

14/6

**PENGARUH EKSTRAK KLOROFORM TEMU PUTIH  
(*Curcuma zedoaria*) PADA AKTIVITAS  
ENZIM TIROSIN KINASE**

**OLIVIA DEWIYUNI SETIAWAN**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2004**

## ABSTRAK

OLIVIA DEWIYUNI SETIAWAN. Pengaruh Ekstrak Kloroform Temu Putih (*Curcuma zeodaria*) pada Aktivitas Enzim Tirosin Kinase. Dibimbing oleh DYAH ISWANTINI PRADONO dan PURWANTININGSIH SUGITA.

Tirosin kinase memainkan peranan penting dalam perkembangan sel kanker. Suatu zat yang dapat menghambat aktivitas tirosin kinase diharapkan mampu menghambat perkembangan sel kanker. Temu putih merupakan tanaman yang memiliki potensi sebagai tanaman obat kanker melalui senyawa golongan flavonoidnya. Penelitian ini dilakukan untuk mengukur daya inhibisi fraksinasi ekstrak kloroform temu putih.

Rimpang temu putih kering diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan metanol dan menghasilkan ekstrak metanol (34,26%) yang kemudian dipartisi dengan kloroform menghasilkan fraksi kloroform (4,15%). Fraksinasi terhadap fraksi kloroform dilakukan dengan cara kromatografi kolom dengan elusi gradien menghasilkan 26 fraksi gabungan dan 12 di antaranya menunjukkan hasil positif terhadap flavonoid. Selanjutnya dilakukan uji toksisitas dan total fenol untuk mendapatkan fraksi yang akan diuji inhibisinya terhadap enzim tirosin kinase, fraksi terpilih (fraksi 5, 7, dan 15) bersama ekstrak kasar metanol, fraksi kloroform kemudian diuji daya inhibisinya menggunakan kit ELISA dan dibandingkan dengan kontrol positif (genistein). Berdasarkan uji kit ELISA, semua fraksi dan ekstrak yang diuji menghambat aktivitas enzim tirosin kinase dengan daya inhibisi yang lebih besar daripada kontrol positif dan fraksi 15 merupakan fraksi dengan daya inhibisi terbesar.

## ABSTRACT

OLIVIA DEWIYUNI SETIAWAN. Influence of Temu Putih (*Curcuma zeodaria*) Extract to Tyrosine Kinase Enzyme Activity. Under supervision of DYAH ISWANTINI PRADONO and PURWANTININGSIH SUGITA.

Tyrosine kinase plays an important role in cancer cell growth. A substance which can inhibit tyrosine kinase activity is expected to inhibit cancer cell growth. Temu putih is potential as cancer medicine plant due to its flavonoid content. This research measures the capacity of inhibition chloroform extract fraction of temu putih.

Dried rhizome of temu putih was extracted by maceration with methanol and produced methanol extract (34.26%), then the extract was partitioned with chloroform and produced chloroform fraction (4.15%). Fractionation to chloroform fraction was done by column chromatography with gradient elution, produced 26 fraction including 12 fractions that positively contained flavonoid. Total phenol determination and toxicity test was done to get some fraction for inhibition test. Selected fraction (fraction 5, 7, and 15), methanol extract, and chloroform fraction was tested by ELISA kit and the capacity of inhibition was compared with genestein. Based on result of ELISA kit, all fractions and extract inhibited tyrosine kinase enzyme activity higher than the positive control; fraction 15 shared the highest capacity of inhibition.

# **PENGARUH EKSTRAK KLOOROFORM TEMU PUTIH (*Curcuma zedoaria*) PADA AKTIVITAS ENZIM TIROSIN KINASE**

**OLIVIA DEWIYUNI SETIAWAN**

**PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2004**

# **PENGARUH EKSTRAK KLOOROFORM TEMU PUTIH (*Curcuma zeodaria*) PADA AKTIVITAS ENZIM TIROSIN KINASE**

**OLIVIA DEWIYUNI SETIAWAN**

Skripsi  
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains  
Pada  
Program Studi Kimia

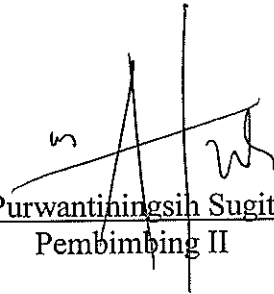
**PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2004**

Judul : Pengaruh Ekstrak Kloroform Temu Putih (*Curcuma zeodaria*) pada  
Aktivitas Enzim Tirosin Kinase  
Nama : Olivia Dewiyuni Setiawan  
NIM : G01499056

Menyetujui,

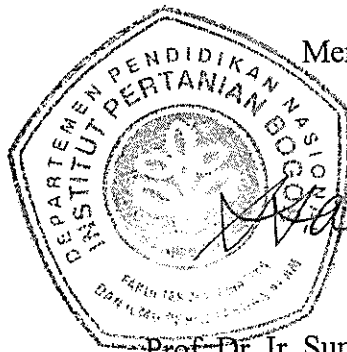


Dr. Dyah Iswantini Pradono, M.Agr  
Pembimbing I



Dr. Purwantiningsih Sugita, MS  
Pembimbing II

Mengetahui,



Prof. Dr. Ir. Suminar Setiati Achmadi  
Ketua Program Studi Kimia

## RIWAYAT HIDUP

Penulis, dilahirkan di Bandung pada tanggal 27 Juni 1981 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara, anak pasangan dari Bambang Budi Setiawan dan Kitawati Laksana.

Pendidikan formal penulis sampai dengan tingkat SMU diselesaikan di Bekasi dan di Tangerang, Banten, yaitu TK Kurnia Bekasi, SD Negeri Bekasi Timur IV Bekasi, SMP Negeri 8 Tangerang, dan SMU Negeri 5 Tangerang dari tahun 1984-1999. Penulis lulus dari SMU pada tahun 1999 dan diterima dari seleksi masuk IPB dan pilihan Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI). Bidang yang diminati ialah Kimia Fisik.

Selama masa studi, penulis menjadi asisten praktikum mata kuliah Kimia Lingkungan Program Studi D3 Analisis Lingkungan, dan Kimia Koloid Program Studi D3 Analisis Kimia. Pada tahun 2002 penulis melakukan praktik lapangan di PT Indocement Tungal Prakarsa Tbk. Citeureup, Bogor.

## PRAKATA

Alhamdulillah robbil'alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini dapat diselesaikan. Penelitian ini telah dilakukan dari bulan April-November 2003 dengan tema yang dipilih ialah pengaruh ekstrak kloroform temu putih (*Curcuma zedoaria*) terhadap aktivitas enzim tirosin kinase. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Kimia Analitik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, dan Laboratorium Biomedis Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian Institut Pertanian Bogor.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Ibu Dr. Dyah Iswanti Pradono, M.Agr dan Ibu Dr. Purwantiningsih Sugita, MS selaku pembimbing atas segala bimbingan, arahan, serta semangat selama penelitian dan dalam penyusunan karya ilmiah ini. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Pak Eman, Pak Dede, Pak Sabur, dan Mas Toni, yang telah membantu selama bekerja di Lab. Mas Heri, Ayu, Tuti, Edit, Filia, Susi, Gelar, Yulia, dan segenap kimia angkatan 36 atas bantuan dan dukungannya.

Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada Bapak, Mamah, Eby, Akbar, dan Kak Harry tersayang yang telah memberikan bantuan materil, doa, dan kasih sayangnya selama penulis kuliah.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Juni 2004

*Olivia Dewiyuni Setiawan*

## DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA .....	i
DAFTAR GAMBAR .....	ii
DAFTAR TABEL .....	ii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ii
PENDAHULUAN .....	1
TINJAUAN PUSTAKA	
Temu Putih .....	1
Kanker .....	2
Enzim Protein Kinase .....	3
Uji Aktivitas Enzim PTK .....	3
BAHAN DAN METODE	
Bahan dan Alat .....	3
Prosedur Penelitian .....	3
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Ekstraksi Flavonoid .....	5
Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	5
Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom .....	6
Penentuan Total Fenol dan Uji LC <sub>50</sub> dengan menggunakan Larva Udang .....	8
Uji Inhibisi terhadap Enzim Tirosin Kinase .....	8
SIMPULAN DAN SARAN	
Simpulan .....	8
Saran .....	8
DAFTAR PUSTAKA .....	8
LAMPIRAN .....	11





## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Profil tumbuhan temu putih ( <i>Curcuma zeodaria</i> (Berg.) Roscoe) .....	2
2. KLT fraksi kloroform rimpang temu putih dengan menggunakan eluen kloroform : etil asetat (7 : 3) .....	6
3. Hasil uji inhibisi pada berbagai fraksi dan ekstrak .....	7
4. Persen inhibisi terhadap enzim tirosin kinase .....	7

## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Nilai Rf pada KLT fraksi larut kloroform dengan menggunakan eluen kloroform : etil asetat (7 : 3) .....	6

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Bagan alir penelitian .....	11
2. Kadar air rimpang temu putih .....	12
3. Hasil uji fitokimia rimpang temu putih .....	12
4. KLT fraksi kloroform rimpang temu putih dengan eluen tunggal .....	13
5. KLT fraksi kloroform rimpang temu putih dengan perbandingan eluen .....	14
6. Hasil penentuan total fenol dan uji LC <sub>50</sub> dengan menggunakan larva udang .....	15
7. Hasil uji inhibisi terhadap enzim tirosin kinase .....	16

## PENDAHULUAN

Temu putih merupakan tanaman yang dianggap mempunyai kemampuan sebagai obat antikanker. Esvandiari (2002) menyimpulkan ekstrak kasar kloroform dan etanol temu putih memiliki potensi menurunkan pertumbuhan khamir *Saccharomyces cerevisiae* melalui kecenderungannya menghambat enzim tirosin kinase, namun tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Rimpang temu putih mengandung hampir semua senyawa metabolit sekunder kecuali tanin. Berdasarkan penelitian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, salah satunya adalah menentukan daya inhibisi ekstrak rimpang temu putih terhadap enzim tirosin kinase.

Enzim tirosin kinase memainkan peranan vital dalam pengaturan pertumbuhan sel dan diferensiasi. Aktivitas tirosin kinase sebagai reseptor faktor pertumbuhan dan produk protein onkogen sangat penting bagi perbanyakan sel. Inhibitor spesifik yang ditargetkan terhadap domain aktivitas tirosin kinase mungkin merupakan obat antiperkembangbiakan yang berpotensi. Salah satu inhibitor tirosin kinase yang telah diketahui ialah isoflavin alami genestein dan daidzein (Blair 1996, Rood 1998), serta tirofostin (Dasgupta 2001).

Tanaman yang diduga berfungsi sebagai antikanker adalah temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe). Tanaman ini termasuk famili Zingiberaceae, sama dengan temulawak yang sudah jauh lebih dikenal. Sebagai tanaman obat, potensi rimpang sebagai antikanker belum banyak diketahui.

Perangkat pengujian Protein Tirosin Kinase (PTK), digunakan untuk pengukuran aktivitas tirosin kinase dari tirosin kinase yang dimurnikan atau dari sampel selama purifikasi, untuk pengkarakterisasian protein tirosin kinase dan penentuan aktivitas protein tirosin kinase dalam sel dan ekstrak jaringan. Fosforilasi protein tirosin kinase menjadi pusat mekanisme yang memediasi peristiwa sinyal transduksi yang terjadi pada hampir di seluruh proses selular. Protein tirosin kinase dianggap memainkan peranan yang penting dalam peristiwa sinyal transduksi yaitu dengan cara mengatur siklus maju sel, regulasi transkripsi, transformasi sel, proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis. Pengukuran aktivitas protein tirosin kinase adalah salah satu syarat utama dalam penelitian transduksi sinyal pada pemurnian dan pengkarakterisasian protein tirosin kinase, penggunaan protein tirosin kinase secara biologi, dan pengembangan inhibitor spesifik protein tirosin kinase (Sigma).

Penelitian ini bertujuan mengetahui daya inhibisi fraksinasi ekstrak kloroform temu putih (*Curcuma*

*zedaria* (Berg.) Roscoe) pada aktivitas enzim tirosin kinase. Hipotesis dari penelitian ini, yaitu komponen flavonoid dalam ekstrak kloroform temu putih berpotensi sebagai inhibitor enzim tirosin kinase. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang kandungan senyawa aktif (flavonoid) dalam rimpang temu putih sehingga dapat digunakan sebagai obat antikanker.

## TINJAUAN PUSTAKA

### Temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe)

Temu putih (*Curcuma zedoaria*) yang memiliki sinonim nama ilmiah *Curcuma zerbumbet* digolongkan dalam klasifikasi botani sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub-Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: Curcuma
Jenis	: <i>Curcuma zedoaria</i> (Berg.) Roscoe

*Curcuma zedoaria* ditemukan di berbagai daerah di Indonesia dengan nama yang beragam, di daerah Sunda tanaman ini memiliki nama koneng tegal dan di Jawa dikenal dengan nama temu putih. *Zeodary* adalah nama asing dari temu putih, sedangkan nama obat patennya adalah Leilipen dan Pao Kwun Tan. Kata *zedoaria* sering disebut juga *zedaria* (Flach & Rumawas 1996).

Temu putih merupakan tanaman semak, tinggi kurang lebih satu meter, dengan batang semu, dan berwarna hijau, di dalam tanah membentuk rimpang. Daun berjenis tunggal, bentuk lonjong dengan ujung meruncing, pangkal tumpul, berbulu halus, warna hijau bergaris ungu. Bunganya adalah bunga majemuk, berbentuk tabung, mahkota lonjong, dan berwarna putih. Buah berbentuk kotak, bulat, warna hijau. Biji bulat berwarna hitam (Syukur & Hernani 2001).

Rimpang temu putih mengandung beberapa senyawa kimia, diantaranya minyak atsiri zingiberin, sineol, prokurkumenol, kurkumenol, kurkumadiol, kurkumol, isofuranogermakrena, zederona, zat pati, minyak lemak, hars, dan lendir (Wijayakusuma

1997). Senyawa yang terkandung dalam temu putih merupakan turunan *germacrane*, *elemane*, *cadinane*, *eudesmane*, *guaiane*, dan tipe rangka lain (Tang & Eisenbrand 1992).



Gambar 1. Profil tumbuhan temu putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe)

Tanaman temu putih ini memiliki beberapa khasiat diantaranya adalah sebagai antineoplastik, kholeretik, stomakik, antiflogistik, antipiretik (Soedibyo *et al.* 1998), sebagai antiinflamasi (Iswari 1997) dan sebagai pelega perut (Hutapea *et al.* 1993). Secara empiris, rimpang temu putih digunakan sebagai antiinflamasi (Utami 2000), antikanker, melancarkan sirkulasi darah, bersifat fibrinolitik, dan antineoplastik. Melalui minyak atsiri yang dikandungnya, temu putih berpotensi sebagai zat antioksidan (Chyau *et al.* 2002). Prof Chan Minyi (2001) melalui penelitiannya menyatakan bahwa temu putih memiliki kemampuan untuk mencegah dan menyembuhkan kanker, tumor, dan rakhitis dikarenakan mengandung RIP (*ribosome inactivating protein*) yang dapat mengganggu dan merusak perkembangan sel kanker. Ekstrak kasar metanol rimpang temu putih dilaporkan mampu menghambat *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), (Jang *et al.* 2001). Ekstrak kasar *Curcuma zedoaria* dilaporkan mampu menghambat enzim HMG Co-A reduktase (Liu *et al.* 2003). Selain itu, temu putih sering dipadu dengan kunir putih; paduan ini dapat menyembuhkan kanker, peradangan dalam, dan anti lemak (Departemen Kesehatan 1999).

### Kanker

Tumor ialah istilah umum untuk menunjukkan adanya pertumbuhan tidak normal suatu massa atau jaringan. Tumor terbentuk karena adanya mutasi pada biosintesis sel, yaitu kekeliruan DNA karena terpotong, tersubstitusi, atau ada pengaturan kembali,

adanya adisi dan integrasi bahan genetik virus baru ke dalam gen sel, dan adanya perubahan ekspresi gen. Tumor yang membahayakan atau *malignant tumor* disebut kanker (Siswandono & Soekardjo 1995), sedangkan penyebab kanker, seperti virus-virus tertentu, senyawa kimia seperti hidrokarbon aromatik polisiklik, dan aflaktoksin, disebut karsinogenik.

