

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Pengumpulan Bahan dan Hasil Determinasi Tanaman

Tanaman buah ranti hitam (*Solanum nigrum* L.) diperoleh dari perkebunan Ciwidey Bandung dan kemudian dideterminasi di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB Bandung, Jawa Barat. Hasil determinasi menyatakan bahwa buah tersebut adalah benar buah ranti hitam yang berasal dari jenis *Solanum nigrum* L., suku Solanaceae, ranti, leunca. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1. Starter kombucha dan SCOBY (*Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast*) diperoleh dari wikikombucha. Sel MDA-MB 231 diperoleh dari Dr. Med. Muhammad Hasan Bashari, dr., M.Kes, Rumah Sakit Pendidikan Universitas Padjajaran, Bandung.

VI.2 Penyiapan Sampel

Buah ranti hitam disortasi basah untuk memisahkan bagian tanaman yang tidak diperlukan dan partikel asing. Buah lalu dicuci bersih dengan air mengalir, dikering anginkan, dirajang, dan dikeringkan. Simplisia tidak boleh mengandung kadar air lebih dari 10% karena apabila kadar air lebih tinggi memungkinkan jamur dan mikroba untuk tumbuh dan menyebabkan penurunan kandungan kimia dari simplisia (Sopian et al., 2017). Penetapan kadar air simplisia dilakukan dengan menggunakan metode Gravimetri. Hasil penelitian menunjukkan kadar air yang diperoleh sebesar 2% (termasuk zat-zat mudah menguap) yang berarti memenuhi syarat kadar air simplisia. Hasil penghitungan kadar air dengan metode Gravimetri dapat dilihat di lampiran 2. Selanjutnya simplisia disortasi kering dan diperkecil ukuran partikelnya menggunakan blender agar proses penarikan

senyawa kimia yang terkandung didalamnya lebih maksimal (Faturrachman, 2014).

VI.3 Ekstraksi Buah Ranti Hitam (*Solanum nigrum* L.)

Ekstraksi buah ranti hitam dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Metode maserasi dapat digunakan untuk senyawa yang tidak tahan panas ataupun yang tahan panas sehingga rusaknya senyawa-senyawa aktif pada buah ranti hitam dapat dihindari. Prinsip metode maserasi adalah pencapaian konsentrasi pada kesetimbangan (Depkes RI, 1994). Pada saat perendaman serbuk, pelarut atau cairan penyari masuk ke dalam sel dan akan melewati dinding sel. Perbedaan konsentrasi larutan didalam dan diluar sel akan menyebabkan isi sel larut. Selanjutnya akan terjadi proses difusi, yaitu larutan yang konsentrasinya tinggi akan keluar dan diganti oleh cairan penyari yang memiliki konsentrasi lebih rendah. Peristiwa tersebut akan terus terjadi sampai kesetimbangan tercapai (Hasrianti et al., 2016). Dalam penelitian ini, proses maserasi dilakukan selama 3 hari dan setiap hari dilakukan penggantian larutan penyari dan pengadukan. Penggantian larutan penyari dilakukan agar senyawa yang tersari lebih banyak. Sedangkan pengadukan bertujuan untuk mempercepat kontak antara sampel dan pelarut serta menghomogenkan larutan selama proses perendaman (Khunaifi, 2010).

Etanol 70% digunakan sebagai pelarut karena merupakan pelarut universal yaitu pelarut yang selain mampu mengekstrak komponen polar juga dapat mengekstrak komponen non polar (Houghton & Raman, 1998). Selain itu, titik didih etanol juga rendah dan

cenderung aman, tidak berbahaya dan tidak beracun (Azis et al., 2014). Pelarut etanol mempunyai gugus -OH yang bersifat polar dan gugus CH_2CH_3 yang bersifat non polar. Sifat polar dan non polar ini membuat etanol mampu mengekstrak alkaloid di dalam buah ranti hitam secara optimal (Azis et al., 2014). Agar simplisia terendam sempurna, digunakan perbandingan simplisia dan pelarut yaitu 1:3 (Sayuti, 2018). Maserasi dilakukan dalam botol kaca coklat (gelap) agar kerusakan senyawa oleh pengaruh cahaya dapat dihindari karena menurut Suryaningrum, dkk., 2006, sinar matahari dapat merusak kandungan bioaktif dalam sampel. Setelah dimaserasi, maserat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Dari 1000 gram simplisia kering, didapatkan ekstrak kental sebanyak 177,35 gram dengan rendemen sebesar 17,74%. Perhitungan persentase rendemen ekstrak dapat dilihat di lampiran 3.

VI.4 Fraksinasi Buah Ranti Hitam (*Solanum nigrum* L.)

Ekstrak kental hasil maserasi kemudian difraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair (ECC) menggunakan corong pisah. Fraksinasi adalah suatu proses pemisahan yang didasarkan pada perbedaan distribusi komponen yang dipisahkan antara dua fase cair. Proses pemisahannya menggunakan dua pelarut yang tidak saling campur (memiliki kepolaran yang berbeda) (Hermawan et al., 2016). Tujuan fraksinasi adalah untuk memisahkan kandungan senyawa berdasarkan sifat kepolarannya (Febriyanti et al., 2004). Fraksinasi dilakukan secara berkelanjutan menggunakan pelarut non polar (n-heksan), kemudian pelarut semi polar (etil asetat) dan pelarut polar menggunakan metanol dan air dengan perbandingan 1:1 (v/v) (Hikmah, 2012) Fraksi polar kemudian dipekatkan dengan *rotary*

evaporator sebelum digunakan untuk proses selanjutnya. Alkaloid diketahui merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder pada buah ranti hitam yang memiliki aktivitas sitotoksik (Istiaji et al., 2010; Sammani et al., 2014; Simorangkir et al., 2017). Dari 112 gram ekstrak kental hasil maserasi, didapatkan fraksi polar kental sebanyak 75,46 gram dengan rendemen sebesar 67,37%. Perhitungan persentase rendemen fraksi dapat dilihat di lampiran 4.

