

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAUN MAJAPAHIT
(*Crescentia Cujete L.*) DENGAN LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass
Spectrometer*) DAN ANALISA TOKSISITAS TERHADAP
*Artemia Salina Leach***

SKRIPSI



Oleh:

EGA NURGIA ADISYANINGRUM

1913206014

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

STIKES KARYA PUTRA BANGSA

TULUNGAGUNG

JULI 2023

HALAMAN JUDUL
IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAUN MAJAPAHIT
(*Crescentia Cujete L.*) DENGAN LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass*
***Spectrometer*) DAN ANALISA 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:

EGA NURGIA ADISYANINGRUM

1913206014

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

STIKES KARYA PUTRA BANGSA

TULUNGAGUNG

JULI 2023

PERPUSTAKAAN STIKES KARYA PUTRA BANGSA TULUNGAGUNG

HALAMAN PERSETUJUAN

SKRIPSI

IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAUN MAJAPAHIT

(*Crescentia Cujete L.*) DENGAN LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*) DAN ANALISA TOKSISITAS TERHADAP

Artemia Salina Leach

Yang diajukan oleh:


EGA NURGIA ADISYANINGRUM


1913206014

Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping


(Rahma Diyan Martha, S.Si,M.Sc.)
NIDN.0710029101


(Apt. Dara Pranidya Tilarso, M.Farm.)
NIDN.0719128906

HALAMAN PENGESAHAN

SKRIPSI

IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAUN MAJAPAHIT

(*Crescentia Cujete L.*) DENGAN LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*) DAN ANALISA TOKSISITAS TERHADAP

Artemia Salina Leach

Oleh:

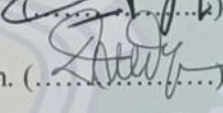
EGA NURGIA ADISYANINGRUM

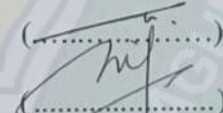
1913206014


Telah lolos uji etik penelitian dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa

Tanggal:

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

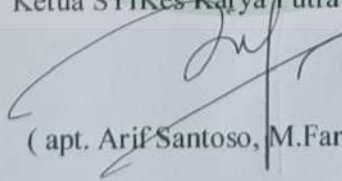
Anggota Penguji : apt. Dara Pranidya Tilarso, M.Farm. (.....) 

apt. Choirul Huda, M.Farm. (.....) 

apt. Arif Santoso, 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 disuatu 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 diterbitkan dalam daftar pustaka.

Tulungagung, 07 Juli 2023

Penulis,

Ega Nurgia Adisyaningrum

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena dengan rahmat, karunia, serta taufik dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Identifikasi Senyawa Infusa Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) Dengan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*) Dan Analisa Toksisitas Terhadap *Artemia Salina Leach*”, ini dengan baik meski masih terdapat banyak kekurangan di dalamnya.

Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menempuh pendidikan Sarjana Farmasi (S.Farm.) pada prodi Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKes). Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, semangat, dan doa sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Ucapan terima kasih ini penulis tujukan kepada :

1. Allah SWT yang mana atas izin dan ridhonya, skripsi ini dapat disusun dan selesai pada waktunya.
2. Bapak apt. Arif Santoso, M.Farm. selaku ketua STIKes Karya Putra Bangsa yang telah mendidik dan memberikan bimbingan selama masa perkuliahan.
3. Ibu apt. Dara Pranidya Tilarso, M.Farm. selaku Kaprodi STIKes Karya Putra Bangsa yang telah mendidik dan memberikan bimbingan selama masa perkuliahan.
4. Ibu Rahma Diyan Martha, S.Si, M.Sc. selaku pembimbing I yang telah mendidik dan memberikan bimbingan selama penyusunan naskah.
5. Ibu apt. Dara Pranindya Tilarso, M.Farm. selaku pembimbing II yang telah mendidik dan memberikan bimbingan selama masa penyusunan naskah.
6. Orang tua, dan juga keluarga yang telah memberikan do'a, dukungan dan semangat selama penyusunan skripsi.
7. Teman-teman “TIM MAJAPAHIT” yang telah memberi dukungan, bantuan, dan pendengar atas segala keluh kesah.
8. Teman-teman farmasi angkatan 2019 terutama yang telah memberikan dukungan dan semangat selama penyusunan proposal.
9. Seluruh dosen dan warga STIKes Karya Putra Bangsa yang telah mendidik dan memberi semangat keceriaan.

10. Diri sendiri yang berhasil melawan rasa malas dan tidak pernah menyerah sesulit apapun proses penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak sangat diharapkan untuk memperbaiki skripsi ini.

Tulungagung, 24 Mei 2023

Penulis,

Ega Nurgia Adisyaningrum



DENTIFIKASI SENYAWA INFUSA DAUN MAJAPAHIT (*Crescentia Cujete L.*) DENGAN LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*) DAN ANALISA TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina Leach*

Ega Nurgia Adisyaningrum
Prodi S1 Farmasi

INTISARI

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel yang tidak terkontrol dan memiliki kemampuan untuk menginvasi serta bermetastasis. Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai obat herbal adalah tanaman majapahit (*Crescentia Cujete L.*). Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kandungan dan kadar senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antikanker pada infusa daun majapahit menggunakan LC-MS, serta untuk mengetahui toksisitas akut (LC_{50}) infusa daun majapahit terhadap larva *Artemia Salina Leach* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Ekstrak daun majapahit diperoleh menggunakan metode infudasi dengan pelarut aquades pada suhu $90^{\circ}C$ selama 15 menit. Pengujian toksisitas ekstrak infusa daun majapahit dilakukan dengan beberapa serial konsentrasi, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, dan 1000 ppm yang diujikan pada larva *Artemia Salina Leach* selama 24 jam, dan dihitung nilai LC_{50} menggunakan analisis probit. Hasil pengujian ekstrak infusa daun majapahit menggunakan LC-MS diketahui terdapat 94 senyawa dengan 3 senyawa yang memiliki konsentrasi tertinggi yaitu, *acacetin7-rutinoside* sebanyak 2,94521%, *Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]* sebanyak 2,96860%, dan *Narirutin 4'-glicoside* sebanyak 2,93385%. Ketiga senyawa tersebut termasuk dalam golongan senyawa flavonoid. Hasil dari pengujian toksisitas akut ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) menggunakan metode BSLT menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 792,8664 ppm. Dari nilai LC_{50} yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) memiliki sifat toksik terhadap larva udang *Artemia Salina Leach* dan berpotensi sebagai antikanker dengan ditandai perolehan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm.

Kata kunci: Antikanker, *Artemia Salina Leach*, LC-MS, daun majapahit, metode BSLT

IDENTIFICATION OF MAJAPAHIT LEAF INFUSION COMPOUNDS (*Crescentia Cujete L.*) WITH LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*) AND TOXICITY ANALYSIS OF *Artemia Salina* Leach

Ega Nurgia Adisyaningrum
Pharmacy S1 Study Program

Cancer is a disease caused by the growth of cells that are not benign and have the ability to invade and metastasize. One of the plants that has potential as herbal medicine is the Majapahit plant (*Crescentia Cujete L.*). The purpose of this study was to determine the content and levels of secondary metabolites that have anticancer activity in majapahit leaf infusion using LC-MS, and to determine the acute toxicity (LC_{50}) of majapahit leaf infusion to *Artemia Salina* Leach larvae using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method. This study uses an experimental method. The majapahit leaf extract was obtained using the infusion method by dissolving in distilled water at 90°C for 15 minutes. Toxicity testing of majapahit leaf infusion extract was carried out with several serial concentrations, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, and 1000 ppm which were tested on *Artemia Salina* Leach larvae during 24 hours, and calculated the LC_{50} value using probit analysis. The results of testing the majapahit leaf infusion extract using LC-MS found that there were 94 compounds with 3 compounds having the highest concentrations namely, *acacetin 7-rutinoside* as much as 2.94521%, *Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]* 2.96860%, and *Narirutin 4'-glycoside* 2.93385%. These three compounds are included in the class of flavonoid compounds. The results of the toxicity test of the acute extract of majapahit (*Crescentia Cujete L.*) leaf infusion using the BSLT method yielded an LC_{50} value of 792.8664 ppm. From the LC_{50} value obtained, it can be significant that the extract of majapahit leaf infusion (*Crescentia Cujete L.*) has toxic properties to the larvae of the *shrimp Artemia Salina* Leach and has the potential as an anticancer by being labeled with an acquisition value of $LC_{50} < 1000$ ppm.

Keywords: Anticancer, *Artemia Salina* Leach, LC-MS, majapahit leaves, BSLT method

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	vii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
INTISARI	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR PERSAMAAN.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Relevansi Penelitian.....	4
BAB II	5
2.1 Tanaman Majapahit (Crescentia Cujete L.).....	5
2.2 Kanker.....	8
2.3 Uraian Metode Ekstraksi	11
2.4 Uraian Pelarut	17
2.5 Metode Identifikasi Senyawa.....	18
2.6 Uraian Tentang LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer).....	22
2.7 Uraian Tentang Artemia Salina Leach.....	23
2.8 Uraian Metode BSLT Terhadap Pengujian Antikanker	24
2.9 Uraian Toksisitas Terhadap (Artemia Salina Leach) dengan Metode BSLT	25
2.10 Hipotesis	26
BAB III.....	28

3.1 Alat Dan Bahan.....	28
3.2 Populasi Penelitian.....	28
3.3 Sampel Penelitian	28
3.4 Variabel Penelitian.....	28
3.5 Metode Penyarian	29
3.6 Uji Kandungan Senyawa Infusa Daun Majapahit (Crescentia Cujete L.) dengan LC-MS	31
3.7 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Uji	31
3.8 Skrining Potensi Antikanker Dengan Metode BSLT	31
3.9 Kerangka Penelitian.....	35
BAB IV	36
4.1 Determinasi Tanaman.....	36
4.2 Pengambilan Bahan	37
4.3 Pembuatan Bahan Uji (Infusa Daun Majapahit).....	37
4.4 Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak.....	37
4.5 Skrining Fitokimia.....	38
4.6 Uji Kandungan Senyawa Infusa Daun Majapahit (Crescentia Cujete L.) dengan LC-MS	45
4.7 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Uji	48
4.8 Skrining Potensi Anti Kanker dengan Metode BSLT	49
4.9 Uji Toksisitas Terhadap (Artemia Salina Leach) dengan Metode BSLT....	50
BAB V.....	56
5.1 Kesimpulan	56
5.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Potensi Farmakologis Tanaman Majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>)	5
Gambar 2.2 Tanaman Majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>).....	6
Gambar 2.3 Bagian Tanaman Majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>).....	7
Gambar 2.4 Proses Metastasis Sel Kanker.....	11
Gambar 2.5 Dekoktasi.....	12
Gambar 2.6 Perkolasi	12
Gambar 2.7 Sokletasi	14
Gambar 2.8 <i>Microwave-Assisted Extraction</i> (MAE).....	14
Gambar 2.9 <i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> (UAE)	15
Gambar 2.10 <i>Pressurized Liquid Extraction</i> (PLE).....	16
Gambar 2.11 <i>Supercritical CO₂ Extraction</i> (SC-CO ₂).....	17
Gambar 2.12 Struktur Kimia Flavonol.....	19
Gambar 2.13 Struktur Triterpenoid.....	21
Gambar 2.14 Struktur Kimia Catechin.....	22
Gambar 2.15 <i>Artemia Salina</i> Leach.....	23
Gambar 4. 1 Reaksi Uji Flavonoid	40
Gambar 4. 2 Hasil Uji Flavonoid	41
Gambar 4. 3 Reaksi Uji Mayer	42
Gambar 4. 4 Reaksi Uji Dragendorff	42
Gambar 4. 5 Hasil Uji Alkaloid	43
Gambar 4. 6 Reaksi Uji Saponin.....	44
Gambar 4. 7 Hasil Uji Saponin	44
Gambar 4. 8 Reaksi Uji Tanin.....	45
Gambar 4. 9 Hasil Uji Tanin.....	45
Gambar 4. 10 <i>Struktur Acacetin-7-Rutinoside</i>	48
Gambar 4. 11 Struktur <i>Kaempferol 3[6''-(3-hydroxy-3methylglutaryl)</i>	48
Gambar 4. 12 Struktur <i>Narirutin 4'-glucoside</i>	48
Gambar 4. 13 Grafik Hubungan Antara Log Konsentrasi dan Probit Kematian Larva	52

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Nilai LC ₅₀	26
Tabel 3.1 Model Tabel Data Probit Analisis.....	33
Tabel 4.1 Hasil Rendemen Ekstrak.....	37
Tabel 4.2 Hasil Uji Kandungan Fitokimia Ekstrak Infusa Daun Majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>).....	38
Tabel 4.3 Kandungan Senyawa dengan Konsentrasi Tertinggi Infusa Daun Majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>) yang Diidentifikasi dengan LC-MS	47
Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang (<i>Artemia Salina Leach</i>).....	51
Tabel 4.5 Data Pengamatan Kematian Larva Udang Menggunakan Analisa Probit	51

PERPUSTAKAAN STIKES KARYA PUTRA BANGSA TULUNGAGUNG

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1	30
Persamaan 3.2	32
Persamaan 3.3	32
Persamaan 3.4	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi Daun Majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>).....	64
Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian.....	65
Lampiran 3 Orientasi Untuk Mendapatkan Seri Konsentrasi Ekstrak Daun majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>) yang Akan Digunakan dalam Pengujian	70
Lampiran 4 Perhitungan Persen Kematian Larva Udang.....	71
Lampiran 5 Perhitungan Nilai LC ₅₀ dengan Menggunakan Analisa Probit Terhadap Ekstrak Infusa Daun Majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>)...	72
Lampiran 6 Hasil Kromatogram Analisa LC-MS Daun Majapahit.....	72
Lampiran 7 Alur Prosedur Kerja.....	73
Lampiran 8 Jadwal Penelitian.....	78

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan obat herbal sebagai terapi farmakologi telah lama digunakan oleh masyarakat Indonesia, karena secara empiris memberi dampak yang baik untuk kesehatan (Dewi dkk., 2015). Salah satu upaya untuk mengoptimalkan pemanfaatan sumber obat nabati adalah menemukan obat kanker. Berdasarkan penelitian (Siegel dkk., 2019) penyakit kanker masih menjadi permasalahan utama kesehatan masyarakat dunia dan menjadi salah satu penyebab kematian. Pengembangan obat herbal antikanker menjadi sangat penting, karena efek yang ditimbulkan dari obat kimia bersifat antiproliferatif terhadap sel kanker serta sel normal (Dewi dkk., 2015). Selain itu, faktor biaya yang mahal juga menjadi kendala bagi masyarakat, hal inilah yang mendasari masyarakat untuk beralih menggunakan pengobatan herbal (Muaja dkk., 2013).

Salah satu tanaman yang digunakan masyarakat sebagai tanaman obat adalah majapahit (*Crescentia Cujete L.*). Tanaman ini merupakan tanaman asli negara Amerika tengah, Kamerun, serta sebagian negara di Afrika (Kusuma dkk., 2014). Disebagian wilayah Jawa Tengah dan Jawa Timur, tanaman ini dikenal dengan nama berenuk dan majapahit. Tanaman majapahit (*Crescentia Cujete L.*) secara tradisional bermanfaat sebagai obat diare, anti-radang, dan obat luka (Kusuma dkk., 2014). Penelitian mengenai tanaman majapahit masih terus dilakukan, karena tanaman ini berpotensi sebagai obat herbal.

Berdasarkan penelitian (Fatimah dkk., 2022) menunjukkan bahwa ekstrak buah majapahit mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder antara lain adalah fenol, tanin, alkaloid, saponin, cardenolides, antrakuinon dan phiobatanin. Serta, flavonoid (flavon & flavonon) (Balogun & Sabiu, 2021). Penelitian (Fardilla & Hidajati, 2018) juga memaparkan bahwa ekstrak metanol daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) mengandung triterpenoid, saponin, alkaloid, dan fenolik. Kandungan glikosida, terpenoid, dan flavonoid telah terdeteksi dari kulit batang dan daun tanaman (*Crescentia Cujete L.*) (Balogun & Sabiu, 2021). Beberapa senyawa metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid, tanin, serta

fenolat memiliki aktivitas untuk menghambat pertumbuhan sel kanker (Fatimah dkk., 2022).

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu tanaman, merupakan senyawa aktif yang memiliki potensi sebagai obat (Humairah dkk., 2022). Cara yang digunakan untuk mengambil senyawa metabolit sekunder pada suatu tanaman dapat dilakukan dengan ekstraksi. Ada beberapa metode ekstraksi yang dapat dilakukan, salah satunya dengan metode infudasi (Badaring dkk., 2020). Menurut (Mayang & Santoso, 2020) infudasi merupakan metode untuk mendapatkan metabolit sekunder yang larut dalam air dari suatu tanaman. Metode infudasi lebih menyerupai metode yang biasa dilakukan oleh masyarakat dalam pembuatan jamu yaitu dengan cara merebus. Menurut (Mayang & Santoso, 2020) jika pelarut etanol diganti dengan air, memungkinkan untuk dapat memberikan perbedaan aktivitas biologi. Dari segi kepolaran, pelarut air memiliki nilai konstanta dielektrik lebih besar dari pada pelarut etanol. Senyawa polar yang tidak terekstraksi di dalam etanol dimungkinkan dapat terekstraksi pada pelarut air, hal ini dikarenakan kepolaran air lebih tinggi dari etanol yang memungkinkan adanya perbedaan metabolit sekunder yang terekstraksi (Dewi dkk., 2015).

Cara yang dapat digunakan untuk mengetahui secara pasti seluruh kandungan senyawa dalam suatu tanaman, dapat dilakukan dengan skrining fitokimia. Tujuan dari skrining fitokimia adalah memberi gambaran terkait senyawa yang terkandung di dalam suatu tanaman (Vifta & Advistasari, 2018). Skrining fitokimia dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya dengan analisis kromatografi modern yaitu LC-MS, instrumen ini dapat digunakan dalam pengujian kuantitatif dan kualitatif untuk menentukan profil dari metabolit sekunder suatu tanaman (Rudiana dkk., 2021). LC-MS memberikan informasi terkait berat molekul, struktur molekul, identitas serta kuantitas dari suatu molekul yang terkandung dalam suatu sampel tanaman. Selain itu, LC-MS dapat menganalisis berbagai komponen termasuk senyawa termolabil, bermassa molekul tinggi, dan memiliki tingkat kepolaran tinggi (Mangurana dkk., 2019).

Beberapa kandungan metabolit sekunder dari suatu tanaman memiliki efek toksik, efek toksik tersebut dapat dikaitkan sebagai antikanker (Dewi dkk., 2015). Untuk mengetahui potensi antikanker dari suatu tanaman, perlu dilakukan

pengujian awal (Muaja dkk., 2013). Metode awal yang dapat digunakan untuk mengetahui potensi antikanker, adalah uji sitotoksik dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini merupakan metode yang populer untuk menemukan senyawa antikanker baru dari suatu tanaman, serta telah terbukti memiliki keterkaitan dengan aktivitas antikanker (Muaja dkk., 2013). Parameter dari uji sitotoksik adalah nilai LC_{50} . Nilai ini menunjukkan konsentrasi sampel yang menyebabkan kematian 50% hewan uji dalam waktu tertentu. Semakin besar nilai LC_{50} maka, senyawa tersebut semakin tidak toksik (Kusuma dkk., 2014). Pada penelitian yang dilakukan oleh (Fatimah dkk., 2022) menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun majapahit bersifat toksik terhadap larva udang *A.salina* leach dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm.

Berdasarkan uraian dan bukti pendukung bahwa tanaman majapahit (*Crescentia Cujete L.*) memiliki potensi sebagai antikanker, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dengan LC-MS serta mengetahui potensi toksisitas infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dengan metode BSLT (*Brine shrimp Lethality Test*).

