

BAB VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Buah ranti hitam (*Solanum nigrum* L.) diperoleh dari perkebunan warga di daerah Ciwidey, Jawa Barat. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung. Berdasarkan hasil determinasi dinyatakan bahwa buah ranti hitam yang digunakan berasal dari jenis *Solanum nigrum* L. dari suku Solanaceae. Hasil determinasi tanaman dapat dilihat pada lampiran 1. Starter kombucha dan SCOBY (*Symbiosis Culture Of Bactery and Yeast*) yang digunakan diperoleh dari Wikikombucha.

VI.2 Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia dimulai dengan sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, dan sortasi kering. Sortasi dilakukan untuk memisahkan buah ranti hitam dari pengotor dan bagian tumbuhan yang tidak diperlukan. Simplisia kering yang diperoleh dari sebanyak 21 kg buah ranti hitam adalah 1670 gram. Didapatkan % rendemen simplisia kering sebesar 7,95%. Setelah didapatkan simplisia kering dilakukan perhitungan penyusutan bobot atau kehilangan air menggunakan metode Gravimetri. Prinsip dari metode ini adalah menguapkan air menggunakan pemanasan pada suhu 105°C sampai didapatkan berat konstan.

Syarat kadar air simplisia yaitu tidak lebih dari 10%, jika kadar air melebihi 10% maka kemungkinan adanya pertumbuhan mikroba dan jamur menjadi lebih tinggi. Kadar air simplisia yang tinggi dapat menyebabkan waktu simpan menjadi pendek karena adanya

kerusakan mikrobiologis dan reaksi kimia pada suhu ruangan (Depkes RI, 1989). Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh kadar air simplisia buah ranti hitam yaitu 1,99%. Hasil kadar simplisia ini memenuhi persyaratan kadar air simplisia. Perhitungan kadar air dapat dilihat pada Lampiran 2.

V1.3 Pembuatan Ekstrak dan Fraksi Buah Ranti Hitam

Pembuatan ekstrak n-heksan buah ranti hitam dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Metode ini merupakan perendaman simplisia, pelarut akan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif dengan cara menembus dinding sel. zat aktif yang terkandung dalam sel akan terekstrak keluar karena adanya perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel. Proses akan berlangsung sampai terjadi kesetimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel (Chasani, Fitriaji and Purwarti, 2013).

Maserasi dilakukan selama 3 hari menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1 : 3. Dilanjutkan dengan penyaringan dan dipekatkan menggunakan *rotary eveporator*. Prinsip kerja dari alat *rotary evaporator* ini adalah menguapkan pelarut dengan vakum destilasi yang menyebabkan penurunan tekanan sehingga pelarut menguap dibawah titik didihnya. Hasil maserasi yang diperoleh dari sebanyak 1000 gram simplisia kering buah ranti hitam yaitu sebesar 177,35 gram. Berdasarkan perhitungan rendemen diperoleh persen kadar rendemen ekstrak sebesar 17,73% (b/b). Perhitungan kadar rendemen dapat dilihat pada lampiran 3. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian di fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair (ECC).

Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Prinsip dari metode ini yaitu melibatkan kontak suatu larutan dengan pelarut (*solvent*) lain yang saling tidak melarutkan dengan pelarut asal yang memiliki densitas berbeda sehingga membentuk dua fase beberapa saat setelah penambahan *solvent* sehingga menyebabkan perpindahan massa dari pelarut asal ke pelarut pengeksrak (Mirwan and Wicakso, 2008).

Proses fraksinasi dilakukan menggunakan tiga pelarut berbeda kepolaran yaitu n-heksan (non polar), etil asetat (semi polar) dan metanol : air (1:1) sebagai pelarut polar. Hasil fraksinasi n-heksan di pekatan menggunakan *rotary evaporator* 336 mBar dengan kecepatan 100 *rpm* dan suhu 50°C. Fraksi kental yang diperoleh sebanyak 9,39 gram. Dari hasil ini diperoleh persen kadar rendemen fraksi n-heksan yaitu sebesar 8,38% (b/b).

V1.4 Analisis Senyawa Alkaloid

VI.4.1 Metode Gravimetri

Analisis senyawa alkaloid menggunakan metode Gravimetri dilakukan berdasarkan pengukuran berat dengan melibatkan pembentukan, pengukuran berat atau isolasi dari suatu endapan (Alasa, Anam and Jamaluddin, 2018). Analisis senyawa alkaloid dilakukan dengan melakukan maserasi fraksi n-hkesan buah ranti hitam dan hasil fermentasi fraksi n-heksan selama 4 jam menggunakan pelarut 10% HCL dalam etanol 70% Penambahan HCL berfungsi mengubah alkaloid menjadi dalam bentuk garam

alkaloid (Verawati, Nofiandi and Mulyani, 2017; Silalahi, Fachriyah and Wibawa, 2018)

Kemudian di uapkan sampai $\frac{1}{4}$ bagian dan disaring, filtrat ditambahkan ammonium hidroksida pekat 10 mL tetes pertetes sampai terbentuk endapan. Amonium hidroksida berfungsi untuk menghidrolisis garam alkaloid menjadi senyawa alkaloid bebas. Endapan disaring menggunakan kertas saring yang sudah ditimbang sebelumnya dan dicuci dengan ammonium hidroksida 1%. Selanjutnya endapan di keringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 30 menit dan ditimbang (Verawati, Nofiandi and Mulyani, 2017; Silalahi, Fachriyah and Wibawa, 2018).