VI.5 Pembuatan Starter Teh Kombucha

Starter kombucha teh dibuat untuk digunakan sebagai starter pada proses fermentasi selanjutnya menggunakan sari buah ranti hitam. Starter teh kombucha dibuat dengan menggunakan SCOBY dan starter yang telah diperoleh sebelumnya. Pembuatan starter bertujuan untuk mendapatkan starter teh yang baru, segar, dan untuk mendapatkan SCOBY (*microbial cellulosa*) yang lebih banyak. Alat, bahan, dan proses pengerjaan dalam fermentasi harus steril agar tidak terjadi kontaminasi yang akan mengganggu pertumbuhan kombucha. Wadah yang digunakan untuk proses fermentasi adalah wadah kaca atau terbuat dari gelas, hal ini untuk menghindari terjadinya reaksi dengan wadah yang digunakan (Ardheniati & Amanto, 2009).

Pada tahap ini digunakan media teh hijau, karena gula pereduksi yang dihasilkan kombucha teh hijau memiliki kadar yang lebih tinggi daripada teh hitam (Júnior et al., 2009). Selain itu, teh hijau juga merupakan sebagai media yang cocok untuk bakteri karena diolah tanpa melalui proses fermentasi buatan (*unfermented tea*). Teh hijau difermentasi secara alami menggunakan enzim yang terdapat pada daun teh yaitu polifenol oksidase yang dapat membuat komponen zat

aktif pada teh dapat terjaga (Habibah et al., 2016; Mahadi & Irda, 2016).

Saat proses fermentasi, pertumbuhan bakteri kombucha dapat terhambat oleh pengaruh cahaya matahari dan guncangan karena dapat membuat SCOBY yang akan terbentuk menjadi sulit memadat (Ardheniati & Amanto, 2009; Mahadi & Irda, 2016). Parameter berhasilnya fermentasi dapat diketahui dengan terciumnya bau asam dan terbentuknya lapisan SCOBY baru (Haryanto, 2018). Pada fermentasi starter teh ini, bau asam mulai tercium pada hari ke-3 fermentasi, sedangkan lapisan SCOBY tipis (*baby kombucha*) sudah mulai terbentuk pada hari ke-5 fermentasi. SCOBY yang terbentuk akan semakin menebal seiring dengan lamanya waktu fermentasi.

VI.6 Peremajaan Starter Kombucha Sari Buah Ranti Hitam

Tujuan peremajaan starter kombucha sari buah ranti hitam adalah untuk mengadaptasi kombucha dalam media yang baru yaitu sari buah ranti hitam. Adaptasi ini dilakukan agar proses fermentasi dengan media fraksi polar buah ranti hitam dapat berlangsung lebih optimal karena sebelumnya telah beradaptasi dengan sari buah ranti hitam (Zamzam, 2017).

Pengambilan sari buah dilakukan menggunakan *juicer* untuk meminimalkan kontaminasi. Pada peremajaan ini, bau baru mulai tercium pada hari ke-5 fermentasi dan *baby kombucha* baru terbentuk pada hari ke-8 fermentasi, hal tersebut dapat dikarenakan waktu adaptasi yang diperlukan kombucha pada sari buah lebih lama dibandingkan dengan starter teh. Hasil dari peremajaan ini digunakan

sebagai starter untuk proses fermentasi selanjutnya dengan menggunakan fraksi polar buah ranti hitam.

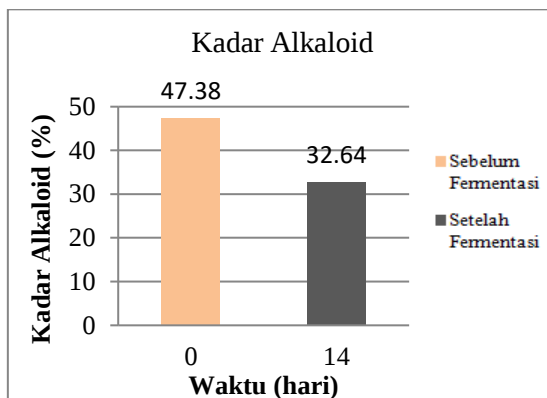
VI.7 Proses Fermentasi Fraksi Polar Buah Ranti Hitam

Fermentasi fraksi polar diharapkan dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik (Ansari et al., 2017). Pada fermentasi ini tidak menggunakan SCOBY, tetapi hanya menggunakan starter buah ranti hitam. Oleh karena itu, fermentasi ini disebut dengan *second fermentation* yaitu fermentasi kombucha tanpa menggunakan starter padat (Ardheniati & Amanto, 2009).

Pada tahap ini, bau asam sudah mulai tercium pada hari ke-2 fermentasi, sedangkan *baby kombucha* sudah mulai terbentuk pada hari ke-3 fermentasi. SCOBY merupakan hasil metabolisme dari *Acetobacter xilynum* yang mensintesis glukosa menjadi polisakarida berupa selulosa yang tampak seperti sera-serat putih. Kemudian secara bertahap, selulosa tersebut akan membentuk lapisan nata dengan ketebalan tertentu. Nata tersebut kemudian digunakan sebagai inokulum pada proses fermentasi selanjutnya. Aroma asam pada proses fermentasi disebabkan karena terbentuknya senyawa-senyawa *volatile* (asam asetat dan asam propionat) yang menimbulkan aroma asam yang khas. *A. xilynum* juga diketahui memiliki kemampuan untuk mengoksidasi glukosa menjadi asam glukonan dan asam-asam organik lain pada waktu yang bersamaan seperti asam laktat dan asetaldehid (Aditiwati & Kusnadi, 2003; Wistiana & Zubaidah, 2015).

VI.8 Penetapan Kadar Alkaloid Total

Alkaloid dapat ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan, tetapi sebagian besar senyawa alkaloid bersumber dari tumbuh-tumbuhan (Ningrum et al., 2016). Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar alkaloid karena buah ranti hitam diketahui kaya akan kandungan glikoalkaloid seperti solamargin, solasonin dan solanin (Maslahat et al., 2011). Senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas antikanker (Istiaji et al., 2010; Sammani et al., 2014; Elhawary et al., 2015). Pada penelitian ini, penetapan kadar alkaloid dilakukan dengan metode Gravimetri yang dapat dilihat pada lampiran 6.



