

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA KULIT BATANG
TANAMAN MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN
LCMS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) DAN ANALISIS
TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach**

SKRIPSI



Oleh:

ELEN VIKELAVIANIS

1913206015

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA
TULUNGAGUNG
JULI 2023**

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA KULIT BATANG
TANAMAN MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN
LCMS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) DAN ANALISIS
TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach**

SKRIPSI

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

Program Studi S1 Farmasi

STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung



Oleh:

ELEN VIKELAVIANIS

1913206015

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

STIKES KARYA PUTRA BANGSA

TULUNGAGUNG

JULI 2023

PERPUSTAKAAN STIKES KARYA PUTRA BANGSA TULUNGAGUNG

**LEMBAR PERSETUJUAN
SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA KULIT BATANG
TANAMAN MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN
LCMS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) DAN ANALISIS
TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach**

Yang diajukan oleh :

ELEN VIKELAVIANIS

1913206015

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Rahma Diyan Martha S.Si, M.Sc

NIDN. 07.10.02.91.01



apt. Arif Santoso M.Farm

NIDN. 07.28.11.86.04

PENYATAAN

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

Tulungagung, 13 Juni 2023

Penulis,

Elen Vikelavianis

Identifikasi Senyawa Infusa Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) Dengan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) Dan Analisis Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach

Elen Vikelavianis
Prodi S1 Farmasi

INTISARI

Kanker merupakan penyakit ketika sel mengalami pertumbuhan dan penyebaran secara abnormal ke beberapa jaringan tubuh. Pengobatan penyakit kanker bisa secara konvensional dan tradisional. Pemilihan pengobatan tradisional untuk penyakit kanker saat ini diperlukan untuk meminimalisir efek samping yang merugikan, salah satunya adalah tanaman majapahit. Menurut beberapa penelitian menunjukkan bahwa bagian daun majapahit memiliki aktivitas antikanker, hal ini tidak memungkinkan bahwa batang dari tanaman ini juga berpotensi sebagai antikanker. Tujuan dari penelitian ini mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam kulit batang tanaman majapahit menggunakan analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) dan analisis toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Penelitian ini dilakukan dengan pembuatan infusa kulit batang tanaman majapahit yang akan dikonversikan ke dalam konsentrasi uji 1000ppm, 900ppm, 800ppm, 700ppm, 600ppm, 500ppm, 400ppm, 300ppm, 200ppm, 100ppm. Pembagian konsentrasi tersebut diberikan larva udang *Artemia salina* Leach dan diamati selama 24 jam. Perhitungan LC_{50} diketahui setelah kematian larva udang *Artemia salina* Leach pada setiap konsentrasi yang akan di konversikan dalam tabel probit dan dimasukkan ke dalam *excel* sehingga diperoleh regresi linier. Hasil dari analisis LCMS pada infusa kulit batang tanaman majapahit teridentifikasi 91 senyawa. Senyawa *kaemperol-3-O-rhamnoside* merupakan senyawa utama dengan puncak tertinggi dengan komposisi 4,11678% dan termasuk ke dalam golongan flavonoid. Hasil pengujian toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach menunjukkan bahwa infusa kulit batang majapahit pada konsentrasi 400 ppm memiliki efek toksik yang dapat mewakili nilai LC_{50} sebesar 324,339 $\mu\text{g/ml}$. Hasil ketoksikan tersebut dapat disimpulkan bahwa infusa kulit batang tanaman majapahit berpotensi sebagai antikanker secara pra klinik yang ditandai dengan nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$.