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Bagaimana hasil kandungan senyawa infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yang diidentifikasi menggunakan LC-MS?
- 1.2.2 Bagaimana hasil identifikasi infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) menggunakan LC-MS yang memiliki peak tertinggi ?
- 1.2.3 Bagaimana hasil LC_{50} pada infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) terhadap *Artemia Salina* Leach?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Untuk mengetahui kandungan senyawa infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yang diidentifikasi menggunakan LC-MS.
- 1.3.2 Untuk mengetahui hasil identifikasi infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) menggunakan LC-MS yang memiliki peak tertinggi.
- 1.3.3 Untuk mengetahui hasil LC_{50} pada infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) terhadap *Artemia Salina* Leach.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1.4.1 Bagian tanaman (*Crescentia Cujete L.*) yang digunakan adalah bagian daun termuda dari pucuk daun hingga daun ke-7 yang diambil dari Desa Wates, Sumbergempol, Tulungagung.
- 1.4.2 Pelarut yang digunakan adalah aquadest.
- 1.4.3 Instrumen yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) adalah LC-MS.

1.5 Relevansi Penelitian

Penelitian ini memiliki relevansi dengan penelitian sebelumnya yaitu :

- 1.5.1 Penelitian pertama yang memiliki relevansi adalah “*Analisis Toksisitas Dan Potensi Antikanker Ekstrak Metanol Daun Majapahit (Crescentia Cujete) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test*” oleh Fatimah dkk (2022) yang menunjukkan bahwa hasil analisis fitokimia ekstrak metanol daun Majapahit mengandung senyawa alkaloid, tanin, saponin, fenolat, dan terpenoid. Uji toksisitas ekstrak metanol daun majapahit memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun majapahit diketahui berpotensi dikembangkan untuk sumber antikanker. Persamaan penelitian diatas dengan peneliti ini ialah memiliki kesamaan obyek yaitu daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dan metode uji toksisitas. Sehingga hasil dari penelitian diatas setidaknya mampu dijadikan referensi bagi peneliti dalam memperoleh data.
- 1.5.2 Penelitian kedua yang memiliki relevansi adalah “*Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (Crescentia kujete) dengan LCMS*” oleh Fatimah dkk (2020) yang menunjukkan hasil identifikasi menggunakan LCMS diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang tanaman majapahit sebanyak 88 senyawa. Persamaan penelitian diatas dengan peneliti ini ialah memiliki kesamaan metode identifikasi senyawa yaitu LC-MS. Sehingga hasil dari penelitian diatas setidaknya mampu dijadikan referensi bagi peneliti dalam memperoleh data.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete L.*)

2.1.1 Uraian Umum Tanaman Majapahit

Tanaman majapahit (*Crescentia Cujete L.*) merupakan tanaman asli negara Amerika tengah, Kamerun, serta sebagian negara di Afrika (Kusuma dkk., 2014). Majapahit merupakan tanaman diploid berukuran kecil atau sedang, berasal dari famili Biognoniaceae (Balogun & Sabiu, 2021). Tanaman majapahit (*Crescentia Cujete L.*) memiliki nama daerah yang berbeda di tiap wilayah, seperti Berenuk (Jawa Tengah), Majapahit (Jawa Timur), Bila Balanda (Makasar), Buah No (Ternate) (Atmodjo, 2019). Tanaman majapahit diketahui mengandung senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai obat. Masyarakat Trinidad dan Tobago memanfaatkan daun majapahit sebagai obat hipertensi (Suleiman, 2019). Sementara, di Bangladesh seluruh bagian dari tanaman majapahit digunakan sebagai pengobatan kanker (Gambar 2.1), pneumonia, dan gigitan ular (Balogun & Sabiu, 2021).

S/N	Part used	Extract type	Type of assay	Concentrations tested	Pharmacological activity	Country of study
5	Leaves, bark and fruits	Ethanol (100, 50%), aqueous	<i>In vitro</i> (DPPH)	31.25, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL	Leaves (particularly 100% ethanol) and bark established good antioxidant activities (IC ₅₀ within the tested concentrations)	Malaysia
			<i>In vitro</i> (BSLT and ASLA)	1.953, 3.907, 7.813, 15.625, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1000 µg/mL	All parts (leaves > bark > fruits) of the plant extracted with three types of solvents are bioactive and cytotoxic (exhibited LC ₅₀ lower than 1000)	

Gambar 2.1 Potensi Farmakologis Tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) (Balogun & Sabiu, 2021)

2.1.2 Klasifikasi Tanaman Majapahit

Menurut (Honculada & Mabasa, 2016) klasifikasi tanaman majapahit (*Crescentia Cujete L.*) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
 Division : Tracheophyta
 Class : Magnoliopsida

Superorder : Asteranae
Order : Lamiales
Famili : Biognoniaceae
Genus : *Crescentia L*
Species : *Crescentia Cujete L*

2.1.3 Morfologi Tanaman Majapahit

Tanaman majapahit (Gambar 2.2) memiliki tinggi antara 6-10 meter, batang berkayu, bulat, memiliki percabangan simpodial, kulit kayunya beralur dan mudah pecah atau mengelupas dengan kepanjangan tidak normal, serta berwarna coklat pucat. Memiliki daun majemuk, bertulang daun menyirip, tipis, lonjong, dengan tepian rata. Memiliki ujung daun meruncing dan pangkal daun membulat. Panjang daun berkisar antara 10-15 cm dengan lebar 5-7 cm dan berwarna hijau. (Kusuma dkk., 2014).



Gambar 2.2 Tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) (Jose dkk., 2020).

Tanaman majapahit memiliki bunga tunggal yang muncul pada cabang ataupun ranting, (Gambar 2.3) kelopak bunga berbentuk corong dengan ujung bercangap dan berwarna hijau pucat atau putih, benang sari berjumlah 4 dengan panjang kisaran 2 cm dan memiliki putik menyerupai corong yang berwarna putih, serta memiliki mahkota bunga yang menyerupai bibir dan memiliki warna putih (Kusuma dkk., 2014). Buah dari tanaman majapahit berbentuk bulat, bila masih muda buahnya berwarna hijau, dan berwarna coklat bila buah telah menua. Proses

pematangan buah majapahit ini memerlukan waktu 6-7 bulan hingga menua dan buah jatuh ke tanah. Buah majapahit memiliki diameter 12-14 cm (Kusuma dkk., 2014).



Gambar 2.3 Bagian Tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) (A-K) A.Ranting; B. Daun; C. Permukaan punggung kelopak; D. Permukaan kelopak; E. Bunga; F. Irisan melintang bunga; G. Benang sari besar; H. Benang sari kecil; I. Putik; J. Buah; K. Irisan melintang buah. (Madhukar dkk., 2013).

2.1.4 Kandungan Kimia Tanaman Majapahit

Kandungan senyawa kimia dari tanaman majapahit (*Crescentia Cujete L.*) telah banyak diteliti. Buah majapahit teridentifikasi mengandung flavonoid (flavons dan flafonon), saponin, tanin, alkaloid, fenol, hidrogen sianida, dan cardenolides (Balogun & Sabiu, 2021), fitosterol, terpenoid, asam kresentik, asam tartarat, sitrat dan asam tanat. Selain itu, juga mengandung komponen minyak atsiri seperti metil ester, asam N-heksadekanoat, asam benzena propanoat, fenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, dan 2,4-bis(1,1-dimethylethyl). Daun majapahit mengandung alkaloid, tanin, saponin, polifenol, flavonoid, glikosida, gula pereduksi, fitosterol, dan minyak atsiri (Balogun & Sabiu, 2021). Selanjutnya, berdasarkan penelitian (Das dkk., 2014) kulit batang serta daun tanaman majapahit mengandung glikosida, terpenoid, dan flavonoid.

2.2 Kanker

2.2.1 Definisi Kanker

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh adanya pertumbuhan sel yang tidak terkontrol dan memiliki kemampuan untuk menginvasi serta bermetastasis (Rachmawati, 2020). Menurut *National Cancer Institute*, kanker merupakan aktivitas dari sel-sel baru yang tumbuh melewati batas normal, dimana dapat menyerang bagian tubuh kontralateral serta dapat menyebar ke organ lain (Siegel dkk., 2019). Penelitian lain yang memaparkan tentang definisi kanker adalah penelitian (Morihito dkk., 2017) yang menyatakan bahwa kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan adanya penambahan jumlah sel yang tidak terkontrol.

2.2.2 Faktor Pemicu Terjadinya Kanker

Faktor yang dapat memicu terjadinya kanker antara lain, pola makan yang tidak sehat dimana dapat menyebabkan IMT yang berlebih, kurang mengkonsumsi buah dan sayur, konsumsi junkfood yang berlebihan, kurang berolah raga, sering merokok dan mengkonsumsi alkohol (Ditasari & Arinda, 2022). Selain itu, disfungsi DNA adalah salah satu faktor pemicu terjadinya kanker. Hal ini disebabkan karena DNA yang sudah tidak berfungsi sebagaimana mestinya, dapat memicu mutasi pada gen vital yang berperan dalam pengontrolan pembelahan sel, sehingga pertumbuhan sel menjadi tak terkendali dan membentuk kanker (Morihito dkk., 2017).

2.2.3 Tahapan Terbentuknya Kanker

Proses terbentuknya kanker dapat berlangsung dalam beberapa tahun. Proses terbentuknya kanker menurut (Widiyastuti dkk., 2019) melalui beberapa tahapan antara lain :

1. Inisiasi, proses inisiasi oleh senyawa karsinogenik pada sel dan adanya suatu agen promotor.
2. Promosi, pada proses ini terjadi pembentukan masa tumor baik intraseluler maupun ekstraseluler.
3. Progesi, tahap ini merupakan tahap lanjutan dari proses promosi, bila perubahan genetik terjadi secara terus-menerus, akan menyebabkan pertumbuhan sel menjadi tidak terkontrol.

2.2.4 Tahapan Mutasi Gen

Mutasi gen, dapat dipicu melalui agen kimia maupun fisika yang biasanya lebih dikenal dengan karsinogen. Mutasi gen dapat dibedakan menjadi tiga, antara lain (Morihito dkk., 2017):

1. Mutasi gen delasi, pada proses ini terjadi pengurangan basa nitrogen.
2. Mutasi gen adisi, pada proses ini terjadi penyisipan basa nitrogen.
3. Mutasi gen substitusi, pada proses ini terjadi pergantian basa nitrogen. Mutasi gen substitusi dibedakan menjadi dua yaitu transisi dan tranversi. Transisi merupakan proses pergantian adenin dengan guanin atau timin dengan sitosin. Sedangkan proses tranversi merupakan proses pergantian adenin dan guanin dengan sitosin dan timin ataupun sebaliknya.

2.2.5 Tahapan Metastasis

Kanker sangat erat hubungannya dengan metastasis dan invasi. Metastasis merupakan kemampuan sel untuk memisahkan diri dari tumor primer, kemudian bersirkulasi menuju ke suatu jaringan, dan membentuk tumor sekunder. Suatu sel dapat melakukan metastasis bila memiliki kemampuan memisahkan diri, bersirkulasi, serta menginvasi (Febriani & Furqon, 2018). Proses metastasis dibagi menjadi 2 hipotesis, yaitu:

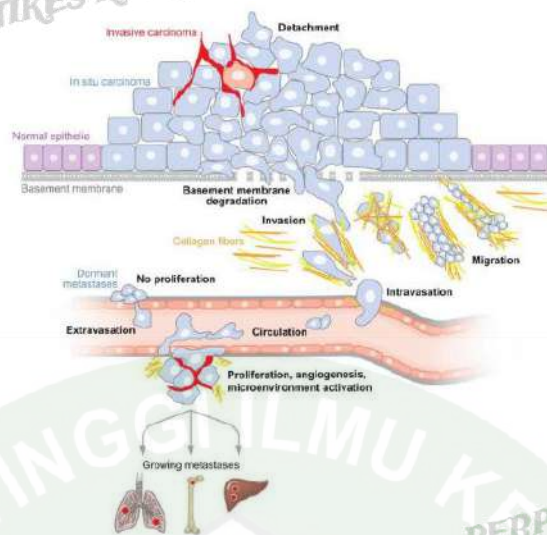
1. Hipotesis anatomical (hemodinamik) memaparkan bahwa penyebaran sel tumor melalui sistem limfatik atau vaskuler dan menetap pada kapiler ataupun nodus limfatik yang pertama kali dilalui dan menjadi lokasi perkembangan tumor (Febriani & Furqon, 2018).
2. Hipotesis *seed and soil* memaparkan bahwa tumor (*seed*) hanya dapat tumbuh pada suatu organ spesifik (*soil*) (Febriani & Furqon, 2018).

Proses metastasis pada seluruh jenis tumor, memiliki prinsip yang sama, akan tetapi tidak semua sel tumor dapat melakukan proses metastasis. Sel tumor yang tidak dapat melakukan proses metastasis akan dieliminasi dari aliran darah, oleh karena itu, adanya sel tumor dalam aliran darah belum dapat dijadikan acuan akan terjadinya metastasis (Febriani & Furqon, 2018). Proses metastasis menurut (Febriani & Furqon, 2018) antara lain (Gambar 2.4):

1. *Detachment*, merupakan proses perlekatan antar sel. Proses perlekatan ini dimediasi oleh *chaderins*, dari beberapa tipe *chaderins*, epitel *chaderins* (E-

chaderins) merupakan protein penting yang ikut berperan dalam interaksi antar sel. Sejatinya, E- *chaderins* berfungsi sebagai lem yang melekatkan antar sel. Pada proses ini sel tumor menonaktifkan E-*chaderins* kemudian mengaktifkan N- *chaderins* yang memicu peningkatan motilitas serta invasi sel tumor, sehingga memungkinkan sel tumor untuk melekat dan menginvasi stroma dibaawahnya.

2. Invasi, merupakan proses yang ditandai dengan adanya perusakan membran basalis. Hal ini dapat memicu sel kanker masuk ke dalam stroma serta jaringan ikat. Proses invasi memiliki beberapa tahapan antara lain :
 - a. Tahap pertama, penggabungan sel kanker dengan matrik sekitar melalui ikatan reseptor pada membran sel kanker dengan glikoprotein laminin serta *fibronectin*.
 - b. Tahap kedua, perusakan enzim hidrolitik oleh sel kanker. Enzim hidrolitik berfungsi untuk merangsang sel tubuh memproduksi enzim perusak matrik.
 - c. Tahap ketiga, sel kanker bermigrasi ke daerah matrik yang telah di *remodelling* oleh enzim proteolitik yang dipengaruhi oleh *Autocrine Motility Factors* (AMFs) dan faktor kemotaktik (Popper, 2016).
3. Intravasasi, pergerakan sel tumor yang telah bermetastasis menuju ke pembuluh darah, dan menembus membran endotel serta *Extra Celuller Matrix* (ECM).
4. Sirkulasi, penempelan sel tumor pada leukosit dan trombosit yang berfungsi sebagai pendamping dari ancaman sel efektor dan anti tumor tubuh.
5. Exstravasasi, pelekatan sel tumor ke endotel vaskuler pada suatu organ, yang juga diikuti oleh pergerakan membran basal yang serupa pada proses invasi.
6. Angiogenesis, merupakan proses dimana pembuluh darah berpenetrasi dan tumbuh di lingkungan sel tumor untuk memenuhi suplai darah pada sel tumor sehingga sel tumor dapat berkembang.



Gambar 2.4 Proses Metastasis Sel Kanker (Febriani & Furqon, 2018)

2.3 Uraian Metode Ekstraksi

2.3.1 Definisi Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa aktif dari suatu simplisia nabati ataupun hewani menggunakan pelarut yang spesifik. Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, teknik ekstraksi yang digunakan untuk mengisolasi senyawa fenolat dari suatu simplisia nabati maupun hewani, dibedakan menjadi metode konvensional dan non konvensional. Metode ekstraksi konvensional ditandai dengan penggunaan pelarut yang lebih banyak serta dilakukan secara manual sehingga ketepatan teknik tidak konsisten (Alara dkk., 2021). Teknik ekstraksi konvensional meliputi :

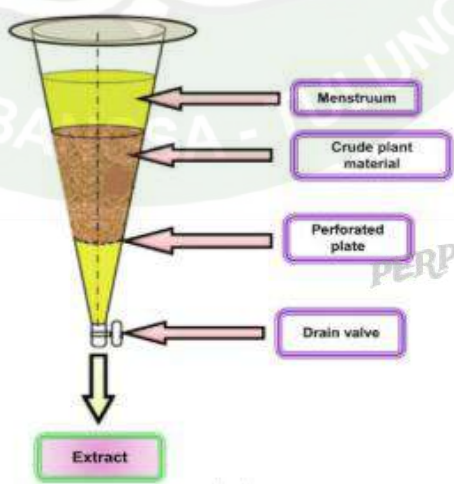
1. Maserasi, proses penyarian sederhana, dimana simplisia serbuk direndam dengan pelarut yang spesifik, dan disimpan dalam wadah gelap serta diikuti proses agitasi yang konstan pada suhu kamar (Olejar., dkk dalam Alara dkk., 2021). Proses pemisahan dilakukan setelah proses ekstraksi selesai, biasanya dilakukan dengan teknik filtrasi, dekantasi, serta klarifikasi. Kelemahan dari metode ini adalah memerlukan waktu yang lama dan jumlah pelarut yang banyak (Alara dkk., 2021).
2. Dekotasi (Gambar 2.5), merupakan proses penyarian dengan merebus simplisia atau dengan merendam simplisia menggunakan air panas dan dibiarkan selama 30 menit. Proses ini cocok untuk menyari simplisia yang

tahan panas, tidak mengandung minyak atsiri, dan larut dalam pelarut air (Alara dkk., 2021).



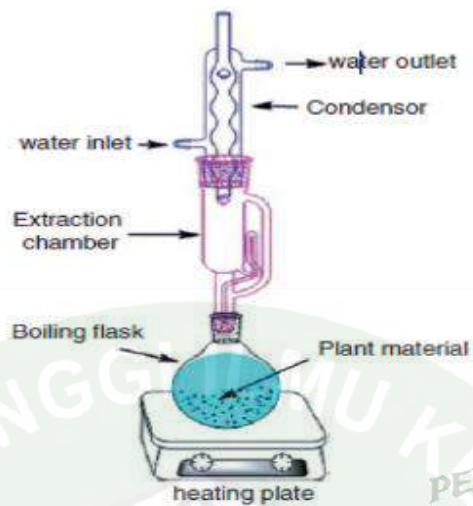
Gambar 2.5 Dekoktasi (Alara dkk., 2021)

3. Perkolasi (Gambar 2.6), merupakan metode penyarian yang hampir mirip dengan metode maserasi. simplisia serbuk diletakkan dalam suatu wadah tertutup dan dialiri oleh pelarut. Pada metode ini tidak memerlukan teknik filtrasi, dikarenakan perkolator telah dilengkapi dengan filter dimana hanya pelarut yang mengandung senyawa fenolat dari ekstrak yang dapat melewatinya (Alara dkk., 2021).



