

Bab VI. Hasil dan Pembahasan

VI. 1 Pengumpulan Bahan, Hasil Determinasi dan Pembuatan Bawang Hitam

Umbi bawang putih (*Allium sativum* L.) yang diperoleh dari Perkebunan Ciwidey Kampung Cikareo Dusun Alam Endah, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu Tinggi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman bersal dari suku Liliaceae. Hasil determinasi tanaman dapat dilihat pada lampiran 1.

Pembuatan bawang hitam dengan cara sejumlah bawang putih dipanaskan menggunakan penanak nasi dengan suhu *warm* selama 15 hari. Hasil pengamatan pembuatan bawang hitam dapat dilihat pada tabel VI.1.

Tabel VI.1 Pengamatan pembuatan bawang hitam

Hari	Warna	Tekstur
0	Putih	Keras
5	Coklat	Lembek, basah
10	Coklat tua	Lunak
15	Hitam	Kenyal

VI. 2 Ekstraksi dan fraksinasi Bawang Hitam

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 3x24 jam, yang dipekatkan alat rotary evaporator pada suhu 60°C didapatkan rendemen sebesar 46,02%. Fraksinasi dilakukan 100 g ekstrak dengan pelarut n heksana, etil

asetat, dan metanol air. Rendemen yang di dapatkan pada metanol air sebesar 91,224%, fraksi etil asetat sebesar 1,5077 %, fraksi n heksana sebesar 1,1388 %. Hasil perhitungan persen rendemen dan fraksi dapat dilihat pada lampiran 3.

VI.3 Karakteristik Ekstrak Bawang Hitam

Karakteristik ekstrak bertujuan untuk mengetahui kualitas ekstrak tersebut. Karakteristik ekstrak meliputi kadar abu total, penetapan susut pengeringan, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, dan bobot jenis. Hasil pengamatan karakteristik ekstrak dapat dilihat dari tabel VI.2

Tabel VI.2 Hasil pengamatan karakteristik ekstrak bawang hitam

Paramater Karakteristik Ekstrak	Hasil
Kadar abu total (%)	3,398
Kadar sari larut air (%)	60,235
Kadar sari larut etanol (%)	11,88
Penetapan Susut Pengeringan (%)	3,075
Bobot jenis (b/v)	0,9773

Paramater kadar abu dengan bahan dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap. Sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Tujuannya untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Kadar abu total ekstrak bawang hitam sebesar 3,398%.

Penetapan Kadar Sari yang larut dalam air dimaksudkan untuk mengetahui jumlah senyawa yang dapat tersari dengan air dari suatu ekstrak (Fauzi, 2013). Kadar sari larut air dalam ekstrak bawang hitam ini sebesar 60,235 %.

Penetapan Kadar Sari yang larut dalam etanol untuk mengetahui jumlah senyawa yang dapat tersari dengan etanol dari suatu ekstrak (Fauzi, 2013). Kadar sari larut etanol dalam ekstrak bawang hitam ini sebesar 11,88 %.

Parameter susut pengeringan dengan pengukuran sisa zat pengeringan pada temperatur 105°C sampai berat konstan yang dinyatakan sebagai nilai persen. Tujuannya untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Penetapan susut pengeringan dilakukan menggunakan alat *Moisture Balance*. Nilai susut pengeringan didapatkan sebesar 3,075%.

Bobot jenis bertujuan memberikan batasan besarnya masa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dituang dan memberikan gambaran kandungan kimia terlarut. Bobot jenis dilakukan menggunakan piknometer. Bobot jenis yang didapatkan sebesar 0,9773 g/mL.

