

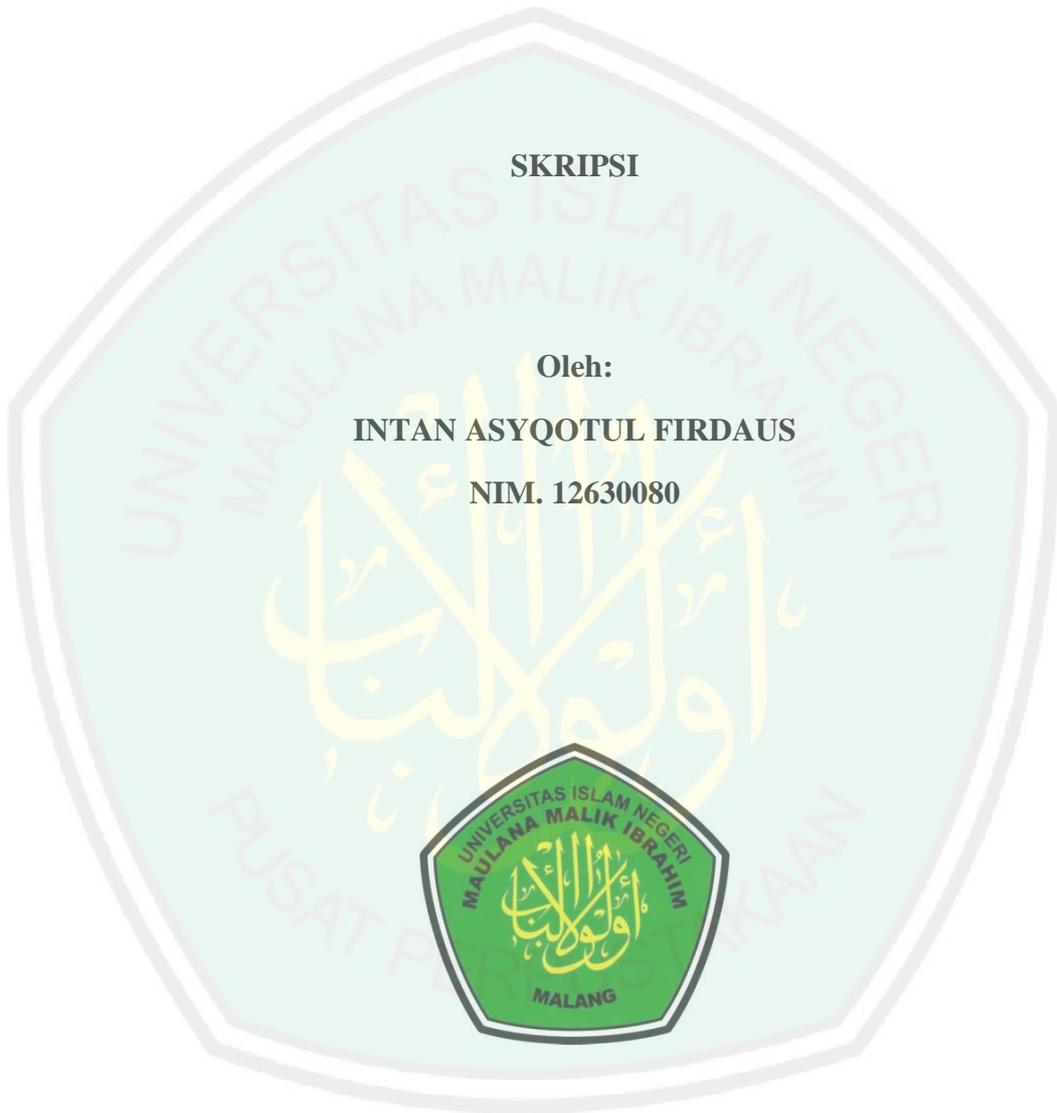
**IDENTIFIKASI TANIN PADA FRAKSI AIR TANAMAN RUMPUT
BAMBU (*Lophatherum Gracile* B.) DAN UJI AKTIVITAS ANTIKANKER
ISOLAT TANIN TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

Oleh:

INTAN ASYQOTUL FIRDAUS

NIM. 12630080



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**IDENTIFIKASI TANIN PADA FRAKSI AIR TANAMAN RUMPUT
BAMBU (*Lophatherum Gracile* B.) DAN UJI AKTIVITAS ANTIKANKER
ISOLAT TANIN TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

Oleh:
INTAN ASYQOTUL FIRDAUS
NIM. 12630080

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

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016

**IDENTIFIKASI TANIN PADA FRAKSI AIR TANAMAN RUMPUT
BAMBU (*Laphatherum Gracile B.*) DAN UJI ANTIKANKER ISOLAT
TANIN TERHADAP SEL KANKER T47D**

SKRIPSI

Oleh
INTAN ASYQOTUL FIRDAUS
NIM. 12630080

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 13 September 2016

Pembimbing I



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620200604 2 002

Pembimbing II



Umaivatus Svarifah, M.A
NIP. 19820925200901 2 005



Mengetahui
Ketua Jurusan Kimia

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620200604 2 002

IDENTIFIKASI TANIN PADA FRAKSI AIR TANAMAN RUMPUT BAMBU (*Laphatherum Gracile B.*) DAN UJI ANTIKANKER ISOLAT TANIN TERHADAP SEL KANKER T47D

SKRIPSI

Oleh
INTAN ASYQOTUL FIRDAUS
NIM. 12630080

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratn
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal 13 September 2016

Penguji Utama	: Suci Amalia, M.Sc NIP. 19821104 200901 2 007	(.....)
Ketua penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Sekretaris Penguji	: Elok Kamlilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Anggota Penguji	: Umaiatus Syarifah, M.A NIP. 19820925 200901 2 005	(.....)

Mengetahui
Ketua Jurusan Kimia



Elok Kamlilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Intan Asyqotul Firdaus
NIM : 12630080
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia
Judul Penelitian : “ Identifikasi Tanin Pada Fraksi Air Tanaman Rumput
Bambu (*Lophatherum Gracile* B.) Dan Uji Aktivitas
Antikanker Isolat Tanin Terhadap Sel Kanker Payudara
T47D”

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 13 September 2016

Yang Membuat Pernyataan,



Intan Asyqotul Firdaus
NIM. 12630080

MOTTO



PERSEMBAHAN

Skripsi ini Saya Persembahkan Teruntuk:

*Ayah dan Ibu tercinta sebagai darma dan baktiku
untukmu, terima kasih untuk limpahan kasih
sayang dan doa yang selalu engkau berikan.*

*Bapak dan Ibu dosen atas segala limpahan ilmu
dan nasehat yang engkau berikan.*

Adikku tersayang beserta keluargaku.

*Calon suami tercinta yang masih dalam
penggladihan-Nya.*

*Jeman-teman tercinta via, melda, aida, dila, ella,
aulin, nilna dan aira. Semoga kita semua
mendapatkan ilmu yang barokah.*

Terimakasih atas motivasi dan do'anya

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada hamba-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir (skripsi) yang berjudul “Identifikasi Tanin Pada Fraksi Air Tanaman Rumpun Bambu (*Lophatherum Gracile* B.) Dan Uji Aktivitas Antikanker Isolat Tanin Terhadap Sel Kanker Payudara T47D” dengan tepat waktu, walaupun 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 tugas akhir 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 penyelesaian tugas akhir ini kepada :

1. Kedua orang tua, adik-adikku beserta keluarga besar yang telah memberi kasih sayang dan semangat tiada henti.
2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul M. drh, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, saran, serta motivasi yang membangun dan sangat bermanfaat bagi penulis.

5. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku konsultan dan ketua penguji, Ibu Umaiatas Syarifah, M.A selaku dosen pembimbing agama dan Ibu Suci Amalia, M.Sc selaku dosen penguji.
6. Seluruh dosen dan laboran Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengalaman wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
7. Rekan-rekan mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya angkatan 2012 yang telah memberikan semangat, motivasi dan pengalaman yang tak pernah terlupakan.

Penyusun menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan dalam penyusunan tugas akhir ini. Namun demikian dengan segala keterbatasan dan kemampuan yang ada, penulis telah berusaha untuk menyelesaikan tugas akhir dengan sebaik-baiknya. Oleh karena itu, penyusun mengharapkan saran dan kritik yang kiranya dapat membawa ke arah yang lebih baik. Akhir kata semoga tugas akhir ini dapat diambil manfaatnya oleh semua pihak, khususnya bagi pembaca. Amin.

Malang, 13 September 2016

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	xii
DAFTAR PERSAMAAN	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
ملخص البحث	xviii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	7
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pemanfaatan Tumbuhan dalam Perspektif Islam	9
2.2 Rumput Bambu	11
2.2.1 Morfologi	11
2.2.2 Klasifikasi	12
2.2.3 Kandungan Kimia Rumput Bambu	13
2.3 Kanker	13
2.3.1 Sel Kanker Payudara T47D	13
2.3.2 Analisis dengan ELISA Reader	15
2.4 Metode Pemisahan Senyawa Aktif Tanaman Rumput Bambu	16
2.4.1 Ekstraksi Maserasi	16
2.4.2 Ekstraksi Cair-Cair	18
2.4.3 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif	19
2.5 Uji Kualitatif Senyawa Tanin	20
2.6 Uji Aktivitas Antikanker secara <i>In-Vitro</i> dengan Metode MTT	21
2.7 Tanin	24
2.7.1 Penggolongan Tanin	24
2.7.2 Tanin Berpotensi Sebagai Antikanker	28
2.8 Identifikasi Tanin dengan LC-MS	29

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	31
3.2	Alat dan Bahan Penelitian	31
3.2.1	Alat Penelitian	31
3.2.2	Bahan Penelitian	31
3.3	Rangan Penelitian.....	32
3.4	Tahapan Penelitian	32
3.5	Pelaksanaan Penelitian	33
3.5.1	Preparasi Sampel.....	33
3.5.2	Analisis Kadar Air	33
3.5.3	Ekstraksi Senyawa Aktif Tanin Tanaman Rumput Bambu Menggunakan Maserasi dengan Metode Modifikasi.....	34
3.5.4	Uji Kualitatif Ekstrak Tanin dengan Reagen.....	35
3.5.5	Identifikasi Senyawa Tanin dengan LC-MS.....	36
3.5.6	Pemisahan Senyawa Tanin	37
3.5.6.1	Pemisahan Menggunakan KLT Analitik.....	37
3.5.6.2	Pemisahan Senyawa Aktif Tanin dengan KLT Preparatif ..	38
3.5.7	Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT	39
3.5.7.1	Penyiapan Sel	39
3.5.7.2	Penghitungan Sel Kanker	40
3.5.7.3	Peletakan Sel pada <i>Plate</i>	40
3.5.7.4	Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada <i>Plat</i>	41
3.5.7.5	Pemberian Larutan MTT	41
3.6	Analisis data	42

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Preparasi Sampel.....	44
4.2	Analisis Kadar Air	45
4.3	Ekstraksi dengan Metode Maserasi dan Metode Partisi	45
4.4	Uji Fitokimia Ekstrak Rumput Bambu dengan Reagen.....	49
4.4.1	Uji Fitokimia Tanin Menggunakan $FeCl_3$ 1 %	50
4.4.2	Uji Fitokimia Tanin Menggunakan Larutan Gelatin.....	52
4.4.3	Uji Fitokimia Tanin Katekol dan Galat.....	52
4.5	Identifikasi Senyawa dengan UPLC/QToF/MS/MS System (Water)...	54
4.5.1	Pemisahan Senyawa dengan UPLC dan Identifikasi Senyawa dengan UPLC/QToF/MS/MS System (Water)	54
4.6	Pemisahan Senyawa Tanin dengan KLT Analitik	65
4.7	Pemisahan Senyawa Tanin dengan KLTP reparatif	69
4.8	Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT.....	70
4.9	Pemanfaatan Rumput Bambu (<i>Lophatherum gracile</i> B.) sebagai Obat Dalam Perspektif Islam	77

BAB V PENUTUP

5.1	Kesimpulan	82
5.2	Saran.....	82

DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN	90

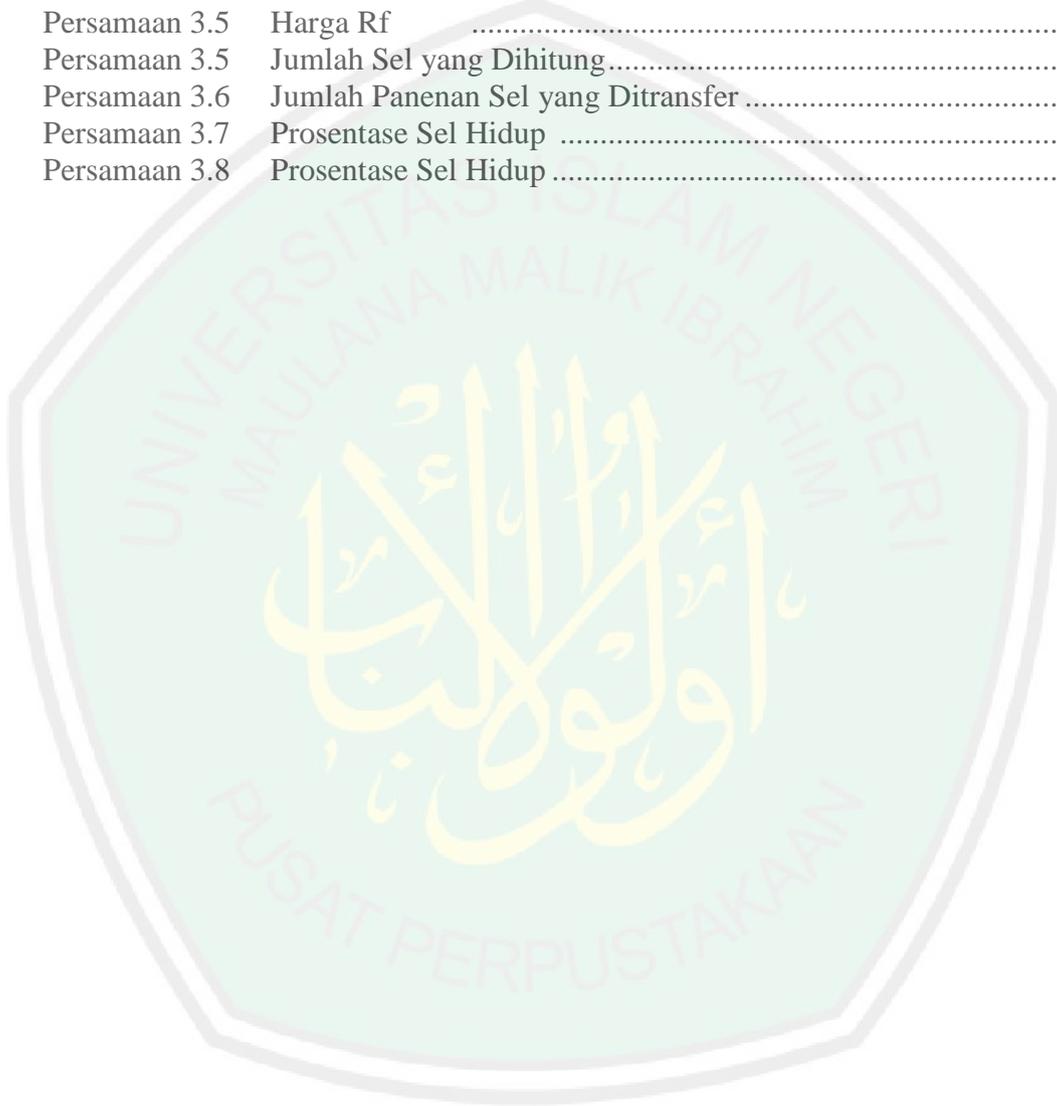


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman Rumput Bambu(<i>Lophatherum gracile</i> B.)	12
Gambar 2.2	Hasil Reaksi dugaan antara senyawa tanin dengan FeCl ₃	20
Gambar 2.3	Reaksi tanin dengan gelatin.....	21
Gambar 2.4	Reaksi Reduksi MTT	23
Gambar 2.5	Struktur Senyawa Tanin	24
Gambar 2.6	Proantosianidin atau flavolan (1), katekin (2), afzelekin (3).....	24
Gambar 2.7	Spektra massa dari flavon-3ols.....	25
Gambar 2.8	Fragmentasi dari senyawa prosianidin dimer.....	25
Gambar 2.9	Struktur gallotanin (1) dan asam galat (2).....	26
Gambar 2.10	Fragmentasi dari gallotanin (tetra-O-galloyl-glucose).....	27
Gambar 2.11	Kromatogram ellagitanin pada panjang gelombang 280 nm	28
Gambar 4.1	Reaksi tanin dengan FeCl ₃	50
Gambar 4.2	Kromatogram UPLC hasil pemisahan senyawa dalam fraksi etil asetat Rumput Bambu	56
Gambar 4.3	Spektra massa dari katekin.....	57
Gambar 4.4	Struktur senyawa katekin	58
Gambar 4.5	Spektra massa dari <i>trigalloyl-diglucose</i>	58
Gambar 4.6	Fragmentasi <i>Trigalloyl-diglucose</i> 4.5.a pada tR 4,973.....	59
Gambar 4.7	Fragmentasi <i>Triagalloyl-diglucose</i> 4.5.b tR 4,712.....	60
Gambar 4.8	Spektra <i>Ellagic acid glucoside</i>	60
Gambar 4.9	Fragmentasi <i>Ellagic acid glucoside</i>	61
Gambar 4.10	Spektra massa dari <i>Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl</i>	62
Gambar 4.11	Fragmentasi dari <i>Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl</i>	62
Gambar 4.12	Spektra massa <i>Trigalloyl (2R, 3R)-Tetrahydro-2H-Pyran-2,4,5- Tetraol</i>	63
Gambar 4.13	Fragmentasi <i>Trigalloyl(2R,3R)-Tetrahydro-2Pyran2,4,5Tetraol</i> ..	64
Gambar 4.14	Hasil KLTA stanin dengan eluen n- butanol:asam asetat:air.....	67
Gambar 4.15	Kenampakan morfologi sel T47D	72
Gambar 4.16	Kenampakan morfologi sel T47D setelah di <i>treatment</i>	73

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1	Kadar Air	34
Persamaan 3.2	Faktor Koreksi	34
Persamaan 3.3	Kadar Air Terkoreksi	34
Persamaan 3.4	Rendemen	35
Persamaan 3.5	Harga Rf	38
Persamaan 3.5	Jumlah Sel yang Dihitung.....	40
Persamaan 3.6	Jumlah Panenan Sel yang Ditransfer	40
Persamaan 3.7	Prosentase Sel Hidup	42
Persamaan 3.8	Prosentase Sel Hidup	42



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan pelarut	17
Tabel 2.2	Identifikasi tannin berdasarkan waktu retensi.....	30
Tabel 4.1	Hasil maserasi serbuk rumput bambu	48
Tabel 4.2	Data hasil uji fitokimia tannin.....	49
Tabel 4.3	Senyawa yang diduga terdapat dalam fraksi air Rumput Bambu	56
Tabel 4.4	Identifikasi senyawa yang terdapat dalam fraksi air	65
Tabel 4.5	Data penampakan noda hasil KLTA rumput bambu	66
Tabel 4.6	Hasil KLTA ekstrak tanin daun rumput bambu dengan BAA (4:1:5).....	68
Tabel 4.7	Hasil pemisahan senyawa tanin dari Rumput Bambu dengan eluen n-butanol: asam asetat: air (4:1:5).....	69
Tabel 4.8	Data nilai IC ₅₀ uji aktivitas antikanker.....	75



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Diagram Alir Penelitian.....	90
Lampiran 2	Skema Kerja	91
Lampiran 3	Perhitungan Serta Cara Pembuatan Reagen dan Larutan	98
Lampiran 4	Data dan Perhitungan Hasil Penelitian	101
Lampiran 5	Dokumentasi	113



ABSTRAK

Firdaus, I. Asyqotul. 2016. Identifikasi Tanin Pada Fraksi Air Tanaman Rumput Bambu (*Lophatherum Gracile* B.) dan Uji Aktivitas Antikanker Isolat Tanin Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Umaiyatus Syarifah, M.A; Konsultan: A. Ghanaim Fahsya, M. Si.

Kata Kunci : Rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.), sel kanker payudara T47D, *in-vitro*, *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS) dan metode MTT.

Rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) merupakan salah satu tanaman gulma yang sering dimanfaatkan sebagai obat, hampir seluruh bagian dari tumbuhan ini mengandung golongan senyawa golongan tanin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui jenis dari senyawa tanin yang berada dalam fraksi air dengan instrument *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS) dan untuk uji aktivitas antikanker dari ekstrak, fraksi air dan isolat tanin rumput bambu terhadap sel kanker payudara T47D.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi maserasi dengan pelarut aseton dan air (7:3) dan dipartisi dengan kloroform dan etil asetat. Ekstrak hasil maserasi dan partisi diuji fitokimia dan kemudian identifikasi tanin pada fraksi air menggunakan instrument *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS). Pemisahan golongan senyawa aktif dengan KLTA untuk mengetahui pelarut terbaik dan pemisahan dengan KLTP untuk mendapatkan isolat dengan pelarut n-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5). Ekstrak aseton : air (7:3), fraksi air dan isolat tanin yang didapat diuji aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D secara *in-vitro* dengan metode MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*).

Berdasarkan hasil uji fitokimia ekstrak tannin dan fraksi rumput bambu mengandung golongan senyawa tanin katekin dan tanin galat. Berdasarkan hasil analisis dengan instrument *Liquid Chromatography–Mass Spectroscopy* (LC-MS), diduga ada 5 golongan senyawa tanin yaitu *catechin*; *Ellagic–acid–glucoside 2-ethyl-3,4,5-trimethyl–tetrahydrofuran*; *Ellagic Acid–Gallic Acid Galloyl*; *trigalloyl (2R,3R)-tetrahydro-2H–pyran-2,4,5-tetraol* dan *Triagalloyl–diglucose*. Nilai IC₅₀ keempat ekstrak rumput bambu yaitu ekstrak aseton : air (7 : 3), fraksi air, isolat tanin 1 dan isolat tanin 2 berturut-turut 5,144; 30,989; 16,899 dan 2,046 µg/mL, dari keempat ekstrak tersebut yang memiliki sitotoksik tertinggi adalah isolat 2.

ABSTRACT

Firdaus, I. Asyqotul. 2016. Identification Tannin of Fraction Water Bamboo Grass (*Lophatherum gracile* B.) and Anticancer Activity Test Isolate Tannin to Breast Cancer Cells T47D. Supervisor: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor of Religion: Umaiyyatus Syarifah, M.A; Consultant: A. Ghanaim Fahsya, M. Si.

Key Word : Bamboo grass (*Lophatherum gracile* B.), Breast Cancer cells T47D, *in vitro*, *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS) and *MTT assay*

Bamboo grass (*Lophatherum gracile* B.) is one weed plant that is often used as a drug, nearly all parts of this plant contain a class of compounds tannin. This study was conducted to identification tannin compounds of fraction water which instrument *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS) and to determine the anticancer activity of extracts and fractions etil acetate, isolate tannin 1 and isolate tannin 2 of bamboo grass against T47D breast cancer cells.

Extraction method used is the extraction maceration with acetone : water (7:3), partitioned with chloroform and etile acetat. Result of extracts maseration and partition tested phytochemical and identification tannin of fraction water which instrument *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS). Separation of tannin compounds using TLC analysis to know the best eluent and using method TLC preparif with solution n-butanol: acetate acid: water (BAA) (4:1:5). Anticancer activity against of eksracts, fraction water and islotae tannin to breast cancer cells T47D *in vitro* with method MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*).

Based on the results of a test of phytochemical extract and faction of grass bamboo the compound containing tannin katekin and tannin galat. The results identification tannin which instrument *Liquid Chromatography–Mass Spectroscopy* (LC-MS) separated 5 compound tannin there are *catechin*; *Ellagic–acid-glucoside 2-ethyl-3,4,5-trimethyl – tetrahydrofuran*; *Ellagic Acid - Gallic Acid Galloyl*; *trigalloy (2R,3R) - tetrahydro- 2H–pyran-2,4,5-t etraol* and *Triagalloy-diglucose*. IC_{50} value of bamboo grass extract acetone : water (7:3) , the fraction water, isolate tannin 1 and isolate tannin 2 respectively 5,144, 30,989, 16,899 dan 2,046 $\mu\text{g/mL}$, of the four extracts which have the highest cytotoxic isolate tannin 2.

ملخص

الفردوس و، أشقة. 2016. تحديد التانين جزء من الماء في العشب الخيزران (*Lophatherum Gracile B.*) و اختبار النشاط المضادة للسرطان يعزل التانين في خلية سرطان الثدي. T47D. المشرفة لأول: إيلوك كاميلة هياتي الماجستير، المشرفة الثان: أمية الشريفة الماجستير. ومستشار: أ غن عم فشا، الماجستير.

كلمات الرئيسية: العشب الخيزران (*Lophatherum Gracile B.*)، خلية سرطان الثدي T47D، اللوني السائل وقداس الطيفي، في المختبر، م ت ت

العشب الخيزران (*Lophatherum Gracile B.*) هي الأعشا والتي كثيرا ما تستخدم كدواء، ما يقرب من جميع أجزاء هذه النبات تحتوي على العفص فئة من المركبات التانين. وقد أجريت هذه الدراسة لتحديد نوع مركبات التانين التي هي في خلايا جزء الإيثيل مع أداة اللوني السائل وقداس الطيفي واختبار النشاط المضادة للسرطان من استخراج، جزء خلايا الإيثيل وعزل التانين العشب الخيزران على خلايا سرطان الثدي T47D.

طريقة الاستخراج تستخدم م هو استخراج النقع باستخدام الأستون والماء (7:3)، وتقسيم مع خلايا الإيثيل والكلو رو فورم. ثم اختبر فيتو الكيمائي ثم تحديد التانين باستخدام أداة اللوني السائل وقداس الطيفي فصل المركبات النشطة مع اللوني طبقة رقيقة التحضيرية مع المذيبات ن بيوتانول: حمض الخليك: المياه (ن- بيوتانول :وحامض الخليك ; الماء) (4 : 1 : 5). استخراج الأستون: المياه (7 : 3)، جزء الإيثيل خلايا العزلة التانين الذي يستطيع ان يختبر النشاط المضادة للسرطان على خلايا سرطان الثدي T47D في المختبر عن طريق م ت ت (*2,5-diphenyltetrazolium-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-bromide*).

وبناء على الاختبار الكيمائي النباتي استخراج التانين و جزء من العشب الخيزران يحتوي على فئة من التانين مركبات كاتيكن والتانين الخطأ. وفقا لتحليل من أداة اللوني السائل وقداس الطيفي، وهناك خمسة أنواع من مركبات يشتهب في التانين أعني-*Ellagic Acid*; *Triagalloyl-diglucose*; *Gallic Acid Galloyl*; *Ellagic-acid-glucoside 2-ethyl-3,4,5-trimethyl-trigalloyl (2R,3R)-tetrahydro-2H-pyran-2,4,5-tetrahydrofuran*; قيمة IC₅₀ من الرابعة مقتطفات من العشب الخيزران هو استخراج الأستون: المياه (7 : 3)، جزء الإيثيل خلايا، العفص التانين 1 و2 على التوالي 5.144، 30.989، 16.899 و2.046 ميكروغرام /مل، من الرابعة مقتطفات منها يكون السامة للخلايا وأقصاها يعنالعزلة.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan di sekitarnya (*invasive*) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah, dan menyerang organ-organ penting serta saraf tulang belakang. Sel kanker akan membelah terus meskipun tubuh tidak memerlukannya, sehingga akan terjadi penumpukan sel baru. Penumpukan sel tersebut mendesak dan merusak jaringan normal, sehingga mengganggu organ yang ditempatinya (Mangan, 2009).

Kanker payudara dapat didefinisikan sebagai tumor ganas atau kumpulan sel kanker yang berkembang dari sel-sel payudara yang pada umumnya terjadi pada saluran atau lobus ASI. Laporan terbaru WHO memprediksi angka yang mengerikan. Kanker tersebut merupakan penyebab utama kematian wanita di berbagai belahan dunia. Organisasi kesehatan dunia (WHO) mencatat bahwa pasien kanker payudara meningkat sebanyak 13 juta orang dalam kurun waktu 4 tahun (2008 – 2012), nomor 2 terbanyak setelah kanker leher rahim, dimana 70 persennya berada di negara-negara berkembang seperti di Indonesia (KemenKes, 2012).

Kanker payudara merupakan kanker dengan angka kejadian tertinggi yang diderita oleh para wanita di Indonesia. Statistik dari Kementerian Kesehatan Indonesia mencatat prevalansi penderita kanker payudara di Indonesia adalah sebanyak 26 dari 100 ribu perempuan pada tahun 2012 dengan jumlah kunjungan

pasien sebanyak 2.089 kasus. Kanker payudara menempati urutan pertama selama lima tahun terakhir pada pasien rawat inap di seluruh rumah sakit di Indonesia berdasarkan data dari Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2012 (KemenKes, 2012).

Faktor-faktor yang diduga meningkatkan resiko terjadinya penyakit kanker, antara lain adalah: masuknya radikal dalam tubuh, bahan kimia, radiasi, virus, hormon dan makanan (Rijal, 2013). Pengobatan terhadap kanker dapat dilakukan dengan 3 metode yaitu tindakan bedah, radiasi dan kemoterapi (Sukardja, 2000). Salah satu metode lain pengobatan kanker yang telah ada dan masih terus dikembangkan adalah penggunaan agen antikanker dari bahan alam. Penggunaan bahan alam memiliki kesinergisan dengan obat sintetis dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Keanekaragaman hayati diciptakan Allah SWT untuk dapat dimanfaatkan oleh manusia. Hal tersebut merupakan rahmat yang diberikan Allah SWT terhadap manusia sebagaimana dijelaskan dalam surat asy Syu'ara (26); 7, Allah SWT berfirman:


 أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya. Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (Q.S. asy syu'ara (26); 7).

Shihab (2002) menjelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan dari berbagai macam tumbuhan yang baik, yaitu subur dan bermanfaat. Kata (زَوْجٍ) bermakna pasangan (pasangan tumbuh-tumbuhan) karena tumbuhan muncul di antara celah-celah tanah yang terhampar di bumi, dengan demikian ayat ini

mengisyaratkan bahwa tumbuh-tumbuhan juga memiliki pasangan untuk pertumbuhan dan perkembangan. Ada tumbuhan yang memiliki benang sari dan putik sehingga menyatu dari pasangannya dan dalam penyerbukannya tidak membutuhkan pejantan dari bunga lain, dan ada juga yang hanya memiliki salah satunya sehingga membutuhkan pasangannya.

Kata (کریم) digunakan untuk mensifati segala sesuatu yang baik sesuai obyeknya. Tumbuhan yang paling baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat. Jadi, Allah menumbuhkan berbagai macam jenis tumbuhan yang baik (کریم) di bumi ini berbagai manfaat dan kegunaan yang terkandung di dalamnya yang dapat digunakan dan dikembangkan untuk kemaslahatan manusia. Salah satu hasil yang diharapkan dari tanaman adalah pemanfaatannya sebagai obat. Seperti halnya tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile*B.) memiliki banyak manfaat bagi manusia, diantaranya untuk menurunkan panas, meluruhkan kemih, antiradang, mengatasi demam, mimisan, sakit tenggorokan, sariawan, dan gusi bengkak (Wijayakusuma, 2005).

Tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) merupakan tanaman gulma yang dianggap tumbuhan liar (pengganggu) dan perlu untuk dimusnahkan. Rumput bambu mempunyai sifat lebih mudah tumbuh dengan sendirinya di tempat-tempat rindang, terbuka, pada tanah lembap seperti di bawah pohon besar, pinggir jalan teduh, dan lereng bukit. Menurut Kusumawati, dkk (2003) *Lophatherum gracile* B. adalah salah satu dari tiga belas jenis tanaman yang sangat berpotensi sebagai obat herbal penyembuhan penyakit tertentu, seperti antiinflamasi maupun antikanker.