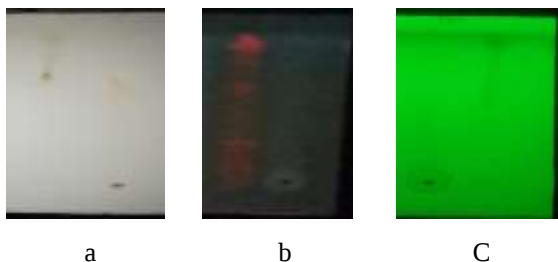
Perhitungan untuk analisis kandungan alkaloid metode gravimetri adalah bobot kertas saring dan endapan dikurangi bobot kertas saring kosong kemudian dibagi dengan bobot sampel awal dan dikalikan dengan seratus persen. Hasil perhitungan diperoleh kadar alkaloid sebelum dan sesudah fermentasi fraksi n-heksan buah ranti hitam adalah sebesar 5,16% dan 4,65%. Berdasarkan hasil tersebut diketahui terjadi penurunan persen kadar alkaloid yaitu sebesar 9,84%.

Penurunan persen kadar alkaloid total sebelum dan sesudah fermentasi disebabkan oleh penurunan pH selama proses fermentasi. Selain itu juga dapat disebabkan proses pembentukan endapan yang tidak sempurna. Proses pembentukan endapan dan ukuran endapan dipengaruhi oleh pemanasan, pengadukan dan penambahan elektrolit. Perbedaan

ukuran partikel dapat menyebabkan banyaknya presipitat ukuran kecil yang lolos kertas saring sehingga tidak tertimbang (Widjanarko and Megawati, 2015).

VI.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis senyawa menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya menyebabkan komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak (Alen, Agres and Yuliandra, 2002).



Gambar.VI.1 Hasil kromatografi lapis tipis fraksi n-heksan buah ranti hitam dan hasil fermentasi fraksi n-heksan buah ranti hitam (a) Sinar tampak (b) sinar UV 366 nm (c) sinar UV 254 nm

Proses analisis menggunakan KLT dilakukan dengan menggunakan fase gerak etil asetat metanol dengan perbandingan 10:1. Hasil pemantauan dengan kromatografi lapis tipis diperoleh bercak orange pada sinar UV 366 yang diduga

merupakan alkaloid (Verawati, Nofiandi and Mulyani, 2017). Pada sinar UV 254 nm terjadi daya interaksi antara indikator fluoresensi pada plat KLT dengan sinar UV yang menyebabkan sampel akan tampak berwarna gelap. Sedangkan pada sinar UV 366 terjadi interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auktokrom yang terdapat pada noda sehingga plat KLT akan berwarna gelap dan bercak berfluoresensi (Alen, Agres and Yuliandra, 2002).

VI.5 Pembuatan Starter Kombucha

Pembuatan starter kombucha digunakan teh hijau sebagai media, sukrosa, starter cair kombucha teh dan SCOBY (*Symbiosis Collony Of Bactery and Yeast*). Pembuatan strater kombucha bertujuan untuk memperbarui starter teh, dan adaptasi dengan media teh yang baru. Daun teh hijau dipilih sebagai media kultur karena kombucha terbaik yang dihasilkan adalah yang terbuat dari daun teh. (Suhardini and Zubaidah, 2016). Selain itu teh hijau juga merupakan jenis olahan *unfermented tea* atau teh tanpa melalui poses fermentasi yaitu tidak menggunakan enzim polifenol oksidase pada daun teh melainkan menggunakan proses pelayuan (80°C-100°C) untuk menjaga komponen-komponen zat aktif yang terdapat pada teh hijau tetap ada dan enzim-enzim yang dalam keadaan inaktif (Adheniati, Adriani and Amanto, 2018; Mahadi et al., 2016).

Pembuatan starter kombucha dimulai dengan sterilisasi panas basah menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Sterilisasi dilakukan agar selama proses pembuatan fermentasi tidak terjadi kontaminasi yang dapat mengganggu atau membunuh kombucha.

Kemudian dilanjutkan dengan mendidihkan sebanyak 300 mL akuades, ditambahkan 10 % sukrosa (b/v) atau 300 gram dalam 3000 mL air sampai larut. Daun teh hijau kering 5% (b/v) atau 150 gram dilarutkan ke dalam larutan sukrosa, larutan dimasukkan kedalam wadah kaca yang sudah disterilkan dan didinginkan. Sukrosa dalam fermentasi kombucha berfungsi sebagai sumber nutrisi selain dari media teh untuk kultur mikroba selama fermentasi dan untuk menciptakan kondisi yang optimum. Selanjutnya dilakukan penambahan starter kombucha (Nurikasari et al., 2017).

Penambahan starter kombucha dilakukan setelah suhu larutan sama dengan suhu ruangan karena mikroba kombucha tidak tahan terhadap suhu tinggi. Starter kombucha cair yang ditambahkan sebanyak 10%(v/v) dan satu lembar SCOBY kedalam larutan. Proses fermentasi dilakukan selama 14 hari dan tidak dianjurkan untuk membuka wadah karena dikhawatirkan akan terkontaminasi dari lingkungan luar.

Selain tidak dianjurkan untuk membuka wadah juga tidak boleh terguncang atau gangguan fisik dari luar selama proses fermentasi karena dapat menyebabkan SCOBY menjadi sulit untuk memadat (Adheniati, Adriani and Amanto, 2018). Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada hari ke-2 bau asam asetat sudah mulai tercium yang menandakan sedang terjadi proses fermentasi, sedangkan SCOBY terbentuk dengan jelas pada hari ke-7.