VI.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder secara kualitatif ada atau tidak senyawa tersebut pada ekstrak bawang hitam. Penapisan fitokimia yang dilakukan terdiri dari pemeriksaan golongan terdiri dari pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan

steroid/terpenoid. Hasil pengamatan penapisan fitokimia dapat dilihat pada tabel VI.3

Tabel VI.3 Pengamatan penapisan fitokimia

No	Senyawa	Hasil
1	Alkaloid	(-)
2	Flavonoid	(+)
3	Saponin	(+)
4	Kuinon	(-)
5	Tanin	(+)
6	Steroid/Triterpenoid	(+)

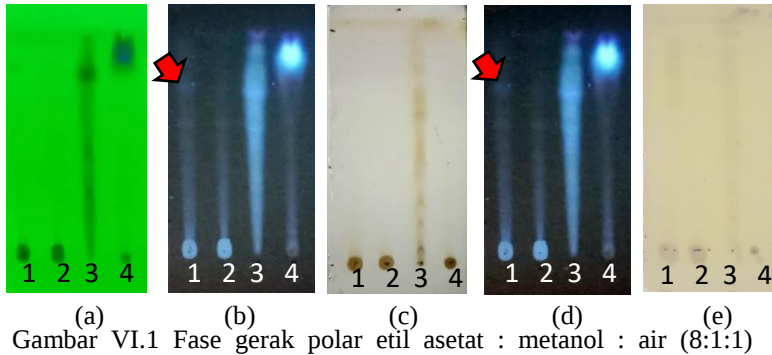
Keterangan :

(+) : Mengandung golongan senyawa yang diuji

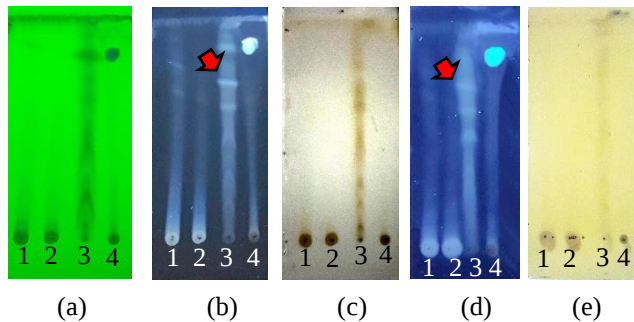
(-) : Tidak mengandung golongan senyawa yang diuji

VI.5 Pemantauan

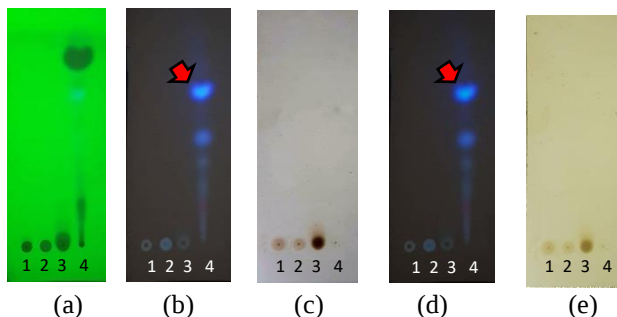
Kromatografi lapis tipis merupakan suatu metode identifikasi secara kualitatif dari suatu sampel (Hertiani dan Efendi, 2013). Prinsip dari KLT adalah adsorpsi dan partisi (Akhyar, 2010). Dalam pemantauan KLT dilakukan juga penjenuhan pengembang menggunakan kertas saring dengan tujuan mencegah terjadinya penguapan pelarut (Hanifah, 2014).



Keterangan : Pola Kromatogram KLT (1) Ekstrak etanol 70%, (2) Fraksi Metanol air, (3) Fraksi etil asetat, (4) Fraksi n heksana, dengan fase gerak polar polar etil asetat : metanol : air (8:1:1) secara : (a) lampu UV λ 254 nm, (b) lampu UV λ 365 nm, (c) H_2SO_4 10% (d) AlCl_3 5%, dan (e) FeCl_3 10%.



Keterangan : Pola Kromatogram KLT (1) Ekstrak etanol 70%, (2) Fraksi Metanol air, (3) Fraksi etil asetat, (4) Fraksi n heksana, dengan fase gerak semi polar Kloroform - Metanol (8:2) secara : (a) lampu UV λ 254 nm, (b) lampu UV λ 365 nm, (c) H_2SO_4 10% (d) AlCl_3 5%, dan (e) FeCl_3 10%.



