

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAGING BUAH
MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN LC-MS DAN
ANALISIS TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach**

SKRIPSI



Oleh :

**DIRA TARICA PUTRI
1913206012**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA**

TULUNGAGUNG

2023

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAGING BUAH
MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN LCMS DAN
ANALISIS TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm.) Program Studi S1 Farmasi

STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung



Oleh :

**DIRA TARICA PUTRI
1913206012**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA
TULUNGAGUNG**

2023

PERPUSTAKAAN STIKES KARYA PUTRA BANGSA TULUNGAGUNG

SKRIPSI
IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAGING BUAH
MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN LC-MS DAN
ANALISIS TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach

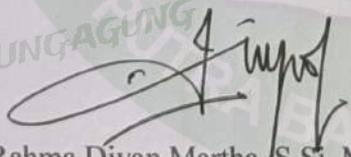
Yang diajukan oleh :

DIRA TARICA PUTRI
1913206012

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Rahma Diyan Martha, S.Si, M.Sc

NIDN. 0710029101


apt. Choirul Huda, M.Farm

NIDN. 0726038502

SKRIPSI
IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAGING BUAH
MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN LC-MS DAN
ANALISIS TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach

Oleh :

DIRA TARICA PUTRI

1913206012

Telah lolos uji etik penelitian dan dipertahankan Panitia Penguji Skripsi

Program Studi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa

Tanggal : 07 Juli 2023

Ketua Penguji : Rahma Diyan Martha, S.Si., M.Sc (.....)

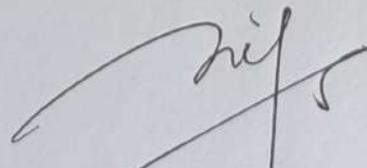
Anggota Penguji 1. apt. Choirul Huda, M. Farm (.....)

2. apt. Arif Santosa, M.Farm (.....)

3. apt. Dara Pranidya Tilarso, M.Farm (.....)

Mengetahui,

Ketua STIKes Karya Putra Bangsa


apt. Arif Santoso, M.Farm

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan dalam daftar pustaka.

Tulungagung, 12 Juni 2023

Dira Tarica Putri

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena dengan rahmat, karunia, serta taufik dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan proposal yang berjudul “**Identifikasi Senyawa Infusa Daging Buah Majapahit (*Crescentia cujete*) Dengan LC-MS dan Analisis Toksisitas Terhadap *Artemia Salina* Leach**”, ini dengan baik meski masih terdapat banyak kekurangan didalamnya.

Proposal ini merupakan salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.) pada Jurusan Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKes). Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, semangat, dan doa sehingga proposal penelitian ini dapat selesai. Ucapan terima kasih ini penulis tujukan kepada:

1. Bapak apt. Arif Santoso, M.Farm selaku ketua STIKes Karya Putra Bangsa
2. Ibu apt. Dara Pranidya Tilarso, M. Farm selaku ketua program studi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung
3. Ibu Rahma Diyan Martha, S.Si., M.Sc selaku pembimbing utama yang telah mendidik dan memberikan bimbingan selama masa perkuliahan dan penyusunan naskah.
4. Bapak apt. Choirul Huda, M. Farm selaku pembimbing kedua yang telah mendidik dan memberikan bimbingan selama masa perkuliahan dan penyusunan naskah.
5. Ibu, ayah, adik, bude, pakpoh yang telah memberikan do'a dukungan, semangat selama penyusunan proposal.
6. Teman-teman satu tempat kerja, sahabat-sahabatku yang telah memberikan dukungan dan semangat selama penyusunan proposal.
7. Teman-teman satu bimbingan penelitian proposal dan teman-teman satu angkatan, yang telah berjuang bersama-sama penulis dalam menyelesaikan proposal penelitian.
8. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu.
9. Diri sendiri yang berhasil melawan rasa malas dan tidak pernah

menyerah sesulit apapun proses penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan proposal ini terdapat kekurangan. Oleh sebab itu, penulis berharap adanya kritik dan saran demi kesempurnaan proposal penelitian ini.

Tulungagung, Juli 2023

Penulis,

(Dira Tarica Putri)



IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAGING BUAH MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN LC-MS DAN ANALISIS TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina Leach*

DIRA TARICA PUTRI
Prodi S1 Farmasi

INTISARI

Kanker merupakan penyakit heterogen yang ditandai dengan proliferasi yang tidak terkontrol serta dapat mengganggu siklus sel yang mengarah ke pertumbuhan sel abnormal yang dapat menyerang dan bermetastasis pada bagian lain dari dalam tubuh. Banyak pengobatan yang dilakukan untuk penyakit kanker seperti kemoterapi, radiasi, hingga pengobatan secara tradisional seperti pada penggunaan tanaman majapahit. Tanaman majapahit merupakan tanaman yang bersifat toksik terhadap sel kanker, hal tersebut dapat dilihat dari penelitian-penelitian yang sudah ada pada bagian batang dan daun tanaman majapahit. Meskipun demikian bagian lain tanaman majapahit juga memiliki potensi yang sama, namun belum banyak yang meneliti seperti pada bagian daging buah majapahit. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kandungan dan kadar senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antikanker pada infusa daging buah majapahit menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometri*), dan untuk mengetahui kadar toksisitas akut (LC_{50}) terhadap larva *Artemia Salina Leach* dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Pada penelitian ini menggunakan metode ekperimental. Daging buah majapahit diperoleh dengan cara infundasi menggunakan aquadest, yang kemudian diuji secara kualitatif dan kuantitatif. Hasil dari LCMS terdapat komposisi senyawa sebanyak 101 yang ada di daging buah majapahit (*Crescentia cujete*). Hasil identifikasi LCMS senyawa yang diambil termasuk kedalam golongan flavonoid dengan nilai konsentrasi komposisi tertinggi yaitu sebesar 3,29479% dengan nama senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside* dan *hesperidine* dengan komposisi senyawa 3,18572%. Pengujian toksisitas infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) menggunakan konsentrasi 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, dan 500ppm yang diberikan pada larva *Artemia Salina Leach* selama 24 jam dan menghitung nilai LC_{50} menggunakan analisis probit. Hasil pengujian toksisitas akut infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) memiliki sifat toksik yang menunjukkan adanya potensi sebagai antikanker dengan perolehan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm yaitu sebesar 675,46ppm.

Kata Kunci : Antikanker, Daging Buah Majapahit, LCMS,BSLT

**IDENTIFICATION OF MAJAPAHIT FRUIT (*Crescentia cujete*) MEAT
INFUSION COMPOUNDS WITH LC-MS AND TOXICITY
ANALYSIS OF *Artemia Salina* Leach**

DIRA TARICA PUTRI
Pharmacy S1 Study Program

ABSTRACT

Cancer is a heterogeneous disease characterized by uncontrolled proliferation and can disrupt the cell cycle leading to abnormal cell growth that can invade and metastasize to other parts of the body. Many treatments are carried out for cancer such as chemotherapy, radiation, to traditional treatments such as the use of the Majapahit plant. The Majapahit plant is a plant that is toxic to cancer cells, this can be seen from existing studies on the stems and leaves of the Majapahit plant. Even so, other parts of the Majapahit plant also have the same potential, but not much research has been done on the flesh of the Majapahit fruit. The purpose of this study was to determine the content and levels of secondary metabolites that have anticancer activity in majapahit pulp infusion using LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*), and to determine the level of acute toxicity (LC_{50}) to *Artemia Salina* Leach larvae using the BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) method. In this study using experimental methods. The majapahit fruit flesh was obtained by infundation using aquadest, which was then tested qualitatively and quantitatively. The results of the LCMS showed that there were 101 compounds in the flesh of the Majapahit fruit (*Crescentia cujete*). The results of the LCMS identification of the compounds taken belong to the flavonoid group with the highest composition concentration value of 3.29479% with the compound names kaempferol-3-O-rhamnoside and hesperidine with a compound composition of 3.18572%. Toxicity testing of majapahit fruit (*Crescentia cujete*). pulp infusion used concentrations of 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, and 500ppm given to *Artemia Salina* Leach larvae for 24 hours and calculated the LC_{50} value using probit analysis. The results of the acute toxicity test for majapait (*Crescentia cujete*) pulp infusion using the BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) method have toxic properties indicating potential as anticancer with an LC_{50} value of <1000 ppm, which is 675.46 ppm.

Keywords: Anticancer, Majapahit Flesh, LCMS, BSLT

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
KATA PENGANTAR	v
INTISARI	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.4. Batasan Masalah.....	5
1.5. Relevansi Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Kanker	7
2.2. Tanaman Majapahit.....	8
2.2.1. Uraian Umum Tanaman Majapahit	8
2.2.2. Deskripsi Tanaman Majapahit.....	9
2.2.3. Kandungan Kimia Tanaman Majapahit.....	10
2.2.4. Manfaat Tanaman Majapahit Bagi Masyarakat.....	13
2.3. Uraian Metode Penyarian.....	13
2.3.1. Metode Penyari	13
2.3.1.1 Metode Penyarian Cara Dingin.....	13
2.3.1.2 Metode Penyarian Cara Panas.....	14
2.3.2. Pemilihan Pelarut.....	16
2.4. LCMS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry).....	18

2.5. <i>Artemia Salina Leach</i>	18
2.5.1. Morfologi <i>Artemia Slina Leach</i>	19
2.5.2. Siklus hidup <i>Artemia salina Leach</i>	20
2.5.3. Penetasan <i>Artemia salina Leach</i>	21
2.6. BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)	22
2.7. Uraian Toksisitas Terhadap <i>Artemia salina Leach</i> dengan Metode BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>)	23
2.8. Probit	24
BAB III METODE PENELITIAN	26
3.1. Alat dan Bahan	26
3.1.1. Alat	26
3.1.2. Bahan	26
3.2. Populasi Penelitian	26
3.3. Sampel Penelitian	26
3.4. Variabel Penelitian	26
3.4.1. Variabel Bebas	26
3.4.2. Variabel Kontrol	27
3.4.3. Variabel Terikat	27
3.5. Determinasi Tanaman	27
3.6. Metode Penelitian	27
3.7. Skrining Fitokimia	28
3.7.1. Flavonoid	28
3.7.2. Alkaloid	28
3.7.3. Saponin	29
3.7.4. Tanin	29
3.8. Identifikasi Senyawa Ekstrak Daging Buah Majapahit (<i>Crescentia cujete</i>) Menggunakan LCMS (<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>)	29
3.9. Skrining Metode BSLT	30
3.10. Pemilihan Telur Larva	30
3.11. Penyiapan Larva	30
3.12. Pembagian Kelompok Perlakuan	31
3.13. Uji Toksisitas	31

3.14. Kerangka Penelitian	33
BAB IV PEMBAHASAN.....	34
4.1 Determinasi Tanaman.....	34
4.2 Pembuatan Ekstrak Daging Buah Majapahit.....	34
4.3 Hasil Rendemen.....	35
4.4 Skrining Fitokimia.....	35
4.4.1 Uji Flavonoid	36
4.4.2 Uji Alkaloid	37
4.4.3 Uji Saponin	40
4.4.4 Uji Tanin	41
4.5 Identifikasi LCMS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometri)	43
4.5.1 <i>Kaempferol-3-O-rhamnoside</i>	43
4.5.2 <i>Hesperidine</i>	45
4.6 Skrining Potensi Antikanker dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	46
4.6.1 Pembuatan Air Laut Buatan.....	46
4.6.2 Penetasan <i>Siste Artemia</i>	46
4.6.3 Uji Toksisitas Dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	47
BAB V PENUTUP	52
5.1 Kesimpulan.....	52
5.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	54

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Tingkat Toksisitas Bahan	24
Tabel 2. 2 Nilai % Probit.....	26
Tabel 3. 1 Pembagian Kelompok Perlakuan	31
Tabel 3. 2 Model Tabel Data Probit Analisis	32
Tabel 4.1 Hasil Rendemen Infusa Daging Buah Majapahit	35
Tabel 4.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia.....	36
Tabel 4.3 Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	48
Tabel 4.3 Nilai Probit Infusa Daging Buah Majapahit.....	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Tanaman Majapahit (<i>Crescentia cujete L.</i>)	8
Gambar 2. 1 Buah Majapahit (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	8
Gambar 2. 1 Daging Buah Majapahit (<i>Crescentia cujete L.</i>).....	8
Gambar 2. 2 <i>Artemia Salina Leach</i>	18
Gambar 2. 3 Bagian-bagian tubuh <i>Artemia salina Leach</i>	19
Gambar 2. 4 Siklus Hidup <i>Artemia Salina Leach</i>	19
Gambar 2. 5 Tahap penetasan telur <i>Artemia salina Leach</i>	20
Gambar 3.1 Kerangka Penelitian.....	33
Gambar 4.1 Persamaan Reaksi Flavonoid	37
Gambar 4.2 Uji Flavonoid.....	37
Gambar 4.3 Persamaan Reaksi Mayer.....	38
Gambar 4.4 Uji Alkaloid dengan Pereaksi Reaksi Mayer.....	38
Gambar 4.5 Persamaan Reaksi Wagner.....	38
Gambar 4.6 Uji Alkaloid dengan Pereaksi Reaksi Wagner.	39
Gambar 4.7 Persamaan Reaksi Dragendorf.....	39
Gambar 4.8 Uji Alkaloid dengan Pereaksi Reaksi Dragendorf.....	39
Gambar 4.9 Uji Saponin.....	40
Gambar 4.10 Persamaan Reaksi Saponin.....	41
Gambar 4.11 Persamaan Reaksi Tanin.....	42
Gambar 4.12 Uji Tanin.....	42
Gambar 4.13 Hasil Chromatogram.....	43
Gambar 4.14 Mass Spectrometri senyawa <i>Kaempferol-3-O-rhamnoside</i>	44
Gambar 4.15 Struktur Senyawa <i>Kaempferol-3-O-rhamnoside</i>	44
Gambar 4.16 Mass Spectrometri Senyawa <i>Hesperidine</i>	45
Gambar 4.17 Struktur Senyawa <i>Hesperidine</i>	45
Gambar 4.18 Grafik Regresi Linier.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi.....	58
Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian.....	59
Lampiran 3. Orientasi Seri Konsentrasi.....	64
Lampiran 4. Perhitungan Nilai LC ₅₀ dengan Analisis Probit.....	68
Lampiran 5. Jadwal Penelitian.....	69
Lampiran 6. Alur Prosedur Kerja.....	70

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang disebut sebagai hutan tropis paling besar ketiga di dunia (setelah Brazil dan Zaire). Keanekaragaman hayati di Indonesia memiliki basis berbagai pengobatan dan penemuan pada industri farmasi pada masa yang mendatang. Jumlah tanaman yang memiliki khasiat obat di Indonesia diperkirakan sejumlah 1.260 jenis tanaman. Tanaman tersebut banyak menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan, zat perwarna, penambah aroma makanan, parfum, insektisida dan obat. Terdapat 150.000 metabolit sekunder yang sudah teridentifikasi dan terdapat 4000 metabolit sekunder yang “baru” setiap tahun (Yuhernita dkk., 2011). Keanekaragaman hayati tersebut masih banyak dimanfaatkan menjadi sumber yang dipergunakan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang mencakup golongan alkaloid, flavonoid, steroid serta terpenoid (Mainawati, 2017).

Senyawa metabolit sekunder flavonoid yang terdapat pada tanaman merupakan zat bioaktif yang saling terkait dengan kandungan kimia pada tumbuhan yang memiliki aktivitas sebagai antikanker serta dapat diartikan sebagai prosedur pertahanan diri terhadap ancaman lingkungan, sehingga tanaman bisa dipergunakan menjadi bahan obat maupun beragam penyakit. Flavonoid merupakan senyawa yang tergolong polifenol, dan memiliki berbagai kandungan salah satunya yaitu kuersetin yang berasal dari subkelas flavonol, genistein maupun flavopiridol sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengobatan kanker (Ravishankar dkk., 2013). Kuersetin diduga memiliki senyawa yang bertanggungjawab dalam proses penghambatan angiogenesis yang merupakan salah satu cara dalam menghambat penyebaran kanker (Agron, 2013). Namun disisi lain masih terdapat beberapa kandungan senyawa pada flavonoid yaitu senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside* dan senyawa *hesperidine* yang memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis. Metabolit sekunder pada tanaman tersebar merata ke semua bagian tumbuhan

tetapi pada kadar yang tidak sama (Firjatillah dkk., 2020). Salah satu tanaman yang sering ditemukan pada lingkup masyarakat tetapi belum dikenal secara luas salah satunya ada tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*). Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) merupakan jenis tumbuhan dikotil berbunga yang berasal dari Grenada yang masuk dalam genus *Crescentia* dan family *bignoniaceae* (Fardilla dkk., 2018). Biasanya tanaman majapahit ini digunakan masyarakat secara tradisional dengan meminum air rebusannya seperti digunakan untuk pengobatan luka gatal, demam, diare, dan hipokondria, dan hipertensi atau penurunan tekanan darah tinggi (Widyaningrum, 2011).

Pada Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete*) terdapat komponen senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak buah majapahit seperti fenol, tanin, alkaloid, saponin, flavonoid, cardenolides, antrakuinon, dan phiobatanin. Beberapa senyawa metabolit pada buah Majapahit diketahui memiliki aktivitas sebagai antikanker senyawa tersebut berupa saponin, flavanoid, tanin, dan fenolat yang diketahui mampu menghambat pertumbuhan sel kanker dengan perbandingan yang signifikan rendah pada tingkat toksisitas bahan alam dan kemoterapi dalam pengobatan kanker (Ejelonu *et al.*, 2011). Senyawa flavonoid merupakan metabolit sekunder dari poliferol yang ditemukan secara luas pada tanaman dan memiliki berbagai macam efek bioaktif seperti anti inflamasi, anti virus (Qinghu *et al.*, 2016), Menurut (Vanessa dkk, 2016) flavonoid memiliki efek bioaktif sebagai anti oksidan dan anti penuaan. Namun pakar lain berpendapat bahwa flavonoid memiliki efek bioaktif sebagai antidiabetes, kardioprotektif, dan antikanker (Marzouk, 2016).

