

BAB VI

HASIL DAN PEMBAHASAN

VI.1 Penyiapan bahan

Pengumpulan bahan dilakukan untuk mendapatkan sampel yang diinginkan. Rimpang kecombrang yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang. Pengumpulan bahan dilakukan dari satu tempat atau daerah agar kandungan kimianya konsisten, untuk menghindari variabel kandungan kimia yang terlalu besar sebab berbeda daerah dapat berbeda kandungan kimianya.

Determinasi tumbuhan bertujuan untuk memastikan kebenaran tumbuhan yang akan digunakan dalam penelitian. Determinasi tumbuhan perlu dilakukan untuk menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan sampel. Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Dari hasil determinasi yang dilakukan menunjukkan bahwa tumbuhan yang akan diteliti merupakan tumbuhan *Etlingera elatior* atau dikenal sebagai Kecombrang. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

Rimpang kecombrang yang telah dikumpulkan disortasi basah untuk membersihkan dari tanah, kerikil ataupun benda asing yang terbawa pada saat pengumpulan bahan, kemudian dicuci bersih dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada kecombrang dan ditiriskan sampai airnya hilang. Rimpang kecombrang kemudian dirajang dan dikeringkan dengan

menggunakan oven dengan suhu 40°C. Tujuan pengeringan untuk mengurangi kadar air dan mencegah timbulnya kerusakan akibat reaksi enzimatis dan pertumbuhan mikroba yang mungkin terjadi bila kandungan air dalam sampel tinggi. Pengeringan juga dapat mempermudah saat diserbuk, selain itu diharapkan dengan pengeringan sampel dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama apabila tidak segera digunakan.

Rimpang kecombrang yang telah dikeringkan dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bahan organik asing yang kemungkinan timbul saat proses pengeringan kemudian simplisia yang telah kering ditimbang. Simplisia selanjutnya diserbuk dengan menggunakan alat blender. Tujuan diserbuk adalah untuk meningkatkan luas permukaan simplisia sehingga luas kontak dengan cairan penyari akan semakin besar sehingga dapat mempengaruhi proses ekstraksi. Ukuran serbuk yang optimal akan memberikan hasil ekstraksi yang baik. Kemudian serbuk simplisia rimpang kecombrang disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

Tabel VI.1 Hasil Rendemen Simplisia

Tanaman	Bobot simplisia basah	Bobot simplisia kering	Rendemen simplisia %
Rimpang	14,91 kg	1,050 g	7,04 g

$$\text{Keterangan : \% rendemen} = \frac{\text{Bobot simplisia kering}}{\text{Bobot simplisia basah}} \times 100$$

VI.2 Karakterisasi Simplisia

Pemeriksaan karakterisasi serbuk simplisia rimpang kecombrang (*Etlingera elatior*) meliputi penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar air dan penetapan susut pengeringan. Setiap pemeriksaan tersebut memiliki persyaratan yang harus dipenuhi untuk dapat menjamin mutu simplisia sehingga akan diperoleh bahan baku simplisia yang seragam yang pada akhirnya dapat menjamin efek farmakologi tanaman tersebut. Hasil karakterisasi dapat dilihat pada tabel VI.2.

Tabel VI.2
Hasil Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia
Rimpang Kecombrang

Pemeriksaan	Hasil (% b/b)
Kadar abu total	8,18 %
Kadar abu tidak larut asam	4,35 %
Kadar abu larut air	5,1 %
Kadar sari larut air	8,22 %
Kadar sari larut etanol	5,44 %
Susut pengeringan	11,14 %

Abu adalah zat anorganik sisa pembakaran dari senyawa organik. Pengabuan dianggap selesai apabila diperoleh sisa pembakaran yang umumnya berwarna putih abu-abu dan beratnya konstan (Sudarmadji, 2003). Penentuan kadar abu berkaitan dengan

kandungan mineral yang terdapat dalam suatu bahan, kemurnian, serta kebersihan suatu bahan yang di hasilkan. Jika semakin tinggi kadar abu suatu bahan, maka semakin buruk kualitas dari bahan tersebut. Hasil pemeriksaan kadar abu total pada simplisia rimpang kecombrang didapatkan hasil 8,18 %.

