menit dan ditimbang kembali, perlakuan diulangi hingga berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan Persamaan 3.1 (Dwi, 2015).

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-a)}{(b-c)} \times 100\% \dots\dots\dots(3.1)$$

Dengan *a* adalah berat konstan cawan kosong; *b* adalah berat cawan + sampel sebelum dikeringkan; *c* adalah berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan.

3.4.3 Ekstraksi Senyawa Kurkuminoid Rimpang Kunyit Putih menggunakan Maserasi

Serbuk rimpang kunyit putih ditimbang sebanyak 80 gram, lalu dimasukkan dalam 3 Erlenmeyer 500 mL yang berbeda. Hasil penimbangan diekstraksi dengan menggunakan 200 mL pelarut etanol 96%, tiap erlenmeyer selama 24 jam pada suhu kamar. Pengadukan dengan bantuan *shaker* berkecepatan 100 rpm selama 4 jam, kemudian disaring dengan corong *buchner* dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama sebanyak 3 kali pengulangan sampai filtrat berwarna bening agar senyawa organik dapat terekstrak secara sempurna. Filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum* untuk menghilangkan pelarut dalam ekstrak dengan suhu 50°C (Hardiyanti, 2015; Ramdja, dkk., 2009; Firdaus, 2016; Cahyono, dkk., 2011).

Ekstrak etanol dipartisi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan *n*-heksana dengan perbandingan 1:1 (3x25 mL) dengan corong pisah, didiamkan beberapa saat sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan fraksi *n*-heksana (atas) dipisahkan dan fraksi etanol (bawah) yang diduga mengandung senyawa kurkuminoid dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum* pada suhu 50°C. Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana dan fraksi etanol (ekstrak kasar) diuji kualitatif kurkuminoid menggunakan reagen. Fraksi etanol kemudian ditimbang dan dibagi

menjadi 2 bagian, yaitu untuk sampel uji dan sampel pemurnian. Fraksi etanol dapat dihitung randemennya menggunakan Persamaan 3.2.

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.2)$$

Fraksi etanol yang digunakan sebagai sampel uji, disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C agar ekstrak tidak menjadi rusak. Kemudian fraksi etanol (ekstrak kasar kurkuminoid) diuji aktivitas antikanker secara *in vitro* dengan menggunakan sel kanker T47D.

3.4.4 Uji Kualitatif Ekstrak Kurkuminoid dengan Reagen

Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana dan fraksi etanol (ekstrak kasar) dibuat larutan 10.000 ppm. Filtrat ekstrak etanol hasil maserasi dan partisi masing-masing dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi yang berbeda sebanyak 0,5 mL. Ekstrak hasil maserasi pada tabung pertama, fraksi *n*-heksana pada tabung kedua dan ekstrak kasar kurkuminoid pada tabung ketiga direaksikan dengan 2-3 tetes NaOH 5%. Jika ekstrak mengandung senyawa kurkuminoid akan menghasilkan warna merah (Rinanto, dkk., 2009).

3.4.5 Pemisahan Senyawa Kurkuminoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

3.4.5.1 Pemisahan Senyawa Kurkuminoid dengan KLT Analitik (KLTA)

1. Persiapan Plat KLT

Plat KLT yang digunakan adalah plat silika G₆₀ F₂₅₄ sebagai fase diamnya dengan ukuran 1 x 10 cm. Kemudian tepi atas bawah plat diberi penanda garis dengan jarak 1 cm sebagai posisi penotolan sampel, dan tepi atas plat untuk

menunjukkan batas dari proses elusi. Plat silika diaktivasi dengan cara di oven pada suhu 100°C selama 30 menit (Dwi, 2015; Firdaus, 2016).

2. Persiapan Fase Gerak (Eluen)

Bejana (*great chamber*) ditambahkan masing-masing eluen dengan dilakukan penjenjutan selama 1 jam dalam keadaan tertutup rapat. Beberapa daftar eluen (fase gerak) yang digunakan untuk pemisahan senyawa kurkuminoid ditampilkan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Daftar fase gerak

No.	Fase gerak (eluen)	Referensi
1.	Kloroform : Etanol (98:2)	Ati, dkk. (2006)
2.	Diklorometana : Metanol (95:5)	Paramapojn dan Wandee (2009)
3.	Kloroform : <i>N</i> -Heksana : Metanol (1:1:0,1)	Phattanawasin, dkk. (2009)
4.	Kloroform : Metanol (95:5)	Revathy, dkk. (2011)
5.	Kloroform: Etanol: Asam asetat glasial (94:5:1)	Yusuf, dkk. (2015)

3. Penotolan Sampel

Ekstrak pekat fraksi etanol (ekstrak kasar) dibuat larutan 10.000 ppm. Larutan fraksi etanol ditotolkan pada plat KLT dengan jarak 1 cm dari tepi bawah plat. Larutan ekstrak ditotolkan menggunakan pipa kapiler sebanyak 10 kali penotolan pada tempat yang sama, kemudian dikeringanginkan.

4. Proses Elusi

Plat KLT yang telah ditotolkan ekstrak dilakukan elusi pada masing-masing fase gerak. Fase gerak dalam *great chamber* yang telah jenuh dimasukkan Plat KLT. *Great chamber* ditutup hingga larutan pengembang (eluen) mencapai batas 1 cm dari tepi atas plat. Plat KLT diangkat dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

5. Identifikasi Noda

Noda-noda yang terbentuk pada plat silika diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Noda yang tampak ditandai dengan pensil. Jika terbentuk warna kuning atau kuning pekat, maka isolat tersebut positif kurkuminoid (Yusuf, dkk., 2015; Azizah, dkk., 2013; Cahyono, dkk., 2011). Kemudian noda yang terbentuk masing-masing diukur jarak tempuhnya, kemudian dihitung nilai R_f dan resolusinya dengan menggunakan Persamaan 3.3 (Wonorahardjo, 2013).

$$R_s \text{ (Resolusi)} = \frac{d}{(w_1 + w_2) \sqrt{2}} \dots\dots\dots (3.3)$$

Dengan d adalah jarak antar noda; w_1 dan w_2 adalah lebar tiap noda yang dihitung jarak antar noda. Eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik dengan nilai resolusi $> 1,25$ selanjutnya digunakan untuk keperluan preparatif.

3.4.5.2 Pemisahan Senyawa Kurkuminoid dengan KLT Preparatif (KLTP)

Pemisahan pada plat KLTP menggunakan plat silika G₆₀ F₂₅₄ dengan ukuran 10 x 20 cm. Ekstrak kurkuminoid dibuat 10.000 ppm dan ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah menggunakan pipa kapiler sebanyak 10 kali penotolan, selanjutnya dielusi menggunakan eluen pemisahan terbaik pada plat KLTA. Noda yang berbentuk pita dihitung R_f -nya dan dibandingkan dengan R_f hasil KLTA. Spot yang terbentuk pada permukaan plat disinari dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya (Firdaus, 2016).

Bercak noda yang dihasilkan pada plat KLT dihitung nilai R_f -nya, kemudian dikerok dan dilarutkan dalam etanol, selanjutnya disentrifugasi untuk

mengendapkan silikanya, dilarutkan sampai plat silika berwarna putih. Supernatan yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan didiamkan dalam suhu kamar. Isolat kurkuminoid yang diperoleh, diuji aktivitasnya terhadap sel kanker payudara T47D (Firdaus, 2016).

3.4.6 Uji Aktivitas Antikanker menggunakan Metode *Microculture Tetrazolium* (MTT)

3.4.6.1 Penyiapan Sel Kanker dan Sel Vero

Sel kanker payudara T47D dan sel vero diambil dari koleksi Universitas Gadjah Mada (UGM). Sel kanker dikeluarkan dari lemari pendingin (-80°C), dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 2-3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan ke dalam *culture dish* yang telah berisi 10 mL media RPMI dan diinkubasi 3-4 jam pada suhu 37°C / 5% CO_2 , kemudian disentrifugasi untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan media RPMI. Pelet yang terbentuk diamati dibawah mikroskop untuk melihat apabila sel melekat di dasar *culture dish* dan bila jumlah sel di dalam *culture dish* mencapai 70-85% (konfluen), dilakukan panen sel (CRCC, 2009; Ilhami, dkk., 2013).

Tahapan panen sel yakni, dicuci sel 2 kali dengan PBS, ditambahkan tripsin-EDTA secara merata dan diinkubasi selama 3 menit, ditambahkan media RPMI 5 mL untuk menginaktifkan sel serta dilakukan resuspensi, diamati dibawah mikroskop *inverted*, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO_2 selama 24 jam. Tahapan penyiapan sel juga dilakukan terhadap sel vero dengan perlakuan yang sama tetapi menggunakan media M199.

3.4.6.2 Perhitungan Sel Kanker dan Sel Vero

Panen sel diambil 10 μ L dan dipipetkan ke hemacytometer. Diamati dan dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel kanker dan sel vero dapat diketahui dengan Persamaan 3.4.

$$\Sigma \text{ sel yang dihitung} = \frac{\Sigma A + \Sigma B + \Sigma C + \Sigma D}{4} \times 10^4 \dots\dots\dots (3.4)$$

Dengan A adalah sel kamar A; B = sel kamar B; C adalah sel kamar C dan D adalah sel kamar D.

3.4.6.3 Peletakan Sel pada Plate

Peletakan sel pada *plate* harus diketahui berapa jumlah mL panen sel yang akan diletakkan pada setiap sumuran. Sel diletakkan dan ditambahkan media RPMI sesuai perhitungan ke dalam *plate* 96-well. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator CO₂, akan tetapi 12 sumuran bagian bawah disisakan untuk kontrol sel dan kontrol media. Perhitungan jumlah mL panen sel menggunakan Persamaan 3.5.

$$\Sigma \text{ panen mL panen sel yang ditransfer} = \frac{\Sigma \text{ total sel yang diperlukan}}{\Sigma \text{ sel terhitung /mL}} \dots\dots\dots (3.5)$$

3.4.6.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada Plate 96-well

Sampel ekstrak kasar kurkuminoid dan isolat kurkuminoid yaitu kurkumin, bisdemetoksikurkumin, dan demetoksikurkumin ditimbang masing-masing sebanyak 10 mg dalam wadah yang berbeda. Sampel dilarutkan masing-masing dalam 100 μ L DMSO dan diaduk dengan vortex agar lebih cepat dalam melarutkan sampel, diambil sel dari inkubator. Media sel dibuang dengan cara

dibalikkan *plate* 180° di atas tempat pembuangan dan ditekan secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan. PBS sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu dimasukkan larutan sampel sebanyak 100 µL dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 ppm dan diulang sebanyak 3 kali (triplo), kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam.

3.4.6.5 Pemberian Larutan MTT

Media sel dibuang dan dicuci dengan PBS, ditambahkan larutan MTT 100 µL ke setiap sumuran kecuali kontrol sel. Inkubasi kembali selama 3-4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Apabila formazan telah terbentuk, diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*, lalu ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCl, dibungkus *plate* dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) selama 24 jam. Langkah selanjutnya yaitu pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA *reader* untuk mengetahui nilai IC₅₀ setiap ekstrak menggunakan panjang gelombang 550 nm. Data dari persentase sel hidup kemudian dianalisis untuk mengetahui nilai IC₅₀ dengan *regression probit* SPSS. Absorbansi yang didapatkan dihitung persentase sel hidup dengan Persamaan 3.6:

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100\% \dots \dots \dots (3.6)$$

Dengan A adalah absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel); B adalah absorbansi kontrol media (media kultur) dan C adalah absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur).

3.4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif

3.4.7.1 Identifikasi Kurkuminoid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi kurkuminoid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang maksimum pada isolat kurkuminoid. Isolat kurkuminoid (isolat 1, 2 dan 5) hasil KLTP dilarutkan dengan metanol *p.a*, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm. Spektra dan hasil absorbansi yang diperoleh dicatat dan dianalisis.

3.4.7.2 Identifikasi Kurkuminoid dengan Spektrofotometer Fourier Transform Infrared (FTIR)

Gugus fungsi kurkuminoid dikarakterisasi dengan spektroskopi FTIR dengan pelet KBr. Sampel isolat kurkuminoid sebanyak 2 mg dicampur dengan 100 mg serbuk kering KBr dan ditumbuk hingga halus. Campuran tersebut dibuat lempengan tipis (pelet). Karakterisasi terhadap kepingan sampel dilakukan pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

3.5 Analisis Data

Potensi ekstrak dalam menghambat atau membunuh sel kanker payudara T47D dapat diketahui dengan melakukan uji IC_{50} , menggunakan analisa *regression probit* SPSS dengan kepercayaan 95% untuk masing-masing konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Penggunaan data absorbansi yang diperoleh dari pengukuran, dapat ditentukan persentase sel yang hidup dengan menggunakan persamaan 3.5 serta nilai maksimum sebesar 100. Selanjutnya, dilakukan analisa *regression probit* serta persentase sel hidup dengan

nilai maksimum sebesar 100 sehingga diperoleh nilai IC_{50} tiap ekstrak (Dwi, 2015).

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan data yang terinput merupakan data hubungan antara konsentrasi dengan persentase sel hidup, kemudian dibuat grafik dengan *chart type scatter* serta nilai maksimum sebesar 100. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier dengan menggunakan *add trendline-regresi linier*. $Y = 50\%$ dimasukkan pada persamaan regresi linier dan cari x nya sehingga diperoleh nilai IC_{50} . Data yang dihasilkan dimasukkan dalam tabel data sesuai pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Tabel data

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Sampel			Rata- rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan tahap penyerbukan sampel dengan prinsip pembersihan, pengeringan, dan penghalusan sampel dengan tujuan mempermudah kontak antara sampel dengan pelarut ketika proses ekstraksi berlangsung. Pengeringan pada suhu 60°C berfungsi untuk meratakan kadar kurkuminoid. Penelitian Cahyono, dkk. (2011) menggunakan pengeringan suhu 60°C mampu memecah oleoresin dan kurkuminoid menjadi lebih rata dalam rimpang. Menurut Bakar, dkk. (2006) oleoresin merupakan campuran minyak dan resin yang berasal dari rimpang dan dapat dihasilkan melalui ekstraksi. Tahap penghalusan sampel berfungsi untuk menyeragamkan ukuran sampel karena semakin kecil ukuran sampel, maka semakin besar luas permukaannya. Hasil yang diperoleh berupa serbuk berwarna kuning muda.

4.2 Kadar Air

Penentuan kadar air pada serbuk bertujuan untuk mengetahui kandungan air pada sampel. Hasil uji kadar air pada serbuk rimpang kunyit putih sebesar 2,5%. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 menyatakan bahwa kadar air yang baik untuk mutu obat tradisional tidak melebihi 10%. Hutabarat (2010) menyatakan bahwa kadar air yang melebihi 10% akan mempermudah tumbuhnya mikroorganisme dan mempengaruhi pelarut dalam mengekstrak suatu sampel.