Penyakit kanker adalah sekelompok penyakit seluler serta genetik yang diawali dari satu sel yang memiliki DNA yang akan bermutasi sebagai komponen dasar dari gen tersebut. Sel yang telah mengalami kerusakan genetik tidak lagi dapat mengikuti mekanisme pengaturan siklus sel normal sehingga dapat mengakibatkan terjadinya proses proliferasi yang tidak terkendali. Mutasi yang terjadi pada materi genetik berupa DNA pada gen yang mengatur siklus sel (pertumbuhan, kematian serta pemeliharaan sel) dapat mengakibatkan ketidakaturan siklus sel sehingga menyebabkan terbentuknya kanker atau karsinogenesis (Parwata, 2014). Dalam lima *decade* terakhir ini tanaman

majapahit menurut para ilmuwan memiliki berbagai senyawa terutama flavonoid yang memiliki kandungan kuersetin didalamnya sehingga dapat digunakan sebagai aktivitas pengobatan antikanker (Kumar dkk., 2011).

Infundasi merupakan suatu proses penyarian yang digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati pada suhu 90°C. Hasil dari proses ekstraksi menggunakan metode infundasi berupa infusa. Prinsip infundasi dibedakan menjadi dua yaitu ekstraksi dengan pelarut air pada temperature penangas air. Infundasi memiliki cara yang sederhana sehingga sering digunakan pada perusahaan obat tradisional dengan beberapa modifikasi (Nurani, 2012).

Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC/MS-MS) merupakan teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen sampel dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometer massa. Data LC-MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu, senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel-partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak) (Himawan, 2010). Beberapa keuntungan yang dimiliki LC-MS yaitu mampu menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa termal labil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi, bahkan juga protein.

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan pada tumbuhan mampu dianalisis untuk mnguji kemampuan sitotoksiknya salah satunya dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah metode dalam uji toksisitas akut paling mudah, cepat, dan murah serta dapat digunakan sebagai suatu bioassay untuk menguji suatu senyawa aktif pada bahan alam yaitu pada daging buah majapahit yang diduga memiliki manfaat sebagai agen anti-tumor atau kanker Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) biasanya menghasilkan uji spesifik yang saling berhubungan sebagai anti kanker atau tumor.

Pada uji toksisitas suatu bahan apabila hasil yang didapat pada rentang dibawah 1000 ppm pada LC_{50} maka bahan yang digunakan memiliki potensi sebagai antikanker (Reskiningsih, 2014). LC_{50} merupakan parameter dari uji sitotoksik yang dapat menunjukkan nilai konsentrasi sampel yang didapat menyebabkan kematian 50% hewan uji dalam waktu tertentu (Kusuma, 2014). LC_{50} tidak berfokus pada kerusakan organ yang spesifik atau tertentu akan tetapi pada total kematian pada hewan uji sehingga nilai LC_{50} dapat digunakan dalam uji jangka pendek yang berfungsi untuk menghitung tingkat kematian *Artemia salina Leach* mengingat bahwa susunan pencernaannya memiliki sensitifitas yang sangat tinggi (Lu, 1995). Prinsip metode BSLT ini yaitu uji toksisitas akut terhadap larva udang *Artemia salina Leach* dengan penentuan nilai LC_{50} dengan perlakuan 24 jam (Fatimah dkk., 2022). Metode BSLT ini memiliki kelebihan yaitu sederhana dan praktis, mudah, cepat serta murah akan tetapi tidak mengesampingkan kekuatan awal skrining tumbuhan pada potensi aktivitas antikanker pada hewan uji larva artemia (Meyer, 1982).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti merasa perlu untuk mengidentifikasi senyawa infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS dan analisis toksisitas terhadap *Artemia Salina Leach* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) karena daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) mempunyai potensi sebagai tanaman obat yang dapat dimanfaatkan sebagai penghambat anti kanker dan memiliki tingkat populasi sampel yang banyak terutama di desa Wates, Sumbergempol, Tulungagung.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian yang menelatarbelakangi penelitian ini maka, dapat disimpulkan bahwa rumusan permasalahannya sebagai berikut:

- 1.2.1 Senyawa apa saja yang terkandung dalam ekstrak infusa daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) ?
- 1.2.2 Berapakah kadar senyawa yang terkandung pada infusa daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*)?
- 1.2.3 Berapakah seri konsentrasi optimum ekstrak infusa daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap nilai LC_{50} pada larva udang *Artemia Salina Leach*?

1.3. Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Mengetahui senyawa apa saja yang terkandung dalam infusa daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*).
- 1.3.2 Mengetahui berapakah kadar senyawa yang terkandung pada infusa daging buah Majapahit (*Cressentia cujete*) dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*).
- 1.3.3 Mengetahui berapakah seri konsentrasi optimum ekstrak daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap nilai LC_{50} pada larva udang *Artemia Salina Leach*.

1.4. Batasan Masalah

Batasan masa lah dalam penelitian ini adalah:

- 1.4.1 Sampel yang digunakan adalah daging buah tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) yang dikenal sebagai tanaman maja di Jawa Timur dan diperoleh di desa Wates, Sumbergempol, Tulungagung.

1.4.2 Metode ekstraksi yaitu dengan menggunakan infundasi yang menghasilkan infusa daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*).

1.4.3 Uji toksisitas yang dilakukan pada daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) merupakan *screening test* yang menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang dihitung analisisnya dengan LC50 (Median Lethal Concentration) terhadap hewan uji *Artemia Salina L*.

1.4.4 Identifikasi senyawa optimum dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) yang memiliki potensi sebagai antikanker.

1.5. Relevansi Penelitian

Penelitian ini memiliki relevansi pada penelitian sebelumnya yaitu:

1.5.1 Penelitian oleh Fatimah, Rahma Diyan Martha dan Danar pada tahun 2022 yang berjudul “Analisis toksisitas dan potensi antikanker ekstrak methanol daun majapahit (*Crescentia cujete*) dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)”. Hasil yang diperoleh yaitu bahwa ekstrak methanol daun majapahit memiliki potensi sebagai sumber antikanker. Hal tersebut ditandai dengan hasil uji toksisitas ekstrak yang memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm.

1.5.2 Penelitian oleh Fatimah, Rahma Diyan Martha, dan Asmarani Kusumawati pada tahun 2020 yang berjudul “Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS”. Adapun hasil penelitiannya, yakni terdapat 12 jenis senyawa flavonoid yang terkandung pada kulit batang tanaman Majapahit (*C. cujete*). Dari 12 senyawa, diketahui 10 senyawa memiliki potensi sebagai antikanker dan belum dilakukan penelitian lanjut tentang efek anti proliferasi dan toksisitas tanaman Majapahit agar dapat digunakan sebagai salah satu kandidat untuk terapi kanker.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker

Kanker menyumbang kematian urutan kedua setelah penyakit kardiovaskuler. Jenis utama kanker yaitu kanker paru, kanker perut, kanker kolorektal, kanker hati, dan kanker payudara dari 70% kematian yang terjadi di Negara yaitu pada tingkat penghasilan rendah maupun menengah dan akan terus diproyeksikan mengenai peningkatan yang telah diperkirakan 11,5 juta kematian tercatat sampai 2030. Kanker merupakan penyakit heterogen yang ditandai dengan proliferasi yang tidak terkontrol serta dapat mengganggu siklus sel yang mengarah ke pertumbuhan sel abnormal yang dapat menyerang dan bermetastasis pada bagian lain dari dalam tubuh. Pertumbuhan sel abnormal disebabkan karena adanya berbagai faktor yang dapat merubah ekspresi dan menimbulkan disregulasi antara proliferasi sel dan kematian sel. Proliferasi sel yang tidak dapat terkontrol akan berkembang menjadi populasi sel yang akan menginvasi jaringan dan bermetastase pada organ lain (Hong & Zu, 2013). Proliferasi merupakan proses fisiologis yang dapat terjadi pada hampir seluruh jaringan tubuh manusia dalam berbagai keadaan sel agar dapat berkembang biak saat sel mengalami pengulangan siklus sel tanpa adanya hambatan (Sarmoko, 2003).

Karakteristik utama sel kanker yaitu perubahan metabolisme, gangguan siklus sel, mutasi yang sering, resistensi terhadap respon imun, peradangan kronis, pembentukan metastasis, dan induksi angiogenesis (Neagu *et al.*, 2019). Beberapa pendapat memaparkan bahwa kanker merupakan penyakit metabolik yang ditentukan dari berbagai tingkat mitokondria disfungsi yang perubahan metabolik (Bock *et al.*, 2019).

Menurut WHO tahun 2015 faktor risiko utama penyakit kanker yaitu merokok, pengonsumsi alkohol, faktor makanan yang kurang akan konsumsi sayur dan buah, berkurangnya aktivitas fisik, infeksi kronis dari *Helicobacter pylori*, virus hepatitis B, virus hepatitis C, lingkungan, serta beberapa jenis HPV (Human Papilloma Virus), dan risiko kerja yang berhubungan dengan radiasi.

Diagnosa pada kanker dapat dilakukan dengan beberapa cara. Pemeriksaan paling awal dan sederhana dilakukan dengan menggunakan metode anamnesis, selanjutnya dilakukan dengan berbagai metode lain yang telah ditemukan, dan pemeriksaan klinik. Metode lain dapat dilakukan dengan cara tes laboratorium, x-ray, ultrasound, endoskopi, CT SCAN maupun pemeriksaan patologi.

Pemeriksaan patologi merupakan standart acuan dalam pemeriksaan kanker yang harus dilakukan. Pemeriksaan patologi merupakan pemeriksaan yang menggunakan sebagian sel tubuh yang kemudian diperiksa di bawah mikroskop agar dapat mennetukan kanker dengan membandingkan abnormalitas sel yang diamati dengan sel yang sehat. Diagnosa kanker bertujuan untuk mengetahui asal mula (*primatory side*) kanker dan sel-sel apa saja yang terlibat. Kanker bisa terjadi diseluruh tubuh kecuali pada bagian rambut, gigi dan kuku. Pada kanker penentuan derajat kanker perlu dilakukan karena meiliki tujuan untuk menilai berat ringanyakanker dan prognosinya. Derajat kanker biasanya ditentukan berdasarkan penilaian hispatologis melalui biopsy dan derajat klinis (Fuadiyah dkk., 2017).

2.2. Tanaman Majapahit

2.2.1. Uraian Umum Tanaman Majapahit

Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) merupakan tanaman yang dapat tumbuh pada daerah yang tropis maupun subtropis. Tanaman Majapahit ini di Indonesia dapat tumbuh dengan subur pada dataran rendah hingga pada ketinggian 500 mm pada permukaan air laut. Dapat hidup pada lahan yang kering dengan suhu 7°C pada musim hujan maupun dengan suhu 46° C pada musim kemarau dan basah seperti pada rawa-rawa (Fartmawati, 2015).

Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) merupakan tanaman perdu yang memiliki ciri-ciri tanaman seperti kulit buah yang berwarna hijau ukuran sebesar bola voli, kulit buah yang sangat keras, dan dapat tumbuh sampai 20 meter dengan tajuk menjulang ke atas, batang kayu sangat keras, memiliki daun yang lebar berbentuk oval, batang kayu berbentuk silindris berwarna coklat kotor dan permukaan kasar. Tanaman maja memiliki bunga yang berbau harum hingga dalam jarak yang cukup jauh masih dapat tercium aromanya (Nigam, 2015).

2.2.2. Deskripsi Tanaman Majapahit

Klasifikasi tanaman majapahit menurut (Rismayani, 2013):

Regnum : Plantae

Divisi : Tracheophyta

Class : Magnoliopsida

Sub Class : Asteranae

Ordo : Scrophulariales

Family : Bignoniaceae

Genus : Crescentia

Species : *Crescentia cujete* L.



(A)



(B)



(C)

Gambar 2.1 Majapahit (A) Tanaman majapahit (*Crescentia cujete* L.); (B) Buah majapahit (*Crescentia cujete* L.); (C) Daging buah majapahit (*Cresantia cujete* L.)

2.2.3. Kandungan Kimia Tanaman Majapahit

Pada seluruh bagian tanaman majapahit mengandung komponen bioaktif seperti flavonoid dan saponin (Baliga dkk., 2011). Pada daging buah majapahit mengandung senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid, vitamin A, C, E, niasin, thiamin, riboflavin, karbohidrat alkaloid serta mineral-mineral seperti natrium, kalium, kalsium, fosfor, dan magnesium. Pada bagian daun, kulit batang dan akarnya mengandung senyawa kimia berupa tannin dan flavonoid (Karawya dkk., 1980).

Pada Buah majapahit mengandung steroid, terpenoid, flavonoid, senyawa fenol, lignin, lemak, inulin, protein, karbohidrat, alkaloid, dan glikosida jantung (Parvin, 2015). Kandungan terbesar tanaman majapahit adalah flavonoid yang termasuk senyawa yang tergolong polifenol, dan memiliki berbagai kandungan salah satunya yaitu kuersetin yang berasal dari subkelas flavonol, genistein maupun flavopiridol sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengobatan kanker (Ravishankar dkk., 2013). Kuersetin diduga memiliki senyawa yang bertanggungjawab dalam proses penghambatan angiogenesis yang merupakan salah satu cara dalam menghambat penyebaran kanker (Agron, 2013). Namun disisi lain masih terdapat beberapa kandungan senyawa pada flavonoid yaitu senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside* dan senyawa *hesperidine* yang memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis. Senyawa metabolit pada tanaman sangat dipengaruhi oleh proses ekstraksi yang dilakukan. Adanya tingkat kepolaran pelarut akan mempengaruhi proses standarisasi ekstrak standarisasi merupakan suatu proses yang sangat penting dan dibutuhkan untuk mendapatkan ekstrak yang bermutu dan berkualitas. Terdapat 2 parameter dalam standarisasi tanaman obat yaitu parameter spesifik maupun non spesifik. Sifat fisik ekstrak seperti organoleptis, pola kromatogram, kandungan metabolit secara kualitatif dalam ekstrak merupakan parameter spesifik yang perlu dievaluasi sedangkan kadar abu, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar air termasuk dalam parameter non spesifik (Utami dkk., 2016).

Optimasi pelarut sangat mempengaruhi hasil ekstraksi dan kandungan

senyawa metabolit. Tingkat kepolaran pelarut akan mempengaruhi proses ekstraksi, hasil rendemen dan pola kromatogram dari ekstrak. Pelarut polar akan mudah menarik kandungan senyawa metabolit jenis polar, demikian pula untuk pelarut non polar atau semi polar akan mampu menarik senyawa metabolit non polar atau semi polar.

a. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa polar yang dapat larut dalam pelarut polar seperti aseton, butanol, etanol, methanol, dan dimetilformamida karena flavonoid memiliki ikatan dalam bentuk glikosida sehingga campuran pelarut yang merupakan pelarut yang baik sedangkan pada bentuk aglikon yaitu flavon, flavonol, flavanon dapat lebih mudah terlarut dalam pelarut eter, kloroform, dan xanthon (Tian dkk., 2018).

Sebagian besar senyawa flavonoid berkaitan dengan gugus gula glikosidanya dalam bentuk campurannya atau jarang sekali dalam bentuk tunggalnya. Flavonoid mempunyai kerangka dasar yang terdiri atas 15 atom karbon dan terdapat 2 cincin benzene (C_6) yang dapat berkaitan dengan rantai propananya (C_3) (Noer dkk., 2014). Dalam proses karsinogenesis, flavonoid mengganggu jalur transduksi sinyal multiple sehingga membatasi proliferasi, angiogenesis, dan metastasis atau meningkatkan apoptosis (Scarano dkk., 2018).

b. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa bersifat basa pada tanaman yang memiliki fungsi sebagai parameter pada hambatan pertumbuhan sel kanker dengan mekanisme kerja sebagai induksi apoptosis (Khan *et al.*, 2016). Kebanyakan alkaloid diisolasi berupa padatan Kristal dengan titik didih berkisar $87-238^{\circ}C$ (Wilantari, 2018).

c. Saponin

Saponin merupakan kelompok glikosida suatu tanaman yang dapat larut di dalam air. Saponin diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan antikanker. Senyawa triterpen saponin memiliki aktivitas antiproliferasi (Masullo dkk., 2014). Saponin merupakan glikosida yang memiliki aglikon berupa sapogenin. Saponin dapat menurunkan tegangan permukaan air, sehingga akan mengakibatkan

terbentuknya buih pada permukaan air setelah dikocok. Sifat ini mempunyai kesamaan dengan surfaktan. Penurunan tegangan permukaan dipengaruhi oleh adanya senyawa sabun yang dapat merusak ikatan hydrogen pada air. Struktur kimia saponin tersusun atas glikon dan aglikon. Saponin memiliki titik didih yang cukup tinggi yaitu mencapai 158°C (Santosa dkk., 2018).

Pada pengobatan maupun pencegahan penyakit saponin sering dimanfaatkan sebagai antibakteri, antifungi, antivirus, pengontrol kadar glukosa darah, dan menghambat pertumbuhan sel tumor serta berpotensi sebagai antikanker yang memiliki mekanisme dengan cara menginduksi *cell cycle arrest* dan apoptosis sel (Darma dkk., 2020).

d. Tanin

Tanin merupakan suatu zat organik pada tanaman yang larut dalam air dan termasuk ke dalam senyawa poliferol yang dapat mengedepankan protein serta mampu membentuk senyawa yang kompleks. Tanin memiliki berat molekul 1000 g/mol yang dapat membentuk senyawa kompleks protein. Senyawa tannin memiliki cincin benzene (C_6) yang dapat berikatan dengan gugus hidroksil ($-\text{OH}$). Tanin akan terurai menjadi pyrogallol, pyrocatechol, dan phloroglucinol bila dipanaskan sampai suhu $98,8-101,67^{\circ}\text{C}$ (Purwitasari, 2014).

Mekanisme kerja tanin yaitu sebagai racun perut sehingga menyebabkan aktivitas enzim terhambat oleh pembentukan suatu ikatan kompleks protein terhadap enzim substrat sehingga dapat menimbulkan terjadinya gangguan pencernaan dan dapat merusak dinding sel (Hargono, 2015). Senyawa tannin pada tumbuhan memiliki fungsi sebagai pelindung tanaman yaitu untuk melindungi dari UV yang dapat menyebabkan kerusakan, mencegah terjadinya radikal berbahaya yang dapat merusak struktur sel (Riedl dkk., 2001).

