

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Dalam penelitian ini diawali dengan pengumpulan bahan yakni buah ranti hitam (*Solanum nigrum*. L) yang diperoleh dari perkebunan Kawasan Hijau Situ Rembulan Rengasdengklok, Karawang. Buah yang diperoleh selanjutnya dilakukan determinasi tanaman yang merupakan langkah awal dalam suatu penelitian yang menggunakan tanaman bertujuan untuk mengetahui dan memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan serta menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan sampel. Determinasi tanaman dilakukan di Sekolah Ilmu Teknologi dan Hayati ITB. Berdasarkan hasil determinasi membenarkan bahwa tumbuhan yang diteliti adalah buah ranti hitam dengan jenis spesies *Solanum nigrum* yang dapat dilihat pada lampiran 1. Sedangkan starter kombucha dan SCOBY diperoleh dari Wikikombucha.

VI.2 Pembuatan Simplisia Buah Ranti Hitam

Buah ranti hitam yang digunakan dalam penelitian ini berumur 5 bulan, setelah panen dilakukan proses sortasi basah. Kemudian buah dicuci bersih di bawah air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan mikroba dan pengotor lainnya. Setelah didapat buah yang bersih lalu didiamkan sampai kering dengan cara diangin-anginkan yang bertujuan untuk mencegah terjadinya pembusukan pada buah pada saat dioven. Selanjutnya buah dirajang dengan cara memotongnya menjadi dua bagian yang bertujuan untuk memperkecil ukuran agar proses pengeringan lebih sempurna, lalu

buah ranti hitam dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C sampai kadar airnya kurang dari 10%. Kadar air yang tinggi akan mempengaruhi kualitas dari simplisia tersebut, karena jika mengandung banyak air sangat memungkinkan adanya pertumbuhan jamur dan mikroba, organisme tersebut menyukai kondisi lingkungan yang lembab yang akan merusak simplisia (Sopian *et al.*, 2013). Hasil kadar air yang didapat pada simplisia buah ranti hitam yaitu 1.9994% yang berarti memenuhi persyaratan kadar simplisia yang baik, kadar air ini menggunakan metode Gravimetri dengan menimbang 2 gram simplisia. Perhitungan kadar air dapat dilihat pada lampiran 2. Selanjutnya dilakukan sortasi kering kemudian simplisia yang telah kering dihaluskan dengan cara diblender yang bertujuan untuk memperluas permukaan sehingga pada saat proses maserasi memudahkan penarikan metabolit sekunder di dalam simplisia tersebut.

VI.3 Ekstraksi Simplisia Buah Ranti Hitam

Pemilihan metode maserasi untuk proses ekstraksi buah ranti hitam (*Solanum nigrum*. L) selain berdasarkan efektifitas, praktis, keamanan, ekonomis, juga bertujuan untuk menghindari rusaknya senyawa-senyawa aktif buah ranti hitam yang tidak tahan panas (BPOMRI, 2012). Pemilihan pelarut pada proses maserasi berdasarkan pada prinsip kelarutan “*like dissolve like*”, artinya senyawa polar hanya larut dalam pelarut polar, begitu juga sebaliknya untuk senyawa-senyawa semipolar dan non polar (Simorangkir *et al.*, 2017). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70% yang bersifat universal diharapkan dapat

menarik metabolit sekunder yaitu alkaloid. Proses maserasi dilakukan dengan merendam simplisia buah ranti hitam yang telah kering dengan pelarut etanol 70% dalam botol cokelat yang bertujuan untuk menghindari rusaknya senyawa akibat pengaruh cahaya karena untuk menghindari terjadinya perubahan warna (Malik *et al.*, 2003), penggunaan pelarut dengan perbandingan 1:3 (b/v) selama 3 x 24 jam di mana tiap 24 jam dilakukan pergantian pelarut agar tidak jenuh di mana pelarut telah banyak menarik senyawa metabolit sekunder, dengan cara menyaring serbuk simplisia kemudian menggantinya dengan pelarut yang baru menggunakan perbandingan yang sama. Pada proses maserasi, sampel mengalami pemecahan dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut atau terjadi proses difusi (Harbone, 1996).