V1.6 Peremajaan Starter Kombucha Menggunakan Buah Ranti Hitam

Peremajaan starter kombucha menggunakan media sari buah ranti hitam dilakukan untuk meningkatkan proses fermentasi agar lebih optimal dengan adanya adaptasi dari media teh sebelumnya ke media sari buah ranti hitam. Proses fermentasi peremajaan menggunakan sari buah ranti hitam dilakukan selama 14 hari pada suhu 25°C.

Proses fermentasi terlebih dahulu dibuat sari buah ranti hitam menggunakan juicer untuk mengurangi kontaminasi selama proses pembuatan. Pada peremajaan sari buah ranti hitam ini digunakan sebanyak 200 gram buah ranti hitam, 200 mL akuades, 20% (b/v) sukrosa, 20% (v/v) starter cair dan satu lembar SCOBY hasil pembuatan starter kombucha sebelumnya.

VI.7 Fermentasi Menggunakan Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam

Pada fermentasi menggunakan fraksi n-heksan buah ranti hitam terdapat perlakuan khusus yaitu proses sonikasi menggunakan alat sonikator. Sonikasi dilakukan karena fraksi yang digunakan bersifat nonpolar sedangkan media fermentasi adalah air yang bersifat polar yang menyebabkan fraksi tidak dapat terlarut.

Metode sonikasi memanfaatkan gelombang ultrasonik untuk membuat sinyal menggunakan generator listrik ultrasonik kemudian mengubahnya menjadi getaran fisik atau gelombang ultrasonik sehingga memiliki efek sangat kuat (efek kavitas) pada larutan yang

menyebabkan pecahnya molekul-molekul tersebut (Rusdiana, Hambali and Rahayuningsih, 2018).

Fermentasi menggunakan fraksi n-heksan sama dengan sebelumnya yaitu dimulai dengan sterilisasi dan hanya menggunakan starter cair dari fermentasi sebelumnya. Sukrosa 30% dilarutkan dalam akuades kemudian didinginkan sampai suhu ruang, selanjutnya ditambahkan 1,5% fraksi n-heksan yang sudah di sonikasi dan 15 % starter cair kombucha sari buah ranti hitam. Fermentasi dilakukan selama 14 hari pada suhu 25°C terhindar dari cahaya langsung yang dapat membunuh bakteri karena pengaruh sinar UV dan guncangan fisik. Adanya gangguan fisik selama proses fermentasi menyebabkan SCOBY sulit memadat dan terbentuk. Kemudian wadah ditutup menggunakan kain batis supaya CO₂ yang terbentuk selama proses fermentasi dapat keluar dari wadah (Pratiwi and Aryawati, 2012; Napitupulu, Setyohadi and Lubis, 2017)

Hasil pengamatan menunjukkan pada hari ke 3 sudah mulai tercium sedikit bau asam. Semakin lama waktu fermentasi maka aroma kombucha akan semakin asam karena khamir dan bakteri melakukan metabolisme terhadap sukrosa sehingga menghasilkan asam-asam organik seperti asam asetat, asam glunoronat dan asam glukonat. Adanya senyawa volatile menyebabkan terbentuknya aroma yang khas selain itu asam laktat dan asetaldehid yang dihasilkan menyebabkan penurunan pH media fermentasi dan meningkatkan keasaman (Wistiana and Zubaidah, 2015).

Pada hari ke 5 sudah mulai terbentuk lapisan selulosa (*microbial selulosa*) tipis pada bagian atas larutan fermentasi. Produksi *microbial selulosa* menunjukkan bahwa mikroorganisme (bakteri) tumbuh dengan cepat dibawah kondisi yang terkendali dan dapat menghasilkan selulosa dari berbagai sumber karbon seperti glukosa, etanol dan sukrosa (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

Bakteri asam asetat (*A.xylinum*) membentuk *microbial cellulose* melalui sintesis uridin difosfoglukosa (UDPGlc) oleh pirofosforilase UDPGlc yang akan berpolimerase melalui ikatan β -1,4-glukosidik oleh enzim sintase *cellulose* menjadi rantai panjang tidak bercabang. Sintesis selulosa memerlukan adanya oksigen dan proses oksidasi glukosa menjadi asam glukonat oleh bakteri asam asetat sehingga lapisan selulosa terjadi pada lapisan atas (Jayabalan *et al.*, 2015).

VI.8 Analisis Fenolat Total

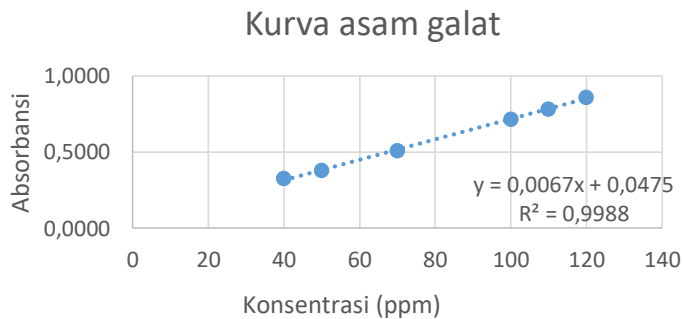
Metode yang digunakan untuk analisis feneol total adalah Folin-Ciocalteu dan asam galat (GAE) sebagai larutan standar. Prinsip metode folin-ciocalteu adalah terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru yang diukur pada panjang gelombang 756 nm. Oksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (asam fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat dalam reagen Folin-Ciocalteu (Alfian and Susanti, 2012).