Tanin dapat ditemukan pada bagian akar, kulit pohon, batang, dan jaringan luar dari jaringan tanaman yang diketahui memiliki efek sebagai antibakteri, antioksidan, dan antikanker (Yildirim dkk., 2015). Terdapat sekitar 57 jenis tannin dan senyawa yang saling berhubungan seperti telah diegallotannin, ellagitannin, dan tannin kompleks. Senyawa tersebut telah di evaluasi kemampuan sitotoksiknya pada sel line tumor manusia seperti malignan melanoma, karsinoma

paru, ileocal adenokarsinoma, dan sel line medulloblastoma (Kashiwada dkk., 1992). Tanin juga diketahui dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada kanker payudara dengan cara mengaktivasi caspase 3/7 dan caspase 9 (Booth *et al.*, 2013).

2.2.4. Manfaat Tanaman Majapahit Bagi Masyarakat

Tanaman majapahit memiliki banyak manfaat dalam sistem obat tradisional di India atau biasa disebut Ayurveda. Daun, akar, kulit kayu, buah dan benih dilaporkan memiliki sifat obat yang beragam dan untuk menyembuhkan berbagai penyakit (Baliga dkk., 2011).

Tanaman majapahit berkasiat mengobati berbagai macam penyakit sehingga sering digunakan dalam pengobatan tradisional. Batang, daun, buah dan akarnya sering digunakan sebagai obat pencahar, diare, obat diuretic, otitis, analgesic dan antiinflamasi (Frotan dkk., 1983).

Buah maja banyak digunakan sebagai obat tradisional, diantaranya mengobati diare, sakit perut, flu, bronkitis, batuk, asma, uretritis, ekspektoran, antitusif, dan pencahar (Parvin dkk., 2015). *Crescentia cujete* L. secara farmakologi juga dimanfaatkan sebagai antelmintik (Romero *et al.*, 2019), antibakteri (Hasanah dkk., 2017).

2.3. Uraian metode penyarian

Metode penyarian atau ekstraksi adalah proses pemisahan suatu senyawa dari simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan tujuan agar dapat memisahkan senyawa dari simplisia tersebut (Hanani, 2014). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kecepatan proses penyarian atau ekstraksi seperti jenis tumbuhan, pemilihan cara penyari, pemilihan metode penyari dan kecepatan difusi zat yang disari, sehingga menimbulkan perpindahan zat yang berpengaruh terhadap perbedaan pada suatu konsentrasi (Prawirodiharjo, 2014).

2.3.1. Metode Penyari

Metode penyarian atau ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan dan pemindahan zat aktif dalam sel yang ditarik keluar oleh pelarut sehingga zat yang

terlarut dapat terpisah dengan bahan yang tidak dapat terlarut (Prawirodiharjo, 2014).

2.3.1.1 Metode penyarian cara dingin

1. Maserasi

Metode maserasi merupakan metode ekstraksi cara dingin . Metode maserasi termasuk dalam metode yang paling sederhana dimana cairan penyari akan menembus dinding sel tanaman yang mana akan masuk pada rongga sel yang mengandung zat aktif, sehingga zat aktif tersebut merupakan larutan terpekat akan didesak keluar dari sel karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif yang didalam sel dengan yang berada diluar sel (Wahyulianingsihet dkk., 2016).

2. Perkolasi

Pada umumnya metode perlokasi digunakan untuk mengekstraksi serbuk kering dan simplisia yang keras seperti kulit batang, kulit buah, biji, kayu dan akar (Direktorat Obat Asli Indonesia, 2013).

2.3.2.1 Metode penyarian cara panas

1. Refluks

Refluks merupakan salah satu metode ekstraksi yang menggunakan alat kondensor dengan cara melalui proses pemanasan selama waktu dengan jumlah pelarut tertentu. Metode refluks digunakan untuk proses ekstraksi yang cukup sempurna. Sehingga metode ini dilakukan dengan 3-5 kali pengulangan pada residu pertama (Marjoni, 2016).

2. Soxhlet

Metode soxhlet merupakan metode ekstraksi panas dingin. Pada ekstraksi ini pelarut dan sampel diletakkan secara terpisah. Metode soxhlet memiliki prinsipnya yaitu ekstraksi dilakukan secara terus-menerus menggunakan pelarut yang relative sedikit. Apabila ekstraksi telah selesai, pelarut dapat diuapkan sehingga akan memperoleh ekstrak. Pada umumnya pelarut yang digunakan berupa pelarut-pelarut yang mudah menguap atau mempunyai titik didih yang rendah (Leba, 2017).

3. Digesti

Digesti merupakan maserasi menggunakan pemanasan lemah (40-50°C). Metode digesti memiliki keuntungan yaitu kemampuan cairan penyari untuk melarutkan zat diinginkan menjadi lebih besar dan memiliki pengaruh sama dengan pengadukan, kekentalan pelarut berkurang yang dapat mengakibatkan berkurangnya lapisan batas. Pada umumnya kelarutan zat akan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu (I Gusti, 2010).

Metode digesti merupakan metode ekstraksi yang sangat tepat untuk bahan yang memiliki kandungan zat aktif tahan terhadap panas (Direktorat Obat Asli Indonesia, 2013). Pemilihan metode digesti karena aman dilakukan untuk mengekstraksi senyawa flavonoid karena Berdasarkan sifat golongan senyawa flavonoid yang tidak tahan pemanasan suhu tinggi dan mudah teroksidasi (Siregar dkk., 2015).

4. Infusa

Masyarakat secara tradisional umumnya seringkali membuat ramuan obat tradisional dengan cara melakukan perebusan terhadap tanaman herbal, namun masyarakat terkadang melakukan perebusan dengan suhu yang terlalu tinggi sehingga dapat merusak senyawa aktif yang terkandung di dalam tanaman herbal tersebut (Puspitasari, 2018).

Metode ekstraksi yang benar dan mendekati cara masyarakat dalam membuat obat tradisional adalah metode infusa. Metode Infusa merupakan sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90 °C selama 15 menit (Mukhlisa dkk., 2021).

Keunggulan dari metode infusa yaitu alat yang digunakan mudah didapatkan dan proses pengeskraksian bersifat sederhana, serta relatif murah (Febrina dkk., 2019). Disisi lain dari keunggulan metode infusa juga memiliki kekurangan yaitu menghasilkan ekstrak yang kurang stabil dan mudah tercemar oleh kuman sehingga masa penyimpanan metode infusa ini tidak boleh lebih dari 24 jam (Nur Oktavia dkk., 2020).

Faktor yang mempengaruhi senyawa kandungan senyawa dalam infusa adalah suhu ekstraksi. Suhu Ekstraksi memiliki batasan agar tidak menimbulkan kerusakan pada senyawa polifenol dengan batas rentang suhu berkisar 80-90 °C

(Sholichah dkk., 2019). Penggunaan metode infusa adalah untuk menarik senyawa berupa alkaloid, flavonoid, tannin, dan saponin (Nur Oktavia dkk., 2020).

Infusa merupakan sediaan cair dengan cara mengekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut polar seperti air pada suhu 90°C dalam waktu 15 menit. Pembuatan yang dilakukan dengan cara pemanasan simplisia dilakukan di atas pemanas air selama 15 menit dihitung pada suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk.

Penyarian dapat dilakukan dalam keadaan panas. Tingkat kepolaran senyawa dengan pelarut akan mudah terlarut sehingga memiliki kepolaran yang sama. Metode Infusa merupakan cara yang efektif untuk memperoleh isolasi dalam komponen senyawa aktif berupa flavonoid, tannin, kumarin, dan saponin sehingga senyawa-senyawa yang diperoleh mampu larut dalam pelarut yang polar seperti air (Hanuraga dkk., 2013).

2.3.2. Pemilihan Pelarut

Pemilihan pelarut merupakan faktor yang penting dalam ekstraksi karena dapat mempengaruhi senyawa aktif yang akan terekstrak. Selektifitas dalam pelarut memiliki sifat yang berbeda dalam melarutkan suatu senyawa aktif dalam bahan. Pelarut yang akan digunakan merupakan pelarut yang dapat menyari sebagian besar pada metabolit sekunder dalam suatu simplisia yang akan digunakan (Astarina dkk, 2012).

Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang memiliki tingkat toksisitas yang rendah, mudah menguap pada suhu yang rendah, dapat mengekstraksi komponen pada senyawa dengan cepat, dapat mengawetkan, serta tidak dapat menyebabkan ekstrak terdisosiasi (Tiwari dkk., 2011).

1. Air

Air merupakan senyawa yang memiliki kepolaran yang sama dan akan lebih mudah tertarik maupun terlarut pada pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama sehingga penggunaan dalam infusa merupakan cara yang efektif untuk mendapatkan isolasi komponen pada senyawa aktif (Harunaga dkk., 2013).

2. Aseton

Aseton merupakan senyawa nonpolar yang identic dengan tetapan dielektrik

20,7⁺ (Adib, 2014).

3. Alkohol

Alkohol termasuk kedalam pelarut universal yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar (Astarina, 2013).

4. Eter

Eter merupakan pelarut non polar yang dapat dimanfaatkan untuk memudahkan proses ekstraksi yang menggunakan komponen non polar (Widyawati dkk., 2010).

5. n-Heksan

n-Heksana merupakan senyawa hidrokarbon alkana yang mempunyai rumus kimia C_6H_{14} n-Heksana adalah jenis pelarut non polar sehingga dapat melarutkan senyawa yang memiliki sifat non polar (Maulida dkk, 2010). Bentuk n-Heksana yaitu cair jernih, berbau seperti eter, memiliki berat molekul 86,18 gr/mol serta memiliki titik didih sebesar 68,73° C. Pelarut n-Heksana banyak digunakan pada ekstraksi minyak dari biji seperti kacang-kacangan dan flax (Utomo, 2016). N-Heksana merupakan salah satu pelarut yang dapat dengan mudah menguap, sehingga ekstrak dapat dengan mudah diperoleh (Wardhani dkk., 2012).

6. Etil asetat

Etil asetat termasuk kedalam pelarut yang baik untuk ekstraksi karena merupakan pelarut yang mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan mempunyai toksisitas yang rendah (Wardhani dkk., 2012). Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang dapat menarik suatu senyawa yang memiliki rentang polaritas lebar dari yang pelarut yang memiliki sifat polar maupun nonpolar (Taofik dkk., 2012).

7. Metanol

Metanol biasa digunakan sebagai pelarut organik, merupakan jenis alkohol yang mempunyai struktur paling sederhana, tetapi paling toksik pada manusia (Nabila, 2011). Metanol memiliki sifat universal dalam berperan sebagai pelarut, yakni mampu melarutkan analit yang memiliki sifat polar dan nonpolar. Metanol dapat menarik analit berupa alkaloid, steroid, saponin dan flavonoid yang berasal dari tanaman.

8. DMSO

DMSO adalah cairan yang tak berwarna dan memiliki rumus molekul $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ yang merupakan pelarut yang mampu melarutkan senyawa polar maupun non polar dan memiliki sifat yang tidak toksik (Fatimawati, 2013).

2.4. LCMS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)

LC-MS/MS atau kromatografi cair–spektrofotometer massa merupakan salah satu metode analisis yang memiliki kemampuan sebagai gabungan dari metode pemisahan fisik menggunakan kromatografi cair serta merupakan metode yang mampu menganalisis dengan menggunakan metode spectrometer massa (Khotimah, 2016).

Kromatografi cair cocok digunakan sebagai alat pemisah berbagai komponen organik dengan kisaran yang luas, seperti nano molekul, mikromolekul, metabolit sekunder pada tanaman, molekul obat, dan protein (Anissa, 2012).

Keunggulan LC-MS dalam penggunaannya yaitu sebagai metode pemisah molekul, menghasilkan hasil analisa yang spesifik dan khas sebagai detektor dan merupakan aplikasi yang luas yang memiliki system kerja yang praktis sehingga dapat melakukan analisa yang tidak memiliki batas terhadap molekul volatile dan biasanya dengan berat molekul dibawah 50 Da. LC-MS juga memiliki teknik derivatisasi dan tahap persiapan sampel yang sederhana sehingga LC-MS memiliki kemampuan untuk mengukur analit yang memiliki sifat sangat polar.

Metode LC-MS merupakan metode yang mampu menghasilkan sebanyak 23 data kualitatif maupun kuantitatif dengan tingkat fleksibilitas tinggi dalam waktu yang relative singkat. Hal ini terjadi karena proses seleksi ion yang sangat cepat dari banyak parameter (Ginting, 2012).

2.5. *Artemia Salina Leach*

Pemilihan penggunaan larva udang (*Artemia salina Leach*) karena sebagai hewan uji yang memiliki sensitivitas tinggi terhadap berbagai senyawa kimia. Larva udang (*Artemia salina Leach*) memiliki membran kulit yang tipis, sehingga kematian larva dapat berakibat memiliki efek toksik dari senyawa bioaktif serta dapat dianalogikan sebagai kematian sebuah sel dalam organisme.

Perumbuhan larva udang (*Artemia salina leach*) sangat cepat sehingga menyerupai laju pertumbuhan sel pada kanker (Ntungwe *et al.*, 2020)

2.5.1. Morfologi *Artemia Salina Leach*

Klasifikasi *Artemia Salina Leach* (Panjaitan, 2011)

Kingdom : Animalia

Phylum : Arthropoda

Classis : Crustaceae

Subclassis : Branchiopoda Ordo : Anostraca

Famili : Artemiidae

Genus : Artemia

Species : *Artemia salina Leach*.



Gambar 2.2 *Artemia salina Leach* (Ruwida, 2010)

Morfologi *Artemia salina Leach* dibagi menjadi tiga bagian yaitu :

1. Telur

Siste adalah sebutan dari telur *Artemia salina Leach* yang merupakan embrio yang diselubungi cangkang yang kuat dan tebal. Cangkang pada telur *Artemia salina Leach* memiliki fungsi sebagai pelindung embrio dari benturan, kekeringan atau keadaan ekstrim, serta pada paparan sinar ultraviolet.

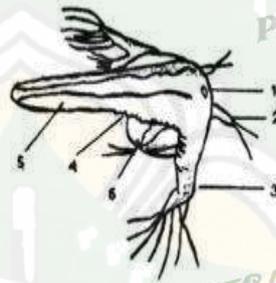
2. Burayak

Nauplius juga disebut sebagai larva *Artemia salina Leach* atau burayak adalah suatu larva yang menetas dari telur dalam kurun waktu 24-36 jam didalam air laut yang memiliki suhu 25° C.

3. Artemia Dewasa

Artemia salina Leach memiliki bentuk yang sempurna sehingga tidak mengalami metamorfosis. *Artemia salina* Leach mempunyai bentuk seperti udang kecil yang memiliki panjang berkisar 1 cm dan memiliki berat 10 mg. Memiliki kepala yang lebih besar daripada bagian tubuhnya yang lain sampa bagian ekor, pada kepala artemia terdapat sepasang mata dan juga antanula. Panjang ekor pada artemia dewasa mencapai sepertiga dari total panjang tubuh yang dimiliki serta terdapat sebelas pasang kaki (torakopoda) dan sepasang alat kelamin yang terletak diantara ekor dan pasang kaki.

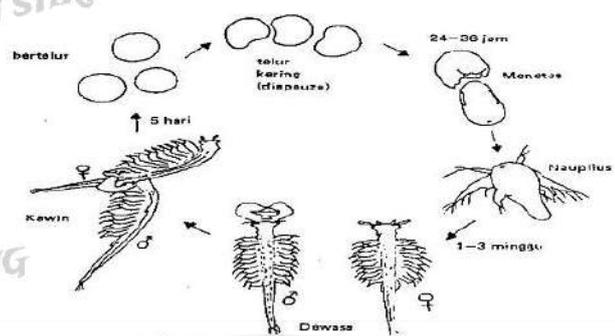
- Keterangan
1. Mata nauplius
 2. Antennula
 3. Antena
 4. Calon thoracopoda
 5. Saluran pencernaan
 6. mandibula



Gambar 2.3 Bagian-bagian tubuh *Artemia salina* Leach ((Mudjiman, 1995).

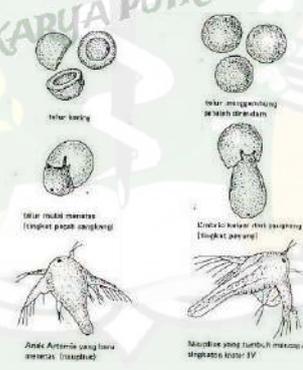
2.5.2. Siklus hidup *Artemia salina* Leach

Pada umumnya siklus hidup larva udang (*Artemia salina* Leach) dapat dilihat melalui tiga fase yaitu pada fase bentuk telur, larva (*nauplii*), dan artemia dewasa. Telur larva udang (*Artemia salina* Leach) berbentuk bulat dengan ukuran 0,2-0,3 mm. Kemudian telur menetas menjadi larva. Telur yang baru menetas memiliki ukuran kurang lebih 300 mikro. Sebelum berubah menjadi dewasa, larva mengalami perubahan bentuk sebanyak 15 kali dalam tingkatan hidup. Untuk menjadi artemia dewasa pada umumnya membutuhkan waktu berkisar 2 minggu. Pada fase awal artemia dewasa berbentuk silinder dengan panjang berukuran 12-15 mm dengan tubuh terbagi atas bagian kepala, dada, dan perut. *Artemia salina* Leach memiliki ketahanan hidup pada suhu 25-30° C, ph berkisar 8-9, oksigen terlarut berkisar 3 mg/L, serta perairan yang berkadar garam tinggi berkisar 15-30 permil (Panjaitan, 2011).



Gambar 2.4 Siklus Hidup *Artemia salina* Leach (Mudjiman, 1995)

Tahapan penetasan *Artemia salina* Leach terdiri atas tahap hidrasi, pemecahan cangkang, dan tahap pengeluaran. Pada tahap hidrasi ini terjadi penyerapan air dimana kista akan menjadi kering dan berbentuk menjadi bulat serta aktif bermetabolisme. Tahap kedua yaitu pemecahan cangkang dan tahap pengeluaran yang terjadi pada beberapa saat sebelum larva keluar dari cangkang. *Artemia* yang baru saja menetas berbentuk bulat lonjong dan berwarna orange.