Seluruh bagian yaitu akar, batang, dan daun rumput bambu banyak mengandung senyawa-senyawa kimia. Ekstrak etanol dari daun rumput bambu menunjukkan adanya kandungan triterpenoid, tanin dan alkaloid (Sari, 2014). Berdasarkan uji fitokimia tanaman rumput bambu telah diketahui bahwa tanaman rumput bambu mengandung senyawa metabolit sekunder. Pada bagian daun (Auwaliah, 2015) didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol 80 % dan etanol terhidrolisis terdapat senyawa alkaloid, tanin dan triterpenoid, sedangkan ekstrak kloroform dan n-heksana terdapat senyawa steroid dan tanin. Pada bagian akar (Hasanah, 2015) menunjukkan adanya senyawa tanin pada ekstrak n-heksana. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa seluruh bagian yaitu akar, batang, dan daun rumput bambu banyak mengandung beberapa metabolit sekunder salah satunya adalah tanin. Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat di antaranya sebagai astringen, antidiare, antibakteri, antioksidan dan antikanker (Desmiaty, dkk., 2008).

Upaya untuk memanfaatkan bahan metabolit sekunder dari tanaman rumput bambu ini dilakukan penelitian lanjutan lebih mendalam yaitu uji aktivitas senyawa antikanker yang diperoleh dari ekstrak kasar tanin pada rumput bambu dan isolat tanin terhadap sel kanker payudara T47D dan identifikasi golongan senyawa aktif tanin dengan instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectra* (LC-MS). Pengujian aktivitas antikanker dilakukan secara *in-vitro* terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode MTT, karena pengujian secara *in-vitro* ini mempunyai keuntungan yaitu senyawa yang digunakan untuk pengujian relatif sedikit, kemudian waktu yang diperlukan lebih singkat dan dapat memberikan

informasi mengenai efeknya secara langsung terhadap sel manusia yang telah di kultur. Metode MTT ini merupakan metode kolorimetrik, dimana terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid) oleh sistem reduktase, dan digunakan sel kanker payudara T47D karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi ([Burdall, dkk., 2003](#)).

Beberapa penelitian tanaman rumput bambu terhadap sel kanker telah dilakukan. Pada bagian daun (Istiqomah, 2015) hasil aktivitas antikanker pada sel T47D dengan variasi ekstrak etanol 80 %, hasil hidrolisis, fraksi kloroform dan fraksi n-heksana berturut-turut adalah 321,4; 482,0; 177,8; dan 300,7 mg/ml. Pada bagian akar (A'ilah, 2015) hasil aktivitas antikanker pada sel T47D dengan variasi ekstrak etanol 80 %, ekstrak etanol hasil hidrolisis, fraksi n-heksana, dan kloroform berturut-turut adalah 143,28; 428,580; 65,461 dan 72,757 ppm. Suatu ekstrak dianggap toksik apabila memiliki nilai $IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Semakin kecil nilai IC_{50} sampel tersebut semakin toksik (NCI dalam Rahmawati, dkk., 2013). Dari data di atas didapat ekstrak akar rumput bambu fraksi n-heksana mempunyai aktivitas lebih baik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dari pada ekstrak daun rumput bambu. Diduga senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak tersebut adalah senyawa tanin.

Beberapa penelitian menunjukkan adanya senyawa tanin yang berpotensi sebagai antikanker. Yulianti, dkk., (2010) menyebutkan bahwa ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid yang berpotensi sebagai antikanker payudara T47D dengan nilai IC_{50}

123,18 mg/mL. Penelitian yang telah dilakukan oleh Hari, dkk., (2008) menyebutkan bahwa asam galat yang merupakan golongan dari senyawa tanin mampu menghambat sel kanker MCF-7 dengan nilai $IC_{50} = 2.2 \mu M$ yang merupakan hormon yang berhubungan dengan kanker payudara. Menurut Abdillah (2006), senyawa tanin dalam tumbuhan merupakan senyawa polifenol kelompok flavonoid yang berfungsi sebagai antikanker.

Mekanisme tanin sebagai antikanker sejalan dengan fungsinya sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi diawali dengan dilepaskan rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Efek lainnya adalah tanin sebagai penghambat proliferasi kanker kanker yang salah satunya dengan menghambat aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke inti sel. Tanin menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase yang mengikat berperan dalam pertumbuhan keganasan sel kanker. Tanin juga berfungsi mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi (Meiyanto, 2008).

Identifikasi golongan senyawa tanin (metabolit sekunder) dilakukan dengan instrument *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS). Alat tersebut berfungsi untuk memisahkan beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya, dimana setelah campuran senyawa tersebut terpisah, maka senyawa yang murni akan diidentifikasi berat molekulnya. Data yang didapatkan adalah berat molekul ditambah beberapa muatan dan berat molekul pelarut. Selanjutnya isolat murni senyawa tanin diujikan terhadap sel kanker payudara T47D. Hasil ekstrak kasar tanin dan isolat tanin diharapkan mempunyai

aktivitas antikanker sehingga dapat meningkatkan nilai guna dari tanaman rumput bambu.

1.2 Rumusan Masalah

1. Senyawa tanin apa yang terdapat dalam fraksi air dari tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) hasil identifikasi dengan *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS).
2. Bagaimanakah aktivitas antikanker ekstrak tanin, fraksi air dan isolat tanin tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) terhadap kanker payudara T47D dengan metode MTT assay?

1.3 Tujuan

1. Mengetahui jenis senyawa tanin yang terdapat dalam fraksi air dari tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) hasil identifikasi dengan *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS).
2. Mengetahui aktivitas antikanker ekstrak tanin, fraksi air dan isolat tanin tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) terhadap kanker payudara T47D dengan metode MTT assay.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan yaitu rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) yang telah diserbukkan dan berasal dari daerah perkebunan Lamongan.

2. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut aseton:air (7:3) dan ditambahkan asam askorbat, kemudian dipartisi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut kloroform dan etil asetat.
3. Pemisahan senyawa tanin dengan KLTP dengan eluen n-butanol: asam asetat: air (4 : 1: 5).
4. Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker payudara T47D.
5. Metode *in-vitro* yang digunakan adalah metode MTT.
6. Identifikasi golongan senyawa tanin dengan *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai pemanfaatan tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) untuk kesehatan yaitu dapat digunakan sebagai salah satu alternatif pengobatan kanker payudara dan sebagai salah satu referensi serta perbandingan untuk penelitian lanjutan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Agama Islam

Al Quran banyak menyebutkan tentang segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT dengan manfaatnya tanpa ada yang sia-sia agar manusia selalu bersyukur dan mengingat kekuasaan-Nya, sebagaimana firman Allah SWT dalam surat Qaaf (50); 7,

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوْسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ بَهِيجٍ



Artinya: “Dan Kami hamparkan bumi itu dan Kami letakkan padanya gunung-gunung yang kokoh dan Kami tumbuhkan padanya segala macam tanaman yang indah dipandang mata” (QS. Qaaf (50);7).

Menurut al Mahali dan as Suyuthi (2011) kata *Zaujin Bahij* menggambarkan mengenai beraneka macam tumbuh-tumbuhan yang indah dipandang mata, dan dengan keindahan itu memiliki sifat kebaikan. Sebaik-baiknya tumbuhan adalah yang bermanfaat bagi makhluk lainnya. Semua jenis tumbuhan dapat dimanfaatkan oleh manusia, mulai dari tumbuhan tingkat rendah hingga tumbuhan tingkat tinggi. Keberadaannya sebagai makhluk hidup sudah banyak dikaji dalam beberapa penelitian, misalnya tumbuhan rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.).

Sementara itu, dalam surat lain disebutkan bahwa Allah SWT menciptakan buah-buahan dan rumput-rumputan yang baik dengan segala

manfaat dan kandungan yang dimilikinya. Allah SWT berfirman dalam surat Abasa (80); 31 - 32,

وَفِيكِهَاتٍ وَأَبَا ۝ مَتَعَا لَكُمْ وَلَا نَعْمِكُمْ ۝

Artinya: Dan buah-buahan serta rumput-rumputan(31) untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu(32) (Abasa (80);31-31).

Jazairi (2009) menafsirkan kalimat *Wa Faakihatan Wa Abban* sebagai segala bentuk buah-buahan dan rumput-rumputan yang dimakan binatang, sementara Muhammad (2010) menafsirkan rumput tersebut sebagai rumput yang dimakan binatang ternak, *Abbaa* sebagai jerami dan Qarni (2007) menafsirkan *Abbaa* sebagai rumput pakan ternak yang indah warnanya dan menyenangkan bagi setiap orang yang melihatnya, seperti halnya rumput hijau yang segar. Rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) yang menjadi objek kajian dalam penelitian ini merupakan tumbuhan hijau segar, perdu, dan merupakan rumput pakan ternak. Manfaat tumbuhan ini salah satunya digunakan sebagai tanaman obat.

Pemanfaatan bahan alam sebagai obat tradisional di Indonesia akhir-akhir ini meningkat. Penggunaan obat tradisional dinilai memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan obat yang berasal dari bahan kimia, disamping itu harganya lebih terjangkau. Selain itu keuntungan lain penggunaan obat tradisional adalah bahan bakunya mudah di peroleh dan harganya yang relatif murah (Putri, 2010). Hasil penelitian eksplorasi keanekaragaman dan kandungan kimia tumbuhan obat di hutan tropis gunung Arjuno menyatakan bahwa tanaman *Lophatherum gracile* B. merupakan salah satu dari tiga belas jenis tanaman yang

sangat berpotensi untuk digunakan sebagai obat herbal penyembuhan penyakit tertentu, seperti antiinflamasi maupun antikanker (Kusumawati, dkk., 2003).

2.2 Rumput Bambu (*Lophatherum gracile B.*)

2.2.1 Morfologi

Al-Quran telah menyebutkan tentang morfologi dari tanaman sebagaimana firman Allah SWT dalam surat al Anam ayat (6); 99,

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا
 مِنْهُ خَضِرًا حُجْرًا مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِن طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ
 وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ انظُرُوا إِلَى
 ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya: “Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah SWT) bagi orang-orang yang beriman” (QS. al An’am (6); 99).

Berdasarkan tafsir al Mahali dan as Suyuthi (2011) sebagai نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ sebagai macam tumbuh-tumbuhan, النَّخْلِ sebagai pohon kurma, قِنْوَانٌ sebagai muncul tangkai-tangkai. Menurut tafsir Al- Aisar (2007) حُجْرًا artinya adalah tanaman yang tumbuh hijau Segar. Hal ini menggambarkan bahwa Allah SWT yang telah menurunkan hujan kemudian menumbuhkan beranekaragam tumbuhan. Menjadikan tumbuhan berwarna hijau, tangkai kurma, buah zaitun dan delima

yang serupa dan tidak serupa, yang menunjukkan ciri-ciri morfologi tumbuhan tersebut. Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Mishbah, aneka tumbuhan dengan bermacam-macam jenis bentuk dan rasanya itu merupakan hal-hal yang sungguh menakjubkan dan membuktikan betapa agung penciptanya. Rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) yang menjadi objek kajian dalam penelitian ini merupakan salah satu bukti keagungan Allah SWT.

Rumput Bambu merupakan rumput menahun yang memiliki tinggi 0,5 sampai 1,2 m, pertangkai banyak dengan rimpang pendek bercabang-cabang, berakar serabut yang tumbuh menjadi umbi-umbi. Tumbuhan ini berada pada tempat yang senantiasa rindang, khususnya berada dalam hutan alam. Batang-batangannya tegak, mampat, tidak berbulu. Daun-daunya bertangkai jelas, berbangun lengset garis dan berurat melintang. Sebagaimana pada gambar berikut:



Gambar 2.1 Tanaman rumput bambu (Kusumastuti, 2003).

2.2.2 Klasifikasi

Adapun klasifikasi dari tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) adalah sebagai berikut (Cronquist, 1981):

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Bangsa	: Poales
Suku	: Poaceae
Marga	: Lophatherum
Jenis	: <i>Lophatherum gracile</i> B.

2.2.3 Kandungan Kimia Rumput Bambu

Seluruh bagian tanaman ini menurut penelitian Kusumawati (2003) menyatakan bahwa tanaman *Lophatherum gracile* B. memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder golongan steroid dan terpenoid yang terdapat pada akar dan senyawa metabolit sekunder flavonoid yang terdapat pada bagian daun. Berdasarkan penelitian Rohmaniyah (2016) menyatakan ekstrak seluruh bagian tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) pada ekstrak etanol 80% dan hidrolisis ditemukan senyawa tanin. Pada bagian daun (Auwalayah, 2015) didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol 80 %, hidrolisis, n-heksana dan ekstrak kloroform terdapat senyawa tanin. Hasanah (2015) menunjukkan bahwa pada akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) terdapat senyawa tanin pada fraksi n-heksana. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa seluruh bagian rumput bambu mengandung senyawa tanin, sehingga saya mengisolasi senyawa tanin pada seluruh bagian rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.).

2.3 Kanker

2.3.1 Sel Kanker Payudara T47D

Sel T47D merupakan *continous cell lines* yang dikultur dari jaringan epitel duktus payudara seorang wanita. *Cell line* adalah sel yang dikultur dari *primary cultures*, yaitu sel dari organ atau jaringan yang dikultur dalam kondisi hormonal yang sesuai. Media yang digunakan pada sel T47D adalah *Reswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 serum. Media RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum mengandung hormone pertumbuhan sel, albumin merupakan protein

transport, lipid diperlukan dalam pertumbuhan sel, dan mineral merupakan kofaktor enzim. dalam media RPMI tersebut berguna untuk memberikan nutrisi yang cukup pada sel untuk tetap bertahan hidup dan memperbanyak diri (Amalina, 2008: 14).

Pada penelitian ilmiah, sering digunakan sel kultur payudara yaitu sel kanker MCF-7 dan T47D. Sel MCF-7 adalah sel kanker payudara yang diperoleh dari seorang pasien wanita kaukasian, golongan darah O, dengan Rh positif. Sel menunjukkan adanya diferensiasi pada jaringan epitel mammae termasuk diferensiasi pada sintesis estradiol. Media dasar penumbuh sel MCF-7 adalah media DMEM terformulasi, sedangkan sel T47D adalah sel kanker payudara yang dapat diambil dari jaringan payudara seorang wanita remaja maupun dewasa yang terkena ductal carcinoma. Sel ini dapat ditumbuhkan dengan media dasar penumbuh RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (ATCC, 2008). Media RPMI ini merupakan temuan Dr. Roswell Park yang telah mendirikan RPCI (*Roswell Park Cancer Institute*) sejak tahun 1989 di USA (Mirand, 2005).

Pada penelitian ini digunakan sel kanker payudara T47D karena sel kultur ini mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall, dkk., 2003). Media kultur yang digunakan adalah media RPMI yang merupakan salah satu media yang banyak digunakan untuk menumbuhkan sel mamalia dan mengandung CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KCl, $\text{MgSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, NaHCO, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glukosa, *Glutathione*, *phenol red*, berbagai asam amino (L-aspargie, L-Cystine, tirosin, valin, dan sebagainya), serta vitamin (biotin, pantotenat, kolin). Media ini berwarna merah karena adanya

phenol red sebagai indikator pH untuk mendeteksi terjadinya perubahan pH akibat metabolisme sel. Jika sisa metabolisme sudah terakumulasi di media, maka warna media akan berubah menjadi kuning. Hal ini menandakan bahwa sel harus dikultur di media baru agar sel tidak mati akibat sisa metabolisme (Rosenberg, 1981).

2.3.2 Analisis dengan ELISA Reader

Analisis dengan ELISA *reader* menggunakan prinsip kolorimetri yang didasarkan pada tercapainya kesamaan besaran warna antara larutan sampel dengan larutan standar dengan menggunakan sumber cahaya polikromatis dan detektor mata. Metoda ini dapat diterapkan untuk penentuan komponen zat warna atau komponen yang belum berwarna, namun dengan menggunakan reagen pewarna yang sesuai. Reagen yang digunakan dalam metode ini yaitu reagen MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) merupakan garam tetrazolium yang diadsorpsi dan dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya (Pamilih, 2009).

Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosman, 2000, dan Padmi 2008). Absorbansi larutan berwarna ini kemudian dapat diukur menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *reader* pada panjang gelombang antara 595 nm karena warna yang tampak pada larutan adalah ungu kebiruan yang akan menyerap warna kuning dari spektrum sinar tampak (Effendy, 2007). *Output* data yang dihasilkan berkorelasi

langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme, sehingga berkorelasi dengan viabilitas sel (kehidupan), yang artinya dari nilai absorbansi sudah dapat diketahui potensi sampel dalam menghambat kanker karena semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel hidup (Meiyanto, dkk., 1999).

Hasil dari proses ELISA secara kuantitatif berupa besaran konsentrasi dan nilai adsorpsi (y) pada sampel. Pengukuran y pada hasil ELISA menggunakan mesin ELISA *reader* yang prinsipnya sama dengan mesin spektrofotometer. Intensitas cahaya yang diserap oleh sampel pada panjang gelombang tertentu berbanding lurus dengan besar nilai y . Jika semakin banyak intensitas cahaya yang diserap, maka semakin besar nilai y . Semakin kecil nilai intensitas cahaya yang diserap oleh sampel, semakin kecil pula nilai y (Crowther, 2001: 10).

2.4 Metode Pemisahan Senyawa Aktif Tanaman Rumput Bambu

2.4.1 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi adalah proses penarikan suatu zat terlarut dari larutannya di dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak dapat bercampur dengan air. Tujuan ekstraksi adalah memisahkan suatu komponen dari campurannya menggunakan pelarut tertentu (Soebagio, 2003). Salah satu metode ekstraksi adalah maserasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyaring (pelarut). Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi

keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Baraja, 2008). Pemilihan pelarut organik yang digunakan dalam ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting dan menentukan untuk mencapai tujuan dan sasaran ekstraksi komponen. Semakin tinggi nilai konstanta dielektrik, titik didih dan kelarutan dalam air, maka pelarut akan bersifat makin polar (Sudarmadji dkk., 2003). Berikut ini adalah konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut:

Tabel 2.1 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut

Jenis pelarut	Konstanta dielektrikum	Tingkat kelarutan dalam air	Titik didih (°C)
Petroleum eter	2,28	TL	60
Benzene	2,38	TL	80,1
Toluene	4,81	TL	111
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Metil asetat	6,68	S	57
Metil klorida	9,08	S	39,75
Butanol	15,80	S	117,2
Propanol	20,1	L	97,22
Aseton	20,70	L	56,2
Air	78,4	L	100

Keterangan: TL = tidak larut; S = sedikit; L = larut dalam berbagai proporsi

Sumber: Sax dan Lewis (1998), Fesenden dan Fesenden (1997), dan Mulyono (2009).

Tanin dapat diekstrak dengan aseton 70 %, lebih efektif dalam mengekstraksi daripada pelarut alkohol. Hal ini dikarenakan aseton menghambat interaksi tanin dengan protein. Pada banyak tumbuhan, terdapat fraksi besar (kadang lebih besar dari 50 %) tanin yang tidak dapat diekstraksi (insoluble tannin), dimana fraksi yang tidak dapat diekstraksi karena efek nutrisi (Cannas, 2001).

Malik (2009) memperoleh tanin dari kulit mangium kering dengan maserasi menggunakan air panas 70 °C dan 90 °C selama 4 jam dan dilakukan berulang-ulang sebanyak 9 kali. Tanin diekstrak dari daun kaliandra dengan menggerus daun bersama es kering dan ditambahkan dengan aseton 70 % yang mengandung asam askorbat 0,1 % (Abdurrahman, 1998). Maserasi pada daun belimbing wuluh dilakukan dengan menggunakan campuran pelarut aseton: air (7:3), dengan penambahan asam askorbat 10 mM selama 24 jam, kemudian dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaporator* (Hayati dkk., 2010 dan Umarudin dkk., 2012).

2.4.2 Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair (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). Kelebihan metode ini adalah dapat memperoleh komponen bioaktif yang lebih spesifik dan waktu ekstraksinya cepat (waktu total ekstraksi pendek) (Dewi, dkk., 2010).

Filtrat ekstrak tanin hasil penyaringan kemudian dilakukan proses fraksinasi dengan cara ekstraksi cair-cair, menggunakan corong pisah dengan menambahkan kloroform menyebabkan terbentuknya dua fase yaitu fase air dan fase kloroform. Hasil proses fraksinasi dengan menambahkan kloroform memberikan warna hijau. Fase kloroform ditampung dan fase air diambil untuk

dilakukan tahap fraksinasi selanjutnya dengan etil asetat. Penambahan etil asetat menyebabkan terbentuknya dua lapisan yaitu lapisan atas (fase etil asetat) dan lapisan bawah (fase air). Fase etil asetat ditampung dan diambil fase airnya. Fase air selanjutnya dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat selanjutnya dilakukan uji fitokimia dengan menambahkan larutan FeCl_3 dan menunjukkan hasil positif tanin (Sa'adah, 2010; Umaruddin dkk., 2012).

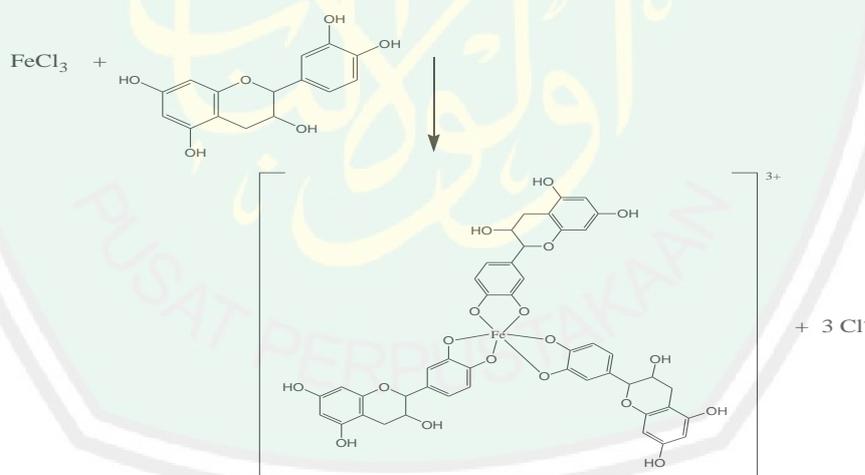
2.4.3 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Pemisahan senyawa dilakukan menggunakan plat silika gel F_{254} dengan menggunakan eluen terbaik untuk masing-masing senyawa. Plat KLT ini dilengkapi dengan indikator fluoresensi pada sinar UV yang bergelombang pendek. Pengamatan plat di bawah lampu UV yang dipasang panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan komponen senyawanya sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluorosensi terang pada dasar yang berfluorosensi seragam (Gritteret, dkk., 1991).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Mangunwardoyo dkk., (2009), Hayati, dkk., (2010), Umarudin dkk., (2012) dan Sidik, (2012) menyatakan bahwa senyawa tanin pada ekstrak meniran, daun belimbing wuluh dan kulit batang kelapa gading (*Cocos nucifera* Var. *eburnea*) memiliki nilai R_f sebesar 0,6 – 0,67 ketika direaksikan dengan FeCl_3 berwarna hijau kekuningan dan dilakukan pengamatan dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm.

2.5 Uji Kualitatif Senyawa Tanin

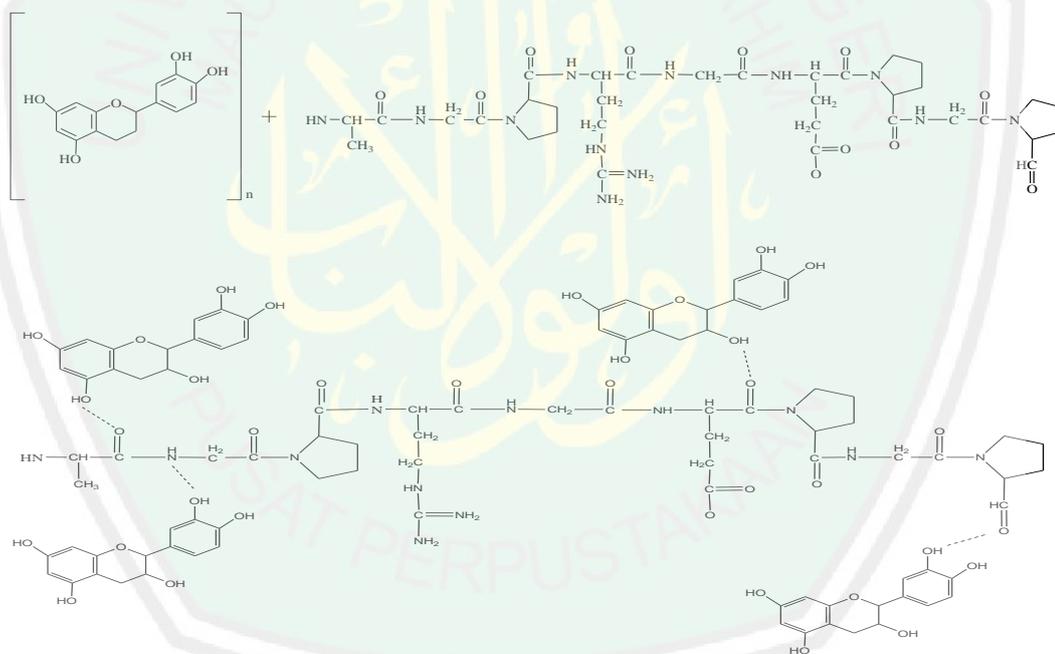
Cara klasik untuk mendeteksi senyawa fenol sederhana yaitu menambahkan ekstrak dengan larutan FeCl_3 1 % dalam air, yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta pada ekstrak setelah ditambahkan dengan FeCl_3 karena tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} (Harbone, 1996). Kecenderungan Fe dalam pembentukan senyawa kompleks dapat mengikat 6 pasang elektron bebas. Ion Fe^{3+} dalam pembentukan senyawa kompleks akan terhibridisasi membentuk hibridisasi d^2sp^3 (Effendy, 2007) sehingga akan terisi oleh 6 pasang elektron bebas atom O pada tanin (Sa'adah, 2010).



Gambar 2.2 Reaksi dugaan antara senyawa tanin dengan FeCl_3 (Dermawan, 2012).

Uji fitokimia dengan menggunakan larutan gelatin digunakan untuk memperkuat dugaan adanya senyawa tanin dalam ekstrak suatu tanaman. Terbentuknya endapan setelah ditambahkan larutan gelatin yang menyatakan bahwa pada ekstrak aseton kulit batang bungur positif mengandung

tanin. Semua tanin menimbulkan endapan sedikit atau banyak jika ditambahkan dengan gelatin (Harborne, 1995). Gelatin merupakan protein alami yang memberikan sifat penstabil dan pengental bagi media yang berbasis air, mengandung asam amino yaitu dengan kandungan glisin (27%), prolin (16%) dan hidroxiprolin (14%), sehingga terbentuknya senyawa tanin protein dikarenakan adanya ikatan hidrogen antara tanin dan protein pada gelatin sehingga terbentuk endapan putih (Leemensand, 1991). Reaksi antara tanin dengan gelatin adalah sebagai berikut:



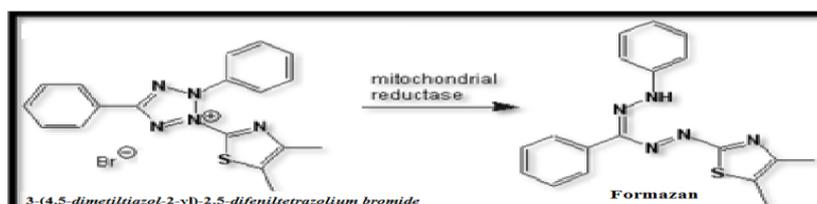
Gambar 2.3 Reaksi tanin dengan gelatin

2.6 Uji Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro* dengan Metode MTT

Antikanker dapat dilakukan dengan uji MTT yang merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. Metode MTT (*Microculture Tetrazolium*) banyak dimanfaatkan untuk menyelidiki mekanisme aktivasi sel dan kerusakan sel yang mana pengujiannya secara kolorimetri dan didasarkan pada

bioreduction garam tetrazolium ke formazan. Dalam penelitian ini digunakan uji MTT karena memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Goodwin, dkk., 1995).

Metode ini merupakan metode kolorimetri, dimana pereaksi atau reagen MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) ini merupakan garam tetrazolium yang diadsorbsi dan dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya (Pamilih, 2009). Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosman, 2000, dan Padmi, 2008). Absorbansi larutan berwarna ini kemudian dapat diukur menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) reader* pada panjang gelombang antara 500 dan 600 nm, yang mana semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Reaksi reduksi MTT dapat dilihat pada gambar berikut (Meiyanto, dkk.,1999):



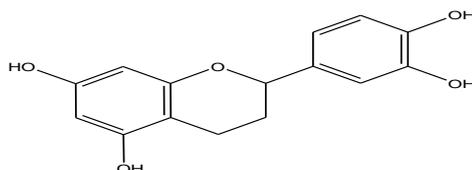
Gambar 2.4 Reaksi reduksi MTT

Uji sitotoksik ini digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitostatik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Meiyanto, dkk., 1999 dan Padmi, 2008).

Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik, ditunjukkan dari hasil pengujian, diperoleh nilai IC_{50} ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi air akar asam kandis terhadap sel kanker payudara T47D berturut-turut sebesar 6,06 $\mu\text{g/ml}$, 0,52 $\mu\text{g/mL}$, dan 81,44 $\mu\text{g/ml}$. Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa fraksi etil asetat akar asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb.) mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D secara signifikan pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ (Ilhamy, dkk., 2013).

2.7 Tanin

Tanin secara umum didefinisikan sebagai senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (lebih dari 1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein (Hagerman dkk., 1992 dan Harbone, 1996). Berikut adalah struktur tanin:

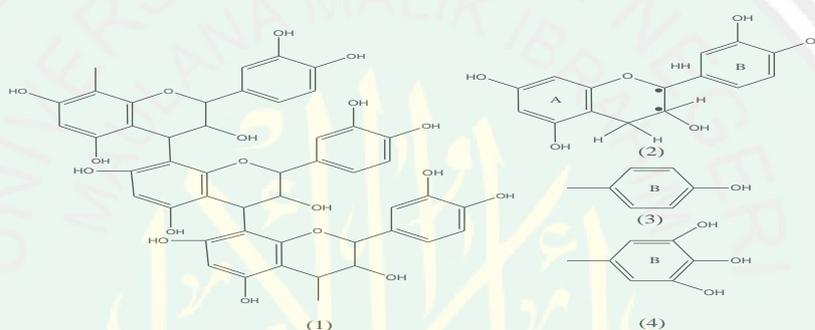


Gambar 2.5 Struktur senyawa Tanin (Robinson, 1995).

2.7.1 Penggolongan Tanin

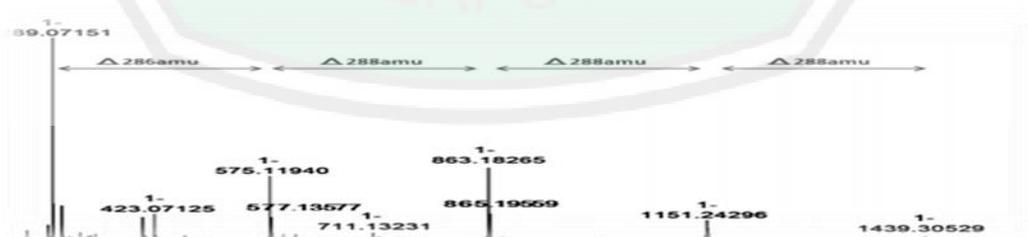
a. Tanin Terkondensasi

Tanin terkondensasi secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal (galokatekin) yang membentuk senyawa dimer, dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Katekin terbagi menjadi tiga jenis diantaranya katekin, afzelekin dan galokatekin (Harbone, 1996). Struktur senyawa flavolan dan katekin dapat dilihat pada Gambar 2.6 berikut:



Gambar 2.6 Proantosianidin atau flavolan (1), katekin (2), afzelekin (3) dan galokatekin (4) (Harborne, 1996; Robinson, 1995).