Pemeriksaan kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk menunjukkan zat anorganik khususnya kandungan seperti pasir, silika, lumpur, dan lain sebagainya (Marliani, 2011). Adanya kandungan abu yang tidak larut dalam asam yang cukup tinggi menunjukkan adanya pasir atau kotoran lain (Irawati, 2008). Hasil pengujian kadar abu tidak larut asam simplisia rimpang kecombrang adalah 4,35 %. Selain pemeriksaan kadar abu tidak larut asam juga dilakukan pemeriksaan kadar abu larut air untuk mengetahui jumlah kandungan mineral yang berasal dari tanaman (internal), didapatkan hasil sebesar 5,1 %.

Penetapan kadar sari adalah metode kuantitatif untuk jumlah kandungan senyawa dalam simplisia yang dapat tersari dalam pelarut tertentu. Penetapan ini dapat dilakukan dengan dua cara yaitu kadar sari yang larut dalam air dan kadar sari yang larut dalam etanol. Kedua cara ini didasarkan pada kelarutan senyawa yang terkandung dalam simplisia. Hasil kadar sari larut air sebesar 8,22 %, sedangkan untuk kadar sari larut etanol didapatkan hasil sebesar 5,44 %. Dari hasil yang didapatkan menunjukan bahwa kandungan senyawa lebih banyak yang terlarut dalam air dibandingkan dengan yang larut dalam etanol.

Karakteristik simplisia yang terakhir adalah susut pengeringan. Tujuan dari susut pengeringan adalah untuk memberikan batas maksimal (rentang) besarnya senyawa yang hilang selama proses pengeringan. Nilai atau rentang yang diperbolehkan terkait dengan kemurnian dan kontaminasi. Hasil yang didapatkan adalah 11,14 %.

VI.3 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia merupakan tahap awal atau pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan simplisia yang terdiri dari alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid yang dilakukan secara kualitatif dengan melihat adanya reaksi warna dengan menggunakan suatu pereaksi. Hasil penapisan rimpang kecombrang ditunjukkan pada tabel VI.3.

Tabel VI.3 Hasil Skrining Fitokimia Rimpang Kecombrang

Pengujian	Hasil
Alkaloid	-
Flavonoid	+
Tanin	+
Saponin	-
Steroid/triterpenoid	+
Kuinon	+

Keterangan : (+) = Mengandung senyawa yang diuji

(-) = Tidak mengandung senyawa yang diuji

Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang terdapat pada Tabel VI.5 diketahui bahwa tanaman rimpang kecombrang mengandung senyawa flavonoid, tanin, steroid/triterpenoid dan kuinon.

VI.4 Ekstraksi

Serbuk rimpang kecombrang seberat 500 gram dimaserasi dengan etanol 70%. Pertimbangan dari penggunaan pelarut etanol karena etanol merupakan pelarut universal sehingga hampir semua kandungan kimia dapat terambil.

Penyarian simplisia rimpang kecombrang menggunakan metode maserasi karena metode ini memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode lain. Selain itu metode maserasi tidak menggunakan pemanasan sehingga rusaknya senyawa-senyawa yang tidak tahan panas tinggi dapat dihindari. Maserasi dilakukan dalam bejana tertutup rapat agar etanol tidak menguap karena etanol mudah menguap pada suhu kamar.

Pada proses maserasi, serbuk rimpang kecombrang direndam sebanyak 3 kali, masing-masing selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Pengadukan bertujuan agar pelarut dapat mengalir secara berulang terhadap serbuk halus sehingga memungkinkan adanya interaksi antara pelarut dan serbuk. Hasil ekstraksi kemudian disaring menggunakan kain saring, filtrat yang diperoleh dilakukan penguapan dengan menggunakan *rotary vaporator* pada suhu 40°C yang kemudian penguapan dilanjutkan dengan penangas air hingga didapatkan ekstrak kental. Hasil rendemen ekstrak rimpang kecombrang dapat dilihat pada tabel VI.4.