Gambar 2.6 Perkolasi (Alara dkk., 2021)

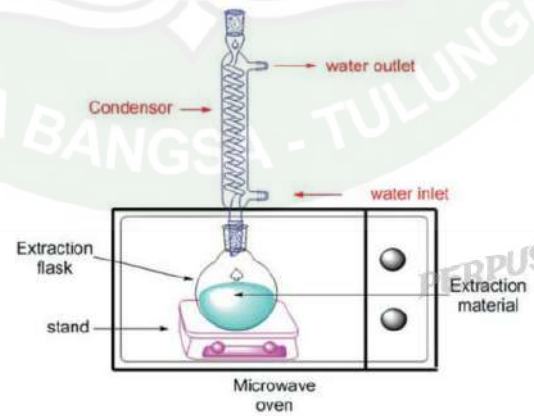
4. Infudasi, merupakan salah satu metode ekstraksi yang menggunakan pelarut air. Metode infudasi lebih menyerupai metode yang biasa dilakukan oleh masyarakat dalam pembuatan jamu yaitu dengan cara merebus sehingga dilakukan dengan proses pemanasan, dengan tujuan menyari zat aktif larut air secara optimal. Proses infudasi dilakukan pada suhu 90°C selama 15 menit (Widyani dkk., 2019). Metode infudasi memiliki kelebihan yaitu, proses pengerjaan dan instrumen yang digunakan sederhana, serta dapat dilakukan dengan waktu yang relatif cepat. Namun, pada metode infudasi menghasilkan ekstrak yang relatif tidak stabil dan mudah ditumbuhi oleh jamur dan kapang, sehingga ekstrak yang diperoleh disimpan pada suhu sejuk $8-15^{\circ}\text{C}$ maksimal selama 14 hari (Oktavia dkk., 2020).
5. Digesti, merupakan pengembangan dari metode maserasi namun melibatkan proses pemanasan, serta dilakukan pengadukan konstan. Suhu disesuaikan agar tidak merusak fenolat dari simplisia, biasanya dilakukan pada suhu 40°C - 50°C . Metode ini cocok digunakan untuk mengisolasi senyawa polifenol (Alara dkk., 2021).
6. *Serial exhaustive extraction*, merupakan penyarian simplisia yang melibatkan proses pemanasan, sehingga metode ini tidak cocok untuk senyawa termolabil. Pada metode ini memerlukan proses fraksinasi untuk ekstraknya dengan pelarut non polar ke semi polar hingga polar untuk menyari semua fenolat ekstrak (Alara dkk., 2021).
7. Soxhletasi (Gambar 2.7), suatu proses ekstraksi dimana sampel serbuk ditempatkan di dalam timbel yang telah terhubung dengan kondensor dan labu alas bulat. Pelarut yang telah dimasukkan dalam labu dipanaskan hingga menguap. Uap tersebut kemudian terkondensasi menjadi molekul air oleh pendingin balik, molekul air tersebut menetes dan menyari senyawa aktif dari serbuk simplisia. Apabila uap cairan penyari telah mencapai sifon tube, maka seluruh cairan akan turun menuju labu alas bulat melalui pipa kapiler sifon. Ekstraksi dilakukan dengan beberapa kali siklus. Ekstraksi dihentikan bila cairan yang berada pada sifon tidak berwarna. Keunggulan dari metode ini adalah memerlukan waktu yang singkat serta volume pelarut yang digunakan sedikit (Alara dkk., 2021).



Gambar 2.7 Sokletasi (Alara dkk., 2021)

Teknik ekstraksi non-konvensional meliputi :

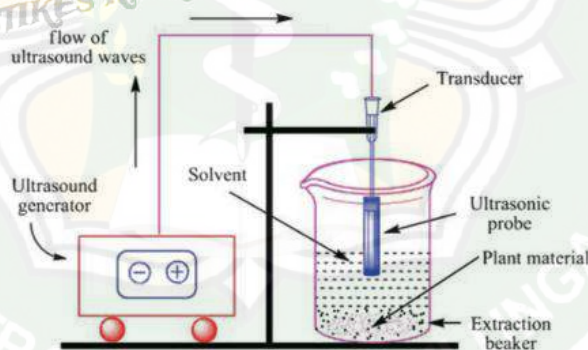
1. *Microwave-Assisted Extraction* (MAE) (Gambar 2.8), merupakan jenis ekstraksi yang menggunakan radiasi gelombang mikro untuk memanaskan pelarut secara cepat dan efisien. Panas yang dihasilkan akan memanaskan dan menguapkan pelarut sehingga tekanan pada dinding sel meningkat dan mengakibatkan sel membengkak (*swelling*), tekanan tersebut mendorong dinding sel dari dalam, meregangkan, dan memecahkan sel tersebut. Rusaknya sel tersebut mempermudah senyawa target keluar dan terekstraksi (Alara dkk., 2021).



Gambar 2.8 *Microwave-Assisted Extraction* (MAE) (Alara dkk., 2021)

Faktor yang mempengaruhi metode MAE yaitu ukuran bahan, pelarut, suhu, dan waktu. Waktu ekstraksi dapat mempengaruhi sifat fisika dan kimia senyawa yang terekstrak. Ekstraksi senyawa fenolik juga dipengaruhi oleh suhu dan waktu. Semakin lama waktu ekstraksi maka semakin lama juga kontak antara pelarut dengan simplisia, sehingga jumlah senyawa yang terekstrak lebih banyak dan pelarutan senyawa akan terus berlangsung hingga pelarut jenuh (Kristanti dkk., 2019).

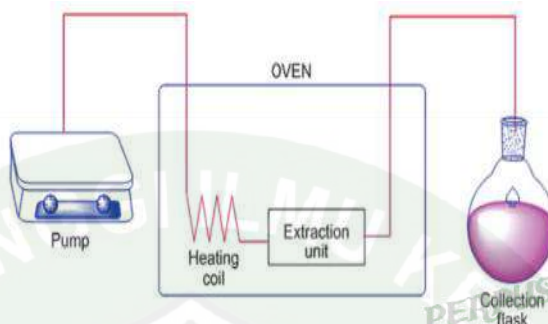
2. *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) (Gambar 2.9), merupakan metode ekstraksi dengan gelombang ultrasonik yang memiliki sifat *non-destructive* dan *non-invasive* yang dapat menjaga kestabilan ekstrak. Metode ini memiliki prinsip kerja akustik kavitasi yaitu dengan merusak dinding sel simplisia sehingga senyawa kimia dari simplisia terlepas keluar sel. Keuntungan dari metode ini adalah menggunakan peralatan yang sederhana, ekonomis dibandingkan dengan metode yang lain, membutuhkan waktu yang singkat, serta meningkatkan perolehan senyawa aktif dari simplisia (Alara dkk., 2021).



Gambar 2.9 *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE)
(Alara dkk., 2021)

3. *Pressurized Liquid Extraction* (PLE) (Gambar 2.10), merupakan metode ekstraksi cair bertekanan, bisa juga disebut dengan “*Accel-erated Solvent Extraction* (ASE)”. Metode ini menggunakan suhu dan tekanan yang tinggi sehingga proses ekstraksi berlangsung cepat. Keuntungan dari metode ini adalah waktu ekstraksi yang lebih cepat, senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak lebih banyak, serta ekstrak yang dihasilkan lebih banyak. Selain

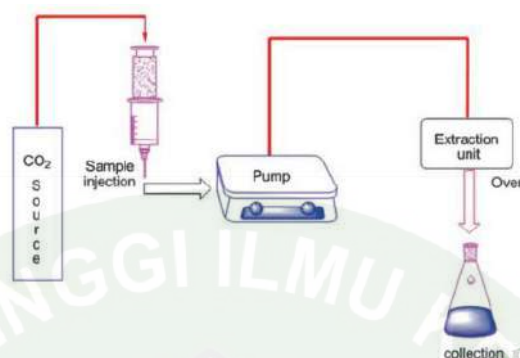
memiliki keuntungan, metode ekstraksi ini juga mempunyai kekurangan yaitu instrumen yang digunakan mahal, selektivitas analit rendah selama proses ekstraksi (Alara dkk., 2021).



Gambar 2.10 *Pressurized Liquid Extraction (PLE)*
(Alara dkk., 2021)

4. *Enzyme-Assisted Extraction (EAE)*, merupakan metode ekstraksi terbaru yang memanfaatkan enzim untuk merusak dinding sel suatu simplisia sehingga kandungan dalam sitoplasma simplisia terdifusi kedalam pelarut. Senyawa fenolat suatu simplisia terlindungi oleh dinding sel yang tersusun atas lignin melalui ikatan hidrofobik atau hidrogen. Komponen enzim yang dapat menghidrolisis lignin yaitu selulosa, hemiselulosa, dan pektinase (Alara dkk., 2021).
5. *Supercritical CO₂ Extraction (SC-CO₂)* (Gambar 2.11), merupakan metode ekstraksi yang menggunakan CO₂ sebagai fluida superkritis (Alara dkk., 2021). Fluida superkritis merupakan suatu unsur atau senyawa yang berada diatas suhu dan tekanan kritisnya. Viskositas dan difusivitas dari fluida superkritis mendekati gas, namun densitasnya cairan, hal inilah yang bermanfaat sebagai transfer masa (Rinawati dkk., 2020). CO₂ adalah salah satu fluida superkritis yang sering dipakai sebagai pelarut dalam ekstraksi SFE, hal ini karena sifat dari CO₂ memiliki toksisitas rendah, suhu dan tekanan superkritisnya juga rendah (T_c dari 31°C dan P_c dari 72 bar). Keuntungan dari metode (SC-CO₂) yaitu berbentuk gas dalam suhu ruang sehingga pemulihan analit sederhana, selain itu karena zat terlarut dalam (SC-CO₂) mudah mengendap saat

depressurisasi, hal ini mempermudah pendaur ulangan CO₂ (Rinawati dkk., 2020).



Gambar 2.11 *Supercritical CO₂ Extraction (SC-CO₂)*
(Alara dkk., 2021)

2.4 Uraian Pelarut

Dalam proses ekstraksi, penarikan senyawa kimia dari simplisia secara optimal dipengaruhi oleh pelarut (Agustina dkk., 2018). Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut (Susanti dkk., 2012):

1. Selektivitas, pelarut dapat melarutkan semua zat yang terkandung dalam simplisia secara keseluruhan.
2. Titik didih, pelarut harus memiliki titik didih yang rendah. Hal ini bertujuan ketika proses penguapan pelarut dapat menguap seluruhnya pada suhu rendah dan tidak ada yang tertinggal dalam ekstrak.
3. Pelarut tidak larut dalam aquadest.
4. Bersifat inert, pelarut harus bersifat inert agar tidak bereaksi dengan senyawa yang ada dalam ekstrak.
5. Ekonomis
6. Toksisitas, pelarut tidak boleh bersifat toksik.
7. Pelarut tidak mudah terbakar.

Menurut penelitian (Susanti dkk., 2012) pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi antara lain:

1. Etanol, merupakan pelarut yang paling banyak dipakai karena memiliki tingkat kelarutan yang tinggi, inert, dan memiliki titik didih rendah sehingga memudahkan proses penguapan.

2. N-heksan, merupakan pelarut non polar, mudah terbakar, memiliki titik didih 65-70⁰C.
3. Isopropanol, merupakan pelarut polar. Pelarut ini mirip dengan etanol, memiliki titik didih 81-82⁰C.
4. Etil asetat, merupakan pelarut semi polar yang memiliki titik didih rendah (70⁰C) dan paling banyak dipakai pada proses ekstraksi dengan metode destilasi.
5. Aseton
6. Metanol, merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam isolasi senyawa dari bahan alam.
7. Aquadest, merupakan pelarut polar yang memiliki konstanta dielektrik yang besar yaitu 80,37, sehingga mampu melarutkan senyawa polar dari simplisia (Dewi dkk., 2015). Selain itu, aquadest sebagai pelarut memiliki sifat stabil, dapat melarutkan senyawa ionik dan non-ionik, tidak beracun, tidak mudah terbakar, mudah diperoleh dan harganya murah (Firyanto dkk., 2019).
8. DMSO (Dimetil Sulfoksida), berwujud cairan jernih, tidak berbau, bersifat higroskopis, larut dalam air, larut dalam alkohol, eter, aseton, kloroform, serta benzena. DMSO merupakan pelarut universal yang sangat aman digunakan karena memiliki efek toksisitas yang rendah terhadap hewan uji, manusia, serta tidak membahayakan lingkungan (Andini dkk., 2021).

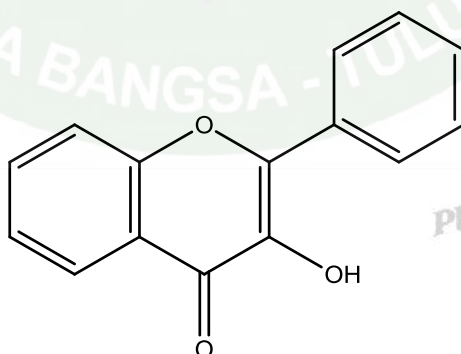
2.5 Metode Identifikasi Senyawa

2.5.1 Identifikasi Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder pada tanaman yang memiliki struktur kimia (C₆-C₃-C₆), flavonoid terbentuk dari reaksi biosintesis yang terjadi pada jaringan tumbuhan. Flavonoid bersifat polar, flavonoid tidak terurai pada suhu >90⁰C (Wahyusi dkk., 2020). Menurut penelitian (Loncaric dkk., 2017) quarcetin yang termasuk dalam golongan flavonoid mengalami peningkatan kelarutan berbanding lurus dengan peningkatan suhu dan waktu pemanasan. Namun, pada suhu 100⁰C quarcetin mulai mengalami degradasi sehingga kadarnya akan menurun. Flavonoid memiliki sifat bioaktif seperti antikanker, antioksidan, antiinflamasi, antivirus, antimutagenik, antitrombolitik, antibakteri, serta vasodilator (Luna dkk., 2020). Flavonoid diklasifikasikan menjadi 14

golongan berdasarkan posisi gugus konstituen, beberapa golongan yang paling terkenal adalah :

1. Aurones, pada golongan ini cincin piranik dari chalcones berubah menjadi cincin furan.
2. Quarcentin, merupakan kelompok flavonoid yang memiliki senyawa fenol.
3. Flavonon, proses hidroksilasi flavonon terjadi dalam bentuk tunggal maupun kombinasi dengan glikosida pada daun, buah, dan bunga.
4. Isoflavon, biasa ditemukan pada tanaman kacang-kacangan, 3-phenylchromen-4-1 merupakan struktur dasar dari isoflavon yang terbentuk selama reaksi biosintesis.
5. Flavon, memiliki struktur kimia 2-phenyl-1-benzopyran-4-1, biasanya ditemukan dalam madu dan anggur.
6. Flavonol (Gambar 2.12), merupakan golongan flavonoid yang memiliki struktur dasar 3-hydroxyflavone, yang biasanya ditemukan diberbagai buah dan sayur.
7. Antosianidin, merupakan golongan dari flavonoid yang biasanya ditemukan pada buah yang memiliki warna ungu. Memiliki struktur kimia 2-phenylbenzopyrylium.
8. Antosianin, memiliki struktur yang hampir mirip dengan antosianidin namun pada struktur antosianin memiliki bagian glikosilasi yang terikat dengan substituen oksigen dari karbon. Biasanya ditemukan pada buah yang berwarna merah.



Gambar 2.12 Struktur Kimia Flavonol
(ChemDraw, 2022)

Aktivitas antioksidan dari flavonoid, dipengaruhi oleh adanya cincin fenolik dan gugus hidroksil bebas. Gugus hidroksil bebas ini mampu menyumbangkan hidrogen sehingga mencegah adanya oksidasi. Ada beberapa teori terkait mekanisme flavonoid sebagai antikanker yaitu, flavonoid sebagai antioksidan melalui jalur pengaktifan apoptosis sel kanker akibat fragmentasi DNA. Proses awal dari fragmentasi DNA adalah pelepasan rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif. Selain itu flavonoid memiliki aktivitas dalam menghambat proliferasi sel kanker, dengan menghambat aktivitas protein kinase sehingga transduksi sinyal dari membran ke inti dihambat (Muaja dkk., 2013). Uji flavonoid dapat dilakukan dengan cara, penambahan etanol pada ekstrak dan beberapa tetes FeCl_3 sampai terjadi perubahan warna. Positif flavonoid bila terjadi perubahan warna menjadi ungu, biru, hijau, merah ataupun hitam. Namun apabila penambahan FeCl_3 hingga 20 tetes belum terjadi perubahan warna maka, ekstrak tidak mengandung flavonoid (Kumalasari & Andiarna, 2020).

2.5.2 Identifikasi Alkaloid

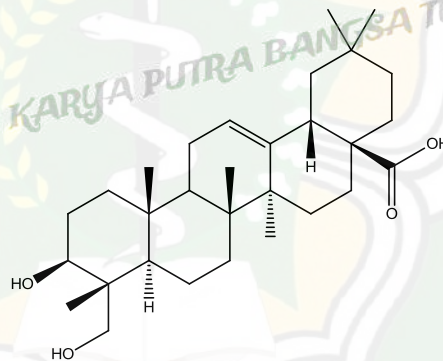
Alkaloid merupakan kelompok senyawa kimia alami, yang mana molekul penyusun terbesarnya adalah nitrogen. Alkaloid bersifat polar dan memiliki titik didih 138°C . Alkaloid memiliki bioaktivitas seperti, antiemetik, antikolinergik, antitumor, antivirus, antiinflamasi, dan antihipertensi (Adejoke dkk., 2019). Keberadaan alkaloid dalam suatu ekstrak, dapat diuji dengan pereaksi Meyer dan Dragendroff. Pengujian Meyer (*mercuri potassium iodide*) hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Sedangkan untuk pengujian Dragendroff (larutan *potassium bismuth iodide*), hasil positif bila terbentuk endapan jingga (Wardhani & Supartono, 2015).

2.5.2 Identifikasi Saponin

Saponin merupakan senyawa glikosida yang terkandung dalam tanaman tingkat tinggi dan beberapa hewan laut. Saponin merupakan kelompok senyawa yang memiliki keberagaman sifat fisikokimia dan juga struktur kimianya (Yunartono dkk., 2017). Saponin bersifat polar, memiliki titik didih yang cukup tinggi yaitu 158°C (Santosa dkk., 2018). Aglikon saponin berupa triterpenoid (Gambar 2.13) dan steroid. Saponin memiliki beberapa kelompok glikosil yang terikat pada gugus C_3 , namun ada juga yang memiliki dua rantai gula yang saling

berikatan pada gugus C_3 dan C_{17} (Yunartono dkk, 2017). Dari struktur saponin tersebutlah yang menyebabkan saponin memiliki sifat seperti sabun. Tak jarang saponin juga diunakan sebagai surfaktan alami (Yunartono dkk., 2017).

Saponin memiliki berbagai sifat biologis yaitu, hemolitik, antibakteri, antivirus, antikanker (Yunartono dkk., 2017). Uji identifikasi saponin dilakukan dengan penambahan aquades dan HCL 2N pada ekstrak, kemudian dikocok kuat. Ekstrak positif mengandung saponin bila terbentuk busa setinggi 1-10 cm selama ± 10 menit (Kumalasari & Andiarna, 2020). Uji identifikasi saponin menggunakan uji pereaksi warna dapat dilakukan dengan, penambahan kloroform pada ekstrak kemudian dipanaskan, dan ditambah pereaksi LB. terbentuknya cincin coklat atau violet menunjukkan adanya kandungan saponin triterpen, sedangkan bila terjadi perubahan warna menjadi biru atau hija menunjukkan positif saponin (Rizkita dkk., 2021).

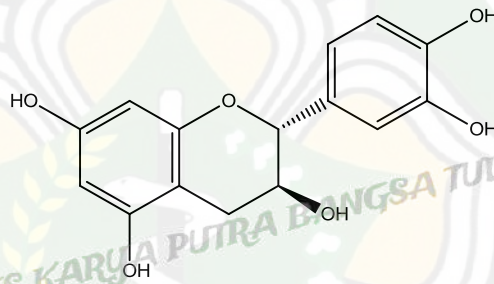


Gambar 2.13 Struktur Triterpenoid
(ChemDraw, 2022)

2.5.3 Identifikasi Tanin

Tanin merupakan senyawa fenol yang memiliki berat molekul besar, yang terdiri dari gugus hidroksil dan karboksil untuk membentuk kompleks yang kuat yang sesuai dengan protein dan beberapa makromolekul. Tanin bersifat polar dan memiliki titik didih $> 98,89^{\circ}\text{C}$. Tanin menyebabkan rasa sepat dan pahit pada beberapa tumbuh-tumbuhan dan buah-buahan (Hidjrawan, 2018). Senyawa tanin memiliki aktivitas antikanker dengan menginhibisi aktivitas protein kinase, akibatnya transduksi sinyal dari membran ke inti sel terhambat. Selain itu tanin juga mengurangi resistensi sel tumor akibat kemoterapi (Marwati dkk., 2020).