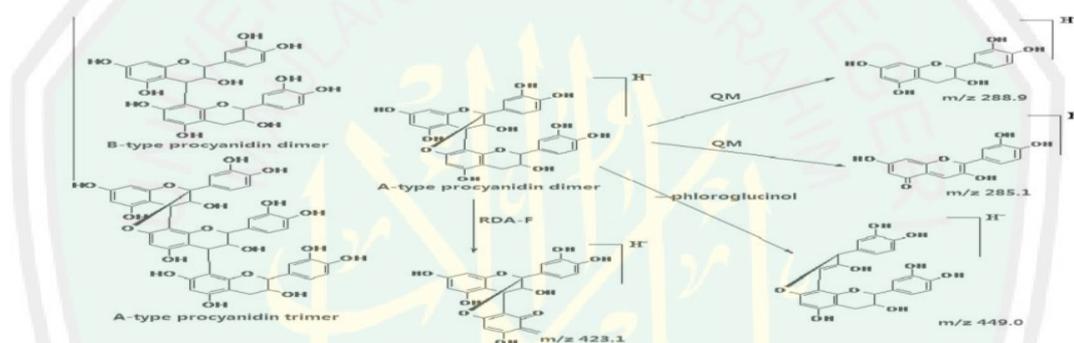
Berikut adalah spektra massa dari flavan-3-ols yang merupakan nama lain dari tanin terkondensasi:



Gambar 2.7 Spektra massa dari flavon-3ols (Li, dkk., 2012).

Berdasarkan Gambar 2.7 dapat diketahui bahwa pada m/z 1439,30529 merupakan puncak dari senyawa prosianidin pentamers ($C_{75}H_{60}O_{30}$) yang

mengalami fragmentasi M-288 menghasilkan puncak m/z 1151,2496 merupakan puncak dari prosianidin tetramers ($C_{60}H_{48}O_{24}$). Pada m/z 865,19559 menunjukkan senyawa trimers prosianidin ($C_{45}H_{38}O_{18}$) yang mengalami fragmentasi M-2 menghasilkan puncak m/z 863,18265. Puncak dengan nilai m/z 577,13231 menunjukkan senyawa dimers ($C_{30}H_{24}O_{12}$) prosianidin yang mengalami fragmentasi M-2 menjadi m/z 575,11940. Selanjutnya senyawa dimers prosianidin terfragmentasi M-288 menjadi monomer prosianidin ($C_{15}H_{14}O_6$) pada puncak m/z 423,07125 (Li, dkk., 2012).



Gambar 2.8 Fragmentasi dari senyawa prosianidin dimer

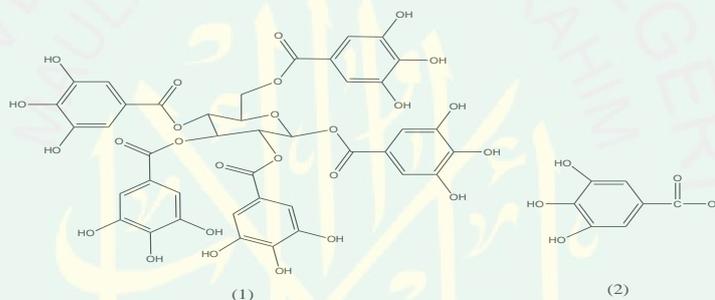
Berdasarkan Gambar 2.8 dapat diketahui bahwa senyawa prosianidin dimer ($C_{30}H_{24}O_{12}$) dengan dengan puncak m/z 449,0 terfragmentasi dengan melepaskan piroglucinol menjadi m/z 423,1. Kemudian prosianidin dimer terfragmentasi M -134,2 membentuk monomer prosianidin dengan puncak m/z 288,9 selanjutnya terfragmentasi M-2 dengan puncak m/z 285,1(Li, dkk., 2012) .

b. Tanin Terhidrolisis

Tanin terhidrolisis merupakan turunan dari asam galat (asam 3,4,5-trihidroksil benzoat). Senyawa ini mengandung ikatan ester antara suatu monosakarida terutama gugus hidroksilnya. Tanin terhidrolisis dapat dibagi dalam dua kelas besar yaitu gallotanin dan ellagitanin(Hagerman, dkk., 1992).

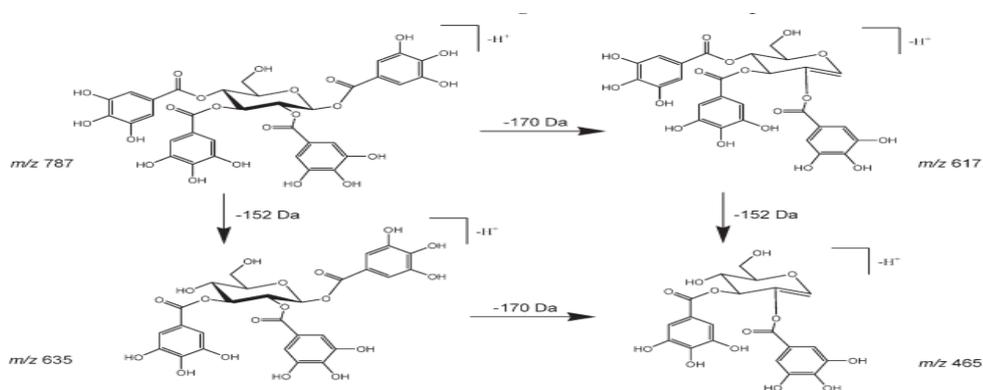
1. Gallotanin

Gallotanin terbentuk dari asam gallat dan gula, terikat bersama pada gugus ester yang terbentuk antara gugus karboksil molekul satu dan gugus hidroksi pada molekul lain (Luchner, 1984 dalam skripsi Nuraini, 2002). Gallotanin bila dihidrolisis akan menghasilkan asam gallat (Manitto, 1981). Struktur gallotanin dan asam galat dapat dilihat pada Gambar 2.9 berikut:



Gambar 2.9 Struktur gallotanin (1) dan asam galat (2) (Robinson, 1995).

Berdasarkan Gambar 2.9 menunjukkan struktur gallotanin merupakan pentagalatol glukosa yang memiliki lima ikatan ester yang mengandung gugus alifatik hidroksi dengan glukosa sebagai inti. Gallotanin merupakan ester dari asam galat (asam karboksilat). Jika dilihat dari strukturnya, asam galat memiliki tiga gugus hidroksi dengan posisi 3,4,5 pada atom C benzen. Semakin banyak gugus hidroksi maka semakin tinggi sifat kepolarannya yang disebabkan oleh adanya ikatan hidrogen intramolekul. Berikut adalah fragmentasi dari gallotanin (Berardini, dkk., 2004):

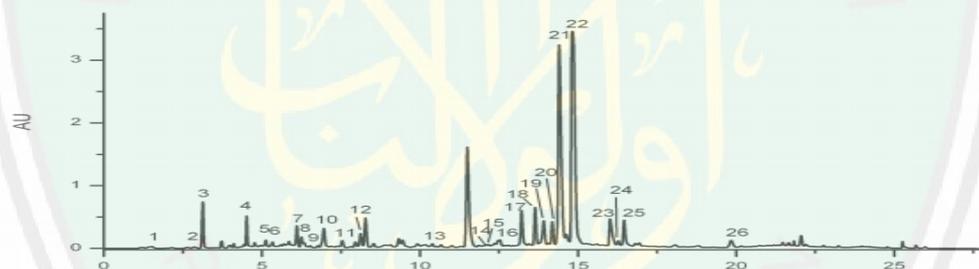


Gambar 2.10 Fragmentasi dari gallotanin (tetra-O-galloyl-glucose)

Berdasarkan Gambar 2.10 dapat diketahui bahwa senyawa gallotanin dengan puncak m/z 787 terfragmentasi dengan melepaskan galloyl (152 Da) menjadi m/z 635 dan m/z 617 dengan melepaskan asam galat (170 Da). Pada puncak m/z 617 terfragmentasi dengan melepaskan galloyl (150 Da) menjadi m/z 465. Senyawa tersebut diidentifikasi sebagai tetra-O-galloyl-glucoses (Berardini, dkk., 2004).

2. Ellagitanin

Ellagitanin merupakan ester dari asam heksahidroksi difenil (HDDP). HDDP secara spontan terdehidrasi membentuk lakton menjadi asam elagat (Hagerman, dkk., 1992). Berikut adalah kromatogram ellagitanin (Kylli, 2011):



Gambar 2.11 Kromatogram Ellagitanin pada panjang gelombang 280 nm.

Pola fragmentasi ditemukan dari literatur adalah dasar untuk identifikasi. Pada kromatogram 12 dan 20 merupakan senyawa ellagitanin yang terdiri dari HHDP, glukosa, dan galloyl. Ellagitanin puncak m/z 1251 terfragmentasi menjadi m/z 1235, m/z 1099. Pada puncak m/z 1235 terfragmentasi dengan melepaskan kelompok HDDP dengan puncak m/z 933. Selanjutnya terfragmentasi dengan melepaskan kelompok HHDP, glukosa dan galloy dengan puncak sebesar m/z 633 dan m/z 301, yang merupakan karakteristik dari ellagitanin (Kylli, 2011).

2.7.2 Tanin Berpotensi Sebagai Antikanker

Tanin adalah kelompok polifenol yang larut dalam air dengan berat molekul antara 500-3000 g/mol (Fajriati, 2006). Tanin dapat digunakan sebagai antikanker. Aktifitas antikanker suatu senyawa tanin terjadi melalui mekanisme penghambatan kerja enzim sel, pencegahan proses mutagenesis sel yang dapat menimbulkan kanker, dan pengaktifan sel makrofag kanker. Mekanisme kerja tanin ini menggunakan inhibitor *histone deacetylase* (HDAC) (Udhi, 2003).

Beberapa penelitian menunjukkan adanya senyawa tanin yang berpotensi sebagai antikanker. Yulianti, dkk., (2010) menyebutkan bahwa ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid yang berpotensi sebagai antikanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} 123,18 mg/mL. Penelitian yang telah dilakukan oleh (Frischa, 2012) menyatakan bahwa ekstrak etanol kulit batang sirsak (*Annona muricata.L*) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC_{50} sebesar 221,81 μ g/mL. Golongan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang sirsak salah satunya adalah tanin. Penelitian yang telah dilakukan oleh Hari, dkk., (2008) menyebutkan bahwa asam galat yang merupakan golongan dari senyawa tanin mampu menghambat sel kanker MCF-7 dengan nilai $IC_{50} = 2.2 \mu$ M yang merupakan hormon yang berhubungan dengan kanker payudara.

2.8 Identifikasi Tanin dengan LC-MS

Kromatografi Cairan Spektroskopi Massa (LC-MS) merupakan untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi yang tidak bisa dianalisis dengan kromatografi gas (GC)(Lindsay, 1992). *Mass*

spectofotometer (MS) merupakan alat yang dapat memberikan informasi mengenai berat molekul dan struktur senyawa organik. Selain itu, alat ini juga dapat mengidentifikasi dan menentukan komponen-komponen suatu senyawa.

LC-MS digunakan fasa gerak atau pelarut untuk membawa sampel melalui kolom yang berisi padatan pendukung yang dilapisi cairan sebagai fasa diam. Selanjutnya analit dipartisikan di antara fasa gerak dan fasa diam tersebut, sehingga terjadi pemisahan karena adanya perbedaan koefisien partisi. Sampel yang telah dipisahkan dalam kolom diuapkan pada suhu tinggi, kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan (m/z), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik menghasilkan spektra massa. Spektra massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya (Khopkar, 2008).

Analisis dengan LC-MS menggunakan fase terbalik dengan sistem Waters 600 E, dilengkapi dengan pompa 600 E pompa. Kolom yang digunakan adalah C18 10 μm (250 mm x 4,6 mm). Eluen yang digunakan adalah campuran dua pelarut disaring melalui membran 0,45 μm . Variasi pelarut yang digunakan adalah pelarut A : MeOH / H₃PO₄ 999 : 1, pelarut B : H₂O / H₃PO₄ 999 : 1. Volume injeksi adalah 20 μl . Program elusi dilakukan pada aliran konstan 1 ml/menit, pada suhu 20 °C, lewat dari 70 % dari B (selama 5 menit) sampai 10 % dari B di 40 menit, dan kemudian naik ke 70 % dari B dalam 10 menit selama 5 menit. Deteksi adalah dengan spektrofotometri variabel-panjang gelombang (WatersTM 486 MS) pada 280 nm. Output yang digunakan adalah injeksi electrospray (ESI) yang digabungkan ke alat LC (Vivas, dkk., 2004). Berikut adalah identifikasi tannin berdasarkan waktu retensi (Chapmen dkk., 2008):

Tabel 2.2 Identifikasi tannin berdasarkan waktu retensi (Chapmen dkk., 2008)

No	t _R	Struktur	LC-MS (m/z)	MS/MS
A	7,4 ; 8,0	<i>Hexahydroxydiphenoyl-glucose</i>	481	421 ; 301
C	12,9 ; 13,4; 16,17; 6,18,5	<i>Tetragalloyl-glucose</i>	783	764; 481; 301
D	21,3	<i>Dehydrated tergallic-C-glucoside</i>	613	595,5; 523,6; 493,2; 301,1
E	22,7	<i>Tergallic C-glucoside</i>	631	613; 493; 469; 301
F	25,8; 27,0; 27,9; 29,1	<i>Ellagic Acid-diglucoside</i>	625	463; 301



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret – Juli 2016 di Laboratorium Organik, Laboratorium Riset Analitik, Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, badan pengkajian dan penerapan teknologi (BPPT) PUSPITEK serpong selatan sebagai tempat analisis dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Umum Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan pada penelitian ini meliputi ayakan 65 mesh, bejana pengembang, *blender*, bola hisap, *conical tube*, *culture dish*, corong Buchner, corong pisah, *counter*, *cuvet*, desikator, *ELISA reader*, *hemacytometer*, inkubator CO₂, kertas saring, lemari asam, mikropipet, mikroskop *inverted*, neraca analitik, oven, penggaris, pensil, pipa kapiler, pipet pasteur, pisau, plat KLT silika G₆₀ F₂₅₄, *plate 96-well*, pompa vakum, rak tabung reaksi, sentrifuge, seperangkat alat LC-MS, seperangkat alat gelas, *shaker incubator*, spatula, tabung reaksi, *vacum rotary evaporator*, *vortex* dan *Yellow tip*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman rumput bambu yang diperoleh dari kota Batu. Bahan-bahan kimia yang digunakan

meliputi: aquades, asam askorbat 10 mM, asam asetat, asam klorida pekat, aseton, etil asetat, besi(III) klorida (FeCl_3) 1%, formaldehid 3 %, gelatin, kloroform, natrium asetat, n-butanol, asam phospat, dimetil sulfoksida, media Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco), PBS, MTT 5 mg/mL (50 mg MTT dan 10 mL PBS), SDS 10 % dalam 0,1 N HCl, tripsin-EDTA 1x dan sel kanker payudara T47D.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan ekstraksi maserasi senyawa aktif tanin dari tanaman rumput bambu. Hasil ekstraksi maserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Selanjutnya dilakukan ekstraksi cair-cair. Ekstrak pekat tanin dibagi menjadi 2, yaitu untuk sampel uji dan untuk pemurnian. Fraksi air hasil fraksinasi diidentifikasi dengan menggunakan instrumen *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* golongan senyawa tanin (LC-MS). Kemudian dilakukan pemisahan dan pemurnian ekstrak tanin menggunakan KLTP dengan pelarut terbaik hasil dari KLTA. Langkah selanjutnya adalah uji aktivitas antikankersenyawa tanin secara *in vitro* terhadap sel kanker T47D menggunakan metode MTT. Penelitian ini menggunakan variabel bebas yaitu variasi larutan uji (U). Larutan uji yang digunakan adalah U1: ekstrak pekat tanin, U2: fraksi air dan U3: isolat tanin hasil KLTP.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel.

2. Ekstraksi tanin pada tanaman rumput bambu dengan metode maserasi dan ekstraksi cair-cair.
3. Uji kualitatif ekstrak kasar tanin dan fraksi air tanaman rumput bambu dengan reagen.
4. Identifikasi senyawa tanin menggunakan instrumen *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS).
5. Pemisahan tanin dengan kromatografi lapis tipis analitik dan preparatif
6. Uji aktivitas antikanker ekstrak tanin, fraksi air dan isolat tanin hasil KLTP terhadap sel T47D.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel (Sari, 2014)

Tanaman rumput bambu basah sebanyak $\pm 1,5$ kg dicuci dengan air lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar hingga bobot menyusut dari bobot semula, kemudian sampel diserbukkan, serbuk yang diperoleh disaring menggunakan ayakan 90 mesh. Hasil yang diperoleh digunakan sebagai sampel penelitian (Sari, 2014).

3.5.2 Analisis Kadar Air

Sampel yang telah disiapkan, dianalisis kandungan kadar airnya dengan analisis gravimetri metode penguapan. Langkah awal yaitu dipanaskan cawan pada suhu $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, lalu didinginkan di dalam desikator selama 10 menit. Kemudian cawan ditimbang dan diulangi perlakuan sampai diperoleh berat konstan. Sampel ditimbang sebanyak 5

gram dan dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam untuk menguapkan air yang terkandung pada sampel. Setelah itu, didinginkan dalam desikator selama ± 15 menit dan ditimbang kembali (Rizqiyah, 2014). Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong
 b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan
 c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \dots\dots\dots (3.2)$$

$$\% \text{ Kadar air terkoreksi} = \text{Kadar air} - \text{Faktor koreksi} \dots\dots\dots (3.3)$$

3.5.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Tanin Rumput Bambu Menggunakan Maserasi dengan Metode Modifikasi (Hayati, dkk., 2010; Nuraini, 2002; Sari, 2014; Sa'adah, 2010)

Sebanyak 60 gram sampel tanaman rumput bambu yang telah halus dimasukkan kedalam erlenmeyer 500 mL kemudian direndam dengan 500 mL pelarut aseton : air (7:3) dengan penambahan 3 mL asam askorbat 10 mM selama 24 jam. Pengadukannya dibantu dengan *shaker* selama 3 jam, kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai 3 kali pengulangan atau sampai diperoleh filtrat yang bening. Ekstrak tanin rumput bambu kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator vacuum* untuk menghilangkan pelarut dalam ekstrak dengan suhu 40-50 °C. Evaporasi dilakukan sampai pelarut pada labu pemisah tidak menetes lagi.

Ekstrak pekat yang dihasilkan kemudian dipartisi dengan cara diekstraksi cair-cair menggunakan kloroform (3 x 25 mL) menggunakan corong pisah sehingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan kloroform (bawah) dipisahkan dan lapisan air 1 (atas) diekstraksi dengan etil asetat (3 x 25 mL) dan terbentuk 2 lapisan. Lapisan etil asetat (atas) dipisahkan dan lapisan air 2 (bawah) dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40 - 50 °C, tekanan ± 800 atm dan rotor 3-7 sampai diperoleh ekstrak kasar tanin. Filtrat hasil maserasi aseton : air, lapisan air₁ dan lapisan air₂ diuji kualitatif tanin menggunakan reagen. Ekstrak kemudian ditimbang dan dibagi ekstrak menjadi 2 bagian, yaitu untuk sampel uji dan untuk pemurnian. Ekstrak kasar tanin dapat dihitung randemennya menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Beratfraksi}}{\text{Beratekstrakpekat}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.4)$$

Ekstrak kasar dapat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C agar ekstrak tersebut tidak menjadi rusak kemudian dilanjutkan dengan pemurnian dan uji aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D.

3.5.4 Uji Kualitatif Ekstrak Tanin dengan Reagen (Dewi, 2013)

Filtrat 1 (hasil ekstraksi dengan aseton : air (7:3), lapisan air 1 dan lapisan air 2 masing-masing dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi yang berbeda sebanyak 3 mL. Ekstrak pada tabung pertama direaksikan dengan 3 tetes larutan FeCl₃ 1 %. Jika ekstrak mengandung senyawa tanin akan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua. Tabung kedua ditambahkan dengan larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih maka positif mengandung tanin. Tabung ketiga digunakan untuk membedakan tanin katekol dan galat dengan cara menambahkan

ekstrak dengan formadehid 3% : asam klorida (2: 1) dan dipanaskan dalam air panas dengan suhu 90 °C, jika terbentuk endapan merah muda merupakan tanin katekol. Filtrat dipisahkan dengan disaring dan dijenuhkan dengan Na-Asetat dan ditambahkan FeCl₃ 1%, adanya tanin galat ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tinta atau hitam.

3.5.5 Identifikasi Golongan Senyawa Tanin dengan *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS) (Vivas, dkk., 2004).

Fraksi air yang diperoleh dari hasil KLTP kemudian dianalisis menggunakan UPLC-QToF-MS/MS Sytem (water). Eluen yang digunakan adalah campuran dua pelarut disaring melalui 0,45 µm membran filter; pelarut A: H₂O + 0,1% formic acid, pelarut B: Acetonitrile + 0,1 % formic acid dengan volume injeksi adalah 5 µL. Sebanyak 30 mg sampel fraksi air dilarutkan dalam asetone lalu larutan diambil menggunakan *syringe*, kemudian dimasukkan kedalam vial hingga batas 1 mL menggunakan syringe yang telah dilengkapi filter. Larutan sampel dalam vial kemudian diukur dengan kromatografi cair - spektroskopi massa melalui kolom *acquity* UPLC BEH C 18 1,7µm (2,1 mm × 50 mm) dengan kecepatan alir 0,3 mL/menit pada suhu 40 dC dan diukur pada panjang gelombang 280 nm. Output dari UPLC-QToF-MS/MS Sytem (water) menggunakan injeksi electrospray (ESI) dengan MS jenis XEVO - G2QTOF dengan tegangan ESI 38V, suhu pelarut 300 °C dan suhu pemanas 110 °C.

3.5.6 Pemisahan Senyawa Tanin

3.5.6.1 Pemisahan Menggunakan KLT Analitik

Proses pemisahan senyawa tanin dengan metode KLT Analitik dilakukan dengan beberapa persiapan diantaranya (Rahmawati, 2015):

1. Persiapan Plat KLT

Plat KLT yang digunakan adalah plat silika $G_{60} F_{254}$ sebagai fasa diamnya, dengan ukuran 1 cm x 10 cm. Kemudian diberi penanda garis pada tepi bawah plat dengan jarak 1 cm sebagai posisi penotolan sampel, dan 1 cm pada tepi atas plat untuk menunjukkan batas dari proses elusi. Plat silika diaktivasi dengan cara di oven pada suhu 100 °C selama 10 menit.

2. Persiapan Fase Gerak (Eluen)

Masing-masing eluen di masukkan dalam bejana (*great chamber*) dan dijenuhkan terlebih dahulu selama 1 jam dengan ditutup rapat. Pengecualian untuk eluenn-butanol : asam asetat : air (BAA) dilakukan penjenuhan selama 24 jam untuk mempermudah proses elusi karena eluen ini sangat polar. Penjenuhan ini berfungsi untuk menyetarakan tekanan uap dalam bagian bejana. Beberapa eluen yang digunakan pada pemisahan senyawa tanin ini diantaranya fase gerak eluen tersebut diantaranya asam asetat glasial : H₂O : HCl pekat (forestal) (30:10:3) (Nuraini, 2002), n-butanol : asam asetat : air (2:0,5:1,1) (Nahari, 2015), n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) (Hayati dkk., Ummah, 2010); n-heksana : etil asetat (6:4) (Mangunwardoyo dkk., 2009) dan kloroform: metanol: air (7:3:0,4).

3. Penotolan Sampel

Dibuat larutan ekstrak tanin 15.000 ppm dan ditotolkan pada plat KLT dengan jarak 1 cm dari tepi bawah plat. Penotolan dilakukan dengan pipa kapiler

sebanyak 10 kali penotolan pada tempat yang sama, kemudian dikering anginkan (Hayati dkk., 2010; Rahmawati, 2015).

4. Proses Elusi

Ekstrak yang telah ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dengan masing-masing fasa gerak, dimana plat KLT dimasukkan dalam *great chamber* yang berisi fasa gerak yang telah jenuh, kemudian *great chamber* ditutup hingga larutan pengembang (eluen) mencapai batas 1 cm dari tepi atas plat. Plat KLT diangkat dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan (Rahmawati, 2015).

5. Identifikasi Noda

Noda-noda yang terbentuk pada plat silika diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Hayati dkk., 2010; Nahari, 2015; Sa'adah, 2010). Noda yang tampak ditandai dengan pensil, kemudian disemprot dengan reagen FeCl_3 1 % dan diamati kembali dibawah sinar UV. Selanjutnya diamati perubahan warna, jika terbentuk warna lembayung setelah penambahan reagen FeCl_3 1 % maka isolat tersebut positif tanin (Harborne, 1996; Hayati dkk., 2010; Nahari, 2015; Umarudin dkk., 2012). Diamati bentuk masing-masing noda dan diukur jarak tempuhnya, kemudian dihitung nilai R_f masing-masing noda. Eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik selanjutnya digunakan untuk keperluan preparatif.

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak senyawa yang digerakkan dari titik asal}}{\text{Jarak pelarut yang digerakkan dari titik asal}} \dots\dots\dots (3.5)$$

3.5.6.2 Pemisahan Senyawa Aktif Tanin dengan KLT Preparatif

Pemisahan pada KLT preparatif menggunakan plat silika $G_{60} F_{254}$ dengan ukuran 10 cm x 20 cm. Dibuat ekstrak tanin 15.000 ppm dan ditotolkan sepanjang

plat pada jarak 1 cm dari garis bawah menggunakan pipa kapiler sebanyak 10 x penotolan, setiap totolan dilakukan pengeriangan menggunakan *hair dryer*, selanjutnya dielusi menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik yakni variasi pelarut n-butanol: asam asetat: air (4 : 1: 5). Noda yang berbentuk pita dihitung Rfnya dan dibandingkan dengan Rf hasil KLTA. Spot yang terbentuk pada permukaan plat disinari dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya.

Bercak noda yang dihasilkan pada plat KLT dihitung nilai Rf-nya, kemudian dikerok dan dilarutkan dalam etanol, selanjutnya di sentrifugasi untuk mengendapkan silikanya, dilakukan sampai plat silica berwarna putih. Supernatan yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan didiamkan dalam suhu kamar.

3.5.7 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT (CCRC, 2009)

3.5.7.1 Penyiapan Sel

Sel kanker payudara T47D diambil dari koleksi Universitas Gajah Mada (UGM). Sel kanker dikeluarkan dari *freezer* (-80°C), dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 2–3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan ke dalam *conical tubeyang* telah berisi 10 mL media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), kemudian disentrifugasi untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan media RPMI. Pelet yang terbentuk dimasukkan ke dalam *culture dish* yang telah berisi 10 mL media RPMI dan diinkubasi selama 3 – 4 jam pada suhu $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$, lalu diamati dibawah mikroskop untuk melihat apakah sel melekat di

dasar *culture dish* dan bila jumlah sel di dalam *culture dish* mencapai 70 – 85 % (konfluen), dilakukan panen sel.

Tahapan panen sel yakni, dibuang media kultur terlebih dahulu, ditambah ± 5 mL PBS (*Phosphate Buffered Saline*) serta dihomogenkan kemudian dibuang kembali, ditambahkan trispsin 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 CO₂ selama 24 jam.

3.5.7.2 Penghitungan Sel Kanker

Diambil 10 μ L panen sel dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Diamati dan dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel kanker dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\Sigma \text{ sel yang dihitung} = \frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4 \dots\dots\dots(3.6)$$

3.5.7.3 Peletakan Sel pada *Plate*

Peletakan sel pada *plate* harus diketahui berapa jumlah mL panen sel yang akan diletakkan pada setiap sumuran, dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\Sigma \text{ panen mL pada } \Sigma \text{ panen sel yang ditransfer} = \frac{\Sigma \text{ total sel yang diperlukan}}{\Sigma \text{ sel terhitung / mL}} \dots\dots\dots(3.7)$$

)

Diletakkan sel dan ditambahkan media RPMI sesuai perhitungan ke dalam *plate 96-well* dan diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator CO₂,

akantetapi 12 sumuran bagian bawah disisakan untuk kontrol sel dan kontrol media.

3.5.7.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada *Plate*

Ditimbang masing-masing sampel ekstrak pekat yakni ekstrak pekat kloroform dan ekstrak pekat etil asetat sebanyak 10 mg dalam wadah yang berbeda, dilarutkan masing-masing ekstrak pekat dalam 100 μL DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dan diaduk dengan vortex agar lebih cepat dalam melarutkan sampel, diambil sel dari inkubator, kemudian dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate* 180° diatas tempat buangan dan ditekan secara perlahan diatas tissue untuk meniriskan sisa cairan, dimasukkan 100 μL PBS kedalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu di masukkan larutan sampel sebanyak 100 μL dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 ppm dan diulang sebanyak 3 x (triplo), diinkubasi kembali selam 24 jam.

3.5.7.5 Pemberian larutan MTT

Dibuang media sel dan dicuci dengan PBS, ditambahkan larutan MTT (reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) berwarna kuning 100 μL kesetiap sumuran. Inkubasi kembali selama 3 – 4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk Kristal formazan atau perubahan warna menjadi biru). Apabila Kristal formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*, lalu ditambahkan *stopper* SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10 % dalam 0,1 N HCl, dibungkus *plate* dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.

Langkah selanjutnya yakni pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA *reader* untuk mengetahui nilai IC₅₀ setiap ekstrak. Tahapan awalnya yakni dihidupkan ELISA *reader* dan ditunggu hingga *prosessing* selesai, dibuka pembungkus *plate* kemudian dimasukkan ke ELISA *reader*, dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 550 – 600 nm, dimatikan kembali ELISA *reader*. Lalu dihitung prosentase sel hidup dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.8)$$

Keterangan :

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

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur)

Data dari prosentase sel hidup kemudian dianalisis untuk mengetahui nilai IC₅₀ dengan SPSS (probit/logit).

3.6 Analisis Data

Potensi tannin dalam menghambat sel kanker payudara T47D dapat diketahui dengan melakukan uji IC₅₀, menggunakan analisa *regression* probit SPSS dengan kepercayaan 95% untuk masing-masing konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 µg/mL. Penggunaan data absorbansi yang diperoleh dari pengukuran, dapat ditentukan prosentase sel yang hidup dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.9)$$

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan data yang terinput merupakan data hubungan antarakonsentrasi dengan prosentase sel hidup serta nilai maksimum sebesar 100. Selanjutnya, dilakukan analisa *regression* probit yang akan memunculkan nilai IC_{50} tiap ekstrak dan grafik.



BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan tahapan penyerbukan sampel yang bertujuan untuk mempercepat tahapan ekstraksi maserasi, karena dengan ukuran sampel bentuk serbuk, yang terjadi semakin banyak kontak antara sampel dengan pelarut sehingga maserasi berjalan dengan cepat dan maksimal. Tahapan preparasi sampel tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile B.*) meliputi pencucian sampel, pengeringan dan penyerbukan. Pencucian sampel bertujuan untuk menghilangkan kotoran tanah dan sampah lainnya yang menempel pada sampel. Pengeringan sebanyak $\pm 1,5$ kg sampel rumput bambu dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang selama 1 minggu kemudian pemanasan menggunakan oven pada suhu $30 - 37$ °C selama ± 24 jam, hal ini berfungsi mengurangi kadar air untuk menghindari tumbuhnya mikroba sehingga sampel tidak mudah busuk dan mempermudah proses ekstraksi. Pengeringan sampel pada suhu ruang berfungsi untuk menghindari rusaknya senyawa aktif terutama tanin yang terkandung dalam sampel. Tahap selanjutnya yakni penyerbukan sampel yang berfungsi untuk menyeragamkan ukuran sampel dengan ukuran 90 mesh dan memperluas permukaan, sehingga diharapkan proses ekstraksi lebih maksimal karena kontak antara sampel dengan pelarut lebih maksimal. Hasil yang diperoleh disebut sebagai sampel tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile B.*).