Tabel VI.4 Rendemen Ekstrak Rimpang Kecombrang

Tanaman	Bobot simplisia	Bobot ekstrak	Rendemen ekstrak (%)
Rimpang	500 gram	57,17 gram	11,43 %

Keterangan : % rendemen = $\frac{\text{ekstrak kental}}{\text{berat simplisia}} \times 100$

VI.5 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan teknik pemisahan senyawa yang dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolaran yaitu dari non polar, semi polar dan polar. Senyawa yang memiliki sifat non polar akan larut dalam pelarut non polar, yang semi polar akan larut dalam, pelarut semi polar dan yang bersifat polar akan larut kedalam pelarut polar (Harborne, 1987).

Fraksinasi dilakukan dengan metode Ekstraksi Cair-Cair (ECC) berdasarkan pada perbedaan kelarutan komponen dua pelarut yang tidak saling bercampur. Alat yang digunakan yaitu corong pisah. Prinsip fraksinasi menggunakan pelarut didasarkan pada distribusi zat terlarut dan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur (Harbone, 2006).

Sebanyak 50 gram ekstrak kental rimpang kecombrang dimasukkan ke dalam corong pisah dan dicampur dengan pelarut metanol : air (8:2), n-heksana dan etil asetat. Fraksinasi rimpang kecombrang dilakukan sebanyak 3 kali pada masing-masing pelarut. Senyawa yang terkandung didalam ekstrak nantinya akan terpisah sesuai dengan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan.

Hasil fraksinasi yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary vaporator* pada suhu 40°C, yang kemudian dilanjutkan dengan penangas air hingga didapatkan fraksi kental. Hasil rendemen fraksi dapat dilihat pada tabel VI.5.

Tabel VI.5 Rendemen Fraksi Rimpang Kecombrang

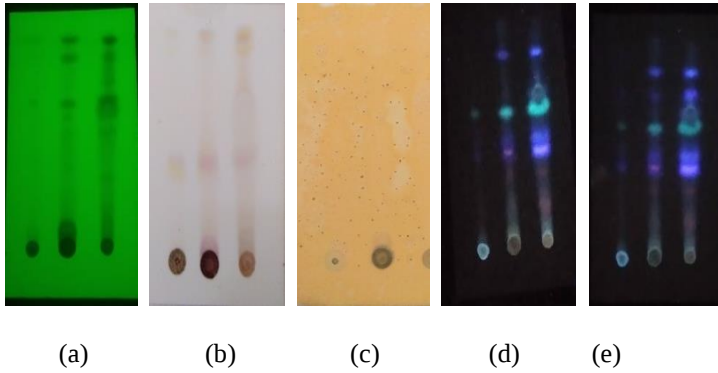
Fraksi	Bobot ekstrak	Bobot fraksi	Rendemen fraksi (%)
Metanol : air	50 g	26,8911	53,7822 %
n-heksana		1,1197	2,2394 %
Etil asetat		1,4014	2,8028 %

Keterangan : % rendemen = $\frac{\text{berat fraksi kental}}{\text{berat ekstrak}} \times 100$

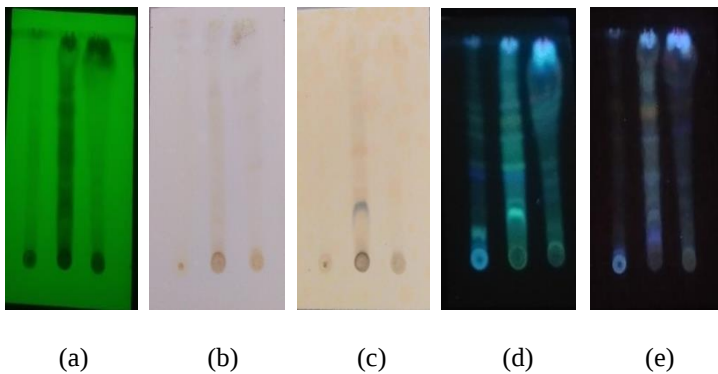
VI.6 Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Prinsip KLT adalah pemisahan komponen berdasarkan distribusinya pada fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄ dan fase gerak n-heksana:etil asetat (8:2); kloroform : metanol (9:1) dan BAW (n-butanol:asam asetat:air) (4:1:5). Penampak bercak yang digunakan yaitu H₂SO₄ 10%, FeCl₃10%, AlCl₃ 5% dan Sitroborat.