Tanin terbagi menjadi dua kelompok yaitu, tanin terkondensasi serta tanin mudah terhidrolisis. Tanin mudah terhidrolisis adalah polimer gallic dan ellagic acid yang saling berikatan dengan ester dan molekul gula. Tanin terkondensasi adalah polimer dari senyawa flavonoid yang berikatan dengan karbon-karbon catechin (Gambar 2.14) dan gallocathecin (Hidayah, 2016). Pengujian terhadap senyawa tanin dapat dilakukan dengan uji reaksi warna dengan penambahan FeCl_3 10% terjadi perubahan warna biru tua atau hijau kehitaman, menunjukkan positif tanin (Sulistyarini dkk., 2019). Selain itu identifikasi tanin dapat dilakukan dengan uji gelatin, dengan penambahan 1% larutan gelatin dan 10% natrium klorida pada ekstrak. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya tanin (Sulistyarini dkk., 2019).



Gambar 2.14 Struktur Kimia Catechin
(ChemDraw, 2022)

2.6 Uraian Tentang LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer)

LC-MS merupakan suatu teknik analisis dengan akurasi tinggi yang dapat digunakan untuk analisa kuantitatif maupun struktural, yang dapat memberikan informasi untuk mengidentifikasi suatu metabolit. Mz mine adalah seluruh kegiatan yang dilakukan diawal pemrosesan data kromatogram LC-MS, yang berguna untuk proses pengidentifikasian suatu senyawa pada sampel (Sumartini dkk., 2020). MZ mine memproses kromatogram LC-MS ke dalam bentuk mass array. Mass array merupakan suatu matrik data berbentuk tiga dimensi yang menyimpan informasi massa akurat dari *peak* puncak dimana data terdeteksi, waktu retensi, serta intensitas peak puncak (Sumartini dkk., 2020).

Cara kerja LC-MS adalah dengan meneruskan komponen elusi ke dalam spektrometer massa dengan jalur antar muka, analit-analit akan dipisahkan berdasarkan kepolarannya, kecepatan analit untuk sampai ke detektor akan

berbeda. Hal ini akan terlihat pada spektrum dengan peak yang terpisah (Mangurana dkk., 2019). Analisa LC-MS menggunakan teknik ionisasi, biasanya menghasilkan ion molekuler ($[M+H]^+$ atau $[M+H]^-$), hal ini dipengaruhi oleh sifat fisika dan kimia analit, polaritas tegangan ESI, sifat matrik, serta komposisi pelarut (Sumartini dkk., 2020). LC-MS menggunakan sedikit atau tanpa pemanasan pada proses identifikasi molekul analit, oleh karena itu metode identifikasi senyawa menggunakan LC-MS dapat diterapkan pada sebagian besar senyawa organik. Sampel yang digunakan dalam metode ini dapat menggunakan senyawa berukuran kecil sampai protein besar. LC-MS cocok untuk identifikasi senyawa bersifat polar, termolabil, dan tidak mudah menguap (Saibaba dkk., 2016).

2.7 Uraian Tentang *Artemia Salina* Leach

2.7.1 Definisi (*Artemia Salina* Leach)

Artemia Salina Leach (Gambar 2.15) merupakan microcrustasean laut yang digunakan untuk mendeteksi senyawa bioaktif suatu ekstrak tumbuhan serta potensi toksisitasnya (Arcanjo dkk., 2012).



Gambar 2.15 *Artemia Salina* Leach
(Hamidi dkk., 2014)

2.7.2 Klasifikasi (*Artemia Salina* Leach)

Klasifikasi *Artemia Salina* Leach menurut (Linnaeus dalam Hamidi dkk., 2014) :

Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Subphylum : Crustacea

Class : Branchiopoda
Order : Anostraca
Family : Artemiidae
Genus : Artemia
Spesies : *Artemia salina* L

2.7.3 Faktor yang Mempengaruhi Penetasan Telur (*Artemia Salina* Leach)

Ada beberapa kriteria yang harus diterapkan dalam proses pentasan telur *Artemia Salina* Leach antara lain (Hamidi dkk., 2014):

1. Lingkungan eksperimen, larva udang *Artemia Salina* Leach ditetaskan dalam suatu wadah yang cukup luas, agar dapat digunakan untuk menaruh suplai udara untuk menunjang penetasan larva. Suplai udara saat proses penetasan sangat penting, karena air laut buatan setidaknya harus jenuh (90%) dengan O₂ agar proses penetasan sempurna. Wadah penetasan sebelumnya diisi dengan air laut buatan sebagai media hidup larva udang (Hamidi dkk., 2014). Nilai pH air laut buatan sangat penting dalam proses penetasan larva, pH optimal untuk penetasan larva berkisar antara pH 5-8, bila perlu pH diatur dengan penambahan NaOH atau Na₂CO₃ untuk menghindari kematian larva akibat penurunan pH selama proses penetasan. Suhu juga berpengaruh dalam proses penetasan larva udang, menurut penelitian (Hamidi dkk., 2014) pada usia 30 jam dengan suhu 20⁰C-30⁰C larva udang yang menetas sebanyak 50%. Selain itu, stimulasi cahaya juga mempengaruhi proses penetasan larva udang, dimana telur yang mendapat stimulasi cahaya lebih cepat menetas dari pada telur yang tidak mendapat stimulasi cahaya (Hamidi dkk., 2014).
2. Asal wilayah geografis telur *Artemia Salina* Leach harus sama.
3. Usia *Artemia Salina* Leach harus sama pada tiap perlakuan uji.
4. Kelompok uji dan kelompok negatif, merupakan hal terpenting dalam pengujian yang memaparkan korelasi antara hasil dan kesesuaian prosedur uji.

2.8 Uraian Metode BSLT Terhadap Pengujian Antikanker

Salah satu teknik yang digunakan untuk uji toksisitas adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Mayang dan Santoso, 2020). Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan uji pendahuluan suatu senyawa yang bermanfaat untuk mendeteksi keberadaan suatu senyawa toksik, dengan

menentukan nilai LC_{50} dari suatu senyawa aktif (Jelita dkk., 2020). Prinsip dari uji toksisitas menggunakan metode BSLT adalah mengamati dan menghitung persentase kematian larva udang *Artemia Salina Leach* dalam jangka waktu 24 jam (Mayang & Santoso, 2020). Larva udang memiliki karakteristik kulit yang tipis, serta memiliki kepekaan terhadap lingkungannya, larva tersebut akan mati apabila terkena zat toksik, hal inilah yang menyebabkan larva udang *Artemia Salina Leach* banyak digunakan dalam uji toksisitas (Jelita dkk., 2020). Selain itu alasan digunakan larva udang *Artemia Salina Leach* dalam metode BSLT dikarenakan larva udang *Artemia Salina Leach* dapat merespon suatu senyawa kimia yang mirip dengan mamalia (Mayang & Santoso, 2020). Metode BSLT memiliki beberapa keuntungan bila digunakan dalam pengujian toksisitas suatu senyawa seperti, waktu perlakuan cepat (24 jam), ekonomis, proses pengujian mudah dilakukan dan tidak memerlukan teknik khusus, memerlukan sampel sedikit, serta efek toksik dapat diketahui dari kematian larva udang (Jelita dkk., 2020).

Menurut penelitian (Hamidi dkk., 2014) keuntungan menggunakan metode BSLT adalah sebagai berikut:

1. Proses pengujian dilakukan cepat, maksimal 60 jam. Namun dalam pengambilan data nilai LC_{50} hasil telah dapat diperoleh pada waktu 24 jam.
2. Proses uji sederhana dan tidak memerlukan keterampilan khusus.
3. Peralatan uji sederhana, serta ketersediaan sampel uji yang melimpah.
4. Ekonomis.

2.9 Uraian Toksisitas Terhadap (*Artemia Salina Leach*) dengan Metode BSLT

Uji toksisitas merupakan uji yang berguna untuk mengetahui aktivitas farmakologi suatu senyawa pada waktu yang singkat setelah pemberian dosis. Prinsip dari uji toksisitas adalah bahwa suatu senyawa bioaktif dipastikan tetap bersifat toksik bila diberikan pada dosis yang tinggi, dan akan memberikan efek farmakologis yang baik bila pada dosis rendah (Makiyah dan Tresnayanti, 2017). Berbagai metode telah banyak dilakukan untuk mengidentifikasi potensi toksisitas suatu senyawa terhadap organisme. Uji toksisitas dapat dibedakan menjadi, uji toksisitas akut, uji toksisitas sub-akut, serta uji toksisitas kronis (Singh dan Zahra,

2017). Toksisitas akut adalah toksisitas yang menyebabkan efek parah pada organisme dari pajanan jangka pendek suatu zat toksik, biasanya kurang dari 24 jam. Toksisitas sub-akut merupakan pajanan berulang dari suatu senyawa yang bersifat toksik terhadap suatu organisme dalam jangka waktu kurang dari 1 bulan. Sedangkan uji toksisitas kronis merupakan pajanan berulang dari suatu senyawa yang bersifat toksik terhadap suatu organisme dalam jangka waktu lebih dari 3 bulan (Singh dan Zahra, 2017). Toksisitas sangat erat hubungannya dengan *Lethal Concentration 50* (LC₅₀). LC₅₀ (Tabel 2.1) merupakan konsentrasi dari suatu sampel yang mengakibatkan kematian 50% terhadap hewan uji dalam waktu tertentu (Mayang & Santoso, 2020). Dari nilai LC₅₀ dapat memberikan informasi terkait tingkat toksisitas dari suatu senyawa. Apabila nilai LC₅₀ < 1000 mg/L, maka suatu senyawa di duga memiliki efek toksik (Mayang & Santoso, 2020). Untuk menghitung LC₅₀, dengan analisis probit konsentrasi (Gambar 3.1). Diperoleh dari nilai log probit presentase kematian hewan uji dan uji konsentrasi yang dihitung dengan persamaan linier $y = mx+b$ (Singh dan Zahra, 2017).

Tabel 2.1 Nilai LC₅₀ (Sumihe dkk., 2014)

Nilai LC ₅₀	Tingkat Ketoksikan
LC ₅₀ > 1.000 mg/L	Tidak toksik
LC ₅₀ ≤ 1.000 mg/L	Toksik
LC ₅₀ ≤ 30 mg/L	Sangat toksik

2.10 Hipotesis

2.10.1 Hasil identifikasi senyawa infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) diduga memiliki kandungan senyawa sianohidrik, asam tartarat, tanin, beta-sitosterol, asam sitrat, asam kresentia, alpa dan beta amirina, stigmastrol, asam palmitat, asam esterat, apegenin, naftaquinon, flavonoid-quarcetin, 3-hidroksioctanol glicoside, glikosida iridoid berdasarkan penelitian ekstrak etanol daun berenuk (*Crescentia Cujete L.*) sebelumnya (Kusuma dkk., 2014).

2.10.2 Hasil identifikasi senyawa infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) diduga memiliki kandungan senyawa terbesar yaitu flavonoid-quarcetin

berdasarkan penelitian ekstrak etanol daun berenuk (*Crescentia Cujete L.*) sebelumnya (Kusuma dkk., 2014).

2.10.3 Nilai LC_{50} infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) diduga < 1000 ppm, yaitu sebesar 642, 877 ppm (Fatimah dkk., 2022).



BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Alat Dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, seperangkat alat infundasi, seperangkat alat LC-MS (SHIMADZU), *rotary evaporator* PC 620 select, termometer (GEA), neraca analitik (KENKO), timbangan digital (SPEEDS), alat-alat gelas (PYREX), kain saring, lampu pijar (PHILIPS), aquarium, aerator (ARMADA), kaca pembesar (JOYKO), flacon.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, daun segar Tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete L.*), aquadest (ONEMED), etanol (EMSURE), FeCl₃ (MERCK), kloroform (ONEMED), DMSO 2% (MERCK), asam sulfat (GLATT CHEMICAL), amonia (GLATT CHEMICAL), pereaksi Meyer (NITRA KIMIA), pereaksi Dragendroff (NITRA KIMIA), pereaksi LB (NITRA KIMIA), telur *Artemia Salina Leach* (SUPREME PLUS), garam laut (ASW), ragi (FERMIPAN).

3.2 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yang terdapat di Desa Wates, Kecamatan Sumbergempol, Tulungagung.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) muda dari daun muda mendekati pucuk, hingga daun ke-7 pada saat dipetik di pekarangan kantor kelurahan Desa Wates, Kecamatan Sumbergempol, Tulungagung.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan suatu faktor yang mempengaruhi satu atau lebih variabel lain (Nasution, 2017). Variabel bebas pada penelitian ini adalah

infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dan variasi konsentrasi ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yaitu 1000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, dan 100 ppm yang akan dilakukan pengujian toksisitas dengan metode BSLT.

3.4.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol merupakan suatu faktor yang dipengaruhi oleh satu atau lebih variabel lain (Nasution, 2017). Variabel kontrol pada penelitian ini adalah larva *Artemia Salina* Leach yang berumur 24 jam, pH air laut buatan yang digunakan dalam rentang 5-8, suhu pada proses penetasan telur *Artemia Salina* Leach dalam rentang 20°C-30°C, wadah yang digunakan pada metode BSLT.

3.4.3 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan suatu faktor yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas (Nasution, 2017). Variabel terikat pada penelitian ini adalah senyawa yang terkandung dalam ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dan nilai LC₅₀ yang akan diperoleh.

3.5 Metode Penyarian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Sampel tanaman daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dideterminasi di UPT Materia Medika di Batu Malang, Jawa Timur. Tujuan dari determinasi tanaman adalah untuk memperoleh identitas yang benar dari tanaman yang akan diteliti, dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan awal (Diniatik, 2015).

3.5.2 Pembuatan Infusa Daun Majapahit

Pembuatan infusa daun majapahit menggunakan metode infudasi, sebanyak 1.200 gram daun majapahit segar disortasi basah lalu dicuci, kemudian dipotong kecil-kecil dimasukkan dalam alat infudasi yang telah terisi oleh 2.400 ml aquades sebagai pelarut. Daun direbus pada suhu 90°C selama 15 menit sambil sesekali diaduk. Setelah itu dilakukan penyaringan. Infusa daun majapahit kemudian dipekatkan menggunakan *rotarry evaporator* pada suhu 40°C hingga didapat ekstrak kental. Setelah diperoleh ekstrak kental, dilakukan penimbangan ekstrak dan penyimpanan ekstrak. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian disimpan pada lemari pendingin (Maharani dkk., 2018).

3.5.3 Rendemen

Rendemen merupakan perbandingan antara simplisia awal dengan ekstrak yang didapat (Wijaya dkk., 2018). Rumus perhitungan persen (%) rendemen yaitu:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.1})$$

3.5.4 Skrining Fitokimia

3.5.4.1 Flavonoid

Skrining fitokimia flavonoid dalam ekstrak daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dilakukan dengan cara menambahkan 10 mg sampel dengan 5 ml etanol dan beberapa tetes FeCl_3 sampai terjadi perubahan warna. Adanya perubahan warna menjadi biru, ungu, hijau, merah, atau hitam menunjukkan adanya kandungan flavonoid (Kumalasari & Andiarna, 2020).

3.5.4.2 Alkaloid

Skrining fitokimia alkaloid dalam ekstrak daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dilakukan dengan cara sebanyak 2 g sampel ditambah kloroform 10 ml dan dilarutkan. Ditambahkan 5 ml kloroform-amoniak 0,05 M, filtrat yang terbentuk ditambahkan 10-20 tetes asam sulfat 2 N lalu dikocok perlahan selama 2-3 menit dan dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan, lapisan atas diambil dan dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi dan diuji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Terbentuknya endapan putih terhadap pereaksi Mayer dan endapan jingga-merah dengan pereaksi Dragendorff menunjukkan hasil positif uji alkaloid (Wardhani & Supartono, 2015).

3.5.4.3 Saponin

Skrining fitokimia saponin dalam ekstrak daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 gram sampel 5 ml aquades dan dikocok kuat-kuat. Uji positif adanya saponin pada larutan ditandai dengan terbentuknya busa/buih (Kumalasari & Andiarna, 2020). Uji warna pada saponin dapat dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 gram sampel ditambah kloroform 10 ml, dipanaskan selama 5 menit sambil dikocok kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi LB. Jika terbentuk cincin coklat atau violet maka mengandung saponin

triterpen, sedangkan warna hijau atau biru mengandung saponin (Rizkita dkk., 2021).

3.5.4.4 Tanin

Skринing fitokimia tanin dalam ekstrak daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dilakukan dengan cara sebanyak sebanyak 0,5 gram sampel ditambah 20 ml akuades dan dipanaskan. Saring filtrat dan tambahkan beberapa tetes 0,1% FeCl₃ sampai berubah warna. Hasil positif mengandung tanin ditunjukkan dengan munculnya warna hijau kecoklatan atau warna biru hitam (Sulistyarini dkk., 2019).

3.6 Uji Kandungan Senyawa Infusa Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dengan LC-MS

Uji kandungan senyawa ekstrak merupakan pengujian lanjutan dari skринing fitokimia, dimana kita menguji kandungan senyawa ekstrak daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) menggunakan LC-MS (*Liquid Chromaography-Mass Spectrometer*) yang bertempat di Universitas Muhammadiyah Malang.

3.7 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Uji

Pembuatan larutan induk 1000ppm sebanyak 100ml. Larutan induk dibuat dengan menimbang 100mg ekstrak kental daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yang kemudian dilarutkan dengan 2 ml DMSO 2%, kemudian di add kan dengan aquadest 100 ml. Dibuat dengan seri konsentrasi 1000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm dan 600 ppm sebagai uji pendahuluan.

3.8 Skринing Potensi Antikanker Dengan Metode BSLT

3.8.1 Pembuatan Air Laut Buatan

Pembuatan air laut buatan dilakukan dengan mencampurkan 1 liter air dengan garam ikan tidak beryodium seberat 35 gram agar mendapatkan tingkat salinitas 35% sebagai media penetasan telur *Artemia salina* Leach (Aqiila dkk., 2017). Air laut buatan yang sudah jadi kemudian dimaserasi selama 2 jam, dengan tujuan agar air laut buatan memiliki kandungan oksigen yang cukup untuk kelangsungan hidup *Artemia salina* Leach. pH optimal air laut buatan adalah 5-8 (Suhaimi dkk., 2019).

3.8.2 Penetasan Telur *Artemia Salina* Leach

Dalam proses penetasan telur *Artemia Salina* Leach dapat dilakukan dengan mengisi wadah yang digunakan sebagai tempat penetasan, dengan air laut buatan,

dilengkapi dengan aerator sebagai *suplay* oksigen. Taburkan telur *Artemia Salina* Leach dan tunggu selama 24 jam. Suhu optimal dalam penetasan telur *Artemia Salina* Leach adalah 20⁰C-30⁰C. Larva *Artemia Salina* Leach berumur 48 jam dan telah aktif bergerak siap digunakan sebagai hewan uji (Suhaimi dkk., 2019).

3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Pembagian kelompok perlakuan pada metode BST menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebanyak 180 ekor. Larva-larva tersebut dibagi dalam lima kelompok uji dengan konsentrasi 1000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, 100 ppm, dan kelompok kontrol negatif yang nantinya akan direplikasikan sebanyak tiga kali. Setiap kelompok berisi sepuluh larva *Artemia salina* Leach.