Asam galat digunakan sebagai standar karena merupakan salah satu fenol alami dan stabil. Jika direaksikan dengan reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan warna kuning (menandakan mengandung fenol). Ditambahkan dengan larutan Na_2CO_3 akan menghasilkan

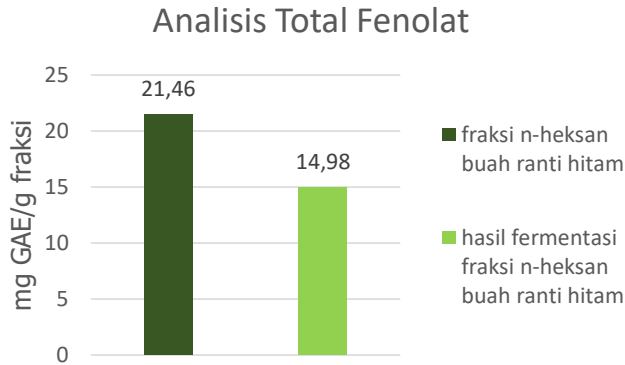
warna biru. Penambahan Na_2CO_3 karena senyawa fenolik bereaksi dengan reagen folin-ciocalteau hanya dalam suasana basa agar proton pada senyawa fenolik dapat terdisosiasi menjadi ion fenolat. (Ahmad *et al.*, 2015).

Gugus hidroksil pada senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteau membentuk kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru yang bisa dideteksi menggunakan spektrofotometer. Semakin besar kandungan senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli menjadi kompleks molibdenum-tungsten menyebabkan semakin pekat warna biru yang dihasilkan (Alfian and Susanti, 2012).

Analisis total fenol dilakukan pada fraksi n-heksan buah ranti hitam sebelum dan sesudah fermentasi. Pengukuran absorbansi masing-masing sampel dilakukan 3 kali pengulangan dan didapatkan rata-rata untuk fraksi n-heksan adalah sebesar 0,335 dan hasil fermentasi sebesar 0,248.



Gambar VI.2 Kurva Standar Asam Galat



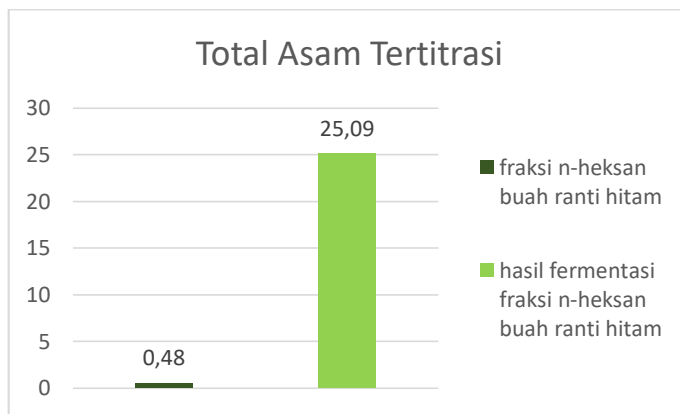
Gambar VI.3 Grafik Nilai Fenolat Total Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam Sebelum Dan Sesudah Fermentasi Kombucha.

Berdasarkan perhitungan kadar fenol total (lampiran 10) diperoleh nilai fenol total fraksi n-heksan sebesar 21,46 mgGAE/g fraksi dan kadar fenol total fraksi n-heksan hasil fermentasi sebesar 14,98 mgGAE/g fraksi. Terjadi penurunan kadar fenol sebesar 30,19 %. Perhitungan kadar fenol total dapat dilihat pada lampiran.

Penurunan kadar fenol total ini dipengaruhi karena selama proses fermentasi terbentuk asam yang menyebabkan kondisi pH fermentasi berada di bawah rentang pH yang sesuai dalam pembentukan fenol. Kondisi pH optimum pembentukan senyawa fenol adalah pada rentang pH 4-5. Metabolisme mikroba kombucha yang kurang optimal juga dapat menyebabkan kurang meningkatnya metabolit sekunder (Kunaepah, 2009; Shahidi and Nacz, 2006 Suhardini and Zubaidah, 2016).

VI.9 Analisis Total Asam Tertitrasi

Tujuan dilakukannya analisis total asam tertitrasi yaitu untuk menentukan keberhasilan dari fermentasi yang ditandai dengan adanya asam yang terbentuk dari proses metabolisme mikroorganisme. Metode yang digunakan untuk analisis total asam tertitrasi adalah metode titrimetri. Hasil perhitungan analisis total asam tertitrasi dapat dilihat pada lampiran 9.



Gambar VI.4 Garfik Total Asam Tertitrasi (TAT) Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam dan Hasil Fermentasi Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam.

Berdasarkan hasil perhitungan total asam tertitrasi diperoleh nilai TAT fraksi n-heksan buah ranti hitam sebesar 0,48% dan hasil fermentasi fraksi n-heksan buah ranti hitam sebesar 25,09%, terjadi peningkatan TAT sebesar 98,08%. Peningkatan TAT setelah fermentasi karena adanya pembentukan asam organik seperti asam asetat, asam glukuronat, asam glukonat, asam laktat dan lain sebagainya. Selain itu sel jamur juga merubah sukrosa menjadi

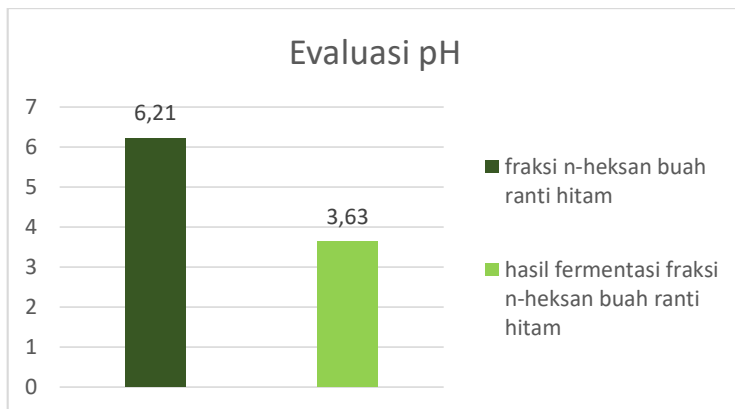
sukrosa, glukosa dan menghasilkan etanol (Dufresne and Farnworth, 2000; Adheniati, Adriani and Amanto, 2018).