Hasil maserasi berupa cairan berwarna hijau tua yang didapat sebanyak 4,5 L. Kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan 175 mBar, 100 rpm pada suhu *waterbath* 55°C sampai didapat ekstrak kental, hasil ekstrak kental yang didapat sebanyak 99,837g dari 570g dengan persen rendemen 17,5152% (lampiran 3). Ekstrak yang sudah kental kemudian disimpan di lemari pendingin untuk menghindari pertumbuhan jamur sampai dilakukan fermentasi (Simorangkir *et al.*, 2017)

VI.4 Fraksinasi Etil Asetat Buah Ranti Hitam

Fraksinasi ekstrak etanol buah ranti hitam dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah. Fraksinasi merupakan

proses pemisahan antara zat cair dengan zat cair antara senyawa aktif dalam sampel berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolaran, yaitu dari non polar (n-heksan), semi polar (etil asetat) dan polar (metanol:air) (v/v). Senyawa yang memiliki sifat non polar akan larut dalam pelarut non polar, begitu juga pada pelarut semi polar dan polar (Harborne, 1987). Lapisan metanol:air akan berada di posisi bawah karena memiliki berat jenis yang lebih berat dari n-heksan yaitu 0.670 sedangkan metanol:air dengan berat jenis 1. Kemudian campuran metanol:air diekstraksi cair-cair kembali menggunakan pelarut etil asetat yang mana campuran tersebut digunakan untuk tahapan aktivitas uji sitotoksik, lapisan etil asetat berada di posisi atas karena memiliki berat jenis yang ringan dari metanol:air yaitu 0.89 . Hal tersebut terjadi karena adanya perbedaan berat jenis antar pelarut. Dari hasil fraksinasi rendemen fraksi etil asetat yang didapat yaitu 37,4464% (lampiran 3).

VI.5 Analisis Kadar Alkaloid Total

Penentuan kadar alkaloid total digunakan metode Gravimetri yaitu suatu metode analisis yang didasarkan pada pengukuran berat, yang melibatkan pembentukan, atau pun isolasi dari suatu endapan. Metode ini sangat sederhana dan mudah dilakukan, juga hasil yang didapatkan spesifik dan akurat. Berdasarkan sifat kebiasaan dari alkaloid, jika senyawa alkaloid ditambahkan dengan asam akan terbentuk garam alkaloid. Terbentuknya garam alkaloid menyebabkan senyawa alkaloid lebih mudah diekstraksi kedalam pelarut (Indarto, 2011).

Dalam uji alkaloid ini, sampel dimaserasi dengan asam klorida 10% dalam etanol 70%. Hal ini bertujuan untuk mengekstrak alkaloid yang bersifat basa (Robinson, 1995). Hasil ekstrak ini kemudian dipekatkan hingga volumenya menjadi 1/4 dari volume awal. Kemudian ekstrak tersebut dibasakan dengan menambahkan NH_4OH sehingga alkaloid tersebut akan mengendap. Fungsi dari penambahan NH_4OH adalah agar NH_4OH dapat bereaksi dengan asam klorida dan membentuk garam yang larut dalam air sehingga terbentuk endapan. Endapan tersebut dipisahkan dengan cara disaring dan kemudian dikeringkan, setelah kering ditimbang beratnya. Dari hasil pengerjaan ini, diperoleh berat alkaloid untuk sampel fraksi etil asetat sebelum fermentasi sebesar 1,4g atau 56% berat sampel. Sedangkan untuk sampel fraksi etil asetat setelah fermentasi sebesar 1,5g atau 60% berat sampel sehingga terjadi peningkatan kandungan alkaloid sebanyak 4%. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa kandungan alkaloid dalam fraksi etil asetat setelah fermentasi lebih banyak dibandingkan dalam fraksi etil asetat sebelum fermentasi. Hal ini karena adanya penambahan kombucha sebagai substrat sehingga dapat meningkatkan kandungan alkaloid.

Selanjutnya dilakukan analisis kualitatif alkaloid menggunakan pereaksi Dragendorff dan Mayer, sampel yang digunakan yaitu hasil dari endapan yang telah didapat dari metode Gravimetri yang kemudian dilarutkan dengan metanol. Hasil uji positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna jingga terhadap reagen Dragendorff (kalium tetraiodobismutat) dan endapan putih terhadap reagen Mayer (kalium tetraiodomerkurat). Menurut Harbone (1987) ekstrak positif alkaloid akan membentuk endapan

jingga dengan reagen Dragendorff dan membentuk endapan putih dengan reagen Mayer. Endapan terbentuk karena adanya pembentukan senyawa kompleks antara ion logam dari reagen dengan senyawa alkaloid. Dari hasil yang didapat untuk sampel fraksi sebelum fermentasi ketika ditambahkan preaksi Mayer menunjukkan adanya endapan putih yang lebih kuat dibanding dengan fraksi setelah fermentasi sedangkan ketika ditambahkan pereaksi Dragendorff menunjukkan adanya endapan jingga yang sama kuat. Diperkirakan endapan tersebut merupakan kompleks kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi mayer, larutan merkuriem (II) klorida ditambah kalium iodida akan bereaksi membentuk endapan merah merkuriem (II) iodida. Jika kalium iodida yang ditambahkan berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat (II).

Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam. Pada uji alkaloid dengan pereaksi mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marlina, 2005). Sedangkan pada reaksi menggunakan reagen Dragendorff, ion logam K^+ membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan alkaloid sehingga membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marlina, 2005). Menurut Simorangkir (2017) bahwa hasil analisis fitokimia menunjukan bahwa ekstrak ranti hitam mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin, sedangkan alkaloid yang dihasilkan dari fermentasi kombucha berasal dari teh yang mengandung kafein yang merupakan senyawa alkaloid yang terdapat

dalam teh. Kafein merupakan alkaloid yang mempunyai sifat tidak berwarna dan mempunyai rasa pahit. Pada teh terkandung kafein sebanyak 3 - 5%.

Kadar zat padat terlarut teh hijau berkisar 23,85-41,89 % (Kustamiyati, 1978). Setelah dilakukan analisis secara kualitatif, endapan alkaloid yang sudah dilarutkan dengan metanol dilakukan analisis secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid yang terkandung. KLT merupakan suatu metode pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fasa gerak. Fasa diam yang digunakan ialah plat silika gel yang bersifat polar, sedangkan fasa gerak atau eluen yang digunakan bersifat semi polar dan polar menggunakan 2 campuran pelarut. Kepolaran fasa diam dan fasa gerak hampir sama, tetapi kepolaran fasa gerak lebih kecil sehingga senyawa alkaloid yang dipisahkan dapat terangkat mengikuti aliran eluen karena alkaloid bersifat polar. Plat KLT yang digunakan terbuat dari silika gel GF 254 (Merck). Identifikasi senyawa alkaloid ini dilakukan pengamatan di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm. Eluen yang baik adalah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas (Harbone, 1996).

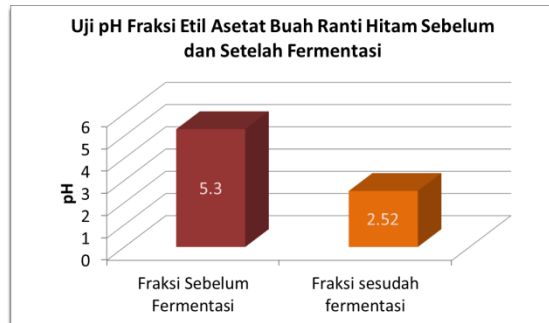
Pada penelitian ini digunakan eluen etil asetat : metanol (8 : 2) (v/v). Dari hasil yang didapat menunjukkan pemisahan dengan menghasilkan 1 buah spot dari masing-masing sampel dengan nilai R_f 0.54 untuk fraksi sebelum fermentasi dan 0.40 untuk fraksi

setelah fermentasi dengan warna yang muncul pada pengamatan panjang gelombang 365 nm ialah biru dan hijau, Rf (Faktor retensi) adalah jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh eluen. Senyawa yang mempunyai nilai Rf lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya hal tersebut karena fasa diam berupa silika gel yang bersifat polar yang akan tertahan kuat pada fasa diam sehingga menghasilkan Rf yang rendah. Dugaan tersebut didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Marlina (2007) bahwa pemisahan senyawa alkaloid dengan variasi eluen etil asetat : metanol : air (6:4:2) (v/v) dengan pereaksi penyemprot reagen Dragendorff menunjukkan adanya alkaloid jika timbul warna coklat atau jingga setelah penyemprotan. Bila tanpa pereaksi kimia, di bawah lampu UV 365 nm, alkaloid akan berfluoresensi biru, biru-hijau atau ungu (Marlina, 2007). Berdasarkan Harbone (1987) nilai Rf alkaloid paling umum yaitu 0.07-0.62 yang berarti sampel fraksi sebelum dan sesudah fermentasi mengandung senyawa alkaloid. Rf KLT yang baik yaitu berkisar antara 0.2-0.8, jika terlalu tinggi dapat memodifikasi eluen yang digunakan, sebaliknya jika terlalu rendah maka kepolaran eluen harus ditambah (Ewing Galen Wood, 1985)

VI.6 Evaluasi Kombucha Buah Ranti Hitam (*Solanum nigrum* L.)