Pada penelitian ini sampel tanaman rumput bambu segar berwarna hijau matang dipreparasi sebanyak $\pm 1,5$ kg tanaman rumput bambu basah. Kemudian dikeringkan hingga bobotnya menyusut menjadi 500 gram tanaman rumput

bambu kering. Setelah diserbukkan berkurang menjadi 300 gram. Sehingga 60% sampel yang hilang. Hasil yang diperoleh berupa serbuk berwarna hijau pudar. Selanjutnya serbuk halus dilakukan analisa uji kadar air.

4.2 Analisis Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan pada sampel kering yaitu tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) bertujuan untuk mengetahui kandungan air pada sampel yang digunakan. Prinsipnya adalah penghilangan air yang terkandung dalam sampel dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu diatas titik didih air yaitu 100 – 105 °C hingga diperoleh berat konstan. Selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan merupakan kadar air yang telah teruapkan. Kadar air yang tinggi dalam sampel dapat menjadi media tumbuhnya mikroorganismenya yang dapat mendekomposisi senyawa aktif dalam sampel (Winarno, 2002).

Hasil analisis kadar air sampel kering rumput bambu sebesar 8,828 %. Hasil analisis kadar air pada penelitian ini tidak melebihi 10 %. Kumala (2007) menyatakan bahwa semakin kecil kadar air suatu sampel maka semakin mudah pelarut mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan.

4.3 Ekstraksi dengan Metode Maserasi dan Metode Partisi

Metode ekstraksi senyawa aktif yang digunakan adalah ekstraksi maserasi tanpa pemanasan, berfungsi untuk menghindari kerusakan senyawa tanin dalam sampel karena tanin akan terurai menjadi *pyrogallol*, *pyrocatechol* dan *phloroglucinol* bila dipanaskan sampai suhu 98,89 - 101,67 °C (Browning, 1966), Maserasi berprinsip dengan merendam sampel dengan pelarut dan beberapa kali

dilakukan pengocokan dalam suhu ruang, sehingga terdapat waktu kontak yang cukup antara sampel dengan pelarut yang secara terus menerus akan terdistribusi ke dalam sel tumbuhan dan mengakibatkan pemecahan dinding dan membran sel, kemudian senyawa aktif yang berada dalam sitoplasma akan terambil dan masuk dalam pelarut (Djarwis, 2004).

Sampel seberat 60 gram ditimbang secara terpisah, yang terbagi dalam 2 erlenmeyer 500 mL dengan masing-masing 30 gram dan direndam dengan aseton : air (7:3) sebanyak 500 mL tiap erlenmeyer selama 24 jam. Pemilihan pelarut ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak tanin secara maksimal. Struktur senyawa tanin tersusun atas atom-atom yang berbeda, tanin memiliki gugus hidroksi lebih dari satu serta memiliki momen dipol tidak sama dengan nol ($\mu \neq 0$) yang menyebabkan tanin bersifat polar, sehingga harus dilarutkan dengan pelarut yang bersifat polar. Berdasarkan penelitian Ummah (2010) hasil perhitungan kadar tanin menggunakan metode *lowenthal procter* didapatkan kadar tanin yang lebih banyak menggunakan campuran pelarut aseton: air (7:3) yakni 10,92 %. Tanin dapat membentuk kompleks dengan protein, pelarut aseton bisa meminimalkan interaksi antara tanin dengan protein, dimana protein akan larut dalam aseton sedangkan ekstrak tanin larut dalam fase air, sehingga ekstrak tanin dapat terekstrak dalam air secara maksimal (Sa'adah, 2010). Ekstraksi paling baik menggunakan pelarut aseton: air untuk mencegah hidrolisis ikatan ester dalam tanin (Harborne, 1996).

Maserasi dilakukan dalam waktu 24 jam disertai pengadukan menggunakan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 1500 rpm. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak tanin lebih banyak, karena proses ekstraksi

berlangsung optimal dengan tersedianya waktu kontak antara sampel dengan pelarut. Pengadukan bertujuan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk sampel sehingga tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam dan di luar sel (Baraja, 2008).

Ekstraksi ini dilakukan 3 kali pengulangan untuk mendapatkan ekstrak tanin lebih banyak karena suatu ekstraksi berlangsung optimal jika dilakukan berulang kali. Berdasarkan hukum distribusi ekstraksi, ekstraksi dengan n kali lebih efektif dari pada ekstraksi tunggal dengan total volume yang sama (Wonorahardjo, 2013). Penambahan asam askorbat 10 mM saat proses maserasi berfungsi sebagai antioksidan untuk mencegah terjadinya oksidasi senyawa tanin selama proses ekstraksi, sehingga jika terjadi proses oksidasi maka yang diharapkan bukan senyawa tanin melainkan asam askorbat (Ummah, 2010). Robinson (1995) menyatakan senyawa polifenol seperti tanin sangat peka terhadap oksidasi udara dalam larutan netral atau basa, oleh karena itu dianjurkan untuk menambahkan senyawa pereduksi seperti asam askorbat pada ekstrak.

Tahapan selanjutnya yaitu proses penyaringan menggunakan corong *buchner* dengan bantuan pompa vakum bertujuan untuk mempercepat proses penyaringan. Prinsipnya pompa vakum akan memperkecil tekanan dalam erlenmeyer yang secara otomatis akan memperbesar tekanan diluar, sehingga tekanan diluar akan mendorong filtrat masuk kedalam erlenmeyer. Filtrat yang diperoleh, dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 50 °C untuk menguapkan pelarut sehingga diperoleh ekstrak pekat. Prinsip kerja *rotary evaporator vacuum* adalah penurunan tekanan sehingga pelarut akan menguap 5 - 10 °C pada suhu dibawah titik didihnya (Ernawati, 2013). Pelarut yang

menguap lebih dahulu di bawah titik didihnya dikarenakan adanya pompa vakum yang berfungsi untuk menurunkan tekanan. Penurunan tekanan menyebabkan titik didih pelarut menjadi turun sehingga pelarut akan lebih mudah menguap. Pelarut yang terkena panas dari *waterbath* dibawah suhu titik didihnya akan menguap, uap dari pelarut akan terkondensasi menjadi wujud cair yang tertampung dalam labu destilat sedangkan ekstrak tertampung dalam labu alas bulat (Abraham, 2013 dalam A'ilah 2015). Proses pemekatan dihentikan ketika ekstrak yang diperoleh cukup pekat dan ditandai dengan berhentinya penetesan pelarut pada labu alas bulat. Berikut adalah hasil maserasi pada tabel 4.1:

Tabel 4.1 Hasil maserasi serbuk rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.)

Pelarut	Perubahan warna		Serbuk (g) + pelarut (mL)	Berat (g)		Randemen (b/b)
	Filtrat	ekstrak pekat		ekstrak kasar	ekstrak pekat	Ekstrak pekat
Aseton: air (7:3)	Hijau tua	Coklat kehijauan	60 g + 500 ml	9, 212	6, 0401	10,087

Senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar diduga bukan hanya senyawa tanin melainkan kumpulan dari senyawa yang memiliki kepolaran yang sama dengan pelarutnya, oleh karena itu ekstrak kasar dipartisi menggunakan variasi pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu kloroform dan etil asetat. Pemilihan pelarut ini dimaksudkan agar senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran berbeda dapat terekstrak ke dalam pelarut yang sesuai (Voight, 1994 dalam Lailah, 2014). Penambahan pelarut kloroform berfungsi menghilangkan senyawa yang sifatnya lebih nonpolar seperti terpenoid (Harborne, 1996). Terbentuk 2 lapisan setelah dipertisi yakni lapisan atas dan bawah. Lapisan atas berupa fasa air dan lapisan bawah berupa fasa kloroform, hal ini karena massa

jenis air lebih rendah dari kloroform yakni $1 < 1,483$. Senyawa tanin larut dalam fasa air yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari coklat kehijauan menjadi biru kehitaman setelah ditambahkan FeCl_3 1 %. Fasa air dipartisi menggunakan pelarut etil asetat untuk menghilangkan senyawa yang sifat kepolarannya sesuai dengan etil asetat. Hasil partisi dengan etil asetat didapatkan 2 lapisan, yakni lapisan atas berupa fasa etil asetat dan lapisan bawah berupa fasa air. Tanin terkandung dalam fasa air karena memiliki kepolaran yang sesuai, sehingga fasa air dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarutnya dan diperoleh ekstrak pekat tanin.

4.4 Uji Fitokimia Ekstrak Rumpun Bambu dengan Reagen

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa dalam sampel. Prinsipnya adalah reaksi pengujian warna (*spot test*) dengan suatu pereaksi warna (Kristanti dkk.,2008). Hasil uji fiokimia tanin dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Data hasil uji fitokimia tanin

Reagen	Sampel				Keterangan hasil positif	
	Filtrat maserasi	Fase air	Fase kloroform	Fase etil asetat		
FeCl_3 1 %	+++	++ +	-	-	Hijau Kehitaman	
Larutan gelatin	-	+	-	-	Endapan	
Formaldehid 3 %: HCl (3:1)	Katekin	+	++	-	-	Coklat kekuningan
	Proantosianidin (katekol)	-	-	-	-	Merah
Na-asetat + FeCl_3 1 % (galat)	+	++ +	-	-	Hitam kebiruan	

Keterangan +++ = Kandungan senyawa lebih banyak (warna sangat pekat)

++ = Mengandung senyawa (warna cukup pekat)

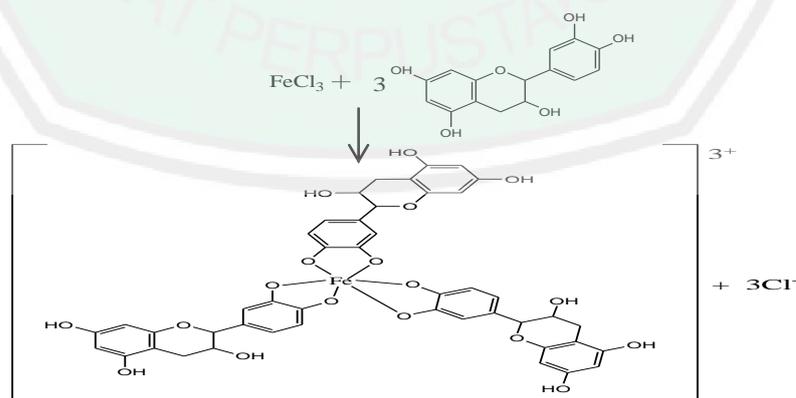
+ = Mengandung senyawa (berwarna)

- = Tidak mengandung senyawa

4.4.1 Uji Fitokimia Tanin Menggunakan FeCl_3 1 %

Uji fitokimia tanin pada penelitian ini menggunakan logam transisi Fe. Logam Fe merupakan salah satu logam yang sering digunakan untuk reaksi kompleksasi karena kemudahannya membentuk senyawa kompleks. Hal ini disebabkan karena delokalisasi elektron yang memungkinkan pada orbital s dan d. Senyawa transisi stabil dan lebih mudah membentuk kompleks dari pada senyawa golongan utama karena titik leleh dan entalpi molar penggabungan logam-logam transisi lebih tinggi dari pada unsur golongan utama (Rosyda dan Ersam, 2009).

Hasil positif uji tanin setelah penambahan FeCl_3 adalah terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta. Penambahan larutan FeCl_3 ini digunakan untuk mengidentifikasi dalam sampel mengandung gugus fenol, yang mana tanin merupakan senyawa polifenol. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta pada ekstrak ini disebabkan tanin (senyawa polifenol) akan membentuk senyawa kompleks dengan FeCl_3 . Adapun dugaan reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 4.1 (Harbone, 1994):



Gambar 4.1 Reaksi tanin dengan FeCl_3

Berdasarkan Gambar 4.1 menunjukkan terjadi ikatan kovalenkoordinasi pada senyawa kompleks antara ion atau atom Fe dengan 6 atom O dari senyawa tanin. Secara umum senyawa yang pembentukannya melibatkan pembentukan ikatan kovalen koordinasi dianggap sebagai senyawa koordinasi, senyawa koordinasi merupakan senyawa yang melibatkan pembentukan ikatan kovalen koordinasi antara ion logam atau atom logam dengan atom nonlogam. Ion atau atom Fe merupakan atom logam, sedangkan atom O dari senyawa tanin merupakan atom nonlogam. Atom Fe adalah atom pusat dari senyawa kompleks tersebut yang menerima donor elektron, sedangkan atom O merupakan atom donor yang memberikan elektron pada atom pusat Fe. Atom donor terdapat pada suatu ion atau molekul netral. Ion dan molekul netral yang memiliki atom-atom donor yang dikoordinasikan pada atom pusat disebut dengan ligan. Ligan O dari senyawa tanin memiliki pasangan elektron bebas (PEB). Atom O tersebut bertindak sebagai basa lewis yang dapat mendonorkan pasangan elektron bebasnya pada atom pusat Fe yang berlaku sebagai asam lewis. Ion Fe^{3+} dalam pembentukan senyawa kompleks akan terhibridisasi membentuk hibridisasi d^2sp^3 , sehingga akan terisi oleh 6 pasang elektron bebas atom O (Effendy, 2007). Kestabilan dapat tercapai jika tolakan antara ligan pada 3 tanin minimal. Hal ini terjadi jika 3 tanin tersebut posisinya dijauhkan. Ion logam pusat Fe^{3+} yang cenderung stabil dengan bilangan koordinasi 6 (oktahedral) ini, memungkinkan untuk senyawa polifenol seperti tanin katekol mengikat besi dalam perbandingan 3 : 1 (1 atom Fe mengikat 3 ligan bidentat tanin katekol) (Sari, 2014).

4.4.2 Uji Fitokimia Tanin Menggunakan Larutan Gelatin

Uji fitokimia menggunakan larutan gelatin berfungsi untuk memperkuat dugaan awal adanya tanin dalam sampel daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.). Tanin merupakan himpunan polihidroksi fenol yang dapat dibedakan dengan senyawa fenol lainnya karena sifat tanin dapat mengendapkan protein. Protein yang digunakan pada penelitian ini berupa larutan gelatin. Gelatin adalah protein yang dapat larut dalam air dan dapat dicernakan, berasal dari kolagen yang telah dipanaskan dalam air mendidih oleh larutan asam atau basa encer, terdiri atas 25 % glisin dan 25 % prolin serta hidroksi prolin (Poedjiaji dan Titin, 1994). Robinson (1995) menyatakan larutan tanin dalam air menimbulkan endapan jika ditambahkan dengan gelatin. Berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan adanya endapan putih, hal ini berarti dalam sampel mengandung tanin. Terbentuknya senyawa tanin protein dikarenakan adanya ikatan hidrogen antara tanin dan protein pada gelatin sehingga terbentuk endapan putih (Leemensand, 1991).

4.4.3 Uji Fitokimia Tanin Katekol dan Galat

Pengujian tanin dilanjutkan untuk mengetahui jenis golongannya. Secara kimia terdapat dua jenis golongan tanin yaitu tanin terkondensasi atau katekol dan tanin terhidrolisis atau tanin galat. Penambahan formaldehid 3 %: HCl pekat (3:1) dengan pemanasan pada sampel digunakan untuk mengetahui kandungan tanin katekol, adanya endapan merah menunjukkan bahwa dalam sampel positif mengandung tanin katekol atau proantosianidin, sedangkan warna coklat menunjukkan adanya katekin. Tanin adalah senyawa fenol yang dapat berkondensasi dengan formaldehid. Nama lain tanin terkondensasi ialah

proantosianidin, karena bila direaksikan dengan asam panas, beberapa ikatan karbon-karbon penghubung satuan terputus dan dibebaskanlah monomer antosianidin. Penambahan HCl panas pada sampel tumbuhan digunakan untuk mendeteksi katekin dan leukoantosianidin, terbentuknya warna coklat kuning menunjukkan adanya katekin sedangkan timbulnya warna merah menunjukkan adanya leukoantosianidin (Harborne, 1996; Robinson, 1995). Uji fitokimia tanin galat atau tanin terhidrolisis dilakukan dengan menambahkan natrium asetat hingga jenuh kemudian ditambahkan FeCl_3 1% dalam sampel, terbentuknya warna biru tinta atau hitam menunjukkan adanya tanin galat (Ummah, 2010; Sa'adah, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Tabel 4.2 tidak menunjukkan adanya proantosianidin, karena setelah penambahan formaldehid 3%: HCl pekat (3:1) dengan pemanasan tidak membentuk endapan merah, melainkan terbentuk warna coklat kekuningan pada filtrat maserasi dan fase air setelah dipartisi. Terbentuknya warna sampel menjadi coklat kekuningan setelah penambahan HCl panas diduga adanya senyawa katekin dalam sampel tersebut. Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal atau galokatekin yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi.

Filtrat hasil uji tanin katekol ditambahkan natrium asetat hingga jenuh, kemudian ditambahkan dengan FeCl_3 1% menghasilkan warna hitam kebiruan. Terbentuknya warna tersebut menunjukkan adanya dugaan tanin galat atau tanin terhidrolisis dalam sampel daun rumput bambu. Tanin terhidrolisis terbagi menjadi 2 jenis diantaranya gallotanin dan ellgitanin. Kandungan tanin

terhidrolisis yang dimaksud dalam penelitian ini adalah jenis gallotanin, karena menurut Manitto (1981) gallotanin memberikan warna biru kehitaman jika ditambahkan FeCl_3 1 % dan larut dalam air. Robinson (1995) juga menyatakan reaksi sampel dengan larutan besi (III) klorida membentuk warna hitam-biru membuktikan adanya 3,4,5-trihidroksifenol. Gallotanin jika dihidrolisis menghasilkan asam galat dan glukosa.

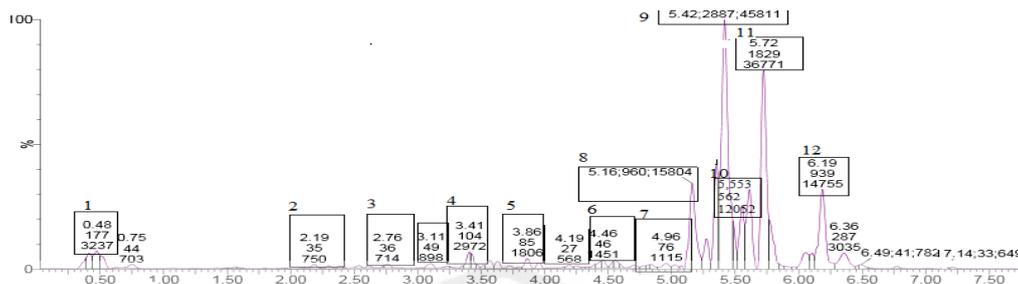
4.5 Identifikasi Senyawa dengan UPLC/QToF/MS/MS System (Water)

4.5.1 Pemisahan Senyawa dengan UPLC dan Identifikasi Senyawa dengan UPLC/QToF/MS/MS System (Water)

Kromatografi cair merupakan teknik yang mana solut atau zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati kolom (Gandjar dan Rohman, 2008). Prinsip dari LC-MS yaitu memisahkan senyawa yang tidak menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi berdasarkan perbedaan distribusi antara fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak atau pelarut untuk membawa sampel melalui kolom yang berisi padatan pendukung yang dilapisi cairan sebagai fasa diam. Selanjutnya analit dipartisikan diantara fasa gerak dan fasa diam tersebut, sehingga terjadi pemisahan karena adanya perbedaan koefisien partisi. Sampel yang telah dipisahkan dalam kolom diuapkan pada suhu tinggi, kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan (m/z), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik menghasilkan spectra massa. Spektra massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya (Khopkar, 2008).

Penelitian ini menggunakan fasa diam berupa kolom Sunfire C18. Kolom C18 merupakan kolom dengan fasa terbalik dimana fasa diam C18 bersifat non polar dan fasa gerak bersifat polar. Kolom pengaman atau pra-kolom (*guard column*) yang digunakan berukuran 1,7 μm dengan diameter 2,1 x 50 mm. Kolom pengaman ini memiliki fungsi untuk menyaring kotoran yang terbawa dalam fasa diam serta untuk menjenuhkan fasa diam dalam rangka menghindarkan terjadinya erosi fasa diam oleh aliran pelarut (Hendayana, 2006).

Fasa gerak merupakan fase yang bergerak di atas celah atau di atas fase diam yang membawa analit. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini berupa 2 campuran yakni A= air (H_2O) dengan 0,1 % asam format (HCOOH), B = asetonitril (CH_3CN) dengan 0,1 % asam format (HCOOH). Elusi digunakan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) yaitu 30% H_2O + 0,1 % asam format, 70% asetonitri. Fase gerak yang digunakan memiliki kemurnian yang sangat tinggi dan telah dilakukan dengan saringan 0,45 μm . Penyaringan dibantu dengan pompa vakum dengan tujuan menyaring partikel kotoran yang kecil sekaligus menghilangkan gas dari pelarut karena gas dapat mengganggu *base line* (Hendayana, 2008). Penyaringan partikel kotoran ini dimaksudkan agar tidak terjadi gangguan pada sistem kromatografi, sebab adanya partikel kecil dapat terkumpul dalam kolom sehingga dapat mengakibatkan suatu kekosongan pada kolom (Gandjar dan Rohman, 2008). Kromatogram UPLC hasil dari pemisahan senyawa tanin dalam fraksi air Rumput Bambu disajikan dalam Gambar 4.2 :



Gambar 4.2 Kromatogram UPLC hasil pemisahan senyawa dalam fraksi air Rumput Bambu

Berdasarkan identifikasi *database* UPLC/QToF/MS/MS terdapat 12 senyawa yang dapat teridentifikasi. Tabel 4.3 Senyawa yang diduga dalam fraksi air Rumput Bambu berdasarkan waktu retensi.

Tabel 4.3 Senyawa yang diduga terdapat dalam fraksi air Rumput Bambu

No Puncak	Waktu retensi (min)	% Luas Area	Senyawa
1	0,48	1,42%	<i>Chatecin</i>
2	2,43	0,33%	<i>Berberine</i>
3	2,76	0,31%	<i>Berberine</i>
4	3,41	1,30%	<i>Berberine</i>
5	3,86	0,79%	<i>Palmatine</i>
6	4,46	0,63%	<i>Palmatine</i>
7	4,96	0,49%	<i>Triagalloyl-diglucose</i>
8	5,16	6,92%	<i>Palmatine</i>
9	5,42	20%	<i>Ellagic-acid-glucoside2- ethyl -3,4,5-trimethyl-tetrahydrofuran</i>
10	5,55	5,29%	<i>Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl</i>
11	5,721	16,12%	<i>Trigalloyl(2R,3R)- tetrahydro-2H-pyran-2,4,5-tetraol</i>
12	6,19	6,47%	<i>Fucosterol</i>

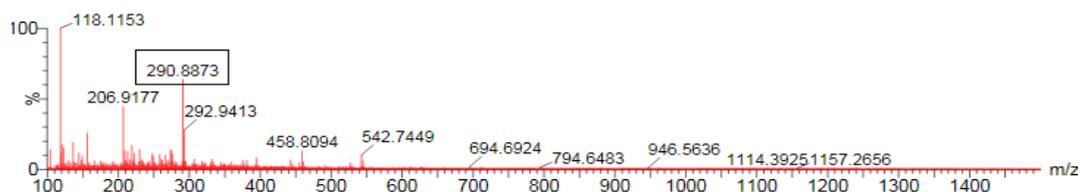
Berdasarkan kromatogram pada Gambar 4.2 diduga adalah senyawa katekin dengan nilai m/z 290 pada puncak nomor 1. Pada puncak nomor 2, 3 dan 4 diduga senyawa *Berberin* dengan nilai m/z 335 dan 337. *Palmatine* dengan nilai m/z 355 pada puncak 5, 6 dan 8. Senyawa *Triagalloyl-diglucose* dengan nilai m/z

782,2564 pada puncak nomer 7, senyawa *Ellagic-acid-glucoside*2 –ethyl - 3,4,5-trimethyl- tetrahydrofuran dengan nilai m/z 593,2776 pada puncak nomer 9, senyawa *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl* dengan nilai m/z 623,2873 pada puncak nomer 10, senyawa *trigalloyl (2R,3R)-tetrahydro-2H- pyran-2,4,5-tetraol* dengan nilai m/z 607,2926 pada puncak 11 dan golongan steroid yakni fucosterol dengan nilai m/z 149,0577 pada puncak nomer 12.

Berdasarkan hasil diatas dapat diketahui bahwa dalam fraksi air Rumput Bambu tidak hanya ada senyawa tannin melainkan ada gabungan dari senyawa alkaloid dan steroid. Hal ini dapat terjadi karena adanya ikatan glikosida antar atom karena tidak dilakukan hidrolisis sebelum dianalisis. Berdasarkan Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa senyawa tanin memiliki nilai persen luas area paling besar dibandingkan dengan alkaloid dan steroid yakni 43,32 % hal ini berarti senyawa tanin merupakan senyawa mayor dalam fraksi air Rumput Bambu.

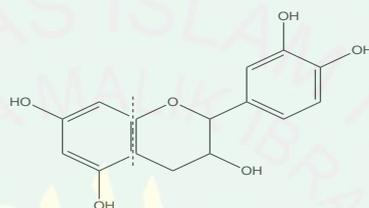
1. Katekin

Katekin merupakan jenis tannin terkondensasi yang terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer, dan kemudian oligomer yang lebih tinggi .Berikut adalah spectra massa dari katekin:



Gambar 4.3 Spektra Massa dari Katekin

Senyawa dengan berat molekul 1157,2656 terfragmentasi menjadi molekul-molekul. Pada puncak dengan nilai m/z 790 diduga senyawa katekin terfragmentasi dengan melepaskan M-80 menjadi m/z 208. Selisih antara hasil pada spectra dengan hasil m/z diasumsikan atom H berikatan dengan senyawa lain. Pada puncak m/z 208 terfragmentasi menjadi m/z 114. Berikut adalah fragmentasi dari katekin:

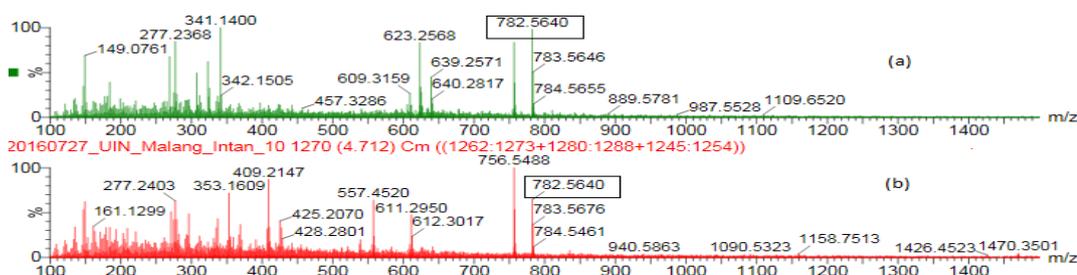


Katekin m/z 490

Gambar 4.4 Struktur senyawa katekin

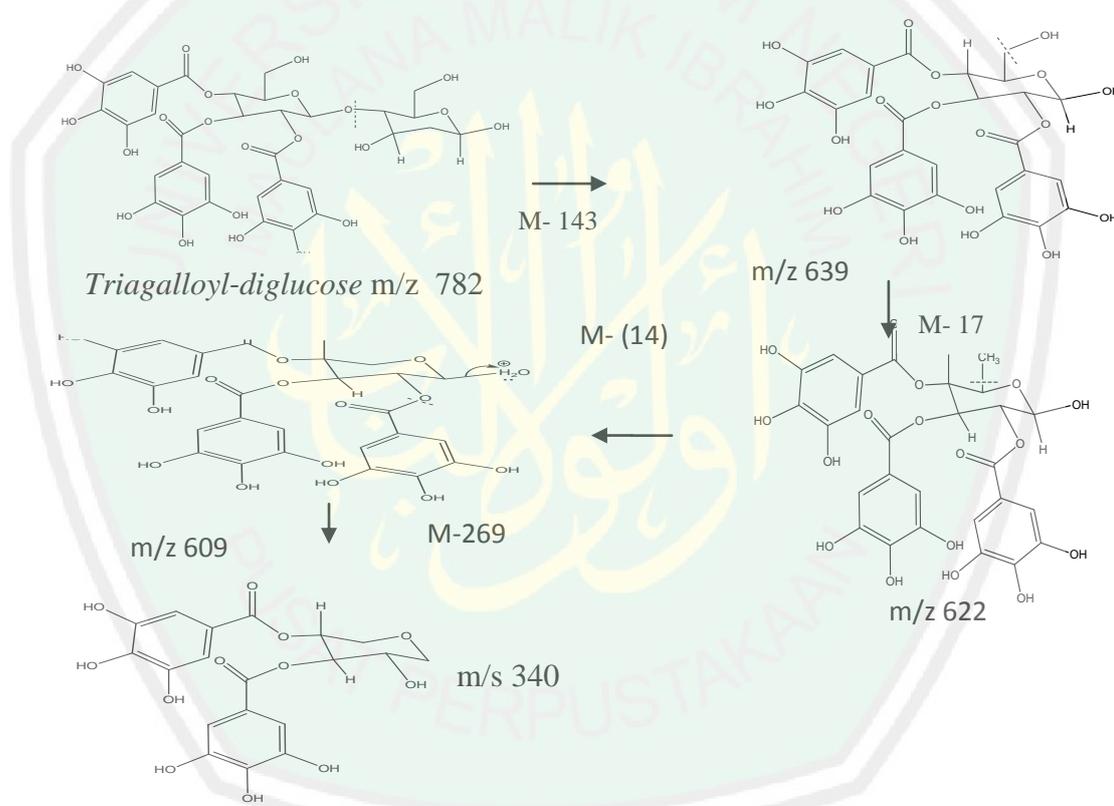
2. *Triagalloyl-diglucose*

Triagalloyl-diglucose merupakan golongan dari senyawa tannin terhidrolisis. Senyawa ini mengandung ikatan ester antara suatu monosakarida terutama gugus hidroksilnya (Hagerman *et al.*, 1992). Tanin terhidrolisis ini merupakan jenis tanin gallotanin. Gallotanin memiliki lima ikatan ester yang mengandung gugus alifatik hidroksil dengan glukosa sebagai inti (Hagerman, 2002). Berikut adalah spectra mass dari *Triagalloyl-diglucose* pada tR 4,973:



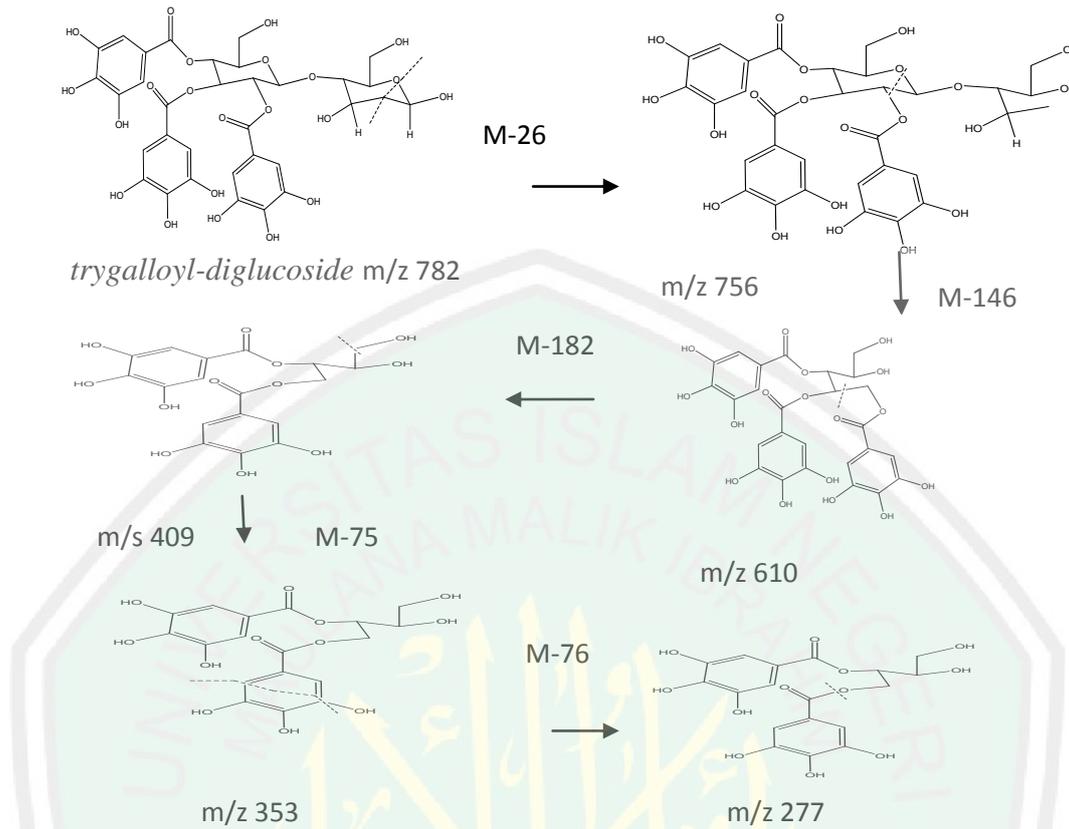
Gambar 4.5 Spektra m/z *Triagalloyl-diglucose* (a) tR 4,973 (b) tR 4,712