Gambar 2.5 Tahap penetasan telur *Artemia salina* Leach (Mudjiman, 1995)

2.5.3. Penetasan *Artemia salina* Leach

Pada uji toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach yaitu menggunakan metode BSLT untuk penetasan larva udang. Pada penetasan telur larva tahap pertama yang dilakukan adalah pembuatan air garam dengan kadar konsentrasi 5 per mil. Telur-telur larva dapat ditetaskan pada air laut maupun dengan air laut buatan sendiri. Kemudian dilakukan penyesuaian ph agar dapat stabil dengan nilai ph berkisar 8-9 namun juga bisa ditambahkan dengan 2 gram atau 1 natrium

hidrokarbonat (Mudjiman, 1991).

Penetasan larva udang *Artemia salina* Leach dilakukan di dalam wadah aquarium yang memiliki bentuk kotak dan memiliki panjang 40 cm, lebar 20 cm dan tinggi 20 cm. Kemudian wadah tersebut dibagi menjadi dua bagian yaitu pada bagian gelap dan bagian terang. Pada bagian gelap aquarium digunakan untuk tempat telur dan pada bagian terang digunakan untuk merangsang pertumbuhan larva dengan menggunakan bantuan lampu pijar sebesar 5W. Pada dua bagian yang telah dibuat terdapat sekat pemisah atau pembatas tepat pada bagian tengah untuk dibuat lubang dengan diameter 3 cm yang memiliki fungsi untuk jalan keluar larva udang dari tempat yang gelap menuju tempat yang terang. Pada penetasan larva udang menggunakan media air laut yang sudah distrerilkan dan memiliki pH serta distabilkan terlebih dahulu dengan menggunakan penyaringan. Media penetasan telur larva memerlukan kadar oksigen harus lebih dari 3 mg/L dan diberi udara menggunakan aerator. Telur-telur larva biasanya akan menetas pada kurun waktu 24-36 jam pada umumnya larva yang sudah menetas disebut dengan nauplii. Nauplii ini akan aktif ketika telah berumur 48 jam sehingga dapat digunakan sebagai hewan uji dalam percobaan (Ningdyah, 2015).

2.6. BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)

Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) adalah suatu metode penapisan farmakologi awal yang murah, mudah, cepat dan tidak menggunakan spesialisasi tertentu, metode ini telah teruji hasilnya berdasarkan tingkat kepercayaan berkisar 95% yang berfungsi untuk mengamati tingkat toksisitas suatu senyawa yang berhubungan dengan tahap awal pengujian aktivitas sebelum diaplikasikan pada sel lain (Baud dkk., 2014).

Pada pengujian BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) memiliki tujuan untuk mengetahui sifat toksik ekstrak tanaman yang nantinya dapat dikembangkan sebagai obat antikanker. Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan memanfaatkan larva udang *Artemia salina* L. sebagai indikator. Mengenai hasil dari metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) berdasarkan pada akumulasi nilai LC₅₀ setelah aktivitas dari pengamatan senyawa ekstrak tanaman pada ku

run waktu 24 jam. Nilai LC_{50} dapat menunjukkan tingkat konsentrasi pada bahan mana yang akan menyebabkan kematian 50% pada hewan uji (Naidu dkk., 2014). Penggunaan larva udang *Artemia salina* L. sebagai indikator adanya senyawa antikanker telah digunakan di Lafayette, Indiana, Amerika Serikat oleh Pusat Kanker Purdue, Universitas Purdue Amerika Serikat. Pada metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) terdapat ikatan yang spesifik dengan senyawa yang memiliki sifat toksik dengan sitotoksitas. Senyawa yang bersifat toksik tersebut diperkirakan mampu menjadi agen antikanker (Vitalia dkk, 2016).

2.7. Uraian Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Dalam pengujian toksisitas terhadap larva udang pengukuran suatu tingkat ketoksikan pada senyawa dapat dilakukan dengan cara kuantitatif. Perbandingan antara zat disertai dengan pemaparan mengenai efek toksik maupun batas nilai aman suatu senyawa biasanya disebut dengan toksisitas. Pengamatan yang dilakukan pada tahap uji toksisitas ini yaitu pengamatan gejala klinis, histopatologi tubuh pada hewan coba, dan jumlah kematian hewan uji sehingga pada uji LC_{50} (*median lethal concentration*) maupun pada LD_{50} (*median lethal dose*) memperoleh data yang komulatif (Loomis, 1978).

Penentuan toksisitas senyawa pada hewan coba larva udang (*Artemia salina* Leach) merupakan tahap awal uji pendahuluan pada aktivitas biologis yang sederhana. Penggunaan larva udang *Artemia salina* Leach dalam pengujian toksisitas ini menggunakan *Artemia salina* yang sudah berusia 48 jam karena pada larva udang sudah terbentuk sempurna berupa mulut maupun saluran pencernaannya. Pada penggunaan larva *Artemia salina* yang digunakan dalam pengujian ini adalah *Artemia salina* yang berusia 48 jam karena pada larva umur 48 jam mulut, saluran pencernaannya, dan memiliki ketahanan tubuh yang meningkat (Fatimawati dkk., 2019). Pengujian toksisitas dilakukan agar dapat mengetahui suatu efek toksik dalam suatu bahan alam (Emi, 2019).

Tabel 2. 1 Tingkat toksisitas bahan (Mayer *et al.*, 1982).

Kategori	LC ₅₀ (µg/ml)
Sangat toksik	< 30
Toksik	30-1000
Tidak toksik	>1000

Dalam mekanisme kematian larva *Artemia salina* memiliki hubungan yang erat dengan fungsi senyawa metabolit sekunder dalam daging buah majapahit (*Crescentina cujete*) seperti senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dan fenolik karena senyawa tersebut dapat menghambat daya makan larva (antifedan). Cara kerja senyawa metabolit sekunder saponin yaitu dengan cara mengikat oksigen dalam air, sehingga saponin dapat menyebabkan larva *Artemia salina* mati akibat kekurangan oksigen karena saponin mengandung glikosida yang memiliki sifat menyerupai sabun serta larut dalam air yang mengakibatkan kadar oksigen dalam air menurun.

Pada senyawa metabolit sekunder flavonoid bekerja dengan cara menurunkan aktivitas enzim pencernaan serta dapat melakukan penyerapan makanan yang dapat bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut sehingga dapat menyebabkan larva *Artemia salina* menjadi kelaparan dan mati. Sedangkan pada senyawa metabolit sekunder alkaloid dapat juga membunuh larva udang karena alkaloid termasuk dalam komponen aktif yang bekerja di saraf sehingga dapat menyebabkan gangguan pencernaan. Alkaloid juga dapat bertindak sebagai racun melalui mulut larva. Sehingga dapat mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa dan larva tidak dapat mengenali makanannya yang dapat membuat larva mati kelaparan (Yunita, 2009).

2.8. Probit

Pada analisis probit ini merupakan suatu jenis regresi yang berfungsi untuk menganalisis variable dalam respond binomial serta merupakan metode statistic yang berhubungan pada pemahaman dosis-respond dan digunakan dalam

perbandingan antara variabel respon terhadap variabel independen. Pada analisis probit ini umumnya digunakan untuk menentukan toksisitas yang relative dari suatu bahan kimia terhadap organisme hidup yang dilakukan dengan cara pengujian respon organisme pada berbagai konsentrasi bahan kimia yang akan digunakan (Kim, 2013). Probit analisis umumnya digunakan dalam toksikologi yang berfungsi untuk menentukan toksisitas relative bahan kimia hewan hidup dengan cara menguji respon suatu organisme pada berbagai konsentrasi bahan kimia dengan membandingkan konsentrasi di mana respon terjadi

Hasil yang sering digunakan pada percobaan dosis-respon yaitu pada nilai LC_{50} . Pada perhitungan nilai LC_{50} juga terdapat persyaratan yaitu:

1. Adanya tabel probit
2. Penentuan nilai probit dari % kematian tiap kelompok hewan uji
3. Penentuan log dosis tiap-tiap kelompok
4. Menentukan persamaan garis lurus hubungan antara nilai probit dengan log dosis, $Y=mX+b$
5. Memasukkan nilai 5 (probit dari 50% kematian hewan coba) pada persamaan garis lurus pada nilai Y. Nilai LC_{50} dihitung dari nilai anti log X pada saat $Y=5$ (Priyanto, 2009).

Tabel 2.2 Nilai % Probit (Finney, 1971).

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.25	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi corong (Pyrex), kertas saring, rotary vacuum evaporator, aquarium, aluminium foil, rak tabung reaksi, kain hitam, sekat berlubang, aerator (alat pengatur oksigen), lampu sebagai pemanas (suhu), pengikat mikro, kaca pembesar (Joyko), tabung reaksi (Pyrex), beaker glass (Pyrex), pipet, instrument LCMS (Shimadzu LCMS).

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging buah segar majapahit sebanyak 500 gram, fermipan, garam laut, HCL pekat, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendrof, HCL 2 N, FeCl₃, dan aquades.

3.2. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang ditandai dengan warna putih segar yang diambil di desa Wates, Sumbergempol, Tulungagung.

3.3. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang ditandai dengan warna putih segar yang diambil di desa Wates, Sumbergempol, Tulungagung.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan sesuatu dalam bentuk apapun yang ditetapkan bagi peneliti yang digunakan untuk dipelajari sehingga mampu menarik informasi dari penelitian yang telah dilakukan agar dapat diambil kesimpulannya (Soleha, 2015). Variabel yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu, variabel bebas, variabel kontrol, dan variabel terikat.

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat menjadi penyebab atau mempengaruhi perubahannya (Sugiyono, 2013). Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak pekat daging buah majapahit yakni

500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, dan 100 ppm yang dilakukan untuk pengujian toksisitas akut dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*).

3.4.2. Variabel Kontrol

Metode Infusa merupakan sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90 °C selama 15 menit.

BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) merupakan metode pengujian toksisitas dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach. Nilai yang diperoleh berupa LC₅₀ yang mana ekstrak dapat menyebabkan kematian 50% larva *Artemia salina* Leach.

3.4.3. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang menjadi akibat atau yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas (Sugiyono, 2013). Variabel terikat pada penelitian ini yakni:

1. Usia larva *Artemia salina* Leach adalah 48 jam
2. Air laut buatan yang digunakan dengan kadar 5/ml
3. PH air laut yang digunakan yaitu 7 sampai 8
4. Tempat yang digunakan untuk percobaan BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

3.5. Determinasi Tanaman

Sampel tanaman majapahit dideterminasi di UPT Matera Medika Batu Malang, Jawa Timur. Tujuan dilakukan determinasi untuk mengetahui kebenaran jenis tanaman (Depkes RI, 2000).

3.6. Metode Penelitian

Menurut Departemen Kesehatan (1995) ekstraksi pada daging buah segar dilakukan dengan menggunakan metode infundasi termodifikasi. Pembuatan yang dilakukan pada daging buah Majapahit dengan cara daging buah Majapahit dicuci hingga bersih, kemudian daging buah dipotong-potong dan dilakukan pemanasan simplisia daging buah segar Majapahit sebanyak 500 gram didalam 1000 ml aquadest dalam panci infusa dilakukan di atas pemanas air selama 15 menit terhitung sejak suhu 90°C sambil sesekali diaduk. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring. Infusa yang telah diperoleh kemudian dilakukan evaporasi dengan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 55°C pada kecepatan rotasi 60 rpm dengan posisi labu rotavapor terendam

dalam waterbath dengan tekanan udara 350 mBar selama prose pemekatan berlangsung. Destilat kemudian ditampung dalam labu rotavapor, sehingga hasil ekstrak dimasukkan dalam cawan porselen lalu diuapkan sampa memperoleh bobot yang konstan.

3.7. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan suatu senyawa dalam tanaman atau simplisia yang akan digunakan. Fitokimia pada tumbuhan mempelajari mengenai aneka ragam senyawa organic yang akan dibentuk oleh tanaman berupa struktur kimia, biosintesis, penyebaran secara ilmiah, dan pada fungsi biologisnya.

Senyawa kimia yang merupakan hasil metabolit sekunder banyak dimanfaatkan sebagai zat warna, racun, aroma makanan, dan sebagai obat-obatan sehingga masih banyak jenis tumbuhan lainnya yang digunakan sebagai obat-obatan yang umumnya dikenal sebagai obat tradisional. Penelitian perlu dilakukan pada penggunaan tumbuhan yang memiliki khasiat beserta fungsi senyawa kimia dalam obat.

Hasil metabolisme sekunder pada senyawa kimia suatu tanaman memiliki keanekaragaman yang dapat diklasifikasikan dalam tingkat golongan senyawa bahan alam meliputi, senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, dan steroid (Putranti dkk, 2013).

3.7.1. Flavonoid

Skrining fitokimia senyawa flavonoid dalam ekstrak daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 1 gram lalu masukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCL pekat 5 tetes dan dipanaskan selama 15 menit di atas penangas air. Apabila terbentuk adanya endapan berwarna merah atau kuning maka sampel tersebut positif flavonoid (Muthmainnah, 2019).

3.7.2. Alkaloid

Skrining fitokimia senyawa alkaloid dalam ekstrak daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 2 gram

kemudian masukkan kedalam tabung reaksi dan ditetsi dengan 5 mL HCL 2N Lalu dipanaskan. Selanjutnya didinginkan dan dibagi menjadi 3 tabung reaksi masing-masing 1 mL menggunakan pereaksi Mayer. Hasil yang positif mengandung alkaloid ditandai dengan adanya endapan berwarna putih atau kuning. Sedangkan penambahan pereaksi Wagner hasil positif mengandung alkaloid jika terdapat endapan berwarna coklat dan pada Dragendrof hasil positif jika terbentuk endapan berwarna jingga (Muthmainnah, 2019).

3.7.3. Saponin

Skrining fitokimia senyawa saponin dalam ekstrak daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air panas lalu dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Memperoleh hasil positif mengandung saponin jika terbentuk adanya buih setinggi 1-10 cm dan tidak kurang dalam 10 menit dan pada saat dilakukan penambahan 1 tetes HCL 2 N, buih yang terbentuk tidak hilang (Muthmainnah, 2019).

3.7.4. Tanin

Skrining fitokimia senyawa flavonoid dalam ekstrak daging buah Majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air panas selama 5 menit lalu filtratnya ditambahkan $FeCl_3$ sebanyak 3-4 tetes. Hasil positif adanya tanin yaitu terbentuk warna hijau biru maupun biru hitam (Muthmainnah, 2019).

3.8. Identifikasi Senyawa Ekstrak Daging Buah Majapahit (*Crescentia cujete*) Menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*)

Identifikasi senyawa ekstrak merupakan pengujian lanjutan dari skrining fitokimia, dimana kita menguji ekstrak daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) menggunakan LCMS. Pada uji ini sampel dikirimkan di UMM (Universitas Muhammadiyah Malang).

3.9. Skrining Metode BSLT

Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) merupakan suatu metode yang diketahui untuk penapisan dalam penyarian senyawa antikanker pada tanaman. Semakin tinggi tingkat toksisitas metabolit sekunder yang dimiliki dari BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang dipaparkan dengan nilai LC_{50} yang kecil maka semakin memiliki potensial pada tanaman sehingga dimanfaatkan dalam pengobatan antikanker (Mayer *et al.*, 1982). Uji toksitas dalam prosedur dari metode BST yaitu dengan menentukan nilai LC_{50} dari konsentrasi suatu sampel dalam kematian hewan uji selama 24 jam menggunakan regresi linier (Prawirodiharjo, 2014).

3.10. Pemilihan Telur Larva

Pemilihan telur larva *Artemia salina* Leach merupakan salah satu langkah yang dapat dilakukan agar pengujian yang dilakukan dapat berhasil. Apabila dalam proses penetasan atau pengujian menggunakan metode BSLT dengan telur tidak baik maka hasil penetasan dan pengujianannya tidak bisa maksimal, baik dari hasil jumlah penetasan sedikit atau daya bertahan hidup larva *Artemia salina* Leach yang tidak baik. Telur pada *Artemia salina* Leach yang baik yaitu berupa telur yang kering karena agar telur larva *Artemia salina* Leach dapat bertahan lama, proses penetasan berkisar 24-36 jam dan dapat berpindah menuju daerah yang lebih terang.

3.11. Penyiapan Larva

Menyiapkan wadah bening atau aquarium kecil yang berisi air laut buatan berkadar 5 per mil sebanyak 1 liter kemudian bagi menjadi 2 bagian dengan sekat yang berlubang. Tutup pada 1 bagian agar timbul suasana gelap dan dibandingkan dengan 1 bagian pada suasana terang. Selanjutnya masukkan telur larva *Artemia salina* Leach yang telah direndam aquadest selama 1 jam pada bagian gelap dan tutup dengan menggunakan aluminium foil dan kain hitam dengan waktu 24-36 jam sampai telur menetas. Kemudian telur yang sudah menetas berpindah pada bagian terang yang sudah diberi lampu penerangan agar suhu yang ada dapat stabil yaitu kurang lebih suhu berkisar 25-30°C.

3.12. Pembagian Kelompok Perlakuan

Pembagian kelompok perlakuan pada metode BSLT menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebanyak 110 ekor. Larva-larva tersebut akan dibagi dalam lima kelompok uji yang nantinya akan direplikasikan sebanyak tiga kali, sehingga setiap kelompok berisi 10 larva *Artemia salina* Leach.