Analisis pH

Pengujian analisis pH bertujuan untuk mengetahui perubahan pH fraksi etil asetat buah ranti hitam sebelum dan sesudah fermentasi. Nilai pH fraksi etil asetat sebelum fermentasi yakni 5,30 sedangkan fraksi setelah fermentasi selama 14 hari menjadi 2,52.

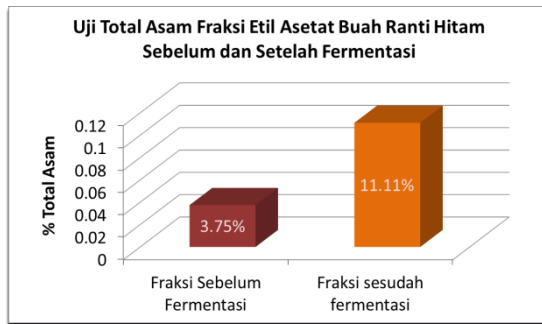


Gambar VI.1 Analisis pH sebelum dan sesudah fermentasi

Penurunan nilai pH kombucha teh fraksi etil asetat setelah fermentasi disebabkan oleh penambahan substansi yang bersifat asam ke dalam teh dan disebabkan oleh peningkatan konsentrasi asam organik seperti asam asetat yang diproduksi oleh bakteri dan *yeast*. Dengan bertambahnya waktu fermentasi, asam asetat yang terlarut akan melepaskan proton yang menyebabkan penurunan pH. Penurunan nilai pH dalam fermentasi akan mendukung kehidupan bakteri *Acetobacter xylinum* dalam kultur kombucha untuk melangsungkan aktivitas metabolismenya. Asam asetat yang terlarut akan terdisosiasi untuk melepaskan proton-proton bebas yang menurunkan pH larutan (Wistiana dan Zubaedah, 2015). Menurut Junior *et al* (2009) selama awal fermentasi penurunan pH disebabkan oleh bakteri dan *yeast* yang memetabolisme sukrosa menjadi asam organik. Tingginya kadar gula dalam larutan menyebabkan peningkatan aktivitas mikroorganisme dan produksi asam organik sehingga menurunkan pH larutan (Nainggolan, 2009).

Analisis Total Asam

Pengujian analisis total asam bertujuan untuk mengetahui kadar total asam dari fraksi etil asetat buah ranti hitam sebelum dan sesudah fermentasi. Kadar total asam fraksi etil asetat sebelum fermentasi yaitu 3,75% sedangkan sesudah fermentasi 11,11%. Terjadi peningkatan sebesar 7.36% (Lampiran 7).



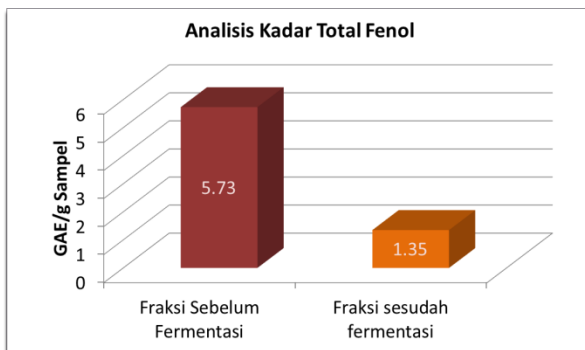
Gambar VI.2 Analisis total asam sebelum dan sesudah fermentasi

Prinsip dari titrasi asam basa ialah netralisasi di mana melibatkan asam maupun basa sebagai titer ataupun titran kemudian kadar larutan asam ditentukan dengan menggunakan larutan basa atau sebaliknya. Gambar VI.2 menunjukkan adanya peningkatan total asam yang ditandai dari menurunnya pH, semakin tinggi kadar asam maka nilai pH semakin menurun hal ini disebabkan karena selama proses fermentasi bakteri dan *yeast* melakukan metabolisme terhadap sukrosa akan dirombak menjadi glukosa dan fruktosa sehingga menghasilkan sejumlah asam-asam organik seperti asam asetat, asam glukonat dan asam glukoronat oleh karena itu terjadi peningkatan kadar asam. Sehingga semakin tinggi asam organik seperti asam laktat, asam asetat, asam glukonat, asam glukoronat yang terdapat

dalam kombucha maka semakin tinggi pula total asamnya. Hal ini juga disebabkan karena pengaruh lamanya waktu fermentasi maka akan semakin banyak asam asetat yang terbentuk sebagai hasil metabolisme *Acetobacter xylinum* (Wistiana dan Zubaedah, 2015).