Berdasarkan spektra massa Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa puncak tertinggi memiliki nilai m/z 782.2564 pada waktu retensi 4,973. Tingginya puncak menandakan kelimpahan senyawa dalam sampel dalam jumlah yang tinggi. Pada puncak 782,5640 m/z maka akan terfragmentasi menjadi m/z 639; 622; 609 dan 341. Berdasarkan puncak dengan nilai m/z 782,5640 diduga senyawa *Triagalloyl-diglucose*, berikut adalah fragmentasi dari *Triagalloyl-diglucose* pada Gambar 4.5 :



Gambar 4.6 Fragmentasi *Triagalloyl-diglucose* 4.5.a pada tR 4,973

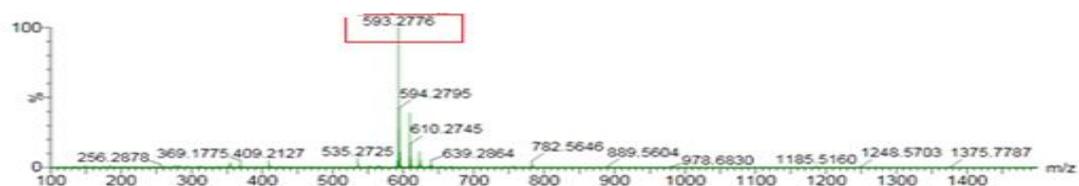
Pada puncak dengan nilai m/z 782,5640 muncul 6 kali pada spectra massa dengan waktu retensi yang berbeda. Banyaknya kesamaan nilai m/z pada waktu retensi yang berbeda menunjukkan bahwa senyawa dengan m/z 782 yang diduga senyawa *trygalloyl-diglucoside* merupakan senyawa mayor dalam fraksi air Rumput Bambu. Berikut adalah fragmentasi pada tR 4,712:



Gambar 4.7 Fragmentasi *Triagalloyl-diglucose* 4.5.b tR 4,712

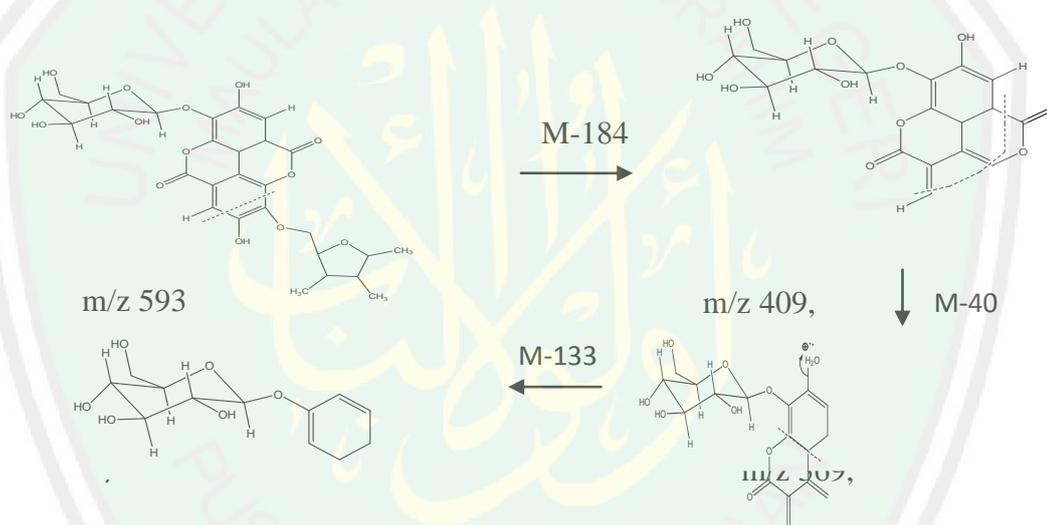
3. *Ellagic-Acid-Glucoside-2-Ethyl-3,4,5-Trimethyl-Tetrahydrofuran*

Ellagic-acid-glucoside-2-ethyl-3,4,5-trimethyl-tetrahydrofuran diduga sebagai gallotanin yang termasuk sebagai golongan tanin terhidrolisis. Tanin terhidrolisis adalah pecahnya karbohidrat dan asam fenolik oleh asam lemah atau basa lemah (Hagerman, 1998). Berikut adalah spektra massa senyawa tersebut:



Gambar 4.8 Spektra *Ellagic acid glucoside 2-ethyl-3,4,5-trimethyltetrahydrofuran*

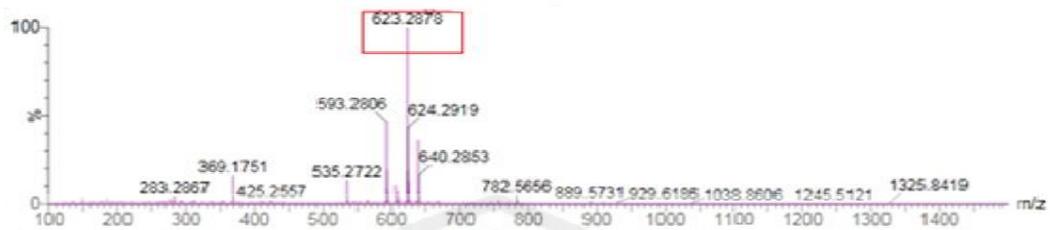
Berdasarkan Gambar 4.8 dapat diketahui bahwa senyawa tersebut mempunyai berat molekul 1357,78787 terfragmentasi menjadi molekul-molekul. Pada puncak dengan nilai m/z 593, 2776 diduga senyawa *Ellagic-acid -glucoside 2- ethyl-3,4,5-trimethyl tetrahydrofuran*. Pada puncak m/z 593,2776 terfragmentasi menjadi m/z 409; 369,1775 dan 256. Berikut adalah Berikut adalah fragmentasi dari *Ellagic-acid-glucoside 2- ethyl-3,4,5-trimethyl tetrahydrofuran*:



Gambar 4.9 Fragmentasi *Ellagic – acid – glucoside-2- ethyl -3,4,5-trimethyl-tetrahydrofuran*

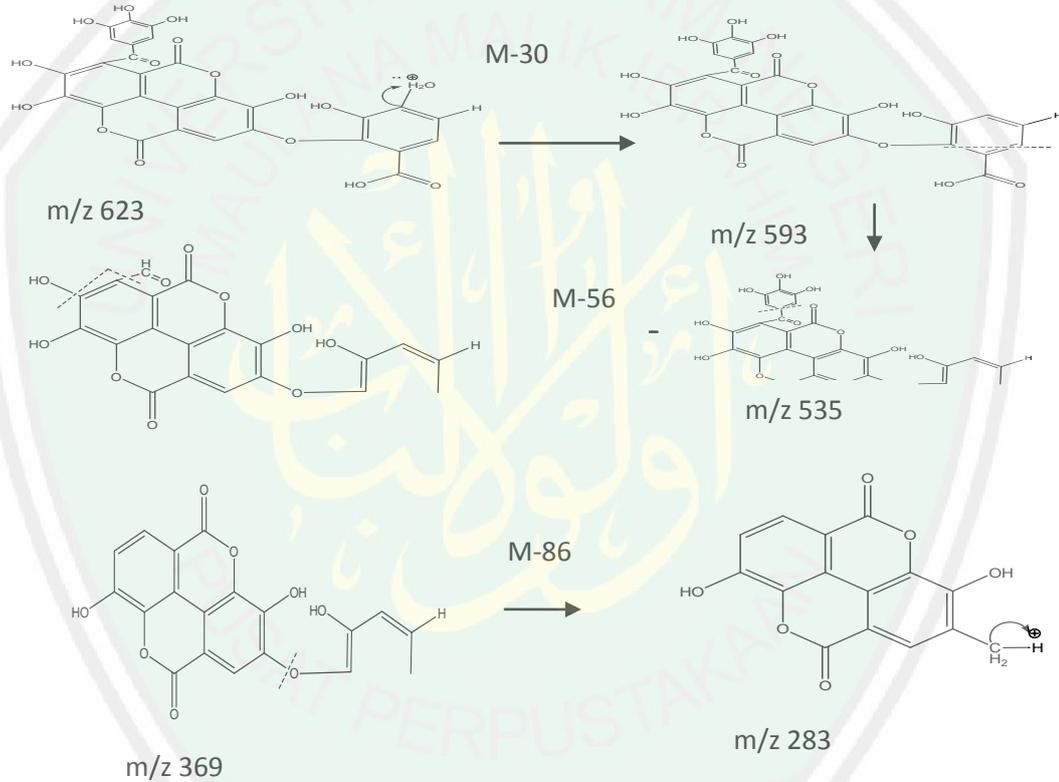
4. *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl*

Ellagic Acid-gallic acid galloyl atau asam ellagat diglukosida merupakan ellagitanin yang termasuk golongan tanin terhidrolisis (Chapman dkk., 2008). Asam ellagat tersebut dihasilkan karena hidrolisis dengan asam kuat (Bate, 1972). Asam ellagat membentuk jarum kristal hijau kuning dengan piridin, meleleh pada $360\text{ }^{\circ}\text{C}$, tidak larut dalam eter, sedikit larut dalam air dan larut dalam alkali (Fieser, 1961).



Gambar 4.10 Spektra massa dari *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl*

Berikut adalah fragmentasi dari *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl*:



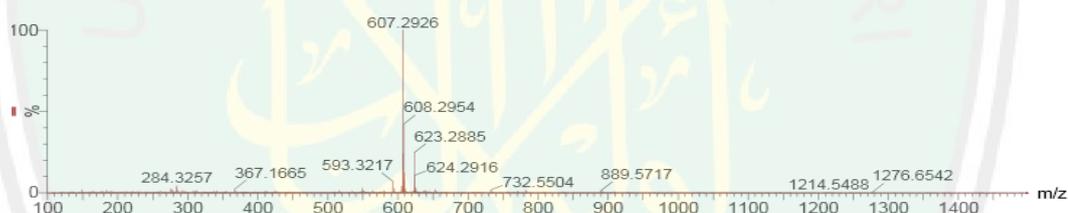
Gambar 4.11 fragmentasi dari *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl*

Berdasarkan Gambar 4.10 dapat diketahui bahwa puncak tertinggi mempunyai nilai m/z 623,2878 yang menunjukkan senyawa *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl* yang muncul pada t_R 5,553. Munculnya puncak tertinggi karena kelimpahan senyawa *Ellagic Acid-diglucoside* banyak. Ellagitanin pada puncak m/z 623 terfragmentasi dengan melepaskan asam galat (170 Da) dan galloyl (152 Da)

menjadi menjadi m/z 425,2557. Pada puncak sebesar m/z 425,2557 terfragmentasi menjadi m/z 369,1751. Senyawa tersebut diidentifikasi sebagai *Ellagic Acid - Gallic Acid Galloyl*.

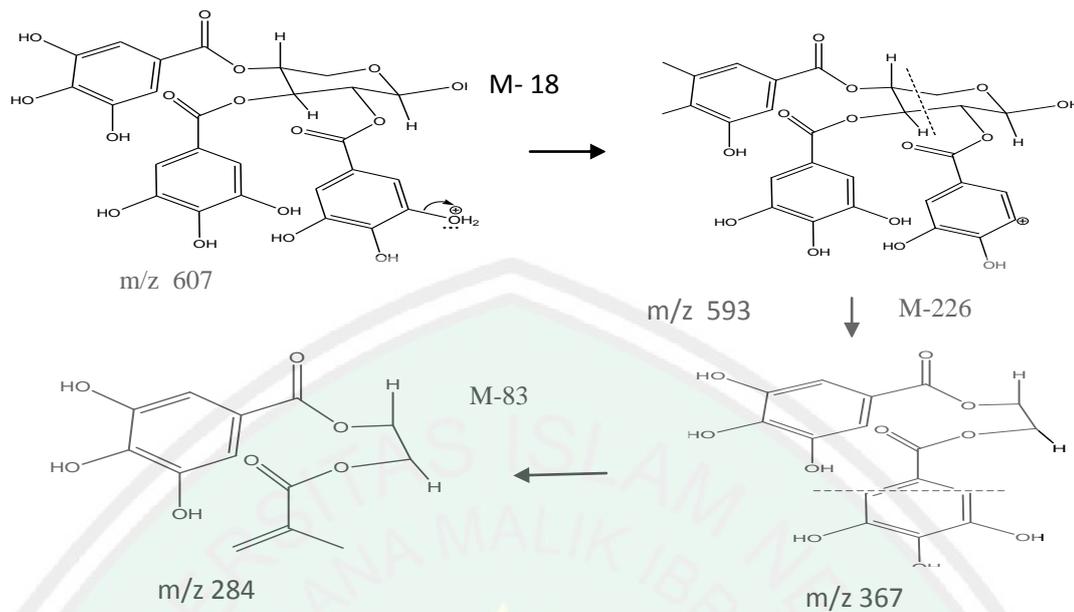
5. *Trigalloyl (2R, 3R)- Tetrahydro-2H-Pyran-2,4,5-Tetraol*

Trigalloyl (2R, 3R)- Tetrahydro-2H-Pyran-2,4,5-Tetraol merupakan golongan dari senyawa tannin terhidrolisis. Senyawa ini mengandung ikatan ester antara suatu monosakarida terutama gugus hidroksilnya (Hagerman et al., 1992). Berikut adalah spectra massa dari *Trigalloyl (2R, 3R)- Tetrahydro-2H-Pyran-2,4,5-Tetraol*:



Gambar 4.12 Spektra massa *Trigalloyl (2R, 3R)-Tetrahydro-2H-Pyran-2,4,5-Tetraol*

Berdasarkan Gambar 4.12 dapat diketahui bahwa puncak tertinggi mempunyai nilai m/z 607,2926 yang menunjukkan senyawa *Trigalloyl (2R, 3R)- Tetrahydro-2H-Pyran-2,4,5-Tetraol* yang muncul pada t_R 5,721 yang merupakan senyawa mayor. Pada puncak m/z 607,2926 terfragmentasi dengan melepaskan H_2O (18 Da) menjadi m/z 593,3217. Puncak dengan nilai m/z 593,3217 melepaskan $C_{12}H_{16}O_6$ menjadi m/z 367,1665. Kemudian m/z 367,1665 terfragmentasi lagi dengan melepas $C_5H_8O_3$ menjadi menjadi m/z 284,3257. Pada puncak dengan nilai m/z 284,3257 dengan nama 2 (methacryloxy) ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate. Berikut fragmntasi senyawa tersebut:



Gambar 4.13 Fragmentasi *Trigalloyl(2R,3R)-Tetrahydro-2H-Pyran-2,4,5-Tetraol*

Berdasarkan hasil analisis dengan *liquid chromatography - mass spectra* (LC-MS) dari fraksi air dapat diketahui bahwa senyawa *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl*, *Ellagic-acid-glucoside pentoside* dan *Triagalloyl-diglucose* merupakan senyawa mayor. Senyawa *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl* dengan nilai m/z yaitu 623 muncul 4 kali pada waktu retensi 4,973; 5,553; 5,571 dan 5,721. Pada puncak dengan nilai m/z 593 yang diduga senyawa *Ellagic - acid - glucoside-2-ethyl -3,4,5-trimethyl-tetrahydrofuran* muncul 4 kali pada waktu retensi 5,413; 5,553; 5,571 dan 5,721. Senyawa dengan nilai m/z 782 yang diduga senyawa *Triagalloyl-diglucose* muncul sebanyak 6 kali pada waktu retensi yang berbeda yakni 4,712; 4,973; 5,159; 5,413; 5,53; 5,571 dan 5,721. Tabel 4.4 Senyawa yang diduga dalam fraksi air Rumput Bambu berdasarkan waktu retensi.

Tabel 4.4 Identifikasi senyawa yang diduga terdapat dalam fraksi air Rumput Bambu

LC/MS (M-H) m/z	Golongan	Senyawa	Banyaknya Senyawa Muncul (n)
290,8873	Tanin	<i>Chatecin</i>	1
337,1634	Alkaloid	<i>Berberine</i>	5
355,1606	Alkaloid	<i>Palmatine</i>	5
782,2540	Tanin	<i>Triagalloyl-diglucose</i>	6
593,2776	Tannin	<i>Ellagic – acid - glucoside 2-ethyl -3,4,5-trimethyl-tetrahydrofuran</i>	5
623,2873	Tannin	<i>Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl</i>	4
607,2926	Tannin	<i>trigalloyl(2R,3R)-tetrahydro-2H-pyran-2,4,5-tetraol</i>	4
149	Steroid	<i>Fucosterol</i>	4

4.6 Pemisahan Senyawa Tanin dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

KLT analitik digunakan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang baik dalam pemisahan senyawa tanin. Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa dalam bentuk noda dengan jumlah yang banyak. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas.

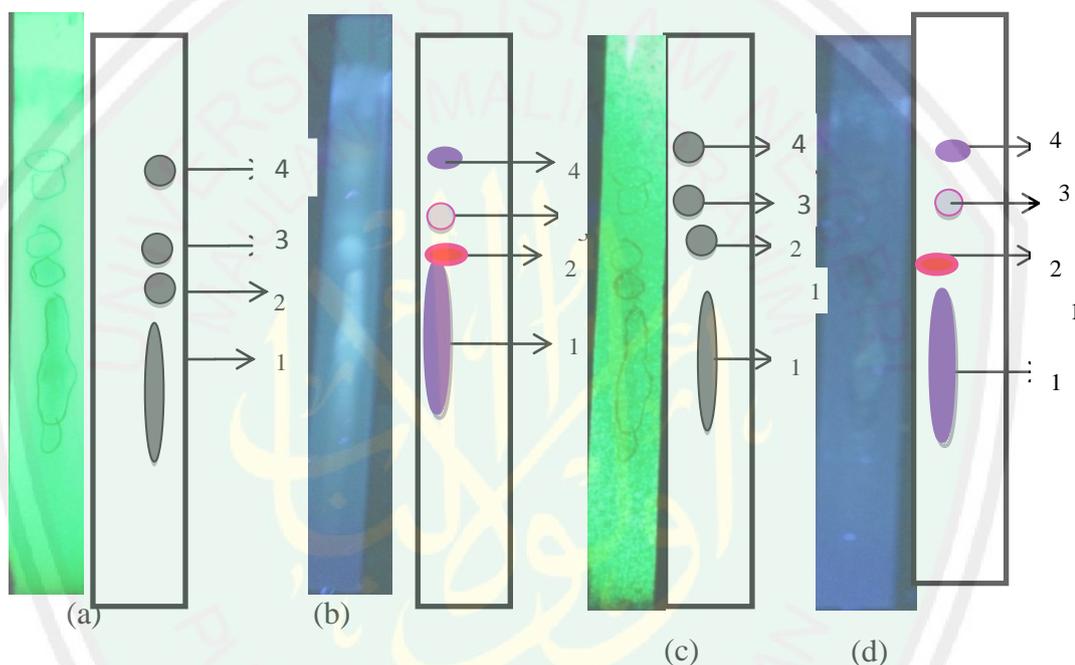
Pemilihan eluen terbaik diharapkan mampu memisahkan komponen tanin yang terkandung dalam daun rumput bambu dengan baik. Pemisahan tanin menggunakan beberapa variasi eluen terbaik dari berbagai penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya, diantaranya n-butanol : asam asetat : air (BAA) (2:0,5:2,5) (Nahari, 2015), n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) (Hayati dkk., Ummah, 2010); n-heksana : etil asetat (6:4) (Mangunwardoyo dkk., 2009), kloroform: metanol: air (7:3:0,4) dan asam asetat glasial :air (0,1 :4,9).

Penjenuhan dilakukan dengan menutup rapat masing-masing bejana yang terisi 5 mL eluen diatas. Penjenuhan berfungsi untuk mempermudah proses elusi dengan adanya tekanan dari uap pelarut. Penjenuhan tiap eluen dilakukan selama 1 jam sebelum dilakukan proses elusi, kecuali penjenuhan n-butanol: asam asetat: air dilakukan 1 hari sebelum proses elusi, karena eluen tersebut mengandung air dan bersifat polar sehingga proses elusi berlangsung lama jika penjenuhannya kurang maksimal. Aplikasi penotolan sampel dilakukan dengan menotolkan larutan ekstrak 15000 ppm pada 5 plat silica, dilakukan 15 x penotolan pada setiap platnya. Pemisahan ini terjadi karena adanya perbedaan kepolaran senyawa dengan fase diam berupa plat silica dan fase gerak berupa eluennya. Proses elusi dihentikan bila eluen telah mencapai tanda batas atas. Noda yang dihasilkan dideteksi dengan pereaksi FeCl_3 1 %, kemudian diamati dibawah lampu UV panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Tabel 4.5 Data penampakan noda senyawa tanin hasil KLTA ekstrak pekat daun rumput bambu pada beberapa variasi eluen

No.	Eluen	Jumlah noda	Nilai Rf	Keterangan
1.	n-butanol : asam asetat : air (2:0,5:2,5)	3	0,28 ; 0,46 ; 0,77	Terpisah
2.	n-butanol : asam asetat : air (4:1:5)	4	0,31 ; 0,75 ; 0,83 ; 0,89	Terpisah
3.	asam asetat glasial : H_2O (0,1:4,9)	3	0,21 ; 0,48 ; 0,72	Tidak terpisah
4.	n-heksana : etil asetat (6:4)	-	-	Tidak terpisah
5.	kloroform: metanol: air (7:3:0,4)	2	0,2 ; 0,89	Terpisah

Tabel 4.4 menunjukkan variasi pelarut n-butanol: asam asetat: air (4:1:5) merupakan eluen terbaik yang mampu memberikan pemisahan terbaik dibandingkan dengan variasi lainnya. Eluen ini mampu memisah 4 noda dan terdapat noda yang menunjukkan adanya senyawa tanin. Hal ini membuktikan senyawa tanin bersifat polar karena mampu dipisahkan oleh eluen yang bersifat polar.



Gambar 4.14 Hasil KLTA senyawa tanin dengan eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5):

- (a) Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada $\lambda_{254 \text{ nm}}$ sebelum disemprot reagen FeCl_3
- (b) Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada $\lambda_{366 \text{ nm}}$ sebelum disemprot reagen FeCl_3
- (c) Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada $\lambda_{254 \text{ nm}}$ setelah disemprot reagen FeCl_3
- (d) Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada $\lambda_{366 \text{ nm}}$ setelah disemprot reagen FeCl_3

Tabel 4.6 Hasil KLTA ekstrak tanin daun rumput bambu dengan BAA (4:1:5)

Rf noda	Warna noda dibawah lampu UV pada λ 254 nm		Warna noda dibawah lampu UV pada λ 366 nm		Dugaan positif tanin
	Sebelum disemprot FeCl_3	Sesudah disemprot FeCl_3	Sebelum disemprot FeCl_3	Sesudah disemprot FeCl_3	
0,31	-	-	Ungu	Ungu pudar	Tanin
0,75	Hitam	Hitam	Merah	Merah Kehitaman	-
0,83	Hitam	Hitam	Ungu	Ungu Pudar	Tanin
0,89	Hitam	Hitam	Ungu	Ungu	Tanin

Pemisahan menggunakan KLTA pada campuran eluen ini menghasilkan 4 noda dengan Rf yang berbeda. Gambar 4.9 menunjukkan noda ke dua berwarna merah dengan nilai Rf 0,75 diduga senyawa triterpenoid. Noda yang diasumsikan sebagai senyawa tanin ialah noda ke 1, 3 dan 4 yang memiliki nilai Rf 0,31 ; 0,83 dan 0,89. Dugaan tersebut berdasarkan warna ungu yang dihasilkan dibawah sinar UV pada λ 366 nm, hal ini diperkuat Sa'adah (2010) yang melakukan identifikasi terhadap belimbing wuluh dengan menggunakan eluen yang sama, didapatkan penampakan noda berwarna ungu atau lembayung saat disinari UV 366 menggunakan pereaksi FeCl_3 1 %. Harborne (1996) juga menyatakan tanin dapat dideteksi dengan sinar UV pendek berupa bercak lembayung. Nilai Rf ketiga noda tersebut menunjukkan senyawa tanin bersifat polar karena lebih cenderung terdistribusi pada fase geraknya yang bersifat polar dari pada fase diamnya, sehingga proses migrasi solut berlangsung lebih cepat, memiliki nilai koefisien distribusi senyawa: $C_{stasiner} < C_{mobile}$.

4.7 Pemisahan Senyawa Tanin dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) merupakan pemisahan senyawa dalam jumlah yang lebih besar. KLTP ini menggunakan plat silica G 60 F₂₅₄ dengan ukuran yang lebih besar yaitu 10 x 20 cm. Aplikasi penotolannya sama dengan KLT analitik hanya jumlah ekstrak yang ditotolkan lebih banyak dan konsentrasi ekstrak tanin yang digunakan adalah 15.000 ppm. Eluen yang digunakan pada KLTP ini menggunakan eluen terbaik pada pemisahan KLTA yakni n-butanol: asam asetat: air (4:1:5). Hasil pemisahan KLTP dibawah sinar UV 254 dan 366 nm disajikan pada Tabel 4.6

Tabel 4.7 Hasil pemisahan senyawa tanin dari Rumput Bambu dengan eluen n-butanol: asam asetat: air (4:1:5)

Noda	Nilai Rf	Warna noda dibawah lampu UV pada λ 254 nm	Warna noda dibawah lampu UV pada λ 366 nm
1	0,17	Hitam pudar	Coklat kehijauan
2	0,26	-	Ungu Kehitaman
3	0,56	-	Ungu Pudar
4	0,63	Hitam	Hitam Kehijauan
5	0,7	-	Merah
6	0,73	Hitam	Hijau
7	0,88	-	Ungu (lembayung)

Hasil pemisahan golongan senyawa tanin dari fraksi air diperoleh 7 noda. Hasil penelitian Mangunwardoyo (2009) tentang identifikasi golongan senyawa tanin dari herba meniran menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (6:4) menghasilkan 11 noda dibawah sinar UV 366 nm, dan yang menunjukkan positif adalah noda yang berwarna hijau kekuningan dengan nilai Rf 0,65. Umarudin dkk., (2012) menyebutkan bahwa senyawa tanin dari tanaman seledri memiliki nilai Rf 0,82 pada UV 300 dengan warna lembayung. Hasil pemisahan KLT pada ekstrak air kulit batang kelapa gading (*Cocosnucifera Var. eburnea*) dengan

eluen n-butanol : asam asetat : air (4 :1 : 5), diperoleh tiga bercak noda dengan nilai Rf yaitu 0,51; 0,67; 0,78. Berdasarkan hasil tersebut dugaan golongan senyawa tanin adalah noda 2, 3, 4, 6 dan 7 yang berwarna hijau dan ungu.

Noda-noda yang diduga senyawa tanin dikerok kecuali noda ke-5, karena noda tersebut berwarna merah yang diduga senyawa triterpenoid. Hal ini didukung oleh A'ilah (2015) bahwa pada akar rumput bambu mengandung senyawa triterpenoid dengan noda berwarna merah dengan Rf 0,72. Munculnya senyawa triterpenoid dikarenakan ikatan glikosida tanin belum terputus karena tidak dilakukannya hidrolisis sehingga senyawa triterpenoid masih ikut terelusi. Noda yang dikerok dilarutkan dalam etanol kemudian disentrifugasi untuk memisahkan silika gel dengan senyawa aktif yang terlarut pada etanol. Filtrat yang diperoleh diuapkan untuk mendapatkan isolat.

4.8 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

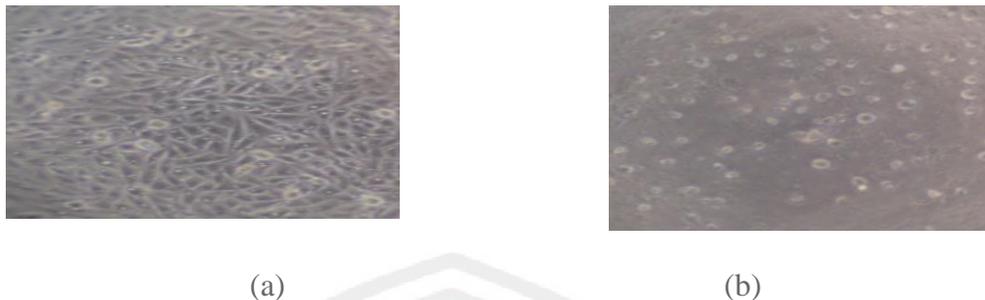
Pengujian antikanker ini dilakukan untuk mengetahui potensi dari ekstrak aseton : air (7:3), fraksi airdan isolat tanin dari rumput bambu (*Lophatherum gracile*B.) dalam menghambat atau membunuh kanker dalam berbagai variasi konsentrasi yaitu 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Uji aktivitas antikanker ini dilakukan secara *in-vitro* terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode MTT (*Microculture tetrazolium*). Metode MTT merupakan pengujian aktivitas sel berdasarkan perubahan warna atau reaksi kolorimetri pada *bio-reduction* garam tetrazolium ke formazan (Goodwin, dkk., 1995).

Pengujian aktivitas antikanker ini melalui beberapa tahapan yaitu : 1) penyiapan sel kanker, 2) panen sel, 3) uji sitotoksisitas, 4) pemberian reagen MTT

dan 5) pembacaan absorbansi. Tahapan penyiapan sel kanker meliputi penghidupan kembali sel yang telah ditidurkan (inaktif sel) dan ditumbuhkan hingga mencapai konfluen. Konfluenitas sel merupakan tumbuhnya sel secara homogen atau meratanya sel sebagai sel monolayer sampai menutupi *cover glass*. Sel dikatakan konfluen apabila sel tersebut sudah menempel dan berkembang memenuhi wadah kultur (Djati, 2006).

Panen sel adalah tahapan penumbuhan dan pengembangbiakkan sel dengan penambahan media kultur. Media kultur berfungsi sebagai sumber nutrisi dan respirasi, serta memberi dukungan pada kehidupan sel yang dibiakkan agar dapat tumbuh (Bambang, 2009). Media kultur yang digunakan pada penelitian ini adalah RPMI karena mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, glukosa dan serum. Serum yang digunakan adalah FBS (*Fetal Bovine Serum*), mengandung hormon yang dapat memacu pertumbuhan sel, albumin sebagai protein transpor, lipid yang diperlukan sel untuk pertumbuhannya dan mineral sebagai kofaktor enzim (Freshney, 2000).

Pada tahapan panen sel, sel akan menempel pada dasar wadah kultur (*culture dish*) karena mempunyai sifat adhesif yaitu mampu melekat pada substrat, sehingga perlu ditambahkan tripsin untuk melepaskan sel-sel yang menempel. Morfologi sel T47D akan terlihat lonjong seperti daun ketika menempel pada wadah kultur, sedangkan sel yang lepas dari wadah kultur akan terbentuk bulat – bulat dan terlihat mengapung dipermukaan.