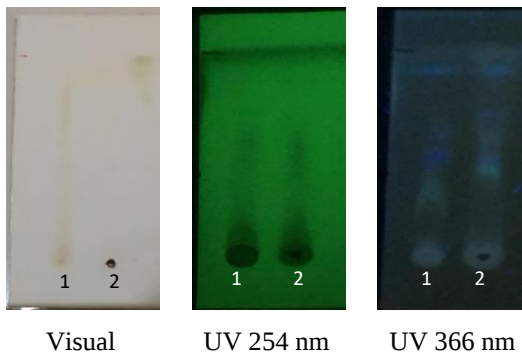
Gambar VI. 1 Pengukuran Persen Kadar Alkaloid Sebelum dan Setelah Fermentasi

Setelah dilakukan perhitungan kadar alkaloid fraksi polar buah ranti hitam adalah 47,38% dan setelah difermentasi menjadi 32,64%. Dari grafik (Gambar VI.1) diketahui bahwa terjadi penurunan nilai persen kadar alkaloid setelah dilakukan fermentasi sebesar $\pm 31\%$. Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan penurunan kadar alkaloid yang semula sebelum fermentasi 0,65% menjadi 0,45% setelah

dilakukan fermentasi (Fauzi et al., 2018). Penurunan tersebut dapat disebabkan karena endapan yang terbentuk tidak sempurna. Pemanasan, penambahan elektrolit, dan pengadukan dapat mempengaruhi proses terbentuknya endapan dan ukuran endapan. Hasil ukuran endapan yang halus dapat lolos pada kertas saring dan kemudian tidak ikut tertimbang (Widjanarko & Megawati, 2015). Selain itu, penurunan kadar alkaloid juga dapat disebabkan karena pH yang turun oleh proses fermentasi. Semakin lama fermentasi maka kadar alkaloid akan semakin menurun dan selanjutnya menghasilkan metabolit-metabolit baru berupa enzim (Fauzi et al., 2018).

Selanjutnya dilakukan konfirmasi alkaloid menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Prinsip kerja KLT adalah memisahkan sampel berdasarkan dengan perbedaan kepolaran sampel dengan pelarut yang digunakan. Fase diam dalam KLT biasanya dalam bentuk plat silica dan fase geraknya (eluen) sesuai dengan jenis sampel yang akan dipisahkan. Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase geraknya tersebut, begitu juga sebaliknya (Alen et al., 2017). Eluen yang digunakan pada KLT ini adalah etil asetat. Hasil pemisahan kemudian diamati dibawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Harbone, 1996). Pada UV 254 nm, lempeng akan berfluoresensi sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap. Penampakan bercak pada lampu UV 254 nm terjadi karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng. Sedangkan bercak akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna gelap pada UV 366 nm.

Penampakan bercak pada lampu UV 366 nm terjadi karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang ada pada noda tersebut (Wullur et al., 2012). Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar VI.2.



Keterangan: 1= sebelum fermentasi, 2= setelah fermentasi

Gambar VI. 2 Hasil Konfirmasi Senyawa Alkaloid Fraksi Polar Buah Ranti Hitam dengan Metode KLT

Dari hasil KLT didapatkan nilai R_f endapan alkaloid fraksi polar sebelum fermentasi yaitu 0,48 dan untuk endapan alkaloid fraksi polar setelah fermentasi nilai R_f nya adalah 0,45. Nilai R_f tersebut menunjukkan bahwa senyawa yang didapat (diduga alkaloid) memiliki kepolaran yang berbeda dengan eluen yang digunakan yaitu etil asetat yang bersifar semi polar. Dapat disimpulkan bahwa alkaloid bersifat lebih polar daripada etil asetat (Alen et al., 2017). Pada gambar dapat dilihat, ketika plat diletakkan dibawah sinar UV 254 nm terdapat bercak berwarna gelap dan ketika dibawah sinar UV 366 nm terdapat bercak berwarna biru. Bercak tersebut diduga merupakan senyawa alkaloid karena Berdasarkan Harborne (1987), nilai R_f kisaran 12 alkaloid yang paling umum yaitu 0,07–0,62.

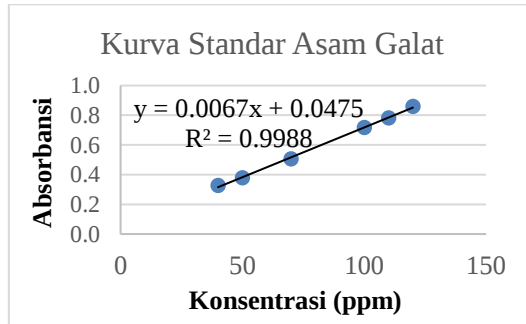
Selain itu, warna bercak alkaloid yang dihasilkan pada sinar UV 254 dan 366 nm juga sama seperti penelitian Verawati et al., 2017.

VI.9 Analisis Fenol Total

Analisis fenol total dilakukan untuk melihat kadar fenol pada fraksi polar buah ranti hitam sebelum dan setelah difermentasi. Fenol dianalisis menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. Prinsip dari metode Folin-Ciocalteu adalah pada panjang gelombang 765 nm akan terbentuk senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur. Senyawa kompleks (molibdenum-tungsten) berwarna biru karena adanya gugus fenolik-hidroksi yang mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) pada pereaksi Folin-Ciocalteu. Agar disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat dapat terjadi, maka senyawa fenolik yang bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu harus dalam keadaan basa. Na_2CO_3 1 M digunakan untuk membuat suasana menjadi basa. Alat spektrofotometer dapat mendeteksi kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru, dimana semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli menjadi kompleks molibdenum-tungsten akan semakin banyak dan membuat warna biru yang dihasilkan semakin pekat (Alfian & Susanti, 2012).

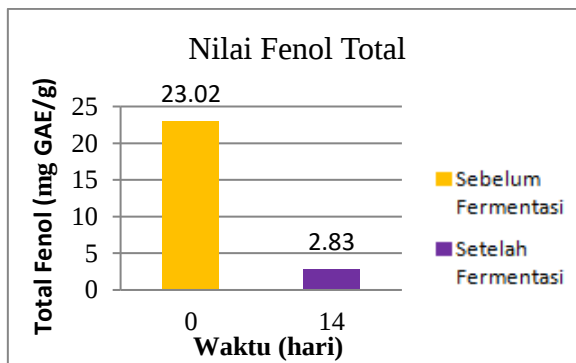
Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar fenol total karena fenol merupakan salah satu senyawa yang diketahui memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker (Deghrigue et al., 2013). Hasil senyawa total fenolik dinyatakan dalam ekuivalen asam galat atau *Gallic Acid Equivalent* (GAE). Asam galat adalah acuan umum yang sering digunakan untuk mengukur senyawa fenolik yang terkandung

dalam suatu sampel karena merupakan salah satu fenol alami dan stabil (Ahmad et al., 2015). Hasil absorbansi standar asam galat dapat dilihat pada lampiran 7.