4.3 Ekstraksi Kurkuminoid dengan Metode Maserasi dan Partisi

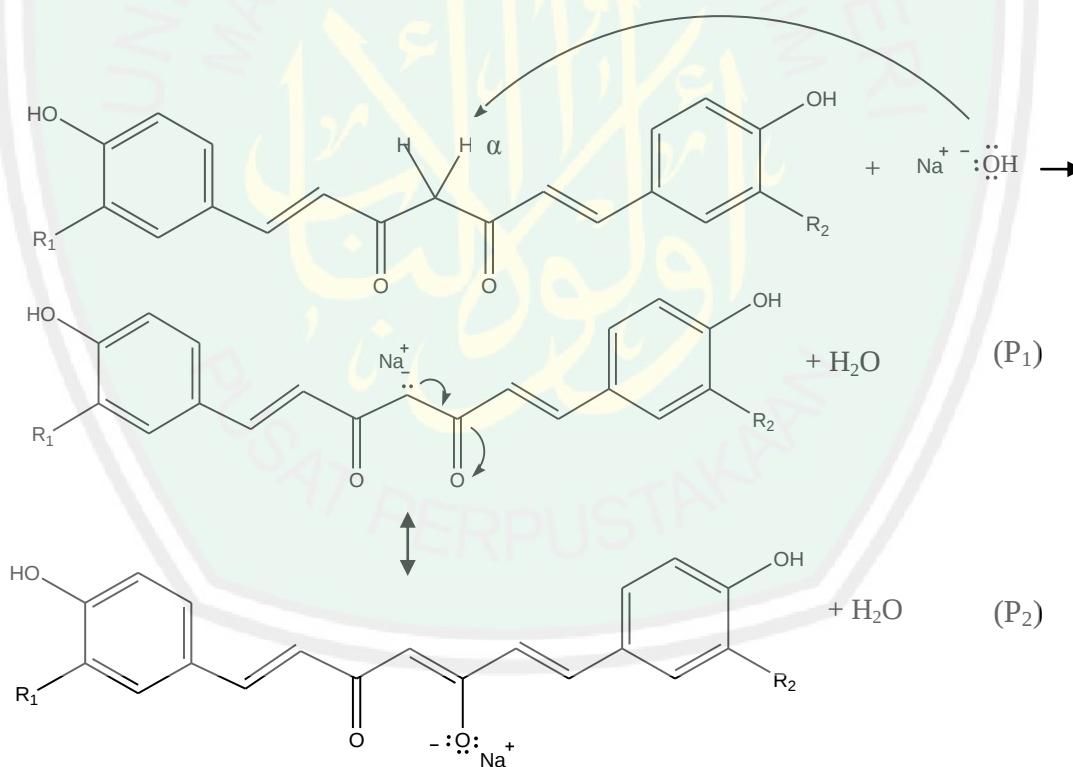
Metode ekstraksi senyawa yang digunakan yaitu metode maserasi dan partisi. Ekstraksi maserasi dilakukan tanpa pemanasan dan dilakukan pengulangan. Wonorahardjo (2013) menyatakan bahwa hukum distribusi ekstraksi dengan n kali pengulangan lebih efektif daripada ekstraksi tunggal dengan total volume yang sama. Serbuk rimpang kunyit putih direndam dengan etanol dan pengadukan selama 4 jam dengan kecepatan 100 rpm. Penelitian Ramdja, dkk. (2009) menyatakan bahwa pengadukan dan kecepatan yang semakin tinggi akan memperoleh senyawa kurkuminoid yang semakin banyak. Hasil maserasi diperoleh perubahan warna filtrat dari putih kekuningan menjadi coklat kemerahan. Berat ekstrak kasar 15,65 gram dan berat ekstrak pekat 13,2 gram. Hasil randemen ekstrak pekat sebesar 22% (*b/b*).

Ekstrak etanol yang diduga mengandung senyawa kurkuminoid dipartisi menggunakan *n*-heksana agar didapatkan ekstrak kasar kurkuminoid. Penggunaan *n*-heksana berfungsi untuk menghilangkan senyawa yang bersifat non polar dan memisahkan resin yang terkandung dalam sampel. Sifat kurkuminoid tidak larut pada pelarut non polar. Penelitian Cahyono, dkk. (2011); Azizah dan Salamah (2013) menunjukkan bahwa penggunaan *n*-heksana mampu menghilangkan lemak, memisahkan resin dan terpenoid. Hasil partisi terbentuk 2 lapisan yaitu atas (fraksi *n*-heksana) dan bawah (fraksi etanol). Partisi menggunakan *n*-heksana diambil fraksi etanol dan dipekatkan. Hasil partisi fraksi etanol yang diduga ekstrak kasar kurkuminoid didapatkan warna filtrat kuning kecoklatan dan ekstrak pekat berwarna coklat kemerahan, sehingga didapatkan rendemen sebesar 9,505% (*b/b*).

4.4 Uji Fitokimia Ekstrak Kunyit Putih dengan Reagen NaOH 5%

Uji fitokimia kurkuminoid dilakukan penambahan NaOH 5%.

Penambahan larutan NaOH ini digunakan untuk mengidentifikasi senyawa kurkuminoid yang mengandung gugus fenol. Rinanto, dkk. (2012) menyatakan bahwa hasil positif uji kurkuminoid setelah penambahan NaOH 5% adalah terbentuknya warna merah. Hasil uji fitokimia kurkuminoid pada ekstrak dan fraksi etanol didapatkan warna merah pekat, sedangkan pada fraksi *n*-heksana tidak mengandung senyawa kurkuminoid. Dugaan reaksi yang terjadi ditampilkan pada Gambar 4.1 (Lee, dkk. 2013).



Gambar 4.1 Reaksi kurkuminoid dengan NaOH. Senyawa Kurkumin (1) R₁ O CH₃ dan R₂ O CH₃; Demetoksikurkumin (2) R₁ H dan R₂ O CH₃ dan Bisdemetoksikurkumin (3) R₁ H dan R₂ H. P₁ adalah senyawa kurkuminoid yang bermuatan akan beresonansi dan P₂ adalah hasil resonansi (Lee, dkk. 2013; Cahyono, dkk. 2011).

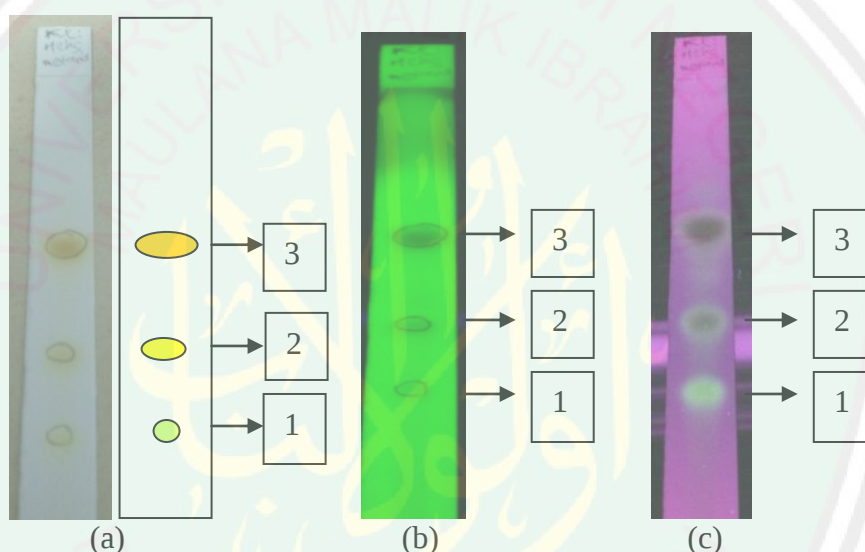
Mekanisme reaksi pada Gambar 4.1 yaitu OH^- yang terdapat pada NaOH menyerang $\text{H}\alpha$ pada senyawa kurkuminoid. Senyawa kurkuminoid mempunyai $\text{H}\alpha$ yang bersifat lebih asam. Sifat asam pada $\text{H}\alpha$ cenderung melepaskan ikatan karbon. Sifat asam pada $\text{H}\alpha$ senyawa kurkuminoid mempunyai kemampuan untuk mengubah bentuk anion kembali menjadi atom netral yang disebut kestabilan anion, sehingga senyawa kurkuminoid terbentuk karbanion dan PEB beresonansi dari P_1 menjadi P_2 sebagai hasil resonansi. OH^- berikatan dengan $\text{H}\alpha$ menjadi H_2O . Hasil resonansi yaitu gugus karbonil pada kurkuminoid menjadi ion enolat. Hasil ion enolat (O^-) terjadi interaksi yaitu ikatan ionik dengan Na^+ menjadi $\text{O}^- \text{Na}^+$. Lee, dkk. (2013) menyatakan bahwa kurkumin pada $\text{pH} > 8$ berbentuk enolat dan bertindak sebagai donor elektron. Kurkumin memiliki tiga proton ionik (H^+) yang disumbangkan oleh proton enolik pada pKa 8,5 dan dua gugus OH fenolik (pKa 10-10,5).

4.5 Pemisahan Kurkuminoid menggunakan KLT Analitik

Penggunaan KLT Analitik berfungsi untuk menentukan eluen terbaik yang akan digunakan untuk pemisahan suatu senyawa menggunakan KLT Preparatif. Pemisahan pada KLT Analitik menggunakan sampel ekstrak kasar kurkuminoid yang berasal dari fraksi etanol. Variasi eluen yang digunakan cenderung bersifat non polar. Hasil KLT Analitik pada berbagai variasi eluen ditampilkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data penampakan noda senyawa kurkuminoid hasil KLT Analitik ekstrak pekat kunyit putih pada beberapa variasi eluen

No.	Eluen	Jumlah noda	Nilai R_f	Keterangan
1.	kloroform: <i>n</i> -heksana : metanol (1:1:0,1)	3	0,67; 0,45; 0,3	Terpisah
2.	kloroform : etanol : asam asetat glasial (94:5:1)	3	0,92; 0,88; 0,8	Terpisah
3.	kloroform : metanol (95:5)	3	0,89; 0,7; 0,48	Terpisah (berekor)
4.	kloroform : etanol (98:2)	3	0,63; 0,37; 0,19	Terpisah (berekor)
5.	diklorometana : metanol (95:5)	3	0,9; 0,87; 0,75	Terpisah



Gambar 4.2 Hasil KLT Analitik fraksi etanol senyawa kurkuminoid dengan eluen kloroform: *n*-heksana: metanol (1:1:0,1). (a) Sinar tampak (b) UV 254 nm (c) UV 366 nm.

Tabel 4.2 dan hasil KLT Analitik yang ditampilkan pada Gambar 4.3 menunjukkan variasi pelarut kloroform: *n*-heksana: metanol (1:1:0,1) sebagai eluen dengan pemisahan kurkuminoid terbaik karena noda yang terbentuk tidak berekor dan menghasilkan resolusi yang lebih tinggi dibandingkan variasi eluen yang lain. Hasil nilai resolusi pada variasi tersebut berdasarkan jarak dan jumlah noda yang terbentuk sebesar 1,41 (Lampiran 4.4). Wonorahardjo (2013) menunjukkan bahwa nilai resolusi yang baik lebih dari 1,25. Penelitian Ati, dkk.

(2006) menunjukkan bercak noda berwarna kuning, kuning muda, dan kuning tua yang menunjukkan adanya senyawa kurkuminoid.

4.6 Pemisahan Senyawa Kurkuminoid menggunakan KLT Preparatif

Pemisahan pada KLT Preparatif menggunakan fraksi etanol dengan konsentrasi 15.000 ppm. Eluen yang digunakan pada KLT Preparatif menggunakan pemisahan terbaik pada KLT Analitik yaitu kloroform: *n*-heksana: metanol dengan perbandingan 1:1:0,1. Hasil pemisahan menggunakan KLT Preparatif dibawah sinar UV 254 dan 366 nm disajikan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil pemisahan KLT Preparatif senyawa kurkuminoid fraksi etanol rimpang kunyit putih dengan eluen kloroform: *n*-heksana: metanol (1:1:0,1)

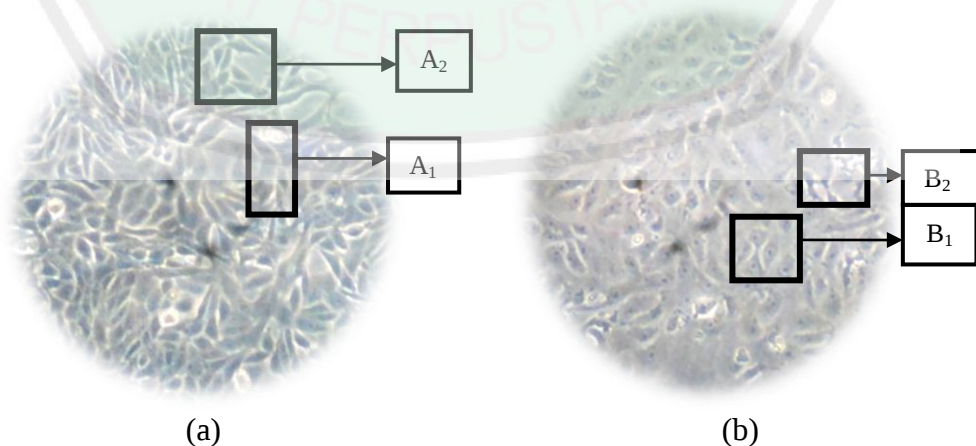
Noda	Nilai <i>R_f</i>	Warna noda dibawah lampu UV pada 254 nm	Warna noda dibawah lampu UV pada 366 nm	Simpulan
1	0,06	Hitam pudar	Kuning muda	Kurkuminoid
2	0,14	Hitam	Kuning	Kurkuminoid
3	0,17	-	Biru	Flavonoid
4	0,24	-	Biru muda	Flavonoid
5	0,37	Hitam	Kuning pekat	Kurkuminoid
6	0,45	Hitam pudar	Biru	Flavonoid

Berdasarkan Tabel 4.3, pemisahan senyawa kurkuminoid dari fraksi etanol menghasilkan 6 noda. Noda 1, 2 dan 5 mempunyai rentang warna kuning muda-kuning pekat pada UV 366 nm yang diduga senyawa kurkuminoid. Penelitian Azizah dan Salamah (2013), menunjukkan adanya senyawa kurkuminoid ekstrak etanol pada kunyit ditunjukkan adanya bercak noda berwarna kuning pada UV 366 nm. Noda 3, 4 dan 6 berwarna biru pada UV 366 nm. Latifah (2015), menyatakan bahwa identifikasi senyawa flavonoid menggunakan KLT pada

rimbang kencur menunjukkan adanya bercak berwarna biru pada UV 366 nm. Isolat 1, 2 dan 5 yang diduga mengandung kurkuminoid dilakukan uji aktivitas dan identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

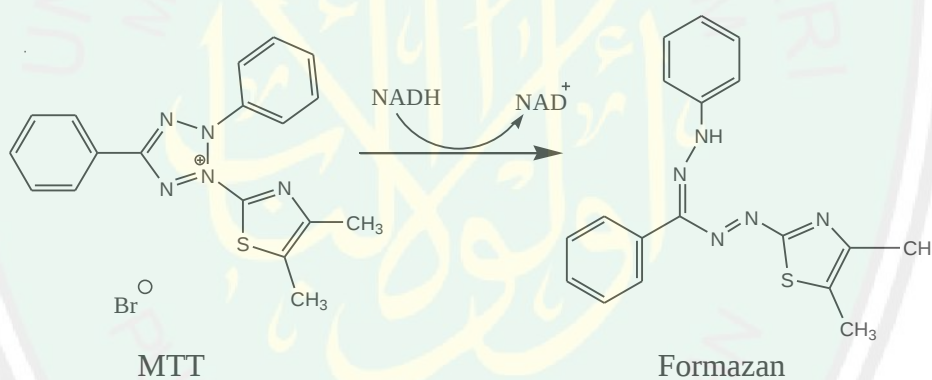
4.7 Uji Aktivitas Antikanker Metode MTT

Pengujian antikanker ini dilakukan untuk mengetahui potensi antara fraksi etanol (ekstrak kasar kurkuminoid) dengan isolat kurkuminoid dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dalam berbagai variasi konsentrasi yaitu 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Uji aktivitas ini dilakukan secara *in vitro* menggunakan sel kanker payudara T47D dan sel vero dengan metode MTT yang digunakan untuk menguji tingkat selektifitas. Sel kanker payudara T47D dan sel Vero dilakukan panen sel menggunakan media RPMI agar mencapai konfluenitas sel. Morfologi sel kanker payudara T47D dan sel vero ditampilkan Gambar 4.3 yaitu berbentuk memanjang, tebal, dan berbentuk poligonal, sedangkan sel vero berbentuk poligonal dan pipih (Goncalves, dkk. 2006).



Gambar 4.3 Morfologi (a) sel kanker payudara T47D (b) sel Vero. (Keterangan: A₁ adalah panjang dan tebal; A₂ adalah poligonal. B₁ adalah poligonal dan B₂ adalah pipih.