3.8.5 Pelaksanaan Uji Toksisitas

Pada uji toksisitas akut menggunakan larva *Artemia salina* Leach dilakukan dalam dengan cara membagi larva pada flakon-flakon yang telah disiapkan, dimana flakon telah berisi 5ml air laut buatan. Setelah larva sudah dibagi diberi 1 ml larutan uji dan 1 tetes suspensi ragi sebagai sumber makanan larva. Kemudian larva didiamkan selama 24 jam, setelah 24 jam diamati pergerakan larva 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. Rumus prosentase kematian larva yaitu:

$$\% \text{ larva} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.2})$$

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

$$y = mx + b \quad (\text{Persamaan 3.3})$$

Keterangan :

y = nilai LC₅₀ dalam tabel probit

m = log konsentrasi bahan uji

Dari keterangan tersebut kemudian dihitung LC_{50} dengan memasukkan nilai probit, sesuai dengan Gambar 3.1 (Singh & Zahra, 2017) yang dibentuk seperti pada Tabel 3.1 dibawah ini :

%	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

Gambar 3.1 Tabel Probit (Finney, 1952)

Tabel 3.1 Model Tabel Data Probit Analisis

Konsentrasi	Log 10	Probit	% Dead	Mortality	Total hewan uji
Kontrol negatif					
1000 ppm					
900 ppm					
800 ppm					
700 ppm					
600 ppm					
500 ppm					
400 ppm					
300 ppm					
200 ppm					
100 ppm					

Apabila pada kontrol ada larva yang mati, maka % kematian ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{ Kematian larva} = \frac{T - K}{10} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.4})$$

Keterangan :

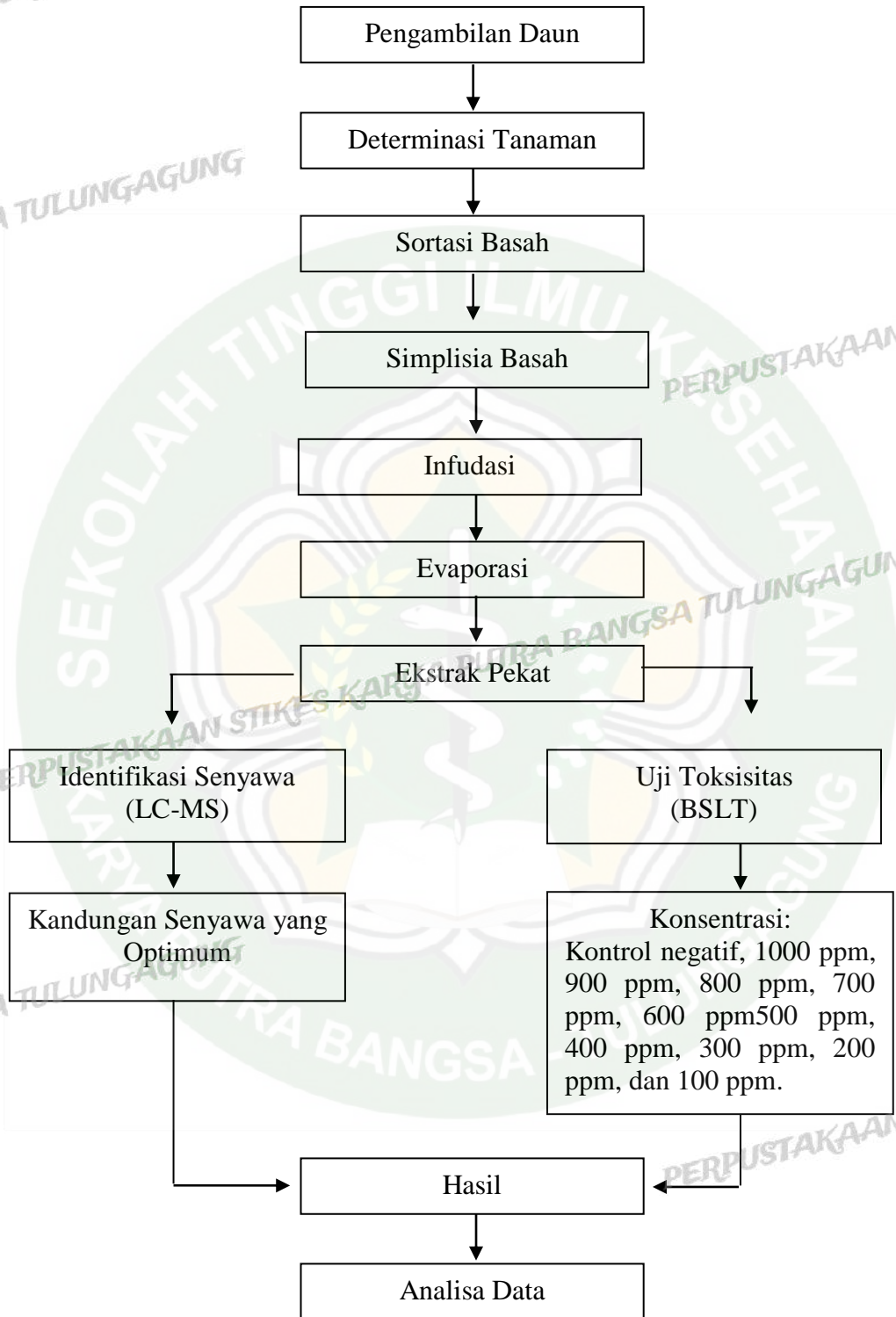
T = Jumlah larva uji yang mati,

K = Jumlah larva kontrol yang mati,

10 = Jumlah larva uji



3.9 Kerangka Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung, diruang instrumen evaporasi Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 13 Februari 2023 - 17 Februari 2023, serta diruang instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) Universitas Muhammadiyah Malang pada tanggal 22 Februari 2023 – 24 Maret. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut (LC₅₀) ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*), dengan tahapan penelitian dimulai dari pembuatan ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*), dilanjutkan dengan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS), dan pengujian toksisitas dengan menggunakan metode *Brine shrimp Lethality Test* (BSLT). Dari penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil sebagai berikut :

4.1 Determinasi Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun majapahit. Tanaman majapahit yang akan digunakan dalam penelitian dideterminasi terlebih dahulu untuk mengetahui jenis tanaman yang akan digunakan. Determinasi tanaman majapahit dilakukan di UPT Materia Medika Batu, Malang. Berdasarkan buku “FLORA: untuk sekolah di Indonesia” karangan Van Steenis (2008) hasil determinasi tanaman majapahit dengan nomor surat 074/697/102.20-A/2022 menunjukkan bahwa sampel tanaman yang digunakan yaitu tanaman majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dengan kunci determinasi 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b-16b-286a-287a:Bignoniaceae-1b-3a:Cressentia-3:C.cujete.

Dengan klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Scrophulariales
Suku : Bignoniaceae
Marga : Crescentia

Jenis : *Crescentia Cujete L.*

Berdasarkan determinasi tersebut dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman majapahit. Adapun surat pengesahan determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2 Pengambilan Bahan

Bagian tanaman majapahit yang digunakan pada penelitian ini yaitu bagian daun yang sehat, dari pucuk daun hingga daun ke-tujuh, hal itu dapat dilihat dari bagian daun yang tampak segar, bentuk yang bagus atau tidak terserang penyakit. Pemilihan daun dari daun muda mendekati pucuk, hingga daun ke-tujuh dikarenakan apabila daun terlalu tua dikhawatirkan kandungan zat aktif dalam daun telah mengalami penurunan (Rahmiati dkk., 2018).

4.3 Pembuatan Bahan Uji (Infusa Daun Majapahit)

Setelah dilakukan pemanenan, selanjutnya daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) disortasi basah. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan daun majapahit dengan bagian tanaman yang lain, maupun material-material lain yang tidak diperlukan (Azizah dkk., 2020). Daun majapahit yang telah disortasi basah, kemudian dirajang kecil-kecil dan dimasukkan dalam alat infudasi. Perajangan pada daun bertujuan untuk memperluas permukaan daun yang berkontak dengan pelarut, sehingga lebih banyak metabolit sekunder yang tersari (Rahmiati dkk., 2018). Bahan uji dibuat dengan merebus daun majapahit sebanyak 1.200 gram kedalam 2.400 aquadest pada suhu 90°C selama 15 menit, sambil sesekali diaduk. Pemekatan Ekstrak cair dilakukan dengan proses evaporasi di Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak

4.3.1 Uji Rendemen

Tabel 4.1 Hasil Rendemen Ekstrak

Sampel	Bobot simplisia	Bobot ekstrak	%Hasil
Daun majapahit (<i>Crescentia Cujete L.</i>)	1.200 gram	46,45 gram	3,87%

Mutu suatu ekstrak, dapat dilihat dari hasil rendemen ekstrak yang didapat. Rendemen merupakan perbandingan antara simplisia awal dengan ekstrak yang didapat. Rendemen biasanya ditandai dengan satuan persen (%), semakin tinggi nilai rendemen maka semakin banyak ekstrak yang didapatkan. Salah satu faktor yang mempengaruhi rendemen dari suatu ekstrak adalah metode ekstraksi (Wijaya dkk., 2018). Hasil penelitian menunjukkan rendemen ekstrak infusa daun majapahit yang telah dihitung berdasarkan rumus pada Persamaan 3.1 menghasilkan rendemen sebesar 3,87%, yang mana persyaratan rendemen berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia adalah 10%. Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa setelah melalui proses ekstraksi daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) kehilangan berat sebesar 96,13%. Hal ini menunjukkan bahwa rendemen yang dihasilkan rendah. Rendahnya nilai rendemen juga dipengaruhi oleh metode ekstraksi, suhu ekstraksi, waktu ekstraksi, jenis dan jumlah dari pelarut, ukuran sampel, serta usia daun (Wijaya dkk., 2018). Pada proses penyarian dengan metode ekstraksi, menggunakan waktu yang cukup singkat yaitu 15 menit, sehingga kesempatan bereaksi antara bahan dengan pelarut hanya sebentar, hal ini menyebabkan proses penetrasi pelarut ke dalam bahan tidak efektif dan menyebabkan sedikitnya senyawa yang berdifusi keluar sel (Wijaya dkk., 2018).

4.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia digunakan untuk memastikan keberadaan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam suatu sampel tanaman (Oktavia dkk., 2020). Pada penelitian ini peneliti melakukan skrining fitokimia ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) secara kualitatif dengan reaksi warna yang bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang meliputi flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Hasil uji kandungan fitokimia ekstrak infusa daun majapahit dapat dilihat pada (Tabel 4.2) berikut ini :

Tabel 4.2 Hasil Uji Kandungan Fitokimia Ekstrak Infusa Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*)

No	Uji Fitokimia	Pereaksi	Gradien Warna	Hasil
1.	Flavonoid	C ₆ H ₂ O+FeCl ₃	Hijau Kehitaman	+

Tabel 4.2 Lanjutan

No	Uji Fitokimia	pereaksi	Gradien Warna	Hasil
2.	Alkaloid		Filtrat + pereaksi mayer	+
			Endapan putih	
		CHCl ₃ + NH ₃	Filtrat + pereaksi dragendroff	+
			Endapan jingga	
3.	Saponin	Aquadest 5ml	Terbentuk busa	+
4.	Tanin	FeCl ₃ 0,1%	Hijau kecoklatan	+

Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak infusa daun majapahit mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.2. Setiap bagian tanaman memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang sama dalam satu spesies meskipun dengan kuantitas yang berbeda. Hal ini dikarenakan senyawa metabolit sekunder pada tanaman digunakan sebagai perlindungan diri dari predator. Perbedaan kuantitas dari senyawa metabolit sekunder dikarenakan, setiap bagian tanaman memiliki kebutuhan yang berbeda (Mangurana dkk., 2019). Pada penelitian Fatimah dkk (2022), menyatakan bahwa hasil uji fitokimia daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) dengan pelarut metanol mengandung senyawa tanin, saponin, alkaloid, fenolat, dan terpenoid. Mekanisme ekstraksi pada suatu ekstrak, terjadi karena adanya pelarut yang mengalir masuk kedalam sel, yang mengakibatkan protoplasma membengkak, dan bahan aktif yang ada di dalam sel akan terlarut oleh pelarut yang sesuai. Polaritas dari pelarut yang digunakan untuk ekstraksi, harus memiliki kepolaran yang sama atau hampir sama dengan kepolaran bahan aktif, agar mendapatkan rendemen yang banyak. Hal ini juga mengacu pada prinsip *like dissolves like*, yang mana menyatakan bahwa suatu senyawa aktif akan terlarut pada pelarut yang memiliki kepolaran yang sama (Prayoga dkk., 2019). Pelarut metanol dan aquades sama-sama memiliki sifat polar. Pelarut polar akan menarik senyawa polar yang berada di dalam ekstrak. Sehingga pada uji fitokimia dengan dibantu pereaksi akan menghasilkan warna yang berbeda pada larutan. Hasil uji fitokimia pada infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) menunjukkan

bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung berupa flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin.

4.5.1 Uji Flavonoid

Uji Flavonoid dilakukan dengan menambahkan 10 mg sampel dengan 5 ml etanol dan beberapa tetes FeCl_3 sampai terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman. Hasil warna hijau kehitaman pada uji flavonoid didapatkan dari adanya reaksi pada ekstrak dengan pereaksi FeCl_3 . Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol yang memiliki gugus OH. Senyawa fenol yang terkandung dalam ekstrak daun majapahit akan bereaksi dengan ion Fe^{3+} dari pereaksi FeCl_3 yang akan membentuk ikatan kompleks dan menyebabkan perubahan warna larutan menjadi hijau kehitaman (Kumalasari & Andiarna, 2020). Pada penelitian (Arel dkk., 2018) terkait uji flavonoid pada daun berenuk (*Crescentia Cujete L.*) menunjukkan hasil positif flavonoid dengan timbulnya warna kuning orange sampai merah. Hasil warna yang dihasilkan berbeda dengan penelitian ini dikarenakan perbedaan pereaksi yang digunakan. Penelitian yang dilakukan oleh Arel dkk (2018) menggunakan sedikit serbuk Mg dan beberapa tetes HCl. flavonoid berfungsi sebagai antikanker dengan berperan sebagai antioksidan, melalui jalur pengaktifan apoptosis sel kanker akibat fragmentasi DNA, serta menghambat proliferasi sel kanker dengan menginhibisi aktivitas protein kinase sehingga transduksi sinyal ke inti sel terhambat (Kumalasari & Andiarna, 2020) Reaksi terbentuknya flavonoid dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4. 1 Reaksi Uji Flavonoid (Kumalasari & Andiarna, 2020)



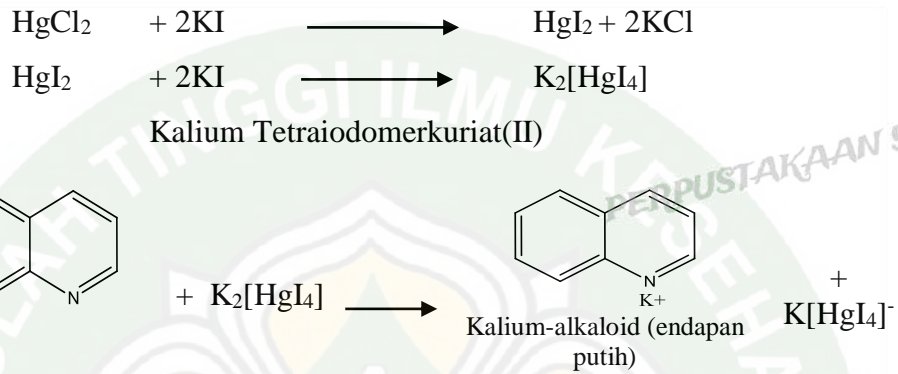
Gambar 4. 2 Hasil Uji Flavonoid. (A) Sebelum Perlakuan, (B) Sesudah Perlakuan

4.5.2 Uji Alkaloid

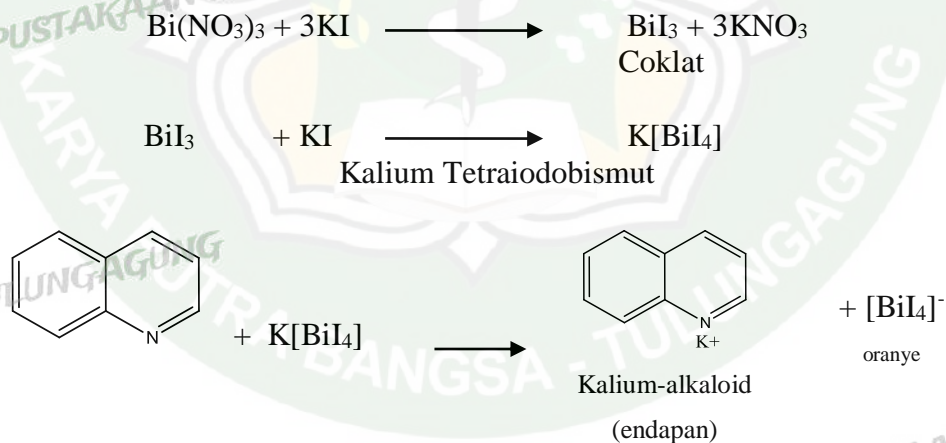
Pengujian senyawa alkaloid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak dengan reagen Mayer dan reagen Dragendorff. Hasil positif pengujian alkaloid dengan reagen Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Sementara itu, untuk pengujian alkaloid dengan reagen Dragendorff menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya endapan jingga. Endapan putih yang terbentuk pada pengujian dengan reagen Mayer merupakan kompleks kalium-alkaloid. Pereaksi mayer terbentuk dari larutan (II) klorida yang direaksikan dengan kalium iodida yang akan membentuk endapan merah merkuri (II) iodida. Apabila penambahan kalium iodida berlebih, akan membentuk kalium tetraiodomerkurat (II). Senyawa alkaloid mengandung atom nitrogen yang berpasangan dengan elektron bebas. Pada uji alkaloid menggunakan pereaksi Mayer, atom nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II), sehingga membentuk kompleks kalium alkaloid yang mengendap (Agustina dkk., 2018).

Pada uji Dragendorff ditandai dengan terbentuknya endapan jingga. Pada pembuatan pereaksi Dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCL agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis menjadi ion bismutil. Selanjutnya, ion Bi^{3+} dari bismut nitrat bereaksi dengan ion kalium iodida membentuk endapan hitam Bismut (III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida yang berlebih dan membentuk kalium tetraiodobismutat. Atom Nitrogen pada alkaloid akan membentuk ikatan kovalen dengan K^+ yang merupakan ion logam, dan membentuk endapan jingga. Endapan tersebut

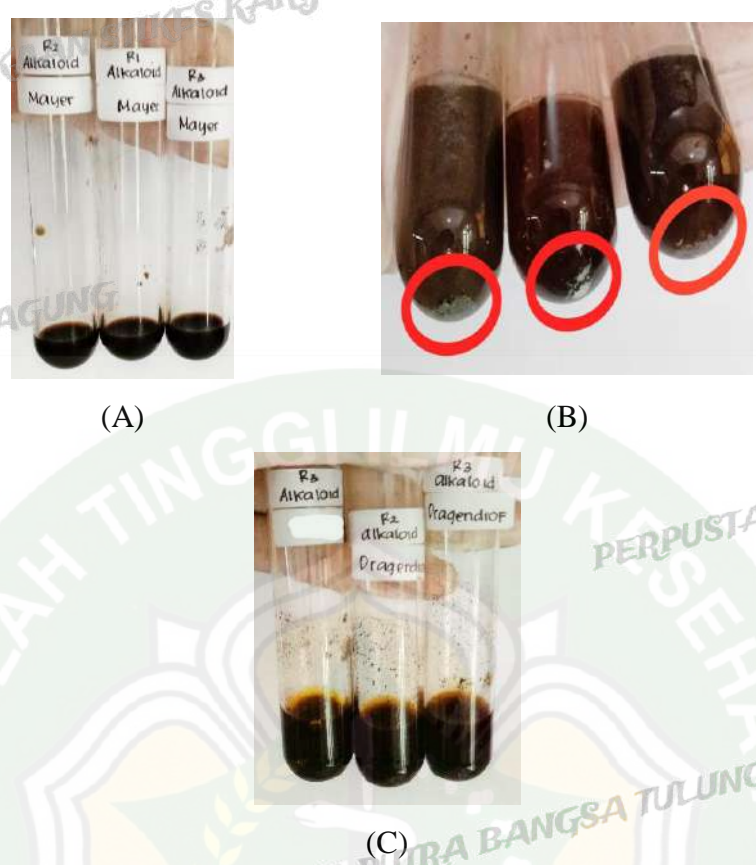
merupakan kalium alkaloid (Wardhani & Suparsono, 2015). Alkaloid sebagai antikanker berfungsi menghambat polimerasi protein menjadi mikrotubulus, sehingga menghambat terbentuknya spindle mitotic dan menghetikan siklus pembelahan sel kanker (Adejoke dkk, 2019). Reaksi terbentuknya alkaloid dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3.