Gambar VI. 3 Kurva Standar Asam Galat

Dari hasil pengukuran, persamaan regresi linier yang didapat adalah $y = 0,0067x + 0,0475$ dengan nilai $R^2 = 0,9988$. Setelah dilakukan perhitungan, didapatkan nilai fenol total fraksi polar buah ranti hitam sebelum fermentasi dengan konsentrasi 2000 ppm adalah sebesar 23,02 mg GAE/g sampel dan setelah fermentasi dengan konsentrasi 10.000 ppm adalah sebesar 2,83 mg GAE/g sampel. Hasil perhitungan analisis fenol total dapat dilihat pada lampiran 8.

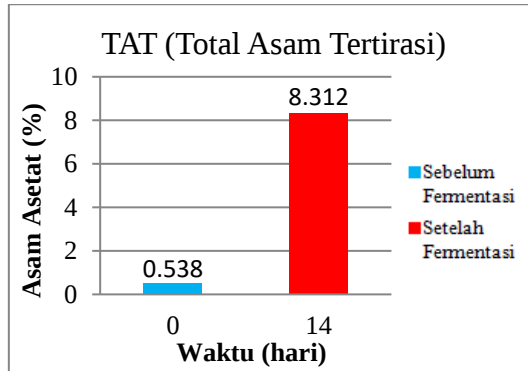


Gambar VI. 4 Pengukuran Nilai Senyawa Fenolik Sebelum dan Setelah Fermentasi

Dari grafik dapat dilihat bahwa terjadi penurunan kandungan senyawa fenol total sebelum dan setelah fermentasi sebesar $\pm 88\%$. Penurunan tersebut diduga disebabkan karena suasana yang terlalu asam pada saat proses fermentasi membuat senyawa fenolik tidak terbentuk (Shahidi & Naczki, 2006). Fenol terbentuk sebagai akibat dari dekarboksilasi asam sinamat dan asam ferulat oleh enzim *vinyl phenol reductase* dengan bantuan enzim *ferulic acid reductase* (Suhardini & Zubaidah 2016; Hassmy & Abidjulu 2017). Asam hidroksi sinamat dan asam ferulat yang dihasilkan oleh SCOBY memerlukan kondisi asam yang sedang dengan nilai pH 4-5 dalam membentuk senyawa fenolik. Sedangkan pH pada fermentasi ini adalah 3,28 yang merupakan pH yang tidak sesuai untuk pembentukan fenol (Shahidi & Naczki, 2006).

VI.10 Analisis Total Asam Titrasi

Untuk mengetahui keberhasilan proses fermentasi dilakukan analisis total asam titrasi. Keberhasilan proses fermentasi dapat dilihat dengan adanya peningkatan persen Total Asam Titrasi (TAT). Analisis TAT merupakan suatu analisis untuk mengukur jumlah asam yang terkandung pada suatu larutan dan mengacu pada persentase asam asetat yang dihasilkan oleh bakteri asam asetat selama proses fermentasi (Galih dan Karina, 2015). Analisis dilakukan pada fraksi polar buah ranti hitam sebelum dan setelah fermentasi. Dalam perhitungan TAT ini digunakan metode titrasi asam basa atau tirasi netralisasi.



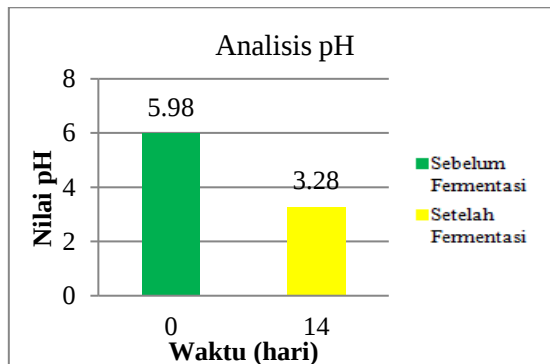
Gambar VI. 5 Pengukuran Nilai Total Asam Tertitrasi Sebelum dan Setelah Fermentasi

Kadar total asam fraksi polar buah ranti hitam sebelum fermentasi adalah sebesar 0,54% dan setelah fermentasi sebesar 8,31%. Hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi peningkatan total asam setelah dilakukan proses fermentasi sebesar $\pm 94\%$. Pada penelitian sebelumnya, kandungan total asam tertitrasi didalam fraksi buah ranti hitam yang difermentasi menggunakan sari buah dan SCOBY kombucha didapat sebesar 0,47% (Nawangwulan, 2018). Peningkatan TAT pada saat proses fermentasi merupakan hasil akumulasi berbagai asam organik seperti asam asetat, glukonat, glukoronat, malat, malonat, piruvat, dan usnat. Asam asetat merupakan asam yang paling dominan pada proses fermentasi. Asam ini dibentuk melalui reaksi oksidasi alkohol oleh bakteri asam asetat (*A. xilynum*). Pada awal fermentasi terjadi hidrolisis enzimatik sukrosa sehingga menghasilkan etanol dan karbon dioksida oleh jamur. Kemudian bakteri asam asetat mengubah etanol menjadi asam organik melalui proses oksidasi. Glukosa akan diubah menjadi asam glukonat dan fruktosa akan diubah menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat (Dufresne & Farnworth, 2000; Ardheniati & Amanto,

2009; Zubaidah et al., 2018). Hasil perhitungan analisis TAT dapat dilihat pada lampiran 9.

VI.11 Analisis pH

Nilai pH fraksi polar buah ranti hitam sebelum fermentasi sebesar 5,98 dan pH fraksi polar buah ranti hitam setelah fermentasi sebesar 3,28.