Analisis Total Fenol

Pengujian analisis total fenol bertujuan untuk mengetahui kadar total fenolik dari fraksi etil asetat buah ranti hitam sebelum dan sesudah fermentasi. Menggunakan metode Folin-Ciocalteu.



Gambar VI.3 Analisis total fenol sebelum dan sesudah fermentasi

Senyawa fenolik merupakan senyawa bahan alam yang cukup luas penggunaannya, kemampuannya sebagai senyawa biologis aktif memberikan suatu peran yang besar salah satunya sebagai antioksidan, pencegahan penyakit degeneratif, gangguan sistem imun dan kanker (Apsari dan Susanti, 2011). Menurut penelitian Jayabalan *et al* (2006) terdapat beberapa jenis fenolik yang terdapat pada kombucha seperti variasi epikatekin selama fermentasi yaitu epigalokatekin galat, epikatekin galat, epigalokatekin dan epikatekin yang mana senyawa tersebut berperan dalam pencegahan penyakit

kanker oleh aktivitas antioksidannya yang menekan pertumbuhan sel-sel kanker (Liu, 2006. Gong *et al*, 2006).

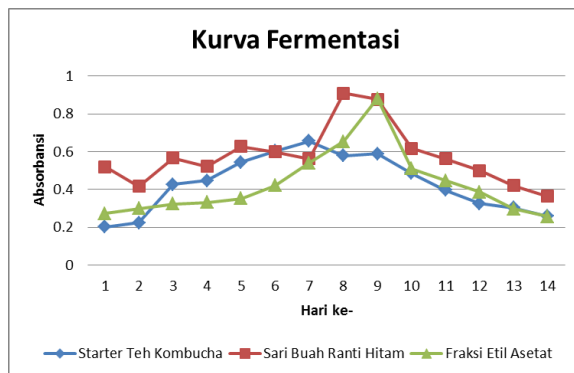
Pada penelitian ini metode uji total fenol menggunakan metode Folin-Ciocalteu mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat dalam pereaksi Folin Ciocalteu menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru (Singleton dan Rossi, 1965). Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Untuk membuat kondisi basa digunakan Na_2CO_3 . Gugus hidroksil pada senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu membentuk kompleks molybdenum tungsten berwarna biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer. Pada penentuan kadar fenolik total, larutan standar yang digunakan adalah asam galat dengan variasi konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan persamaan linear $y = 0,0019x + 0,0873$ dengan $R^2 = 0,9995$. Kadar total fenol fraksi etil asetat sebelum fermentasi yaitu 5,7 GAE/g sampel sedangkan sesudah fermentasi 1,35 GAE/g sampel dengan penurunan sebesar 61%. Digunakan asam galat sebagai larutan standar karena merupakan salah satu fenolik alami dan stabil, serta relatif murah dibanding lainnya (Viranda, 2009).

Pada percobaan ini didapat hasil bahwa fraksi etil asetat buah ranti hitam setelah fermentasi tidak terjadi adanya kenaikan total fenol hasilnya pun lebih kecil dari fraksi etil asetat sebelum fermentasi, hal ini diduga karena SCOBY kombucha tidak mampu menghasilkan

senyawa fenolik karena pH media yang terlalu rendah dan pengaruh lama waktu fermentasi maka nutrisi yang terdapat dalam larutan kombucha akan habis dimanfaatkan oleh bakteri sehingga terjadi kompetisi (Rezaee, 2008)

VI.7 Pengukuran Kurva Pertumbuhan Bakteri Kombucha

Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri kombucha ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri kombucha teh dan kombucha fraksi etil asetat ranti hitam selama proses fermentasi. Kurva pertumbuhan juga digunakan untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan bakteri yang disebabkan oleh pengaruh lingkungan hidupnya (Ardheniati *et al.*, 2009). Metode yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Optical Density* (OD) yang merupakan metode perhitungan kepadatan sel bakteri menggunakan spektrofotometri (Zamani, 2016).



Gambar VI.4 Kurva fermentasi kombucha

Hasil fermentasi kombucha teh yang merupakan starter kombucha diamati pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 525 nm. Pada hari ke-1 sampai hari ke-2

terjadi *lag phase* atau fase adaptasi di mana pada fase ini bakteri menyesuaikan diri dengan lingkungannya. Pada fase ini bakteri kombucha mulai membelah dengan kecepatan rendah. Dikarenakan kombucha baru menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan dan medianya yang baru (Suharyono, 2012). Kemudian pada hari ke-2 sampai hari ke-5 terjadi peningkatan pertumbuhan kombucha, hal ini menunjukkan pertumbuhan bakteri memasuki fase logaritmik.