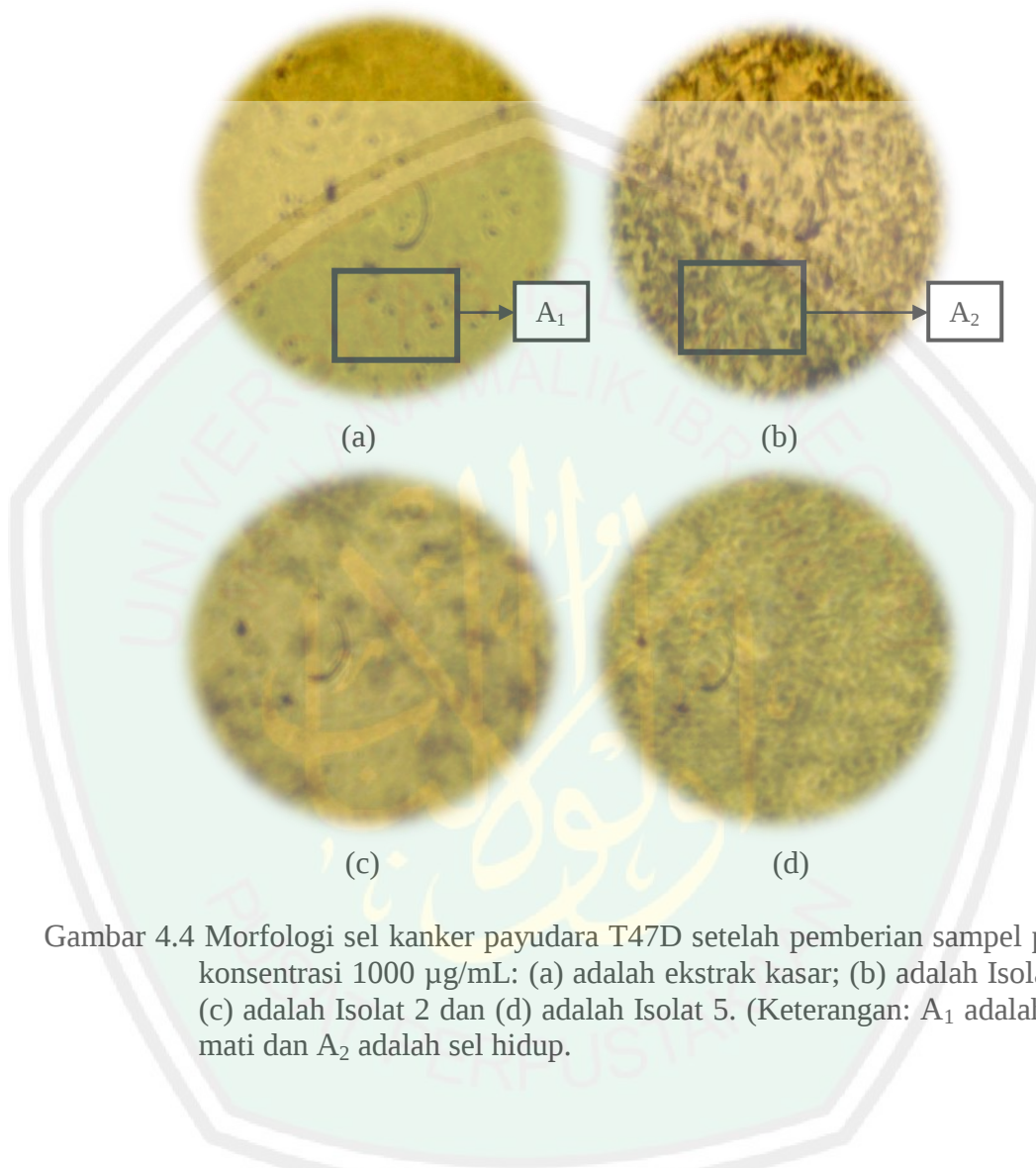
Frakasi etanol dan isolat 1, 2 dan 5 ditambahkan reagen MTT. Reaksi MTT menjadi formazan menggunakan enzim NADH dehidrogenase yang mendonorkan elektron dalam proses respirasi sel. Yim, dkk. (2005) menyatakan bahwa enzim NADH dehidrogenase sebagai pendonor elektron akan mudah melepas H^+ dan berikatan dengan tetrazolium yang menyebabkan pemutusan ikatan. Semakin banyak sel yang hidup semakin mudah membuka cincin tetrazolium dan mengubah bentuk menjadi formazan dengan ditunjukkan warna ungu yang lebih pekat. Reaksi MTT menjadi formazan ditampilkan pada Gambar 4.4 (Yim, dkk. 2005).



Gambar 4.4 Reaksi reduksi MTT (Yim, dkk., 2005)

Hasil uji pada sel kanker payudara T47D pada konsentrasi 1000 $\mu g/mL$ menghasilkan sel hidup yang sedikit. Sel hidup yang sedikit menunjukkan bahwa ekstrak kasar lebih mempunyai aktivitas lebih baik dibandingkan isolat. Sel mati ditunjukkan dengan berbentuk bulat, tampak keruh dan cenderung tersebar. Sel hidup berbentuk seperti jarum dan helaian daun yang saling berhimpit dengan sel lain yang berada di sekitarnya dan menempel pada dasar wadah kultur. Morfologi

sel kanker payudara T47D setelah pemberian sampel pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ ditampilkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.4 Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian sampel pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$: (a) adalah ekstrak kasar; (b) adalah Isolat 1; (c) adalah Isolat 2 dan (d) adalah Isolat 5. (Keterangan: A₁ adalah sel mati dan A₂ adalah sel hidup).

Banyaknya sel hidup menunjukkan nilai absorbansi yang tinggi, sehingga mudah terbukanya cincin tetrazolium pada reaksi MTT yang ditunjukkan warna ungu berupa kristal formazan (Meiyanto, dkk. 1999). Nilai absorbansi masing-masing sampel ditunjukkan pada Lampiran 4.3. Hasil analisis yang diperoleh menunjukkan absorbansi pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah dibandingkan konsentrasi 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian Hudaya, dkk. (2015) menunjukkan hasil

absorbansi paling rendah pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak etanol kunyit putih disebabkan sel hidup lebih sedikit. Hasil absorbansi mampu menghasilkan perhitungan prosentase sel hidup sehingga diketahui data IC_{50} setiap sampel. Data nilai IC_{50} dan SI ditampilkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Data nilai IC_{50} dan SI (*Selectivity Index*) uji aktivitas antikanker terhadap Sel Kanker Payudara T47D dan Sel Vero

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Sel kanker Payudara T47D	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Sel Vero	SI (<i>Selectivity Index</i>)
Fraksi etanol	153,3	367,1	2,4
Isolat 1	6222,2	-	
Isolat 2	173,8	-	
Isolat 5	2528,9	910,4	-

Berdasarkan Tabel 4.3, fraksi etanol mempunyai nilai IC_{50} lebih rendah dibandingkan isolat 1, 2 dan 5. Fraksi etanol pada rimpang kunyit putih lebih toksik diduga mengandung senyawa fenol (kurkuminoid) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Penelitian Hudaya, dkk. (2015) menunjukkan bahwa ekstrak etanol pada rimpang kunyit putih mengandung senyawa fenol berfungsi mencegah pertumbuhan kanker dan menghambat kerusakan DNA.

Isolat 2 mempunyai aktivitas yang lebih baik dibandingkan isolat 1 dan 5. Senyawa yang diduga adalah senyawa demetoksikurkumin mempunyai aktivitas tingkat moderat terhadap sel kanker T47D. Tussanti, dkk. (2014) menunjukkan bahwa nilai IC_{50} antara 100 hingga 1000 $\mu\text{g/mL}$ merupakan sitotoksik moderat, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai kemoprevensi dalam penghambatan dan pecegahan sel kanker. Berdasarkan hasil identifikasi UV-Vis dan FTIR menunjukkan bahwa isolat 2 mempunyai panjang dan bilangan gelombang yang

berbeda dibandingkan isolat 1 dan 5, dimungkinkan sedikitnya pengotor dalam isolat 2 akan mempengaruhi sinergitas dalam suatu senyawa terhadap sel kanker payudara T47D.

Isolat 1 dan 5 tidak mempunyai aktivitas antikanker karena nilai $IC_{50} > 100$ $\mu\text{g/mL}$, yaitu 2528,9 dan 6222,2 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel kanker payudara T47D. Perbedaan potensi suatu sampel dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dipengaruhi oleh senyawa yang terdapat di dalam isolat 1, 2 dan 5. Riki, dkk. (2015) menyatakan bahwa keseimbangan nutrisi karbon dan keadaan suatu lingkungan yang berbeda akan mempengaruhi kandungan kurkuminoid yang berbeda.

Sel vero digunakan untuk menghitung tingkat selektivitas antara sel normal (sel vero) dengan sel kanker payudara T47D. Tingkat selektivitas diketahui dari nilai *Selectivity Index* (SI) pada masing-masing sampel, yaitu dengan cara membagi nilai IC_{50} sel Vero dengan sel kanker payudara T47D. Berdasarkan Tabel 4.3, fraksi etanol bersifat selektif terhadap sel kanker payudara T47D. Nilai *Selectivity Index* > 2 , menandakan bahwa fraksi etanol (ekstrak kasar kurkuminoid) rimpang kunyit putih mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal (Artun, dkk. 2016).

4.8 Identifikasi Kurkuminoid dari Isolat Hasil KLTP menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil identifikasi senyawa kurkuminoid dari isolat hasil KLTP fraksi etanol dengan spektrofotometer UV-Vis disajikan pada Lampiran 5.8. Isolat yang diduga senyawa kurkuminoid adalah isolat 1, 2 dan 5 memiliki 2 garis spektra pada panjang gelombang 357; 359 dan 357 nm dan 276,1 nm pada ketiga isolat.

Penelitian Ati, dkk. (2006) menunjukkan bahwa kurkuminoid mempunyai panjang gelombang maksimum masing-masing 426 nm pada kurkumin, 424 nm pada demetoksikurkumin, dan 416 nm pada bisdemetoksikurkumin. Penelitian Kumila (2016) menyatakan bahwa panjang gelombang maksimum kurkuminoid yaitu 421 nm. Penyebab perbedaan panjang gelombang yaitu pergeseran panjang gelombang yang disebabkan oleh pelarut dan pengotor pada isolat. Penelitian Murnah (2012) menunjukkan bahwa pergeseran panjang gelombang disebabkan adanya kepolaran pelarut.

Hasil spektra menunjukkan bahwa senyawa pada daerah *visible* ini diduga karena adanya transisi elektronik dari $\pi - \pi^*$ yaitu pada ikatan C=C aromatik dan $n - \pi^*$ pada ikatan C=O. Kumar (2016) menyatakan bahwa transisi $n - \pi^*$ mempunyai energi yang paling rendah dengan panjang gelombang sekitar 280 nm dan mempunyai intensitas rendah, sehingga disebut *symmetry forbidden* dan transisi $\pi - \pi^*$ merupakan transisi *allowed*. Menurut Rohman (2007) menyatakan bahwa transisi $\pi - \pi^*$ dan $n - \pi^*$ disebabkan terikatnya gugus auksokrom (OH) oleh gugus kromofor (C=C) akan mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih pendek (hipsokromik). Gugus auksokrom adalah gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas seperti amina, hidroksil, metoksi, dan gugus auksokrom juga merupakan gugus penambah warna. Penelitian Aisya (2012) menunjukkan bahwa pergeseran disebabkan oleh gugus auksokrom yang tidak mengabsorpsi pada daerah UV, tetapi mampu menggeser puncak-puncak panjang gelombang yang lebih kecil dan mengurangi intensitas. Rohman (2007) menyatakan bahwa adanya gugus kromofor pada panjang

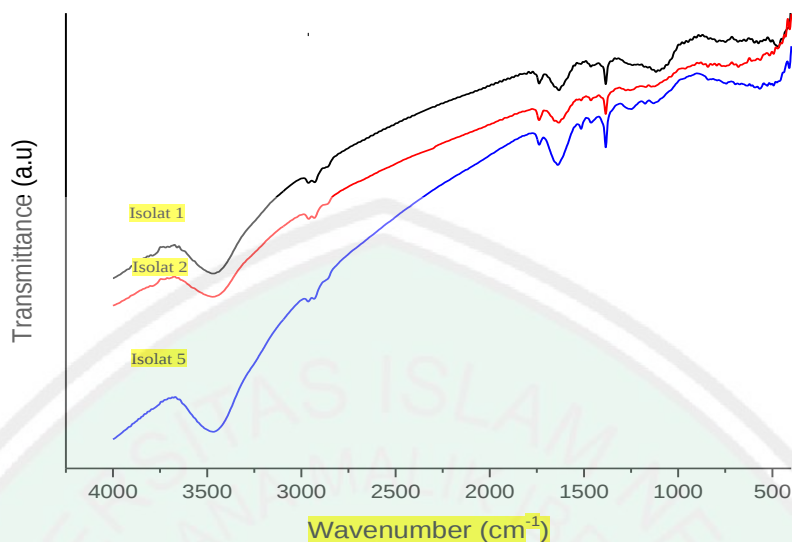
gelombang tampak (*visible*) merupakan gugus pengemban warna dimana ketika ada molekul ikatan rangkap atau inti benzene dapat menyerap cahaya.

4.9 Identifikasi Kurkuminoid dari Isolat Hasil KLTP menggunakan Spektrofotometer FTIR

Isolat 1, 2 dan 5 hasil KLTP diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR berfungsi mengetahui gugus-gugus fungsi dan memperkuat dugaan bahwa spektra yang dihasilkan senyawa kurkuminoid. Hasil spektra FTIR isolat 1,2, dan 5 senyawa kurkuminoid fraksi etanol pada rimpang kunyit putih ditampilkan pada Gambar 4.5 dan interpretasi hasil spektra pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Data hasil bilangan gelombang menggunakan FTIR senyawa kurkuminoid fraksi etanol

No.	Bilangan gelombang (cm^{-1})			Range pustaka (cm^{-1}) (Socrates, 1994)	Intensitas	Jenis Vibrasi
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 5			
1.	3468	3472	3467	3600-3450	lemah	Regangan O-H dari ikatan hidrogen
2.	2961	2961	-	Isolat 2 =2995-2955	sedang	Rentang C-H Asimetrik
3.	2931	2932	2935	Isolat 1 =3200-2500 3200-2500	sedang sedang	Rentangan CH_3 Rentangan $\text{C}(\text{sp}^3\text{-H})$ Alifatik
4.	1738	1738	1738	1780-1730	kuat	Rentangan eksosiklik $\text{C}=\text{C}$
5.	1632	1633	1638	1640-1610	sedang	$\text{C}=\text{O}$
6.	1384	1384	1384	1410-1310	kuat	Rentang O-CH_3
7.	1117	1142	1135	1300-1200	lemah	Rentang C-OH alkohol sekunder
8.	-	680	-	700-600	kuat	Bengkokan $=\text{C-H}$ Siklik (sidik jari)
9.	467	514	493	570-435	kuat	Sikloheksana



Gambar 4.5 Spektra FTIR Isolot 1, 2 dan 5

Hasil spektra FTIR isolat 1, 2 dan 5 menunjukkan adanya gugus fungsi alkohol (O-H) dari ikatan hidrogen molekular pada bilangan gelombang 3468; 3472 dan 3467 cm^{-1} dengan intensitas lemah. Gugus O-H yang dihasilkan merupakan alkohol sekunder yang ditunjukkan adanya serapan lemah pada bilangan gelombang sekitar 1100 cm^{-1} (Socrates, 1994). Penelitian Pomkeua (2010) menunjukkan bahwa senyawa kurkumin pada rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc) mempunyai bilangan gelombang 3385 cm^{-1} dari gugus hidroksil dengan intensitas lemah. Serapan dengan intensitas sedang pada bilangan gelombang 2931; 2932 dan 2935 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C-H. Socrates (1994) menyatakan bahwa serapan pada bilangan gelombang di bawah 3000 cm^{-1} merupakan rentangan C ($\text{sp}^3\text{-H}$) alifatik, sehingga dimungkinkan merupakan gugus metil (CH_3).

Spektra pada bilangan gelombang 1738 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C=O. Bilangan gelombang 1632; 1633 dan 1638 cm^{-1} dengan intensitas sedang

pada isolat 1, 2 dan 5 menunjukkan adanya gugus C=O (Socrates, 1994). Spektra bilangan gelombang 1384 cm^{-1} merupakan gugus O-CH₃. Hasil spektra pada bilangan gelombang sekitar 467; 514 dan 493 cm^{-1} merupakan gugus sikloheksana. Pita serapan yang berbeda pada isolat 2 pada bilangan gelombang 680 cm^{-1} dengan intensitas kuat merupakan gugus bengkokan =C-H siklik. Dugaan hasil identifikasi isolat 1, 2 dan 5 menunjukkan adanya gugus fungsi khas kurkuminoid yaitu adanya gugus OH dan C=O dan gugus aromatik C=C.

4.10 Pemanfaatan Kunyit Putih dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan alam semesta beserta isinya agar menganjurkan hamba-hambanya untuk melihat dan memikirkan keajaiban-keajaibannya. Sebagaimana dalam QS. Ali Imran 190-191.