Glukosa diubah menjadi asam glukonat dan fruktosa menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat. Asam asetat merangsang khamir untuk menghasilkan etanol dan etanol pada gilirannya dapat membantu bakteri asam asetat untuk tumbuh dan menghasilkan asam asetat. (Dufresne and Farnworth, 2000; Adheniati, Adriani and Amanto, 2018).

Penelitian Hismiogullari *et al* (2008) menunjukkan asam asetat merupakan asam yang memiliki aktivitas sitotoksik paling tinggi diantara asam-asam organik lain lain seperti asam askorbat dan asam laktat. Mekanisme kerja sitotoksik dari asam organik ini adalah dengan menembus dinding sel dan mereduksi pH intraseluler. Kemudian mengalihkan jalur metabolisme sel ke arah refluks kelebihan proton (H^+) yang dihasilkan oleh asam. Proses ini memerlukan energi tinggi sehingga meningkatkan stress metabolisme sel yang menyebabkan kematian sel. (Hismiogullari *et al.*, 2008).

VI.10 Evaluasi pH

Evaluasi pH dilakukan bertujuan untuk mengetahui keberhasilan dari fermentasi kombucha berdasarkan penurunan pH sebelum dan sesudah fermentasi. Evaluasi pH menggunakan alat pH meter yang sebelum digunakan dikalibrasi terlebih dahulu pada pH 4, pH 7, dan pH 9. Pengukuran pH dilakukan 3 kali pengulangan.



Gambar V.5 Grafik Evalusi pH Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam Sebelum Dan Sesudah Fermentasi.

Nilai pH mengalami penurunan setelah proses fermentasi, pH fraksi n-heksan buah ranti hitam sebesar 6,21 dan pH hasil fermentasi fraksi n-heksan buah ranti hitam sebesar 3,63. Terjadi penurunan pH sebesar 41,54%. Penurunan pH ini disebabkan oleh aktivitas jamur *S. Cerevisiae* dan bakteri asam asetat (*A. Xylinum*) menghasilkan enzim sukrose atau sukrose invertase yang menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa (Jayabalan, Malbasa and Sathishkumar, 2016; Nurikasari, 2017).

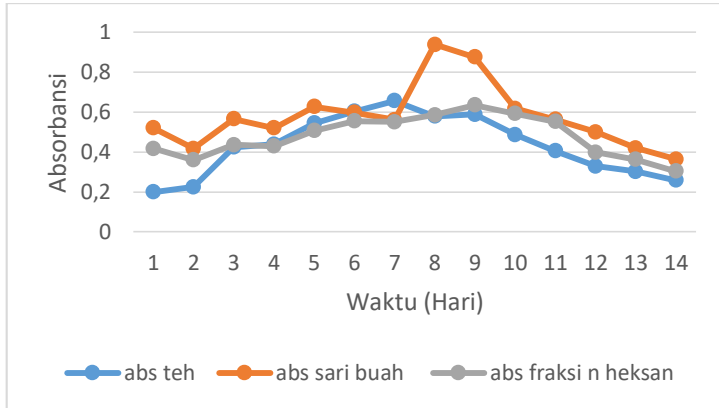
Fruktosa yang dilepaskan oleh sukrosa invertase melalui tahap glikolisis di metabolisme oleh sel-sel jamur dan diubah menjadi etanol dan karbondioksida. Etanol dioksidasi oleh bakteri asam asetat menjadi asam asetat yang merupakan asam organik utama hasil dari proses fermentasi dan penyebab utama penurunan pH. (Jayabalan, Malbasa and Sathishkumar, 2016; Nurikasari, 2017).

V.11 Kurva Pertumbuhan Kombucha

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat menggunakan metode Turbidimetri. Cahaya yang mengenai sel akan dipantulkan sedangkan cahaya yang tidak mengenai sel akan diteruskan. Jumlah cahaya yang diteruskan berbanding lurus dengan transmittan dan cahaya yang dipantulkan berbanding lurus dengan absorbansi atau berbanding terbalik dengan transmittan (Kosim and Rosa, 2010).

Nilai OD (*Optical Density*) dipengaruhi oleh banyaknya cahaya yang diserap oleh bakteri, semakin sedikit cahaya yang dilewatkan sehingga nilai absorbansinya tinggi. Nilai absorbansi rendah menunjukkan jumlah bakteri yang sedikit disebabkan lebih banyak cahaya yang diteruskan dibandingkan cahaya yang diserap pada saat pengukuran OD menggunakan spektrofometer (Lizayana, Mudatsir and Iswadi, 2016).

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri kombucha dilakukan dengan membuat masing-masing 14 vial fermentasi kombucha teh, fermentasi kombucha sari buah ranti hitam dan fermentasi kombucha fraksi n-heksan buah ranti hitam yang diukur setiap hari selama 14 hari (Bhattacharya *et al.*, 2016). Sebelum pengukuran dilakukan penentuan panjang gelombang maksimal dengan mengukur nilai OD kombucha yang didapat nilai OD sebesar 525 nm, kemudian digunakan sebagai panjang gelombang untuk pengukuran absorbansi.