Peningkatan jumlah sel pada hari pertama disebabkan adanya gula reduksi sebagai substrat yang masih cukup banyak. Kenaikan jumlah sel menunjukkan gula reduksi dapat digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan sel dan produksi alkohol. Kemudian pada hari ke-5 sampai hari ke-9 menunjukkan fase stationer yang mana nutrisi dalam kombucha sudah habis, pada proses ini menghasilkan zat beracun sehingga jumlah bakteri yang mati meningkat. Hal ini dikarenakan keterbatasan zat gizi menyebabkan terakumulasinya enzim metabolit sekunder dan terlepasnya gen-gen yang dapat memicu sintesis metabolit sekunder. Selanjutnya pada hari ke-10 sampai hari ke-14 menunjukkan kecepatan kematian bakteri sehingga terjadinya penurunan jumlah bakteri atau disebut fase kematian. Hal ini disebabkan karena jumlah nutrient yang terdapat didalam larutan teh mengalami penurunan dan kandungan polifenol teh dapat menghambat pertumbuhan *yeast*. Keadaan ini juga berkaitan dengan kadar gula reduksi yang menurun sehingga mikrobia kekurangan makanan (Rose, 1987)

Sedangkan hasil kurva pertumbuhan bakteri kombucha fraksi etil asetat buah ranti hitam yang difermentasi selama 14 hari

menunjukkan kurva pertumbuhan bakteri pada hari ke-1 sampai hari ke-7 memasuki fase adaptasi. Kondisi ini berbeda dengan pertumbuhan starter kombucha teh sebelumnya. Hal ini dikarenakan media dan lingkungan pertumbuhan starter kombucha sari buah ranti hitam tidak sama seperti media dan lingkungan sebelumnya, sehingga diperlukan waktu adaptasi yang lebih lama agar bakteri dapat tumbuh secara optimal. kemudian pada hari ke-7 sampai hari ke-8, pertumbuhan bakteri mencapai fase logaritmik. Akan tetapi pada hari ke-8 hingga hari ke-9 bakteri kombucha mengalami penurunan pertumbuhan atau memasuki fase kematian. Hal ini diduga nutrisi yang terdapat pada media kombucha sari buah ranti hitam mulai berkurang karena digunakan selama proses adaptasi berlangsung. Sehingga saat bakteri memasuki fase logaritmik, bakteri tidak dapat tumbuh secara optimal karena kurangnya nutrisi. Inilah yang diduga menyebabkan pertumbuhan bakteri kombucha fraksi etil asetat buah ranti hitam pada hari ke-9 sampai hari ke-14 (Suharyono, 2012).

VI.8 Uji Aktivitas Sitotoksik Lini Sel Kanker Payudara MDA-MB 231

VI.8.1 Proses menumbuhkan sel MDA-MB 231 (*Cell Thawing*)

Proses menumbuhkan sel (*Cell Thawing*) bertujuan untuk mengatur pertumbuhan sel dari tangki nitrogen cair yang telah lama disimpan. Sel kanker yang tidak digunakan dalam jangka waktu 2-3 tahun biasanya disimpan pada tangki nitrogen cair dengan suhu -152°C hingga -200°C atau dapat disimpan pada suhu -80° jika akan digunakan 2-3 tahun. Kemudian sel yang disimpan tersebut bisa

ditumbuhkan kembali dalam medium apabila akan digunakan untuk pengujian *in vitro*. Pada proses penumbuhan sel, perlu diperhatikan beberapa faktor agar sel dapat tumbuh dengan baik pada penggunaan mediumnya, sehingga hasil analisis yang diperoleh menjadi baik.