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ (١٩٠) الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ قَوْلًا عَذَابَ النَّارِ (١٩١)

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal (190) (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Maha Suci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka (191)” (QS. Ali Imran 190-191).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menunjukkan ciri khas orang yang berakal yaitu apabila memperhatikan sesuatu, selalu memperoleh manfaat dan terinspirasi oleh tanda-tanda kebesaran Allah SWT di alam ini. Setiap waktunya diisi untuk memikirkan keajaiban-keajaiban yang terdapat dalam

ciptaan-Nya yang menggambarkan kesempurnaan-Nya. Salah satu hasil yang diharapkan adalah mengetahui manfaat dari suatu tanaman, misalnya sebagai obat. Tumbuhan yang dapat dimanfaatkan adalah rimpang kunyit putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg).

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etanol (ekstrak kasar kurkuminoid) pada rimpang kunyit putih memiliki nilai IC_{50} 153,3 $\mu\text{g/mL}$, Isolat 5 IC_{50} 2528,9 $\mu\text{g/mL}$, Isolat 2 IC_{50} 173,8 $\mu\text{g/mL}$ dan Isolat 1 IC_{50} 6222,2 $\mu\text{g/mL}$ pada sel kanker payudara T47D, sedangkan pada sel vero memiliki nilai IC_{50} pada fraksi etanol sebesar 367,1 $\mu\text{g/mL}$ dan isolat 1 sebesar 910,4 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa isolat pada rimpang kunyit putih kurang efektif sebagai pengobatan antikanker payudara T47D dengan nilai $IC_{50} > 100$ ppm yang ditunjukkan kurangnya sifat selektifitas, sehingga senyawa kurkuminoid kurang mampu memilih penghambatan yang baik antara sel kanker payudara T47D dengan sel vero. Sabda Nabi Muhammad SAW:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

“Setiap penyakit ada obatnya. Maka bila obat itu mengenai penyakit akan sembuh dengan izin Allah penyakit itu sembuh. (HR. Muslim dan Ahmad)”

Hadits tersebut menjelaskan bahwa penyakit yang diturunkan Allah SWT baik jenis penyakit pada zaman nabi maupun sesudahnya pasti Allah menurunkan juga obatnya. Obat yang diturunkan Allah SWT jika tepat mengenai sumber penyakitnya, maka atas izin Allah SWT penyakit tersebut akan hilang. Sebagaimana dalam manfaat rimpang kunyit putih selain sebagai obat kanker antara lain sebagai antiradikal, antioksidan, antimikroba, antiinflamasi dan antimutagenik.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Eluen terbaik yang digunakan pada KLT Preparatif untuk mendapatkan isolat kurkuminoid dari rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria* (Chirstm.) Berg) yaitu kloroform: *n*-heksana: metanol (1: 1: 0,1).
2. Fraksi etanol (ekstrak kasar) mempunyai potensi menghambat sel kanker payudara T47D dibandingkan isolat kurkuminoid dengan nilai IC_{50} sebesar 153,3 $\mu\text{g/mL}$. Hasil IC_{50} pada isolat 1, 2 dan 5 sebesar 6222,2; 173,8 dan 2528,9 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi etanol (ekstrak kasar) juga mempunyai nilai selektifitas dalam menghambat sel kanker, sehingga mampu membedakan antara sel normal dan sel kanker yang ditunjukkan dengan nilai SI (*Selectivity Index*) sebesar 2,4 $\mu\text{g/mL}$.
3. Hasil analisis menggunakan UV-Vis dan FTIR yaitu isolat 1, 2 dan 5 mempunyai panjang gelombang 357,9; 359,0 dan 357,9. Hasil spektra FTIR diduga mengandung gugus fungsi yang khas dalam senyawa kurkuminoid yaitu gugus regangan O-H dari ikatan hidrogen dan gugus karbonil C=O.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji lanjutan pada MTT dengan sel dan variasi konsentrasi yang berbeda.
2. Perlu dilakukan metode pemisahan isolat yang berbeda dan identifikasi menggunakan instrumen LC-MS agar mengetahui jenis senyawa yang terkandung dalam isolat .

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, B. B., Kumar, A., Aggarwal, M. S., dan Shishodia, S. 2005. *Curcumin Derived from Turmeric (Curcuma longa): A Spice for All Season*. CRC Press LLC.
- Aka, J. A., dan Lin, S. X. 2012. Correction: Comparison of Functional Proteomic Analyses of Human Breast Cancer Cell Lines T47D and MCF7. *Plos One*, 7(4):1-9.
- Al-Jazairi, A. B. K. 2007. *Tafsir Al-Quran Al-Aisar*. Terjemahan oleh Hatim, A. dan Mukti, A. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Maraghi, A. M. 1993. *Terjemahan Tafsir Al-Maraghi Juz 4*. Terjemahan oleh Hery Noer Aly, K. Anshori Umar Sitanggal, Bahrin Abu Bakar. Semarang: CV Toha Putra.
- Al-Qurthubi S. I. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam
- Amalina, N. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Merica Hitam (*Piper Nigrum L.*) terhadap Sel Hela. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Arifin, H., Anggraini, N., Handayani D., dan Rasyid, R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol daun *Eugenia cumini Merr.* *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 11(2): 88.
- Artun, F. T., Karagoz, A., Ozcan G., Melikoglu, G., Anil, S., Kultur, S., Sultupinar, N. 2016. In Vitro Anticancer and Cytotoxic Activities of Some Plant Extracts on Hela and Vero Cell Lines. *Journal aimed at the rapid diffusion of scientific knowledge in Oncology*, 21(3): 720-725.
- Ati, N. H., Rahayu, P., Notosoedarmo, S., dan Limantara, L. 2006. Komposisi dan Kandungan Pigmen Tumbuhan Pewarna Alami Tenun Ikat di Kabupaten Timor Tengah Selatan, Propinsi Nusa Tenggara Timur. *Indonesian Journal of Chemistry*, 6(3): 325-331.
- Azizah B., dan Salamah, N. 2013. Standarisasi Parameter Non Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang kunyit. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 3(1): 21-30.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. (Eds.). 2010. *Acuan Sediaan Herbal*, Vol. 5, Edisi 1. Jakarta: Direktorat Obat Asli Indonesia.
- Bakar, A., Mulyono, E., dan Yulianingsih. 2006. *Prospek Oleoresin dan Penggunaannya di Indonesia*. Bogor: Balai Besar Litbang Pascapanen Pertanian.

- Baraja, M. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus Elastica* Nois Ex Blume terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Basnet, P., dan Skalko N. B. 2011. Review Curcumin: An Anti-inflammatory Molecule from a Curry Spice on The Path to Cancer Treatment. *Journal of Molecules*, 16(6): 4567-4598.
- Bernasconi, G., H. Guster., Hauster. H., dan E. Schneifer. 1995. *Teknologi Kimia Jilid 1 dan 2*. Terjemahan oleh Handoyo L. Jakarta: PT. Pradnya Paramitha.
- Bharti, A. C., Donato, N., Singh, S. dan Aggarwal, B. B. 2003. Curcumin (diferloymethane) Down-Regulates The Constitutive Action of Nuclear Factor- κ B and I κ Ba Kinase in Human Multiple Myeloma Cells, leading to Suppression of Proliferation and Induction of Apoptosis. *Blood*, 101(3): 1053-1062.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R., dan Speirs, V. 2003. Breast Cancer Cell Lines: Friend or Foe. *Breast Cancer Research*, 5(2): 89-95.
- Cahyono, B., Huda, M.D.K., dan Limantara, L. 2011. Pengaruh Proses Pengeringan Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) terhadap Kandungan dan Komposisi Kurkuminoid. *Jurnal Reaktor*, 13(3): 165-171.
- CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center). 2009. *Preparasi sample*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.
- CCRC. 2012. Prosedur Tetap Uji Sitotoksik metode MTT. *Cancer Chemoprevention Research Center*: 1-7.
- Crowther. 2001. *The ELISA Guidebook*. New Jersey: Humana Press.
- Da'i, M., Meiyanto E., Supardjan A.M., Anggara U.J., dan Kawaichi M. 2007. Potensi Antiproliferative Analog Kurkumin Pentagamavunon terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Artocarpus*, 7(1):14-20.
- Dewi S. M., Rahman, F., Hamdayani, N., dan Rismawati, R. 2010. Penentuan Kandungan Kimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam) sebagai antikanker. Makalah disajikan pada LPPM UNS, Penelitian DP2M pada Hibah Bersaing di Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 28 April 2010, (Online), (<http://lppm.uns.ac.id>), diakses 2 November 2016.
- Dhule, S. S., Penfornis, P., Frazier, T., Walker, R., Fieldman, J., Tan, G., He., Alb, A., John, V., Pochampally, R. 2012. Kurkumin-loaded Gamma(γ)-cyclodextrin Liposomal Nanoparticles as Delivery Vehicles for

- Osteosarcoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, (8): 440-451.
- Dwi, H. H. 2015. Uji Antikanker dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Benalu Mangga terhadap Cell Line Kanker Payudara T47D. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki.
- Effendy, Ph. D. 2007. *Kimia Koordinasi Jilid 1 Edisi 2*. Malang: Indonesian Academic Publishing.
- Fessenden, R. J. dan Fessenden, J. S. 1982. *Kimia Organik Jilid 1 Edisi 3*. Terjemahkan oleh Pudjaatmakan, A. H. Jakarta: Erlangga.
- Firdaus, I. A. 2016. Uji Senyawa Tanin dan Aktivitas pada Rumpun Bambu (*Lophaterum gracile B.*) sebagai Antikanker Payudara T47D. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Freshney, I. R. 2000. *Culture Of Animal Cells: A Manual of Basic Technique Fourth Edition*. Toronto: Wiley-Liss Publication. Dari Amazon.co.uk, (Online), (<https://www.amazon.co.uk/Culture-Animal-Cells-Wiley-Liss-Publication-x/dp/0471348899>), diakses 20 November 2016.
- Fuadati, C. 2015. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Jamur Endofit dari Temulawak (*curcuma xanthorrhiza Roxb.*) yang Berpotensi sebagai Senyawa Antibakteri. *Skripsi*. Malang: Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki.
- Globocan. 2012. *Breast Cancer Estimated Cancer Incidence, Mortality, Prevalence) Worldwide in 2012*. (Online), (<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>), diakses tanggal 1 November 2016.
- Goncalves, E. M., Ventura, C. A., Yano, T., Macedo, M. L. R., dan Genari, S. C. 2006. Morphological and Growth Alterations in Vero Cells Transformed by Cisplatin. *Cell biology International*, 30: 485-494.
- Hudaya, I., Nasihun, T. R., dan Sumarawati, T. 2015. Effect of White Turmeric Extract (*Curcuma zedoaria*) Using Zam-zam Solvent Compare with Ethanol Solvent Against Breast Cancer Cell. *Journal of Medicine and Health*, 6(2): 52-55.
- Hutabarat, N. 2010. Profil kimiawi dari Formula Ekstrak Meniran, Kunyit, dan Temulawak berdasarkan Toksisitas Terbaik. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

- International Agency for Research on Cancer (IARC)*. 2012. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012. (Online), (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx), diakses 17 Januari 2018.
- Ilhami, F. Y., Wahyuni, F.S., Husni, E. 2013. Uji Efek Sitotoksik Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol Akar Asam Kandis (*Garcinia cowa Roxb.*) terhadap Sel Kanker Payudara T47D dengan Metoda MTT. Di dalam: Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Famasi dan Klinik III. *Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Famasi dan Klinik III*; Padang, Panitia Seminar Nasional Padang. Halaman 2339-2592.
- Indriani, V. 2007. Isolasi Kurkuminoid dari Kunyit Kuning (*Curcuma longa linn.*) dan Uji Aktivitasnya sebagai Tabir Surya dan Antioksidan. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Malang.
- Joe, B., Vijaykumar, M., dan Lokesh., B. R. 2004. Biological Properties of Curcumin-cellular and Molecular Mechanism of Action. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 44(2): 97-112.
- Kementrian Kesehatan. 2012. *Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan*. Jakarta: Kemenentrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 381 Tahun 2007 tentang Kebijakan Obat Tradisional Nasional*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.(Online), (<http://binfar.depkes.go.id>), diakses 5 Maret 2017.
- Khadem, Y. 2005. *Kedokteran Islam: Sejarah dan Perkembangannya*. Bandung: Dzakra.
- Kharkwal, H., Bala, K., Joshi, D. D., dan Katare, D. P. 2012. Bioavailability enhancement of Curcuminoids using Natural Polymer. *Der Pharmacia Lettre*, 4(6): 1698-1711.
- Khopkar, S. M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kitamura, C., Nagoe T., Prana M.S., Agusta A., Ohashi K., and Shibuya H. 2007. Comparison of *Curcuma sp.* in Yakushima with *C. aeruginosa* and *C. zedoaria* in Java by trn K gene sequence, RAPD pattern, and essential oil component. *Journal of Natural Medicines*, 61(3): 239–243.
- Kumar, Prof. Subodh. 2016. *Organic Chemistry: Spectroscopy of Organic Compound*. Amritsar: Departemen of Chemistry.
- Kumila, S. S., Widayat, Cahyono, B. 2016. Validasi Spektrofotometri UV-Vis untuk Penentuan Kurkuminoid dalam Produk Herbal. Makalah Pendamping. Di dalam: Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VIII. *Peningkatan Profesionalisme Pendidik dan Periset Sains Kimia di Era*

Masyarakat Ekonomi Asean (MEA); Solo, Universitas Sebelas Maret. Halaman 107-113.

- Latifah. 2015. Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Rimpang Kencur *Kaempferia galangan L.* dengan Metode DPPH (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL). *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki.
- Lee, Wing-Hin., Loo, Ching-Yee., Bebawy, M., Luk, F., Mason R. S. dan Rohanizadeh, R. 2013. Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Current Neuropharmacology*, 11(4): 338-378.
- Lenny, S. 2006. Senyawa flavonoida, fenilflavonoida dan Alkaloida. *Karya Ilmiah*. Medan: Mc Graw Hill Companizadeny.
- Lobo, R., Prabhua, K. S., Shirwaikara, A., dan Shirwaikarb, A. 2009. *Curcuma zedoaria* rosc. (white turmeric): A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61: 13–21.
- Lockshin, R. A., dan Zakeri Z. 2007. Cell Death in Health and Disease. *Journal of Cellular Molecul and Medicine*, 11(6): 1214-1224.
- Malek, S. N. A., Lee, G. S., Hong, S. L., Yaacob H., Wahab, N. A., Weber, J. F. F., dan Shah S. A. A. 2011. Phytochemical and Cytotoxic Investigations of *Curcuma mangga* Rhizomes. *Molecules*, 16: 4539-4548.
- Mallik, S., Kshirsagar, M. D., dan Saini V. 2011. Studies on Physical Chemical Compatibility between Synthetic and Herbal Drugs with Various Pharmaceutical Excipients. *Der Pharmacia Lettre*, 3(5): 173-178.
- Mangan, Y. 2009. *Cara Bijak Menaklukkan Kanker*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Meiyanto, E. 1999. Kurkumin sebagai obat kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya. *Majalah Farmasi Indonesia*, 10(4): 224-236.
- Meiyanto, E., Susidarti, R.A., Handayani, S. dan Rahmi, F. 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu L.*) Mampu Menghambat Proliferasi dan Memacu Apoptosis Sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19(1): 12-19.
- Meiyanto, E., Sismindari, Kusnandar, L.C., Moordiani. 2003. Efek Anti Proliferative Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Tanaman Cangkring (*Erythrina fusca Lour*) terhadap Sel Hela. *Majalah Farmasi Indonesia* , 14: 124-131.