Gambar VI.3 Fase gerak non polar n heksana : etil asetat (9:1)

Keterangan : Pola Kromatogram KLT (1) Ekstrak etanol 70%, (2) Fraksi Metanol air, (3) Fraksi etil asetat, (4) Fraksi n heksana (, dengan fase gerak non polar n heksana : etil asetat (9:1) secara : (a) lampu UV λ 254 nm, (b) lampu UV λ 365 nm, (c) H_2SO_4 10% (d) AlCl_3 5%, dan (e) FeCl_3 10%

Hasil Pemantauan ekstrak dan fraksi bawang hitam dengan fase gerak polar, semi polar, dan non polar dengan penampak bercak H_2SO_4 10% sebagai penampak bercak universal. Penampak bercak AlCl_3 5%, untuk mengidentifikasi adanya senyawa flavonoid dengan adanya fluoresensi saat dilihat dibawah sinar UV 365 nm. Penampak bercak FeCl_3 10% mengidentifikasi senyawa fenol ditunjukkan hasil positif warna biru kehitaman dengan latar kuning.

VI.6 Analisis menggunakan metode KGSM

Analisis menggunakan KGSM (Kromatografi Gas Spektrometri Massa) dengan tujuan untuk mengidentifikasi senyawa volatil / mudah menguap yang terkandung di dalam fraksi n heksana bawang hitam. Prinsip kromatografi gas dengan pemisahan yang mana solut – solut yang mudah menguap bermigrasi melalui kolom yang

mengandung fase diam dengan suatu kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya (Gandjar, 2007). Pemisahan pada kromatografi gas didasarkan pada titik didih suatu senyawa dikurangi dengan semua interaksi khusus antara solut dengan fase diam (kolom kapiler). Fase gerak yang berupa gas akan mengelusi solut dari ujung kolom lalu menghantarkan ke detektor.

Prinsip kerja spektrofotometri massa adalah menembak bahan yang sedang di analisis dengan berkas elektron secara kuantitatif mencatat hasilnya sebagai spectrum fragmen ion positif. Fragmen – fragmen tersebut berkelompok sesuai dengan massanya (Fessenden and Fessenden, 1982). Informasi yang diperoleh pada kromatografi gas adalah waktu retensi untuk tiap-tiap senyawa dalam sampel. Sedangkan untuk spektrofotometri massa diperoleh informasi mengenai massa molekul relatif dari senyawa sampel tersebut.

Hasil kromatogram KGSM dapat dilihat dilampiran 6 sedangkan hasil identifikasi senyawa volatil fraksi n heksana dengan metode KGSM menghasilkan senyawa kimia sebagai berikut :

Tabel VI.4 Identifikasi senyawa fraksi n heksana bawang hitam menggunakan KGSM

Waktu Retensi	Nama Seyawa	Bobot Molekul	Rumus Molekul	%Area
13.223	Tetradekana	198	$C_{14}H_{30}$	4,07
18.032	Heksadekana	226	$C_{16}H_{34}$	5,66
21,867	Nonadekana	268	$C_{19}H_{40}$	4,84
23,580	Asam heksadekanoat, metil ester	270	$C_{17}H_{34}O_2$	1,94
24,111	Asam heksadekanoat	256	$C_{16}H_{32}O_2$	3,02
24,437	Ikosana	282	$C_{20}H_{42}$	3,64
25,492	9-12 asam oktadekadionat	294	$C_{19}H_{34}O_2$	2,53
26,068	9 – Asam oktadekanoat	282	$C_{18}H_{34}O_2$	16,99
26,227	Asam heksadekanoat, fenilmetil ester	346	$C_{23}H_{38}O_2$	6,94
26,486	Heptakosana	380	$C_{27}H_{56}$	9,27

VI.7 Pengaktifan dan pemeliharaan sel kanker MCF-7

Pengaktifan dan pemeliharaan sel kanker MCF-7 meliputi pembuatan media lengkap, aktivasi sel MCF-7 dari tangki nitrogen cair, panen sel kanker MCF-7, subkultur sel kanker MCF-7, dan pembuatan larutan uji.