Gambar 4. 3 Reaksi Uji Mayer (Agustina dkk., 2018)



Gambar 4. 4 Reaksi Uji Dragendorff (Agustina dkk., 2018)

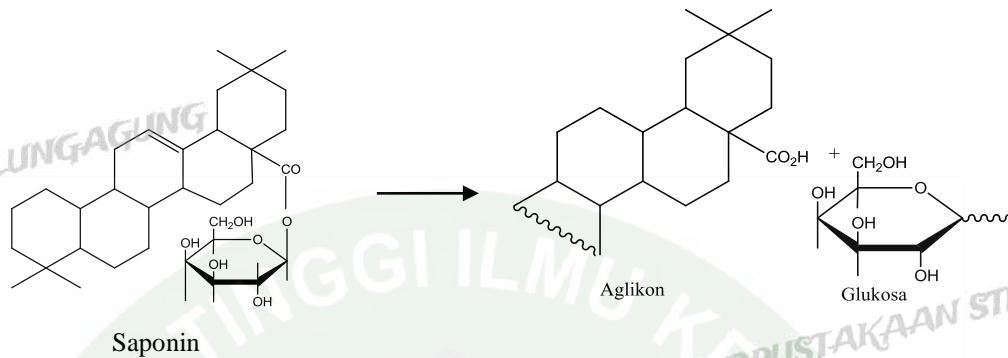


Gambar 4. 5 Hasil Uji Alkaloid. (A) Sebelum Perlakuan, (B) Uji Mayer (C) Uji Dragendorff

4.5.3 Uji Saponin

Pengujian senyawa saponin dilakukan dengan menambahkan 0,5 gram sampel dengan 5 ml aquades kemudian dikocok kuat hingga terbentuk busa. Terbentuknya busa stabil pada uji ekstrak infusa daun majapahit menunjukkan positif senyawa saponin. Terbentuknya busa menunjukkan telah terbentuknya gugus glikosil yang berfungsi sebagai gugus polar dan gugus non polar. Senyawa yang memiliki dua gugus berbeda akan memiliki sifat aktif permukaan, dimana ketika dilakukan pengocokan akan terbentuk busa yang stabil. Gugus hidroksil yang diduga terkandung dalam senyawa saponin merupakan gugus hidrofob dan gugus hidrofilik, sehingga akan terjadi reaksi dan membentuk suatu ikatan. Gugus hidrofob akan mengikat udara yang ada dan membentuk buih (Suleman dkk., 2022). Sebagai senyawa antikanker saponin berperan dengan menghambat pembentukan Bcl-2 yang diekspresikan berlebih, menginduksi produksi protein *caspase-3*,

meningkatkan ekspresi sel p53, serta dapat memicu G1 *cell cycle arrest* (Marwati dkk., 2020). Reaksi terbentuknya saponin dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4. 6 Reaksi Uji Saponin (Suleman dkk., 2022)

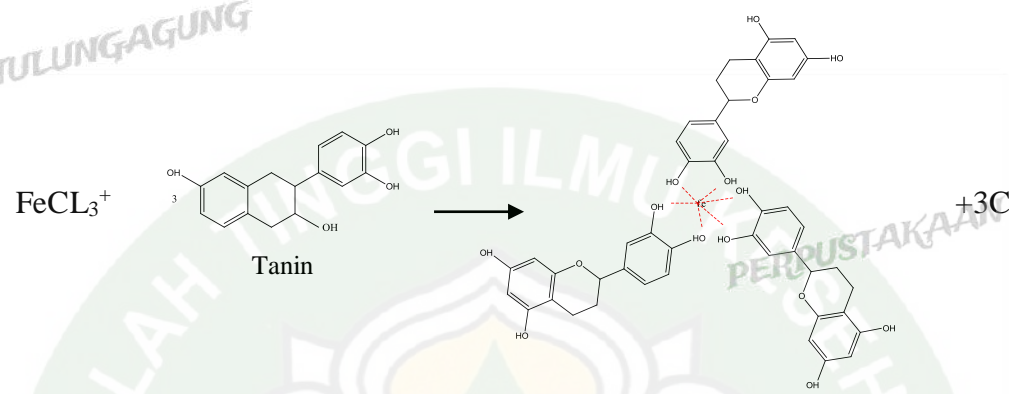


Gambar 4. 7 Hasil Uji Saponin. (A) Sebelum Perlakuan, (B) Sesudah Perlakuan

4.5.4 Uji Tanin

Pengujian senyawa Tanin dilakukan dengan menambahkan 0,5 gram sampel dengan 20 ml aquades kemudian dipanaskan. Hasil positif mengandung senyawa tanin dibuktikan dengan terbentuknya warna hijau kecoklatan. Senyawa tanin, merupakan senyawa yang memiliki sifat polar karena memiliki gugus OH, sehingga ketika sampel ditambah dengan FeCl_3 akan terjadi perubahan warna menjadi hijau kecoklatan. Perubahan warna terjadi diduga karena adanya reaksi antara ion Fe dengan ekstrak, reaksi tersebut akan menghasilkan suatu senyawa kompleks yang menyebabkan perubahan warna (Sulistyarini dkk., 2019). Tanin, memiliki manfaat

sebagai antikanker dengan mekanisme kerja yang sama dengan senyawa flavonoid, yaitu dengan menginhibisi aktivitas protein kinase, sehingga transduksi sinyal dari membran sel ke intisel terhambat (Marwati dkk., 2020). Reaksi terbentuknya Tanin dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4. 8 Reaksi Uji Tanin (Sulistyarini dkk., 2019)



(A) (B)

Gambar 4. 9 Hasil Uji Tanin. (A) Sebelum Perlakuan, (B) Sesudah Perlakuan

4.6 Uji Kandungan Senyawa Infusa Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dengan LC-MS

LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) merupakan suatu teknik analisis dengan akuransi tinggi yang dapat digunakan untuk analisa kuantitatif maupun struktural, yang memberikan informasi untuk mengidentifikasi suatu metabolit. LC-MS memberikan informasi terkait berat molekul, struktur molekul, identitas serta kuantitas dari suatu molekul yang terkandung dalam suatu sampel

tanaman. Selain itu, LC-MS dapat menganalisis berbagai komponen termasuk senyawa termolabil, bermassa molekul tinggi, dan memiliki tingkat kepolaran tinggi (Mangurana dkk., 2019).

LC-MS menggabungkan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifitas deteksi spektrometri massa. Komponen-komponen dalam sampel dipisahkan oleh kromatografi cair, kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometer massa. Cara kerja LC-MS adalah dengan meneruskan komponen elusi ke dalam spektrometer massa dengan jalur antar muka, analit-analit akan dipisahkan berdasarkan kepolarannya, kecepatan analit untuk sampai ke detektor akan berbeda. Hal ini akan terlihat pada spektrum dengan peak yang terpisah (Mangurana dkk., 2019).

Fase gerak cair dialirkan melalui kolom menuju detektor melalui pompa, kemudian cuplikan disuntikkan kedalam aliran fase gerak. Pemisahan komponen terjadi di dalam kolom akibat perbedaan kekuatan interaksi antara fase diam dengan larutan. Larutan yang memiliki interaksi lemah dengan fase diam akan keluar terlebih dahulu dari kolom, sedangkan larutan yang memiliki interaksi yang kuat dengan fase diam akan keluar setelahnya dan akan langsung dideteksi oleh detektor yang kemudian direkam dalam bentuk kromatogram (Mangurana dkk., 2019).

Analisa LC-MS senyawa infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) dilakukan di Universitas Muhammadiyah Malang. Hasil dari analisis LC-MS diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) sebanyak 94 senyawa dengan 3 senyawa yang memiliki konsentrasi tertinggi yang dapat diamati pada Lampiran 6. Berdasarkan Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa senyawa dengan jumlah komposisi tertinggi dari ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) sebanyak 3 senyawa antara lain, *acacetin7-rutinoside* (Gambar 4.10) sebesar 2,94521% yang muncul pada waktu retensi menit ke-33,702, *Kaempferol 3[6''-(3-hydroxy-3methylglutaryl)glucoside]* (Gambar 4.11) sebesar 2,96860% yang muncul pada waktu retensi menit ke-33,729, dan senyawa *narirutin 4'-glucoside* (Gambar 4.12) sebesar 2,93385% yang muncul pada waktu retensi menit ke-46,301. Waktu retensi merupakan lamanya waktu analisis sampel, dimana pada fase terbalik zat yang lebih polar akan terelusi lebih

dulu, dan memiliki waktu retensi yang lebih cepat dibandingkan zat non polar (Mangurana dkk., 2019).

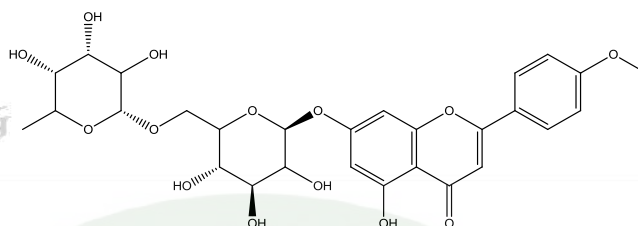
Senyawa *acacetin7-rutinoside*, *Kaempferol3[6''-(3-hydroxy-3methylglutaryl) glucoside]* dan senyawa *narirutin 4'-glucoside* yang teridentifikasi tersebut termasuk dalam golongan flavonoid. Senyawa Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan. Antioksidan sangat berperan sebagai antikanker, dimana memiliki mekanisme kerja dengan menangkal radikal bebas yang dapat memicu kanker.

Tabel 4.3 Kandungan Senyawa dengan Konsentrasi Tertinggi Infusa Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yang Diidentifikasi dengan LC-MS

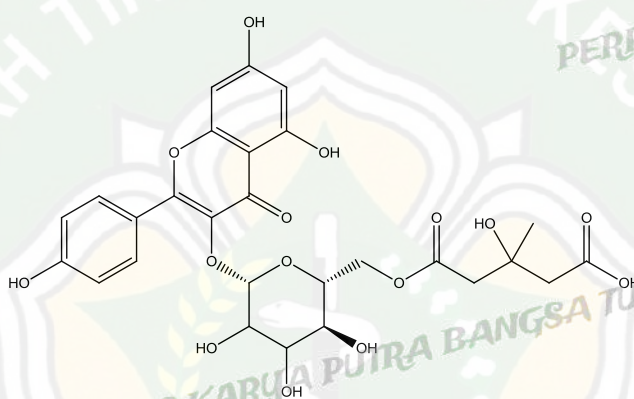
No. peak	Nama Senyawa	Waktu retensi (menit)	Komposisi (%)	Analisis komponen
83	<i>Acacetin 7-rutinoside</i>	33,702	2,94521	Rumus kimia : $C_{28}H_{32}O_{14}$ BM : 592,5500 m/z : 592.1792 (100%)
85	<i>Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]</i>	33,729	2,96860	Rumus Kimia: $C_{27}H_{28}O_{15}$ BM : 592,5060 m/z : 592.1428(100%)
93	<i>Narirutin 4'-glicoside</i>	46,301	2,93385	Rumus Kimia : $C_{33}H_{42}O_{19}$ BM : 742,6800 m/z : 742.2320 (100.0)

Acacetin7-rutinoside (linarin) diketahui memiliki manfaat sebagai antikanker, yaitu dapat menginduksi proses apoptosis yang terjadi pada sel *line* kanker prostat manusia LNCaP serta DU145. *Kaempferol 3[6''-(3-hydroxy-3methylglutaryl)glucoside]* merupakan turunan dari senyawa *kaemferol* yang mengalami proses glikosilasi. Golongan *kaemferol* beserta turunannya yang mengalami glikosilasi memiliki kemampuan sebagai antikanker seperti, menghambat proses ploriferasi pada *hepatocarsinoma*, menghambat pertumbuhan dari sel kanker payudara, dapat memicu sel untuk berapoptosis pada kanker darah, serta dapat menghambat metastasis dan pertumbuhan sel *glioblastoma* pada kanker

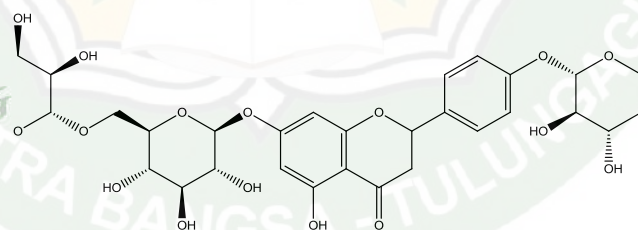
otak. *Narirutin 4'-glucoside* mampu menghambat proses proliferasi sel *line* leukemia HL-60 (Fatimah dkk., 2020).



Gambar 4. 10 Struktur *Acacetin 7-Rutinoside* (ChemDraw, 2023)



Gambar 4. 11 Struktur *Kaempferol 3[6''-(3-hydroxy-3methylglutaryl) glucoside]* (ChemDraw, 2023)



Gambar 4. 12 Struktur *Narirutin 4'-glucoside* (ChemDraw, 2023)

4.7 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Uji

Dalam penelitian ini, dibuat 10 konsentrasi ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yaitu, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, 1000 ppm, dan kontrol negatif. Masing-masing konsentrasi dilakukan 3 kali replikasi. Dalam pembuatan serial konsentrasi tersebut diawali dengan pembuatan larutan induk 1000 ppm sebanyak 300 ml. Larutan

induk dibuat dengan menimbang 100mg ekstrak kental daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) yang kemudian dilarutkan dengan 2 ml DMSO 2% dan di add kan dengan aquadest hingga 100 ml pada labu alas bulat. Perlakuan tersebut dilakukan hingga 3 kali replikasi, hingga di dapat larutan induk 1000 ppm sebanyak 300 ml.

4.8 Skrining Potensi Anti Kanker dengan Metode BSLT

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan suatu uji pendahuluan suatu senyawa yang bermanfaat untuk mendeteksi keberadaan suatu senyawa toksik, dengan menentukan nilai LC_{50} dari suatu senyawa aktif (Jelita dkk., 2020). Hewan uji yang digunakan pada metode BSLT adalah larva udang *Artemia Salina* Leach. Larva udang *Artemia Salina* Leach memiliki karakteristik kulit yang tipis, serta memiliki kepekaan terhadap lingkungannya, larva tersebut akan mati apabila terkena zat toksik, hal inilah yang menyebabkan larva udang *Artemia Salina* Leach banyak digunakan dalam uji toksisitas (Jelita dkk., 2020). Selain itu, alasan digunakan larva udang *Artemia Salina* Leach dalam metode BSLT dikarenakan larva udang *Artemia Salina* Leach mampu merespon suatu senyawa kimia yang mirip dengan respon mamalia yaitu DNA dependent RNA Polymerase, serta larva udang *Artemia Salina* Leach memiliki sistem transport Na^+ dan K^+ dependent ATPase (Mayang & Santoso, 2020). Prinsip dari uji toksisitas menggunakan metode BSLT adalah mengamati dan menghitung persentase kematian larva udang *Artemia Salina* Leach dalam jangka waktu 24 jam (Mayang & Santoso, 2020).

4.8.1 Pembuatan Air Laut Buatan

Larva udang *Artemia Salina* Leach ditetaskan dalam media air laut buatan. *Artemia Salina* Leach mempunyai kelenjar garam didalam tubuhnya yang berguna untuk menyesuaikan diri dengan suasana garam di lingkungan hidupnya. Dalam pembuatan air laut buatan, dibutuhkan 1 liter air dan 35 gram garam tidak beryodium. Air laut buatan dimaserasi selama 2 jam dengan tujuan supaya air laut buatan memiliki kandungan oksigen yang cukup jenuh (90%), agar proses penetasan larva udang *Artemia Salina* Leach sempurna. Selain kadar oksigen yang baik, nilai pH air yang optimal untuk penetasan larva berkisar antara 5-8. Bila dibutuhkan, pH diatur dengan penambahan NaOH atau Na_2CO_3 untuk menghindari kematian larva akibat penurunan pH (Hamidi dkk., 2014).

4.8.2 Penetasan Telur *Artemia Salina* Leach

Penetasan telur *Artemia Salina* Leach dilakukan dalam aquarium kecil, dengan menggunakan media air laut buatan. Wadah penetasan dilengkapi dengan aerator sebagai suplay oksigen. Telur *Artemia Salina* Leach dimasukkan dalam media penetasan sebanyak satu sendok teh. Diberi 1 tetes suspensi ragi sebagai makanan larva. Penetasan dilakukan di bawah penerangan cahaya untuk menjaga suhu lingkungan penetasan agar stabil pada suhu 20°-30°C. Telur *Artemia Salina* Leach dibiarkan terendam dalam waktu 48 jam. Pada usia 24 jam, telur *Artemia Salina* Leach akan menetas. Larva yang telah menetas akan aktif bergerak dan melepaskan diri dari cangkangnya. Larva *Artemia Salina* Leach yang digunakan sebagai hewan uji adalah larva yang telah berusia 48 jam. Hal ini dikarenakan organ-organ larva *Artemia Salina* Leach telah terbentuk sempurna, sehingga data kematian larva *Artemia Salina* Leach benar-benar disebabkan oleh ekstrak daun majapahit (Suhaimi dkk., 2019).

4.9 Uji Toksisitas Terhadap (*Artemia Salina* Leach) dengan Metode BSLT

Uji toksisitas adalah uji yang digunakan untuk mengetahui aktivitas farmakologi suatu senyawa yang bersifat toksik pada waktu yang singkat, setelah pemberian dosis. Pada penelitian ini digunakan ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) sebagai sampel dan larva *Artemia Salina* Leach sebagai hewan uji pada uji toksisitas dengan metode BSLT. Uji toksisitas dilakukan dengan berbagai serial konsentrasi yaitu, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, 1000 ppm, dan kontrol negatif. Perhitungan pembuatan serial konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 3. Pengujian sampel dilakukan dengan memasukkan larva *Artemia Salina* Leach sebanyak 10 ekor di masing masing vial dengan kapasitas volume 10 ml dan ditambahkan sampel. Apabila banyaknya ekstrak tidak memenuhi volume vial 10 ml, maka ditambah dengan air laut buatan add 10 ml. Tiap-tiap serial konsentrasi dilakukan 3 kali replikasi dengan tujuan memperoleh keakuratan data dan meminimalisir kesalahan dalam penelitian. Jumlah total larva *Artemia Salina* Leach yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 300 ekor yang dimasukkan dalam 30 vial. Setelah 24 jam perlakuan, larva udang diamati menggunakan bantuan kaca pembesar. Pengamatan kematian larva dilihat dari pergerakan larva selama beberapa detik,

dan larva yang mati akan mengendap di dasar vial. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang (*Artemia Salina* Leach)

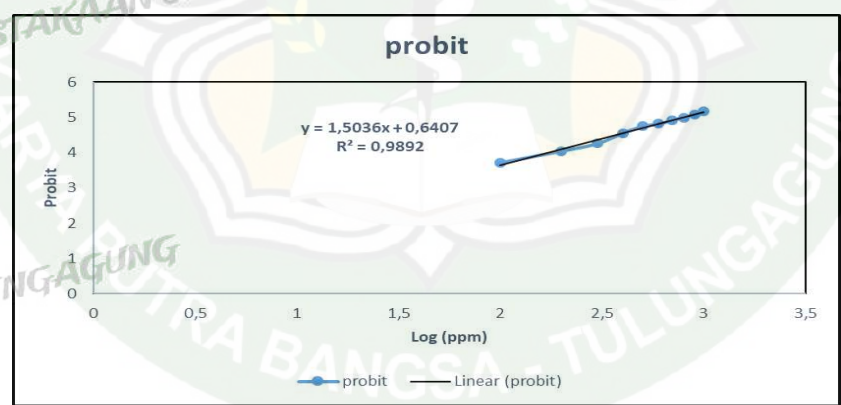
Konsentrasi	R ₁	R ₂	R ₃	Total kematian	Rata-rata kematian	% Kematian
100 ppm	1	0	2	3	0,1	10
200 ppm	2	2	1	5	0,1667	16,7
300 ppm	2	3	2	7	0,2333	23,3
400 ppm	2	4	4	10	0,3333	33,3
500 ppm	5	4	3	12	0,4	40
600 ppm	4	5	4	13	0,4333	43,3
700 ppm	6	4	4	14	0,4667	46,7
800 ppm	5	5	5	15	0,5	50
900 ppm	6	5	5	16	0,5333	53,3
1000 ppm	7	5	5	17	0,5667	56,7
K(-)	0	0	0	0	0	0

Berdasarkan data pada Tabel 4.4 dapat diketahui bahwa kematian larva semakin besar dengan tingginya konsentrasi pada ekstrak.