- Mosmann, T. 2000. The Hallmarks of cancer. *Journal proliferation and cytotoxic eseis*, 65: 55-63.
- Muflikha. 2014. White Turmeric (*Curcuma zedoaria*): Its Chemical Substance and The Pharmacological Benefits. *Medical Journal of Lampung University, Majority*, 3(7).
- Nafsiati, 2009. *Konsep Dasar Kimia*. Malang: UIN Malang Press.
- Nurcholis, W., Ambarsari L., Permasku, G., Latifah, K. D., dan Kurniatin, P. A. 2015. Analisis Kandungan Kurkuminoid dan Penghambatan α -Glukosidase dari Ekstrak Beberapa Aksesori Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 13(2): 229-234.
- Nurhayati, S. dan Lusiyanti, L. 2006. Apoptosis dan Respon Biologi Sel sebagai Faktor Prognosa Radioterapi Kanker. *Iptek Ilmiah Populer dalam Buletin Alara*, 7(3): 57 – 66.
- Nurrochmad, Arief. 2004. Review: Pandangan Baru Kurkumin dan Aktivitasnya sebagai Antikanker. *Biofarmasi*, 2(2): 75-80.
- Nursal, F. K., Arsyadi, dan Gunawan, W. 2012. Kombinasi Pelarut Campur Polietilenglikol 400 dan Propilenglikol untuk Meningkatkan Kelarutan Kurkuminoid dalam Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*. Roxb). *Farmasains*, 1(6): 268-273.
- Oktaviani, P.R. 2010. Kajian Kadar Kurkuminoid, Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*. Roxb) pada Berbagai Teknik Pengulangan dan Proporsi Pelarutan. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.
- Pamilih, H. 2009. Uji Sitotoksik Ekstrak Etil Asetat Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) terhadap Sel Kanker Payudara (T47D) dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah.
- Panji, Tri. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Paramapojn, S. dan Wandee, G. 2009. Free Radical Scavenging Activity Determination and Quantitative Analysis of Curcuminoids in *Curcuma zedoaria* Rhizome Extracts by HPLC Method. *Current Science*, 97(7): 1069-1073.
- Phaechemud, T., dan Sotanaphun, U. 2010. Dissolution of Curcuminoids from Solid Dispersion Using Different Carriers. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1(3): 198-206.

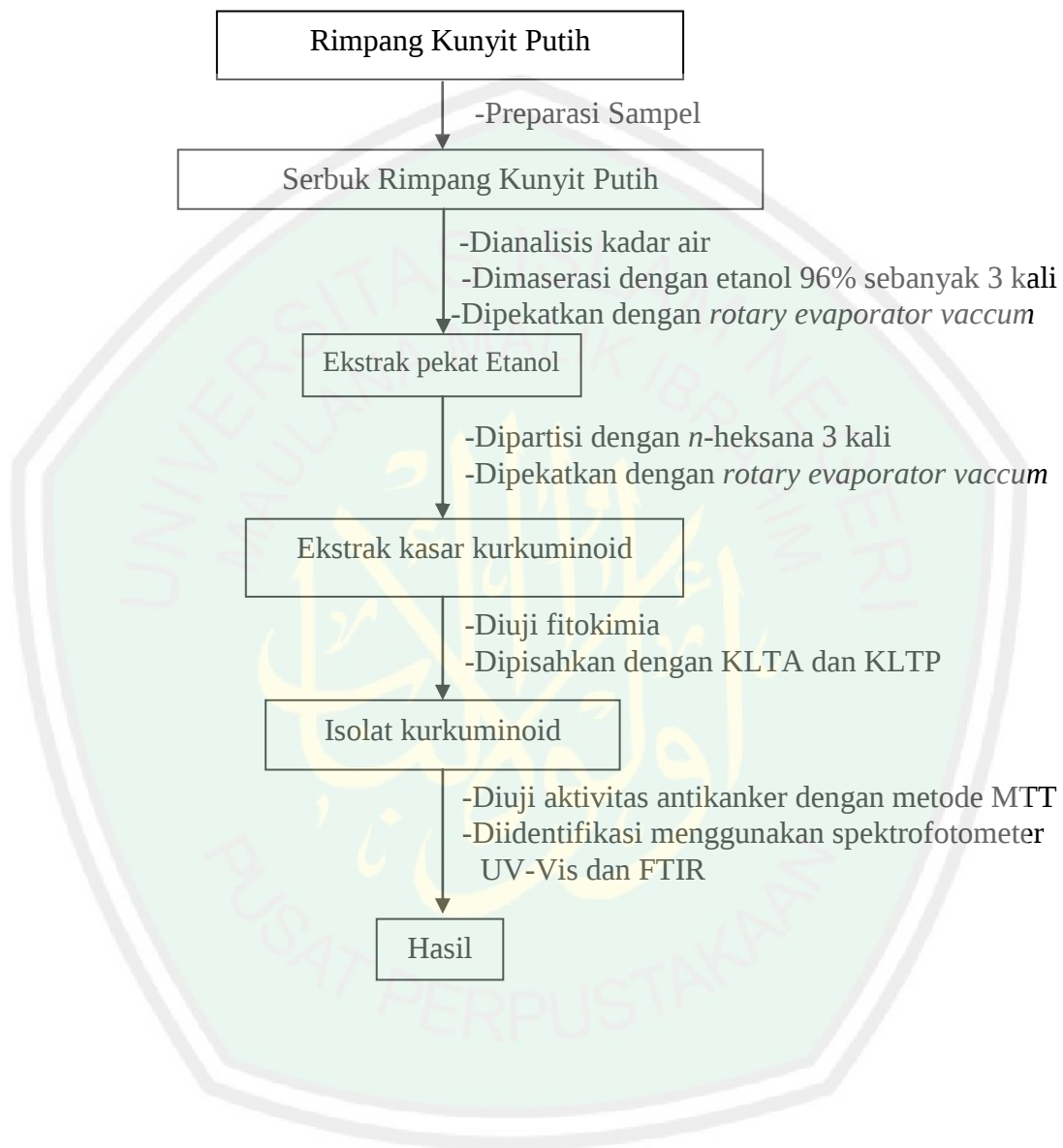
- Parthasarathy V. A., Chempakan B., dan Zachariah, T. J. 2008. *Chemistry of Spices*. CABI: Oxford.
- Pomkeua, S. 2010. Chemical Constituents from the Rhizomes of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc. And the Stems of *Citrus medica* Linn. Thesis. Chemical Studies Prince of Songkla University.
- Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12. 2014. Persyaratan Mutu Obat Tradisional. Halaman 1-24.
- Phattanawasin, P., Sotanaphun, U., dan Sriphong, L. 2009. Validated TLC-Image Analysis Method for Simultaneous Quantification of Curcuminoids in *Curcuma longa*. *Chromatographia*, 69:397-400.
- Pusat data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI. 2012. *Stop Kanker*. (Online), (<http://www.depkes.go.id>), diakses tanggal 4 November 2016.
- Rahayu, Hertik Dwi Iswahyuni. 2010. Pengaruh Pelarut yang digunakan Terhadap Optimasi Ekstraksi Kurkumin pada Kunyit (*Curcuma domestica*Vahl.). *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah.
- Rahmawati, E., Sukardiman dan Muti, A.F. 2013. Aktivitas Antikanker Ekstrak N-Heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* L.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Media Farmasi*, 10(2): 47-55.
- Ramdja, A. F., R. M. Army Aulia, dan Pradita,M. 2009. Ekstraksi Kurkumin dari Temulawak menggunakan Etanol. *Jurnal Teknik Kimia*, 16(3): 52-58.
- Revathy, S., Elumalai, S., Merina, B., dan Benny, A.. 2011. Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.) by Column Chromatography. *Journal of Experimental Sciences*: 21-25.
- Riki, Popi, A. K., Laksmi, A., Waras, N., Latifah, K., Darusman. 2015. Characterization and Toxicity of Temulawak Curcuminoid Nanoparticles. *Current Biochemistry*, 3(1): 43-53.
- Rinanto, Y., Sunarni T., dan Leviana, F. 2009. Induksi Kurkuminoid dalam Kalus dengan Penambahan Prekursor dalam Media Kulut Jaringan. *Jurnal Farmasi Indonesia*: 1-11.
- Rismayani, A. A., Nugraha, D., S. Farm., dan Wahlanto, S., S. Farm. 2016. Identifikasi Kurkuminoid pada Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas merah (*Alpinia galangal* L. Wild) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). *Karya Tulis Ilmiah*. Ciamis: Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Muhammadiyah.
- Rohman, Abdul. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: PustakaPelajar.

- Roth, H. J. dan Blaschke, G. 1988. *Analisis Farmasi*. Diterjemahkan oleh: Sarjono Kisman dan Slamet Ibrahim. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Mujahid, R., Awal, P. K. D., dan Nita, S. 2008. Maserasi sebagai Alternatif Ekstraksi pada Penetapan Kadar Kurkuminoid Simplisia Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). *Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu*: 18-23.
- Saifudin. 2006. Bio Transformation Kurkumin melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus Roseus* (L) G. dan Berbunga Merah. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, 7(2): 92-102.
- Sari, D. L., B. C., dan Kumoro, A. C. 2013. Pengaruh Jenis Pelarut pada Ekstraksi Kurkuminoid dari Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Indonesian Journal of Chemistry*, 1(1): 101-107.
- Savitri, Evika Sandi. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Malang Press.
- Sax, D., dan Lewis, R. 1998. *Dictionary Chemistry*. Canada: Galler International.
- Schieffer, G.W. 2002. Pressurized liquid extraction of curcuminoids and curcuminoid degradation products from turmeric (*Curcuma longa* L.) with subsequent HPLC assays. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25: 3033-3044.
- Siregar, F. dan Akbar, S. M. 2007. Cytotoxicity of *Jatropha curcas* Latex by MTT esei. Singapore: *International Association of Dental Research, South-East Asia Meeting*.
- Solomon dan Fryhle. 2006. *Organic Chemistry 8th*. India: Wiley India Pvt.
- Souza, M.C., Bevilacqua, C.L., Morais, M.S., Costa, C.C., Silvia A.A. dan Filho, R.B. 2008. Anthelmintic Acetogenins from *Annonasquamosa* L Seed. Brazil: *Annals Brazilian Academy of Science Journal*, 80(2): 271-277.
- Sudarmadji, Slamet, H. Bambang, Suhardi. 2007. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sumarny, Ros., Djamil R., dan Indira A.S. 2012. Kadar Kurkumin dan potensi antioksidan ekstrak etanol rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg) Roscoe.), temu manga (*Curcuma mangga* Val et Zyp.) dan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). *Skripsi*. Cimahi: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.
- Syu, W.J., Ming, J. D., Don, M. J., Ou, J. C., Lee, G. H., dan Sun, C. M. 1998. Cytotoxicity of Curcuminoids and Some Novel Compounds from *Curcuma zedoaria*. *Journal of Natural Products Impact Factor*, 61(12): 1531-1534.

- Tonnesen, H.H., A.F. Arrieta, and D. Lerner. 1995. *Pharmazie*, 50: 689-694.
- Tussanti, I., Johan, A., Kisdjamiatun. 2014. Sitotoksitas *In Vitro* Ekstrak Etanolik Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*, reinw.ex bl.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Jurnal Gizi Indonesia (ISSN : 1858-4942)*, 2(2): 53-58.
- Wardihan, Rusdi M., Alam G., Lukman dan Marianti A. M. 2013. Selective Cytotoxicity Evaluation in Anticancer Drug Screening of *Boehmeria virgata* (Forst) Guill Leaves to Several Human Cell Lines: HeLa, WiDr, T47D and Vero. *Dhaka University Journal Pharmacy of Science*. 12(2): 87-90.
- WHO. 2008. *Preventing Chronic Disease a Vital Investment*. Switzerland: WHO Press.
- Wonorahardjo, Ph. D., S. 2013. *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia Permata.
- Yim, S. K., Yun, C. H., Ahn, T., Jung H. C., dan Pan, J. G. 2005. A Continuous Spectrophotometric Assay for NADPH-cytochrome P₄₅₀ Reductase Activity using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(3): 366-9.
- Yusuf, F. M., dan Nurkhasanah. 2015. Evaluasi Kadar Kurkumin dalam Jamu Tradisional Kunir Asam yang dijual di Pasar Kota Gede Bulan Februari 2015. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(3): 115-123.
- Zuraida, Z. 2015. Dasar Terapi Tumor dan Kanker di Rumah Riset Jamu "Hortus Medicus" Tawangmangu. *Cancer Comitte*, 42(11): 858-861.

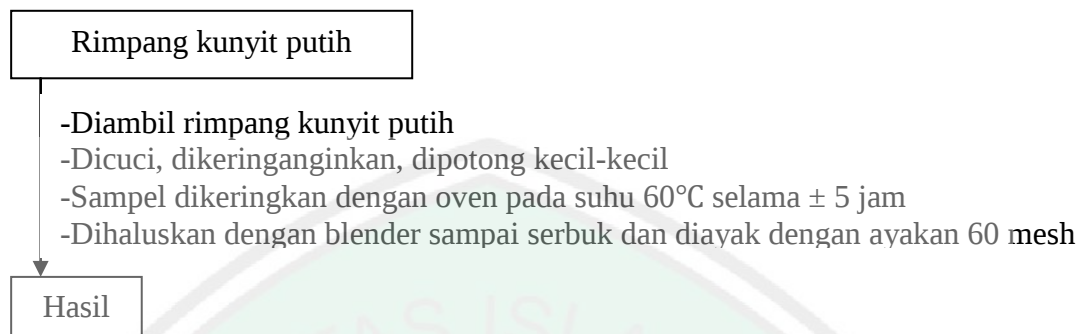
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