VI.7.1 Pembuatan Media kultur Lengkap

Suatu sel memerlukan media yang sesuai untuk dapat tumbuh dan berkembang salah satunya adalah media kultur lengkap. Media kultur

lengkap ini merupakan media yang mengandung faktor pertumbuhan. Pada penelitian ini digunakan media kultur lengkap terdiri dari *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, dan Penisilin – Streptomisin 1%. RPMI merupakan media yang mengandung garam – garam organik, asam amino, vitamin – vitamin serta zat lainnya (Sitorus, 2013). Medium yang digunakan untuk menumbuhkan kultur sel merupakan medium yang sesuai bagi pertumbuhan mikroorganisme dimana tingkat pertumbuhannya lebih cepat dibandingkan sel kultur itu sendiri (Sitorus, 2013).

Fetal Bovine Serum (FBS) adalah serum yang mengandung faktor pertumbuhan dimana mendorong poliferasi sel dan faktor adhesi serta memiliki aktivitas antitripsin dimana mendorong sel untuk *attached* (Freshney, 2013). Penisilin – Streptomisin merupakan antibiotik gram positif – gram negatif yang berfungsi untuk menekan terjadinya kontaminasi (Freshney, 2013).

VI.7.2 Penumbuhan sel MCF-7 dari tangki nitrogen (*cell thawing*)

Cell thawing merupakan pengaktifan kembali sel dari pengawetan berku tangki nitrogen cair (*cyropreservation*) untuk dapat di kembangkan dan digunakan kembali dalam pengujian (Sitorus, 2013). Apabila sel tidak digunakan maka sel dapat disimpan dalam tangki nitrogen cair (tekanan atmosfer normal bersuhu -152°C hingga -200°C) untuk waktu penyimpanan selama 2 - 3 tahun dapat disimpan dalam suhu -80°C sedangkan *cryopreservation* adalah suhu yang sangat rendah untuk mengawetkan struktur utuh sel hidup dan jaringan dalam jangka waktu sangat lama (Jag *et al*, 2017).

Cryoprotectant merupakan zat yang digunakan untuk melindungi sel atau jaringan secara biologi dari kerusakan selama pembekuan. *Cryoprotectant* yang umum digunakan untuk *cryopreservation* adalah DMSO karena harga yang murah dan sitotoksik yang rendah. DMSO bertindak dengan mengurangi konsentrasi elektrolit dalam sisa larutan yang dicairkan didalam sekitar sel pada suhu tertentu (Jag et al, 2017).

VI.7.3 Panen Sel Kanker MCF-7

Kultur sel yang telah membentuk monolayer dengan kepadatan 80% dapat digunakan untuk pengujian atau di subkultur. Proses pengambilan sel yang telah padat disebut panen sel. Hal terpenting dari panen sel adalah ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matriks dilepaskan tanpa merusak sel itu sendiri (CCRC, 2009). Setelah sel diinkubasi, sel diamati dengan mikroskop inverted sampai kepadatan mencapai 80 % lalu media dibuang dan dicuci dengan PBS (*Phosfat Buffer Saline*).

PBS ini berfungsi untuk mempertahankan pH. Pengatur tekanan osmose dalam medium serta berbagai sumber ion inorganik. PBS ini juga berfungsi sebagai larutan pencuci sel untuk menghilangkan sisa serum yang menempel pada sel serta mengangkat sel – sel yang telah diamati (Sitorus, 2013). Lalu Tripsin – EDTA ditambahkan. Tripsin merupakan enzim protease yang dapat memotong matriks seluler sel yang menempel pada dinding flask. Kelebihan dari tripsin yaitu dapat menoleransi banyak jenis dan sisa tripsin yang tertinggal dalam suspensi sel dapat dinetralkan oleh serum dalam media. FBS dalam media RPMI 1640 mengandung antitripsin sehingga penambahan media dapat menonaktifkan tripsin (Sitorus, 2013).