Kata kunci: Antikanker, Majapahit, LCMS, BSLT, *Artemia Salina* Leach

**Identification Of Compound Majapahit (*Crescentia Cujete*) Stem Bark Infusion
with LCMS (Liquid Chromatograph Mass Spectrometry)
And Toxicity Analysis of *Artemia Salina* Leach**

Elen Vikelavianis
Pharmacy S1 Study Program

ABSTRACT

Cancer is a disease when cells experience abnormal growth and spread to several body tissues. Treatment of cancer can be conventional and traditional. The selection of traditional treatments for cancer is currently needed to minimize adverse side effects, one of which is Majapahit plant. According to several studies showing that the leaves of Majapahit have anticancer activity, it is impossible that the stems of this plant also have anticancer potential. The purpose of this study was to identify compounds contained in the stem bark of the Majapahit plant using LCMS analysis (Liquid Chromatograph Mass Spectrometry) and analysis of toxicity to *Artemia salina* Leach shrimp larvae using the BSLT (Bhrine Shrimp Lethality Test) method. This research was conducted by making an infusion of stem bark from Majapahit plant which would be converted into test concentrations of 1000ppm, 900ppm, 800ppm, 700ppm, 600ppm, 500ppm, 400ppm, 300ppm, 200ppm, 100ppm. The concentration distribution was given by *Artemia salina* Leach shrimp larvae and observed for 24 hours. The LC_{50} calculation is known after the death of the *Artemia salina* Leach shrimp larvae at each concentration to be converted in the probit table and entered into excell so that a linear regression is obtained. The results of the LCMS analysis on the infusion of the bark of the Majapahit plant identified 91 compounds. The kaemperol-3-O-rhamnoside compound is the main compound with the highest peak with a composition of 4.11678% and belongs to the flavonoid group. The results of the toxicity test on *Artemia salina* Leach showed that the infusion of majapahit stem bark at a concentration of 400 ppm had a toxic effect which could represent an LC_{50} value of 324.339 $\mu\text{g/ml}$. From the toxicity results, it can be concluded that the infusion of the bark of the Majapahit plant has the potential as a pre-clinical anticancer which is characterized by an LC_{50} value of $<1000 \mu\text{g/ml}$.

Keywords: Anticancer, Majapahit, LCMS, BSLT, *Artemia salina* Leach

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji syukur penulis panjatkan atas segala limpahan rahmat dan hidayah yang telah diberikan Allah swt kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul: **“Identifikasi Senyawa Infusa Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete*) Dengan LCMS (*Liquid Crhomatograph Mass Spectrometry*) Dan Analisis Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach”**, yang merupakan salah satu persyaratan untuk memperoleh Sarjana Farmasi pada Program Sarjana Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung. Salam dan shalawat selalu tercurah kepada Nabi besar Muhammad S.A.W sebagai suri teladan oleh seluruh ummatnya.

Penulis dengan ini mengucapkan rasa terima kasih kepada semua pihak-pihak yang telah banyak berkontribusi memberikan arahan dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini, sehingga dapat terselesaikan tepat waktu. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Bapak apt. Arif Santoso, M.Farm selaku Ketua STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung.
2. Ibu apt. Dara Pranidya Tilarso, M.Farm selaku Kaprodi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung.
3. Ibu Rahma Diyan Martha, S.Si., M.Sc selaku Pembimbing I yang telah meluangkan waktu dan pikirannya dalam mengoreksi dan memberikan saran, arahan dalam penyusunan skripsi ini.
4. Bapak apt. Arif Santoso, M.Farm selaku selaku Pembimbing II yang telah meluangkan waktu dan pikirannya dalam mengoreksi dan memberikan saran, arahan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Orang tua tercinta, Bapak Raji dan Ibu Ismiati atas kasih sayang tak terhingga, serta segala dukungan dan doa restu yang diberikan.
6. Kakak perempuan tersayang, Eva Sovianis yang telah memberikan dukungan lahir dan batin serta masukan selama proses penyusunan skripsi ini.

7. Seluruh dosen STIKes Karya Putra Bangsa yang telah memberikan didikan dan dukungan dari awal semester hingga sampai penyusunan skripsi ini.
8. Teman teman seperjuangan program studi S1 Farmasi angkatan 2019 yang telah memberikan dukungan, semangat dan kontribusinya selama penyusunan skripsi ini.
9. Semua pihak yang tidak disebutkan satu persatu, atas segala masukan, dukungan dan doa yang diberikan dalam penyelesaian skripsi ini.