Kanker adalah sekelompok penyakit yang disebabkan oleh sel-sel abnormal yang tumbuh dan berkembang biak secara cepat dan tak terkendali. Kelompok sel ini yang akhirnya meyerang dan merusak jaringan tubuh yang sehat (Wijayakusuma 1997). Sedangkan menurut Schunack *et al.* (1990), kanker ialah pembentukan baru jaringan ganas dari sel tubuh yang sebelumnya normal. Ciri utamanya adalah perubahan yang diatur sendiri, lepas dari mekanisme pengendali yang lebih tinggi dari organisme. Dalam keadaan normal selnya akan membelah diri bila badan membutuhkan, umpamanya ada sel-sel yang perlu diganti karena mati atau rusak. Sedangkan, sel kanker akan membelah diri meskipun tak diperlukan, sehingga terjadi sel-sel baru yang berlebihan. Sel-sel baru mempunyai sifat seperti induknya yang sakit yaitu sel-sel yang tidak mempunyai daya atur (Mulyadi 1997). Dalam kasus kanker, ada indikasi terjadinya peradangan lantaran aktivitas sel kanker masuk ke dalam jaringan lewat pembuluh darah. Kondisi tersebut memicu terjadinya perdarahan dan infeksi (Iswari 1997).

Golongan flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas biologis yang berbeda-beda dan memiliki kegunaan yang bermacam-macam. Aktivitas tersebut antara lain sebagai anti-viral, anti-fungal, anti-inflamatori, dan aktivitas yang bersifat toksik (Claustro 1985). Flavonoid tumbuhan dapat menimbulkan gangguan besar karena kemampuannya membentuk kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen. Beberapa flavonoid menghambat fosfodiesterase, aldoreduktase, monoamina oksidase, protein kinase balik transkriptase, DNA polimerase, dan lipooksigenase (Harborne 1996). Bila kandungan sel tumbuhan bercampur dan membran menjadi rusak selama proses isolasi, golongan flavonoid cepat sekali membentuk kompleks dengan protein, akibatnya, sering menghambat kerja enzim. Dalam penghambatan kanker yang disebabkan benzo(a)pirena, diduga golongan flavonoid berperan dalam menghalangi terjadinya ikatan



antara benzo(a) pirena dengan DNA (Le Bon 1993).

Penelitian tentang tumbuhan yang mengandung flavonoid dan berpotensi menghambat kanker melalui senyawa flavonoid banyak dilakukan, teh yang komponen utamanya banyak mengandung senyawa golongan flavonoid mampu menghambat kanker (Chen & Han 2000). Tanaman lain yaitu *Rubus idaeus* dilaporkan memiliki kandungan flavonoid yang tinggi, kapasitas antioksidan yang besar dan mampu menghambat sel kanker (Weber & Liu 2004).

#### Enzim Protein Tirosin Kinase (PTK)

Aktivitas banyak enzim, protein target, dan saluran membran diatur oleh fosforilasi, suatu tipe modifikasi kovalen bolak-balik yang umum. Enzim yang mengkatalisis reaksi seperti ini disebut protein kinase. Terdapat dua kelompok protein kinase (Mahlmann 2000):

- (1) Protein kinase yang memfosforilasi jenis spesifik residu serin dan treonin.
- (2) Protein kinase yang memfosforilasi jenis spesifik residu tirosin.

Akseptor dalam reaksi fosforilasi protein terjadi dalam sel ketika jumlah ATP berlimpah. Dalam reaksi fosforilasi, gugus terminal (gama) fosforil milik ATP ditransfer ke gugus serin, treonin, atau tirosin. Enzim PTK adalah enzim yang mengkatalisis transfer gugus fosforil dari ATP ke tirosin pada substrat protein yang mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi substrat (O'Dwyer *et al.* 2000). Enzim PTK (EC 2.7.1.112) dikenal juga dengan berbagai nama seperti tirosilprotein kinase, protein kinase (tirosin), ataupun gen lck tirosin kinase. Mutasi yang menyebabkan aktivitas tirosin kinase yang tidak terkontrol akan mengakibatkan kanker (Mahlmann 2000).

#### Uji Aktivitas Enzim PTK

Penelitian ini menggunakan uji aktivitas enzim dengan memakai metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). ELISA merupakan metode yang paling luas digunakan untuk menguji yang dikenal dengan *enzyme immunoassay* (EIA). Terdapat dua teknik dasar yaitu, *direct* ELISA yang mendeteksi antigen dan *indirect* ELISA yang mendeteksi antibodi. Metode ini menggunakan mikrotiter plate yang terdiri dari sejumlah sumur yang dangkal. Prosedur dengan ELISA lebih diutamakan karena dalam pengerjaannya tidak membutuhkan keahlian khusus dan hasil uji dapat menunjukkan positif dan negatif dengan jelas. Selain itu metode ELISA memiliki kesensitifan dan kespesifikan yang tinggi (Voller *et al.* 1979). Beberapa keuntungan dari prosedur ini adalah kespesifikan dan kesensitifan yang tinggi dibandingkan dengan metode radioaktif,

pengujian yang mudah dan dapat dipercaya, penunjukkan yang cepat dan ukuran komponen yang tepat untuk penanganan yang mudah. Selain itu, jika dibandingkan dengan metode radioaktif metode ini lebih aman.

Sistem peralatan pengujian Protein Tirosin Kinase (PTK) untuk penentuan aktivitas protein tirosin kinase secara *in vitro* didasarkan pada uji ELISA yang menggunakan mikropelat yang dilapisi dengan substrat polimer PTK yang spesifik. Mikropelat dilapisi dengan substrat polimer acak sintetik poli-Glu-Tyr (PGT) yang mengandung residu tirosin. Reaksi fosforilase dimulai dengan penambahan PTK dalam bufer tirosin kinase. Substrat polimer terfosforilasi diperiksa dengan antibodi monoklonal spesifik fosfotirosin murni yang mengkonjugasikan *horseradish peroxidase* (HRP). Warna terbentuk oleh substrat kromogenik HRP (OPD). Warna yang terbentuk dikuantisasi dengan spektrofotometri dan menggambarkan jumlah relatif aktivitas tirosin kinase dalam sampel (kualitatif). Aktivitas protein tirosin kinase dalam sampel (kuantitatif) didapat dari kontrol EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) atau perhitungan grafik aktivitas EGFR pada panjang gelombang 492 nm terhadap unit aktivitas EGFR (Sigma).

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan ialah rimpang temu putih, metanol, kloroform, serbuk magnesium, HCl, etanol, amil alkohol, etanol, air, etil asetat,  $H_2SO_4$  2 M, reagen folin-ciocalteau,  $Na_2CO_3$ , silika gel 60, larva udang, air laut, kit untuk uji aktivitas enzim tirosin kinase dengan metode ELISA, dan akuades

Alat yang digunakan ialah alat-alat gelas, alat-alat ekstraksi, *rotary evaporator*, tabung mikrofuse, mikrofuse, inkubator, mikropipet, *Spektronic 20*, dan peralatan ELISA.

### Prosedur Penelitian

#### Ekstraksi Flavonoid

Rimpang Temu Putih diiris tipis, kemudian dikeringkan dengan oven bersuhu 40 °C selama tiga hari sampai diperoleh kadar air 10%, kemudian rimpang kering dihaluskan dengan menggunakan blender. Ekstraksi flavonoid dilakukan dengan cara maserasi dan partisi.

Sebanyak 150 g serbuk diekstraksi dengan maserasi menggunakan metanol sebagai pelarut dan diulang ampasnya sampai filtrat menunjukkan hasil uji negatif pada uji umum flavonoid (3x450 ml). Ekstrak kemudian dipekatkan dengan *rotavapour*. Ekstrak yang sudah pekat kemudian dipartisi dengan menggunakan pelarut kloroform. Kemudian setelah terbentuk dua fraksi, setiap fraksi dipekatkan dan dikeringkan.