Tabel 3. 1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Konsentrai	Replikasi
Kontrol negative	3
1000 ppm	3
900 ppm	3
800 ppm	3
700 ppm	3
600 ppm	3

3.13. Uji Toksisitas

Uji Pendahuluan yang dilakukan yaitu pembuatan larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm dalam 100 ml, membutuhkan 100 mg ekstrak kental. Konsentrasi dimula dari 1000 ppm dengan kelipatan 100 sehingga menjadi 900 ppm hingga menjadi 600 ppm dengan cara dilakukan pengenceran konsentrasi. Uji toksisitas memiliki fungsi sebagai perlakuan untuk skrining pada jenis tanaman yang berpotensi sebagai antikanker. Pemanfaatan bahan alam untuk dijadikan antikanker dibutuhkan nilai LC_{50} yang rendah, karena semakin toksik maka semakin baik untuk mengobati kanker (Sutiningsih dkk., 2020). Uji toksisitas larva *Artemia salina* Leach perlakuan pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva tersebut dengan tiga kali replikasi. Penilaian kematian larva *Artemia salina* Leach sebagai kriteria standar apabila tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik saat observasi berlangsung. Observasi pengamatan pada pergerakan yaitu selama 10 detik, apabila larva *Artemia salina* Leach tidak ada pergerakan selama 10 detik maka larva *Artemia salina* Leach dapat dikatakan mati. Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan persen kematian.

$$\% \text{ larva} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Dengan mengetahui kematian larva *Artemia salina*, kemudian dicari angka probit melalui tabel dan dibuat persamaan garis :

$$Y = Bx + A$$

Keterangan:

Y : log konsentrasi

X: Angka probit

Dari persamaan tersebut kemudian dihitung LC50 dengan memasukkan nilai probit (50 % kematian)

Tabel 3. 2 Model Tabel Data Probit Analisis

Konsentrasi (ppm)	Log (x)	10 Probit (y)	%dead	Mortality	Total hewan uji
Kontrol					
negative					
1000 ppm					
900 ppm					
800 ppm					
700 ppm					
600 ppm					

Apabila pada kontrol ada larva yang mati maka % kematian ditentukan dengan rumus Abbot (Meyer et al., 1982).

$$\% \text{kematian larva} = \frac{T - K}{10} \times 100\%$$

Keterangan:

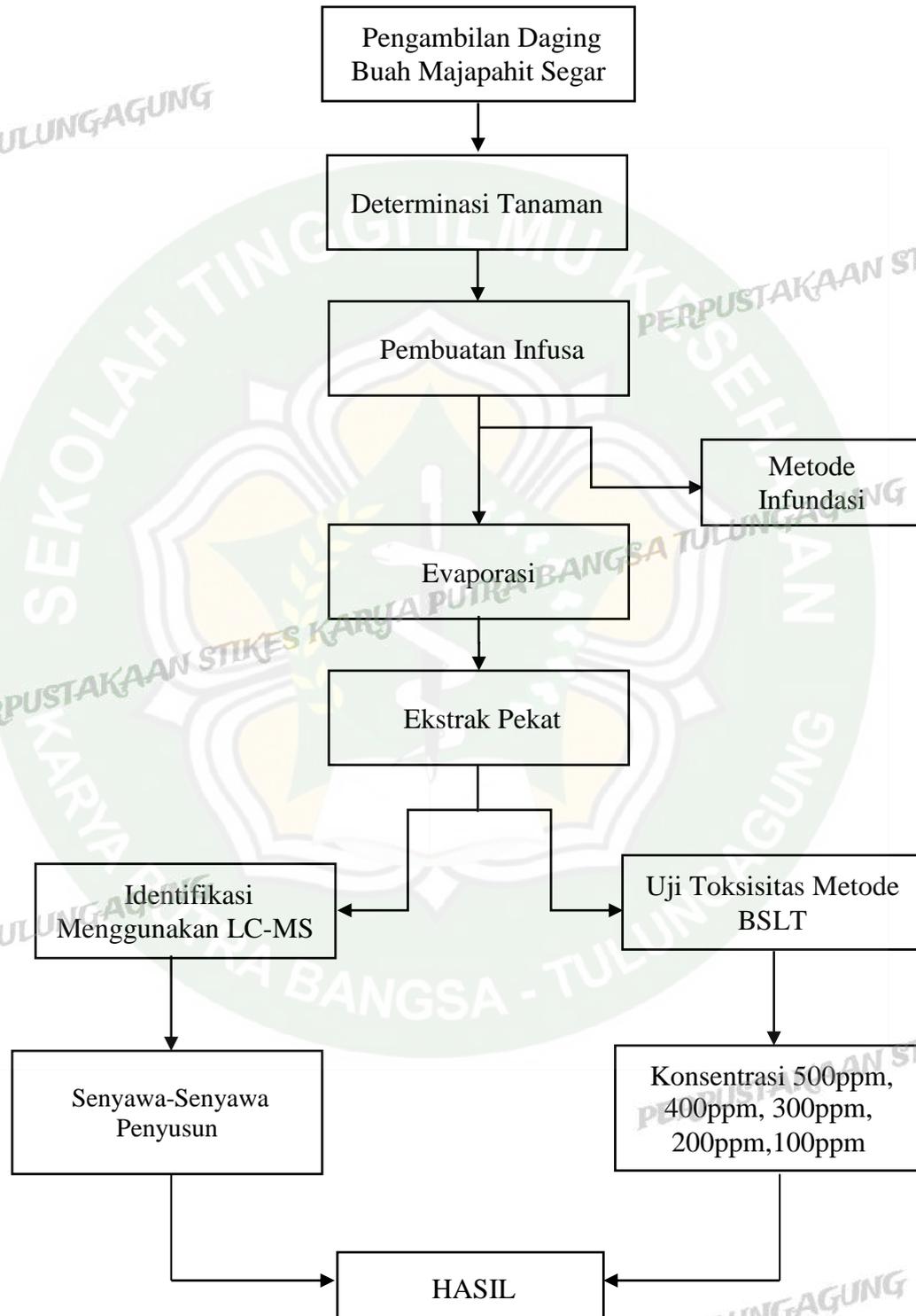
T : jumlah larva yang mati

K: jumlah larva kontrol yang mati

10 : jumlah larva uji

3.14. Kerangka Penelitian

Kerangka penelitian merupakan suatu metode yang berkatandengan variable yang akan diteliti (Notoatmodjo, 2018).



Gambar 3. 1 Kerangka Penelitian

BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman majapahit dilakukan di Materia Medika, Batu. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah daging buah majapahit. Kunci determinasi untuk daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) adalah 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b-16b-286a-287a dengan nomor surat 074/ 707/ 102.20-A/ 2022. Dapat dilihat pada Lampiran 1. Hasil determinasi tersebut menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan memiliki morfologi yang sama dengan daging buah majapahit. Sehingga dapat disimpulkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini benar-benar daging buah majapahit.

4.2 Pembuatan Ekstrak Daging Buah Majapahit

Proses ekstraksi daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan menggunakan metode infusa. Infusa ini dipilih memiliki keunggulan dalam proses pengerjaan yang mudah dan alat yang digunakan mudah didapatkan serta proses pengeskraksian bersifat sederhana dan relatif murah (Febrina dkk., 2019). Pada infusa ini, digunakan daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebanyak 1500 gr dan proses infusa dilakukan dengan merendam daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang masih segar menggunakan pelarut aquadest sebanyak 3000 mL dengan beberapa kali pengadukan dengan suhu 90°C. Infusa merupakan ekstraksi yang menggunakan pelarut aquadest yang bersifat polar sehingga senyawa yang memiliki kepolaran yang sama dengan pelarut maka akan lebih mudah terlarut dalam mengisolasi komponen senyawa aktif seperti flavonoid, saponin, dan tannin (Harunaga dkk., 2013). Dalam proses infundasi ekstrak yang didapat kemudian dilakukan pemekatan dengan metode evaporasi menggunakan evaporator hingga memperoleh ekstrak kental. Penggunaan evaporator memiliki tujuan untuk mengurangi kontak langsung antara ekstrak dan suhu panas secara terus menerus agar senyawa yang terkandung didalam daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) tidak rusak maupun berubah. Prinsip dari evaporator terletak pada penurunan

tekanan sehingga dapat menguapkan pelarut dibawah titik didihnya sehingga dapat mempermudah dalam pengontrolan suhu dan meminimalisir resiko terjadinya oksidasi udara yang mungkin bisa terjadi dalam proses penguapan yang mampu merusak senyawa-senyawa antioksidan (Salamah dkk., 2014).

4.3 Hasil Rendemen

Hasil rendemen pada infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) menggunakan konsentrasi infusa yang sesuai, sampel yang digunakan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* di Laboratorium Universitas Brawijaya Malang. Hasil evaporasi menghasilkan ekstrak kental dengan hasil rendemen 3,6%. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi kecilnya nilai rendemen yang dihasilkan seperti waktu ekstraksi, jenis dan jumlah pelarut maupun ukuran partikel (Maslukhah dkk., 2016). Hasil perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil rendemen infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*)

Sampel	Bobot Simplisia	Bobot ekstrak	%Hasil
Daging buah majapahit (<i>Crescentia cujete</i>)	1500 gram	54 gram	3,6%

4.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia ekstrak daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) bertujuan untuk memastikan keberadaan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalam ekstrak daging buah majapahit (*Crescentia cujete*). Pada daging buah majapahit mengandung senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, (Karawya dkk., 1980). Pada penelitian kali ini peneliti hanya menguji senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan tannin pada daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) karena menurut beberapa peneliti keempat senyawa tersebut mempunyai sifat toksik terhadap potensi antikanker.

Hasil uji skrining fitokimia ekstrak infusa daging buah majapahit

(*Crescentia cujete*) dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Infusa Daging Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)

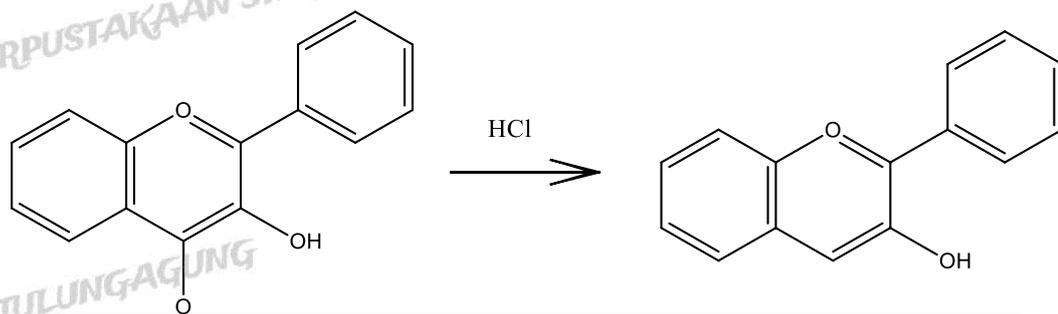
Golongan Senyawa	Pereaksi	Perubahan Warna	Hasil
Flavonoid	HCL pekat	Endapan+warna kuning/merah	(+)
Alkaloid	HCL 2N+Mayer	Endapan+warna kuning/putih	(+)
	HCL 2N+Wagner	Endapan berwarna coklat	(+)
	HCL2N+Dragendrof	Endapan berwarna jingga	(+)
Saponin	Air panas+HCL 2N	Terdapat buih	(+)
Tanin	Air panas+ FeCL ₃	Hijau biru / biru hitam	(+)

Keterangan : (+) Terdapat senyawa dan (-) Tidak terdapat senyawa

4.4.1 Uji Flavonoid

Uji flavonoid ini dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstrak pekat daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) diambil sebanyak 1 gram lalu masukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCL pekat 5 tetes dan dipanaskan selama 15 menit di atas penangas air. Dalam uji flavonoid penambahan HCL pekat berfungsi untuk menghidrolisis flavonoid sehingga terbentuk flavonoid tanpa aglikon, selain itu HCL juga memiliki fungsi untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk warna merah atau kuning (Ngibad, 2019).

Reaksi reduksi HCL pekat dapat membentuk senyawa kompleks yang berwarna merah, jingga atau kuning pada golongan senyawa flavonol, flavanon, dan flavanonol. Apabila terbentuk adanya endapan berwarna merah atau kuning maka sampel tersebut positif flavonoid (Mutmainah, 2019).



(Flavonoid)

Gambar 4.1 Persamaan Reaksi Flavonoid dengan HCL Pekat (Setiabudi dkk., 2017).



(A)

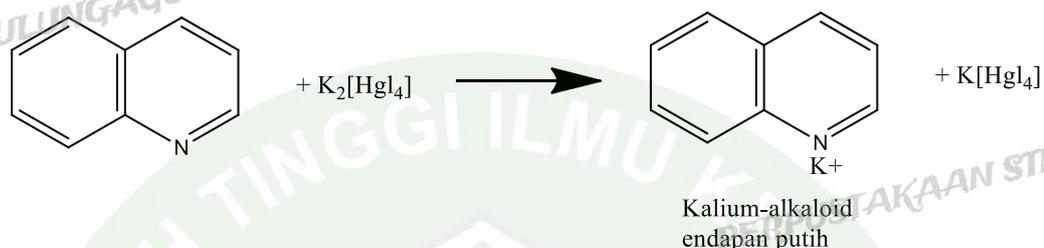
(B)

Gambar 4.2 Uji Flavonoid, (A) Sebelum perlakuan; (B) Sesudah perlakuan

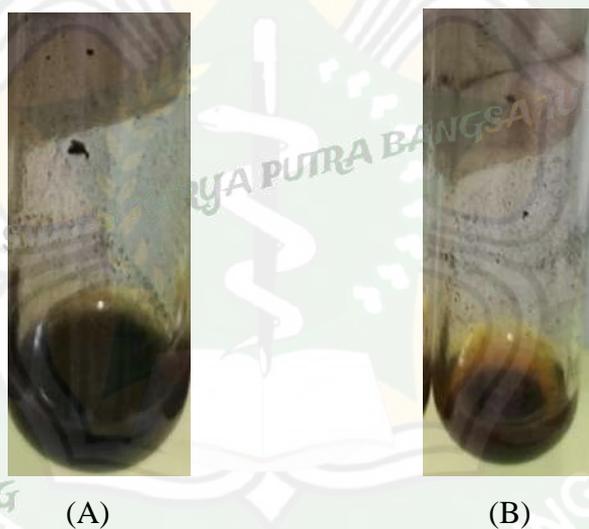
4.4.2 Uji Alkaloid

Uji alkaloid ini dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstrak pekat daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebanyak 2 gram kemudian masukkan kedalam tabung reaksi dan ditesti dengan 5 mL HCL 2N lalu dipanaskan. Selanjutnya didinginkan dan dibagi menjadi 3 tabung reaksi masing-masing 1 mL menggunakan pereaksi Mayer. Hasil yang positif mengandung alkaloid ditandai dengan adanya endapan berwarna putih atau kuning. Sedangkan penambahan pereaksi Wagner hasil positif mengandung alkaloid jika terdapat endapan berwarna coklat dan pada Dragendrof hasil positif jika terbentuk endapan

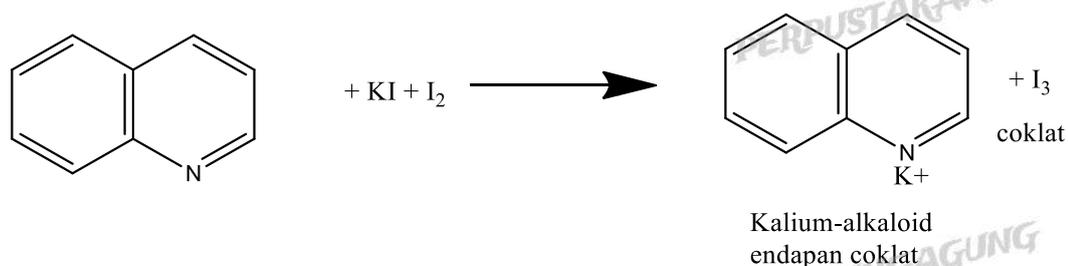
berwarna jingga (Mutmainah, 2019). Endapan yang dihasilkan pada pereaksi terjadi karena adanya pembentukan kompleks kalium-alkaloid. Alkaloid mempunyai pasangan berupa electron bebas pada atom nitrogen yang akan berikatan dengan ion K^+ yang terjadi dalam pereaksi alkaloid (McMurry *et al.*, 2004).



Gambar 4.3 Persamaan Reaksi Mayer (Setiabudi dkk., 2017).



Gambar 4.4 Uji Alkaloid dengan pereaksi meyer, (A) Sebelum perlakuan; (B) Sesudah perlakuan



Gambar 4.5 Persamaan Reaksi Wagner (Setiabudi dkk., 2017).

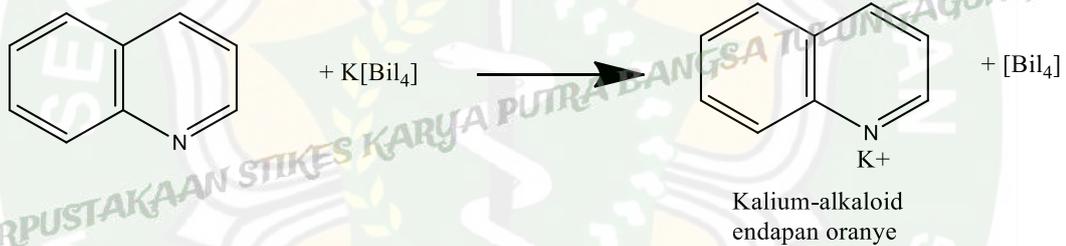


(A)



(B)

Gambar 4.6 Uji Alkaloid dengan pereaksi wagner, (A) Sebelum perlakuan; (B) Sesudah perlakuan



Gambar 4.7 Persamaan Reaksi Dragendorf (Setiabudi dkk., 2017).



(A)

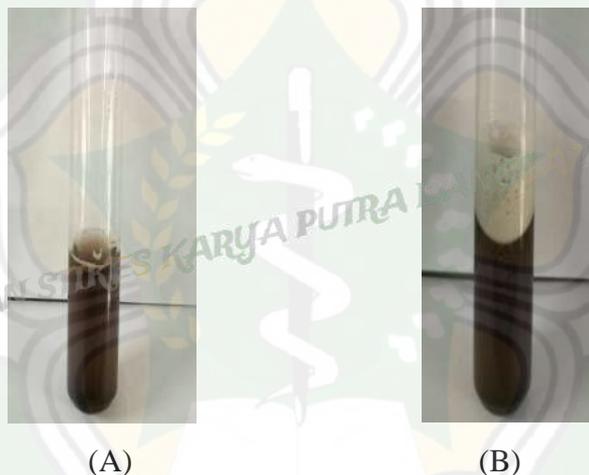


(B)

Gambar 4.8 Uji alkaloid dengan pereaksi dragendorf, (A) Sebelum perlakuan; (B) Sesudah perlakuan.