Tabel 4.5 Data Pengamatan Kematian Larva Udang Menggunakan Analisa Probit

Konsentrasi	Log 10	Probit	% Dead	Mortality	Total hewan uji
100 ppm	2	3,72	10	3	30
200 ppm	2,301	4,05	17	5	30
300 ppm	2,477	4,26	23	7	30
400 ppm	2,602	4,56	33	10	30
500 ppm	2,698	4,75	40	12	30
600 ppm	2,778	4,82	43	13	30
700 ppm	2,845	4,92	47	14	30
800 ppm	2,903	5,00	50	15	30
900 ppm	2,954	5,08	53	16	30
1000 ppm	3	5,18	57	17	30

Berdasarkan Tabel 4.5 dapat dilakukan proses perhitungan nilai LC₅₀. Untuk menghitung nilai LC₅₀ dapat menggunakan *microsoft office excel*. Berdasarkan data log konsentrasi dan data probit kematian larva udang dapat ditentukan grafik hubungan antara keduanya dan dapat digunakan untuk mencari regresi linier berdasarkan grafik yang didapatkan. Hasil dari grafik (Gambar 4.5) didapatkan persamaan $y = mx + b$ beserta nilai *R square* (R^2). Berdasarkan grafik pada (Gambar 4.5) nilai R^2 adalah sebesar 0,9892 yang berarti bahwa pengaruh log konsentrasi dengan probit kematian larva adalah sebesar 98,92%. Pada grafik tersebut juga didapatkan persamaan $y = 1,5036x + 0,6407$. Persamaan tersebut dapat digunakan untuk menentukan nilai LC₅₀, dengan memasukkan $y = 5$ ke dalam persamaan tersebut, sehingga didapatkan $5 = 1,5036x + 0,6407$. Dari hasil perhitungan tersebut didapatkan nilai x sebesar 2,8992, sehingga nilai *antilog x* adalah 792,8664 ppm. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) untuk dapat membunuh 50% dari populasi sampel larva udang (*Artemia Salina Leach*) adalah sebesar 792, 8664 ppm.



Gambar 4. 13 Grafik Hubungan Antara Log Konsentrasi dan Probit Kematian Larva

Berdasarkan perhitungan nilai LC₅₀ yang didapat, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) memiliki sifat toksik karena nilai LC₅₀ yang dimiliki <1000 ppm. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Sumihe dkk., 2014) yang menyatakan bahwa senyawa dengan nilai LC₅₀ ≤ 30 ppm memiliki sifat yang sangat toksik, senyawa dengan nilai LC₅₀ ≤ 1000 ppm memiliki sifat toksik, sedangkan senyawa dengan nilai LC₅₀ > 1000 ppm memiliki

sifat tidak toksik. Penelitian yang dilakukan oleh Fatimah dkk (2022) menyebutkan bahwa nilai LC_{50} dari ekstrak metanol daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) sebesar 642, 877 ppm. Hasil penelitian tersebut sangat berbeda dengan hasil penelitian yang didapatkan pada penelitian ini. Hal ini dapat dikarenakan dari perbedaan metode ekstraksi, dan pelarut yang digunakan, sehingga memungkinkan kandungan senyawa metabolit sekunder yang tersari dari daun majapahit berbeda.

Adanya sifat toksik ini dapat berkaitan dengan senyawa-senyawa yang terkandung pada ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yang telah diidentifikasi dengan LC-MS. Senyawa tersebut antara lain, *acacetin7-rutinoside* sebanyak 2,94521%, *Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]* sebanyak 2,96860%, dan *Narirutin 4'-glicoside* sebanyak 2,93385%, yang mana ketiga senyawa tersebut merupakan golongan senyawa flavonoid yang bersifat toksik terhadap larva udang dan, dapat berpotensi sebagai antikanker. Infusa daun majapahit, memberikan efek sebagai antikanker pada pembentukan kanker diproses promosi, dengan mekanisme kerja menghambat pembentukan masa kanker, agar tidak sampai pada tahap progresi dimana kanker dapat berproliferasi. Mekanisme kematian larva udang diduga dengan menghambat daya makan larva (*antifeedant*). Flavonoid bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut, dengan menghambat saluran pencernaan larva (Fatimah dkk., 2022). Flavonoid sebagai antikanker berperan sebagai antioksidan melalui jalur pengaktifan apoptosis sel kanker akibat fragmentasi DNA. Proses awal dari fragmentasi DNA adalah pelepasan rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif. Selain itu, flavonoid memiliki aktivitas dalam menghambat proliferasi sel kanker, dengan menginhibisi aktivitas protein kinase sehingga transduksi sinyal dari membran ke inti dihambat.

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 daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) menunjukkan bahwa mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin.
2. Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) dengan LC-MS menunjukkan hasil senyawa yang terkandung dalam ekstrak sebanyak 94 senyawa dengan 3 senyawa yang memiliki konsentrasi tertinggi yaitu, *acacetin7-rutinoside* sebanyak 2,94521%, *Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]* sebanyak 2,96860%, dan *Narirutin 4'-glicoside* sebanyak 2,93385%. Diketahui ketiga senyawa tersebut termasuk dalam golongan senyawa flavonoid.
3. Uji toksisitas ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) terhadap larva udang (*Artemia Salina* Leach) berpotensi sebagai antikanker dengan perolehan nilai uji toksisitas yaitu $LC_{50} \leq 1000$ ppm, yaitu sebesar 792,8664 ppm.

5.2 Saran

1. Pada uji toksisitas ekstrak infusa daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) terhadap larva udang (*Artemia Salina* Leach) menunjukkan adanya potensi sebagai antikanker, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar perolehan nilai LC_{50} meningkat dan bersifat sangat toksik, sehingga lebih adekuat sebagai antikanker.
2. Pada proses perajangan daun majapahit (*Crescentia Cujete* L.) ukuran perajangan, perlu disesuaikan dengan standar perajangan pada daun, yaitu dengan dipotong melintang dengan lebar daun ± 2 cm, sehingga diharapkan semakin banyak senyawa metabolit sekunder yang didapatkan dan meningkatkan nilai % rendemen.

3. Pada proses penyimpanan telur larva *Artemia Salina* Leach perlu disimpan pada suhu ruang, karena perbedaan suhu penyimpanan akan berpengaruh pada keberhasilan penetasan larva.
4. Dokumentasi berlatar belakang hitam/putih dengan terfokus pada objek penelitian



DAFTAR PUSTAKA

- Adejoke, H. T., Louis, H., Amusan, O. O., & Apebende, G. (2019). A Review on Classes, Extraction, Purification and Pharmaceutical Importance of Plants Alkaloid. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences Original Article J. Med. Chem. Sci*, 2019(2), 130–139. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12867.96809>
- Agustina, E., Andiarna, F., Lusiana, N., Purnamasari, R., & Hadi, M. I. (2018). Identifikasi senyawa aktif dari ekstrak daun jambu air (*Syzygium aqueum*) dengan perbandingan beberapa pelarut pada metode maserasi. *Biotropic : The Journal of Tropical Biology*, 2(2), 108–118. <https://doi.org/10.29080/biotropic.2018.2.2.108-118>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4(December 2020), 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Andini, A., Prayekti, E., Triasmoro, F., & Kamaliyah, nur endah. (2021). Pengaruh penggunaan jenis pelarut dalam uji sitotoksitas metode brine shrimp lethality test (BSLT) pada wound dressing kolagen-kitosan. *Al-Kimiya*, 8(1), 15–20. <https://doi.org/10.15575/ak.v8i1.10277>
- Aqiila, G. R., Taufiqurrahman, I., & Wydiamala, E. (2017). uji efektivitas ekstrak etanol daun ramania (*Bouea macrophylla* Griffith) terhadap mortalitas larva *Artemia salina* leach. *Jurnal Kedokteran Gigi Dentino*, 2(2), 170–176.
- Arcanjo, D., Albuquerque, A., Melo-Neto, B., Santana, L., Medeiros, M., & Citó, A. (2012). Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology*, 72(3), 505–509. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000300013>
- Arel, A., Wardi, E. S., & Oktaviani, Y. (2018). Profil metabolit sekunder ekstrak daun berenuk (*Crescentia Cujete* L.) dan uji sitotoksik dengan metode Brine Shrimp Lethality Test. *Jurnal Katalisator*, 3(2), 82. <https://doi.org/10.22216/jk.v3i2.3165>
- Atmodjo, K. (2019). Keragaman dan pemanfaatan tumbuhan Berenuk (*Crescentia cujete* L) di daerah istimewa Yogyakarta. *Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 4(3), 116–123. <https://doi.org/10.24002/biota.v4i3.2518>
- Azizah, Z., Elvis, F., Zulharmita, Misfadhila, S., Chandra, B., & Yetti, R. D. (2020). Penetapan kadar flavonoid rutin pada daun ubi kayu (*Manihot Esculenta* Crantz) secara spektrofotometri sinar tampak. *Jurnal Farmasi Higea*, 12(1), 90–98.
- Badaring, D. R., Sari, S. P. M., Nurhabiba, S., Wulan, W., & Lembang, S. A. R. (2020). Uji Ekstrak Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Indonesian Journal of Fundamental Sciences*, 6(1), 16. <https://doi.org/10.26858/ijfs.v6i1.13941>
- Balogun, F. O., & Sabiu, S. (2021). A review of the phytochemistry, ethnobotany, toxicology, and pharmacological potentials of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2021/6683708>

- Das, N., Islam, M. E., Jahan, N., Islam, M. S. islam., Khan, A., Islam, M. R., & Parvin, M. S. (2014). Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(45), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-45>
- Dewi, N. R. K., Kuncoro, H., & Rijai, L. (2015). Potensi sitotoksik ekstrak air daun sirih hitam (*Piper sp.*). *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, *1*(1), 11–15. <https://doi.org/10.25026/jsk.v1i1.9>
- Diniatik, D. (2015). penentuan kadar flavonoid total ekstrak etanolik daun kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th.) dengan metode spektrofotometri. *Kartika-Jurnal Ilmiah Farmasi*, *3*(1), 1–5.
- Ditasari, I., & Arinda, D. F. (2022). Pengetahuan Gizi dan Persepsi terhadap Perilaku Konsumsi Makanan Pemicu Kanker. *Jurnal Ilmiah Kesehatan (JIKA)*, *4*(1), 38–46. <https://doi.org/10.36590/jika.v4i1.214>
- Fardilla, I., & Hidajati, N. (2018). Isolasi senyawa metabolit ekunder dari ekstrak N-Heksana daun tumbuhan majapahit (*Crescentia Cujete*) isolation of secondary metabolites from N-Hexane extract of majapahit leaf (*Crescentia Cujete*). *Unesa Journal of Chemistry*, *7*(1), 34–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.26740/ujc.v7n1.p%25p>
- Fatimah, F., Martha, R. D., & Danar, D. (2022). Analisis toksisitas dan potensi antikanker ekstrak metanol daun Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan metode Brine Shrimp Lethality Test. *SAINTEK*, *27*(1), 24–30. <https://journal.uny.ac.id/index.php/saintek>
- Fatimah, F., Martha, R. D., & Kusumawati, A. (2020). Deteksi dan identifikasi senyawa flavonoid ekstrak etanol kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS. *CHEESA: Chemical Engineering Research Articles*, *3*(2), 88. <https://doi.org/10.25273/cheesa.v3i2.7688.88-98>
- Febriani, A., & Furqon, A. (2018). Metastasis kanker paru. *Jurnal Respirasi*, *4*(3), 94. <https://doi.org/10.20473/jr.v4-i.3.2018.94-101>
- Firyanto, R., Mulyaningsih, M. S., & Leviana, W. (2019). Pengambilan polifenol dari teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan cara ekstraksi menggunakan aquadest sebagai pelarut. *Prosiding Seminar Nasional Sains Dan Teknologi*, *1*(1), 10–13.
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., & panovska, tatjana K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, *60*(01), 9–18. <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>
- Hidayah, N. (2016). Pemanfaatan Senyawa Metabolit Sekunder Tanaman (Tanin dan Saponin) dalam mengurangi emisi metan ternak ruminansia. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, *11*(2), 89–98.
- Hidjrawan, Y. (2018). Identifikasi senyawa tanin pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurusan Teknik Industri*, *4*(2), 78–82.
- Honculada, M. O., & Mabasa, M. T. (2016). Antimicrobial Activity of *Crescentia cujete*. *Asian Journal of Health*, *6*, 80–86. <https://asianscientificjournals.com/new/publication/index.php/ajoh/search/advancedResults>

- Humairah, A., Yuniarti, yuniarti, & Thamrin, G. A. R. (2022). *identifikasi senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan belaran tapah (Merremia peltata)*. 05(1), 86–91.
- Jelita, S. F., Setyowati, G. W., Ferdinand, M., Zuhrotun, A., & Megantara, S. (2020). Uji Toksisitas Infusa Acalypha Simensis Dengan Metode Brine Shrip Lethality Test (BSLT). *Jurnal Farmaka*, 18(1), 14–22.
- Jose, J. C., Oyong, G., Ajero, M. D., Chiong, I., Cabrera, E., & Tan, M. C. S. (2020). Insights on the chemical constituents and hydrothermal carbonization of crescentia kujete l. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 24(1), 134–145.
- Kristanti, Y., Widarta, I. W. R., & Permana, I. D. G. M. (2019). Pengaruh waktu ekstraksi etanol menggunakan metode Microwave Assited Exstrak rambut jagung(Zea mays L.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 8(1), 94–103. <https://doi.org/10.24843/itepa.2019.v08.i01.p11>
- Kumalasari, M. L. F., & Andiarna, F. (2020). Uji fitokimi ekstrak etanol daun kemangi (Ocimum basilicum L.). *Indonesian Journal for Health Sciences*, 4(1), 39–44. <https://doi.org/10.24269/ijhs.v4i1.2279>
- Kusuma, A. M., Susanti, S., & Akbariani, G. (2014). Potensi sitotoksik ekstrak etanol daun berenuk (Crescentia kujete L.) terhadap sel kanker. *FARMASAINS*, 2(4), 191–195.
- Loncaric, A., Lamas, J., P., Guerra, E., & Lores, M. (2017). Increasing water solubility of Quercetin by increasing the temperature. *15th INSTRUMENTAL ANALYSIS CONFERENCE- Book of Abstracts*, 14, 89. <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Increasing+water+solubility+of+Quercetin+by+increasing+the+temperature>
- Luna, sara luisa rodríguez de, Ramírez-Garza, R. E., & Serna Saldívar, S. O. (2020). Environmentally friendly methods for Flavonoid Extraction from plant material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. *Scientific World Journal*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6792069>
- Madhukar, V. K., Srivastava, S. K., & Dubey, N. K. (2013). Revision of genus Crescentia L. (Bignoniaceae) in India. *American Journal of Plant Sciences*, 4(June), 1164–1168.
- Maharani, E. S., Puspitawati, R., & Gunawan, H. A. (2018). Antibacterial effect of binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) leaf infusion against black pigmented bacteria. *Journal of Physics: Conference Series*, 1073(3), 1–7. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1073/3/032013>
- Makiyah, A., & Tresnayanti, S. (2017). Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD50 Ekstrak Etanol Umbi Iles-iles (Amorphophallus variabilis Bl.) pada Tikus Putih Strain Wistar. *Majalah Kedokteran Bandung*, 49(3), 145–155. <https://doi.org/10.15395/mkb.v49n3.1130>
- Mangurana, W. O. I., Yusnaini, Y., & Sahidin, S. (2019). analisis LC-MS/MS (Liquid Chromatograph Mass Spectrometry) dan metabolit sekunder serta potensi antibakteri ekstrak n-heksana spons Callyspongia aerizusa yang diambil pada kondisi tutupan terumbu karang yang berbeda di perairan teluk stiring. *Jurnal Biologi Tropis*, 19(2), 131–141. <https://doi.org/10.29303/jbt.v19i2.1126>

- Marwati, M., Salampe, M., Burhan, A., Khairuddin, K., Naneng, A. A. al ma'aridj, & Oktaviani, N. (2020). Skrining Antioksidan dan Antikanker Ekstrak Etanol Daun Karamunting (*Rhonomyrtus Tomentosa L.*) Sebagai Obat Alternatif. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 6(2), 240–245.
- Mayang, A., & Santoso, bilal sa. (2020). Uji toksisitas akut infusa daun sirsak (*annona muricata*) pada larva artemia salina menggunakan metode brine shrimp lethality test. *Pharmacy Medical Journal*, 3(1), 23–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.35799/pmj.3.1.2020.28960>
- Morihiro, R. V. S. ., Chungdinata, S. E., Nazareth, T. A., Pulukadang, M. I., Makalew, R. A. ., & Pinontoan, B. (2017). Identifikasi perubahan struktur Dna terhadap pembentukan sel Kanker menggunakan Dekomposisi Graf. *Jurnal Ilmiah Sains*, 17(2), 153. <https://doi.org/10.35799/jis.17.2.2017.17368>
- 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), 115–118. <https://doi.org/10.35799/jm.2.2.2013.3000>
- Nasution, S. (2017). Variabel penelitian. *Raudhah*, 05(02), 1–9. <http://jurnaltarbiyah.uinsu.ac.id/index.php/raudhah/article/view/182>
- Oktavia, S. nur, Wahyuningsih, E., Andasari, S. deti, & Normaidah, N. (2020). Skrining fitokimia dari infusa dan ekstrak etanol 70% daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*). *Jurnal Ilmu Farmasi*, 11(1), 1–6.
- Popper, H. H. (2016). Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(1), 75–91. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9618-0>
- Prayoga, D. G. E., Nocianitri, K. A., & Puspawati, N. N. (2019). Identifikasi senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak kasar daun pepe. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 8(2), 111. <https://doi.org/10.24843/itepa.2019.v08.i02.p01>
- Rachmawati, A. S. (2020). Prevalensi kanker di rumah sakit jasa Kartini kota tasikmalaya Tahun 2018. *Jurnal Kesehatan Komunitas Indonesia*, 16(1), 119–126.
- Rahmiati, N. I., Jamaluddin, A. W., & Ramadhan, B. (2018). Aktivitas Infusa Daun Jambu Biji (*Psidium Guajava L.*) Terhadap Nematoda *Haemonchus Sp.* Dari Sapi Bali (*Bos Sondaicus*) Secara in Vitro. *Jurnal Agrisistem*, 14(1), 27–36.
- Rinawati, R., Gustami Pangesti, G., & Gede Ratna Juliasih, N. L. (2020). Review: green analytical chemistry: pemanfaatan supercritical fluid extraction (Sfe) dan microwave-assisted extraction (Mae) Sebagai metode ekstraksi senyawa diterpena pada minyak biji kopi shangrai. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 5(1), 24–33. <https://doi.org/10.23960/aec.v5.i1.2020.p24-33>
- Rizkita, A. D., Dewi, S. A., Wibowo, E. A. P., & Maulana, I. (2021). Isolasi dan Identifikasi Saponin dari Ekstrak Leunca (*Solanum ningrum L*) Secara Spektrofotometri Infra Merah. *Jurnal Ilmiah Sains*, 21(2), 166–169. <https://doi.org/10.35799/jis.v21i2.34635>