#### Uji Flavonoid

Sebanyak 5 ml filtrat ditambahkan serbuk magnesium (0.5 g), 1 ml alkohol klorhidrat (campuran asam klorida 37% dan etanol 95% dengan volume sama), dan 10 ml amil alkohol, kemudian dikocok kuat-kuat. Terbentuknya warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya golongan flavonoid.

#### Penentuan Total Fenol

Sebanyak 5 mg ekstrak kering dilarutkan dalam 2 ml etanol 95% kemudian ditambahkan 5 ml aquades dan 0,5 ml reagen folin-ciocalteau 50% (v/v), lalu didiamkan 5 menit. Setelah itu ditambahkan 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% (b/v), lalu dihomogenisasi dan diinkubasi dalam gelap selama 1 jam. Kemudian dihomogenisasi kembali dan diukur pada panjang gelombang 725 nm dan 760 nm.

#### Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil fraksinasi kloroform dianalisis menggunakan pelat KLT silika gel 60 GF<sub>254</sub> dengan berbagai sistem eluen yang berbeda-beda tingkat kepolarannya, yaitu air, metanol, etanol, etil asetat dan kloroform, dalam berbagai perbandingan sampai didapatkan kombinasi eluen terbaik.

Setelah dielusi, plat KLT dikeringkan. Untuk melihat pola pemisahannya, plat tersebut dideteksi dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

#### Uji Toksisitas Larva Udang (*Artemia salina*)

Telur udang ditetaskan dalam gelas piala berisi 200 ml air laut dan dilengkapi dengan aerator. Setelah dua hari, telur udang akan menetas menjadi *naupili* atau larva udang. Ekstrak kasar ditimbang dan dilarutkan dalam air laut sehingga didapatkan konsentrasi lebih kurang 500, 1000, 3000, dan 5000 ppm. Sebanyak lebih kurang 10 ekor larva udang ditempatkan pada masing-masing sumur yang telah berisi ekstrak. Jumlah larva udang yang mati dihitung setelah 24 jam. Data yang didapat dianalisis menggunakan program 'Analisis Probit Quant' dengan derajat kepercayaan 95% untuk mendapatkan nilai

LC<sub>50</sub>. Sebagai kontrol digunakan air laut tanpa penambahan ekstrak (Meyer *et al.* 1982). Uji toksisitas larva udang dilakukan terhadap ekstrak metanol, ekstrak kloroform, dan beberapa fraksi hasil kromatografi kolom.

#### Kromatografi Kolom

Pemisahan ekstrak dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan silika gel sebagai fase diamnya. Sedang fase gerak menggunakan kloroform, etil asetat, dan metanol. Fraksi yang keluar ditampung tiap volume 10 ml, atau pada saat pita fraksi tertentu muncul. Setiap fraksi dianalisis dengan kromatografi lapis tipis dengan eluen yang sesuai. Noda pada kromatografi lapis tipis divisualisasi dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Fraksi dengan noda yang sama dikumpulkan dan kemudian dipekatkan.

#### Pelapisan 96-wells Microtiter Plate

Peralatan uji PTK disediakan dengan sumur yang dapat dipindahkan sehingga pengujian dapat dilakukan hanya dengan jumlah sumur yang diperlukan dalam percobaan khusus. Dianjurkan hanya melapisi jumlah sumur yang diperlukan dalam pengujian tersebut.

Pelapisan dilakukan dengan cara-cara berikut. Plastik penutup dilepaskan dari tempatnya, kemudian tempatkan sejumlah sumur yang diperlukan dalam tempatnya (*well holder*) dan kembalikan strip yang tak digunakan ke dalam plastik bag. Sampel larutan stok substrat PTK dicairkan dan sebanyak 125  $\mu\text{l}$  substrat PTK ditambahkan ke dalam masing-masing sumur, lalu mikropelat ditutup. Kemudian pelat diinkubasi sepanjang malam pada suhu 37 °C, jika diperlukan, waktu pelapisan dapat diperpendek menjadi empat jam. Setelah itu, larutan pelapis dibuang dan masing-masing sumur dicuci dengan 200  $\mu\text{l}$  bufer pencuci (PBS-Tween 20), kemudian bufer pencuci dibuang dan sumur dikeringkan selama dua jam dengan suhu 37 °C.

#### Pengujian Protein Tirosin Kinase

Pelarut bufer tirosin kinase (BTK) dengan konsentrasi 1x dibuat dengan cara, sebanyak 1 ml BTK konsentrasi 10x dilarutkan dengan 9 ml air deionisasi. Sebanyak 5  $\mu\text{l}$  EGFR (20U) dicairkan, kemudian ditambah 95  $\mu\text{l}$  BTK (1x), campuran diaduk dan disimpan dalam es.

Larutan stok ATP dicairkan, kemudian sebanyak sebanyak 40 µl larutan ATP ditambahkan pada 1 ml BTK (1x), dicampurkan dan disimpan di es. Sebanyak 90 µl BTK (1x) yang mengandung ATP dimasukkan ke dalam masing-masing sumur. Sebagai blanko digunakan 20 µl BTK (1x) yang dimasukkan ke dalam sumur. Sedangkan untuk kontrol digunakan EGFR sebanyak 20 µl (4U) dan sampel yang diuji, dilarutkan dengan perbandingan 1:1 atau 1:2 dan seterusnya dalam BTK. Konsentrasi akhir ATP dalam reaksi PTK adalah 0,3 mM. Setelah itu sumur-sumur ditutup dan diinkubasi pada temperatur kamar selama 30 menit. Campuran dikeluarkan dari masing-masing sumur, dan sumur dicuci dengan 200 µl bufer pencuci dengan lima kali pengulangan. Setelah itu sebanyak 100 µl larutan antibodi conjugate dengan pelarutan yang tepat dimasukkan ke dalam sumur. Sumur ditutup dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur ruangan. Larutan substrat peroksidase segar dibuat dengan cara pelarutan satu tablet OPD dan satu tablet urea hidrogen peroksida dalam 20 ml air deionisasi, dicampurkan sampai larut dan hindarkan dari cahaya sampai digunakan, larutan ini tidak untuk disimpan. Setelah itu, larutan antibodi dikeluarkan dari sumur, kemudian masing-masing sumur dicuci dengan 200 µl bufer pencuci, pencucian dilakukan lima kali. Kemudian, sebanyak 100 µl larutan substrat OPD segar ditambahkan pada masing-masing sumur dan diinkubasi selama tujuh menit dalam keadaan gelap dan suhu ruangan. Warna oranye-kuning akan muncul dalam sumur yang positif. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 µl  $H_2SO_4$  2,5 N pada masing-masing sumur. Sumur diukur serapannya 492 nm. Pengukuran harus dalam waktu 30 menit dalam mikroplat ELISA yang ditetapkan pada dari penambahan larutan penghenti.

Kurva aktivitas PTK dapat dibuat dengan kontrol EGFR, dilakukan dengan proses yang sama, hanya adanya modifikasi pada konsentrasi EGFR. Sebanyak 5 µl EGFR (20U) dicairkan dan ditambah 45 µl BTK 1x, kemudian dicampurkan. Ini menunjukkan pada 8U EGFR/20 µl, dibuat seri larutan dari EGFR dengan BTK sehingga mewakili 0,25U, 0,5U, 1U, 2U, dan 4U EGFR.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah rimpang yang dikeringkan. Pengeringan dilakukan dengan oven bersuhu 40 °C selama 3 hari sampai memiliki kadar air 9,76%. Proses ini dilakukan untuk mencegah terjadinya perubahan kimia. Bagian

tumbuhan yang sudah benar-benar kering masih dapat dianalisis walaupun telah disimpan dalam jangka waktu yang lama. Analisis flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan quinon dapat dilakukan pada bagian tumbuhan yang telah disimpan bertahun-tahun (Harborne 1996).