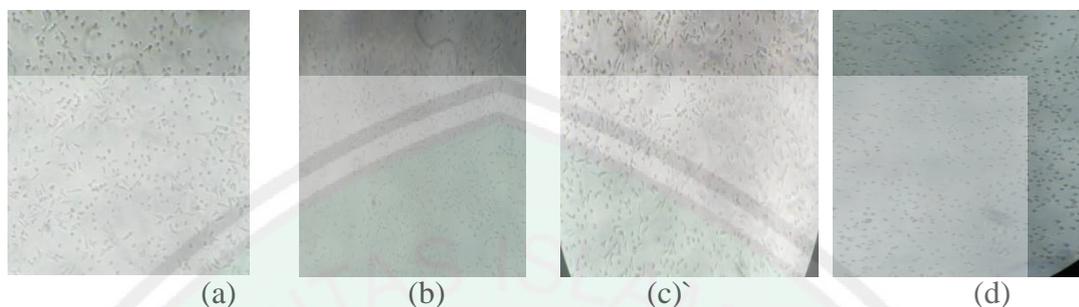


(a) (b)
Gambar 4.15 Kenampakan morfologi sel T47D (a) sebelum pemberian tripsin dan (b) setelah pemberian tripsin.

Sel sebelum pemberian tripsin terlebih dahulu dibuang media kultur dan ditambahkan PBS sebagai pencuci wadah kultur dari media yang mengandung serum FBS, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin (Freshney, 2000). Pemberian tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara glikoprotein dan proteoglikan dengan dasar wadah kultur, akibatnya sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada dasar wadah dan mengapung (Doyle dan Griffith, 2000). Penghitungan sel dilakukan menggunakan alat *hemocytometr* dengan pengamatan dibawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui konsentrasi sel yang akan dipakai uji sitotoksisitas. Hasil perhitungan sel yang diperoleh adalah $191,5 \times 10^4$ /mL.

Tahapan uji sitotoksisitas meliputi preparasi sampel dan *treatment* sel. Ekstrak dan fraksi memiliki perbedaan kepolaran dilarutkan dalam DMSO. Dimetilsulfoksida (DMSO) merupakan cairan tak berwarna yang memiliki rumus $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar (Morshed, dkk.,2012). Pengamatan morfologi sel setelah di *treatment*, dilakukan di bawah mikroskop *inverted* pada setiap ekstrak dengan konsentrasi 500 dan $15,625 \mu\text{g/mL}$. Pada konsentrasi $500 \mu\text{g/mL}$ jumlah sel mati sedikit dibandingkan dengan jumlah sel yang mati pada konsentrasi 125 dan $15,625 \mu\text{g/mL}$, sel mati

akan terlihat berbentuk bulat jernih dan sel hidup akan terlihat lonjong seperti daun. Hal ini terlihat pada Gambar 4.15 dan Lampiran 5.5.



Gambar 4.16 Kenampakan morfologi sel T47D setelah di *treatment* (a) ekstrak tanin konsentrasi 500µg/mL, (b) fraksi air konsentrasi 500µg/mL dan (c) isolat 1 konsentrasi 500µg/mL(c) isolat 2 konsentrasi 500µg/mL.

Berdasarkan Gambar 4.15 dapat diketahui sel yang mati berbentuk bulat dan cenderung tersebar, sel hidup berbentuk seperti jarum yang saling berdempet dengan sel lain yang berada disekitarnya dan menempel pada dasar wadah kultur. Hasil *treatment* sel tidak dapat diamati secara kasat mata, tetapi setelah penambahan reagen MTT dapat diamati, karena terjadi reaksi kolorimetri. Sel yang hidup akan mampu mengadsorpsi garam tetrazolium (reagen MTT) dan dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel, sehingga reagen MTT yang awalnya berwarna kuningakan berubah menjadi ungu (formazan), sedangkan pada sel mati akan tetap berwarna kuning.

Berdasarkan metode MTT, sel yang hidup akan membentuk kristal formazan seperti pada Lampiran 5.5. Formazan merupakan zat berwarna ungu yang tidak larut dalam air sehingga perlu ditambahkan *stopper* SDS 10 % dalam 0,1 N HCl. Intensitas warna ungu tersebut ditetapkan nilai absorbansinya menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Penggunaan

panjang gelombang 595 nm karena warna yang tampak pada larutan adalah ungu kebiruan yang akan menyerap warna kuning dari spektrum sinar tampak (Effendy, 2007). *Output data* yang dihasilkan berkorelasi langsung dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme, sehingga berkorelasi dengan viabilitas sel (kehidupan), yang artinya dari nilai absorbansi sudah dapat diketahui potensi sampel dalam menghambat kanker karena semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel hidup (Meiyanto, dkk., 1999).

Nilai absorbansi yang diperoleh untuk perlakuan dengan konsentrasi 500, 250, 125, 62,5, 31,25 dan 15,625 $\mu\text{g/mL}$ pada ekstrak aseton : air (7:3) direntang 0,142 – 0,648, fraksi air 0,115– 0,775, isolat tanin 1 0,159 – 0,806 dan isolat tanin 2 0,140- 0,763, sedangkan untuk kontrol sel diketahui sebesar 0,707 dan kontrol media 0,097. Berdasarkan hasil absorbansi yang diperoleh dapat dibandingkan antara absorbansi perlakuan dengan kontrol sel, pada fraksi air, isolat tanin 1 dan isolat tanin 2 nilai absorbansi dengan konsentrasi 250 dan 500 $\mu\text{g/mL}$ lebih besar daripada kontrol sel sehingga tidak mempengaruhi penghambatan sel kanker, sedangkan ekstrak aseton : air (7:3) nilai absorbansi dari beberapa konsentrasi diperoleh lebih rendah daripada kontrol sel sehingga dapat diketahui bahwasannya ekstrak aseton: air (7:3) lebih memberikan pengaruh terhadap sel kanker, dan lebih mempunyai sifat toksik daripada fraksi air, isolat tanin 1 dan isolat tanin 2.

Perhitungan prosentase sel hidup tiap sampel ditunjukkan pada Lampiran 4.3 dan dianalisis menggunakan SPSS probit untuk mengetahui nilai IC_{50} tiap sampel. Adapun hasil IC_{50} tiap sampel ditunjukkan pada Tabel 4.7:

Tabel 4.8 Data nilai IC₅₀ uji aktivitas antikanker

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrakaseton : air (7:3)	5,144
Fraksi air	30,989
Isolat 1	16,899
Isolat 2	2,046

Berdasarkan Tabel 4.4 dapat diketahui bahwa semua sampel memiliki nilai IC₅₀ < 1000 µg/mL. Nilai IC₅₀ menunjukkan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50 % dari populasi sel, sehingga semakin kecil nilai IC₅₀ sampel tersebut semakin toksik. Sifat sitotoksik memiliki tiga tingkatan menurut *National Cancer Institute* (NCI), yaitu sangat aktif apabila nilai IC₅₀ < 30 µg/mL, moderate aktif dengan nilai IC₅₀ 30 – 100 µg/mL, dan nilai IC₅₀ > 100 µg/mL dinyatakan tidak aktif (NCI dalam Rahmawati, dkk., 2013). Menurut Kamubhawa, dkk (2000) ekstrak uji dengan nilai IC₅₀ < 100 µg/mL tetap dinyatakan toksik dan memiliki antiproliferasi (menghambat pertumbuhan sel) meskipun nilainya kecil. Nilai IC₅₀ dibawah 100 µg/mL menunjukkan adanya potensi ekstrak uji sebagai agen kemoprevensi, yang artinya kandungan senyawa dalam ekstrak dapat menghambat dan menekan proses karsinogenesis pada manusia sehingga pertumbuhan kanker dapat dicegah (Meiyanto, dkk., 2008 dan Kakizoe, 2003). Berdasarkan hasil tersebut ekstrak tanin, fraksi air, isolat tanin 1 dan isolat 2 memiliki potensi penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara T47D.

Rahmawati dkk., (2013) telah melakukan penelitian penentuan nilai IC₅₀ doksorubisin dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D yaitu sebesar 0,14. Doksorubisin merupakan senyawa tunggal yang berfungsi sebagai

agen antikanker. Hasil ini berbeda jauh dengan hasil nilai IC₅₀ ekstrak, fraksi dan isolat tanin rumput bambu dikarenakan masing-masing memiliki aktivitas yang berbeda dan sampel yang digunakan merupakan obat herbal sehingga proses dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker lebih lama.

Perbedaan potensi suatu sampel dalam menghambat kanker dipengaruhi oleh kandungan senyawa dalam sampel tersebut. Hasil uji fitokimia dari ekstrak tanin, fraksi air, isolat 1 dan isolat 2 mengandung senyawa tanin. Menurut Meiyanto, dkk., (2008) senyawa tanin memiliki efek antikanker, mekanisme tanin sebagai antikanker sejalan dengan fungsinya sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis sel pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi ini diawali dengan dilepasnya rantai peroksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksi. Efek lainnya adalah tanin sebagai penghambat proliferasi kanker yang salah satunya dengan menghambat aktivasi protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti. Tanin menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan keganasan sel kanker. Tanin juga berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi.

Hal yang dapat menyebabkan adanya perbedaan ketoksikan suatu senyawa terhadap sel yaitu kemudahan senyawa dalam melewati struktur membran sel. Senyawa tanin merupakan senyawa polar yang terlarut dengan ukuran kecil akan lebih mudah masuk ke dalam membran sel melalui daerah kepala yang bersifat hidrofilik (Fahri, dkk., 2010). Adanya kemudahan senyawa dalam melewati struktur membran ini dapat dianalogkan seperti model gembok – kunci (*lock –*

key), hal ini menyebabkan senyawa tersebut akan lebih mudah masuk dan mempengaruhi aktivitas yang terjadi di dalam sel (Ernawati, 2010).

4.9 Pemanfaatan Rumput Bambu dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan alam beserta isinya di muka bumi ini untuk kehidupan, kebutuhan dan rizki manusia merupakan suatu kebenaran yang tidak akan pernah sia-sia. Begitu pula Allah SWT telah menciptakan tumbuh-tumbuhan yang telah tercipta dengan sempurna yang dapat kita manfaatkan. Maka, berdasarkan penciptaan alam semesta yang telah memberikan hikmah-hikmah yang agung Allah SWT telah memerintahkan manusia untuk mempelajari dan memanfaatkan segala ciptaanNya yang tertera dalam surat Ali-Imran (3); 191, Allah SWT berfirman:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ
السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ
النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya :” (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka”.

Tafsir al Mahali dan as Suyuthi (2011) menafsirkan firman Allah **بَطْلًا** arti “ dengan sia-sia”. Menurut al-Maraghi (1989) “juga menafsirkan bahwa Allah menciptakan apa yang ada dilangit dan di bumi tidak sia-sia. Semua penciptaanNya memuat hikmah-hikmah yang nyata dan rahasia-rahasia yang amat

berguna serta kemaslahatan yang banyak. Allah SWT benar-benar menciptakan itu semua agar orang berfikir dan beramal dengan melakukan ketaatan.

Allah SWT menciptakan berbagai jenis tumbuhan, mulai dari tumbuhan tingkat tinggi sampai tingkat rendah dan semua yang diciptakanNya memiliki banyak manfaat bagi kelangsungan hidup manusia. Sebagaimana yang telah dijelaskan pada al Quran dalam surat Luqman (31); 10,

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۗ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ
وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۚ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ
كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

Artinya: “ Dia menciptakan langit dan bumi tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang, dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. Luqman (31); 10).

Shihab (2002) menjelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan dari berbagai macam tumbuhan yang baik, yaitu subur dan bermanfaat. Kata كريم yang terdapat dalam surat Luqman ayat 10 tersebut digunakan untuk menyifati segala sesuatu yang baik sesuai obyeknya. Pasangan tumbuhan yang كريم adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamannya. Salah satu hasil yang diharapkan dari tanaman adalah pemanfaatannya yang dapat digunakan sebagai obat. Seperti halnya tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile*B.) memiliki banyak manfaat bagi manusia, diantaranya untuk menurunkan panas, meluruhkan kemih, antiradang, mengatasi demam, mimisan, sakit tenggorokan, sariawan, dan gusi bengkak (Wijayakusuma, 2005).

Berbagai jenis tumbuhan yang diciptakan Allah SWT semuanya untuk kemaslahatan manusia. Sebagaimana Firman Allah SWT dalam surat Abasa (80);31 -32,

وَفِيكِهَاتٍ وَأَبَابَا ۝ مَتَعَا لَكُمْ وَلَا نَعْمِكُمْ ۝

Artinya :“ dan buah-buahan serta rumput-rumputan (31), (semua itu) untuk kesenanganmu dan untuk hewan-hewan ternakmu(32)” (Qs. Abasa (80);31 - 32).

Jazairi (2009) menafsirkan kalimat *Wa Faakihatan Wa Abban* sebagai segala bentuk buah-buahan dan rumput-rumputan yang dimakan binatang, sementara Muhammad (2010) menafsirkan rumput tersebut sebagai rumput yang dimakan binatang ternak, *Abbaa* sebagai jerami dan Qarni (2007) menafsirkan *Abbaa* sebagai rumput pakan ternak yang indah warnanya dan menyenangkan bagi setiap orang yang melihatnya, seperti halnya rumput hijau yang segar. Rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) yang menjadi objek kajian dalam penelitian ini merupakan tumbuhan hijau segar, perdu, dan merupakan rumput pakan ternak.

Ayat *Mataa'al lakum wa li an'aamikum* menurut ash Shiddieqy (2000) menjelaskan bahwa manusia diperintahkan Allah SWT untuk memanfaatkan rumput-rumputan, salah satunya sebagai bahan obat alami. Penelitian ini mencoba untuk mengetahui dan mengkaji kandungan senyawa-senyawa metabolit sekunder yakni tanin yang terkandung dalam keseluruhan bagian tanaman rumput bambu

(*Lapotherum gracile* B.), untuk mencari potensi pemanfaatannya sebagai sumber antikanker. Firman Allah SWT dalam Qs. al Furqon (25); 2,

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُن لَّهُ شَرِيكٌ
فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

Artinya: “Yang kepunyaanNya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan (Nya), dan Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya” (Qs. Al-Furqon (25); 2).

Berdasarkan Al-Furqon (25); 2 tersebut dapat diketahui bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT memiliki kapasitas atau ukuran masing-masing begitu pula dengan aktivitas yang dihasilkannya dari ekstrak rumput bambu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak rumput bambu memiliki nilai IC_{50} 5,144 $\mu\text{g/mL}$, fraksi air IC_{50} 30,968 $\mu\text{g/mL}$, isolat 1 IC_{50} 16,488 $\mu\text{g/mL}$ dan isolat 2 IC_{50} 2,024 $\mu\text{g/mL}$ pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukan bahwa rumput bambu memiliki bioaktivitas baik dengan nilai $LC_{50} < 100$ ppm yang artinya berpotensi sebagai antikanker.

Pemanfaatan rumput bambu sebagai obat merupakan salah satu alat penyembuhan, sesungguhnya tidak ada yang dapat memberikan kesembuhan dari suatu penyakit kecuali Allah SWT. Allah SWT berfirman dalam surat asy Syu'araa (26); 80,

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

Artinya: “dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku” (Qs. Asy Syu'araa; (26), 80).

Surat asy Syu'araa (26) ; 80, tersebut menunjukkan bahwabetapa adilnya Allah SWT yang memberikan suatu penyakit beserta penawarnya(obat). Pengetahuan yang akan menuntun manusia untuk menemukan obat-obatan yang telah tersedia di alam. Ayat di atas menjelaskan bahwa semuanya diciptakan oleh Allah SWTdengan ukuran sesuai dengan ketentuan-Nya, dan disertai dengan hikmah yaitumemberikan manfaat bagi kehidupan manusia. Selain itu, ayat tersebut menjelaskan bahwa sebagai seorang muslim dalam mencari kesembuhan dari suatu penyakit melalui pengobatan harus didasarkan kepada aqidah yang besar yakni meyakini bahwa penyembuhan hanya dari Allah SWT sedangkan obat hanya sebagai perantara (Muhadi dan Muadzin, 2010).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Hasil identifikasi senyawa tanin fraksi air dengan instrumen *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS) menunjukkan bahwa dalam fraksi air terdapat 5 golongan senyawa tanin yaitu *catechin*, *Ellagic-acid-glucoside-2-ethyl-3,4,5-trimethyl-tetrahydrofuran*, *Ellagic Acid-Gallic Acid Galloyl*, *trigalloyl (2R,3R)-tetrahydro-2H-pyran-2,4,5-tetraol* dan *Triagalloy-diglucose* dengan nilai m/z berturut-turut adalah 290; 593,2776; 623,2878; 607,2926 dan 782,5640.
2. Ekstrak aseton:air (7:3), fraksi air, isolat 1 dan isolat 2 rumput bambu (*Lophatherum gracille* B.) memiliki nilai IC_{50} berturut-turut 5,144, 30,989, 16,899 dan 2,046 $\mu\text{g/mL}$. Isolat 2 memiliki potensi yang cukup kuat dalam menghambat dan membunuh sel kanker payudara T47D.

5.2 Saran

1. Isolat 2 rumput bambu (*Lophatherum gracille* B.) diketahui mempunyai potensisi sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, sehingga perlu dilakukan uji aktivitas antikanker lebih lanjut secara *in-vivo*.
2. Perlu dilakukan identifikasi senyawa pada isolat 1 dan 2.

DAFTAR PUSTAKA

- ATCC (*American Type Culture Collection*). 2008. *Cell Biology*. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/> Product Details/ tabid/452/ cellBiology. Diakses pada tanggal 02 Februari 2016.
- Al- Jazairi, A. B. K. 2007. *Tafsir al-Quran al-Aisar*. Terjemahan oleh Hatim A dan Mukti, A. Jakarta: Darus sunnah Press. Al-Qarni, Aidh, 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al Maraghi, A.M. 1992. *Terjemahan Tafsir Al-Maraghi 7*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang
- Al-Qarni, Aidh, 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- As-Sayuthi, 2011. *Metode Pengobatan Nabi SAW*. Semarang: Toha Putra
- Auwaliyah, F. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Rumput Bambu (*Lophatherum Gracile* Brongn) dengan Metode DPPH dan Identifikasi Senyawa Aktifnya. [Skripsi]. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- A'ilah, A. F. 2015. Uji Aktivitas Antikanker Terhadap Sel Kanker Payudara T47D Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Dari Ekstrak Dan Fraksi Akar Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* B.). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Baker, G.B, S. Dunn & A. Latja. 2007. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Practical neurochemistry methods, vol. 6*. Springer Science, New York: x + 475 hlm.
- Bambang, S. T. 2009. *Metode Dasar Kultur Jaringan Hewan*. Jakarta: Universitas Trisakti.
- Baraja, M. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Ficus elastic nois ex lume Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Bate, S. 1972. Detection and Determain of Ellagitannin. *Journal Of Plant Biochemistry Vol II. England: Pragman Press*.
- Benevides, Angeleyne., Montoro, Paola., Bassarello, Carla., Piacente, Sonia, dan Pizza, Cosimo. 2006. Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: Characterisation and LC/ESI/MS/MS quali-quantitative analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol.40* , Hal 639-647
- Berardini, Nicolai., Carle, Reinhold, dan Schieber, Andreas., 2004. Characterization Of Gallotannins And Benzophenone Derivatives From

Mango (*Mangifera Indica* L. Cv. 'Tommy Atkins') Peels, Pulp And Kernels By High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal Institute of Food Technology, Section Plant Foodstuff Technology, Hohenheim University, August-von-Hartmann-Strasse 3, D-70599 Stuttgart, Germany, Vol.18, Hal 2208–2216.*

- Browning, B. L. 1996. *Methods of Wood Chemistry*. Vol I, II. New York: Interscience Publisher.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J., & Speirs, V. 2003. Breast cancer cell lines : friend or foe ? *Breast Cancer Research*, 5, 89–95. doi:10.1186/bcr577.
- CCRC (*Community College Research Center*). 2009. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, UGM.
- Chapman, J.m., Nast, J.R., Scholes, C., and Niemann, S. 2008. Application of LC-ESI-MS and LC/EI/MS to the Characterization of Tannin and Flavonoids from the Acorns of *Quercus macropura*
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Clasification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- Crowther, J.R. 1995. *ELISA: Theory and practice*. Humana Press, New Jersey: iv + 207 hlm.
- Crowther, J.R. 2001. *The ELISA guidebook*. Humana Press, New Jersey: xi + 407 hlm.
- Dermawan, R. 2012. *Metode Analisis Uji Warna Senyawa Metabolit Sekunder. Artikel Kimia Organik Analisis*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin Makasar.
- Desmiaty, Y.; Ratih H.; Dewi M.A.; Agustin R. 2008. Penentuan Jumlah Tanin Total pada Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia Lamk*) dan Daun Sambang Darah (*Excoecaria bicolor Hassk.*) secara Kolorimetri dengan Pereaksi Biru Prusia. *Ortocarpus*. 8, 106-109.
- Dewi, I.D.A.D.Y, Astuti, K.W dan Warditiani, N.K. 2013. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*). Bali. Universitas Udayana.
- Dewi, S., Rahman, F., Handayani, N., dan Rahmawati, R. 2010. Penentuan Kandungan Kimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanusconoideus Lam*). *Jurnal*. Lampung: Universitas Lampung.
- Departemen Kesehatan. 2003. *Profil Kesehatan Indonesia 2001-2003*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

- Djarwis, D. 2004. Teknik Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Workshop Peningkatan Sumber Daya Manusia Penelitian dan Pengelolaan Sumber Daya Hutan yang Berkelanjutan. Pelaksana Kelompok Kimia Organik Bahan Alam Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas Padang kerjasama dengan Proyek Peningkatan Sumber Daya Manusia DITJEN DIKTI DEPDIKNAS Jakarta.
- Djati, M.S. 2006. *Teknologi Manipulasi dan Kultur Sel Jaringan Hewan*. Malang: UB Press.
- Doyle, A dan Griffiths, JB. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York : John Willey and Sons Ltd.
- Effendy. 2007. *Perspektif Baru Kimia Koordinasi Jilid I*. Malang: Banyu Media Publishing.
- Fieser, F.L. 1961. *Advanced Organic Chemistry*. New York: Reinhold Publishing Co.
- Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S, dan Marshall, N.J., 1995. Microculture Tetrazolium Assays: A comparison Between Two New Tetrazolium Salts, XTT and MTS, *Journal Immunol Methods*, Vol. 197, No. 1, Hal: 95 – 103.
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi edisi kedua*. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Hagerman, A.E. 1998. Tannins Chemistry. hagermae@muohiu.edu. Diakses 11 Mei 2015.
- Handayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Padmawinata K, Soedira I, penerjemah. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: Phytochemical methods.
- Hasanah, U. 2015. Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan Uji Golongan Senyawa Aktif Akar Rumput Bambu (*Lophatherum Gracile* Brongn). Jurusan Kimia Saintek UIN Malang
- Hathway, D. E. 1962. The Condensed Tannins. In Wood Extractives (Hillis W. E). New York: Academic Press
- Hayati, E.K.; Fasyah, A.G. dan Sa'adah, L. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.). *Jurnal Kimia*. Volume 4, Nomor 2: 193-200.
- Hernawan, U., K dan Setiawan, A.D. 2003. Ellagitanin; Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi. *Journal Biofarmasi*. Vol, 1, Hal : 25-38, ISSN: 1693-2242.

- Ilhamy, F.Y, Wahyuni, F.S, dan Husni, E. 2013. Uji Efek Sitotoksik Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol Akar Asam Kandis (*Garcinia Cowa Roxb.*) terhadap Sel Kanker Payudara T47D dengan Metoda MTT. *Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik III*. ISSN: 2339-2592.
- Istiqomah, Alfi. 2015. Identifikasi Dan Uji Aktivitas Antikanker Dari Ekstrak Daun Rumput Bambu (*Lophatherum Gracile Brongn*) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Kamubhawa, A., Nshimo, C. and Dewitte, P. 2000. Cytotoxicity of Some medical Plant Extacts Used in Tanzanian Medicine. *J. Ethnopharmacol.* 70: 143-149
- Khopkar, S. M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., dan Tanjung, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Kusumawati, I., Djatmiko, W., dan Rahman, A. 2003. Eksplorasi Keanekaragaman dan Kandungan Kimia Tumbuhan Obat di Hutan Tropis Gunung Arjuno. *Bahan Alam Indonesian*. Volume 2 (3).
- Lindley and Michaud. 2005. *Pharmacotherapy: A Patophysiological Approach*. New York :McGraw Hill Company.
- Li, Shuyi., Xiao, Juan., Chen, Lu., Hu, Chonglin., Chen, Peng., Xie, Bijiun, dan Sun, Zhida. 2012. Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of Litchi chinensis by FT-ICR-MS and LC-MS. *Journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem*. Vol, 135, Hal 31-38.
- Mangan, Y. 2009. *Solusi Sehat Mencegah dan Mengatasi Kanker*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Mangunwardoyo, H., Cahyaningsih, E., dan Tepy, U. 2009. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Herba Meniran (*Phyllanthus niruri L.*). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Volume 7, Nomor 2 : 57-63.
- Manitto, P. 1981. *Biosintesis Produk Alami*. Terjemahan oleh Koensoemardiyah. Semarang: IKIP Press.
- 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, M., Kudo, G., Lee, Y., Yang, T.J., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J. 1999. Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 274. 23963-23968.
- Mirand, E.A., 2005. *Legacy and History of Roswell Park Cancer Institute 1898-1998*. Virginia Beach, VA: The Donning Company Publishers.
- Mosman, T. 2000. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Method*. Volume 16, (1-2): 55-63.
- Muhadi dan Muadzlin. 2010. Semua Penyakit Ada Obatnya, Menyembuhkan Penyakit Ala Rasulullah. Yogyakarta: Mutuara Media.
- Muhammad, M.H.M. 2007. *Mu'jizat Kedokteran Nabi*. Jakarta:Kultum Media
- National Cancer Institute. 2001. Maesturing Cancer Death, Cited from <http://www.cancer.gov/csr> diakses maret 2007. Dalam :Rahmawati, Emma, dkk. 2013. Aktivitas Antikanker n-heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamiana linn*) terhadap Sel Kanker Payudara t47d. *Media Farmasi* Vol. 10 No. 2.
- Nuraini, F. 2002. Isolasi dan Identifikasi Tanaman dari Daun Gamal (*Gliricidia seium (jackquin) Kunth ex Walp.*[Skripsi].Malang:Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Pamilih, H. 2009. Uji Sitotoksik Ekstrak Etil Asetat Herbabandoned (*Ageratum conyzoides L.*) Terhadap Sel Kanker Payudara (T47D) dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. p.1.
- Putri, Z. F. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle L.*) terhadap *Propioni bacterium acne* dan *Staphylococcus aureus* Multi resisten. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah
- Rijal, F. 2013. *Makalah Tentang Kanker*. **Error! Hyperlink reference not valid..** Diakses tanggal 11 April 2014.
- Rizkia, P. 2014. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Umbi Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis).[Skripsi]. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Kokasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rohman, A dan Gandjar, I.B. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Rosenberg, M.J. 1981. *Method for the extraction of a factor that mediates contact inhibition of cell growth*. **Error! Hyperlink reference not valid..** Diakses pada tanggal 02 Februari 2015.
- Rosyda, A. I. Dan Ersan, T. 2009. Peningkatan Kualitas Kayu (*Instesia bijuga*) :Kompleksasi Logam Cu(II), Fe (III) dan Zn(II) oleh Senyawa Tanin. *Prosiding Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Institute Teknologi Sepuluh November.
- Sa'adah, L. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Sari, S. P. 2014. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Kasar Daun Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) Terhadap Larva Udang (*Artemisalina Leach*) Dan Identifikasi Awal Senyawa Aktifnya. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Savitri, E.S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Press.
- Sidik, Y. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Ekstrak Air Kulit Batang Kelapa Gading (*Cocos Nucifera* Var. *Eburnea*). <http://www.digilib.stikesbth.ac.id/page.php?pg=dokumen&id=48&title=isolasi-dan-identifikasi-senyawa-tanin-dari-ekstrak-air-kulit-batang-kelapagading-%28cocos-nucifera-var--eburnea%29>. Diakses tanggal 13 Januari 2015.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol.7 dan 10. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Soebagio. 2003. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press
- Umarudin; Susanti, R. dan Yuniastuti, A. 2012. Efektivitas Ekstrak Tanin Seledri terhadap Profil Hiperkolesterolemi Lipid a. Universitas Negeri Yogyakarta dan Tikus Putih. *Unnes Journal of Life Science*. Volume 1, Nomor 2: 78-85.
- Ummah, M. K. 2010. Ekstraksi dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Senyawa Tanin Pada Blimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (Kajian Variasi Pelarut). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek Malang.
- Vivas, N., Nonier, M., Gaulejac, N., Absalon, C. 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Journal Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 247–256.

Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandi, Apt. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada press.

WHO (*World Health Organisation*). 2013. *World Health Statistic 2013*. Switzerland: WHO Press.

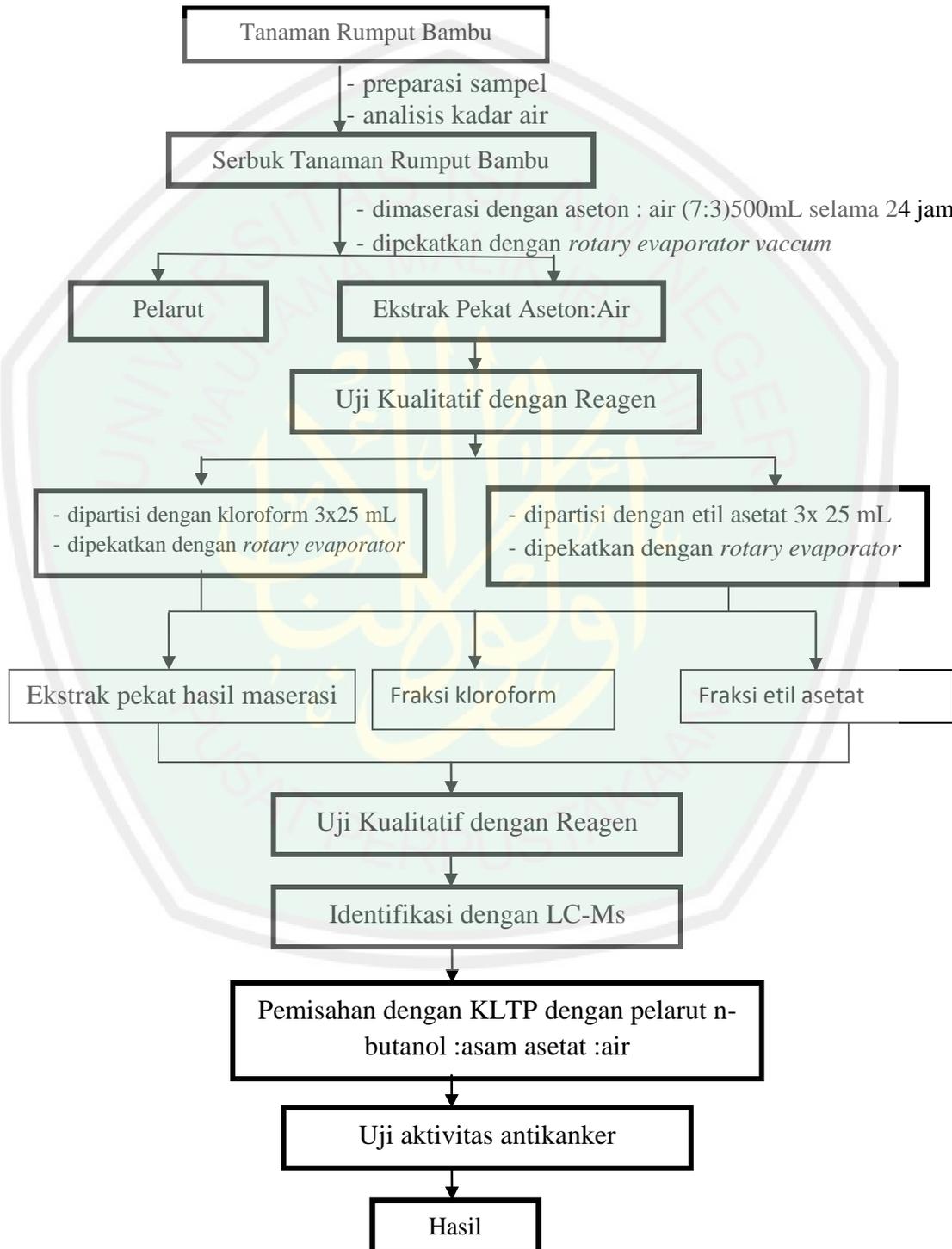
Wijayakusuma, H. 2005. *Atasi Kanker dengan Tanaman Obat*. Jakarta: Puspa Swara.