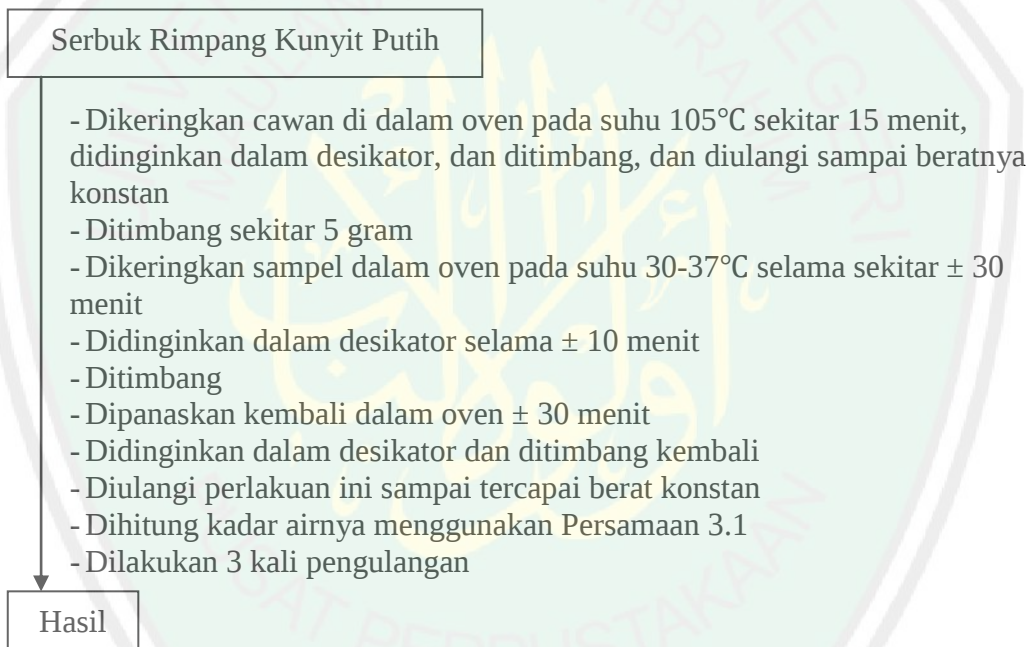


Lampiran 2. Skema Kerja

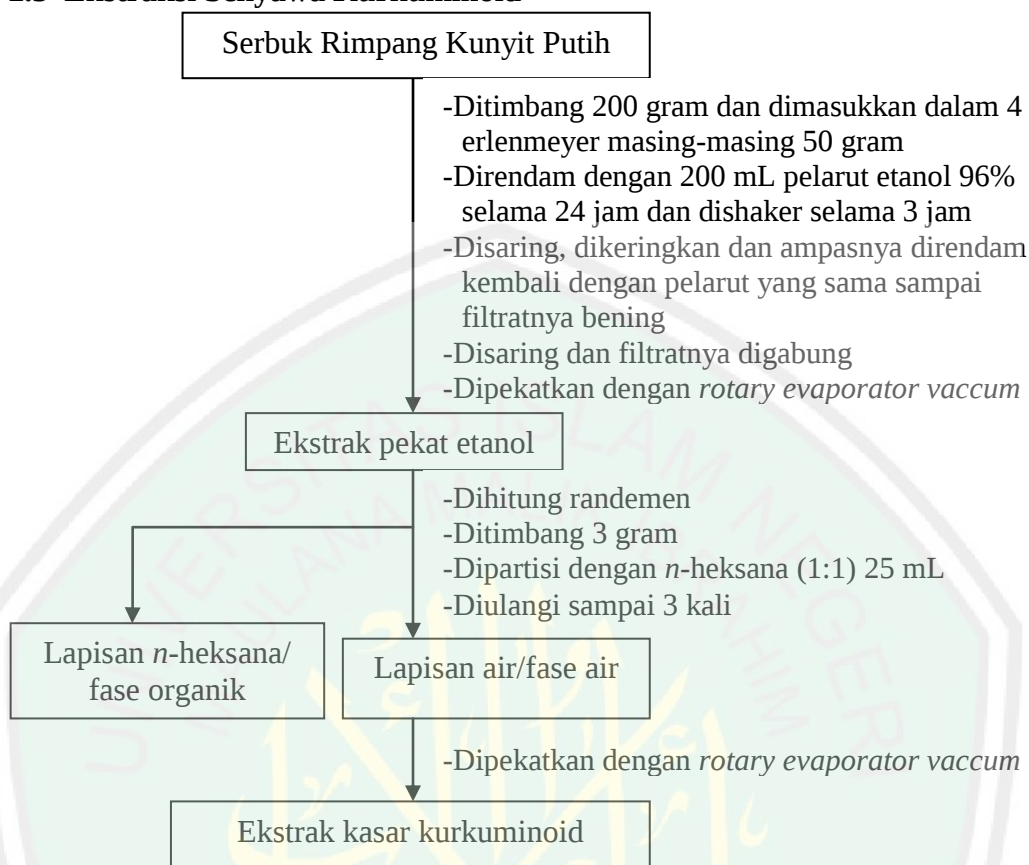
2.1 Preparasi Sampel



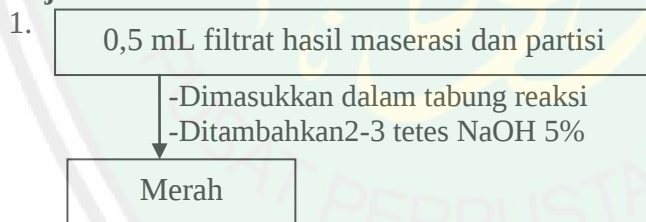
2.2 Analisis Kadar Air



2.3 Ekstraksi Senyawa Kurkuminoid

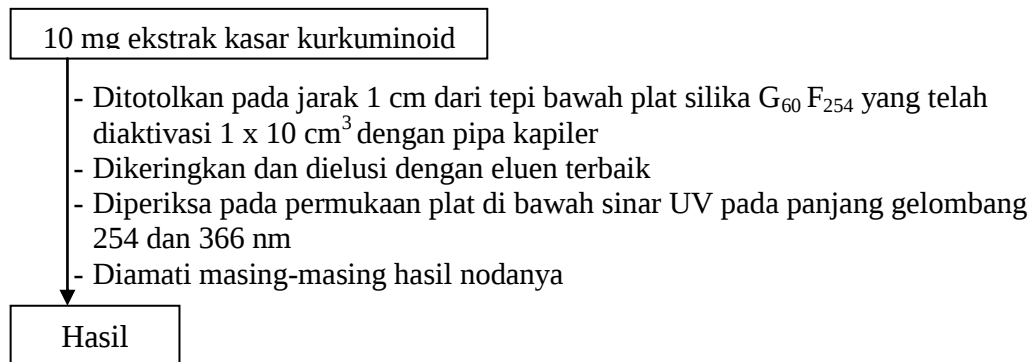


2.4 Uji Fitokimia Kurkuminoid



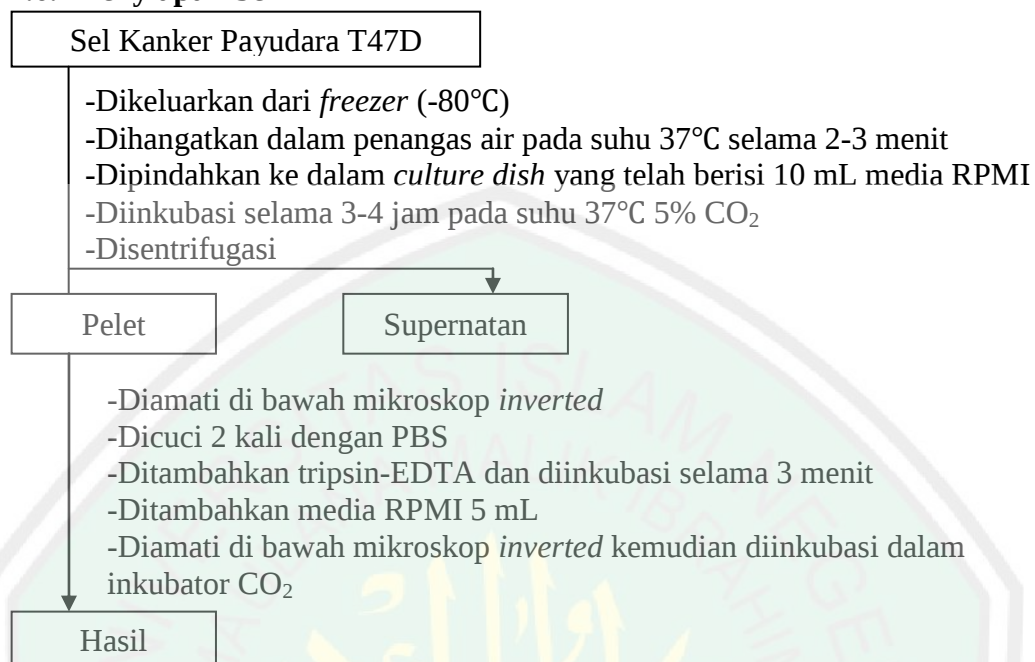
2.5 Pemisahan Kurkuminoid menggunakan KLTP

Pemisahan kurkuminoid dengan KLT dan hasil diuji aktivitas antikanker dengan metode MTT.

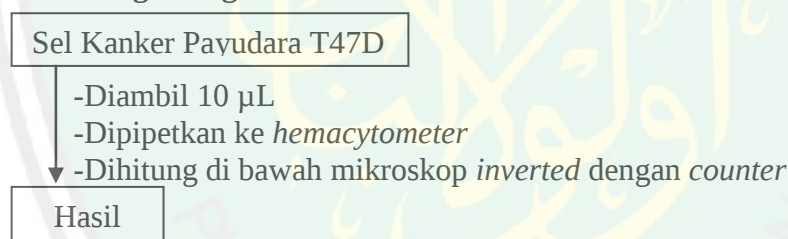


2.6 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

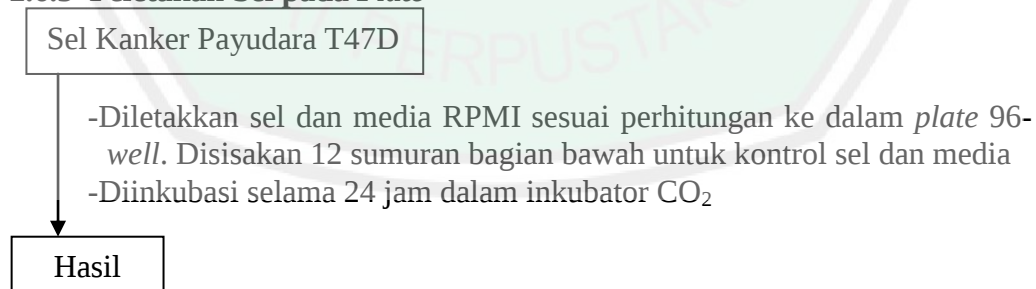
2.6.1 Penyiapan Sel



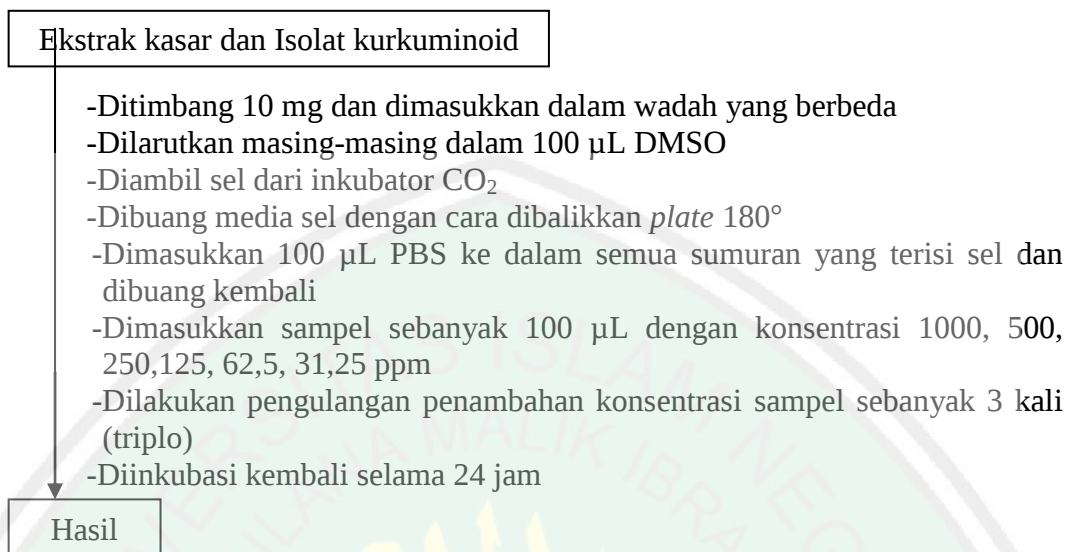
2.6.2 Penghitungan Sel Kanker



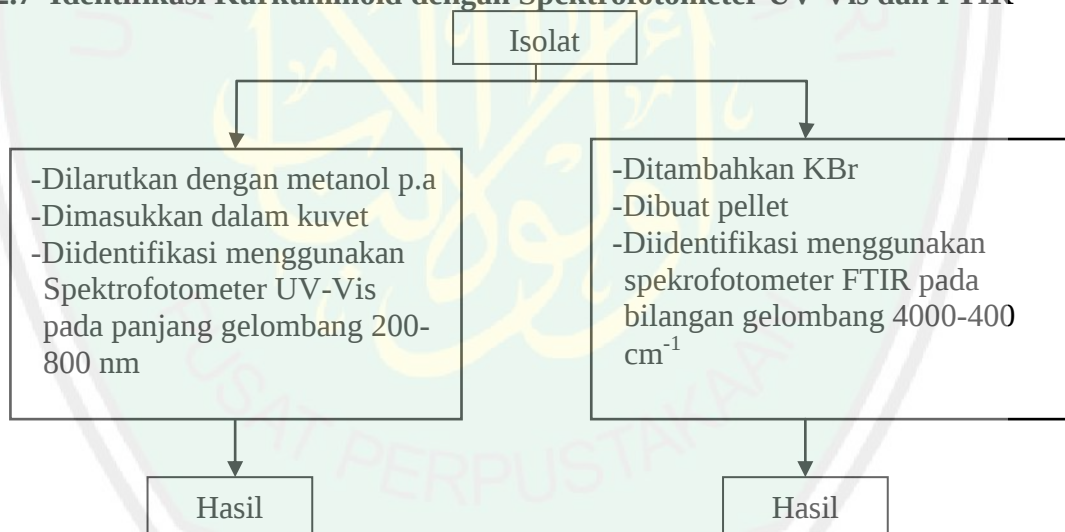
2.6.3 Peletakan Sel pada Plate



2.6.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada Plate



2.7 Identifikasi Kurkuminoid dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR



Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

3.1 Pembuatan Larutan NaOH 5% (b/v)

$$\begin{aligned}\frac{b}{v} &= \frac{\text{berat zat terlarut (g)}}{\text{volume larutan (mL)}} \times 100\% \\ 5\% &= \frac{\text{berat zat terlarut (g)}}{100 \text{ mL}} \times 100\% \\ \frac{5}{100} \text{ g/mL} &= \frac{\text{berat zat terlarut (g)}}{100 \text{ mL}} \\ 5 \text{ gram} \times 100 &= 100 \times \text{berat zat terlarut} \\ 500 \text{ gram} &= 100 \times \text{berat zat terlarut} \\ 5\% &= 5 \text{ gram dalam } 100 \text{ mL larutan}\end{aligned}$$

Cara pembuatannya yaitu ditimbang 5 gram NaOH, kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia. Aquades sebanyak 100 ml diukur menggunakan labu takar 100 mL. NaOH 5 gram diencerkan sedikit aquades yang telah diukur, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur, ditandabatkan kemudian di homongankan.

3.2 Pembuatan Larutan Ekstrak Kurkuminoid 10.000 ppm

$$10.000 \text{ ppm} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1\text{L}} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{10 \text{ mg}}{1 \text{ mL}}$$

Cara pembuatannya adalah sampel ekstrak kurkuminoid ditimbang 10 mg, kemudian dilarutkan dengan 1 mL pelarut dan dihomogenkan dengan diaduk menggunakan pengaduk gelas, sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 10.000 ppm. Ekstrak yang diperoleh digunakan untuk uji pemurnian isolat kurkuminoid pada KLTA sehingga mempermudah dalam proses penotolan.

3.3 Pembuatan Larutan HCl 0,1 M

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi HCl} &= 37\% \text{ (b/b)} \\ &= \frac{37 \text{ gram HCl}}{100 \text{ gram larutan HCl}} \\ \rho \text{ (Berat jenis) HCl pekat} &= 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L} \\ \text{Berat Molekul} &= 36,5 \text{ g/mol} \\ 1,19 \text{ gram larutan HCl} &\rightarrow 1 \text{ mL larutan HCl} \\ 100 \text{ gram larutan HCl} &\rightarrow x \text{ mL larutan HCl} \\ \frac{1,19 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} &= \frac{1 \text{ mL}}{x \text{ (mL)}} \\ \text{Volume larutan HCl} &= \frac{100 \text{ gram} \times 1 \text{ mL}}{1,19 \text{ gram}} \\ &= 84,0336 \text{ mL} \\ &= 0,840336 \text{ L} \\ \text{Mol HCl} &= \frac{\text{gram}}{\text{Mr}} \\ &= \frac{37 \text{ gram}}{36,5 \text{ g/mol}}\end{aligned}$$

$$= 1,013699 \text{ mol} = 1,0137 \text{ mol}$$

$$\text{Molaritas HCl} = \frac{\text{mol}}{V} = \frac{1,0137 \text{ mol}}{0,840336 \text{ L}} = 12,063 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$12,063 \text{ M} \times V_1 = 1 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8,28 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya yaitu ditambahkan aquades 5 mL ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan HCl pekat 37% 8,28 mL. Ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Perlakuan ini dilakukan dalam lemari asap.

3.4 Pembuatan Larutan Stok MTT 5 mg/mL (CCRC, 2009)

Dibuat stok 50 mg serbuk MTT dilarutkan dalam 10 μL PBS sehingga diperoleh konsentrasi 5 mg/mL. Jika diinginkan konsentrasi 0,5 mg/mL maka:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$5 \text{ mg/mL} \times V_1 = 0,5 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

Jadi, 1 mL dari larutan stok MTT diencerkan dengan 10 mL media kultur (untuk 1 buah 96-well plate). Setiap sumuran berisi 10 μL larutan MTT.

3.5 Pembuatan Larutan SDS 10%

$$\text{SDS 10\% (b/v)} = \frac{10 \text{ gram}}{100 \text{ mL}}$$

Cara pembuatannya yaitu 10 gram SDS dimasukkan dalam gelas kimia 100 mL, dilarutkan dalam 100 mL aquades.

3.6 Pembuatan Larutan Stok 1000 ppm Ekstrak Kasar dan Isolat Kurkuminoid

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 10 \text{ mg} \\ \text{Volume pelarut} &= 100 \mu\text{L (DMSO)} \\ M &= \frac{10 \text{ mg}}{100 \mu\text{L}} = \frac{10.000 \mu\text{g}}{100 \mu\text{L}} = 100.000 \mu\text{g/mL} \\ M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 1000 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL} &= 100000 \mu\text{g/mL} \times V_2 \\ V_2 &= 0,01 \text{ mL} \\ &= 10 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan mengambil 10 μL ekstrak yang telah dilarutkan dengan 100 μL DMSO menggunakan mikropipet, kemudian ditambahkan 990 μL media kultur RPMI dan diresuspensi hingga homogen.