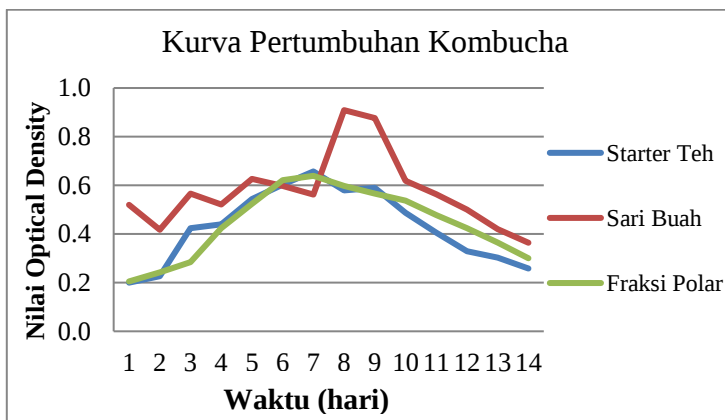
Gambar VI. 6 Pengukuran Nilai pH Sebelum dan Setelah Fermentasi

Fermentasi fraksi polar buah ranti hitam dapat dikatakan berhasil karena memenuhi rentang persyaratan pH fermentasi yaitu 2-4. Setelah fermentasi, terjadi penurunan pH sebesar $\pm 45\%$. Pada penelitian sebelumnya, nilai pH fraksi buah ranti hitam yang difermentasi menggunakan sari buah dan SCOBY kombucha didapat sebesar 3,34 (Nawangwulan, 2018). Penurunan pH tersebut dapat disebabkan karena jamur dan bakteri yang ada pada kombucha memetabolisme sukrosa menjadi asam organik seperti asam asetat dan asam glukonat (Júnior et al., 2009). Asam-asam yang dihasilkan saat proses fermentasi inilah yang membuat nilai pH semakin menurun, karena apabila kadar asam semakin tinggi maka pH akan

semakin menurun (Ardheniati & Amanto, 2009). pH merupakan konsentrasi suatu ion hidrogen yang ada dalam bentuk terdisosiasi, sedangkan total asam tertitrasi adalah jumlah total hidrogen baik dalam bentuk terdisosiasi maupun tidak terdisosiasi (Frobisher et al., 1974). Asam yang sangat berperan dalam penurunan pH adalah asam asetat dan asam piruvat (Yumas & Rosniati, 2014).

VI.12 Kurva Pertumbuhan Kombucha

Tujuan dari pembuatan kurva pertumbuhan kombucha ini adalah untuk mengetahui pola pertumbuhan kombucha pada starter teh, sari buah ranti hitam, dan pada fraksi polar buah ranti hitam. Metode yang digunakan adalah spektrofotometri. Sampel diukur dari hari ke-0 sampai hari ke-14 fermentasi. Hasil pengukuran berupa nilai Optical Density (OD) pada panjang gelombang (λ) 525 nm.



Gambar VI. 7 Grafik Kurva Pertumbuhan Kombucha Pada Starter Teh, Sari Buah, dan Fraksi Polar Buah Ranti Hitam

Dari kurva dapat dilihat pada pertumbuhan kombucha starter teh fase adaptasi terjadi pada hari ke-1 sampai hari ke-2. Fase adaptasi

digambarkan dengan adanya sedikit kenaikan garis kurva. Pada fase ini, ragi dan bakteri yang ada pada SCOBY mulai beradaptasi dengan lingkungan dan belum terjadi pertumbuhan (Azizah et al., 2012). Pada starter teh, fase adaptasi relatif singkat karena bakteri dan jamur pada kombucha beradaptasi dengan media aslinya yaitu media teh, jadi tidak membutuhkan waktu yang lama untuk beradaptasi kembali. Pertumbuhan kombucha pada sari buah memiliki fase adaptasi yang cukup lama, yaitu terjadi pada hari ke-1 sampai hari ke-7 fermentasi. Hal ini terjadi karena bakteri dan jamur pada kombucha membutuhkan waktu untuk beradaptasi dengan media baru, yaitu sari buah ranti hitam. Pertumbuhan kombucha pada fraksi polar buah ranti hitam mengalami fase adaptasi yang relatif singkat, yaitu 3 hari. Kombucha tidak membutuhkan waktu adaptasi lama, karena menggunakan media yang sama. Jumlah bakteri dan jamur yang diinokulasi, media, kondisi fisiologis dan morfologis dapat mempengaruhi lama atau singkatnya fase adaptasi (Sharah et al., 2015).

Fase eksponensial dapat digambarkan dengan peningkatan yang tajam pada garis kurva. Pada fase ini, ragi *S. cerevisiae* dan bakteri asam asetat mengalami pertumbuhan yang sangat cepat. Pemecahan gula secara besar-besaran untuk memenuhi kebutuhan pertumbuhan terjadi pada fase ini. Pada keadaan anaerob, *S. cerevisiae* akan menghasilkan alkohol dalam proses pemecahan gula. Alkohol paling tinggi kemungkinan dihasilkan pada fase ini (Azizah et al., 2012). Untuk membantu pertumbuhan sel, SCOBY akan menghasilkan produk metabolisme primer pada fase ini seperti asam-asam amino, protein, karbohidrat, dan lemak (Stanbury & Whitaker, 1984). Pada

starter teh, fase eksponensial terjadi dari hari ke-2 sampai hari ke-7. Pada sari buah terjadi pada hari ke-7 sampai hari ke-8 fermentasi, sedangkan pada fraksi polar buah ranti hitam terjadi pada hari ke-3 sampai hari ke-6 fermentasi. Masih banyaknya nutrisi yang tersimpan pada kombucha starter teh menyebabkan fase eksponensial yang lama karena sebelumnya kombucha tidak memerlukan waktu yang lama untuk adaptasi.

Pada starter teh, fase stasioner terjadi pada hari ke-7 sampai hari ke-9. Pada sari buah ranti hitam terjadi pada hari ke-8 sampai hari ke-9 dan pada fraksi polar buah ranti hitam terjadi pada hari ke-6 sampai hari ke-8 fermentasi. Fase stasioner dapat digambarkan dengan datarnya garis kurva yang berarti jumlah bakteri dan ragi yang hidup sebanding dengan jumlah yang mati. Metabolit sekunder dikeluarkan oleh bakteri pada fase ini dalam kondisi sel mengalami stress lingkungan karena kurangnya nutrisi dan akumulasi sampah metabolisme (Morison, 1988). Banyaknya metabolit sekunder dan mulai habisnya kandungan nutrisi mengakibatkan kompetisi nutrisi terjadi sehingga kematian sel terjadi dan yang lainnya tetap tumbuh yang akhirnya akan membuat jumlah sel menjadi relatif konstan (Azizah et al., 2012; Sulistijowati, 2012).