Yulianti, E. Rahayu, T. dan Mercuriani, I. S. 2010. Potensi Ekstrak Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) Sebagai Antikanker. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan*. Vol 2. No 2. Yogyakarta.



LAMPIRAN

L.1 Diagram Alir Penelitian



Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Preparasi Sampel

Tanaman Rumput Bambu

- diambil rumput bambu
- dicuci, dikering anginkan, dipotong kecil-kecil
- dihaluskan dengan blender sampai serbuk dan diayak dengan ayakan 100 mesh

Hasil

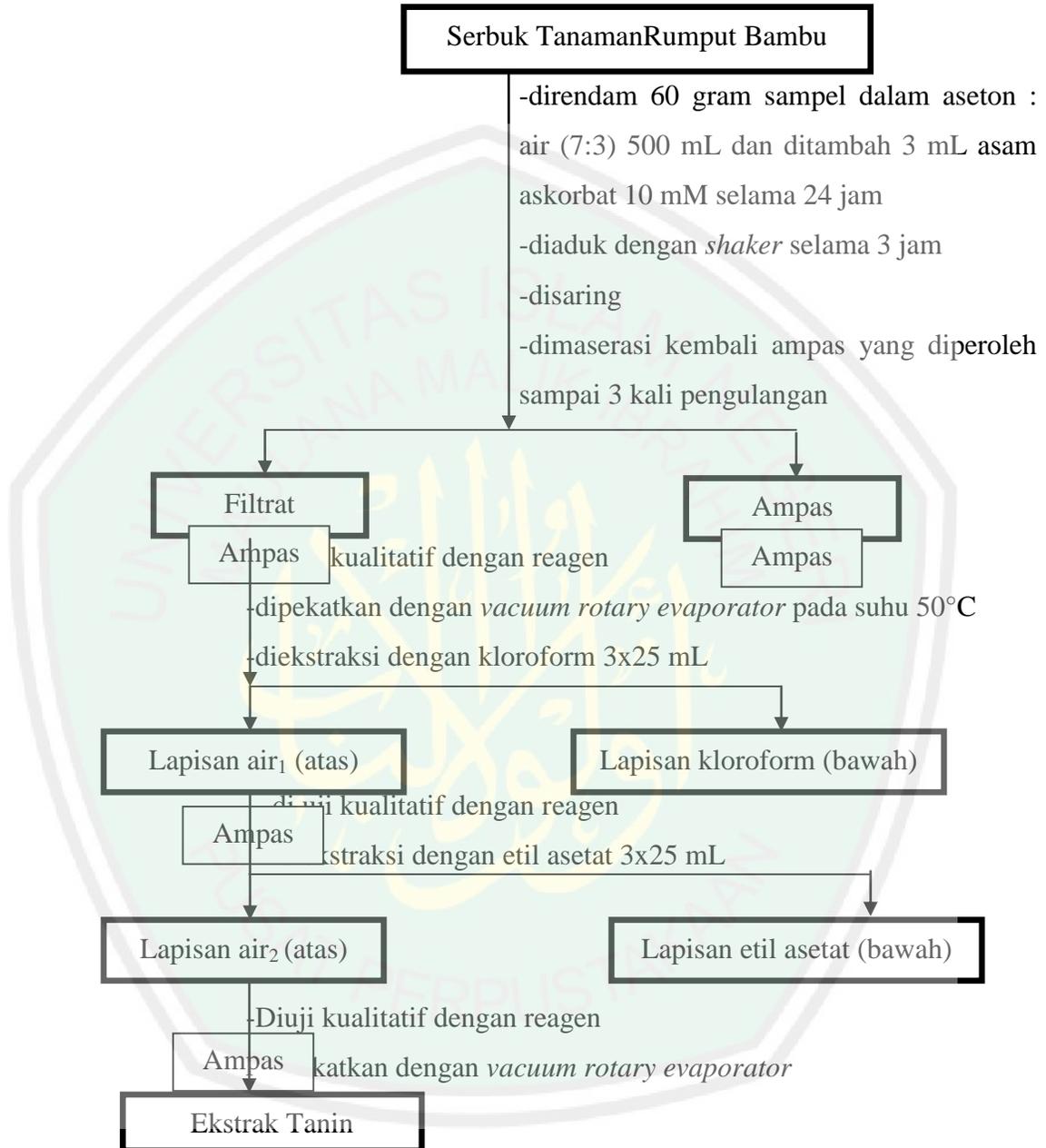
L.2.2 Analisa Kadar Air

Serbuk Tanaman Rumput Bambu

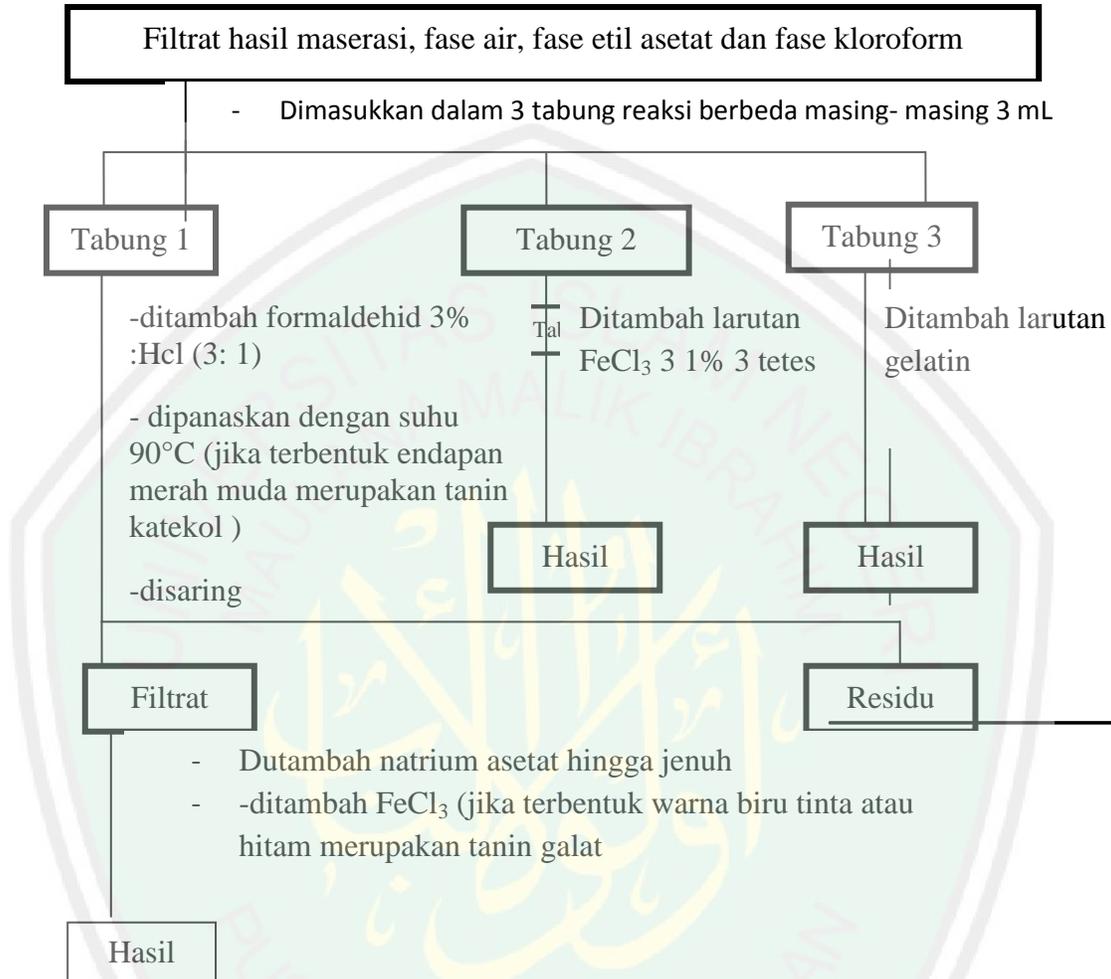
- ditimbang sekitar 5 g
- dikeringkan cawan di dalam oven pada suhu 100 – 105 °C sekitar 15 menit, didinginkan dalam desikator, dan ditimbang sampai beratnya konstan
- dikeringkan sampel dalam oven pada suhu 30 – 37 °c selama sekitar ± 30 menit
- didinginkan dalam desikator selama ± 10 menit
- ditimbang
- dipanaskan kembali dalam oven ± 30 menit
- didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali
- diulangi perlakuan ini sampai tercapai berat konstan
- dihitung kadar airnya menggunakan persamaan 3.1; 3.2; 3.3
- dilakukan 3 kali pengulangan

Hasil

L.2.3 Ekstraksi Komponen Aktif

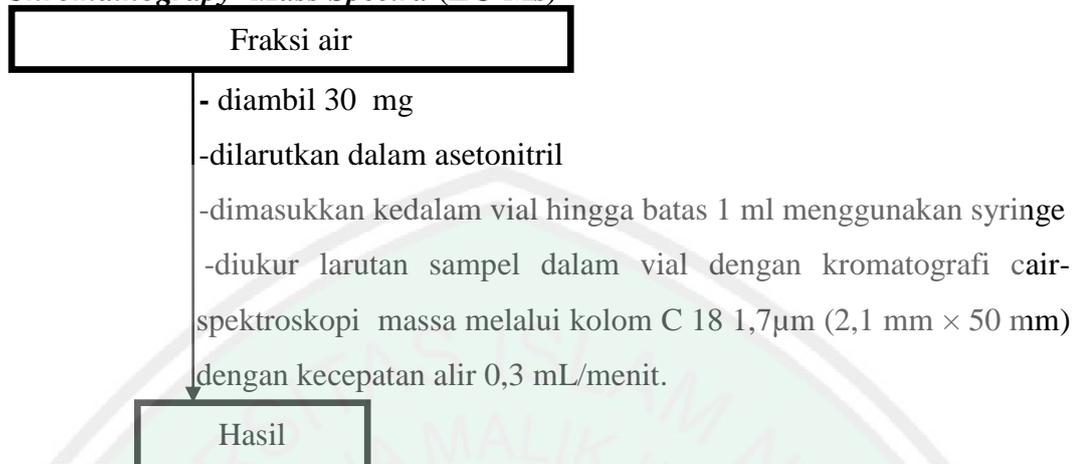


L.2.4 Uji Fitokimia Senyawa Tanin

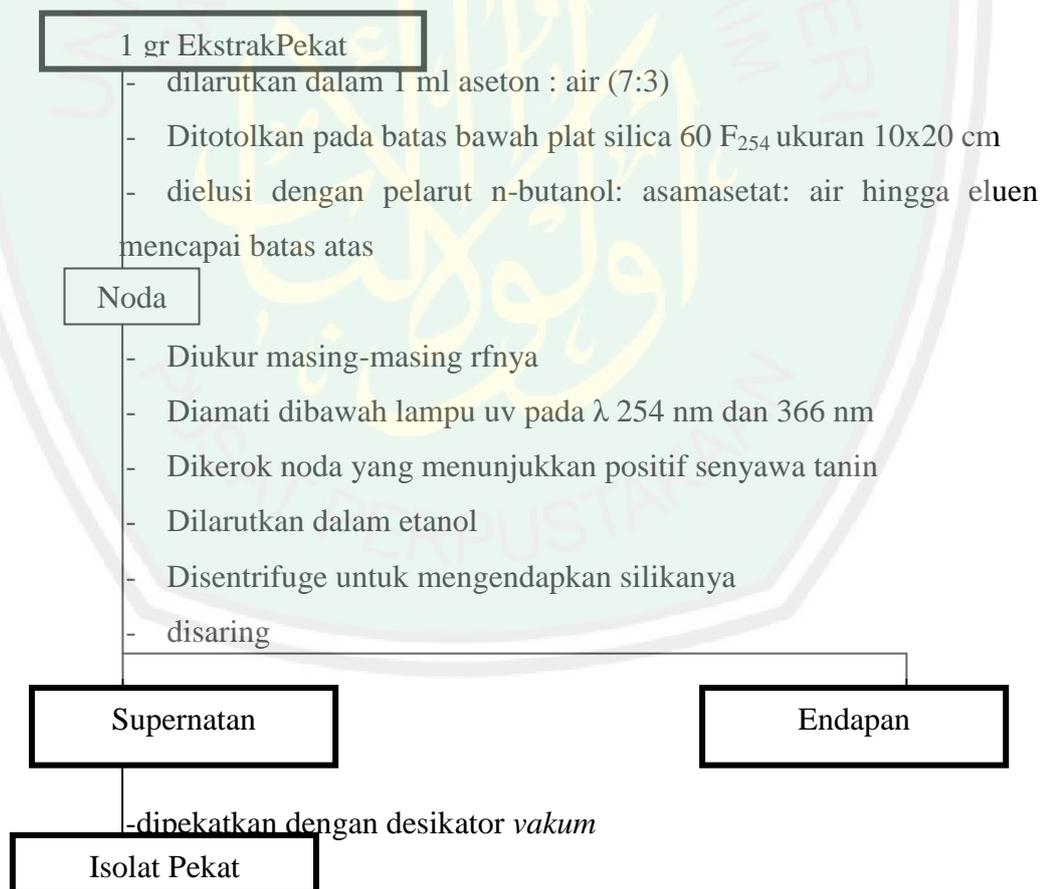


L.2.5 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Tanin dengan *Liquid*

Chromathograpy- Mass Spectra (LC-Ms)

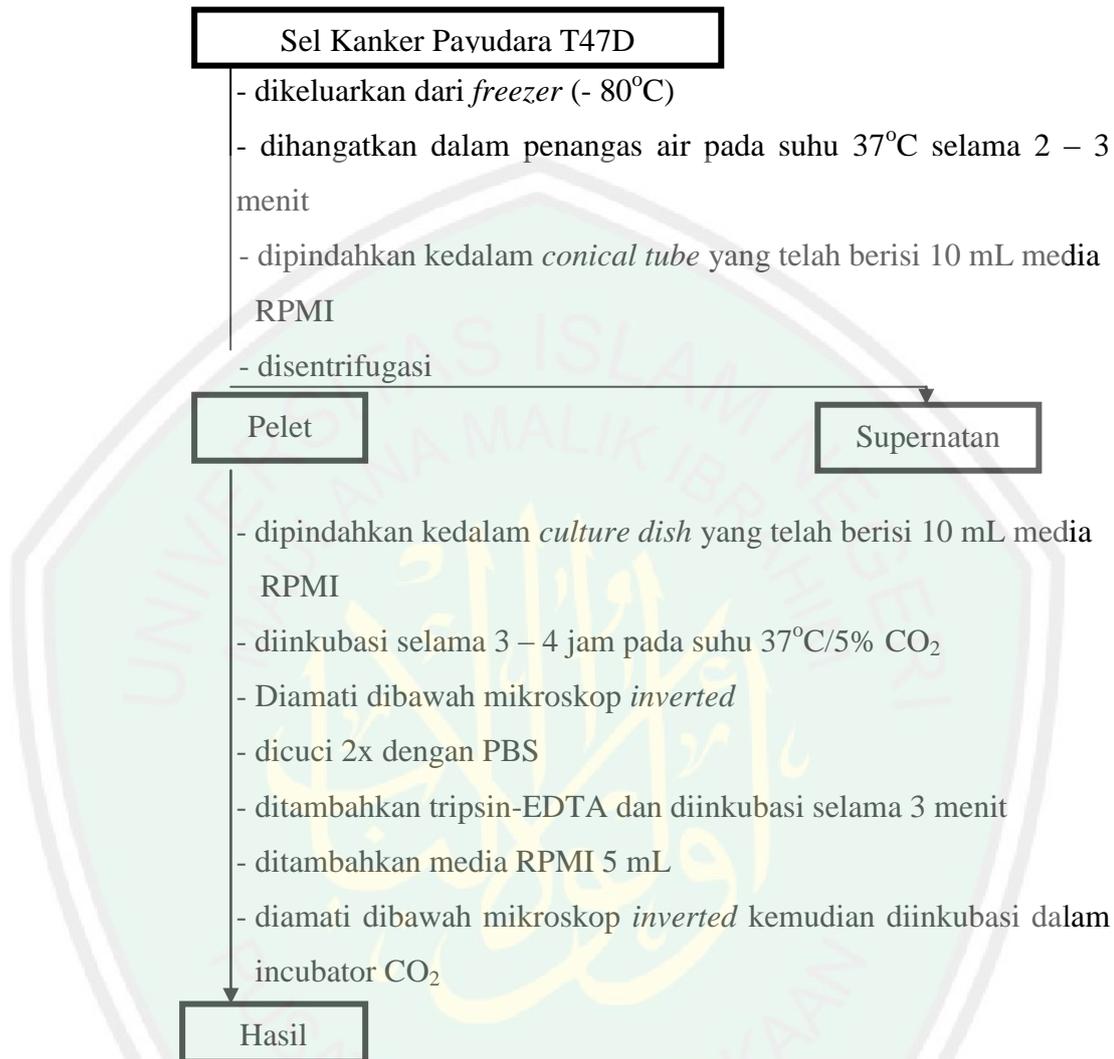


L.2.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTP

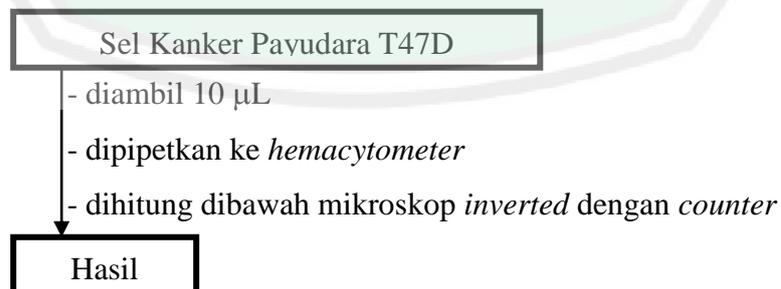


L.2.7 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

L.2.7.1 Penyiapan Sel



L.2.7.2 Penghitungan Sel Kanker



L.2.7.3 Peletakan Sel pada *Plate*

Sel Kanker Payudara T47D

- diletakkan sel dan media RPMI sesuai perhitungan kedalam *plate 96-well*. Disisakan 12 sumuran bagian bawah untuk control sel dan media
- diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂

L.2.7.4 Hasil Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada *Plate*

Masing-Masing Sampel Ekstrak Pekat

- ditimbang 10 mg dan dimasukkan dalam wadah yang berbeda
- dilarutkan masing-masing dalam 100 µL DMSO
- diambil sel dari inkubator
- dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate* 180°
- dimasukkan 100 µL PBS kedalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali
- dimasukkan sampel sebanyak 100 µL dengan konsentrasi 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 ppm
- dilakukan pengulangan penambahan konsentrasi sampel sebanyak 3x
- ↓ diinkubasi kembali selama 24 jam

Hasil

L.2.7.5 Pemberian Larutan MTT

Sel Kanker Payudara T47D

- dibuang media sel dan dicuci dengan PBS
 - ditambahkan larutan MTT 100 μ L kesetiap sumuran kecuali kontrol sel
 - diinkubasi selama 3 – 4 jam didalam inkubator
- Apabila formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*
- ditambahkan *stopper* SDS 10 % dalam 0,1 N HCl
 - dibungkus *plate* dengan aluminium foil
 - diinkubasi kembali ditempat gelap (suhu ruangan) semalam
 - dibaca nilai absorbansi dengan ELISA *reader*

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan Serta Cara Pembuatan Reagen dan Larutan

L.3.1 Pembuatan Larutan FeCl_3 1 %

$$\% \text{ konsentrasi} = \frac{\text{g terlarut}}{\text{g terlarut} + \text{g pelarut}} \times 100 \%$$

$$\text{g terlarut} + \text{g pelarut} = \frac{\text{g terlarut}}{\% \text{ konsentrasi}} \times 100 \%$$

$$1 \text{ g} + \text{g pelarut} = \frac{1 \text{ g}}{1 \%} \times 100 \%$$

$$\text{g pelarut} = 100 \text{ g} - 1 \text{ g} = 99 \text{ g}$$

$$\text{volume pelarut} = \frac{\text{g pelarut}}{\text{BJ pelarut}} = \frac{99 \text{ g}}{1 \text{ g/ml}} = 99 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dengan 99 mL aquades.

L.3.2 Pembuatan Larutan Gelatin (Sudarmadji, dkk., 2007)

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk gelatin 2,5 g menggunakan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL. Kemudian ditambahkan dengan 50 mL larutan garam NaCl jenuh. Selanjutnya dipanaskan sampai gelatin larut seluruhnya. Setelah dingin, larutan tersebut dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambah larutan garam NaCl jenuh sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.3 Pembuatan Larutan Formalin 3 %

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$40 \% V_1 = 3 \% \cdot 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 7,5 \text{ mL}$$

Cara pembuatan larutan formalin 3 % yakni dipipet larutan formalin 40 % sebanyak 7,5 mL menggunakan pipet volume 10 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, selanjutnya ditambah aquades hingga tanda batas.

L.3.4 Pembuatan Asam Askorbat 10 mM

$$\text{Mr C}_6\text{H}_8\text{O}_6 = 176$$

$$\text{Molaritas C}_6\text{H}_8\text{O}_6 = \frac{\text{Massa C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times 1000}{\text{Mr C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \times V}$$

$$\text{Massa C}_6\text{H}_8\text{O}_6 = \frac{0,01\text{M} \times 176 \text{ gr/mol} \times 100 \text{ mL}}{1000} = 0,176 \text{ gram} = 176 \text{ mg}$$

Pembuatan asam askorbat 10 mM dengan cara diambil asam askorbat menggunakan spatula dan diletakkan dalam wadah gelas arloji, kemudian ditimbang sebanyak 176 mg asam askorbat menggunakan neraca analitik, selanjutnya dimasukkan dalam *beaker glass* 50 mL dan ditambah aquades 30 mL, penambahan aquades dengan cara mengalirkannya pada gelas arloji dan spatula untuk melarutkan sisa asam askorbat, kemudian diaduk menggunakan pengaduk gelas sampai homogen. Larutan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah aquades hingga tanda batas.

L.3.5 Perhitungan Randemen Ekstrak Tanin

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak Pekat}}{\text{Berat Sampel}} \times 100 \%$$

L.3.6 Pembuatan HCl 12,3 %

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$37 \% V_1 = 12,3 \% 150$$

$$V_1 = \frac{12,3 \% \cdot 150 \text{ mL}}{37 \%} = 50 \text{ mL}$$

Langkah pembuatan HCl 12,3 % diantaranya diambil 100 mL aquades menggunakan pipet volume 50 mL dan dimasukkan dalam *beaker glass* 150 mL, selanjutnya ditambah 50 mL HCl 37 % menggunakan pipet volume 50 mL, penambahan HCl pekat dilakukan hati-hati dengan cara mengalirkannya melewati dinding *beaker glass*. Pembuatan larutan HCl ini dilakukan dalam lemari asam

L.3.7 Pembuatan Larutan SDS 10 %

$$\text{SDS 10 \%} = \frac{10 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Cara pembuatannya yakni ditimbang 10 gram SDS (*Sodium Deodecyl Sulphate*) dan dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL, lalu dilarutkan dalam 100 mL aquades.

L.3.8 Pembuatan Larutan Stok MTT (5 mg/mL) (CCRC, 2009)

Ditimbang 50 mg serbuk MTT, dilarutkan dalam 10 μL mL PBS dan diaduk dengan *vortex*.

L.3.9 Pembuatan larutan stok 1000 ppm ekstrak rumput bambu

$$\text{Berat ekstrak} = 10 \text{ mg}$$

$$\text{Volume pelarut} = 100 \mu\text{L (DMSO)}$$

$$M = \frac{10 \text{ mg}}{100 \mu\text{L}} = \frac{10000 \mu\text{g}}{100 \mu\text{L}} = 100000 \mu\text{g/mL}$$

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

$$1 \text{ ml} \times 1000 \mu\text{g/mL} = 100000 \mu\text{g/mL} \times V_2$$

$$V_2 = 0,01 \text{ mL} = 10 \mu\text{L}$$

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 RMPI dan diresuspensi hingga homogen.

L.3.10 Pembuatan Larutan HCl 0,1 N

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,07 \text{ N} \times V_1 = 0,1 \text{ N} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,08 \text{ mL} \rightarrow 0,010 \text{ (2 tetes)}$$

Cara pembuatannya yaitu ditambahkan aquades 5 mL kedalam labu ukur 10 mL, lalu ditetaskan HCl pekat 37 % sebanyak 2 tetes. Ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Perlakuan ini dilakukan dalam lemari asap.

Lampiran 4. Data dan Perhitungan Hasil Penelitian

L.4.1 Perhitungan Kadar Air

A. Data Pengukuran Kadar Air Sampel Kering Rumput Bambu (*Lophaterum gracile* B.)

Ulangan perlakuan	Berat cawan kosong (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
P1	19, 1457	24, 9177	17, 4944
P2	19, 1454	24, 9170	17, 4942
P3	19, 1450	24, 9165	17, 4930
Rata-Rata Berat Konstan	19, 1454	24, 9171	17, 4942

Berat cawan + sampel sebelum dioven:

- Cawan 1 = 24, 1557 g
- Cawan 2 = 29, 9600 g
- Cawan 3 = 22, 5061 g

Ulangan perlakuan	Berat cawan + Sampel (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
P1	23, 7373	29, 5295	22, 0269
P2	23, 7358	29, 5283	22, 0271
P3	23, 7356	29, 5284	22, 0270
Rata-rata berat konstan	23, 7362	29, 5287	22, 027

B. Perhitungan Kadar Air Sampel Kering Rumput Bambu (*Lophaterum gracile* B.)

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

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

$$\% \text{ Kadar air terkoreksi} = \text{Kadar air} - \text{Faktor koreksi}$$

❖ Ulangan ke 1

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(24,1557 - 23,7362)}{(24,1557 - 19,1454)} \times 100 \% \\ &= \frac{0,4195}{5,0103} \times 100 \% \\ &= 8,372 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{100}{100-8,372\%} \\ &= \frac{100}{91,628\%} \end{aligned}$$

$$= 1,09\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air terkoreksi} &= 8,372\% - 1,09\% \\ &= 7,282\% \end{aligned}$$

❖ **Ulangan ke 2**

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(29,5061 - 29,5287)}{(29,5061 - 24,9171)} \times 100\% \\ &= \frac{0,4813}{5,0429} \times 100\% \end{aligned}$$

$$= 8,553\%$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{100}{100-8,553\%} \\ &= \frac{100}{91,447\%} \end{aligned}$$

$$= 1,0935\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air terkoreksi} &= 8,553\% - 1,0935\% \\ &= 7,5195\% \end{aligned}$$

❖ **Ulangan ke 3**

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(22,5061 - 22,027)}{(22,5061 - 17,4942)} \times 100\% \\ &= \frac{0,4791}{5,0119} \times 100\% \end{aligned}$$

$$= 9,559\%$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{100}{100-9,559\%} \\ &= \frac{100}{90,441\%} \end{aligned}$$

$$= 1,105\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air terkoreksi} &= 9,559\% - 1,105\% \\ &= 8,454\% \end{aligned}$$

Hasil rata-rata kadar air dari ulangan ke 1 sampai ulangan ke 3 adalah :

$$\text{Rata-rata kadar air} = \frac{8,372\% + 9,559\% + 8,553\%}{3}$$

$$= 8,828\%$$

Hasil rata-rata faktor koreksi dari ulangan ke 1 sampai ulangan ke 3 adalah:

$$\text{Rata-rata faktor koreksi} = \frac{1,09\% + 1,105\% + 1,0935\%}{3}$$

$$= 1,096\%$$

Hasil rata-rata kadar air terkoreksi dari ulangan ke 1 sampai ulangan ke 3 adalah :

$$\text{Rata-rata kadar air terkoreksi} = \frac{7,282\% + 8,454\% + 7,5195\%}{3}$$

$$= 7,752\%$$

Kadar air yang terkandung pada sampel kering rumput bambu (*Lophaterum gracile* B.) pada setiap pengulangannya adalah :

Sampel	Kadar air yang terkandung dalam sampel			
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-Rata
Rumput Bambu	7, 282 %	8, 454 %	7, 5195 %	7, 752 %

L.4.2 Perhitungan Rendemen

1. Ekstrak Peekat Tanin

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 60 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak pekat} &= 6,0401 \text{ g} \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{6,0401 \text{ g}}{60 \text{ g}} \times 100 \% = 10,067 \% \end{aligned}$$

2. Fraksi Air

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 6,25 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak pekat} &= 1,57 \text{ g} \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{1,57 \text{ g}}{6,25 \text{ g}} \times 100 \% = 25,12 \% \end{aligned}$$

L.4.3 Perhitungan Data dan Hasil Uji Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro*

A. Perhitungan konsentrasi sel

- Pengamatan jumlah sel dengan *hemocytometr* dibawah mikroskop *inverted*

Kuadran A	Kuadran B
41	43
Kuadran C	Kuadran D
61	63

$$\begin{aligned}
 & \text{➤ Jumlah sel yang dihitung (mL}^{-1}\text{)} \\
 & = \frac{\sum \text{sel kuadran A} + \sum \text{sel kuadran B} + \sum \text{sel kuadran C} + \text{sel kuadran D}}{4} \times 10^4 \\
 & = \frac{246+218+148+154}{4} \times 10^4 \\
 & = 191,5 \times 10^4 / \text{mL}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \text{➤ Jumlah mL panen sel yang ditransfer (konsentrasi sel)} \\
 & = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung}} \\
 & = \frac{100 \times 10^4}{191,5 \times 10^4 / \text{mL}} \\
 & = 0,522 \text{ mL} = 0,6 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 0,6 mL, ditambahkan hingga 9,4 mL media kultur RPMI (MK) karena setiap sumuran akan diisi 100 μL MK berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100 μL x 100 sumuran = 10000 μL atau 10 mL.