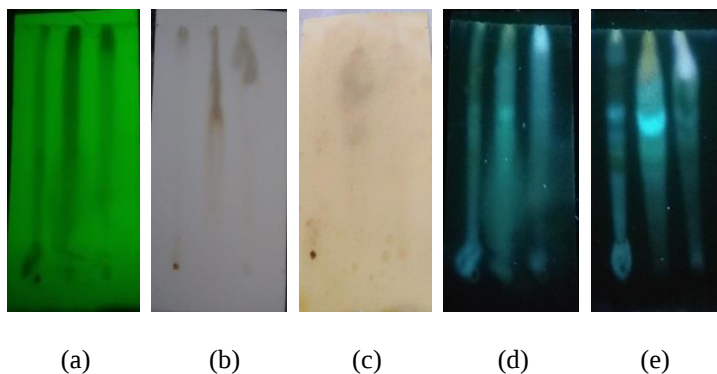
Hasil pemantauan dapat dilihat pada Gambar VI.1, Gambar VI.2, Gambar VI.3.



Gambar VI.1 Profil Kromatografi ekstrak rimpang (1), fraksi etil asetat (2) dan fraksi n-heksan (3) dengan fase gerak : Non polar n-Heksan : Etil Asetat (8:2).



Gambar VI.2 Profil Kromatografi ekstrak rimpang (1), fraksi etil asetat (2) dan fraksi n-heksan (3) dengan fase gerak semi polar Kloroform : Metanol (9:1)



Gambar VI.3 Profil Kromatografi ekstrak rimpang (1), fraksi etil asetat (2) dan fraksi n-heksan (3) dengan fase gerak polar BAW (4:1:5)

Keterangan: Kromatogram lapis tipis ekstrak dan fraksi (1) ekstrak rimpang, (2) fraksi etil asetat (3) fraksi n-heksan. (a) sinar UV 254 nm, (b) penampak bercak H_2SO_4 10%, (c) penampak bercak FeCl_3 10%, (d) penampak bercak AlCl_3 5% sinar UV 365 nm, (e) penampak bercak sitroborat sinar UV 365 nm.

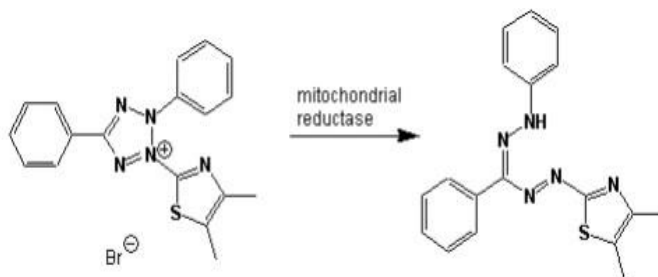
Hasil pemantauan ekstrak dan fraksi rimpang kecombrang dengan fase gerak non polar, semi polar dan polar disempatkan dengan beberapa penampak bercak. Penampak bercak H_2SO_4 10% merupakan penampak bercak universal yang menunjukkan adanya senyawa pada bahan uji. Penampak bercak FeCl_3 10% menunjukkan adanya senyawa fenol yang dapat dilihat dengan adanya bercak warna biru kehitaman dengan latar kuning. Penampak bercak AlCl_3 5% dan sitroborat menunjukkan adanya senyawa flavonoid dengan adanya bercak berfluoresensi kuning kehijauan saat dilihat dibawah

sinar UV 365 nm.

VI.7 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksitas adalah prosedur *screening standart* untuk menilai sitotoksitas suatu bahan obat. Salah satu metode uji sitotoksitas yang sering digunakan yaitu dengan uji enzimatik menggunakan pereaksi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Prinsip pengujian MTT adalah enzim reduktase mereduksi garam kuning tetrazolium sehingga menjadi senyawa suksinat tetrazolium yang masuk ke dalam mitokondria sel sehingga membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air (Arifianti dkk, 2014).