Sel kanker yang digunakan pada penelitian ini adalah lini sel kanker payudara MDA-MB 231 yang berasal dari Laboratorium Sitogenetika Universitas Padjajaran Bandung. Sel kanker diambil dari *cryotube* yang telah disimpan di dalam tangki nitrogen cair pada suhu -80°C lalu segera dicairkan di atas *waterbath* pada suhu 37°C dan segera dipindahkan pada *conical tube* yang berisi media kultur. Media kultur yang digunakan adalah *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640). Media RPMI 1640 ini mengandung 10% *Fetal Bovine Saline* (FBS) dan 1% penisilin-streptomisin. Penambahan FBS pada media bertujuan untuk meningkatkan pertumbuhan lini sel kanker MDA-MB 231. Kemudian penambahan 1% penisilin-streptomisin dilakukan untuk membunuh bakteri agar tidak terjadi kontaminasi. Kemudian pada prosedur kultur sel, digunakan suhu inkubasi 37°C bebas oksigen bertujuan membantu sel untuk mengubah makanan dari medium menjadi energi, sehingga sel dapat tumbuh dan berkembang biak.

VI.8.2 Subkultur Lini Sel Kanker MDA-MB 231

Subkultur adalah proses mengkultur sel dari sel yang tumbuh pada wadah kultur. Setelah sel dibangunkan pada proses *thawing* lalu sel yang telah tumbuh dan memperbanyak diri harus dipertahankan kecepatan tumbuh yang optimal dengan melakukan subkultur. Pada prosesnya semua medium, PBS dan tripsin-EDTA dipanaskan

terlebih dahulu di atas waterbath sampai suhunya 37°C lalu keringkan menggunakan tissue, sel yang akan disubkultur dicuci dengan PBS (*Phosfar Buffer Saline*) pada *flask* T25. Penggunaan PBS sebagai *buffer* bertujuan untuk membantu mempertahankan pH sel agar tetap konstan. Setelah pencucian kemudian dilakukan penambahan larutan tripsin-EDTA yang bertujuan untuk melepaskan sel yang telah menempel pada bagian dasar *flask*. Lalu sel diinkubasi selama 3 menit agar terlepas sempurna. Lamanya waktu 3 menit karena tripsin-EDTA dapat menyebabkan kematian sel apabila terlalu lama diinkubasi dengan sel. Kemudian tambahkan medium kultur yang bertujuan untuk menetralkan kerja tripsin. Proses selanjutnya pada subkultur ini adalah sentrifuga. Proses sentrifuga dilakukan untuk memisahkan sel yang akan digunakan dengan membuang larutan supernatant. Hasil dari sentrifuga ini berupa sel *pellet* dan filtrat. Filtrat yang dihasilkan dibuang, kemudian diganti dengan 6mL media komplit baru.

VI.8.3 Uji Sitotoksik Menggunakan Metode MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Dalam penelitian ini, viabilitas sel dianalisis dengan metode MTT. Garam MTT diabsorpsi oleh sel hidup dan dipecah oleh suksinat dehidrogenase yang termasuk dalam rantai respirasi di mitokondria menjadi formazan (Doyle dan Griffiths, 2000). Hasil uji sitotoksitas dilakukan untuk memperoleh kadar yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi sel atau nilai IC50. *Inhibitory Concentration* (IC50) ini dapat digunakan sebagai parameter toksisitas suatu senyawa sehingga dapat diketahui efek toksisitas terhadap sel kanker (Dona *et al.*, 2016) Intensitas

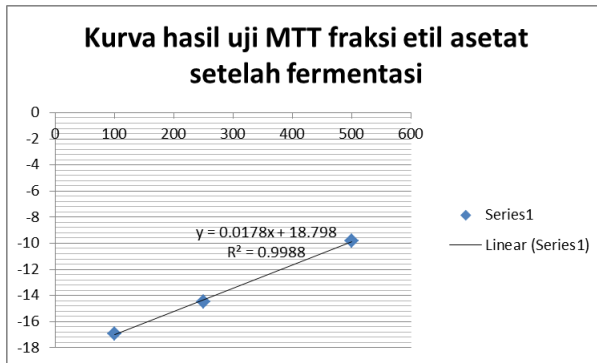
warna ungu yang terbentuk, akan berbanding lurus dengan jumlah sel yang masih hidup. Jika intensitas warna ungu semakin pekat, maka jumlah sel hidup semakin banyak. Selanjutnya ditambahkan DMSO sebagai larutan *stopper* yang dapat melarutkan kristal formazan. Setelah itu, sampel diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 dan 550nm. (CCRC, 2013).