- Rudiana, T., Suryani, N., & Anwar, H. (2021). Aktivitas antioksidan dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak batang dahu (Dracontomelon dao). *JC-T (Journal Cis-Trans): Jurnal Kimia Dan Terapannya*, 5(1), 8–12. <https://doi.org/10.17977/um0260v5i12021p008>
- Saibaba, S. ., Kumar, M. S., & Pandiyan, P. shanmug. (2016). Mini review on Lc / Ms techniques. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 2381–2395. <https://doi.org/10.20959/wjpps20164-6581>
- Santosa, H., Sari, W., & Handayani, N. A. (2018). Ekstraksi saponin dari daun waru berbantu ultrasonik suatu usaha untuk mendapatkan senyawa penghambat berkembangnya sel kanker. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 3(2), 12–26. <https://doi.org/10.31942/inteka.v3i2.2484>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Singh, A., & Zahra, K. (2017). Lc50 assessment of cypermethrin in Heteropneustes fossilis: Probit analysis. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(5), 126–130. www.fisheriesjournal.com
- Suhaimi, S., Fadli, F., & Idris, M. (2019). uji toksisitas akut ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) dengan metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). *Medical Sains : Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 4(1), 35–42. <https://doi.org/10.37874/ms.v4i1.121>
- Suleiman, B. (2019). Effects of fermentation on the nutritional status of *Crescentia cujete* L. seed and its potentiality as aqua feedstuff. *Animal Research International*, 16(1), 3207–3212. <https://bit.ly/3O5s3uj>
- Suleman, I. F., Sulistijowati, R., Manteu, S. H., & Nento, W. R. (2022). Identifikasi senyawa saponin dan antioksidan ekstrak daun lamun (*Thalassia hemprichii*). *Jambura Fish Processing Journal*, 4(2), 94–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.37905/jfpj.v4i2.15213>
- Sulistyarini, I., Sari, D. A., & Wicaksono, T. A. (2019). Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 56–62.
- Sumartini, sumartini, Ikrawan, Y., & Muntaha, fauzan miftah. (2020). Analisis bunga telang (*Clitoria ternatea*) dengan variasi Ph metode liquid chromatograph-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS). *Pasundan Food Technology Journal*, 7(2), 70–77. <https://doi.org/10.23969/pftj.v7i2.2983>
- Sumihe, G., Runtuwene, M. R. J., & Rorong, J. A. (2014). Analisis Fitokimia Dan Penentuan Nilai Lc50 Ekstrak Metanol Daun Liwas. *Jurnal Ilmiah Sains*, 14(2), 125–128. <https://doi.org/10.35799/jis.14.2.2014.6070>
- Susanti, ari diana, Ardiana, D., P, gita gumelar, & G, yosephin bening. (2012). Polaritas pelarut sebagai pertimbangan dalam pemilihan pelarut untuk ekstraksi minyak bekatul dari bekatul varietas ketan (*Oriza sativa glatinosa*). *Simposium Nasional RAPI XI FT UMS*, 8–14.
- Vifta, R. L., & Advistasari, Y. D. (2018). Skrining fitokimia, karakterisasi, dan enentuan Kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi-fraksi buah pariijoto (*Medinilla speciosa* B.). *Prosiding Seminar Nasional Unimus*, 1, 8–14.

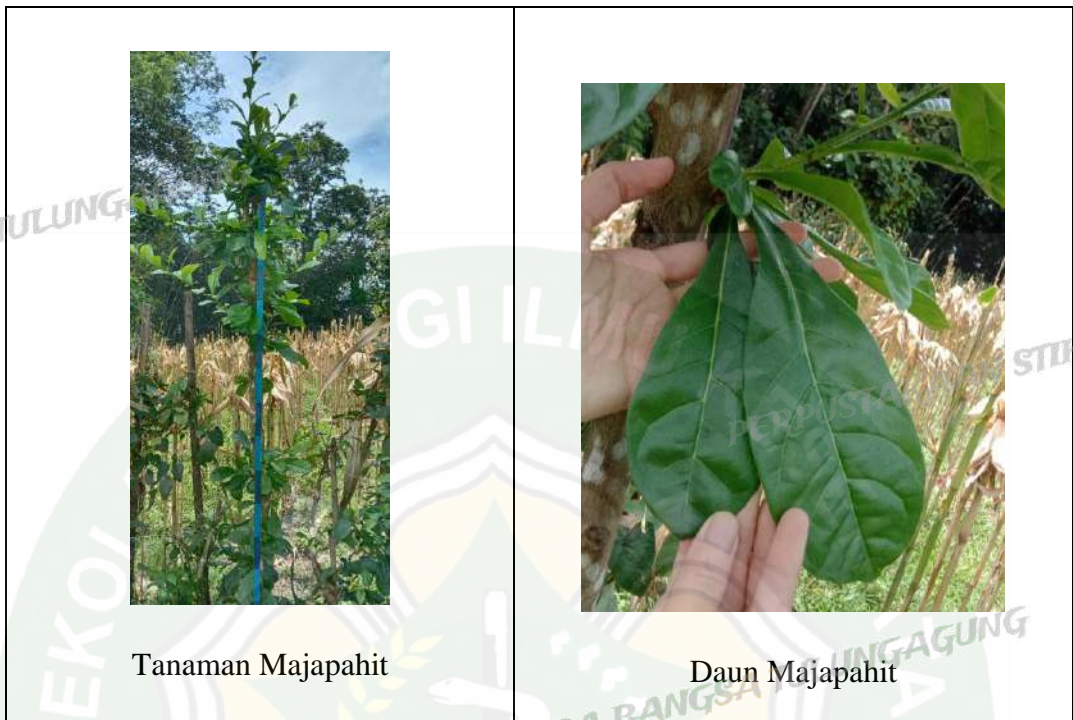
- Wahyusi, K. N., Irmawati, N. D., & Astari, R. Z. (2020). Koefisien perpindahan massa ekstraksi flavonoid dari buah pare dengan pelarut etanol. *Jurnal Teknik Kimia*, 14(2), 40–44. https://doi.org/10.33005/jurnal_tekkim.v14i2.2024
- Wardhani, R. A. P., & Supartono. (2015). Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah rambutan (*Nepheliumlappaceum* L.) pada bakteri. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 4(1), 46–51. <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs>
- Widiyastuti, Y., Marfuatush Sholikhah, I. Y., & Haryanti, S. (2019). Efek sitotoksik formula jamu daun sirsak, buah takokak, dan umbi bidara upas terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 9(2), 140–149. <https://doi.org/10.22435/jki.v9i2.1049>
- Widayani, M., Ulfa, M., & Wirasisya, dyke gita. (2019). Efek penghambatan radikal bebas infusa dan ekstrak etanol herba pegagan (*centella asiatica* L.Urb) dengan metode DPPH. 14(1), 100–106. <https://doi.org/10.29303/jpm.v14.i1.1006>
- Wijaya, H., Novitasari, & Jubaidah, S. (2018). Perbandingan metode ekstraksi terhadap rendemen ekstrak daun rambui laut (*Sonneratia caseolaris* L. Engl). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 4(1), 79–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.51352/jim.v4i1.148>
- Yunartono, Y., Purnamaningsih, H., Nururrozi, A., & Indarjulianto, S. (2017). Saponin : Dampak terhadap Ternak (Ulasan). *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, 6(2), 79–90. <https://doi.org/10.33230/jps.6.2.2017.5083>

Lampiran 1 Hasil Determinasi Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*)

	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/ 697/ 102.20-A/ 2022		
Sifat	: Biasa		
Perihal	: <u>Determinasi Tanaman Majapahit</u>		
Memenuhi permohonan saudara :			
Nama / NIM	: DENIATUL MASITOH / 1913206009 EGA NURGIA ADISYANINGRUM / 1913206014 ELEN VIKELAVIANIS / 1913206015		
Fakultas	: FARMASI, STIKES KARYA PUTRA BANGSA		
1. Perihal determinasi tanaman majapahit			
Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)		
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)		
Kelas	: Dicotyledonae		
Bangsa	: Scrophulariales		
Suku	: Bignoniaceae		
Marga	: Crescentia		
Jenis	: <i>Crescentia cujete L.</i>		
Nama Umum	: Majapahit, mojopahit, moja, maja, berenuk, berunuk (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: <i>C. cujete</i> .		
2. Morfologi : Habitus: Pohon, tinggi ±10 m. Batang: Berkayu, bulat, percabangan simpodial, beralur, putih kehitaman. Daun: Majemuk, menyirip, lonjong, tepi rata, ujung rneruncing, 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 crn, 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	: Daun dan kulit batang.		
4. Penggunaan	: Penelitian.		
5. Daftar Pustaka	<ul style="list-style-type: none"> • Van Steenis, CGGJ. 2008. <i>FLORA: untuk Sekolah di Indonesia</i>. Pradnya Paramita, Jakarta. 		
Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.			
Batu, 27 Oktober 2022			
 KEPALA UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU SCHMAD MABRUR, SKM, M.Kes PEMBINA NIP. 19680203 199203 1 004			

Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian

1. Tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete L.*)



2. Pembuatan Infusa Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*)





Pengeringan Daun Majapahit



Perajangan



Proses Infundasi selama 15 menit dengan suhu 90°C



Pemerasan



Ampas



Ekstrak Cair Infusa Daun Majapahit



Proses Pemekatan Menggunakan Evaporator



Ekstrak Pekat Infusa Daun Majapahit

3. Rendemen





Berat Ekstrak + Pot Salep



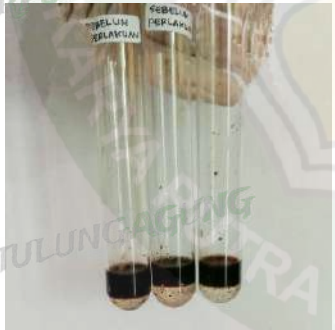



Berat Pot Salep

4. Skrining Fitokimia



A. Uji Flavonoid

Sebelum Perlakuan	Sesudah Perlakuan	Hasil
		Berwarna hitam (+ Flavonoid)



B. Uji Alkaloid

Sebelum Perlakuan	Sesudah Perlakuan	Hasil
	 <p>(+ pereaksi Mayer)</p>	Terbentuk Endapan Putih (+ Alkaloid)
	 <p>(+ perekasi Dragendorff)</p>	Terbentuk Endapan Jingga (+ Alkaloid)

C. Uji Saponin

Sebelum Perlakuan	Sesudah Perlakuan	Hasil
		Terbentuknya Busa (+ Saponin)

D. Uji Tanin

Sebelum Perlakuan	Sesudah Perlakuan	Hasil
		Terbentuk warna hijau kecoklatan (+ Tanin)

5. Uji Toksisitas

A. Pembuatan Seri Konsentrasi



B. Penetasan dan Pengujian Toksisitas



Lampiran 3 Orientasi Untuk Mendapatkan Seri Konsentrasi Ekstrak Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yang Akan Digunakan dalam Pengujian

1. Pembuatan larutan induk 1000 ppm

Larutan induk dibuat dengan menimbang 100 mg ekstrak pekat Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) yang kemudian dilarutkan dengan DMSO 2% dan ditambah air laut buatan add 100 ml.

2. Pembuatan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$
$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 1000 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 10 \text{ ml}$$

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 900 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$
$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 900 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 9 \text{ ml}$$

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 800 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$
$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 800 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 8 \text{ ml}$$

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 700 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$
$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 700 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 7 \text{ ml}$$

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 600 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$
$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 600 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 6 \text{ ml}$$

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 500 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

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

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 400 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 400 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

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

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 300 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 300 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

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

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 200 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 200 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

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

Pembuatan larutan dengan konsentrasi 100 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

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

Lampiran 4 Perhitungan Persen Kematian Larva Udang

$$\% \text{ kematian larva} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{total hewan uji}} \times 100$$

$$\text{a. Konsentrasi 100 ppm} = \frac{3}{30} \times 100\% = 10\%$$

$$\text{b. Konsentrasi 200 ppm} = \frac{5}{30} \times 100\% = 16,7\%$$

$$\text{c. Konsentrasi 300 ppm} = \frac{7}{30} \times 100\% = 23,3\%$$

$$\text{d. Konsentrasi 400 ppm} = \frac{10}{30} \times 100\% = 33,3\%$$

$$\text{e. Konsentrasi 500 ppm} = \frac{12}{30} \times 100\% = 40\%$$

f. Konsentrasi 600 ppm = $\frac{13}{30} \times 100\% = 43,3\%$

g. Konsentrasi 700 ppm = $\frac{14}{30} \times 100\% = 46,7\%$

h. Konsentrasi 800 ppm = $\frac{15}{30} \times 100\% = 50\%$

i. Konsentrasi 900 ppm = $\frac{16}{30} \times 100\% = 53,3\%$

j. Konsentrasi 1000 ppm = $\frac{17}{30} \times 100\% = 56,7\%$

Lampiran 5. Perhitungan Nilai LC50 dengan Menggunakan Analisa Probit

Terhadap Ekstrak Infusa Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*).

a. Perhitungan persamaan $y = mx + b$

$$y = mx + b$$

$$5 = 1,5036x + 0,6407$$

$$\frac{5 - 0,6407}{1,5036} = 2,8992$$

$$x = 2,8992$$

b. Perhitungan nilai LC₅₀

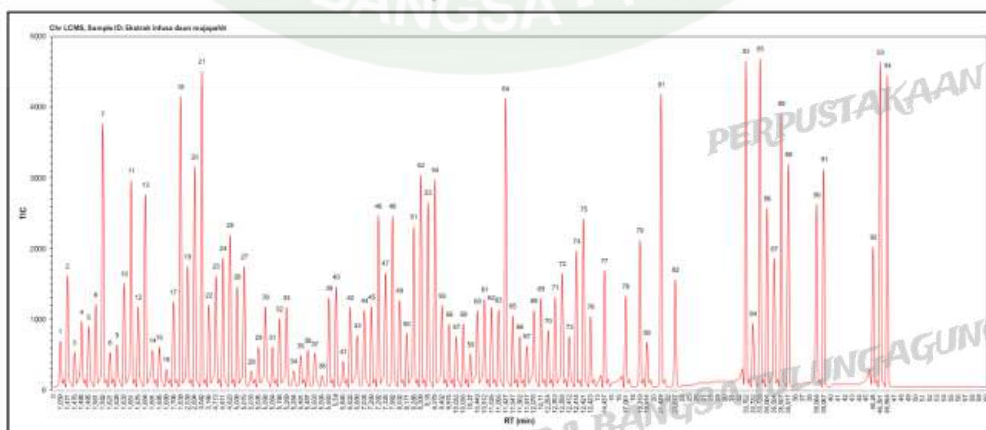
$$LC_{50} = \text{antilog}(x)$$

$$= \text{antilog}(2,8992)$$

$$= 792,8664 \text{ ppm.}$$

Lampiran 6 Hasil Kromatogram Analisa LC-MS Daun Majapahit

LCMS CHROMATOGRAM RESULT, SAMPLE ID: EKSTRAK INFUSA DAUN MAJAPAHIT



Lampiran 7 Alur Prosedur Kerja

a. Pembuatan Infusa

Daun Majapahit

- Diambil bagian daun majapahit
- Dilakukan sortasi basah terhadap daun majapahit
- Dilakukan pencucian dan penirisan daun majapahit
- Daun majapahit dirajang kecil-kecil
- Daun majapahit direbus dengan aquades selama 15 menit, dengan suhu 90°C
- Dilakukan penyaringan
- Ekstrak cair infusa daun majapahit dipekatkan dengan *rotarry evaporator*
- Perhitungan rendemen :

$$\% \text{rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (gram)}}{\text{bobot simplisia awal (gram)}} \times 100\%$$

Ekstrak Pekat

b. Uji Skrining Flavonoid

10 mg sampel

- Diencerkan dengan 5 ml etanol
- Ditambah beberapa tetes FeCl_3
- Adanya perubahan warna menjadi biru, ungu, hijau, merah, hitam maka, positif flavonoid

Hasil

c. Uji Skrining Alkaloid

2 gram sampel

- Sampel dilarutkan dengan 10 ml kloroform
- Ditambahkan dengan 5 ml kloroform-amoniak 0,05 M
- Filtrat yang terbentuk + asam sulfat 2 N, dikocok
- Di diamkan 2-3 menit sampai terbentuk 2 lapisan
- Lapisan atas diuji dengan pereaksi Mayer
- Lapisan bawah diuji dengan pereaksi Dragendorff
- Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer, maka positif alkaloid. Sedangkan, terbentuknya endapan jingga pada pereaksi Dragendorff, maka positif alkalod.

Hasil

d. Uji Skrining Saponin

0,5 gram sampel

- Dilarutkan dalam 5 ml aquades, dikocok kuat-kuat
- Terbentuknya busa yang stabil, maka positif saponin

Hasil

e. Uji Skrining Tanin

0,5 gram sampel

- Dilarutkan dalam 20 ml aquades, dan dipanaskan
- Filtrat disaring dan ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 0,1% sampai terjadi perubahan warna
- Perubahan warna menjadi hijau kecoklatan, maka positif tanin.

Hasil

f. Uji Toksisitas

Telur *Artemia Salina* Leach

- Pada aquarium kecil dimasukkan 1 L air dan 35 gram garam tidak beryodium, di aduk hingga homogen
- Aquarium dilengkapi dengan aerator dan ditaruh di bawah lampu
- Telur larva (*Artemia Salina* Leach) ditaburkan, dan ditambah dengan 1 ml suspensi ragi sebagai makanan larva
- Larva akan menetas pada usia 24 jam
- Larva yang dapat digunakan sebagai hewan uji adalah larva yang berusia 48 jam
- Larva dimasukkan pada flakon-flakon kelompok uji, tiap flakon berisi 10 larva, dan tiap konsentrasi dibuat 3x replikasi
- Ditambahkan larutan ekstrak, sesuai dengan konsentrasinya
- Uji toksisitas dilakukan selama 24 jam, dan diamati larva yang mati
- Menghitung LC₅₀

Hasil

Lampiran 8 Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Bulan										Lokasi	
		09	10	11	12	1	2	3	4	5	6		7
1.	Pengajuan Judul	✓											Di Kampus STIKes Karya Putra Bangsa
2.	Penyusunan Proposal		✓	✓	✓								Di Rumah
3.	Seminar Proposal					✓							Ruang Seminar Proposal STIKes Karya Putra Bangsa
4.	Persiapan penelitian				✓								Di Rumah
	a. Pengambilan Sampel					✓							Di Pekarangan Kantor Kelurahan Ds.Wates
	b. Determinasi Tanaman				✓								UPT Matera Medika Malang
	c. Pembuatan Infusa					✓							Laboratorium Botani STIKes Karya Putra Bangsa
	d. Pembuatan ekstrak Kental					✓							Universitas Brawijaya Malang
	e. Identifikasi Senyawa dengan LC-MS					✓							Universitas Muhammadiyah Malang
	f. Uji BSLT					✓							Laboratorium Mikrobiologi STIKes Karya Putra Bangsa
5.	Hasil Penelitian						✓	✓					Di Kampus STIKes Karya Putra Bangsa
6.	Penyusunan Draft Skripsi								✓	✓	✓		Di Rumah
7.	Seminar Hasil											✓	Ruang Seminar Skripsi STIKes Karya Putra Bangsa