4.4.3 Uji Saponin

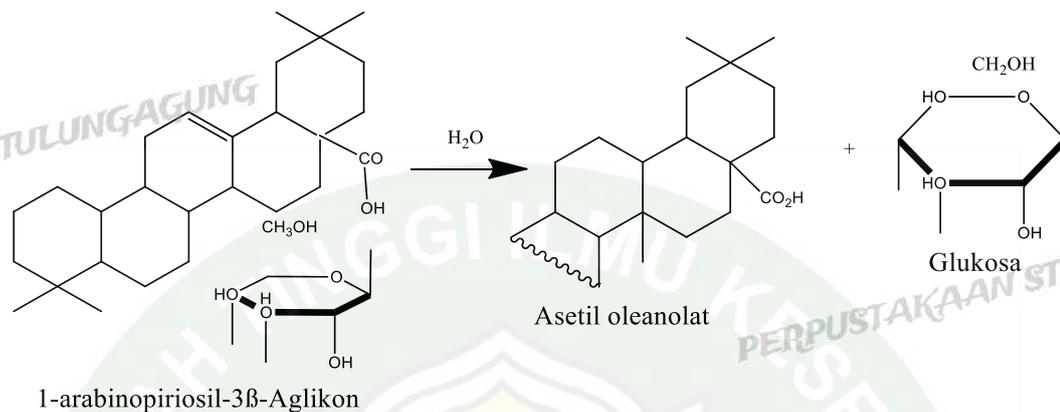
Uji saponin ini dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstrak pekat daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air panas lalu dinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Memperoleh hasil positif mengandung saponin jika terbentuk adanya buih setinggi 1-10 cm dan tidak hilang dalam 10 menit karena saponin termasuk kedalam komponen ikatan glikosida yang menyebabkan senyawa saponin cenderung bersifat polar (Harbone, 1987). Pada saat dilakukan penambahan 1 tetes HCL 2 N, buih yang terbentuk tidak hilang (Mutmainah, 2019).



Gambar 4.9 Uji Saponin, (A) Sebelum Perlakuan; (B) Sesudah perlakuan

Hasil uji saponin ekstrak infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) adalah positif, ditunjukkan dengan adanya buih dan buih tidak akan hilang setelah dilakukan penambahan HCL 2 N sebanyak 1 tetes. Penambahan HCL 2N mampu menjadikan busa lebih stabil karena busa yang ditimbulkan sebab senyawa saponin mengandung senyawa yang sebagian larut dalam air atau bersifat *hidrofilik* dan senyawa yang larut dalam pelarut non polar bersifat *hidrofobik* yang berperan sebagai surfaktan yang dapat menurunkan suatu tegangan permukaan. Pada saat dilakukan pergojokan, gugus hidrofil nantinya akan berikatan dengan air sedangkan pada gusus hidrofob akan berikatan dengan udara sehingga dapat

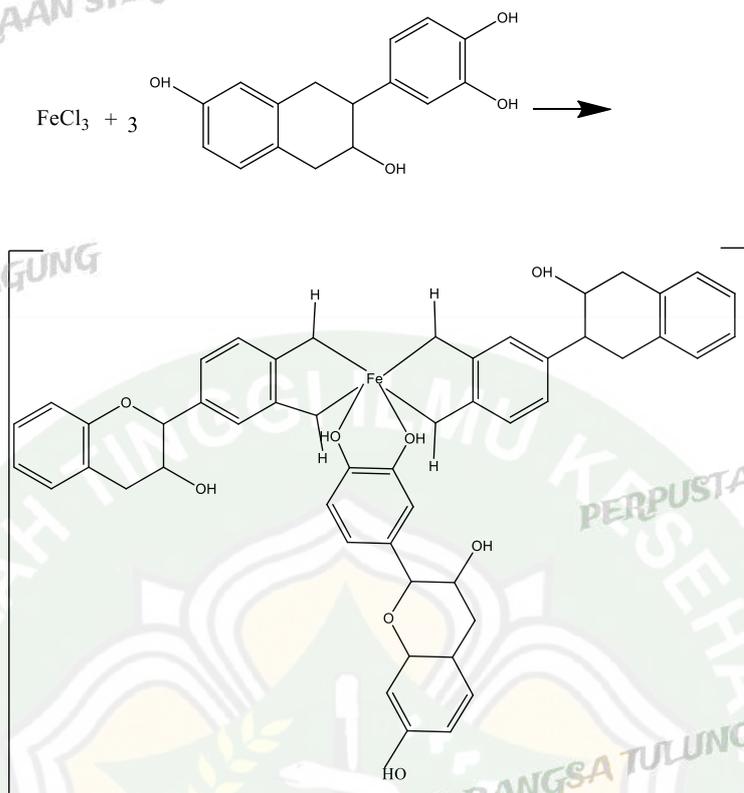
membentuk buih. Buih yang dihasilkan pada pengujian saponin bersifat stabil (Harbone, 1987).



Gambar 4.10 Persamaan Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air (Setiabudi dkk., 2017).

4.4.4 Uji Tanin

Uji tanin ini dilakukan dengan cara mengambil sampel ekstrak pekat daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebanyak 1 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL air panas selama 5 menit lalu filtratnya ditambahkan FeCl_3 sebanyak 3-4 tetes. Hasil positif adanya tanin yaitu terbentuk warna hijau biru maupun biru hitam (Mutmainah, 2019). Perubahan warna yang terjadi karena adanya senyawa fenol pada tanin, sebab tanin merupakan senyawa polifenol sehingga senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} akan terbentuk (Sulasmi dkk., 2019). Senyawa kompleks terbentuk karena adanya ikatan kovalen yang berkoordinasi dengan ion maupun atom logam c dengan atom non logam (Lathifa, 2015).



Gambar 4.11 Persamaan Reaksi antara tanin dan FeCl_3 (Sulasmi dkk., 2019).



(A)

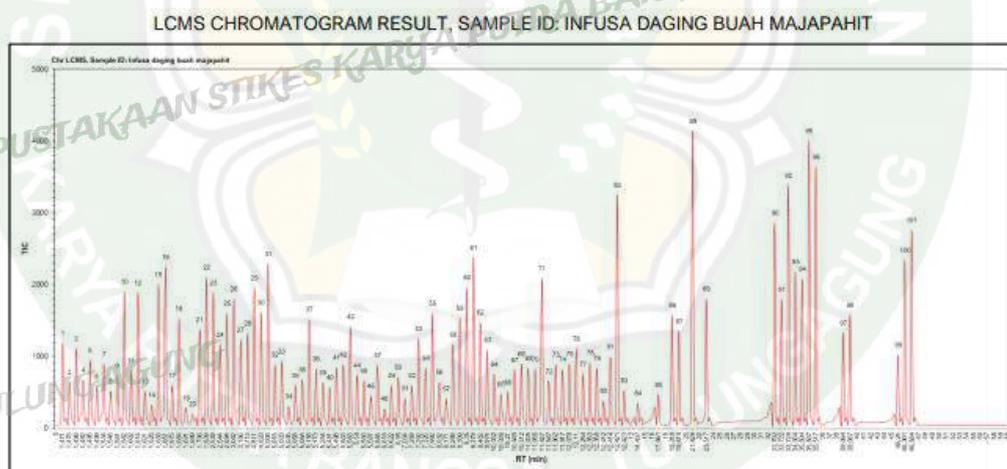


(B)

Gambar 4.12 Uji Tanin, (A) Sebelum perlakuan; (B) Sesudah perlakuan

4.5 Identifikasi LCMS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometri)

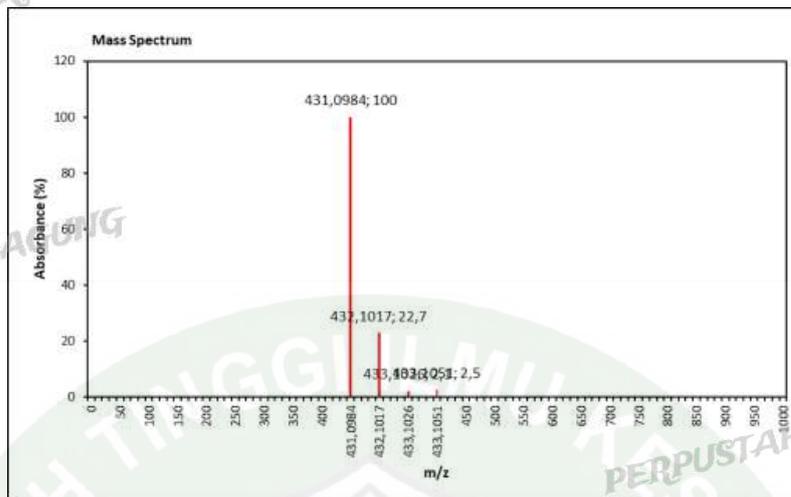
Identifikasi LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometri*) dilakukan di Universitas Muhammadiyah Malang dengan tujuan untuk menganalisis data terkait struktur, berat molekul, identitas dan kuantitas komponen pada daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang akan diuji LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometri*) yang berbentuk kromatogram dimana semua senyawa aktif dapat dipisahkan berdasarkan interaksi relatif dengan lapisan partikel-partikel kimia dengan fase diam dan melalui elusi pelarut dalam kolom menggunakan fase gerak (Himawan, 2010). Hasil *chromatogram* pada gambar 4.8 dapat dilihat puncak terendah sampai dengan tertinggi, dengan jumlah 101 senyawa yang ditemukan pada infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*). Hasil kromatogram pada *liquid chromatogram* terdapat 2 puncak tertinggi dengan nomor 88 dengan nama (*kaempferol-3-O-rhamnoside*) dan nomor 95 dengan nama *hesperidine*.



Gambar 4.13 Hasil *chromatogram* dari *Liquid Chromatography*

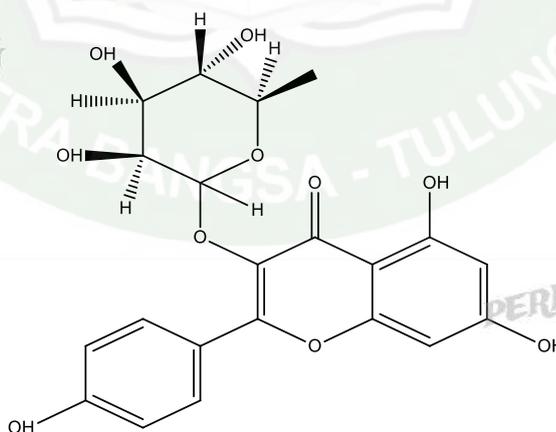
4.5.1 *Kaempferol-3-O-rhamnoside*

Kaempferol-3-O-rhamnoside memiliki kadar persentase senyawa sebesar 3,29479%. Hasil dari *mass spectrum* senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside* terdapat pada gambar 4.9 sebagai berikut :



Gambar 4.14 Hasil *Mass Spectrometri* senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside*

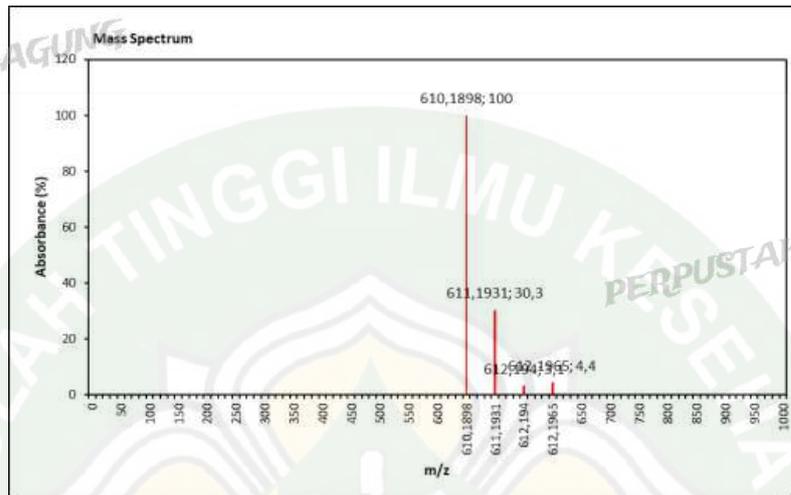
Senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside* memiliki berat molekul (m/z) 432,3810, dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_{10}$. Hasil struktur senyawa dapat dilihat pada gambar 4.10. *Kaempferol-3-O-rhamnoside* termasuk kedalam golongan senyawa flavonoid yang memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 serta dapat menginduksi terjadinya apoptosis dengan cara mengaktifasi *signaling caspase* secara *cascade* (Diantini dkk., 2012).



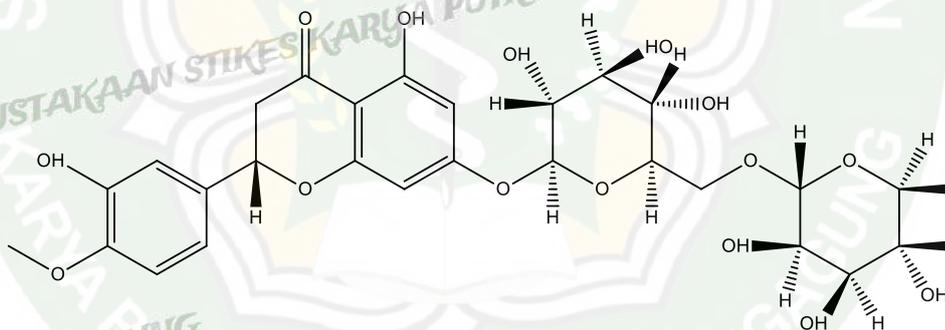
Gambar 4.15 Hasil struktur senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside*

4.5.2 Hesperidine

Hesperidine memiliki kadar persentase senyawa sebesar 3,18572%. Hasil dari *mass spectrum* senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside* terdapat pada gambar 4.11 sebagai berikut :



Gambar 4.16 Hasil *Mass Spectrometri* senyawa *hesperidine*



Gambar 4.17 Hasil struktur senyawa *hesperidine*

Senyawa *hesperidine* memiliki berat molekul (m/z) 610,1898, dengan rumus kimia $C_{28}H_{34}O_{15}$. Hasil struktur senyawa dapat dilihat pada gambar 4.12. *Hesperidine* termasuk kedalam golongan senyawa flavonoid yang memiliki mekanisme kerja dengan cara menginduksi apoptosis pada sel pleural mesothelioma (MSTO-211H) sebagai penghambat protein Sp 1 (Lee *et al.*, 2012). *Hesperidine* juga dapat menginduksi apoptosis pada beberapa kanker seperti kanker kolon, kanker hati, kanker payudara, kanker *gastric*, dan kanker paru (Devi dkk., 2015).

4.6 Skrining Potensi Antikanker dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

4.6.1 Pembuatan Air Laut Buatan

Pembuatan air laut untuk *Artemia salina* Leach yaitu menggunakan garam tanpa iodium sebanyak 35 gr kedalam 1000 ml aquadest, lalu diaduk sampai homogen. *Artemia salina* Leach dapat hidup dengan baik pada suhu berkisar 25°C sampai dengan 30°C pada air yang memiliki kadar garam tinggi dengan pH air berkisar 8 sampai 9. Kestabilan pH sangat penting dalam penetasan *siste* karena pemecahan cangkang dapat terjadi karena adanya bantuan enzim. Kandungan oksigen *Artemia salina* Leach yaitu mendekati titik jenuh berkisar 3 mg/L. Air laut buatan yang sudah jadi kemudian dilakukan aerasi dengan tujuan agar air laut buatan memiliki kandungan oksigen yang cukup untuk kelangsungan hidup larva udang *Artemia salina* Leach.

4.6.2 Penetasan *Siste Artemia*

Penetasan telur udang *Artemia salina* Leach ditetaskan dengan cara dimasukkan kedalam 500 ml air laut buatan yang telah diukur PH nya berkisar 8 sampai 9 yang dimasukkan pada aquarium penetasan dengan menggunakan aerator. Telur *Artemia salina* Leach dibiarkan selama 48 jam sampai menetas menjadi nauplii yang matang dan siap digunakan untuk percobaan. Telur *Artemia salina* Leach yang menetas akan bergerak secara alamiah menuju pada daerah terang sehingga larva udang dapat terpisah dari kulit telur. Nauplii atau buayak yang baru menetas mempunyai warna kemerah-merahan yang diperoleh dari cadangan makanan pada tubuhnya. Larva yang sehat memiliki sifat yang fototropik. Larva udang mampu hidup karena mendapatkan makanan berupa ragi yang dibuat dengan menggunakan air laut buatan sebanyak 5 ml dan ragi 3 mg. Dalam penelitian ini burayak yang digunakan adalah burayak yang telah ditetaskan selama 48 jam atau 2 hari karena sifat burayak yang lebih peka terhadap zat yang masuk dan burayak sudah memiliki organ tubuh yang sempurna dan lengkap. Sehingga data kematian burayak benar-benar disebabkan oleh ekstrak daging buah majapahit (*Crescentia cujete*).

4.6.3 Uji Toksisitas Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan metode dalam uji toksisitas akut yang digunakan sebagai suatu bioassay untuk menguji suatu senyawa aktif pada bahan alam dengan menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach. Larva udang *Artemia salina* sangat sensitif terhadap senyawa sitotoksik sehingga metode penetasan harus dioptimalisasikan sebelum dilakukan uji toksisitas (Sembiring *et al.*, 2016). Penggunaan larva udang pada waktu 48 jam memiliki sensitifitas terhadap toksin sehingga cocok digunakan pada percobaan. Pemilihan hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach sebagai sampel antikanker karena larva udang *Artemia salina* Leach memiliki respon seperti mamalia serta respon stress seperti manusia sehingga larva udang mempunyai syaraf pusat, sistem pencernaan, dan sitem vaskular yang hampir sama dengan manusia. Korelasi uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap antikanker yaitu sebagai metode skrining untuk mengetahui ketoksikan suatu ekstrak ataupun senyawa bahan alam terutama pada daging buah majapahit (*Crescentia cujete*). Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) akan berkaitan dengan nilai LC_{50} yang merupakan nilai yang dapat menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% kematian pada hewan uji setelah perlakuan dalam waktu 24 jam (Naidu dkk., 2014).