Fase selanjutnya adalah fase kematian yang digambarkan dengan garis kurva yang menurun. Jumlah ragi dan bakteri yang mati lebih banyak pada fase ini sampai akhirnya semua ragi dan bakteri mati. Pada fase ini, nutrisi yang terdapat pada media sudah habis dan menyebabkan bakteri tidak dapat bertumbuh lagi dan menyebabkan kematian (Azizah et al., 2012; Sulistijowati, 2012). Selain itu, berkurangnya beberapa nutrisi esensial dalam media dan terjadinya

akumulasi autotoksin dalam media atau kombinasi dari keduanya juga dapat menyebabkan kematian bakteri dan ragi (Setyati et al., 2015). Starter teh dan sari buah ranti hitam mengalami fase kematian pada hari ke-9 sampai hari ke-14, sedangkan pada fraksi polar buah ranti hitam fase kematiannya dimulai pada hari ke-8 sampai hari ke-14. Dapat dilihat pada grafik bahwa fase kematian ini terjadi lebih cepat daripada pada saat proses terbentuknya bakteri baru, sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga sampel memiliki laju kematian yang tinggi.

VI.13 Pemeliharaan Sel Uji MDA-MB 231

Pembuatan Media Kultur Lengkap (MK)

Kultur sel adalah suatu proses saat sel diambil dari jaringan dan ditumbuhkan dalam keadaan yang dapat dikontrol. Media kultur lengkap digunakan sebagai media untuk pertumbuhan dari sel MDA-MB 231, jadi kultur media tersebut harus mengandung campuran nutrisi, serum, hormon, dan antibiotik. Suatu sel tidak akan mampu hidup diluar sel inang tanpa ada media untuk sel bertumbuh. Media kultur lengkap yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari *Fetal Bovine Serume* (FBS) 10%, Penisilin–Streptomisin 1%, dan *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (CCRC, 2009).

Pada penelitian ini, FBS merupakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan sel MDA-MB 231 karena mengandung komponen penting untuk proliferasi dan pemeliharaan sel seperti hormon, vitamin, transpor protein, faktor penyebaran sel, dan faktor pertumbuhan sel. FBS sering digunakan sebagai sumber nutrisi

universal pada media kultur untuk sel manusia dan hewan karena kandungan imunoglobulin dan faktor komplemennya rendah (Bieback et al., 2017). Penisilin–Streptomisin 1% digunakan sebagai antibiotik untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Penggunaan sistem *Laminar air flow* (LAF) dengan pengerjaan dengan teknik aseptik belum cukup untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi pada sel. Penisilin–Streptomisin merupakan antibiotik spektrum luas sehingga mampu membunuh bakteri Gram-positif maupun Gram-negatif. RPMI merupakan media yang dikembangkan untuk kultur jangka panjang limfosit darah perifer. RPMI-1640 dapat mendukung pertumbuhan varietas sel yang luas pada suspensi seperti jumlah pertumbuhan sel pada monolayer. RPMI 1640 diformulasikan dengan menggunakan natrium bikarbonat (NaHCO_3), asam amino, dan vitamin. RPMI mendukung pertumbuhan berbagai jenis kultur sel karena merupakan sumber mineral, lipid, dan hormon yang mampu menunjang proliferasi sel (Sigma, 1976; Freshney, 2005).

Penumbuhan Sel (*Cell-Thawing*)

Tahapan ini merupakan proses untuk menumbuhkan atau mengaktifkan kembali sel yang telah lama disimpan dalam tangki nitrogen cair agar dapat digunakan untuk proses-proses pengujian. Tangki nitrogen cair digunakan untuk menyimpan sel-sel yang jarang digunakan. Tangki ini memiliki tekanan atmosfer normal dengan suhu -152°C sampai -200°C . Untuk kultur sel yang sering digunakan, dapat disimpan pada kulkas dengan suhu -80°C (selama 2-3 tahun) (CCRC, 2009).

Sebelum proses *thawing*, *flash* dan tabung sentrifuga yang akan digunakan harus di inkubasi terlebih dahulu dengan gas CO_2 5%

pada suhu 37°C. Proses ini bertujuan agar sel dapat beradaptasi kembali karena kondisi yang berbeda sebelum sel diaktifkan. Selain itu, media kultur lengkap harus diinkubasi juga dengan gas CO₂ 5% pada suhu 37°C untuk menjaga konsentrasi CO₂ yang dibutuhkan oleh sel. Penambahan CO₂ 5% juga diperlukan untuk mempertahankan keseimbangan pH kultur sel tetap ideal yaitu pada pH 7,4 sehingga CO₂ dapat berinteraksi dengan NaHCO₃ dari RPMI 1640. 5% CO₂ adalah jumlah CO₂ yang sesuai yang diperlukan sel untuk mengubah makanan yang berasal dari medium menjadi suatu energi agar pertumbuhan dan perkembangbiakan sel dapat terjadi (CCRC, 2009)

Sel yang dikeluarkan dari tangki nitrogen cair harus langsung dihangatkan pada *waterbath* suhu 37°C. Suhu ini dipilih karena merupakan suhu tubuh manusia atau dapat juga diatur lebih rendah untuk meminimalisir resiko kerusakan sel. Apabila sel sebelumnya mengandung Dimetil sulfoksida (DMSO) 10%, harus disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1500 *rpm*, lalu dibuang supernatannya dan ditambahkan media baru. Fungsinya adalah untuk mencuci sel dari DMSO, karena apabila nanti ketika sel yang masih mengandung DMSO 10% diinkubasi pada suhu 37°C DMSO akan bersifat toksik. DMSO 10% berfungsi sebagai zat pelindung sel secara biologi dari kerusakan selama pembekuan (CCRC, 2009).

Panen Sel

Apabila kultur sel yang telah membentuk kepadatan 80%, maka sel dapat digunakan untuk pengujian atau dilakukan subkultur. Kepadatan sel dapat diamati menggunakan mikroskop *inverted*. Setelah siap panen, media awal dibuang dan dicuci dengan *Phosfat*

Buffer Saline (PBS). Pencucian ini dilakukan untuk membersihkan sisa serum yang masih menempel pada sel dan untuk mengangkat sel-sel yang telah mati. Selain itu, PBS juga berfungsi untuk mempertahankan pH agar tetap stabil, pengatur tekanan osmosis dalam medium serta sebagai sumber ion inorganik. Selanjutnya ditambahkan tripsin-EDTA untuk melepaskan sel-sel yang masih menempel pada *flash* secara enzimatik. Tripsin merupakan suatu enzim protease yang dapat memotong matriks seluler pada sel yang menempel didinding *flash*. Selain itu, sisa tripsin yang masih tertinggal dalam suspensi sel juga dapat dinetralkan atau dinonaktifkan oleh *Fetal Bovine Serum* (FBS) yang terdapat didalam media RPMI 1640 karena mengandung antitrypsin (CCRC, 2009; Sitorus et al. 2013).