### Ekstraksi Flavonoid

Ekstraksi flavonoid dilakukan dengan proses maserasi dan menggunakan metanol teknis sebagai pelarut. Proses maserasi dengan menggunakan metanol dilakukan mengingat proses ini mampu mengekstrak golongan senyawa polar dan semipolar, sehingga bisa didapatkan rendemen yang besar. Metanol teknis digunakan dengan alasan bahwa metanol teknis masih mengandung air yang bisa digunakan untuk memecah dinding sel pada serbuk rimpang temu putih. Serbuk rimpang temu putih yang telah melalui proses pengeringan sebanyak 160,66 gram dimaserasi dengan metanol teknis, selama 24 jam dengan pengulangan berdasarkan adanya flavonoid. Ekstrak metanol yang dihasilkan ampas atau residu sebanyak 149,60 gram dan fraksi larut metanol yang berbentuk *oily* berwarna coklat dengan berat 55,05 gram (34,26%). Fraksi larut metanol kemudian direndam dengan metanol selama semalam dan diperoleh fraksi larut metanol yang berwarna coklat kemerahan dan fraksi tidak larut metanol yang berwarna coklat dalam bentuk padatan dengan bobot 3,25 gram (2,02%).

Proses selanjutnya adalah partisi fraksi larut metanol dengan kloroform yang diasamkan dengan asam sulfat 2 M, pengasaman ini dimaksudkan untuk memisahkan kelompok senyawa yang memiliki kepolaran rendah dan kepolaran tinggi. Fraksi larut kloroform merupakan fraksi yang terdiri dari kelompok senyawa yang memiliki kepolaran rendah dihasilkan sebanyak 6,67 gram (4,15%), sedangkan fraksi yang tertinggal dalam metanol mempunyai bobot 8,80 gram (5,48%). Uji flavonoid terhadap kedua fraksi tersebut menunjukkan uji yang positif. Fraksi larut kloroform kemudian difraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom.

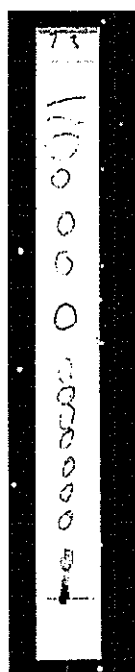
### Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT yang dilakukan pada tahap pertama adalah untuk menentukan eluen yang terbaik untuk memisahkan komponen-komponen yang terdapat pada ekstrak kloroform. Eluen yang



digunakan adalah air, metanol, etanol, kloroform, etil asetat, eter, aseton, dan heksana.

Pada kromatogram KLT (Lampiran 4) terlihat bahwa pemisahan terhadap komponen aktif fraksi kloroform menghasilkan spot yang banyak dengan menggunakan eluen kloroform dan etil asetat, kedua eluen ini merupakan jenis pengembang dengan kepolaran rendah. Sedangkan bila eluen yang digunakan adalah etanol, metanol, air (kepolaran tinggi) dan heksana, aseton (non polar) pemisahan tidak baik karena komponen tidak terpisah. Penampakan warna dilihat dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Berdasarkan pemisahan yang terbaik pada eluen tunggal maka dicoba menggunakan gabungan eluen dengan berbagai perbandingan.



Gambar 2. KLT fraksi kloroform rimpang temu putih dengan menggunakan eluen kloroform : etil asetat (7 : 3).

Eluen kloroform dan etil asetat dengan perbandingan tertentu menghasilkan pemisahan yang terbaik pada perbandingan kloroform : etil asetat (7 : 3). Pemisahan dengan menggunakan eluen tersebut menghasilkan 13 spot. Eluen ini dipilih sebagai eluen terbaik sebagai dasar pemisahan pada metode kromatografi kolom.

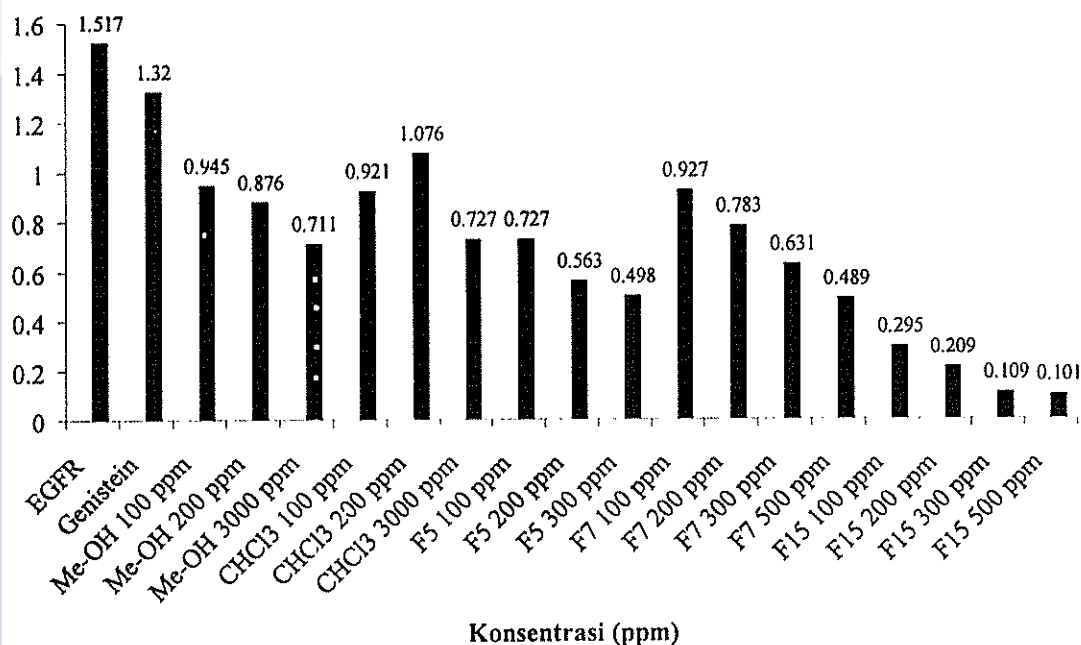
Tabel 1 . Nilai Rf pada KLT fraksi larut kloroform dengan menggunakan eluen Kloroform : etil asetat (7 : 3)

Spot ke-	Nilai Rf
1	0,07
2	0,13
3	0,18
4	0,22
5	0,27
6	0,30
7	0,34
8	0,38
9	0,47
10	0,56
11	0,63
12	0,71
13	0,76

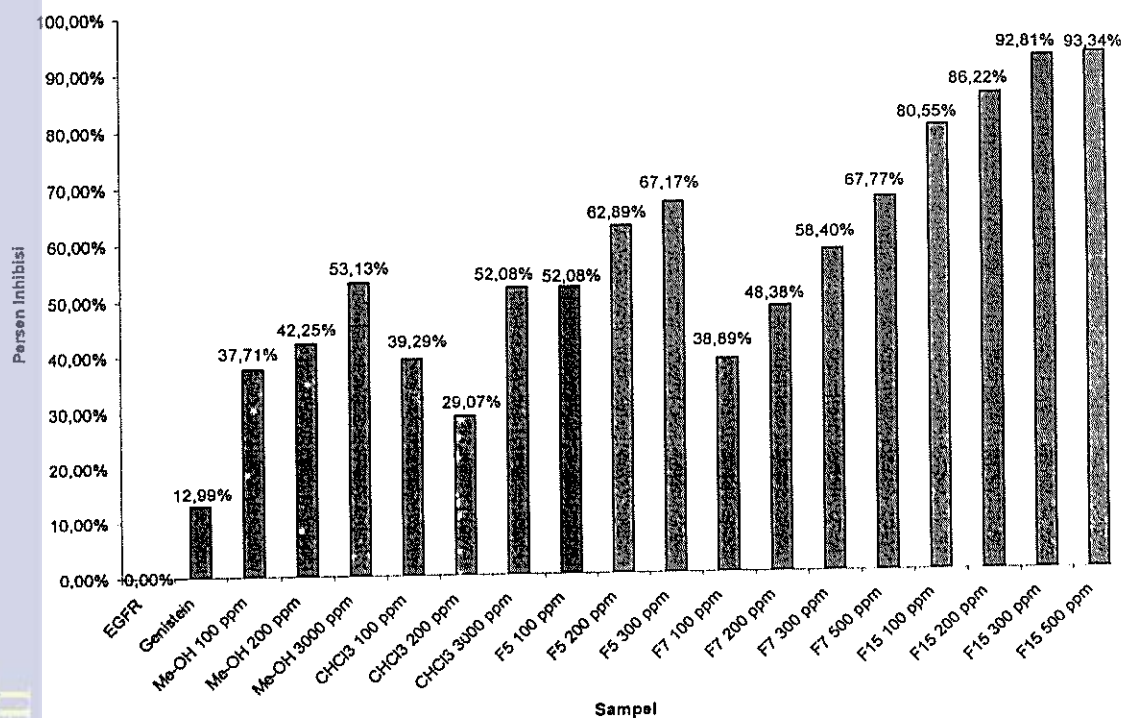
#### Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Fraksinasi dilakukan berdasarkan sifat kepolaran dari komponen yang akan dipisahkan. Pemisahan fraksi kloroform rimpang temu putih dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan eluen kloroform, etil asetat, dan metanol yang digunakan dengan cara gradien berdasarkan urutan kepolaran dari kepolaran rendah samapai kepolaran yang tinggi.