B. Perhitungan Prosentase Sel Hidup

- Data Uji aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

No.	Absorbansi kontrol sel	Absorbansi kontrol media
1.	0,714	0,108
2.	0,695	0,097
3.	0,689	0,108
4.	0,731	0,1
5.	0,691	0,085
6.	0,722	0,084
Rata –Rata:	0,707	0,097

1. Ekstrak aseton : air (7: 30)

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
500	0,408	0,56	-	0,484	63,443
250	0,581	0,633	0,453	0,556	75,246
125	0,617	0,648	0,47	0,578	78,852
62,5	0,582	0,549	0,573	0,568	77,213
31,25	0,402	0,377	0,466	0,415	52,131
15,625	0,398	0,405	0,419	0,407	50,820

2. Fraksi Air

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
500	0,711	0,775	-	0,743	105,902
250	-	-	0,731	0,731	103,934
125	0,601	0,615	0,584	0,600	82,459
62,5	-	0,486	0,474	0,480	62,606
31,25	0,404	0,387	0,115	0,302	33,606
15,625	0,365	0,394	0,402	0,387	47,540

3. Isolat 1 warna ungu

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
500	0,644	0,785	0,79	0,740	105,410
250	0,707	0,806	0,804	0,772	110,656
125	0,613	0,621	0,61	0,615	84,918
62,5	0,555	0,509	0,498	0,521	69,508
31,25	0,48	0,396	0,437	0,438	55,902
15,625	0,453	0,544	0,422	0,473	61,639

4. Isolat 2 warna hijau kehitaman

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
500	0,433	0,476	0,574	0,494	65,082
250	0,763	0,714	0,729	0,735	104,59
125	0,625	0,612	0,592	0,610	84,098
62,5	0,664	0,58	0,593	0,612	84,426
31,25	0,479	0,563	0,47	0,504	66,721
15,625	0,465	0,517	0,317	0,433	55,082

➤ Perhitungan Prosentase Sel Hidup

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

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

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur)

1. Ekstrak Tanin

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0.556 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 75,246 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0.578 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 78,852 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{0.568 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 77,213 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0.086 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 77,704 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{0.086 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 52,131 \%$
- ❖ Konsentrasi 15,625 → % *Hidup* = $\frac{0.086 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 50,820 \%$

2. Fraksi Air

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0.743 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 105,902 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0.731 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 103,934 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{0.6 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 82,459 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0.480 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 62,606 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{0.302 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 33,605 \%$
- ❖ Konsentrasi 15,625 → % *Hidup* = $\frac{0.387 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 47,540 \%$

3. Isolat 1

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0.740 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 105,410 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0.772 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 110,656 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{0.615 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 84,918 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0.521 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 69,508 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{0.438 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 55,902 \%$
- ❖ Konsentrasi 15,625 → % *Hidup* = $\frac{0.473 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 61,639 \%$

4. Isolat 2

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0.494 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 65,082 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0.735 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 104,59 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{0.609 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 84,098 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0.612 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100 \% = 84,426 \%$

- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{0.504 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100\% = 66,721\%$
- ❖ Konsentrasi 15,625 → % *Hidup* = $\frac{0.433 - 0.097}{0.707 - 0.097} \times 100\% = 55,082\%$

C. Hasil perhitungan IC₅₀ dengan SPSS

1. Ekstrak Tanin 500 IC₅₀ 5.114

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	0.01	.000	.	.	-6.047	.	.
	0.02	.000	.	.	-5.256	.	.
	0.03	.000	.	.	-4.753	.	.
	0.04	.000	.	.	-4.376	.	.
	0.05	.000	.	.	-4.068	.	.
	0.06	.000	.	.	-3.807	.	.
	0.07	.000	.	.	-3.577	.	.
	0.08	.000	.	.	-3.372	.	.
	0.09	.001	.	.	-3.185	.	.
	0.1	.001	.	.	-3.013	.	.
	0.15	.005	.	.	-2.301	.	.
	0.2	.018	.	.	-1.735	.	.
	0.25	.056	.	.	-1.250	.	.
	0.3	.153	.	.	-.814	.	.
	0.35	.389	.	.	-.410	.	.
	0.4	.940	.	.	-.027	.	.
	0.45	2.207	.	.	.344	.	.
	0.5	5.114	.	.	.709	.	.
	0.55	11.851	.	.	1.074	.	.
	0.6	27.834	.	.	1.445	.	.
	0.65	67.277	.	.	1.828	.	.
	0.7	170.525	.	.	2.232	.	.
	0.75	465.248	.	.	2.668	.	.
	0.8	1422.575	.	.	3.153	.	.
	0.85	5234.284	.	.	3.719	.	.
	0.9	26961.278	.	.	4.431	.	.
	0.91	40057.315	.	.	4.603	.	.
	0.92	61584.694	.	.	4.789	.	.
	0.93	98823.320	.	.	4.995	.	.
	0.94	1.676E5	.	.	5.224	.	.
	0.95	3.061E5	.	.	5.486	.	.
	0.96	6.212E5	.	.	5.793	.	.
	0.97	1.483E6	.	.	6.171	.	.

0.98	4.714E6	.	.	6.673	.	.
0.99	2.918E7	.	.	7.465	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

2. Fraksi air IC₅₀ 30.989

		Confidence Limits					
		95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	0.01	1.459	.000	7.059	.164	-3.776	.849
	0.02	2.087	.001	8.785	.319	-3.232	.944
	0.03	2.619	.001	10.106	.418	-2.888	1.005
	0.04	3.107	.002	11.238	.492	-2.629	1.051
	0.05	3.571	.004	12.259	.553	-2.419	1.088
	0.06	4.019	.006	13.207	.604	-2.240	1.121
	0.07	4.459	.008	14.104	.649	-2.083	1.149
	0.08	4.893	.011	14.965	.690	-1.943	1.175
	0.09	5.324	.015	15.798	.726	-1.816	1.199
	0.1	5.755	.020	16.612	.760	-1.699	1.220
	0.15	7.941	.061	20.533	.900	-1.217	1.312
	0.2	10.257	.146	24.453	1.011	-.836	1.388
	0.25	12.776	.307	28.593	1.106	-.512	1.456
	0.3	15.560	.596	33.152	1.192	-.225	1.521
	0.35	18.679	1.091	38.371	1.271	.038	1.584
	0.4	22.216	1.913	44.598	1.347	.282	1.649
	0.45	26.273	3.243	52.396	1.420	.511	1.719
	0.5	30.989	5.335	62.754	1.491	.727	1.798
	0.55	36.552	8.507	77.529	1.563	.930	1.889
	0.6	43.227	13.083	100.419	1.636	1.117	2.002
	0.65	51.411	19.249	139.124	1.711	1.284	2.143
	0.7	61.717	26.962	210.379	1.790	1.431	2.323
	0.75	75.169	36.096	353.222	1.876	1.557	2.548
	0.8	93.626	46.826	670.986	1.971	1.670	2.827
	0.85	120.934	60.071	1496.607	2.083	1.779	3.175
	0.9	166.879	78.418	4303.474	2.222	1.894	3.634
	0.91	180.377	83.225	5581.317	2.256	1.920	3.747
	0.92	196.280	88.642	7414.516	2.293	1.948	3.870
	0.93	215.390	94.854	10148.585	2.333	1.977	4.006
	0.94	238.940	102.136	14434.098	2.378	2.009	4.159
	0.95	268.958	110.922	21610.346	2.430	2.045	4.335
	0.96	309.077	121.965	34791.726	2.490	2.086	4.541

0.97	366.691	136.723	62631.845	2.564	2.136	4.797
0.98	460.235	158.621	137283.56 1	2.663	2.200	5.138
0.99	658.433	199.368	475545.76 8	2.819	2.300	5.677

3.Isolat 1 IC₅₀ **16.899**

Confidence Limits

Prob ability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a 0.01	.368	.000	3.139	-.434	-6.246	.497
0.02	.577	.000	4.096	-.239	-5.526	.612
0.03	.767	.000	4.854	-.115	-5.069	.686
0.04	.950	.000	5.517	-.022	-4.726	.742
0.05	1.130	.000	6.125	.053	-4.447	.787
0.06	1.311	.000	6.697	.117	-4.210	.826
0.07	1.492	.000	7.245	.174	-4.002	.860
0.08	1.676	.000	7.774	.224	-3.815	.891
0.09	1.863	.000	8.291	.270	-3.646	.919
0.1	2.054	.000	8.799	.313	-3.491	.944
0.15	3.074	.001	11.280	.488	-2.847	1.052
0.2	4.234	.005	13.789	.627	-2.337	1.140
0.25	5.574	.013	16.439	.746	-1.901	1.216
0.3	7.134	.031	19.323	.853	-1.511	1.286
0.35	8.967	.070	22.546	.953	-1.152	1.353
0.4	11.141	.154	26.244	1.047	-.813	1.419
0.45	13.744	.324	30.621	1.138	-.489	1.486
0.5	16.899	.670	36.003	1.228	-.174	1.556
0.55	20.778	1.363	42.971	1.318	.134	1.633
0.6	25.632	2.738	52.668	1.409	.437	1.722
0.65	31.845	5.411	67.653	1.503	.733	1.830
0.7	40.028	10.340	94.484	1.602	1.015	1.975
0.75	51.234	18.498	152.352	1.710	1.267	2.183
0.8	67.440	30.101	304.604	1.829	1.479	2.484
0.85	92.907	45.119	803.782	1.968	1.654	2.905
0.9	139.030	65.821	3108.307	2.143	1.818	3.493
0.91	153.246	71.258	4360.541	2.185	1.853	3.640
0.92	170.342	77.414	6319.952	2.231	1.889	3.801
0.93	191.350	84.519	9535.950	2.282	1.927	3.979

0.94	217.889	92.921	15146.753	2.338	1.968	4.180
0.95	252.678	103.178	25762.057	2.403	2.014	4.411
0.96	300.712	116.264	48255.468	2.478	2.065	4.684
0.97	372.452	134.097	104811.299	2.571	2.127	5.020
0.98	494.984	161.278	295417.104	2.695	2.208	5.470
0.99	774.951	213.993	1524912.852	2.889	2.330	6.183

a. A heterogeneity factor is used.

4. Isolat Hijau IC₅₀ **2.046**

Confidence Limits						
Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a 0.01	.000	.	.	-4.975	.	.
0.02	.000	.	.	-4.355	.	.
0.03	.000	.	.	-3.962	.	.
0.04	.000	.	.	-3.667	.	.
0.05	.000	.	.	-3.426	.	.
0.06	.001	.	.	-3.222	.	.
0.07	.001	.	.	-3.042	.	.
0.08	.001	.	.	-2.882	.	.
0.09	.002	.	.	-2.735	.	.
0.1	.003	.	.	-2.601	.	.
0.15	.009	.	.	-2.044	.	.
0.2	.025	.	.	-1.601	.	.
0.25	.060	.	.	-1.222	.	.
0.3	.132	.	.	-.881	.	.
0.35	.273	.	.	-.565	.	.
0.4	.544	.	.	-.265	.	.
0.45	1.060	.	.	.025	.	.
0.5	2.046	.	.	.311	.	.
0.55	3.948	.	.	.596	.	.
0.6	7.700	.	.	.887	.	.
0.65	15.359	.	.	1.186	.	.
0.7	31.794	.	.	1.502	.	.
0.75	69.721	.	.	1.843	.	.
0.8	167.146	.	.	2.223	.	.
0.85	463.149	.	.	2.666	.	.
0.9	1669.720	.	.	3.223	.	.
0.91	2275.923	.	.	3.357	.	.
0.92	3186.314	.	.	3.503	.	.
0.93	4612.829	.	.	3.664	.	.

0.94	6973.014	.	.	3.843	.	.
0.95	11170.890	.	.	4.048	.	.
0.96	19433.249	.	.	4.289	.	.
0.97	38384.647	.	.	4.584	.	.
0.98	94868.574	.	.	4.977	.	.
0.99	3.949E5	.	.	5.596	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

L.4.4 Perhitungan Nilai Rf dari Hasil KLTP

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$

Tanin Fraksi etil asetat dengan eluen BAA(n-butanol, asam asetat dan air) (4:1:5)

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{1,4}{8} = 0,17$$

$$\text{Nilai Rf 6} = \frac{7,1}{8} = 0,88$$

$$\text{Nilai Rf 2} = \frac{2,1}{8} = 0,26$$

$$\text{Nilai Rf 7} = \frac{7,5}{8} = 0,93$$

$$\text{Nilai Rf 3} = \frac{4,5}{8} = 0,56$$

$$\text{Nilai Rf 4} = \frac{5,1}{8} = 0,63$$

$$\text{Nilai Rf 5} = \frac{6,1}{8} = 0,7$$

L.4.5 Perhitungan Persen Luas Area

$$\% \text{ Luas Area} = \frac{\text{Area Puncak 1}}{\varepsilon \text{ Area Puncak}} \times 100\%$$

$$1. \text{ Puncak 1} = \frac{3237}{228.135} \times 100\% = 1,42\%$$

$$2. \text{ Puncak 2} = \frac{750}{228.135} \times 100\% = 0,33\%$$

$$3. \text{ Puncak 3} = \frac{714}{228.135} \times 100\% = 0,31\%$$

$$4. \text{ Puncak 4} = \frac{2972}{228.135} \times 100\% = 1,30\%$$

$$5. \text{ Puncak 5} = \frac{1806}{228.135} \times 100\% = 0,79\%$$

$$6. \text{ Puncak 6} = \frac{1451}{228.135} \times 100\% = 0,63\%$$

$$7. \text{ Puncak 7} = \frac{1115}{228.135} \times 100\% = 0,49\%$$

$$8. \text{ Puncak 8} = \frac{15804}{228.135} \times 100\% = 6,92\%$$

9. Puncak 9 $= \frac{45811}{228.135} \times 100\% = 20\%$
10. Puncak 10 $= \frac{12052}{228.135} \times 100\% = 5,29\%$
11. Puncak 11 $= \frac{36711}{228.135} \times 100\% = 16,12\%$
12. Puncak 12 $= \frac{14755}{228.135} \times 100\% = 6,47\%$



Lampiran 5. Dokumentasi

L.5.1 Preparasi Sampel



Pengambilan rumput bamboo



Proses pengeringan



Serbuk rumput bamboo

L.5.2 Analisis Kadar Air



Penguapan air dalam oven



Penimbangan sampel setelah dioven



Sampel setelah konstan

L.5.3 Ekstraksi Senyawa Aktif

- Ekstraksi Maserasi



Proses perendaman (maserasi)



Proses penyaringan



Filtrat 1



Filtrat 2



Filtrat 3



Pemekatan filtrat dengan rotary evaporator vaccum



Hasil Rotav

- Ekstraksi Cair-Cair (Partisi)



Proses partisi kloroform



proses partisi etil asetat



Hasil patisi etil asetat



Hasil partisi kloroform

L.5.4 Uji Fitokimia dengan Reagen

Keterangan gambar :

- 1 = Reagen $FeCl_3$ 1%
- 2 = Larutan Gelatin
- 3 = Formaldehid : HCl
- 4 = Reagen $FeCl_3$ 1 % dengan Na-Asetat

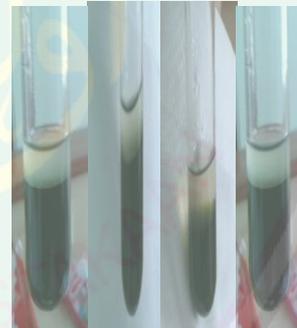
a. Uji Tanin Hasil Maserasi

1 2 3 4



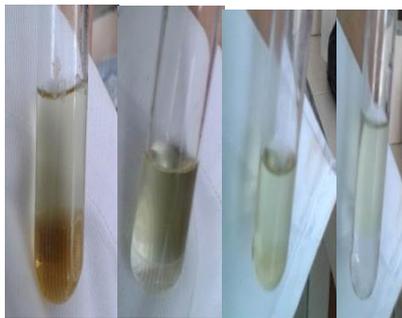
b. Uji Tanin Hasil Fraksi Kloroform

1 2 3 4



c. Uji Tanin Hasil Fraksi Etil Asetat d. Uji Tanin Hasil Fase Air

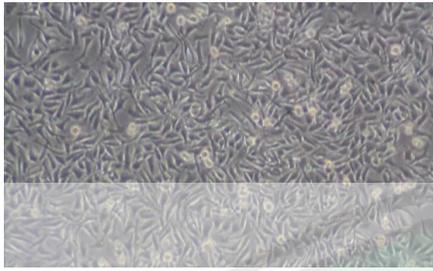
1 2 3 4



1 2 3 4



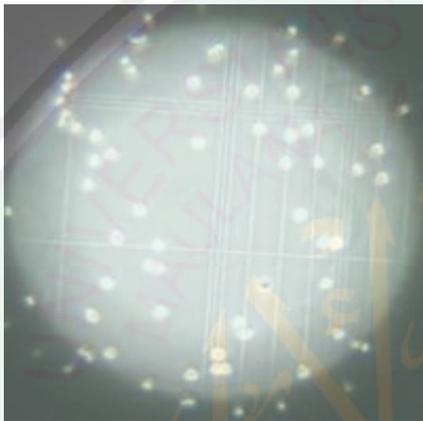
L.5.5 Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro*



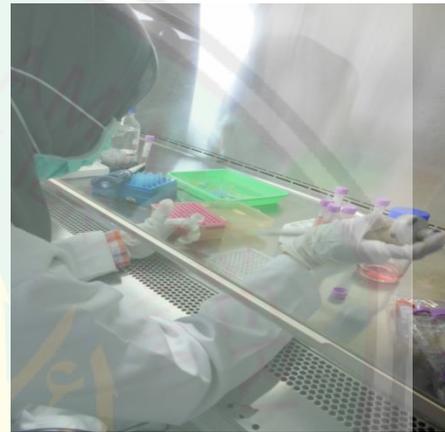
Sel kanker T47D konfluen 80 %



Hemocytometer



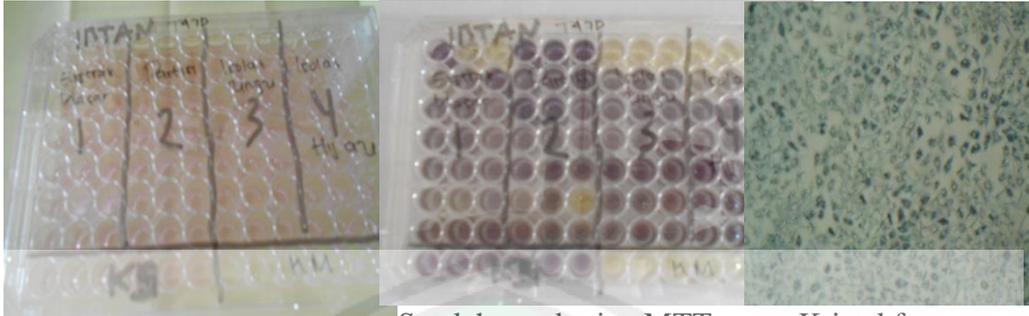
Penghitungan sel dibawah pengamatan mikroskop inverted



Penanaman sel pada plate



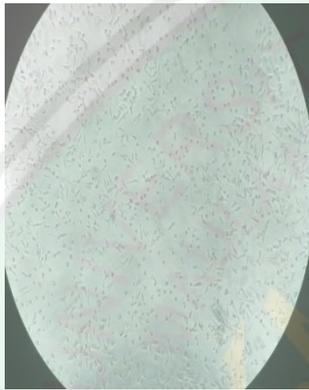
Preparasi sampel



Treatment setelah di inkubasi

Setelah pemberian MTT dan stopper SDS

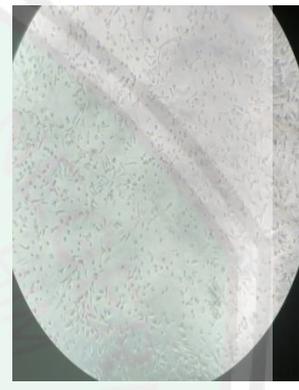
Kristal formazan



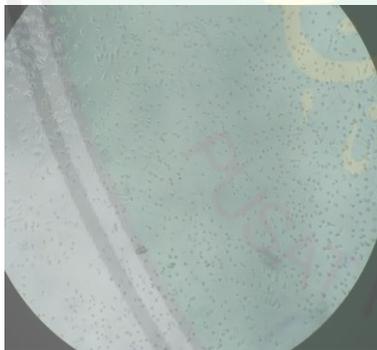
Ekstrak aseton : air (7:3) konsentrasi 500 µg/mL



Fraksi air konsentrasi 500 µg/mL



Isolat 1 konsentrasi 500 µg/mL



Isolat 2 konsentrasi 500 µg/mL

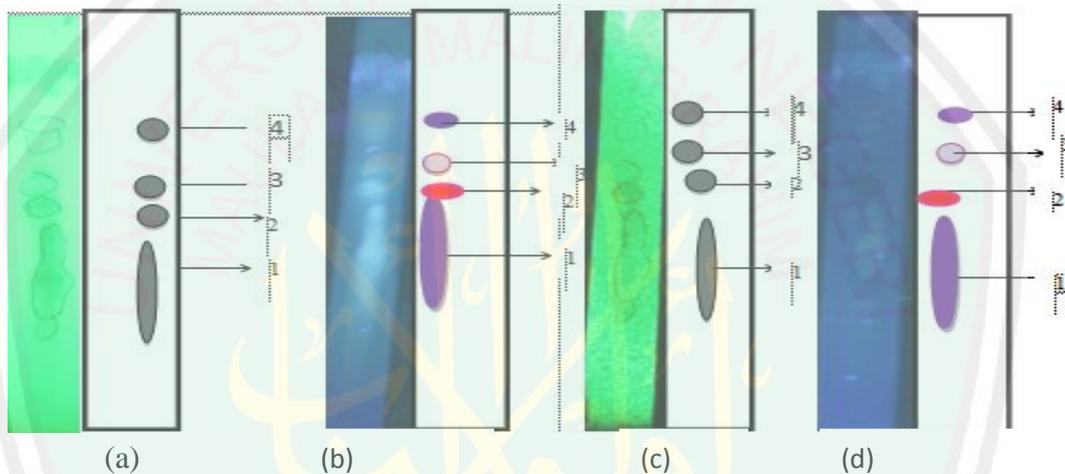


Laminar air flow

Mikroskop inverted

ELISA reader

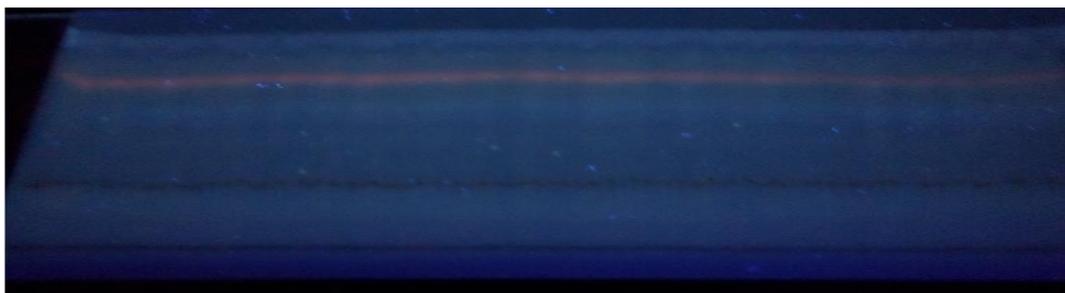
L.5.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTA



Gambar 4.14 Hasil KLTA senyawa tanin dengan eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5):

- Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada λ_{254} nm sebelum disemprot reagen FeCl_3
- Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada λ_{366} nm sebelum disemprot reagen FeCl_3
- Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada λ_{254} nm setelah disemprot reagen FeCl_3
- Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada λ_{366} nm setelah disemprot reagen FeCl_3

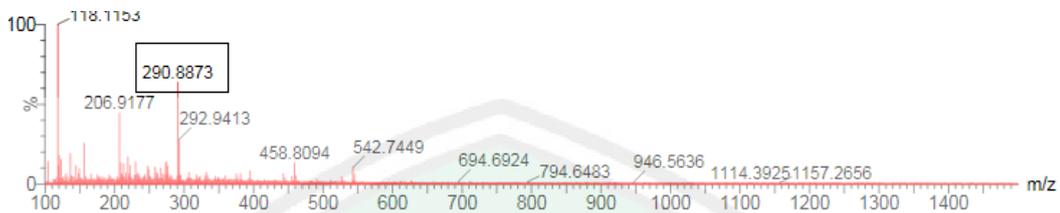
L.5.7 Pemisahan senyawa aktif dengan KLTP



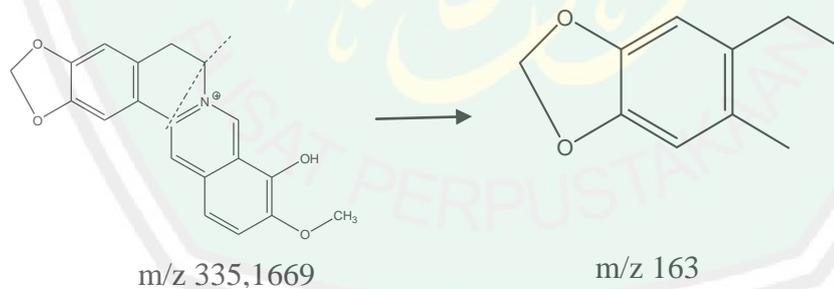
(a) Hasil dibawah pengamatan sinar UV pada λ_{366} nm

L.5.8 Identifikasi Senyawa dengan Liquid Chromathography-Mass Spectrospoy(LC-MS)

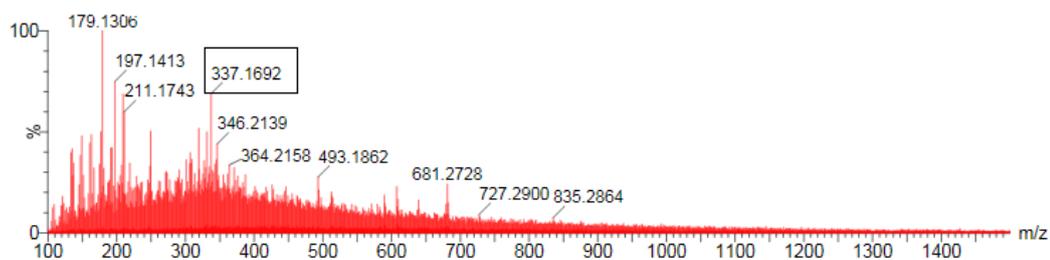
1. Senyawa Katekin pada tR 0,458

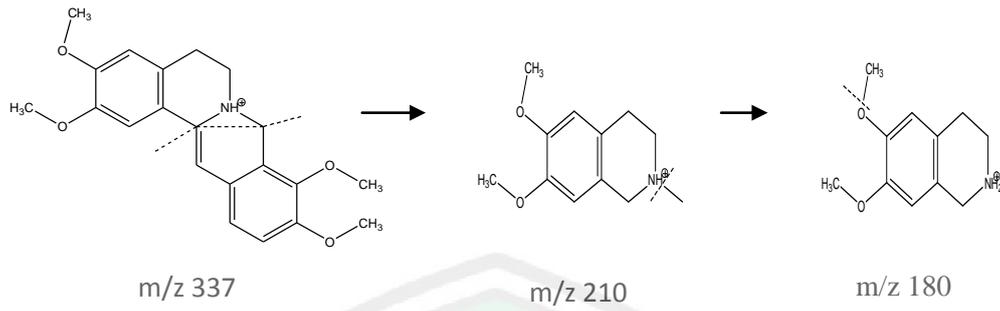


2. Senyawa Berberine pada tR 2,243

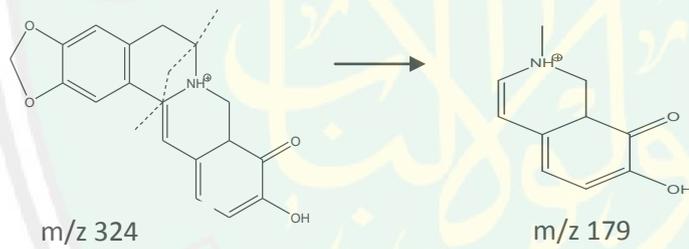
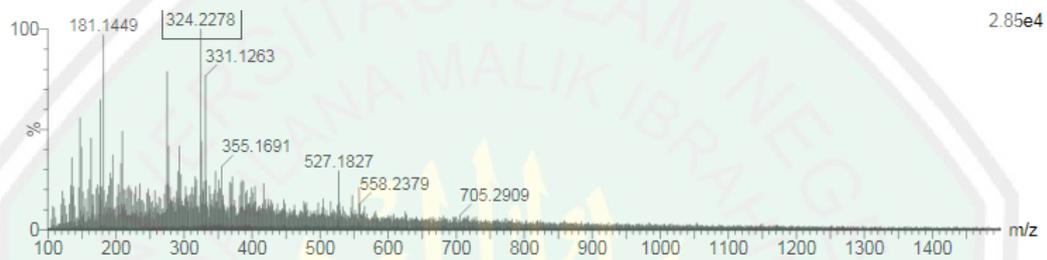


3. Senyawa Berberine pada tR 2,751

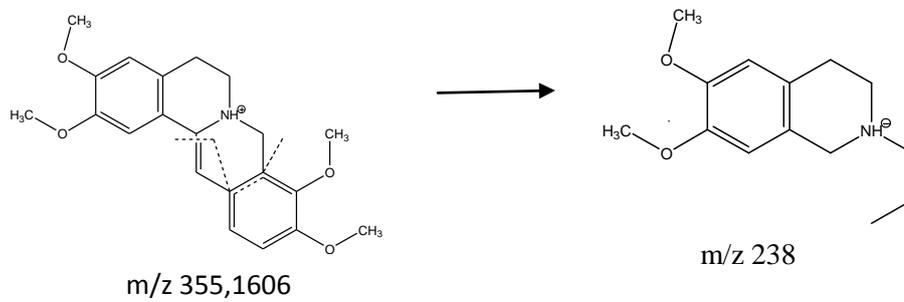




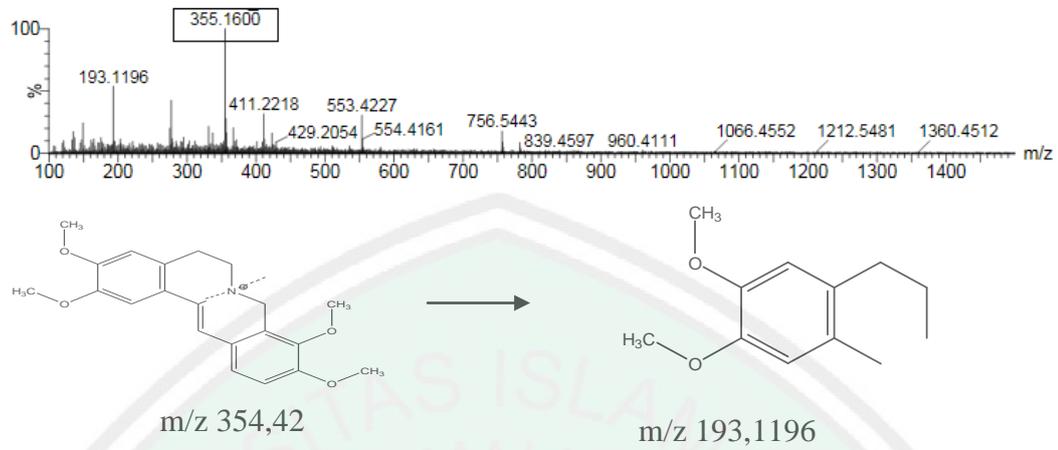
4. Senyawa Berberine pada Tr 3,585



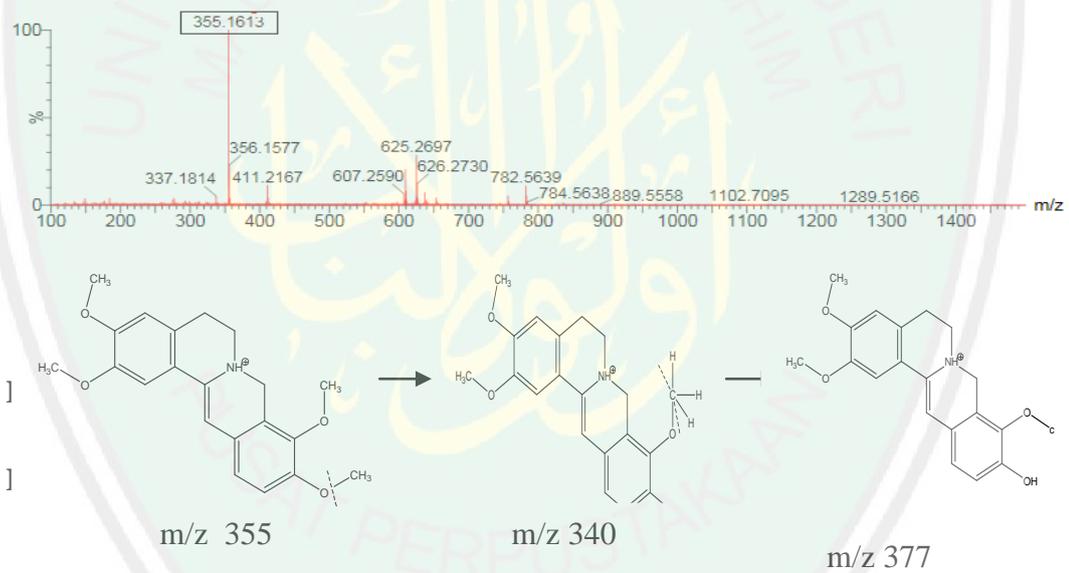
5. Senyawa Palmatine pada tR 3,864



6. Senyawa Palmatine pada tR 4,451



7. Senyawa Palmatine pada tR 5,159



8. Senyawa Fucosterol Pada Tr 6,043