Perhitungan Sel

Dalam berbagai pelaksanaan prosedur, jumlah sel sangat perlu untuk diketahui karena berkaitan dengan kontrol kualitas dan evaluasi hasil penelitian seperti homogenitas dan reliabilitas. Sel yang akan dihitung harus terpisah dan tidak boleh bergerombol. Perhitungan jumlah sel dapat dilakukan dengan atau tanpa menggunakan *tryphan blue dye*. Perbedaanannya terletak pada penambahan pewarna *tryphan blue*. Sel mati yang integritas membrannya rusak akan menyerap warna *tryphan blue*, sedangkan sel yang masih hidup tidak menyerap pewarna, sehingga sel yang hidup akan tetap berwarna bening dan sel yang mati akan berwarna biru. Pada penelitian ini digunakan metode menggunakan *trypan blue dye* (CCRC, 2009).

Setelah dihitung, didapatkan jumlah sel sebanyak $29,5 \times 10^4$ sel/mL yang nantinya akan digunakan untuk 3 *wellplate*. Pada penelitian ini,

waktu inkubasi yang digunakan adalah 72 jam, sehingga dalam setiap sumuran sel yg diisikan sebesar 10.000 sel. Hasil perhitungan menunjukkan, jumlah suspensi sel yang dibutuhkan adalah sebanyak 9450 μL / 3 *wellplate* dan jumlah medium atau media komplet yang dibutuhkan sebanyak 47.550 μL / 3 *plate*. Hasil perhitungan sel dapat dilihat pada lampiran 10.

Subkultur Sel

Subkultur adalah kegiatan memperbanyak atau mengkultur sel dari sel yang sebelumnya tumbuh pada wadah kultur yang sudah hampir penuh, yaitu apabila kepadatan pertumbuhan sel sudah mencapai 70–80%. Selain itu, subkultur perlu dilakukan untuk mempertahankan kecepatan tumbuh sel karena pada media yang lama, sel tidak mendapatkan cukup nutrisi lagi untuk bertumbuh secara optimal (CCRC, 2009).

Pembuatan Larutan Uji

Pada penelitian ini, sampel dibuat menjadi 8 seri konsentrasi. Sampel yang diuji harus terlarut sempurna sehingga ditambahkan pelarut DMSO untuk menambah kelarutan. DMSO yang digunakan harus kurang dari 2% karena dengan konsentrasi lebih tinggi DMSO dapat bersifat toksik dan merusak sel-sel yang ada. Perhitungan pembuatan larutan uji dapat dilihat dilampiran 11.

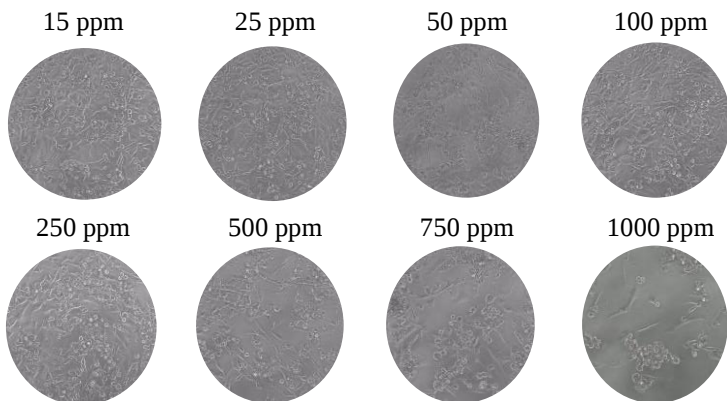
VI.14 Uji Sitotoksik dengan Metode MTT

Uji Aktivitas Sitotoksik

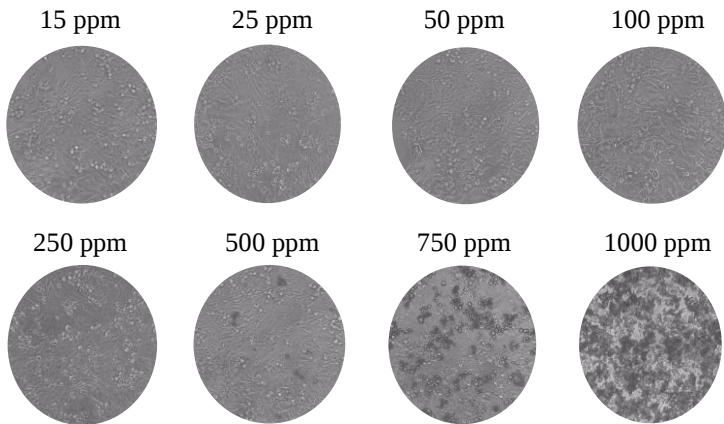
Sel yang sudah ditanam dan diberi perlakuan, kemudian diinkubasi di inkubator CO_2 selama 72 jam pada suhu 37°C . Waktu 72 jam inkubasi ini dipilih dengan harapan untuk mendapat hasil efek yang

optimal. Pengujian MTT adalah pengujian suatu metabolik sel yang interpretasinya berdasarkan perubahan reaksi warna (kolorimetrik). Prinsip metode MTT yaitu enzim suksinat dehidrogenase mereduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air akan terbentuk. Setelah warna formazan ungu terbentuk, ditambahkan *reagen stopper* berupa DMSO agar reaksi MTT berhenti dan juga untuk melarutkan kristal formazan yang tidak larut air. Data yang diukur berupa absorbansi sel. Pengukuran menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang (λ) 550 nm. Jumlah sel hidup yang terbentuk proporsional dengan intensitas warna ungu yang terlihat. Jadi dapat disimpulkan bahwa, semakin besar intensitas warna ungu yang terbentuk maka semakin banyak jumlah sel yang hidup, begitu pula sebaliknya (CCRC, 2009). Hasil absorbansi pembacaan ELISA *reader* dapat dilihat pada lampiran 13.