Semoga hasil skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca. Penulis menyadari bahwa naskah skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Besar harapan penulis atas kontribusinya baik berupa saran dan kritik demi kesempurnaan penelitian selanjutnya.

Tulungagung, 3 Juni 2023

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
INTISARI.....	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR PERSAMAAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah	5
1.5 Relevansi Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Tanaman Majapahit (<i>Crescentia cujete</i>).....	7
2.1.1 Uraian Umum Tanaman Majapahit	7
2.1.2 Morfologi Tanaman Majapahit	7
2.1.3 Kandungan Kimia Tanaman Majapahit	8
2.1.4 Manfaat Tanaman Majapahit	10
2.2 Kanker.....	12
2.2.1 Definisi kanker	12
2.2.2 Pengelompokkan Jenis Kanker	13
2.2.3 Patofisiologi Kanker	14
2.3 Simplisia.....	15
2.3.1 Simplisia Nabati	15
2.3.2 Simplisia Hewani.....	15

2.3.3	Simplisia Pelikan atau Mineral.....	15
2.4	Metode Ekstraksi	15
2.4.1	Jenis Jenis Metode Ekstraksi.....	15
2.4.2	Pemilihan Metode Ekstraksi.....	17
2.5	Skrining Fitokimia	18
2.5.1	Senyawa Alkaloid.....	18
2.5.2	Senyawa Flavonoid.....	19
2.5.3	Senyawa Tanin	20
2.5.4	Senyawa Saponin.....	22
2.6	LCMS (<i>Liquid Chromatograph Mass Spectrometry</i>)	22
2.6.1	Komponen dasar LC-MS	24
2.7	Uji Toksisitas.....	26
2.8	Uraian <i>Artemia Salina</i> Leach	28
2.8.1	Klasifikasi <i>artemia salina</i> Leach.....	29
2.8.2	Morfologi <i>artemia salina</i> Leach.....	29
2.8.3	Habitat dan lingkungan hidup <i>Artemia salina</i> Leach	30
2.8.4	Reproduksi dan Siklus hidup <i>Artemia salina</i> Leach	31
2.8.5	Perilaku <i>Artemia salina</i> Leach	34
2.8.6	Penggunaan <i>Artemia salina</i> Leach sebagai hewan uji.....	34
2.9	Uraian Metode BSLT Sebagai Pengujian Antikanker	35
2.10	Hipotesis.....	36
BAB III METODE PENELITIAN		37
3.1	Alat.....	37
3.2	Bahan	37
3.3	Lokasi Penelitian	37
3.4	Populasi Penelitian.....	37
3.5	Sampel Penelitian	37
3.6	Variabel Penelitian.....	38
3.6.1	Variabel bebas	38
3.6.2	Variabel kontrol.....	38
3.6.3	Variabel terikat	38
3.7	Determinasi Tanaman	39
3.8	Penyiapan Sampel.....	39

3.8.1	Pengambilan Sampel.....	39
3.8.2	Pengolahan Sampel.....	39
3.9	Pembuatan Infusa	39
3.10	Skrining Uji Fitokimia	40
3.10.1	Alkaloid.....	40
3.10.2	Flavonoid	40
3.10.3	Tanin	40
3.10.4	Saponin	40
3.11	Analisis LCMS (<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>).....	41
3.12	Penyiapan Uji Toksisitas Metode BSLT	41
3.12.1	Pembuatan Air Laut Buatan	41
3.12.2	Penetasan Telur <i>Artemia salina</i> Leach	41
3.12.3	Pembuatan Konsentrasi Perlakuan Ekstrak.....	42
3.13	Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Uji	42
3.14	Pelaksanaan Uji Toksisitas.....	43
3.15	Kerangka Penelitian.....	46
BAB IV HASIL dan PEMBAHASAN.....		47
4.1	Determinasi Tanaman	47
4.2	Penyiapan Sampel.....	48
4.3	Pembuatan Infusa	48
4.4	Skrining Fitokimia	50
4.4.1	Uji Alkaloid	51
4.4.2	Uji Flavonoid	53
4.4.3	Uji Tanin.....	53
4.4.4	Uji Saponin	54
4.5	Identifikasi Senyawa Infusa Kulit Batang Majapahit Dengan LCMS.....	55
4.5.1	Senyawa <i>Kaempferol-3-O-rhamnoside</i>	60
4.5.2	Senyawa <i>Hesperidin</i>	61
4.5.3	Senyawa <i>Gallic acid</i>	62
4.5.4	Senyawa <i>Rutin</i>	63
4.6	Pengujian Potensi Antikanker Metode BSLT	64
BAB V PENUTUP		69