Lampiran 4. Data dan Perhitungan Hasil Penelitian

4.1 Perhitungan Kadar Air

A. Data Pengukuran Kadar Air Sampel Kering Rimpang Kunyit Putih (*curcuma zedoaria* (Christm.) Berg)

Tabel L.4.1 Berat cawan kosong pada ulangan perlakuan

Ulangan perlakuan	Berat cawan kosong (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
P1	50,8544	48,7046	55,5675
P2	50,8536	48,7018	55,5658
P3	50,8558	48,7035	55,5691
Rata-rata berat	50,8546	48,7033	55,5675

Berat cawan + sampel sebelum dioven:

1. Cawan 1 = 55,8564
2. Cawan 2 = 53,7039
3. Cawan 3 = 60,5693

Tabel L.4.2 Berat cawan kosong dan sampel pada ulangan perlakuan

Ulangan perlakuan	Berat cawan + sampel (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
P1	55,7828	53,6302	60,4931
P2	55,7185	53,5720	60,4323
P3	55,692	53,5401	60,400
Rata-rata berat	55,7311	53,5807	60,4418

B. Perhitungan Kadar Air Sampel Kering Rimpang Kunyit Putih (*curcuma zedoaria* Christm. Berg)

Adapun rumus perhitungan kadar air adalah:

$$\text{Kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100\%$$

Keterangan a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{55,8564 \text{ gram} - 55,7311 \text{ gram}}{55,8564 \text{ gram} - 50,8546 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= \frac{0,1253 \text{ gram}}{5,0018 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 2,5\% \end{aligned}$$

Tabel L.4.3 Hasil kadar air pada sampel kering rimpang kunyit putih

Ulangan perlakuan	Berat konstan cawan kosong	Berat cawan + sampel sebelum dikeringkan	Berat cawan + sampel setelah dikeringkan	Hasil kadar air (%(b/b))
P1	50,8546	55,8564	55,7311	2,5
P2	48,7033	53,7039	53,58077	2,46
P3	55,5675	60,5693	60,4418	2,55
Hasil rata-rata kadar air				2,503

4.2 Perhitungan Randemen

Ekstrak Pekat Kurkuminoid

Berat sampel = 60 gram

Berat ekstrak pekat = 13,2 gram

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Randemen} = \frac{13,2 \text{ gram}}{60 \text{ gram}} \times 100\% = 22\%$$

Tabel L.4.4 Hasil randemen ekstrak pekat dan fraksi air

Sampel	Berat sampel (gram)	Berat ekstrak pekat (gram)	% Randemen (b/b)
Ekstrak Pekat	60	13,2	22
Ekstrak Fraksi Air	6	0,576	9,505

4.3 Perhitungan Data dan Hasil Uji Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro* metode MTT

A. Perhitungan konsentrasi sel

- Pengamatan jumlah sel kanker payudara T47D dengan *hemacytometer* di bawah mikroskop *inverted*

Kuadran A 126	Kuadran B 96
Kuadran C 109	Kuadran D 99

- Pengamatan jumlah sel vero dengan *hemacytometer* di bawah mikroskop *inverted*

Kuadran A 67	Kuadran B 35
Kuadran C 46	Kuadran D 34

*** Jumlah sel yang dihitung (mL^{-1})**

1. Sel Kanker Payudara T47D

Rata-rata jumlah sel

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

$$= \frac{126 + 96 + 109 + 99}{4} \times 10^4$$

$$= 107,5 \times 10^4 / \text{mL}$$

2. Sel Vero

Rata-rata jumlah sel

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

$$= \frac{67 + 35 + 46 + 34}{4} \times 10^4$$

$$= 45,45 \times 10^4 / \text{mL}$$

***Jumlah mL panen sel yang ditransfer (konsentrasisel)**

1. Sel kanker payudara T47D

$$\text{Jumlah mL panen sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung}}$$

$$= \frac{100 \times 10^4}{100 \times 10^4 / \text{mL}}$$

$$= 1 \text{ mL}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 1 mL, ditambahkan 9 mL media kultur RPMI (MK) karena setiap sumuran akan diisi 100 μL MK berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = $100 \mu\text{L} \times 100$ sumuran = 10000 μL atau 10 mL.

2. Sel Vero

$$\text{Jumlah mL panen sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung}}$$

$$= \frac{100 \times 10^4}{45,45 \times 10^4 / \text{mL}} = 2,2 \text{ mL}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 2,2 mL, ditambahkan 7,8 mL media kultur M199 (MK) karena setiap sumuran akan diisi 100 μL MK berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = $100 \mu\text{L} \times 100$ sumuran = 10000 μL atau 10 mL.

B. Perhitungan Prosentase Sel Hidup

B.1 Sel kanker Payudara T47D

Tabel L.4.5 Rata-rata absorbansi kontrol sel dan kontrol media pada sel T47D

No.	Absorbansi kontrol sel	Absorbansi kontrol media
1.	1,121	0,083
2.	1,110	0,083
3.	1,118	0,089
Rata-rata	1,116	0,085

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100\%$$

Keterangan: A = absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel)

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif/kontrol sel (sel + media kultur)

= konsentrasi yang digunakan untuk menghitung IC₅₀

1. Fraksi etanol (Ekstrak kasar kurkuminoid)

Tabel L.4.6 Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada ekstrak kasar

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000	0,063	0,063	0,061	0,062	-2,198
500	0,098	0,088	0,087	0,091	0,582
250	0,138	0,126	0,138	0,134	4,751
125	0,404	0,401	0,403	0,403	30,801
62.5	0,871	0,554	0,679	0,701	59,761
31.25	1,187	1,097	1,058	1,114	99,774
15.625	0,964	1,05	1,061	1,025	91,144

2. Isolat 1

Tabel L.4.7 Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada Isolat 1

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000	1,052	0,92	0,74	0,904	89,359
500	1,038	1,009	1,035	1,027	102,865
250	0,851	1,014	1,119	0,995	99,288
125	1,07	1,071	1,038	1,059	106,406
62.5	0,985	1,022	1,126	1,044	104,727
31.25	1,084	1,13	1,089	1,101	110,933
15.625	1,077	0,922	1,073	1,024	102,500

3. Isolat 2

Tabel L.4.8 Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada Isolat 2

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000	0,108	0,088	0,114	0,103	1,55
500	0,115	0,109	0,106	0,11	2,149
250	0,22	0,215	0,276	0,237	13,526
125	0,629	0,632	0,619	0,627	48,432
62.5	1,033	0,978	0,914	0,975	79,636
31.25	1,025	1,016	1,007	1,016	83,308
15.625	1,025	1,005	1,014	1,015	83,189

4. Isolat 5

Tabel L.4.9 Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada Isolat 5

Konsentras i	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000	0,294	0,983	0,964	0,747	64,189
500	1,023	1,01	0,777	0,937	82,579
250	1,07	1,111	1,082	1,0877	97,220
125	1,052	1,069	1,113	1,078	96,283
62.5	1,064	1,007	1,078	1,0497	93,536
31.25	1,117	1,019	0,999	1,045	93,083
15.625	0,983	1,029	1,093	1,035	92,114

B.2 Sel Vero

Tabel L.4.10 Rata-rata absorbansi pada kontrol sel dan kontrol media pada sel Vero

No.	Absorbansi kontrol sel	Absorbansi kontrol media
	0,669	0,068
	0,617	0,063
	0,595	0,060
Rata-rata	0,627	0,064

1. Fraksi etanol (ekstrak kasar)

Tabel L. 4.11 Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada fraksi etanol (ekstrak kasar)

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000	0,127	0,116	0,13	0,124	10,769
500	0,187	0,21	0,203	0,2	24,201
250	0,49	0,508	0,423	0,474	72,781
125	0,627	0,652	0,556	0,612	97,278
62,5	0,703	0,658	0,693	0,685	110,237
31,25	0,682	0,685	0,141	0,503	77,929
15,625	0,637	0,59	0,698	0,642	102,603

2. Isolat 5

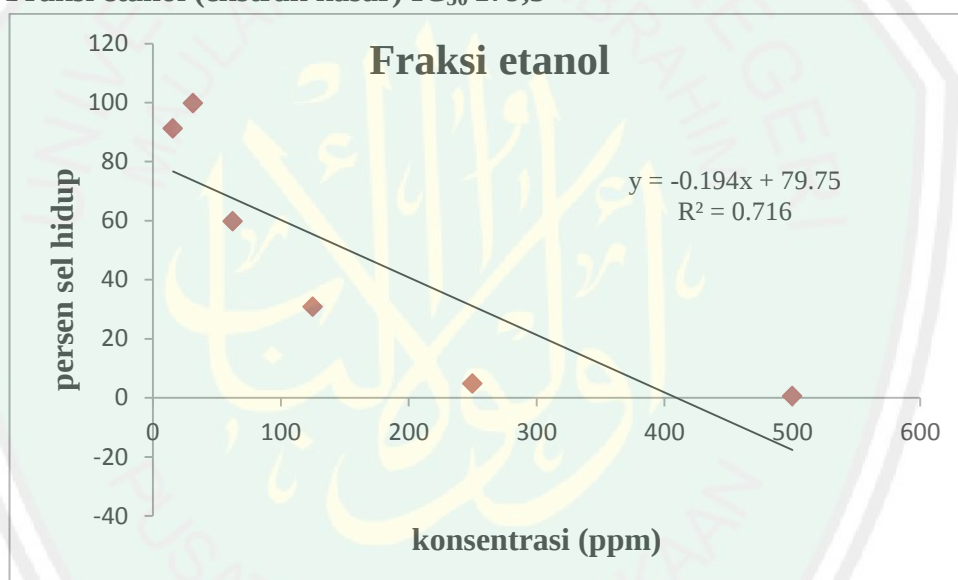
Tabel L.4.12 Persen sel hidup dengan berbagai konsentrasi pada isolat 5

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000	0,678	0,669	0,65	0,666	106,864
500	0,679	0,673	0,681	0,678	108,994
250	0,606	0,69	0,66	0,652	104,438
125	0,623	0,631	0,653	0,636	101,538
62.5	0,593	0,626	0,703	0,641	102,426
31.25	0,628	0,316	0,529	0,491	75,858
15.625	0,568	0,67	0,49	0,576	90,947

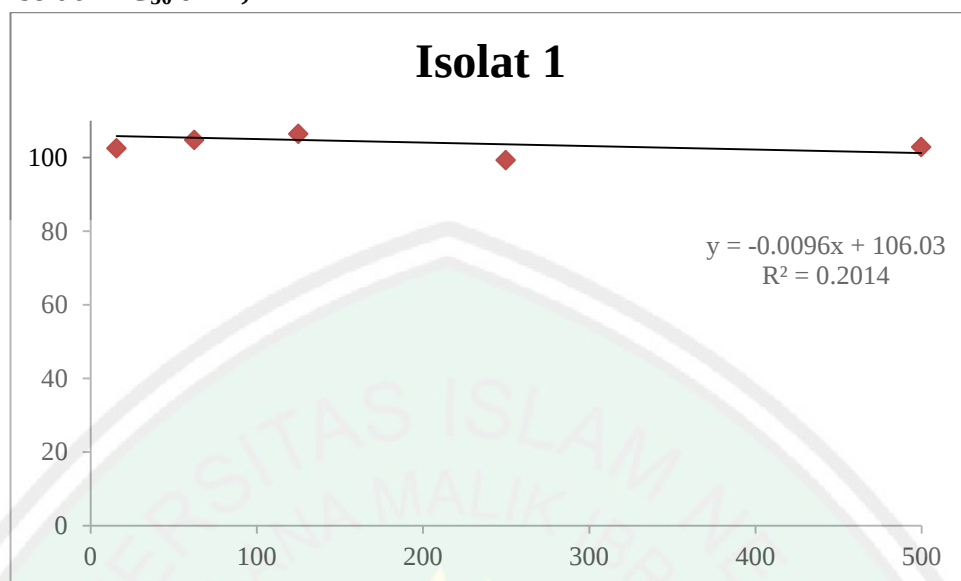
C. Hasil perhitungan IC_{50} dengan Microsoft Excell

1. Sel Kanker Payudara T47D

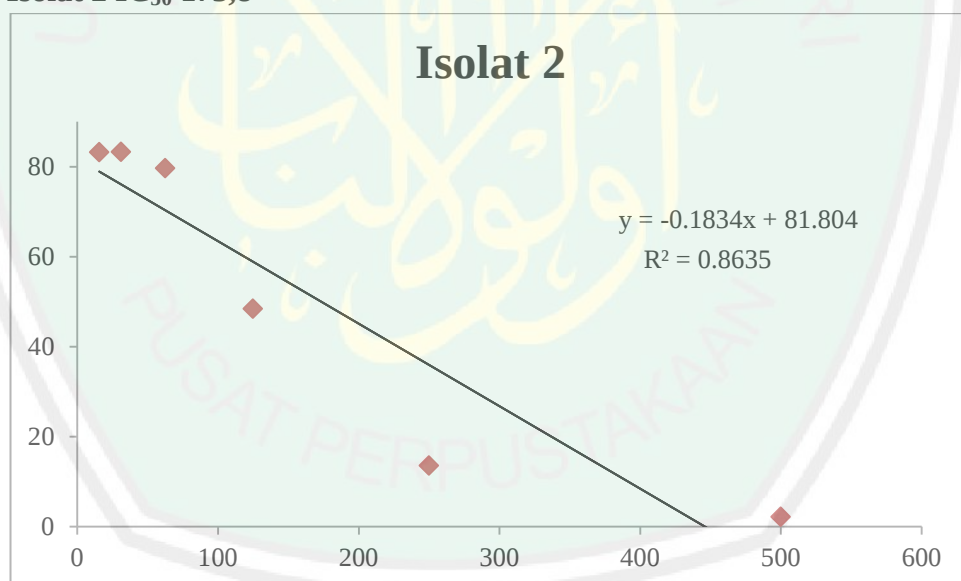
❖ Fraksi etanol (ekstrak kasar) IC_{50} 179,5



Gambar L.4.1 Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel T47D pada ekstrak kasar

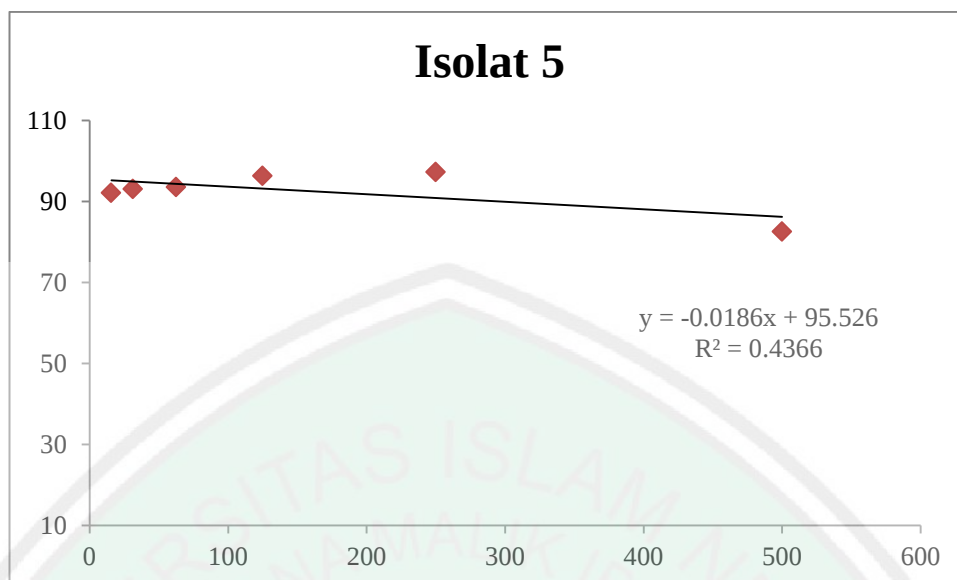
❖ **Isolat 1 IC₅₀ 6222,2**

Gambar L.4.2 Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel T47D pada Isolat 1

❖ **Isolat 2 IC₅₀ 173,8**

Gambar L.4.3 Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel T47D pada Isolat 2