VI.8.4 Perlakuan Fraksi Etil Asetat Buah Ranti Hitam Sebelum dan Sesudah Fermentasi

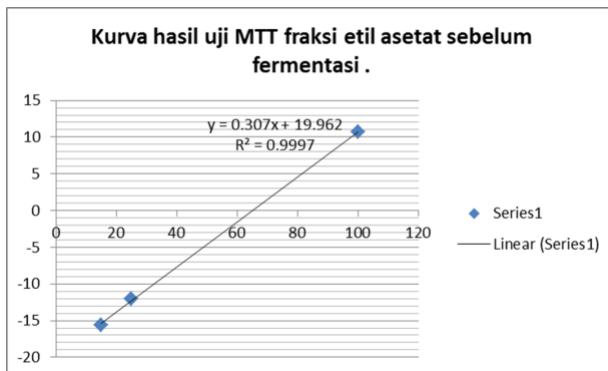
Setelah konsentrasi sampel sudah dibuat, kemudian ambil *plate* dalam inkubator kemudian media sel dicuci dengan PBS lalu buang, dimasukkan seri konsentrasi pada 96 *wellplate* secara triplo sebanyak 200µL kemudian diinkubasi selama 72 jam untuk melihat efek sitotoksik. Setelah 72 jam dilakukan pengamatan secara visual. Lalu ditambahkan *stopper* yaitu DMSO untuk melarutkan kristal formazan. Semakin pekat warna ungu maka semakin banyak sel yang hidup. Kemudian *well plate* dibaca absorbansinya dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 dan 550 nm.

VI.8.5 Pengolahan dan Analisis Data

Setelah pembacaan menggunakan *ELISA reader* kemudian dilakukan analisis data menggunakan linearitas untuk mendapatkan nilai IC₅₀, yang didapatkan dari grafik antara konsentrasi sampel (x) terhadap % inhibisi (y) sehingga didapatkan persamaan regresi linier persamaan regresi linier dan $y = 50$ (Simorangkir *et al.*, 2017).



Gambar VI.5 Kurva MTT fraksi etil asetat sebelum fermentasi pada panjang gelombang 550 nm.



Gambar VI.6 Kurva MTT fraksi etil asetat setelah fermentasi pada panjang gelombang 550 nm.

Tabel VI.1 Nilai IC_{50} fraksi etil asetat sebelum fermentasi

Persamaan linier	Nilai IC_{50}
$y = 0.0307x + 19.962$	$Nilai\ IC_{50} = \frac{(50 - 19.962)}{0.307} = 97.8436\ \mu\text{g/mL}$

Tabel VI.2 Nilai IC₅₀ fraksi etil asetat setelah fermentasi

Persamaan linier	Nilai IC ₅₀
$y = 0.0178x + 18.798$	Nilai IC ₅₀ = $\frac{(50-18.798)}{0.0178} = 1752.921 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Nilai IC₅₀ hasil uji sitotoksisitas fraksi etil asetat buah ranti hitam yang didapatkan dari persamaan linieritas yakni 97.8436 ppm, sedangkan nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat ranti hitam setelah fermentasi yakni 1752.921 ppm, hal ini diduga karena turunnya total fenolik yang terkandung dalam fermentasi sehingga alkaloid yang terkandung dalam fermentasi menjadi berkurang. Menurut penelitian jenis alkaloid yang dapat memberikan efek sitotoksik yakni solasonin, α -solamargin, solamargin, α -solasonin dan aglikonnya dengan kemampuannya mengganggu struktur dan fungsi membran sel tumor, mengganggu sintesis DNA dan RNA dan menginduksi apoptosis (An *et al.*, 2006). Berdasarkan kategori senyawa sitotoksik menurut U.S *National Cancer Institute*, Nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat buah ranti hitam sebelum fermentasi sangat toksik sedangkan sesudah fermentasi termasuk kategori tidak toksik.

Menurut penelitian Fatmawati, Puspitasari dan Yusuf (2011) IC₅₀ doxorubisin sebesar 5,56 $\mu\text{g/mL}$ Sementara nilai IC₅₀ doxorubisin sebagai kontrol positif yakni 41.366 $\mu\text{g/mL}$ dan termasuk kategori sangat toksik terhadap lini sel kanker MDA-MB 231.

Besarnya nilai IC₅₀ yang didapatkan pada sampel fraksi etil asetat setelah fermentasi diduga karena pembentukan senyawa metabolit sekunder saat fermentasi belum terbentuk secara optimal. Perbedaan

media yang digunakan untuk starter kombucha bisa mengakibatkan bakteri membutuhkan waktu yang lama untuk bisa beradaptasi, oleh karena itu dilakukan peremajaan kombucha terlebih dahulu agar dapat beradaptasi. Selain itu, terbatasnya nutrisi yang ditambahkan ke dalam media juga bisa menyebabkan kecepatan kematian bakteri.