Reaksi reduksi MTT oleh enzim suksinat dehidrogenase dapat dijabarkan dengan gambar berikut



Gambar VI.4 Reaksi reduksi MTT

Tahap pertama yang dilakukan adalah proses *Cell Thawing*. *Cell Thawing* adalah pengaktifan kembali sel dari pengawetan beku (*cryopreservation*) untuk dapat dikembangkan dan digunakan dalam pengujian *in vitro*. *Cryopreservation* adalah proses pengawetan sel

dengan dibekukan pada nitrogen cair dalam tekanan atmosfer normal bersuhu -152 hingga -200°C dalam waktu penyimpanan yang lama atau disimpan dalam suhu -80°C untuk penyimpanan selama hingga 2-3 tahun. Sebagai *cyroprotectant* dapat digunakan DMSO atau gliserol. Konsentrasi DMSO yang digunakan adalah 7,5-10%. *Cyroprotectant* harus dihilangkan secepat mungkin setelah *thawing*, karena mengandung DMSO dengan konsentrasi cukup tinggi yaitu 10% yang bersifat toksik pada suhu kamar (Freshney, 2010).

Pada metode ini digunakan medium kultur komplit RPMI. Media RPMI berisi FBS (*Fetal Bovine Serum*) dan ditambahkan antibiotik penisilin streptomisin. FBS berfungsi sebagai nutrisi untuk kelangsungan hidup sel. FBS merupakan serum yang sering digunakan karena mengandung banyak faktor pertumbuhan, melindungi sel dan memberi nutrisi.

Setelah proses *Thawing*, sel perlu dipertahankan pada kecepatan yang optimal dengan melakukan subkultur. Subkultur adalah tindakan mengkultur sel dari sel yang tumbuh pada wadah kultur yang telah hampir penuh (*confluence*). Pada tahap subkultur reagen yang digunakan adalah PBS dan Tripsin/EDTA. PBS ini berfungsi sebagai larutan pencuci sel untuk menghilangkan sisa serum yang masih menempel pada sel serta mengangkat sel-sel yang telah mati. Tripsin/EDTA digunakan untuk melepaskan sel yang melekat pada dinding *culture flask*. Penambahan tripsin dilakukan dengan cara hangat, yaitu larutan tripsin dihangatkan terlebih dahulu hingga suhu 37°C. Proses ini bertujuan agar penguraian sel dilakukan dalam waktu singkat dan mendapatkan hasil yang optimal. Setelah sel

terlepas dari *culture flask* ditambahkan media RPMI yang bertujuan untuk menetralkan kerja tripsin.

Perhitungan jumlah sel dapat dilakukan dengan teknik otomatis menggunakan mesin penghitung atau menggunakan plat *haemocytometer* dibawah mikroskop cahaya. Perhitungan distribusi sel menggunakan *haemocytometer*. *Haemocytometer* terdiri dari kamar hitung, kaca penutup dan dua macam pipet (Depkes, 1089). Sel yang dihitung merupakan sel hidup, dimana sebelumnya telah dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *tripan blue* untuk membedakan antara sel yang hidup dan yang mati.

Pada uji sitotoksik sel MCF-7 ditanam pada *microplate* 96 well dan diinkubasi selama minimal 24 jam. Inkubasi bertujuan agar sel pulih kembali setelah panen dan sel mencapai fase logaritmik ditandai dengan keadaan sel yang konfluen 80% menutupi permukaan wadah medium (CCRC, 2008). Pengujian menggunakan larutan MTT dengan memasukan larutan kedalam setiap sumuran lalu diinkubasi selama 4 jam, pada saat inkubasi MTT yang berwarna kuning akan dimetabolisme oleh enzim *suksinat dehidrogenase* yang terdapat didalam mitokondria sel menjadi kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Formazan harus dilarutkan sebelum pembacaan absorbansi, untuk melarutkan formazan ditambahkan reagen stopper. Larutan DMSO sebagai reagen stopper. Reagen stopper tersebut akan melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein. Selanjutnya ditetapkan absorbansinya dengan pembacaan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550-600 nm. Intensitas warna yang terbentuk berbanding langsung dengan jumlah sel yang aktif

melakukan metabolisme (CCRC, 2008). Semakin banyak sel yang mati maka semakin kecil absorbansi dan semakin berkurang warna ungu yang terbentuk. Maka semakin rendah absorbansi maka semakin toksik zat tersebut terhadap sel kanker payudara MCF-7.