Pada metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terdapat ikatan spesifik yaitu senyawa yang bersifat toksik sehingga diperkirakan mampu menjadi agen antikanker (Vitalia dkk., 2016). Senyawa infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebagai antikanker bekerja didalam pembentukan kanker pada tahap promosi dengan mekanisme kerja untuk mencegah pembentukan massa kanker agar tidak sampai pada tahap progresi dimana kanker dapat berproliferasi. Dengan metode tersebut pelaksanaan skrining awal suatu senyawa aktif dapat berlangsung dengan relatif cepat.

Pengujian dilakukan dengan analisa nilai LC_{50} apabila menghasilkan nilai kurang dari 1000ppm maka dianggap dapat menunjukkan adanya aktivitas biologis, sehingga dapat digunakan sebagai skrining awal pada senyawa bioaktif yang diduga berkhasiat sebagai antikanker. Pada penelitian ini sampel yang

digunakan adalah ekstrak infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan konsentrasi 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, 600ppm, 700ppm, 800ppm, 900ppm, dan 1000ppm. Namun data yang diambil pada penelitian ini difokuskan pada konsentrasi 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, dan 500ppm. Data prosentase tersebut sudah mendapatkan hasil yang lebih linier pada kurva serta menghasilkan nilai LC_{50} dengan hasil gambar yang sesuai. Perhitungan pada pembuatan seri konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 3. Hasil pengamatan kematian larva udang *Artemia salina* Leach dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 4.3 Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang *Artemia salina* Leach

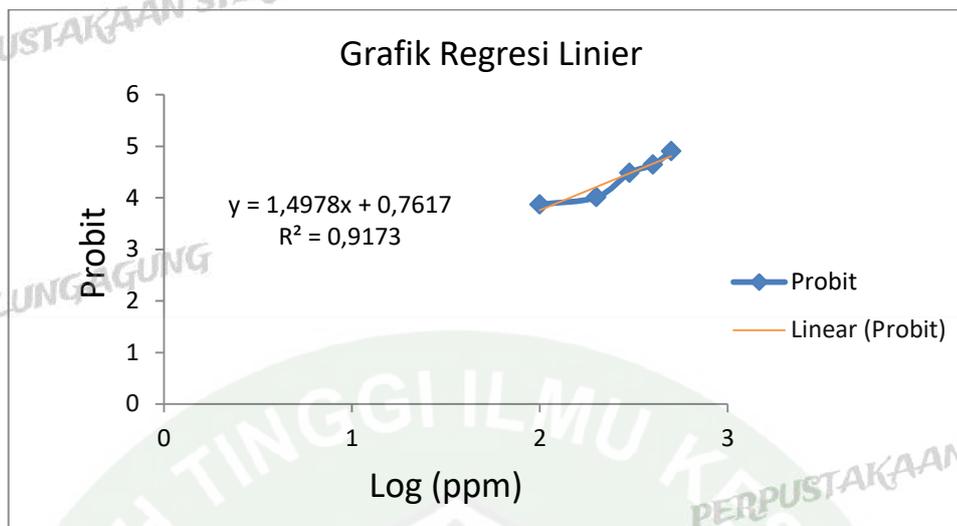
Konsentrasi (ppm)	R ₁	R ₂	R ₃	Total Kematian	Rata-rata Kematian	% Kematian
100	1	1	2	4	1,3	13%
200	1	3	1	5	1,6	16%
300	3	3	3	9	3	30%
400	4	4	3	11	3,6	36%
500	5	5	4	14	4,5	45%
600	6	5	6	17	5,6	56%
700	7	5	6	18	6	60%
800	8	6	5	19	6,3	63%
900	7	7	6	20	6,6	66%
1000	9	8	5	22	7,3	73%
K (-)	0	0	0	0	0	0

Setelah dilakukan pengujian dan mendapatkan data berupa jumlah larva udang yang mati pada konsentrasi 100ppm sampai dengan 1000ppm beserta kontrol negatifnya atau K(-), tahap selanjutnya yaitu melakukan perhitungan pada prosentase kematian untuk menghasilkan nilai probit yang dapat dilihat dengan menggunakan tabel probit. Hasil Pengamatan dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 4.4 Tabel Nilai Probit Ekstrak Infusa Daging Buah Majapahit (*Crescentia cujete*).

Konsentrasi (ppm)	Log 10 (konsentrasi)	Probit	% Kematian	Mortality	Total Hewan Uji
100	2	3,87	13%	4	30
200	2,301	4,01	16%	5	30
300	2,477	4,48	30%	9	30
400	2,602	4,64	36%	11	30
500	2,698	4,90	46%	14	30
600	2,778	5,15	56%	17	30
700	2,845	5,25	60%	18	30
800	2,903	5,33	63%	19	30
900	2,954	5,41	66%	20	30
1000	3	5,61	73%	22	30

Berdasarkan tabel diatas, langkah selanjutnya dapat melakukan proses perhitungan nilai LC_{50} . Nilai LC_{50} dapat dihitung melalui dua cara yang pertama dengan menggunakan Microsoft excel dengan menghitung *slope* berarti nilai koefisien regresi untuk penentuan variable X dan *intersept* berarti nilai rata-rata pada penentuan variable Y apabila variabel X memiliki nilai 0. Pada perhitungan ini nilai *slope* menghasilkan nilai sebesar 1,4978 sedangkan pada nilai *intersept* memperoleh nilai yaitu 0,7617. Perhitungan nilai LC_{50} dapat dilakukan melalui persamaan $y = ax + b$, pada rumus yang telah ditentukan a merupakan nilai *slope* dan b merupakan nilai *intersept*. Cara yang kedua pada perhitungan nilai LC_{50} dapat dilakukan dengan membuat grafik antara log konsentrasi dengan nilai probit yang telah diperoleh dengan membuat persamaan garis lurus pada kurva. Grafik regresi linier dapat dilihat sebagai berikut :



Gambar 4.18 Grafik regresi linier ekstrak infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap nilai probit.

Dari grafik diatas dapat dilakukan perhitungan terhadap nilai LC_{50} dengan menggunakan persamaan yang telah diperoleh yaitu $y = 1,4978x + 0,7617$. Dengan nilai y yang berisikan nilai transformasi probit, karena pada penelitian ini pencarian nilai yang dibutuhkan adalah nilai LC_{50} sehingga nilai 50 dari LC akan diubah dalam nilai probit. Hasil nilai y yang telah diubah menghasilkan nilai 5 sehingga memperoleh persamaan $5 = 1,4978x + 0,7617$ menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 675,46ppm.

Selain itu pada grafik diatas juga terdapat nilai R^2 yang merupakan nilai koefisien korelasi pada hubungan dua variabel yaitu X dan Y dimana untuk mengukur kuatnya hubungan antara variabel X dan Y. Nilai R^2 menunjukkan adanya hubungan korelasi yang linier antara konsentrasi dengan probit, nilai probit akan meningkat jika nilai konsentgrasi juga meningkat. Nilai R^2 pada grafik diatas menunjukkan nilai 0,9173.

Berdasarkan pada perhitungan nilai LC_{50} yang telah diperoleh, dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) memiliki sifat toksik karena memperoleh nilai $LC_{50} < 1000$ ppm sehingga berpotensi sebagai antikanker. Sesuai dengan pernyataan mayer (1982) menyatakan bahwa senyawa yang memiliki nilai $LC_{50} < 100$ mempunyai sifat yang sangat

toksik. Pada kategori toksik memiliki nilai LC_{50} pada rentang < 1000 ppm serta kategori tidak toksik memiliki rentang nilai LC_{50} yaitu > 1000 ppm (Mayer *et al.*, 1982).

Keberadaan sifat toksik ini berkaitan dengan senyawa-senyawa yang terkandung didalam daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebagai antikanker yaitu senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid *kaempferol-3-O-rhamnoside* dan *hesperidine* merupakan senyawa dengan presentase kadar tertinggi pada hasil identifikasi LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) yang memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat sinyal ke inti sel dengan menyerang protein kinase yang dapat menghambat proliferasi pada sel kanker serta dapat menghambat pertumbuhan suatu keganasan dengan cara menyerang reseptor tirosin kinase sebab aktivitas pada reseptor tersebut memiliki peran untuk meningkatkan pertumbuhan keganasan sel kanker (Supiningrum dkk., 2016). Senyawa dalam golongan flavonoid juga dapat menginduksi fragmentasi DNA yang dapat menyebabkan DNA menjadi rusak sehingga dapat memunculkan peningkatan protein proapoptosis sehingga dapat menyebabkan terjadinya proses apoptosis sel dan menjadikan kematian pada sel (Muaja dkk., 2013).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- 1 Pengujian skrining fitokimia pada ekstrak infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) menunjukkan bahwa terdapat kandungan senyawa berupa flavonoid, alkaloid, saponin, dan tannin.
- 2 Analisis LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) terhadap ekstrak infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) pada penelitian kali ini terdapat 101 senyawa. Adapun hasil 2 puncak tertinggi yang termasuk dalam golongan flavonoid yang memiliki fungsi sebagai antikanker yaitu senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside* dengan hasil kadar prosentase sebesar 3,29479% dan senyawa hesperidine sebesar 3,18572%.
- 3 Skrining potensi antikanker ekstrak infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan ,menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) memiliki sifat toksik yang menunjukkan adanya potensi sebagai antikanker dengan perolehan nilai $LC_{50} < 1000\text{ppm}$ yaitu sebesar 675,46ppm.

5.2 Saran

1. Pada hasil skrining antikanker daging buah majapahit (*Crescentia cujete*) menunjukkan hasil yang potensial, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan sebagai antikanker agar lebih spesifik terhadap berbagai macam kanker.
2. Hasil rendemen diharapkan lebih tinggi dengan memperhatikan metode maupun pelarut yang digunakan karena hasil rendemen yang baik yaitu memiliki nilai standarisasi diatas 10%.
3. Perlu dilakukan pengembangan terkait pengujian aktifitas sitotoksik

untuk antikanker dengan metode lain seperti metode kolorimetrik Microtetrazolium (MTT) assay dengan menggunakan ELISA reader untuk mengukur besarnya nilai LC_{50} .



DAFTAR PUSTAKA

- Agron, E.B., 2013, Clabas contain Active IngndientsPotensian for Cancer Tre atment [http:// ww.pchrd.d ost.gov.ph/index. php/20 12-05-23- 07-46-36/r-d-updates/6148-calab ash-contains- active-ingredients-potential-for-cancer-treatment](http://ww.pchrd.dost.gov.ph/index.php/2012-05-23-07-46-36/r-d-updates/6148-calabash-contains-active-ingredients-potential-for-cancer-treatment), [29 september 20 13].
- Bock, F.J.; Tait, S.W.G. 2019. *Mitochondria as multifaceted regulators of cell death*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.
- Baud, G. S., Sangi, M.S., dan H.S.J Koleangan. 2014. *Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Batang Tanaman Patah Tulang (Euphorbia tirucalli L.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Jurnal Ilmiah Sains Vol. 14. 2.
- Darma, W., & Marpaung, M. P. (2020). Analisis jenis dan kadar saponin ekstrak akar kuning secara gravimetri. *Jurnal Pendidikan Kimia Dan Ilmu Kimia*, 3(1), 51–59.
- Devi, K. P., Rajavel, T., Nabavi, S. F., Setzer, W. N., Ahmadi, A., Mansouri, K., & Nabavi, S. M. (2015). Hesperidin: A Promising Anticancer Agent. *Industrial Crops and Products*, 6(2015), 582-589.
- Diantini, A., Subarnas, A., Lestari, K., Halimah, E., Susilawati, Y., Supriyatna., Julaeha, E., Achmad, T.H., Suradji, E. W., Yamazaki, C., Kobayashi, K., & Abdulah, R. (2011). Kaempferol-3-O-rhamnoside Isolated From The Leaves of Schima wallichii Korth. Inhibits MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation Through Activation of The Caspase Cascade Pathway. *Oncology Letters*, 3(2012), 1069-1072
- Ejelonu, B. C., Lasisi, A. A., Ejelonu, O. C. 2011. *The Chemical Constituents of Calabash (Crescentia cujete)*. *African Journal of Biotechnology*. 10: 19631-19636.
- Fatimah, F., Martha, R. D., Danar, D., Zummah, A., Anggraini, I. M. D., & Kusumawati, A. (2023). Identification of Anticancer Potential Compounds and its In Silico Prediction of The Cytotoxic Activity in Majapahit (Crescentia cujete L.) Stem Bark. In AIP Conference Proceedings. doi: 10.1063/5.0112833.
- Fatimawati, Adithya Y, Frenly W. 2013. *Acute Toxicity Test of Etanol Extract from Mangosteen Pericarp (Garcinia mangostana L.) against Artemia salina Leach Larvae using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. *Pharmacon*. 2. 1.
- Fardilla, Intan & Nurul Hidajati. 2018. *Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak N-Heksana Daun Tumbuhan Majapahit (Cerscentia Cujete)*. *Journal Of Chemistry* 7. 1.
- Firjatillah, M., Junaidi, E., & Hakim, A. 2020. *Pengembangan Petunjuk Praktikum Kimia Bahan Alam: Ekstraksi Senyawa Kardol dari Kulit Biji Jambu Mete*. *Chemistry Education Practice*. 3. 2.
- Hanuraga, R. A., dkk. 2013. *Kajian Aktivitas Infusa Daun Mimba (Azadirachta indica Juss.) Sebagai Obat Herbal Pereda Osteoarthritis*. *Indonesian Pharmacy Student Journal*.

- Harborne. (1987). *Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Himawan R. F. (2010). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)*.
- Hong B. & Zu Y. 2013. *Detecting Circulating Tumor Cells: Current Challenges and New Trends*. *Theranostics*. 3. 6.
- I Gusti A.,. 2010. *Optimasi Pembuatan Ekstrak Etanolik Kayu Secang (Caesalpinia sappan L.) Secara Digesti: Aplikasi Desain Faktorial*. Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Molyneux P., 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci.Technol.* 26. 2.
- Kurniawan, B. and Aryana, wayan aryana. 2015. *Binahong (Cassia Alata L) as Inhibitor of Escherichiacoli Growth*. *Medical Journal of Lampung University*, 04. 4.
- Kumala, S., & Sapitri, D. W. 2011. *Phytochemical Screening and Toxicological Evaluation Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) of Some Fractions of Prasman Leaves (Eupatorium triplinerve V) Extract*. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*. 2. 1.
- Latifah, L. (2015). *Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Rimpang Kencur Kaempferia galanga L. dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil)*. Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Leba, M. A. U. 2017. *Ekstraksi dan Real Kromatografi*. Yogyakarta: Deepublish.
- Lee, K-A., Lee, S-H., Lee, Y-J., Baeg, S. M. & Shim, J-H. (2012). Hesperidin Induces Apoptosis by Inhibiting Sp1 and Its Regulatory Protein MSTO-211H Cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 20(3),273-279.
- Loomis, 1978, *Esswntial Of Toxicologi*, Ikip Semarang Prees, Ed.Iii, Pp. 228–233.
- Marjoni, M. R. 2016. *Dasar-dasar fitokimia untuk diploma III farmasi*. Trans Info Media.
- Maslukhah, Y. L., Widyaningsih, T. D., Waziroh,E., Wijayanti, N., dan Sriherfyna, F. H.(2016). *Faktor Pengaruh Ekstraksi CincauHitam (Mesona palustris bl) Skala PilotPlant: kajian pustaka [in press januari2016]*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 4(1).
- Mayer et al., 1982, *Brine Shrimp: A Convenient General Biossay For Active Plant Constituens*, *Journal Of Medicinal Plant Research Planta Medica*, 4(5), pp. 31–32
- Mainawati, D. 2017. *Uji Kandungan Metabolit Sekunder Tumbuhan Obat Yang terdapat Di Kecamatan Rambah Samo Kabupaten Rokan Hulu*. Doctoral dissertation. Universitas Pasir Pengaraian. Riau.
- Muaja, A. D., Koleangan, H. S. J., & Runtuwene, M. R. J. (2013). Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal MIPA*, 2(2), 115.
- McMurry, J. & Fay, R., 2004. *McMurry Fay Chemistry*. 4th edition ed. CA: Pearson Education International.
- Mudjiman, 1991, *Makanan Ikan, Penebar Swadaya*. Jakarta, pp. 72–88

- Mujiman, 1995, Statistika Farmasi dan Biologi, 101, 102, 157, Ghalia Indonesia, Jakarta
- Mutmainah, Kusmita, L., Martono, Y., Franyoto, Y.D., Wulandari, R.P. Kusumaningrum, T.D. (2019), "Antioxidant activity, phenol and flavonoid content, and formulation cream of Stevia rebaudiana Bert", Journal of Physics: Conference Series, 1217 (1), p. 12152.
- Naidu, J.R., Ismail, R., and S. Sasidharan. 2014. *Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of Mentha spicata L (Lamiaceae)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 13. 1.
- Ningdyah, AW., Alimuddin AH., Jayuska A. 2015. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). JKK. Vol. 4. 1.
- Ngibad K. Phytochemical Screening of Sunflower Leaf (*Helianthus annuus*) and Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Plant Ethanol Extract. Borneo J Pharm. 2019;2(1):24–30.
- Neagu, M.; Constantin, C.; Popescu, I.D.; Zipeto, D.; Tzanakakis, G.; Nikitovic, D.; Fenga, C.; Stratakis, C.A.; Spandidos, D.A.; Tsatsakis, A.M *Inflammation and Metabolism in Cancer Cell-Mitochondria Key Player*. Front. Oncol. 2019. 9. 348.
- Nurzaman, F., Djajadisastra, J., & Elya, B. (2018). Identifikasi Kandungan Saponin dalam Ekstrak Kamboja Merah (*Plumeria rubra* L.) dan Daya Surfaktan dalam Sediaan Kosmetik. Jurnal Kefarmasian Indonesia, 8(2), 85–93.
- Noer, S., Pratiwi, R. D., & Gresinta, E. (2014). Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin Dan Flavonoid Sebagai Kuersetin) Pada Ekstrak Daun Inggu (*Ruta angustifolia* L.). Eksata: Jurnal Ilmu-Ilmu MIPA, 19–29.
- Ntungwe N, E., Domínguez-Martín, E. M., Roberto, A., Tavares, J., Isca, V. M. S., Pereira, P., Cebola, M.-J., & Rijo, P. .2020. *Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples*. Current Pharmaceutical Design. 26. 24.
- Panjaitan, 2011, Uji Aktifitas Antioksidan dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 70% dan Ekstrak Air Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*), Fakultas Kedokteran dan ilmu Kesehatan, universitas Syarif hidayatulloh, Jakarta.
- Pawarta, 2014, Habbatus Sauda dalam menangani berbagai penyakit, Surakarta, 81-105.
- Prawirodiharjo E., 2014, Uji Aktivitas Antioksidan Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 70% dan Ekstrak Air Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea Coromandelica*), Universitas Syarif Hidayatulloh, Jakarta.
- Parvin, M. S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M. A., Nahar, L., & Islam, M. E. 2015. *Evaluation of in vitro antiinflammatory and antibacterial potential of Crescentia cujete Leaves and stem bark*. BMC Research Notes. 8. 1.
- Priyanto. Toksikologi : mekanisme, terapi antidotum, dan penilaian resiko. Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi Indonesia (LESKONFI) ; 2009.