Gambar V.6 Kurva Pertumbuhan Kombucha Teh, Sari Buah Ranti Hitam Dan Fermentasi Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam.

Kurva pertumbuhan mikroba terdiri dari 4 fase yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Berdasarkan data kurva pertumbuhan bakteri, pada kurva pertumbuhan fase adaptasi masing-masing sampel berbeda. Kombucha teh memiliki fase adaptasi yang paling singkat dibandingkan dengan sari buah dan fraksi n-heksan. Fase adaptasi terlihat dengan tidak adanya pertumbuhan jumlah mikroba. Karena teh merupakan media yang sesuai dengan kombucha maka fase adaptasinya paling singkat sedangkan pada sari buah ranti hitam fase adaptasi berlangsung paling lama karena bakteri perlu menyesuaikan dengan perubahan lingkungan sekitarnya (pH, suhu dan nutrisi) (Yuliana, 2008; Mardalena, 2018). Setelah fase adaptasi dilanjutkan dengan fase logaritmik.

Fase logaritmik atau eksponensial ditandai dengan meningkatnya pertumbuhan sel-sel secara signifikan. Pada kurva pertumbuhan kombucha teh fase logaritmik terjadi pada hari ke 2-7, kombucha sari buah ranti hitam pada hari ke 7-8 dan kombucha fraksi n-heksan pada hari ke 4-6. Pada fase ini keadaan sel membelah diri dengan cepat dan konstan serta dengan laju yang sama massa menjadi dua kali lipat, komposisi kimiawi media berubah karena terjadinya sintesis produk dan penggunaan substrat. (Yuliana, 2008; Sulistijowati, 2012).

Fase logaritmik sari buah ranti hitam meningkat signifikan tetapi hanya singkat hal ini karena nutrisi yang diduga telah habis selama proses adaptasi. Fase ini ditandai dengan terbentuknya lapisan microbial cellulose dan sel banyak menghasilkan zat-zat metabolit untuk memenuhi kebutuhan dalam pertumbuhan. Selanjutnya sel akan masuk ke dalam fase stasioner. Pada fase stasioner jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan sel yang mati, laju pertumbuhan menurun karena kekurangan faktor pertumbuhan.

Pada fase ini dihasilkan asam-asam organik yang dihasilkan BAL (Bakteri Asam Laktat) seperti asam laktat, asam asetat dan asam piruvat dan penumpukan metabolit hasil aktivitas metabolisme serta karbondioksida. (Yuliana, 2008) Fase stasioner kombucha teh terjadi pada hari ke 7-9, kombucha sari buah ranti hitam pada hari ke 8-9 dan kombucha fraksi n-heksan pada hari ke 6-7. Fase terakhir yaitu fase kematian yang ditandai dengan penurunan grafik. Pada fase ini nutrisi yang diperlukan oleh bakteri telah habis dan terjadi penumpukan hasil ekskresi yang mengganggu pertumbuhan bakteri.

V.12 Pengaktifan Dan Pemeliharaan Sel Lini Kanker MDA-MB 231

Pembuatan media lengkap

Media lengkap diperlukan terdiri dari faktor pertumbuhan seperti *Fetal bufer serume* (FBS) dan penisilin-streptomisin (CCRC, 2009). Media kultur lengkap yang digunakan terdiri dari *Roswell park memorial Institute* (RPMI) yang mengandung faktor pertumbuhan (*growth factor*) dan asam amino.

Penggunaan penisilin-streptomisin yang merupakan antibiotik spektrum luas yang untuk mengurangi terjadinya kontaminasi baik dari bakteri gram positif maupun gram negatif, antibiotik gentamisin dan streptomisin. Penggunaan antibiotik juga berfungsi untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi. (Freshney, 2005).

FBS merupakan serum yang berasal dari janin sapi. Penambahan serum dalam membuat media lengkap karena serum merupakan sumber mineral lipid, hormon dan banyak diantaranya mengikat protein. Serum ini mengandung faktor pertumbuhan yang dapat membantu proliferasi sel, inaktivator tripsin, dan faktor adhesi Media 1640 RPMI mengandung garam-garam anorganik, asam amino, vitamin-vitamin, dan zat lain seperti d-glukosa. (Sitorus, 2013 ; Freshney, 2005).

Penumbuhan Lini Sel Kanker Payudara MDA-MB231 (*Cell Thawing*)

Sel kanker disimpan dalam tangki nitrogen cair atau (-200°C) atau disimpan dalam suhu -80°C untuk mengawetkan jaringan dan struktur

sel hidup dalam jangka waktu yang lama atau disebut dengan (Jang *et al.*, 2017). Penumbuhan lini sel kanker MDA-MB231 dimulai dengan inkubasi media dalam inkubator CO₂, dengan kandungan CO₂ 5% dan suhu 37°C. Penambahan CO₂ berfungsi untuk menjaga konsentrasi CO₂ dalam sel. Media RPMI menggunakan sistem karboksida karbonat (NaHCO₃) yang sama dengan darah. pH ideal kultur sel adalah 7,4 sehingga ditambahkan CO₂ 5% karena pada konsentrasi ini CO₂ dapat bereaksi dengan Na₂CO₃ (Sitorus, 2013).

Sel kanker yang dalam nitrogen cair dikeluarkan kemudian dicairkan pada suhu 37°C dan di sentrifuga untuk memisahkan sel kanker dengan media. Ssentrifuga dilakukan dengan kecepatan 1500 *rpm* selama 5 menit. Sel kanker di masukkan kedalam media lengkap kemudian di inkubasi pada suhu 37°C dengan gas CO₂ 5%. Dilakukan pengamatan dibawah mikroskop jika sel telalu penuh maka media dan kultur perlu diganti.