Hasil uji sitotoksisitas berupa data absorbansi yang kemudian dikonversi menjadi sel hidup kemudian nilai IC_{50} dihitung. Nilai IC_{50} merupakan gambaran efek sitotoksik senyawa yang diberikan senyawa uji, yaitu kadar yang dapat menghambat proliferasi sebesar 50% (Fitria et al., 2011). Data nilai IC_{50} dapat dilihat pada tabel VI.6

Tabel VI.6 Data nilai IC_{50} Rimpang Kecombrang terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

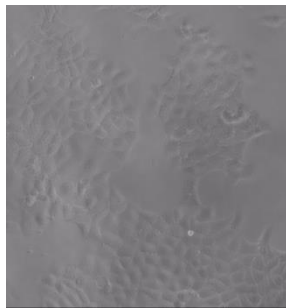
Nama	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ekstrak Etanol	298,62
Fraksi N-Heksan	230,24
Fraksi Etil Asetat	296,41

Berdasarkan Tabel VI.6 diatas diperoleh nilai IC_{50} pada ekstrak etanol sebesar 298,62 $\mu\text{g/ml}$, fraksi n-heksan sebesar 230,24 $\mu\text{g/ml}$ dan fraksi etil asetat sebesar 296,41 $\mu\text{g/ml}$. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksan memiliki nilai IC_{50} yang paling kecil diantara yang lainnya, dimana semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin toksik senyawa tersebut. Dengan demikian fraksi n-heksan mempunyai aktivitas sitotoksik lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat.

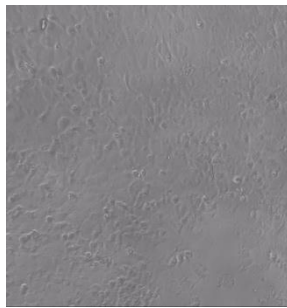
VI.8 Antiproliferasi

Cell cycle progression merupakan parameter utama dalam mengukur sifat proliferaatif suatu sel kanker. Penghambatan *cell cycle progression* dilakukan dengan uji *doubling time* dengan menggunakan metode MTT.

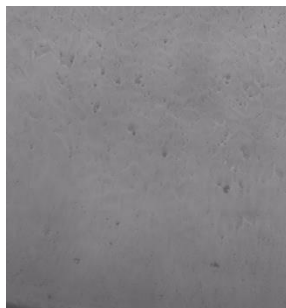
Morfologi sel MCF-7 pada kontrol dan perlakuan senyawa uji menggunakan seri kadar 50 $\mu\text{g/ml}$ yang ditentukan dari IC_{50} pada uji sitotoksik, dengan pertimbangan adar sel dapat diamati karena sel tidak terlalu banyak yang mati. Morfologi sel MCF-7 dapat dilihat pada gambar VI.5.



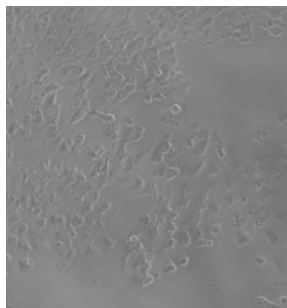
(a)



(b)



(c)



(d)

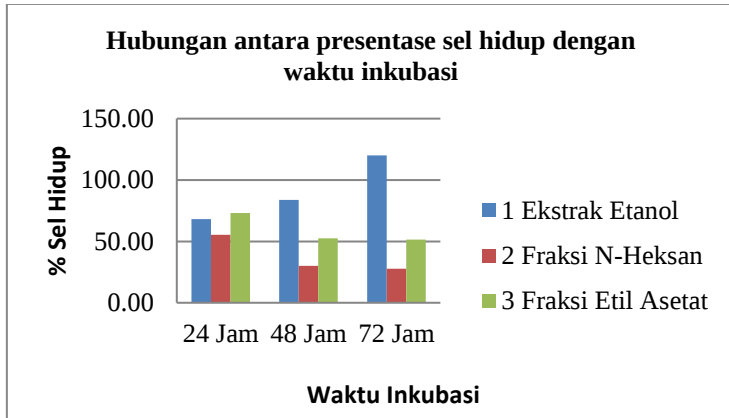
Gambar VI.5 Morfologi sel kanker payudara MCF-7. Kontrol sel (a); Ekstrak 50 µg/ml (b); Fraksi etil asetat 50 µg/ml (c); dan Fraksi n-heksan 50 µg/ml (d)

Dari gambar diatas dapat dilihat pada sel yang hidup terlihat cerah, berbentuk bulat, bergerombol dan menempel didasar sumuran sedangkan sel yang mati akan berbentuk tidak bulat lagi dan berwarna gelap.