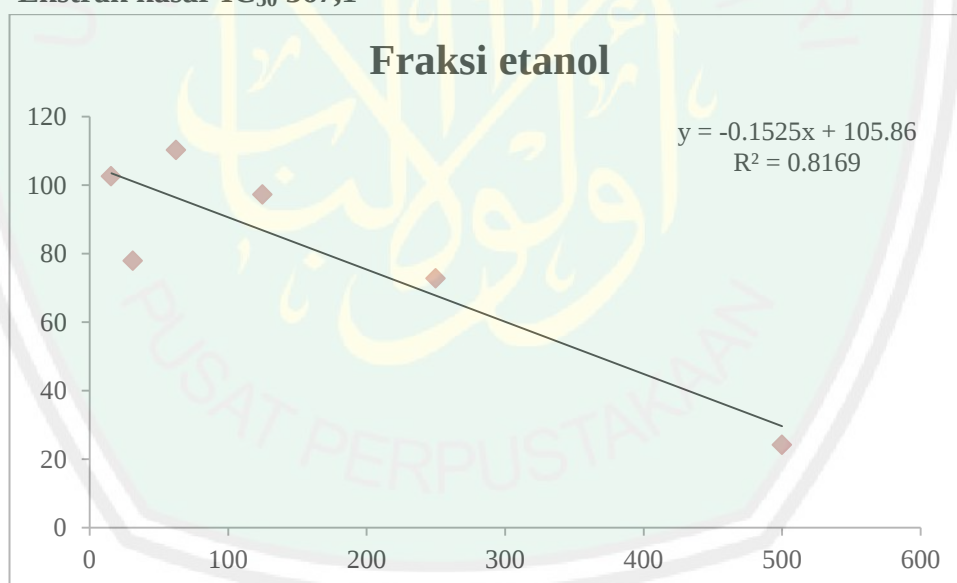
❖ **Isolat 5 IC₅₀ 2528,9**



Gambar L.4.4 Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel T47D pada Isolat 5

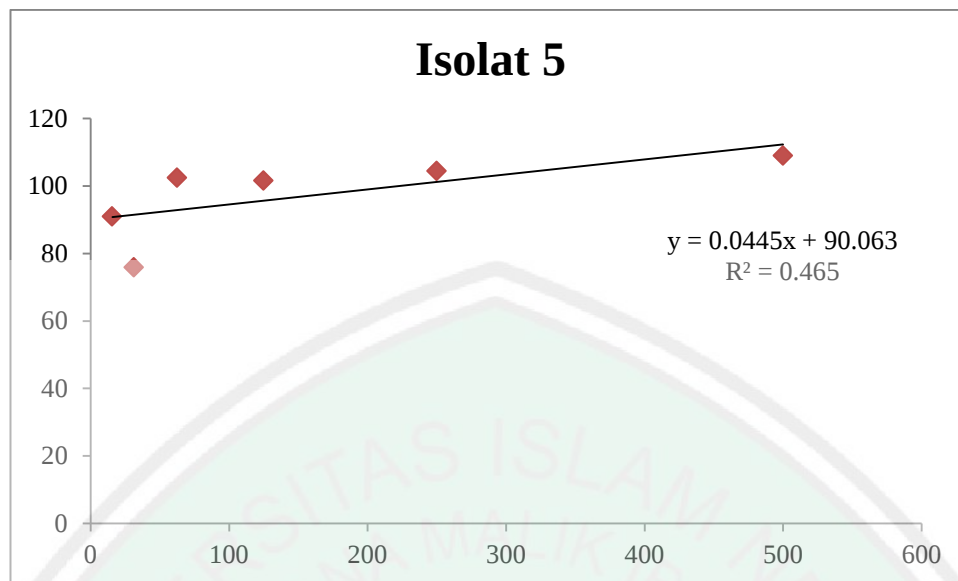
2. Sel Vero

❖ Ekstrak kasar IC_{50} 367,1



Gambar L.4.5 Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel Vero pada ekstrak kasar

❖ Isolat 5 IC_{50} 910,4



Gambar L.4.6 Grafik korelasi antara konsentrasi dengan persen sel hidup terhadap sel Vero pada Isolat 5

4.4 Hasil Resolusi Variasi Eluen pada KLT Analitik

Tabel L.4.13 Hasil resolusi berbagai eluen pada KLT Analitik

No.	Eluen	Jarak antar noda (x) (cm)	Lebar noda (cm) (LN)	Nilai Resolusi
1.	Kloroform: n-heksana: metanol (1:1:0,1)	X₁₋₂ = 0,6 cm X₂₋₃ = 1,2 cm	LN 1 = 0,1 cm LN 2 = 0,2 cm LN 3 = 0,4 cm	R₁₋₂ = 1,41 R₂₋₃ = 1,41
2.	Kloroform: etanol: asam asetat (94:5:1)	X ₁₋₂ = 0,3 cm X ₂₋₃ = 0,05 cm	LN 1 = 0,5 cm LN 2 = 0,2 cm LN 3 = 0,3 cm	R ₁₋₂ = 0,3 R ₂₋₃ = 0,07
3.	Kloroform: metanol (19:1)	X ₁₋₂ = 0,1 cm X ₂₋₃ = 0,2 cm	LN 1 = 1,4 cm LN 2 = 1,1 cm LN 3 = 1,9 cm	R ₁₋₂ = 0,028 R ₂₋₃ = 0,047
4.	Kloroform: etanol (98:2)	X ₁₋₂ = 0,2 cm X ₂₋₃ = 0,4 cm	LN 1 = 0,6 cm LN 2 = 1,3 cm LN 3 = 2,2 cm	R ₁₋₂ = 0,0744 R ₂₋₃ = 0,08
5.	Diklorometana: metanol (95:5)	X ₁₋₂ = 0,4 cm X ₂₋₃ = 0,3 cm	LN 1 = 0,2 cm LN 2 = 0,1 cm LN 3 = 0,3 cm	R ₁₋₂ = 0,9428 R ₂₋₃ = 0,53

Lampiran 5. Dokumentasi

5.1 Serbuk Rimpang Kunyit Putih



Gambar L.5.1 Serbuk rimpang kunyit putih

5.2 Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro*

1. Morfologi sel kanker payudara T47D dan sel vero setelah treatment



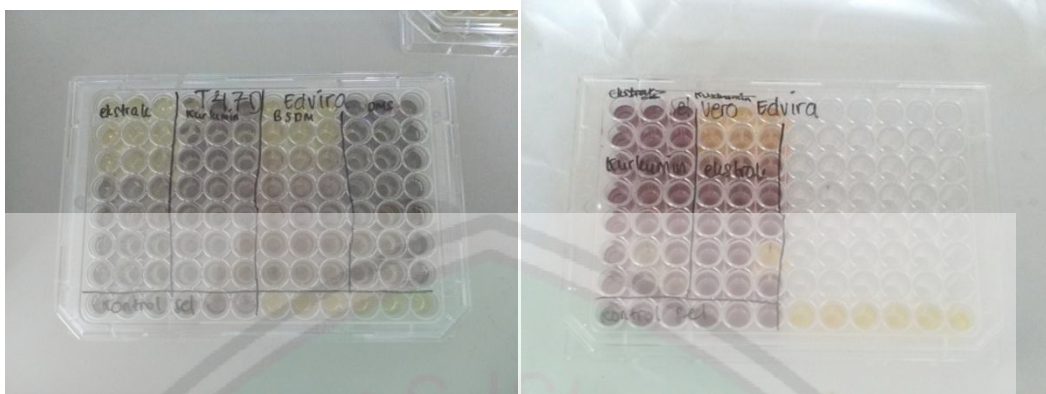
Gambar L.5.2 Morfologi (a) sel kanker payudara T47D dan (b) sel Vero konfluen 80%

2. Sebelum pemberian MTT dan stopper SDS



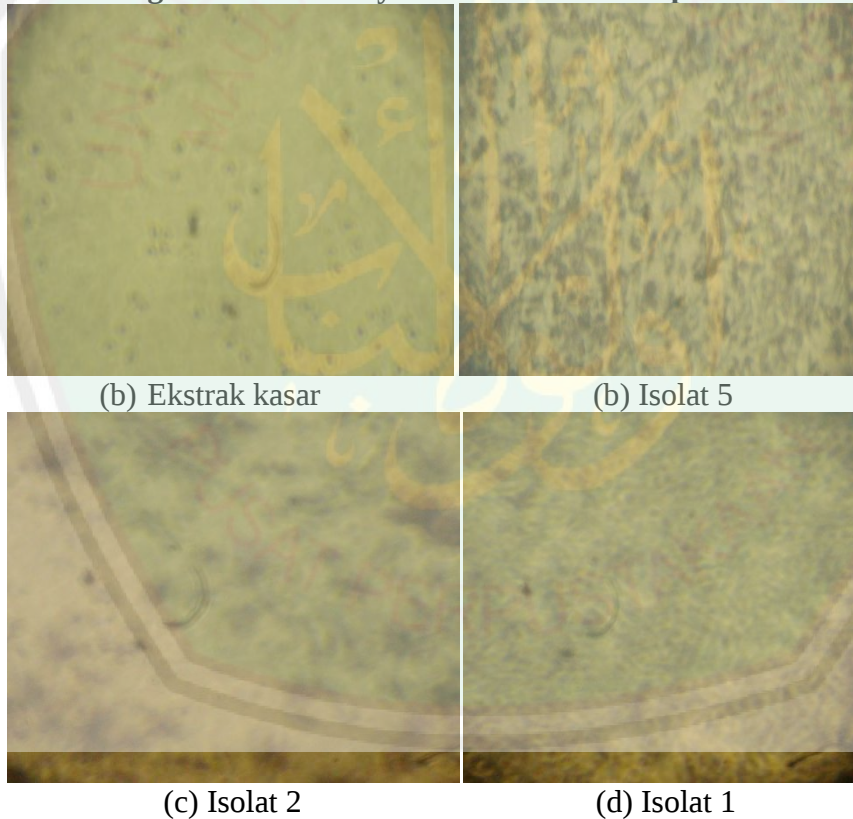
Gambar L.5.3 Warna sampel pada *plate* sebelum pemberian MTT dan stopper SDS

3. Setelah pemberian MTT dan stopper SDS



Gambar L.5.4 Warna sampel pada *plate* setelah pemberian MTT dan stopper SDS

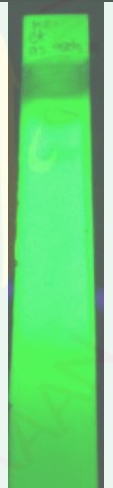
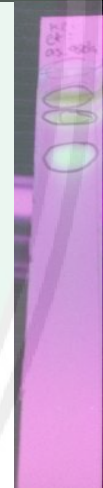
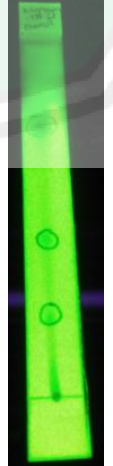
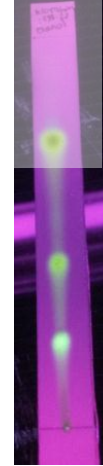
4. Morfologi Sel Kanker Payudara T47D setelah pemberian Sampel

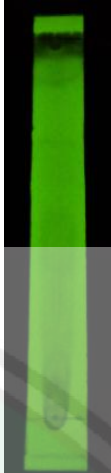
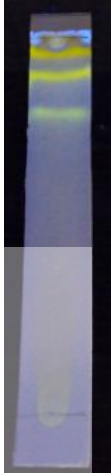


Gambar L.5.5 Morfologi sel kanker payudara T47D setelah pemberian sampel

5.3 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLT Analitik

Tabel L.5.1 Hasil KLT Analitik fraksi air ekstrak rimpang kunyit putih pada berbagai eluen

No.	Eluen	Sinar Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1.	Kloroform: metanol (19:1)			
2.	Kloroform: etanol: asam asetat (94:5:1)			
3.	Kloroform: etanol (98:2)			

4.	Diklorometana : methanol (95:5)			
----	--	---	---	---

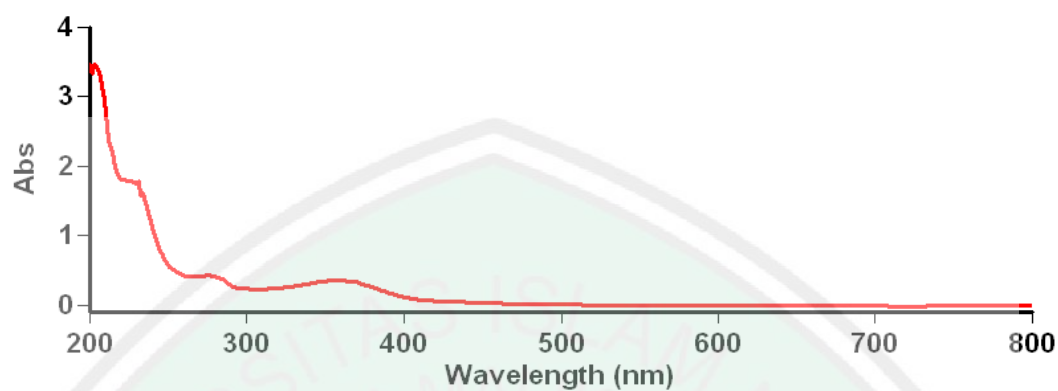
5.4 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLT Preparatif



Gambar L.5.6 Hasil noda pada KLTP di bawah pengamatan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm

5.5 Identifikasi Senyawa Kurkuminoid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

A. Isolat 1



Gambar L.5.7 Hasil spektra UV-Vis Isolat 1 pada rentang panjang gelombang 200-800 nm

Sample Name: Isolat 1

Collection Time

11/13/2017 1:18:59 PM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

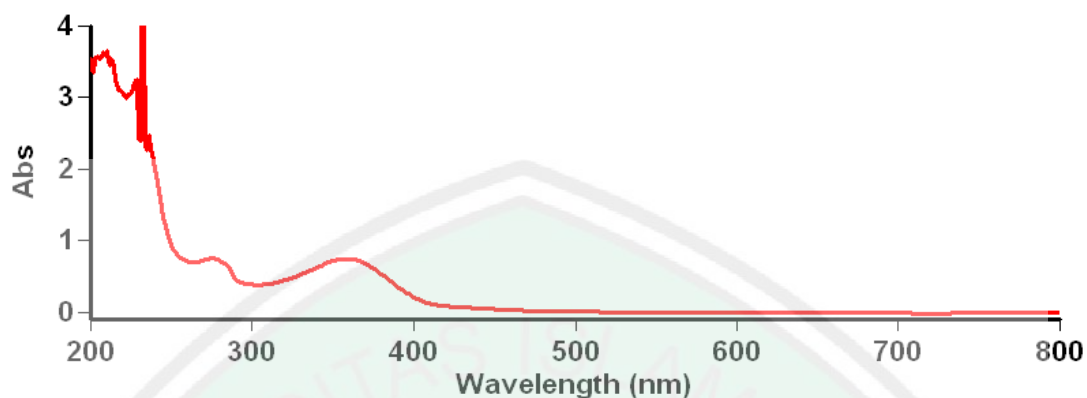
Range

800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)

Abs

636.0	0.003
357.9	0.357
276.1	0.431
234.0	1.612
231.0	1.783
202.9	3.468

B. Isolat 2

Gambar L.5.8 Hasil spektra UV-Vis Isolat 2 pada rentang panjang gelombang 200-800 nm

Sample Name: Isolat 2

Collection Time

11/13/2017 1:16:48 PM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

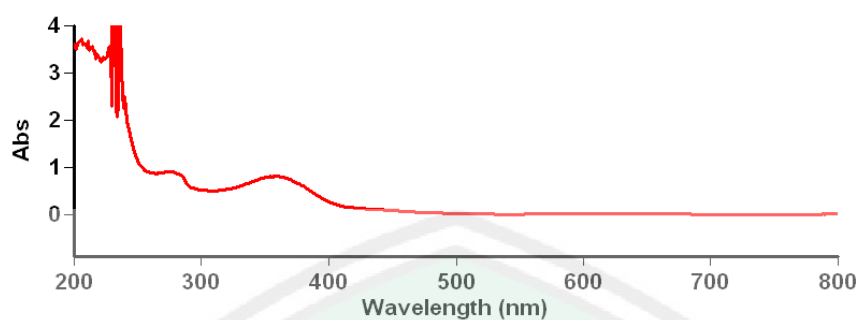
Range

800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)

Abs

602.0	0.004
359.0	0.749
276.1	0.756
236.1	2.471
233.1	10.000
229.0	3.256
213.0	3.543
210.0	3.660
208.0	3.640
204.0	3.577

C. Isolat 5

Gambar L.5.9 Hasil spektra UV-Vis Isolat 5 pada rentang panjang gelombang 200-800 nm

Sample Name: Isolat 5

Collection Time

11/13/2017 1:14:29 PM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)

Abs

357.9	0.803
276.1	0.911
240.0	2.487
236.1	10.000
232.0	10.000
228.1	3.556
223.0	3.350
218.0	3.408
216.0	3.471
213.9	3.568
211.0	3.690
208.0	3.621
205.9	3.730