Kromatografi kolom menggunakan kolom gelas dengan diameter 3,0 cm dan panjang kolom 100 cm yang diisi dengan fase diam silika gel G-60 berukuran halus sebanyak 250 gram. Fraksi kloroform yang dimasukkan sebanyak 4,02 gram terlebih dahulu dilarutkan dalam 5 mL kloroform dan dimasukkan ke dalam kolom melalui bagian atas secara merata. Elusi dilakukan dengan eluen kloroform, kloroform : etil asetat (berbagai nisbah), etil asetat, etil asetat : metanol (berbagai nisbah), dan metanol. Eluat ditampung ke dalam tabung reaksi setiap  $\pm 10$  ml. Fraksi digabung setelah melihat pola KLT (nilai Rf dan warna spot) dengan eluen kloroform : etil asetat (7:3). Fraksi gabungan hasil kromatografi diperoleh sebanyak 26 fraksi dan 12 diantaranya memiliki intensitas flavonoid yang tinggi. Selanjutnya ke 12 fraksi tersebut diuji LC<sub>50</sub> dengan menggunakan larva udang dan dilakukan penentuan total fenol.



Gambar 3. Hasil uji inhibisi pada berbagai fraksi dan ekstrak.



Gambar 4 . Persen inhibisi terhadap enzim tirosin kinase pada ekstrak dan fraksi temu putih.



### Penentuan Total Fenol dan Uji LC<sub>50</sub> dengan Menggunakan Larva Udang

Penentuan total fenol dan uji toksisitas dilakukan dengan tujuan untuk memilih ekstrak dan fraksi yang akan diuji secara *in vitro*. Lampiran 6. menampilkan hasil uji larva udang dan penentuan total fenol.

Ekstrak atau fraksi yang dipilih adalah yang memiliki kandungan fenol yang cukup tinggi dengan kandungan flavonoidnya yang cukup tinggi. Selain itu, toksisitas yang rendah menjadi faktor klasifikasi pemilihan. Lampiran 6 menunjukkan bahwa ekstrak kloroform merupakan ekstrak yang mempunyai kandungan flavonoid sangat tinggi ditunjukkan dengan nilai total fenol pada uji total fenol dengan absorbansi 3,00, kandungan flavonoid yang tinggi ini dikarenakan banyaknya flavonoid yang terekstrak pada kloroform lebih pekat dibandingkan dengan ekstrak metanol, dengan nilai absorbansi 2,00.

Pemisahan lebih lanjut terhadap fraksi larut kloroform menghasilkan berbagai fraksi yang mempunyai kandungan flavonoid yang lebih rendah daripada fraksi larut kloroform. Kandungan flavonoid yang tinggi diantara fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom ada pada fraksi 5, fraksi 7 dan fraksi 15 yang masing-masing memiliki absorbansi 0,740 A, 1,658 A, 0,921 A. Ekstrak metanol, fraksi larut kloroform dan ketiga fraksi tersebut mempunyai toksisitas yang relatif rendah, sehingga ekstrak metanol, ekstrak kloroform, fraksi 5, fraksi 7 dan fraksi 15 dipilih untuk diuji daya inhibisinya terhadap enzim tirosin kinase.

### Uji Inhibisi terhadap Enzim Tirosin Kinase

Uji inhibisi terhadap enzim tirosin kinase dilakukan pada ekstrak atau fraksi yang terpilih seperti pada ekstrak metanol, ekstrak kloroform, fraksi 5, fraksi 7 dan fraksi 15 yang dibandingkan dengan kontrol positif (genestein) dan kontrol negatif (EGFR). Konsentrasi ekstrak atau fraksi disesuaikan dengan nilai toksisitasnya, yaitu konsentrasi yang lebih rendah dari nilai LC<sub>50</sub>, kecuali pada ekstrak kasar ditambah dengan konsentrasi 3000 ppm, dengan maksud untuk membandingkan antara daya hambat terhadap *Saccharomyces cerevisiae* dengan daya hambat terhadap enzim tirosin kinase. Hasil uji ditampilkan pada Gambar 3. dan Gambar 4.

Gambar 3 menampilkan pengaruh ekstrak metanol, ekstrak kloroform, serta fraksi 5, fraksi 7, dan fraksi 15. Daya inhibisi yang tinggi ditentukan dengan semakin sedikitnya produk yang ditunjukkan oleh rendahnya absorbansi (Gambar 4). Hasil uji menunjukkan bahwa semua ekstrak dan fraksi yang diuji menghambat aktivitas enzim tirosin kinase atau bersifat inhibitor. Urutan ekstrak atau fraksi yang berdaya inhibisi dari yang tertinggi sampai yang

terendah adalah fraksi 15 (500 ppm) > fraksi 15 (300 ppm) > fraksi 15 (200 ppm) > fraksi 15 (100 ppm) > fraksi 7 (500 ppm) > fraksi 5 (300 ppm) > fraksi 5 (200 ppm) > fraksi 7 (300 ppm) > metanol 3000 ppm > fraksi 5 dan kloroform (100 ppm) > fraksi 7 (200 ppm) > metanol 200 ppm > kloroform 100 ppm > fraksi 7 (100 ppm) > metanol 100 ppm > kloroform 200 ppm. Fraksi 15 merupakan fraksi yang paling tinggi daya inhibisinya yaitu mampu menghasilkan produk sebesar 6,66% dibandingkan dengan kontrol negatif. Jika dibandingkan dengan kontrol positif, semua ekstrak dan fraksi yang diuji menunjukkan daya inhibisi yang lebih besar. Semakin tinggi konsentrasi maka daya inhibisinya semakin tinggi pula. Berdasarkan tingkat kemurnian fraksi yang merupakan hasil kromatografi kolom yang lebih murni menunjukkan daya inhibisi yang lebih tinggi.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Rimpang temu putih berpotensi menghambat aktivitas enzim tirosin kinase. Ekstrak metanol, ekstrak kloroform, fraksi 5, fraksi 7, dan fraksi 15 yang memiliki kandungan flavonoid yang tinggi mempunyai daya inhibisi yang lebih tinggi dibandingkan dengan genistein sebagai kontrol positif. Fraksi 15 mempunyai daya inhibisi yang tertinggi, dengan konsentrasi 500 ppm dapat menghambat aktivitas enzim tirosin kinase sebesar 93,34%. Penghambatan aktivitas enzim tirosin kinase dipengaruhi oleh konsentrasi dan kandungan flavonoid.

### Saran

Perlu dilakukan pencirian beberapa fraksi yang memiliki daya inhibisi tinggi dari temu putih dengan Spektroskopi Ultraviolet dan Tampak, Inframerah, Resonansi Magnetik Nuklir, Kromatografi gas dan Spektrometri Massa dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Selain itu, perlu dilakukan pengujian terhadap sel kanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Blair HC. 1996. Action of Genistein and Other Tyrosine Kinase Inhibitors in

Preventing Osteoporosis, oral abstract. Di dalam *Soy and Bone Health*. Brussel: Second International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Diseases.

Chyau CC, JL Mau, CC Chen, & CH Chang. 2002. *Composition and antioxidant activity of the essential oil from Curcuma zedoaria*. [http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper\\_10795.htm](http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_10795.htm) [20 Oktober 2003].

Chen J, C Han. 2000. The Protective Effect of Tea on Cancer : Human Evidence. Di dalam *Phytochemicals As Bioactive Agents*. Basel: Technomic Publishing Co., Inc.