Subkultur Sel MDA-MB 231

Sel kanker dibilas menggunakann PBS (*Phosfat Buffer Serum*) yang dapat berfungsi mengangkat sel-sel yang telah mati dan menghilangkan sisa serum pada sel hidup. Selain itu FBS juga berfungsi untuk mempertahankan pH, mengatur tekanan osmose media, dan sebagai sumber ion organik (Sitorus, 2013). Penambahan tripsin EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*) dilakukan untuk melepas sel yang menempel pada dinding flask. Jika sel sudah tidak saling melekat saat diamati dibawah mikroskop selanjutnya ditambahkan media lengkap (Sitorus, 2013). Tripsin merupakan enzim protease yang dpat memotong matriks seluler sel yang

menempel pada dinding flask. Selain itu tripsin juga dapat menoleransi berbagai jenis sel dan tripsin yang tertinggal dalam suspensi sel dapat dinetralkan dengan serum yang ada dalam media (Sitorus, 2013).

Aktivitas tripsin EDTA akan berhenti ketika ditambahkan FBS yang mengandung antitrypsin, perbandingan penambahan Tripsin EDTA : media lengkap adalah 1:1. Selanjutnya dilakukan panen sel. Kultur sel dapat digunakan untuk pengujian jika sudah konfluen 80%.

VI.13 Uji Sitotoksik Metode MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-difenil tetrazolium bromide).

Uji MTT didasarkan pada reduksi garam tetrazolium MTT menjadi formazan yang terjadi di mitokondria sel-sel karena aktivitas dihidrogenase mitokondria (khususnya dehidrogenase suksinat). Terbentuknya reduksi garam kuning tetrazolium dengan intensitas warna ungu yang semakin tinggi menunjukkan jumlah sel hidup semakin banyak (Lidia, Wiktorska and Suchocki, 2016). Metode MTT bisa digunakan untuk mengukur resistensi obat secara *ex-vivo* untuk memprediksi hasil uji klinis, pengujian sensitivitas obat baru, menguji kombinasi obat pada lini sel, dan skrining obat pada lini sel (Meerlo, Kaspers and Cloos, 2011).

Uji sitotoksik metode MTT dilakukan dengan membuat seri konsentrasi larutan uji fraksi n-heksan dan hasil fermentasi n-heksan masing-masing sampel dibuat 8 seri konsentrasi yaitu : 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50ppm, 25 ppm dan 15 ppm. Sampel dilarutkan dalam campuran akudes dan DMSO (*Dimmethyl*

sulfoxide). Konsentrasi DMSO yang digunakan harus kurang dari 2 % karena pada konsentrasi rendah DMSO relatif tidak memberikan efek pada pertumbuhan sel. Penggunaan DMSO yang lebih dari 2% menyebabkan DMSO bersifat sitotoksik (Kusuma, Nurulita and Hartanti, 2010)

Pada larutan sampel digunakan DMSO 1,25%. Selanjutnya dilakukan penambahan fraksi n-heksan dan hasil fermentasi n-heksan. Sel MDA-MB231 dikeluarkan dari inkubator CO₂ dan cairannya dibuang kemudian ditambahkan 200 µL/sumur melalui dinding sumur agar sel yang menempel pada dasar sumuran tidak lepas.

Setelah inkubasi selama 72 jam media dibuang kemudian dicuci dengan PBS, ditambahkan reagen MTT sebanyak 100 µL pada tiap sumuran dan diinkubasi selama 4 jam. Setelah inkubasi selama 4 jam atau sudah terlihat perubahan warna menjadi ungu, selanjutnya ditambahkan dengan *stopper* DMSO sebanyak 100 µL yang berfungsi menghentikan aktivitas MTT. DMSO akan melarutkan kristal ungu formazan yang tidak larut air dan menghentikan aktivitas MTT. Pada saat inkubasi reagen MTT yang berwarna kuning akan bereaksi dengan enzim dehidrogenase suksinat pada mitokondria sel membentuk garam formazan yang berwarna ungu (Freshley, 2013). Setelah ditambahkan *stopper* maka dilakukan pengukuran menggunakan elisa reader pada panjang gelombang 550 nm. Jumlah sel yang hidup sebanding dengan intensitas warna ungu yang terbentuk (Freshley, 2013).

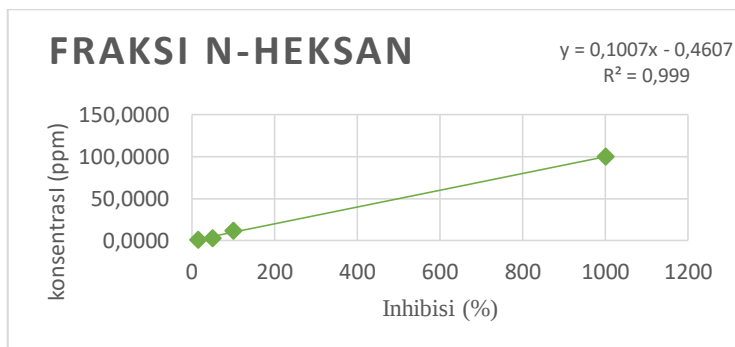
VI.14. Pengolahan dan Analisis Data perhitungan IC₅₀

Hasil pengujian metode MTT diperoleh berupa data IC₅₀. IC₅₀ merupakan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% serta dapat menunjukkan potensi suatu metabolisme senyawa aktif sebagai sitotoksik (Handayani, 2018). Pengolahan data dilakukan dengan menghitung persen viability kemudian menghitung nilai persen inhibisi selanjutnya dibuat grafik antara konsentrasi (x) terhadap persen inhibisi (y) yang menghasilkan persamaan regresi linier (Simorangkir, 2017; Handayani, 2018).