5.1	Kesimpulan.....	69
5.2	Saran	69
	DAFTAR PUSTAKA.....	70
	LAMPIRAN.....	78



DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Penggunaan Obat Tanaman Majapahit (<i>Crescentia cujete</i>).....	11
Tabel 2.2 Kategori Toksisitas LC ₅₀ Bahan.....	28
Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Perlakuan	42
Tabel 3.2 Hasil Model Tabel Data Probit Analisis	44
Tabel 4.1 Hasil perhitungan rendemen kulit batang majapahit	49
Tabel 4.2 Hasil Skrining Fitokimia Kulit Batang Majapahit	51
Tabel 4.3 Hasil Deteksi dan Identifikasi Senyawa Menggunakan LCMS	59
Tabel 4.4 Hasil Model Tabel Data Probit Analisis	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Majapahit.....	8
Gambar 2.2 Struktur Senyawa Alkaloid.....	19
Gambar 2.3 Struktur Senyawa Flavonoid.....	20
Gambar 2.4 Struktur Senyawa Tanin.	21
Gambar 2.5 Struktur Senyawa Saponin.....	22
Gambar 2.6 Skema LCMS (<i>Liquid Chromatograph Mass Spectrometry</i>).	24
Gambar 2.7 <i>Artemia salina</i> Leach.....	29
Gambar 2.8 Siklus hidup <i>Artemia salina</i> Leach	31
Gambar 3.1 Transformation of Percentages to Probits	44
Gambar 3.2 Kerangka Penelitian	46
Gambar 4.1 Reaksi identifikasi alkaloid dengan pereaksi Dragendroff	52
Gambar 4.2 Reaksi identifikasi alkaloid dengan pereaksi Mayer.....	52
Gambar 4.3 Reaksi identifikasi alkaloid dengan pereaksi Wagner.....	52
Gambar 4.4 Reaksi Flavonoid dengan logam Mg dan HCl.....	53
Gambar 4.5 Reaksi Identifikasi Senyawa Tanin dengan Larutan FeCl ₃	54
Gambar 4.6 Reaksi hidrolisis senyawa saponin dalam air	55
Gambar 4.7 Hasil kromatogram LCMS infusa kulit batang majapahit.....	57
Gambar 4.8 Spektrum Massa <i>Kaempferol-3-O-rhamnoside</i>	58
Gambar 4.9 Spektrum Massa Senyawa <i>Hesperidin</i>	58
Gambar 4.10 Spektrum Massa Senyawa <i>Gallic acid</i>	58
Gambar 4.11 Spektrum Massa Senyawa <i>Rutin</i>	59
Gambar 4.12 Struktur Kimia <i>Kaempferol-3-O-rhamnoside</i>	61
Gambar 4.13 Struktur Kimia Senyawa <i>Hesperidin</i>	62
Gambar 4.14 Struktur Kimia Senyawa <i>Gallic acid</i>	63
Gambar 4.15 Struktur Kimia Senyawa <i>Rutin</i>	64
Gambar 4.16 Grafik Regresi Linier Infusa Kulit Batang Majapahit.....	66

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1 39
Persamaan 3.2..... 43
Persamaan 3.3..... 43
Persamaan 3.4..... 44