Sebelum dilakukan perhitungan *doubling time*, data jumlah sel yang hidup pada jam 24, 48 dan 72 dibuat grafik antara jumlah sel yang hidup dan lama waktu inkubasi (jam). Potensi antiproliferasi dianalisis melalui pertumbuhan sel dalam kelipatan waktu inkubasi (*doubling time*). Semakin berkurangnya jumlah sel hidup dalam kelipatan waktu inkubasi menunjukkan adanya potensi antiproliferatif pada bahan uji (Kusumadewi, 2011).

Tabel VI.7 Data Persentase Rimpang Kecombrang

No.	Nama	Jumlah Sel Hidup (%)		
		24 Jam	48 Jam	72 Jam
1	Ekstrak Etanol	68,13	83,67	120,01
2	Fraksi N-Heksan	55,30	30,11	27,76
3	Fraksi Etil Asetat	72,99	52,40	51,45



Gambar VI.6 Hubungan antara presentase sel hidup dengan waktu inkubasi

Analisis *Doubling Time* yang pertama yaitu melalui pertumbuhan sel yang dapat dilihat dari persentase jumlah sel hidup dengan lamanya waktu inkubasi. Hasil diatas menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol rimpang kecombrang tidak memberikan efek pada kondisi sel MCF-7 dengan pengaruh waktu dimana semakin lama waktu inkubasi persentase sel pada ekstrak etanol semakin besar, sedangkan pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat menunjukkan adanya potensi antiproliferatif dengan adanya penurunan presentase sel hidup dengan kelipatan waktu inkubasi.

Doubling time merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipat. Berdasarkan literatur, *doubling time* sel kanker MCF-7 sekitar 24 jam (Sutherland *et al*, 1983). Dalam penentuan *doubling time* jumlah sel pada waktu inkubasi jam ke-0 tidak digunakan dalam pembuatan persamaan,

karena pada waktu ini sel masih beradaptasi sehingga tidak representatif pada pertumbuhan sel. Potensi antiproliferatif bahan uji terhadap sel kanker payudara MCF-7 dapat dianalisis dengan menghitung *doubling time* dengan menggunakan persamaan regresi antara waktu inkubasi dengan log jumlah sel hidup, dimana nilai y merupakan nilai log dua kali jumlah sel awal sehingga akan didapatkan nilai x sebagai nilai *doubling time* dalam jam. Hasil uji *doubling time* dapat dilihat pada tabel VI.8

Tabel VI.8 Hasil uji *doubling time* terhadap proliferasi sel kanker MCF-7

Perlakuan	Persamaan waktu vs log jumlah sel hidup	Doubling Time
Ekstrak Etanol	-	-
Fraksi N-Heksan	$y = -0,008681x + 3,8895$	72,16 Jam
Fraksi Etil Asetat	$y = -0,005754x + 3,9500$	123,26 Jam

Pada tabel VI.8 dapat disimpulkan bahwa pada ekstrak etanol tidak bisa dihitung nilai *doubling timenya* dikarenakan persentase jumlah sel hidup yang terus meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi sehingga pada ekstrak etanol tidak terdapat potensi antiproliferatif. Sedangkan pada fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan dapat dihitung nilai *doubling timenya*. Pada fraksi etil asetat memiliki nilai *doubling time* yang lebih besar yaitu 123,26 Jam dibandingkan dengan nilai *doubling time* dari fraksi n-heksan yaitu 72,16 Jam. Dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat rimpang

kecombrang mempunyai potensi antiproliferasi melalui mekanisme penundaan waktu penggandaan sel.