Departemen Kesehatan RI. 1993. *Tanaman Obat Keluarga (TOGA)*. Ed. Ke-3. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.

Esvandiary. 2002. Pengaruh Ekstrak Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Christ.) Rosc.) dan Kunir Putih (*Curcuma mangga* Val.) pada Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* (*The Effect of Temu Putih and Kunir Putih Extracts on Growth of Saccharomyces cerevisiae*). Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Flach M & F Rumawas. 1996. *Plant Resources of South East Asia: Plants Yielding Non-seed Carbohydrates*. V.9. Bogor: Prosea.

Harborne JB. 1996. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Menganalisis Tanaman*. Terjemahan K. Padmawinata & I Sudiro. Bandung: Penerbit ITB.

Hutapea JR, dkk. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (III)*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Iswari D. 1998. *Seri Pengalaman Obat Tradisional*. Jakarta: PT Niaga Swadaya.

Jang MK, Sohn DH, Ryu JH. 2001. *A curcuminoid and sesquiterpenes as inhibitors of macrophage TNF  $\alpha$  release from Curcuma zedoaria*. *Planta Med*. 2001 Aug;67(6):550-2

Le Bon AM, L Ziegler, M Suschetet & GR Fenwick. 1993. Comparison of Hydroxylated and non Hydroxylated natural flavonoid as in vitro modulator of rat hepatic benzo(a)pyrene metabolism. Editors KW Waldron & IT Johnson.

Royal Society of Chemistry, Cambridge. 217-222 Paris: INRA Toxycologic Nutritionelle.

Liu, J Chi, P Chan, FL Hsu, YJ Chen, MH Hsieh, MY Lo and JY Lin. 2003. *The In Vitro Inhibitory Effects of Crude Extracts of Traditional Chinese Herbs on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme a Reductase on Vero Cells*.

Mallmann S. 2000. *Signaling by Tyrosin Kinase on Regular and Disrupted Hematopoiesis*. Swiss: Brussel Institute for Immunology.

Mulyadi. 1997. *Kanker: Karsinogen, Karsinogenesis dan Antikanker*. Yogyakarta: PT Tiara Wacana Yogya.

O'Dwyer ME & BJ Druker. 2000. *The Role of Tyrosin Kinase Inhibitor ST1571 in the Treatment of Cancer*. Portland: Leukemia Program, Oregon Health Sciences University.

Rood L. 1998. The possible role of soy in breast cancer prevention and treatment. *Nutrition Bytes* 4(1):1-5.

Schunak W, K Mayer & M Haake. 1990. *Senyawa Obat*. Edisi ke-2. Terjemahan J Wattimena & S Soebito. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

Siswandono & B Soekardjo. 1995. *Kimia Medisinal*. Surabaya: Airlangga University Press.

Soedibyo M. 1993. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (II)*. Jakarta: Depkes RI.

Syukur C & Hernani. 2001. *Budi Daya Tanaman Obat Komersial*. Bogor: Penebar Swadaya.

Tang W & G Eisenbrand. 1992. *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine*. Berlin: Springer Verlag.

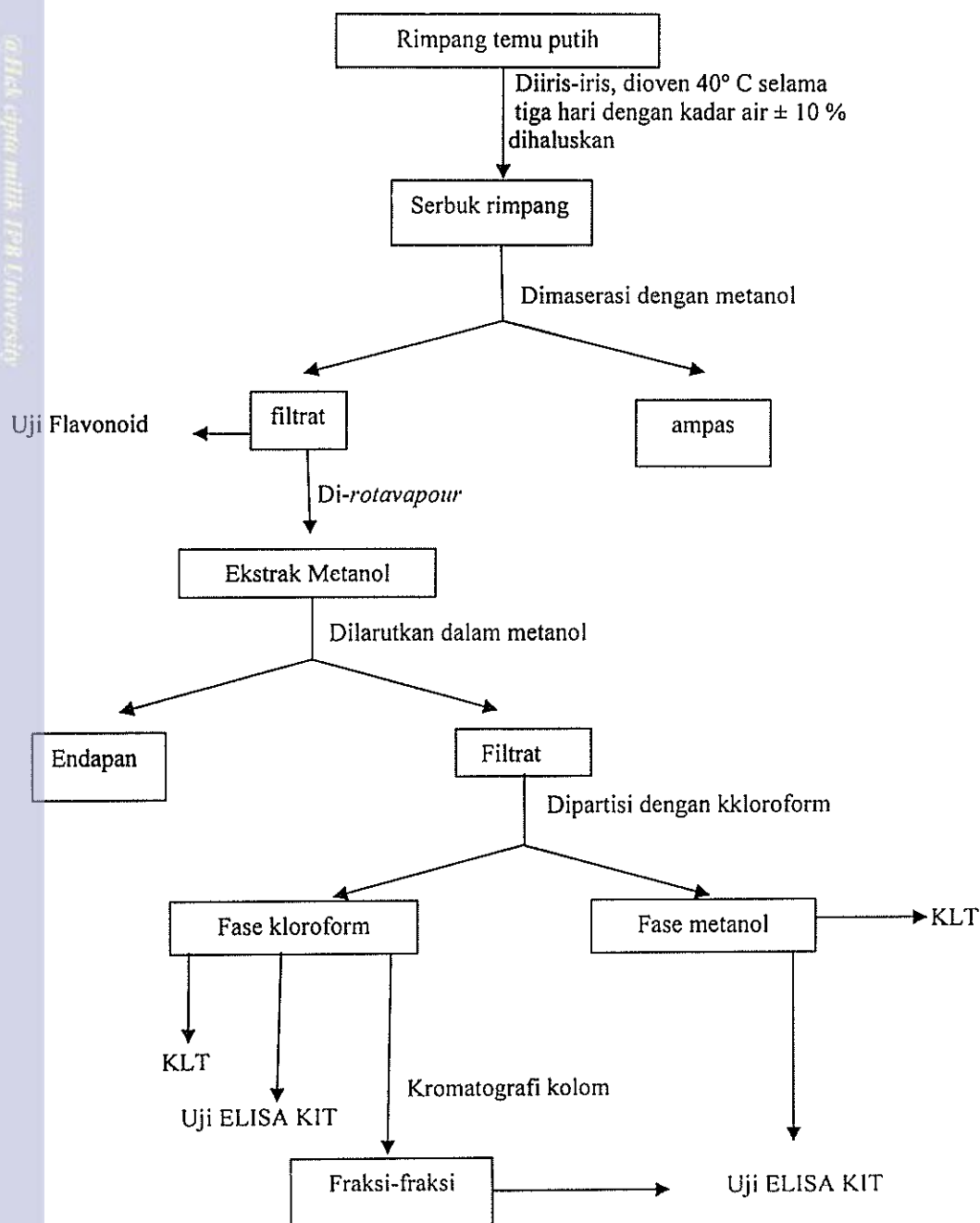
Utami KP. 2000. *Temu putih redam kanker leher rahim*. *Trubus* 31 (366):19-20.

Weber C & R. Hai Liu. 2002. Antioxidant Capacity and Anticancer Properties of Red Raspberry. ISHS Acta Horticulturae 585. Dundee: viii International Rubus and Ribes Symposium.

Wijayakusuma HMH. 1997. *Hidup Sehat secara Hembing*. Buku 6. Jakarta: PT Gramedia.

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan alir penelitian.