VI.7.4 Perhitungan sel kanker MCF-7

Kepadatan sel dapat diketahui dengan dilakukan perhitungan menggunakan hemositometer dibawah mikroskop inverted. Persyaratan dari perhitungan sel dengan metode hemositometri yaitu sel tidak menggerombol atau berdiri sendiri – sendiri (CCRC, 2009). Sel yang dihitung merupakan sel lini MCF-7 yang hidup dengan menggunakan pewarna tripan biru dimana berfungsi untuk membedakan sel yang hidup dan sel yang mati. Sel hidup berwarna bening, berbentuk bulat utuh dan ada inti ditengahnya sedangkan sel mati akan berwarna biru, bentuknya tidak beraturan, dan sitoplasma pecah dan tidak memiliki inti.

Sel yang dihitung dari keempat bidang besar pada sudut seluruh permukaan yang terbagi. Perhitungan dimulai dari sisi kiri atas kemudian ke kanan, turun kebawah dan dari kanan ke kiri. Cara tersebut garis batas sebelah kiri atau atas harus dihitung, sebaliknya sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau bawah tidak dihitung (Sitorus, 2013). Perhitungan kultur sel dapat dilihat pada lampiran 7.

VI.7.5 Subkultur Sel Kanker MCF-7

Subkultur sel adalah proses pemindahan sel dari kondisi yang telah di konfluen ketempat tumbuh yang masih kosong dimana prosedurnya sama seperti proses permanen sel dengan mengganti media komplit setiap hari bila sel telah konfluen.

VI.7.6 Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan menimbang sampel ekstrak, fraksi metanol air, fraksi etil asetat, dan fraksi n heksana masing – masing 10 mg. Kemudian dilarutkan dengan DMSO 10% ditambahkan dengan media hingga 1 mL. Sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk 10.000 bpj. Setelah itu dibuat 5 seri konsentrasi larutan yaitu 400 bpj, 200 bpj, 100 bpj, 50 bpj dan 25 bpj dengan cara mengambil larutan sampel dan penambahan media. Hasil perhitungan seri konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 8.

VI.8 Uji Sitotoksik Metode MTT

Uji sitotoksik merupakan evaluasi yang terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis. Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji sitotoksisitas diantaranya adalah sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis – respon harus sejalan dengan efek yang muncul pada *in vivo*. Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode MTT (CCRC, 2013).

Metode ini mengukur viabilitas sel dalam hal aktivitas reduktif sebagai konversi enzimatik dari senyawa tetrazolium menjadi kristal formazan yang tidak larut dalam air oleh dehidrogenase yang terjadi di sel hidup mitokondria walaupun reduktor dan enzim yang terletak di organel lain seperti retikulum endoplasma juga terlihat (Van Tonder *et al*, 2015).

VI.8.1 Penanaman Sel Kanker MCF-7

Penanaman sel dilakukan dengan cara mengambil 200 μL . Larutan suspensi sel kedalam 93 sumur. Bagian bawah tidak diberi larutan suspensi sel karena diisi dengan blanko yang berisi medium komplit tanpa sel. Setelah itu diinkubasi dengan inkubator CO_2 5% selama 24 jam pada suhu 37°C agar sel *attach*.

VI.8.2 Perlakuan Ekstrak dan Fraksi Bawang Hitam

Setelah larutan sel diinkubasi selama 24 jam didalam inkubator CO_2 5% buang media sel dan cuci tiap sumur dengan 100 μL PBS. Setelah dicuci kemudian dibuang PBS. Dimasukkan ekstrak dan fraksi bawang hitam diisi masing – masing sampel sebanyak 200 μL kedalam tiap sumuran sesuai dengan seri konsentrasi. Kemudian diinkubasi di inkubator CO_2 selama 24 jam pada suhu 37°C .