No	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Tingkat Toksisitas
1	< 100	Sitotoksik potensial
2	100-1000	Sitotoksik moderat (sedang)
3	≥ 1000	Tidak Toksik

Tabel VI.1. Tingkat penghambatan berdasarkan nilai IC₅₀

(Soliha, Widiyantoro and Destiarti, 2017)

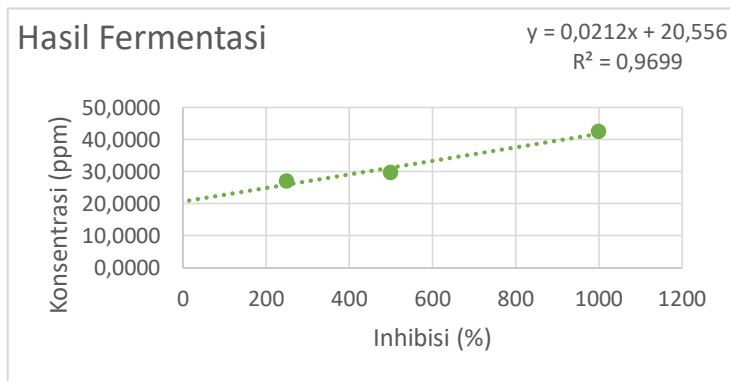


Gambar VI.7 Kurva hasil MTT Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam (Panjang Gelombang 550 nm)

Persamaan Linier	Nilai IC ₅₀
$y = 0,1007x - 0,4607$	$\text{Nilai IC}_{50} = \frac{(50+0,4607)}{0,1007}$ $= 501,099 \text{ ppm}$

Tabel VI.2 Nilai IC₅₀ Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam

Berdasarkan data diatas diketahui nilai IC₅₀ fraksi n-heksan buah ranti hitam adalah sebesar 501,099 ppm. Nilai IC₅₀ ini menurut tabel interpretasi hasil digolongkan termasuk dalam kategori sitotoksik moderat atau memiliki aktivitas sitotoksik sedang terhadap lini sel kanker payudara MDA-MB231.

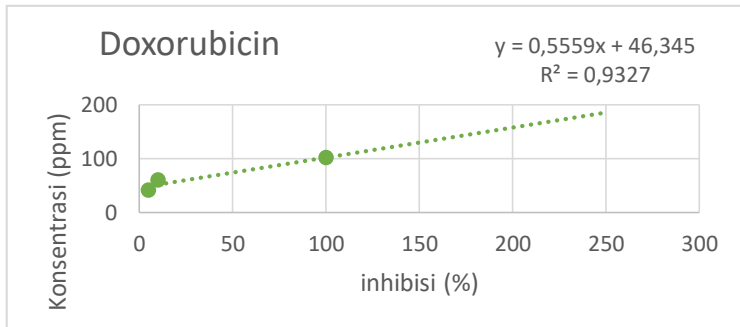


Gambar VI.8 Kurva Hasil MTT Hasil Fermentasi Fraksi N-Heksan Buah Rantti Hitam (Panjang Gelombang 550 nm)

Persamaan Linier	Nilai IC ₅₀
$y = 0,0212 + 20,556$	$\text{Nilai IC}_{50} = \frac{(50+20,556)}{0,0212}$ $= 1388,87 \text{ ppm}$

Tabel VI.3 Nilai IC₅₀ Hasil Fermentasi Fraksi N-Heksan Buah Ranti Hitam

Nilai IC₅₀ hasil fermentasi fraksi n-heksan buah ranti hitam sebesar 1388,87 ppm termasuk dalam kategori tidak toksik atau tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap lini sle kanker payudara MDA-MB231. Terjadi penurunan aktivitas sitotoksik fraksi n-heksan buah ranti setelah proses fermentasi. Hal ini diduga karena proses fermentasi yang kurang optimal diduga karena penggunaan media untuk SCOBY yang berbeda sehingga diperlukan adaptasi yang lebih lama dibandingkan media aslinya (teh). Selain itu juga diduga selama proses ekstraksi senyawa aktif yang memiliki aktivits sitotoksik pada buah ranti hitam tidak terambil dengan maksimal.



Gambar VI.9 Kurva Hasil MTT Doxorubicin (panjang gelombang 550 nm)

Persamaan Linier	Nilai IC ₅₀
$y = 0,5559x + 46,345$	$\text{Nilai IC}_{50} = \frac{(50 - 46,354)}{0,5559}$ $= 6,5747$
	ppm

Tabel V1.4. Nilai IC₅₀ Doxorubicin

Kontrol positif yang digunakan pada pengujian ini adalah doxorubicin. Doxorubicin termasuk golongan antibiotik antasiklin dengan mekanisme kerja sitotoksik yaitu penghambatan replikasi DNA dan penghambatan transkripsi RNA dengan cara berinteraksi dengan DNA, pembentukan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan DNA, oksidasi lipid yang menyebabkan kerusakan membran dan akhirnya penghambatan II. Penghambatan topoisomerase menyebabkan blok resealing DNA, kegagalan super DNA melingkar untuk relaksasi menghambat replikasi dan transkripsi DNA. Ketika untai DNA pecah dapat menyebabkan apoptosis sel

kanker. (Alkuraishy, Al-gareeb and Al-hussaniy, 2017). Nilai IC_{50} doxorubicin sebesar 6,5747 ppm, hasil ini termasuk dalam kategori sitotoksik potensial terhadap lini sel kanker payudara MDA-MB231.