- Reskianingsih, Ayu. 2014. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Buah Phaleria macrocarpa (Sheff) boerl Terhadap Larva Artemia salina Leach dengan metode BSLT*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah : Jakarta.
- Retnowati, Y., Bialangi, N. and Wingti, N. 2011. *Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus Aureus pada Media yang Diekspos dengan Infus Daun Sambiloto (Andrographis Paniculata)*. jurnal sainstek. Vol. 6. 2.
- Ruwaida, DG. 2010. *Uji Toksisitas Senyawa Hasil Isolasi Rumput Mutiara (Hedyotis corimbosa(L) LAMK) dengan Metode Brine Shrimp Letality Test (BST)*. Unpublished. UNS Surakarta.
- Romero Jola, N. J., & Escobar Escobar, N. 2019. *Profile of plant species in the tropical dry forest of Tolima (Colombia) exhibiting anthelmintic activity in sheep*. Pakistan Journal of Botany. 51. 5.
- Salamah, N., dan Nurushoimah. 2014. *Uji aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Herba Pegagan (Centella asiatica(L) Urb.) dengan Metode Penghambatan Degradasi Beta-Karoten*. Farmasains. 2(4): 177-181.
- Sugiyono, 2013, *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, Dan R & D*, Alfabeta
- Sujatmiko, Yusufi Adi. 2014. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kayu Manis (Cinnamomum Burmannii B.) dengan Cara Ekstraksi yang Berbeda terhadap Escherichia Coli Sensitif dan Multiresisten Antibiotik*. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Sulasmi, S., M. & Z., 2019. *Tanin Identification of 4 Species Pteridophyta from Baluran National Park*. Journal of Physics: Conf. Series, 1(2).
- Supriningrum, R., Sapri, & Pranamala, V. A. (2016). *UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL AKAR KB (Coptosapelta tomentosa Valetton ex K. Heyne) DENGAN METODE Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Jurnal Ilmiah Manuntung, 2(2), 161–165.
- Tiwari, P. Et Al. 2011. *Phytochemical Screening And Extraction: A Review*. Internationale Pharmaceutica Scientia. 1.1.
- Wahyulianingsih, Handayani, S., & Malik, A. 2016. *Penetapan kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Cengkeh (Syzygium aromaticum(L.) Merr dan Perry)*. Jurnal Fitofarmaka Indonesia, 3. 2.
- Wilantari, P. D. (2018). *Isolasi Kafein Dengan Metode Sublimasi Dari Dengan Fraksi Etil Asetat Serbuk Daun Camelia Sinensis*. Jurnal Farmasi Udayana, 8(1), 53.

Lampiran 1. Hasil Determinasi Daging Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU

Jl. Lahor 87 Kota Batu
Jl. Raya 228 Kejayan Kabupaten Pasuruan
Jl. Kolonel Sugiono 457 – 459 Kota Malang
Email : materiamedicabatu@jatimprov.go.id



Nomor : 074/ 707/ 102.20-A/ 2022
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Majapahit**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama / NIM : DEWINTA HAPSARI / 1913206010
DIRA TARICA PUTRI / 1913206012
Fakultas : FARMASI, STIKES KARYA PUTRA BANGSA TULUNGAGUNG

1. Perihal determinasi tanaman majapahit

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Scrophulariales
Suku : Bignoniaceae
Marga : Crescentia
Jenis : *Crescentia cujete* L.
Nama Umum : Majapahit, mojopahit, mojo, maja, berenuk, berunek (Jawa); tabu kayu (Melayu); bila balanda (Makasar); buah no (Ternate).
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b-16b-286a-287a: Bignoniaceae-1b-3a: Crescentia-3: *C. cujete*

2. Morfologi

Habitus: Pohon, tinggi ± 10 m. Batang: Berkayu, bulat, percabangan simpodial, beralur, putih kehitanan. Daun: Majemuk, menyirip, lonjong, tepi rata, ujung meruncing, pangkal membulat, panjang 10-15 cm, lebar 5-7 cm, bertangkai pendek, hijau, pertulangan menyirip, hijau. Bunga: Tunggal, di cabang dan ranting, kelopak bentuk corong, ujung bercangap, hijau pucat, benang sari empat, panjang ± 2 cm, putih, putik panjang ± 2 cm, kepala putik bentuk corong, putih, mahkota bentuk bibir, putih. Buah: Buni, bulat, diameter ± 20 cm, hijau kekuningan. Biji: Kotak, panjang ± 5 mm, coklat. Akar: Tunggang, putih kotor.

3. Bagian yang digunakan : Daging buah.

4. Penggunaan : Penelitian.

5. Daftar Pustaka

- Van Steenis, C.G.G.J. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 02 November 2022



Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian

1. Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*)



Tanaman Majapahit
(*Crescentia cujete*)



Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)



Bagian Dalam Buah Majapahit
(*Crescentia cujete*)



Daging Buah Majapahit
(*Crescentia cujete*)

2. Proses Infusa Daging Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)

Pemotongan Daging Buah
Majapahit (*Crescentia cujete*)



Penimbangan Daging Buah
Majapahit (*Crescentia cujete*)



Pencucian Daging Buah
Majapahit (*Crescentia cujete*)



Proses Infusa Daging Buah
Majapahit (*Crescentia cujete*)



Proses Penyaringan Infusa
Daging Buah Majapahit
(*Crescentia cujete*)



Hasil Infusa Daging Buah
Majapahit (*Crescentia cujete*)

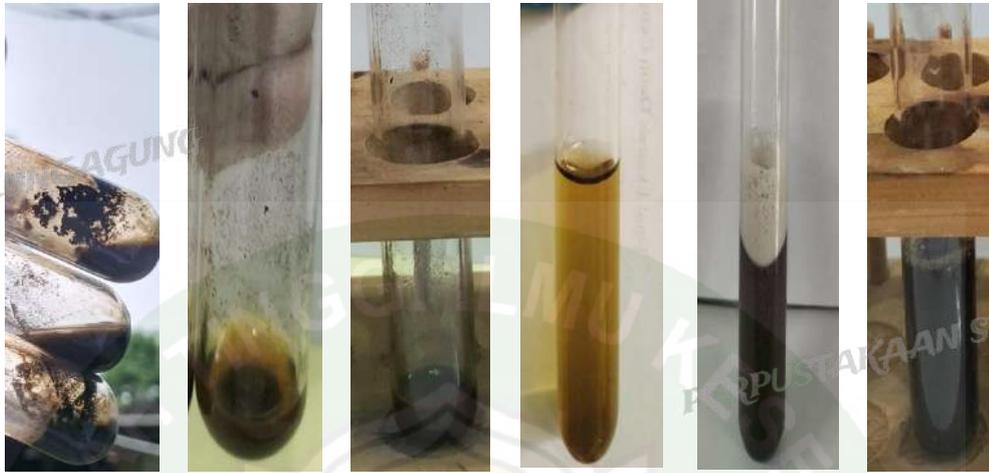


Proses Pemekatan
Menggunakan Evaporator



Ekstrak Kental

3. Skrining Fitokimia



Uji	Uji	Uji	Uji	Uji	Uji
Falavonoid	Alkaloid	Alkaloid	Alkaloid	Saponin	Tannin
	Meyer	Wagner	Dragendrof		

4. Uji Toksisitas

a. Pembuatan Seri Konsentrasi



Penimbangan	Seri Konsentrasi	Pembagian Larutan
Ekstrak Kental		Konsentasi

b. Penetasan dan Pengujian Toksisitas



Proses Penetasan Larva Udang



Proses Pengujian Larva Udang

Lampiran 3. Orientasi Seri Konsentrasi

- Hasil Perhitungan Pembuatan Larutan Induk 1000 ppm dalam 100 ml, membutuhkan 100 mg Ekstrak Kental

$$1000 \text{ ppm} = 1000 \text{ mg/L}$$

$$1000 \text{ ppm} = 100 \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{DMSO } 1\% = \frac{1}{100} \times 100 \rightarrow 100 \text{ mg ekstrak} + 1 \text{ ml DMSO di adkan}$$

100 ml air laut buatan

$$= 1 \text{ ml}$$

Pembuatan DMSO 2% dari DMSO 100% sebanyak 50 ml

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$100\% \cdot V_1 = 2\% \cdot 50 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{100}{100}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

- Pengenceran Konsentrasi :

- Konsentrasi 1000 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V_1 = 1000 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 10 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 900 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$900 \text{ ppm} \cdot V_1 = 900 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 9 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 800 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$800 \text{ ppm} \cdot V_1 = 800 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 8 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 700 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$700 \text{ ppm. } V_1 = 700 \text{ ppm. } 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 7 \text{ ml}$$

e. Konsentrasi 600 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$600 \text{ ppm. } V_1 = 600 \text{ ppm. } 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 6 \text{ ml}$$

3. Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor pada uji pendahuluan

Replikasi	Kontrol (-)	Perlakuan (ppm)				
		600	700	800	900	1000
1	0	6	7	8	7	9
2	0	5	5	6	7	8
3	0	6	6	5	56	5
Total	0	17	18	19	20	22
Kematian						
Rata-rata	0	5,6	6	6,3	6,6	7,3

4. Perhitungan persen kematian

$$\% \text{ Kematian larva} = \frac{T-K}{10} \times 100\%$$

a. Konsentrasi 600ppm = $\frac{5,6-0}{10} \times 100\% = 56\%$

b. Konsentrasi 700ppm = $\frac{6-0}{10} \times 100\% = 60\%$

c. Konsentasi 800ppm = $\frac{6,3-0}{10} \times 100\% = 63\%$

d. Konsentrasi 900ppm = $\frac{6,6-0}{10} \times 100\% = 66\%$

e. Konsentrai 1000ppm = $\frac{7,3-0}{10} \times 100\% = 73\%$

5. Pembuatan Konsentrasi 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, dan 500ppm

a. Konsentrasi 100 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ ppm. } V_1 = 100 \text{ ppm. } 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

b. Konsentrasi 200 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$200 \text{ ppm} \cdot V_1 = 200 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ ml}$$

c. Konsentrasi 300 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$300 \text{ ppm} \cdot V_1 = 300 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 3 \text{ ml}$$

d. Konsentrasi 400 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$400 \text{ ppm} \cdot V_1 = 400 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 4 \text{ ml}$$

e. Konsentrasi 500 ppm

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$500 \text{ ppm} \cdot V_1 = 500 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

6. Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor

Replikasi	Kontrol (-)	Perlakuan (ppm)				
		100	200	300	400	500
1	0	1	1	3	4	5
2	0	1	3	3	4	5
3	0	2	1	3	3	4
Total	0	4	5	9	11	14
Kematian						
Rata-rata	0	1,3	1,6	3	3,6	4,6

7. Perhitungan persen kematian

$$\% \text{ Kematian larva} = \frac{T-K}{10} \times 100\%$$

a. Konsentrasi 600ppm = $\frac{1,3-0}{10} \times 100\% = 13\%$

b. Konsentrasi 700ppm = $\frac{1,6-0}{10} \times 100\% = 16\%$

c. Konsentasi 800ppm = $\frac{3-0}{10} \times 100\% = 30\%$

d. Konsentrasi 900ppm = $\frac{3,6-0}{10} \times 100\% = 36\%$

e. Konsentrai 1000ppm = $\frac{4,6-0}{10} \times 100\% = 46\%$



Lampiran 4. Perhitungan Nilai LC_{50} Dengan Menggunakan Analisis Probit Terhadap Infusa Daging Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)

a. Data yang diperoleh

Konsentrasi (ppm)	Log 10 (konsentrasi)	Probit	% Kematian	Mortality	Total Hewan Uji
100	2	3,87	13%	4	30
200	2,3010	4,01	16%	5	30
300	2,4771	4,48	30%	9	30
400	2,6020	4,64	36%	11	30
500	2,6989	4,90	46%	14	30

b. Coeffisients

Intercept 0,7617 (a)

Log (ppm) 1,4978 (b)

c. Perhitungan Persamaan

$$y = ax + b$$

$$y = 1,4978 + 0,7617$$

$$5 = 1,4978 + 0,7617$$

$$x = 5 - 0,7617 : 1,4978$$

$$x = 2,8296$$

d. Perhitungan LC_{50}

$$LC_{50} = \text{antilog } x \quad 675,460 \quad (\text{ppm})$$

Lampiran 5. Jadwal Penelitian

Jadwal penelitian	Tahun 2022 bulan ke			Tahun 2023 bulan ke							Tempat	
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7		
1. Pencarian judul	✓											Kampus STIKes KARTRASA
2. Studi pustaka		✓										Kampus STIKes KARTRASA
3. Persiapan penelitian			✓									Kampus STIKes KARTRASA
a. Determinasi tanaman			✓									UPT Materia Medica
b. Pembuatan ekstrak (Infundasi)				✓								Kampus STIKes KARTRASA
4. Penelitian laboratorium					✓							STIKes KPB
a. Skrining fitokimia					✓							Laboratorium Botani KPB
b. Pengujian kadar senyawa menggunakan LC-MS					✓							Laboratorium UMM
c. Uji aktifitas antikanker						✓	✓					Laboratorium Mikrobiologi KPB
5. Pengumpulan dan analisis data							✓					Kampus STIKes KARTRASA
a. Penyusunan laporan								✓	✓			Kampus STIKes KARTRASA
b. Pengumpulan tugas akhir									✓			Kampus STIKes KARTRASA

Lampiran 6. Alur Prosedur Kerja1. Pembuatan infusa daging buah buah majapahit (*Crescentia cujete*)

Daging buah majapahit

- Diambil bagian daging buah tanaman majapahit
- Dilakukan sortasi basah
- Dilakukan penimbangan menggunakan timbangan analitik sebanyak 500 gram
- Dilakukan pencucian menggunakan air mengalir
- Dilakukan pemotongan dengan ukuran yang sama
- Dimasukkan kedalam panci berisi 1000 mL aquadest → diinfundasi selama 15 menit terhitung sejak suhu 90°C → sesekali diaduk
- Dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring
- Infusa yang diperoleh → dilakukan evaporasi

Hasil

2. Pengujian skrining fitokimia secara kualitatif

a. Uji flavonoid

Ekstrak kental

- Ditimbang 1 gram → dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambahkan HCL pekat 5 tetes → dipanaskan selama 15 menit diatas penangas air
- Diamati perubahan warnanya → bila terdapat endapan berwarna merah/kuning maka sampel mengandung senyawa flavonoid

Hasil

b. Uji alkaloid

Ekstrak kental

- Ditimbang 2 gram → dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditetesi dengan HCL 2N 5 ml → dipanaskan
- Didinginkan → dibagi menjadi 3 tabung reaksi sebanyak 1 ml
- Ditambahkan pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendrof sebanyak 2-5 tetes
- Diamati perubahan warnanya → pada pereaksi mayer ditandai dengan endapan berwarna kuning, pada pereaksi wagner ditandai dengan endapan berwarna coklat, dan pada pereaksi dragendrof terbentuk endapan berwarna jingga maka sampel mengandung senyawa alkaloid

Hasil

c. Uji saponin

Ekstrak kental

- Ditimbang 1 gram → dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 10 mL air panas → didinginkan
- Dikocok kuat-kuat → selama 10 detik
- Diamati lama busa yang ada → tidak kurang dari 10 menit
- Ditambahkan 1 tetes HCL 2N → pengamatan agar buih yang terbentuk tidak hilang
- Diamati → bila busa bisa bertahan cukup lama atau stabil maka sampel mengandung senyawa saponin

Hasil

d. Uji tanin

Ekstrak kental

- Ditimbang 1 gram → dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 10 mL air panas → selama 5 menit
- Diambil filtratnya → ditambahkan FeCl_3 sebanyak 3-4 tetes
- Diamati perubahan warnanya → bila terdapat warna hijau biru/biru hitam maka sampel mengandung senyawa tanin

Hasil

3. Uji toksisitas menggunakan metode BSLT

a. Pembuatan air laut buatan

Air laut buatan

- Ditimbang garam tanpa iodium sebanyak 35 gram
- Dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 liter → aduk ad homogen

Hasil

b. Penetasan larva udang *Artemia salina* Leach

Wadah penetasan

- Disiapkan 1 wadah untuk penetasan
- Diisi air laut butan 1000 mL
- Dimasukkan telur artemia pada sisi terang
- Penetasan larva dilakukan dibawah penerangan sinar lampu ruangan dan diaerasi → larva akan menetas pada usia 24 jam
- Dilakukan percobaan hewan uji larva udang pada usia 48 jam

Hasil

c. Pembagian kelompok pengujian ketoksikan ekstrak infusa daging buah majapahit (*Crescentia cujete*)



Keterangan :

- Kelompok kontrol negative → tidak diberikan tambahan perlakuan
- Kelompok 1 → diberikan larutan ekstrak daging buah majapahit 100ppm
- Kelompok 2 → diberikan larutan ekstrak daging buah majapahit 200ppm
- Kelompok 3 → diberikan larutan ekstrak daging buah majapahit 300ppm
- Kelompok 4 → diberikan larutan ekstrak daging buah majapahit 400ppm
- Kelompok 5 → diberikan larutan ekstrak daging buah majapahit 500ppm