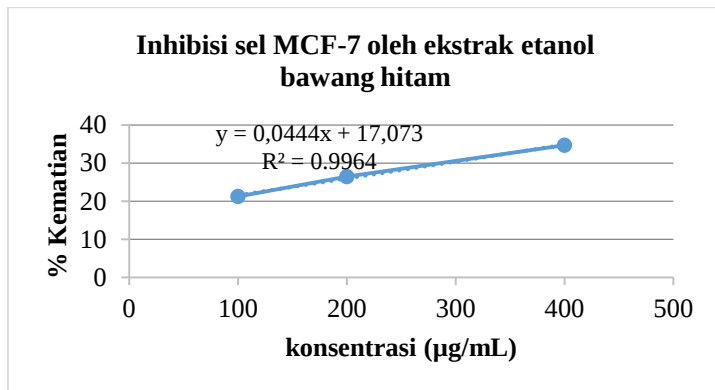
VI.8.3 Pemberian reagen MTT dan Stopper (DMSO)

Setelah diinkubasi selama 24 jam, media sel dibuang, lalu dicuci dengan PBS kemudian diberi reagen MTT sebanyak 100 μL ke setiap sumuran. Selanjutnya diinkubasi selama 4 jam didalam inkubator CO_2 dengan suhu 37°C . Pada saat inkubasi MTT yang berwarna kuning akan bereaksi dengan enzim dehidrogenase suksinat yang terdapat pada mitokondria sel sehingga berubah warna menjadi ungu formazan yang tidak larut air (Freshney, 2013). Setelah diinkubator selama 4 jam, jika formazan telah terbentuk dengan jelas dengan ditandai perubahan intensitas warna dapat ditambahkan dengan stopper DMSO sebanyak 100 μL . Reagen stopper DMSO akan melarutkan kristal ungu formazan yang tidak larut air. Selain itu reagen tersebut akan

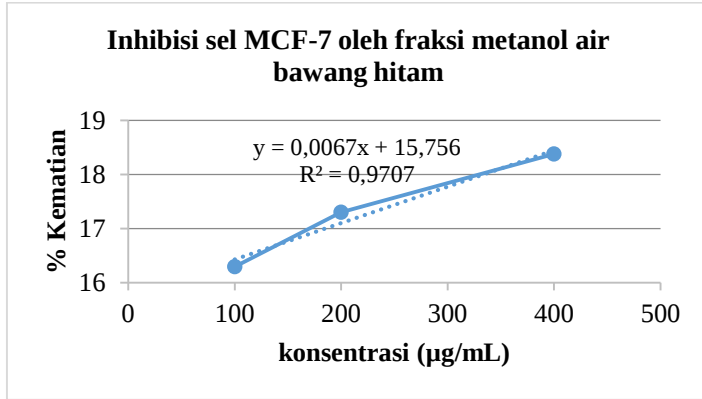
menghentikan aktivitas MTT (Freshney, 2013). Pengukuran dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang (λ) 550 nm. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar maka jumlah sel hidup semakin banyak (CCRC, 2013).

VI.8.4 Hasil Perhitungan IC_{50}

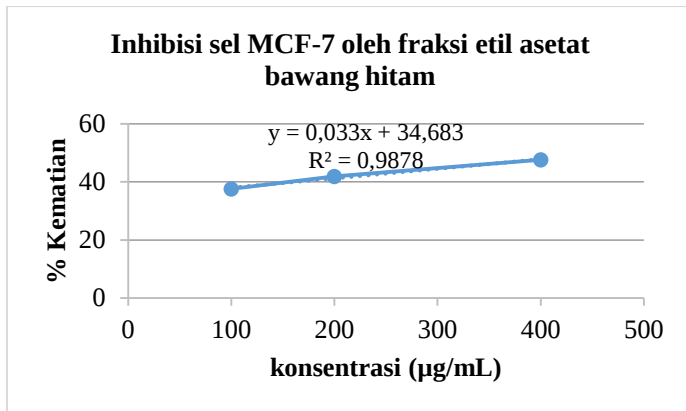
Berdasarkan hasil pengolahan data dengan menggunakan metode MTT diperoleh IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi zat uji yang dapat menghambat perkembangan biakan sel sebanyak 50% setelah di inkubasi (Simorangkir et al, 2017). Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi grafik konsentrasi dengan persen inhibisi/kematian yang dapat di lihat pada gambar berikut.