## Lampiran 2. Kadar air rimpang temu putih.

Ulangan ke-	Bobot Pinggan kosong (gram)	Bobot sampel (gram)	Bobot pinggan + Sampel kering (gram)	Bobot Sampel kering (gram)	Kadar Air (%b/b)	Kadar air rata-rata (%b/b)
1	44,54	1,02	45,56	0,92	9.80	9.76
2	47,14	1.03	48,17	0.93	9.71	

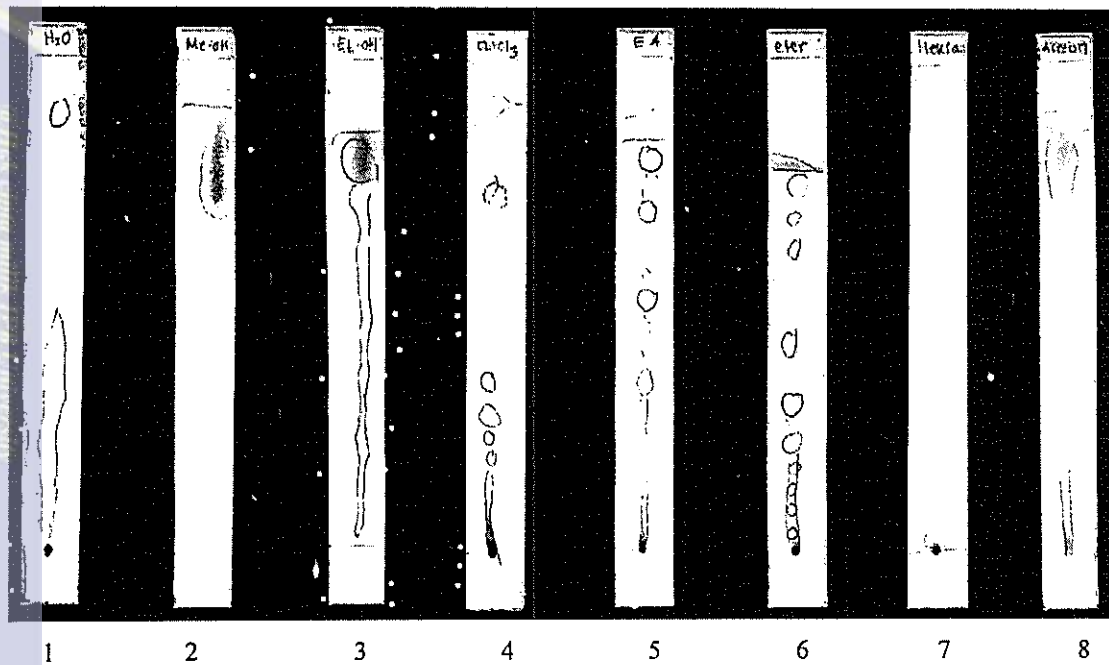
## Contoh Perhitungan

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar Air Ulangan 1} &= \frac{\text{Bobot sampel} - \text{Bobot sampel kering}}{\text{Bobot sampel}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,02 - 0,92}{1,02} \times 100\% \\
 &= 9,80\%
 \end{aligned}$$

## Lampiran 3. Hasil uji fitokimia rimpang temu putih.

Golongan Senyawa	Sampel
Alkaloid	+
Steroid	+
Triterpenoid	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Tanin	-
Kuinon	+

Lampiran 4. KLT fraksi kloroform rimpang temu putih dengan menggunakan eluen tunggal.

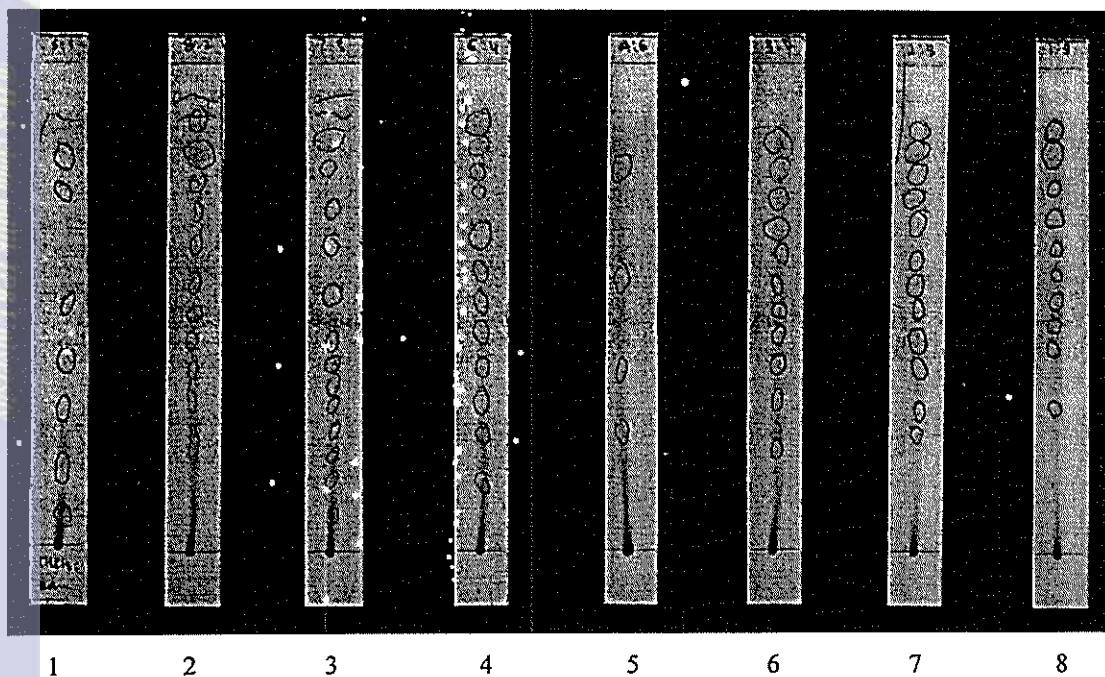


Keterangan :

1. Eluen air
2. Eluen metanol
3. Eluen etanol
4. Eluen kloroform
5. Eluen etil asetat
6. Eluen eter
7. Eluen heksana
8. Eluen aseton



Lampiran 5. KLT Fraksi kloroform dari rimpang temu putih dengan perbandingan eluen.



**Keterangan :**

1. Eluen kloroform : etil asetat (9 : 1)
2. Eluen kloroform : etil asetat (8 : 2)
3. Eluen kloroform : etil asetat (7 : 3)
4. Eluen kloroform : etil asetat (6 : 4)
5. Eluen kloroform : etil asetat (4 : 6)
6. Eluen kloroform : etil asetat (3 : 7)
7. Eluen kloroform : etil asetat (2 : 8)
8. Eluen kloroform : etil asetat (1 : 9)



Lampiran.6. Hasil penentuan total fenol dan uji  $LC_{50}$  dengan menggunakan larva udang.

Ekstrak / Fraksi kloroform	$LC_{50}$ (ppm)	Absorbans (A)	
		725 nm	760 nm
Ekstrak metanol	146,30	2,000	1,921
Ekstrak kloroform	445,93	3,000	3,000
Fraksi 4	147,93	0,666	0,650
Fraksi 5	369,29	0,740	0,740
Fraksi 6	479,82	0,364	0,375
Fraksi 7	595,18	1,658	1,658
Fraksi 8	3730,06	0,324	0,341
Fraksi 9	1437,07	0,519	0,506
Fraksi 10	2539,43	0,110	0,117
Fraksi 11	1334,64	0,310	0,324
Fraksi 12	717,82	0,145	0,156
Fraksi 13	526,87	0,686	0,695
Fraksi 14	933,17	0,544	0,550
Fraksi 15	526,67	0,921	0,921
Kontrol	0,00	0,000	0,000

Lampiran 7. Hasil uji inhibisi terhadap enzim tirosin kinase.

Ekstrak / Fraksi kloroform	Konsentrasi (ppm)	Absorbans (A)	Persen inhibisi (%)
EFGR	-	1,517	0,00
Genistein	-	1,320	12,99
Ekstrak metanol	100	0,945	37,71
	200	0,876	42,25
	3000	0,711	53,13
Ekstrak kloroform	100	0,921	39,29
	200	1,076	29,07
	3000	0,727	52,08
Fraksi 5	100	0,727	52,08
	200	0,563	62,89
	300	0,498	67,17
Fraksi 7	100	0,927	38,89
	200	0,783	48,38
	300	0,631	58,40
	500	0,489	67,77
Fraksi 15	100	0,295	80,55
	200	0,209	86,22
	300	0,109	92,81
	500	0,101	93,34

## Contoh Perhitungan

$$\begin{aligned}
 \text{Persen Inhibisi Ekstrak metanol 100 ppm} &= \left( 1 - \frac{\text{absorbans ekstrak metanol}}{\text{absorbans EFGR}} \right) \times 100\% \\
 &= \left( 1 - \frac{0,945}{1,517} \right) \times 100\% \\
 &= 37,71\%
 \end{aligned}$$