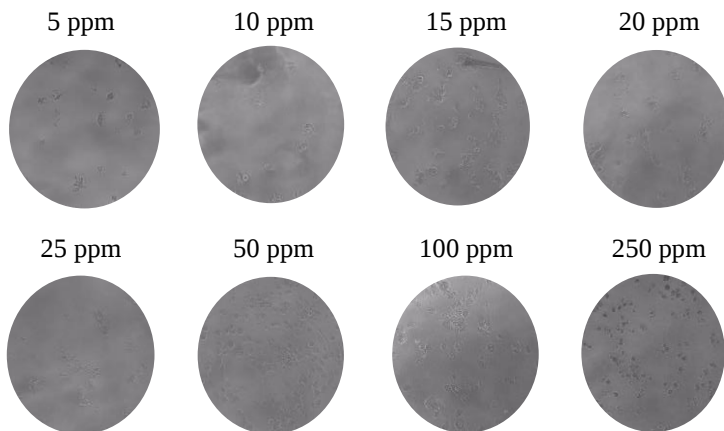
Gambar VI. 8 Tampak Visual Sel Setelah Diberi Perlakuan Fraksi Polar Buah Ranti Hitam



Gambar VI.9 Tampak Visual Sel Setelah Diberi Perlakuan Fraksi Polar Buah Ranti Hitam Hasil Fermentasi

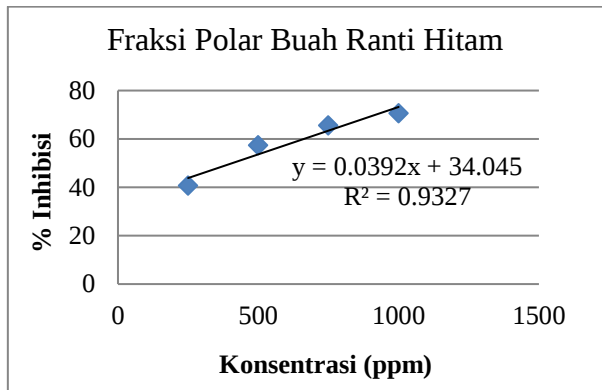


Gambar VI. 10 Tampak Visual Sel Setelah Diberi Perlakuan Kontrol Positif Doxorubicin



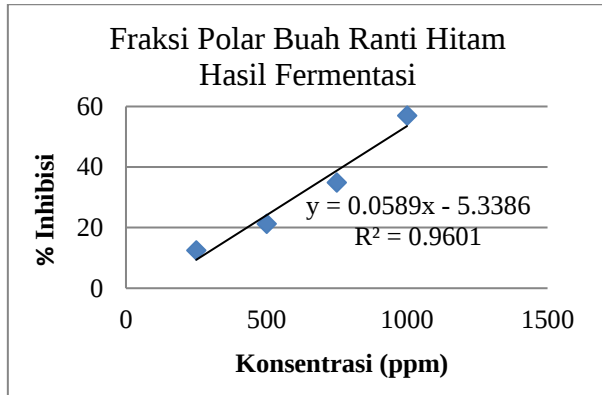
Pengolahan dan Analisis Data

Nilai absorbansi yang diperoleh dari ELISA *reader* kemudian diolah hingga didapat nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} adalah konsentrasi sampel uji yang memberikan hambatan pada 50% subyek uji. Dalam hal ini berarti penghambatan terhadap 50% pertumbuhan sel kanker payudara MDA-MB 231.



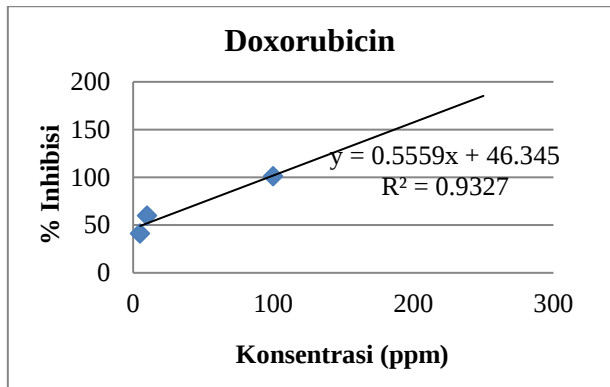
Gambar VI. 11 Hasil Kurva Regresi Linier Fraksi Polar Buah Ranti Hitam

Pada hasil uji sitotoksik fraksi polar buah ranti hitam sebelum fermentasi didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0392x + 34,045$ dengan nilai $R^2 = 0,9327$. Setelah dimasukkan nilai $y = 50$, didapatkan nilai x atau IC_{50} sebesar 407,02 ppm. Berdasarkan tabel tingkat nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) dapat disimpulkan bahwa fraksi polar buah ranti hitam bersifat toksik lemah.



Gambar VI. 12 Hasil Kurva Regresi Linier Fraksi Polar Buah Ranti Hitam Hasil Fermentasi

Pada hasil uji sitotoksik fraksi polar buah ranti hitam hasil fermentasi didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0589x - 5,3386$ dengan nilai $R^2 = 0,9601$. Setelah dimasukkan nilai $y = 50$, didapatkan nilai x atau IC_{50} sebesar 939,53 ppm. Berdasarkan tabel tingkat nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) dapat disimpulkan bahwa fraksi polar buah ranti hitam tidak memiliki aktivitas sitotoksik. Hal ini diduga disebabkan karena proses fermentasi kurang optimal. Selain itu, penggunaan media penumbuhan SCOBY kombucha yang berbeda dapat menyebabkan SCOBY harus beradaptasi lebih lama dibanding media aslinya, yakni teh. Penambahan nutrisi yang kurang pada proses fermentasi dapat menyebabkan SCOBY kombucha mengalami fase stasioner yang sangat sebentar (dapat dilihat pada kurva pertumbuhan kombucha fraksi polar). Hal tersebut dikarenakan SCOBY kombucha membutuhkan banyak energi untuk menghasilkan senyawa-senyawa organik lain pada fase eksponensial. Sehingga akhirnya energi untuk yang digunakan mencapai fase stasioner telah habis.



Gambar VI. 13 Hasil Kurva Regresi Linier Kontrol Positif
Doxorubicin

Pada hasil uji sitotoksik doxorubicin sebagai kontrol positif didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,5559x + 46,345$ dengan nilai $R^2 = 0,9327$. Setelah dimasukkan nilai $y = 50$, didapatkan nilai x atau IC_{50} sebesar 6,57 ppm. Berdasarkan tabel tingkat nilai *Inhibitory Consentration* (IC_{50}) dapat disimpulkan bahwa doxorubicin memiliki aktivitas sitotoksik yang bersifat sangat aktif.