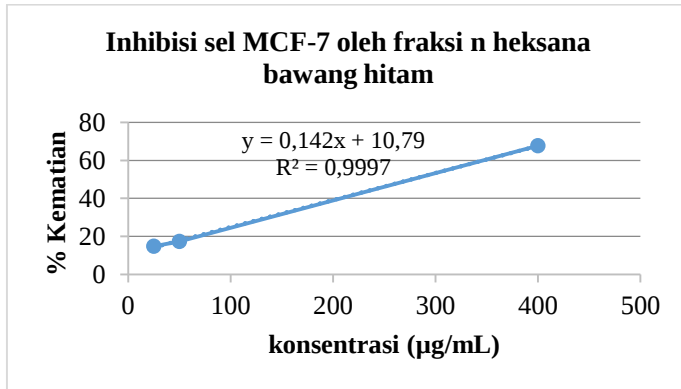
Gambar VI.4 Grafik penghambatan sel kanker payudara MCF-7 oleh ekstrak etanol bawang hitam.



Gambar VI.5 Grafik penghambatan sel kanker payudara MCF-7 oleh fraksi metanol air bawang hitam.

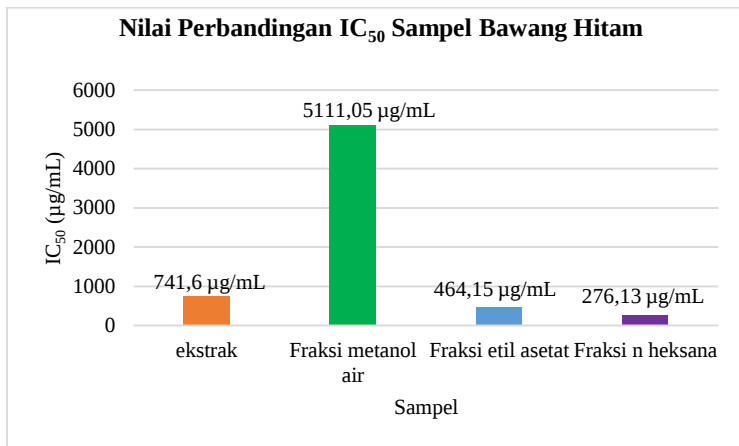


Gambar VI.6 Grafik penghambatan sel kanker payudara MCF-7 oleh fraksi etil asetat bawang hitam.



Gambar VI.7 Grafik penghambatan sel kanker payudara MCF-7 oleh fraksi n heksana bawang hitam.

Persamaan regresi didapatkan lalu dihitung nilai IC_{50} dengan memasukkan nilai y dengan nilai 50. Nilai IC_{50} dari ekstrak etanol bawang hitam sebesar 741,6 µg/mL, fraksi metanol air sebesar 5111,05 µg/mL, fraksi etil asetat sebesar 464,15 µg/mL, dan fraksi n heksana sebesar 276,13 µg/mL. Hasil perbandingan nilai IC_{50} tiap sampel di plotkan dalam sebuah grafik sebagai berikut



Gambar VI.8 Grafik perbandingan nilai IC_{50} sampel bawang hitam.

Menurut *National Cancer Institute* (2001) pembagian kategori sitotoksitas IC_{50} ditunjukkan pada tabel VI.5

Tabel VI.5 Kategori sitotoksitas Nilai IC_{50} (NCI, 2001)

No	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Keterangan
1	≤ 20	Sangat toksik
2	$21 < IC_{50} < 200$	Moderat/cukup aktif
3	$201 < IC_{50} < 500$	Lemah
4	> 500	Tidak Toksik

Dari tabel diatas yang didapat ekstrak etanol bawang hitam dan fraksi metanol air tidak memiliki aktivitas sitotoksik sedangkan fraksi etil asetat dan fraksi n heksana memiliki aktivitas sitotoksik lemah. Hasil perhitungan nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi bawang hitam dapat dilihat di lampiran 10.