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Permasalahan kesehatan dunia terkait penyakit mematikan terus menimbulkan perkembangan angka mortalitas dan morbiditas di setiap sudut dunia. Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2019 penyebab kematian ke dua dari berbagai dunia disebabkan oleh penyakit kanker setelah penyakit kardiovaskular (Sung *et al.*, 2021). Kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai dengan tidak terkendalinya pertumbuhan dan penyebaran sel abnormal yang bersifat immortal atau yang dikenal sebagai metastasis, yang menyebabkan kematian. Faktor eksternal yang dapat memicu terjadinya kanker diantaranya ada penggunaan tembakau, bahan kimia, radiasi, organisme menular dan faktor internal (mutasi bawaan, hormon, penyakit kekebalan, mutasi acak). Faktor lain yang diketahui dapat meningkatkan risiko terjadinya kanker, diantaranya faktor pola makan, infeksi bakteri, jamur, virus, kurangnya aktivitas fisik, obesitas, dan pencemaran udara (Mathur *et al.*, 2015).

Kasus kejadian kanker terus meningkat dari berbagai negara maju dan berkembang karena alasan yang bertautan, dimana meliputi penuaan dan perkembangan populasi, lajunya pembangunan sosial ekonomi, dan terjadinya perubahan dalam prevalensi faktor risiko terkait (Sung *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Menurut *Global Burden of Cancer* (2020), memperkirakan secara keseluruhan terjadi peningkatan kasus baru tentang kejadian dan kematian pada akhir tahun 2020 mencapai 19,3 juta kasus dan 10 juta kejadian meninggal akibat penyakit kanker yang terjadi pada tahun 2020 (Sung *et al.*, 2021). Indonesia menempati urutan ke delapan di Asia Tenggara berdasarkan angka kejadian kanker (Santoso *et al.*, 2021). Menurut data *The Global Cancer Observatory* (2020), angka kejadian tertinggi penyakit kanker di Indonesia diduduki oleh kanker payudara (16,6%), kanker serviks uteri (9,2%), kanker paru paru (8,8%), kanker kolorektum (8,6%), kanker hati (5,4%).

Paradigma masyarakat hingga saat ini terhadap penyakit kanker menimbulkan rasa cemas dan ketakutan berlebih sehingga banyak cara pengobatan yang akan ditempuh. Sejauh ini pengobatan untuk penyakit kanker dapat melalui yaitu penanganan secara konvensional dan tradisional. Penanganan medis konvensional untuk pasien penyakit kanker umumnya menggunakan pengobatan seperti operasi, kemoterapi, imunoterapi dan radioterapi, dimana prinsip dari pengobatan tersebut adalah menyembuhkan secara lokal pada tempat tumbuhnya dan penanganan agar tidak menyebar pada daerah lain (Sofia dkk., 2018). Namun pengobatan secara konvensional sejauh ini banyak menimbulkan efek samping yang merugikan seperti kerusakan kuku, kerontokan rambut, xerostomia, hiposaliva, gangguan system saraf pusat, serta gangguan jantung dan pembuluh darah (Nuroso dkk., 2021). Berdasarkan adanya efek samping yang merugikan dari pengobatan konvensional, maka ditemukanya alternatif obat baru dengan efektivitas yang sama dan efek samping yang lebih kecil dengan penggunaan obat tradisional yang sejauh ini relatif lebih aman dari segi efek sampingnya (Astri *et al.*, 2012).

Pengobatan alternatif salah satunya adalah penggunaan obat tradisional. Penggunaan obat tradisional sudah banyak diterapkan sebagai obat dari penyakit kronis hingga akut. Salah satu tanaman obat berkhasiat yaitu tanaman majapahit (*Crescentia cujete*). Tanaman majapahit dengan famili *Bignoniaceae* dengan 110 genus dan lebih dari 800 spesies (Parente *et al.*, 2016). Seluruh bagian tanaman majapahit ini banyak digunakan sebagai obat tradisional dari berbagai negara salah satunya sebagai agen antikanker (Balogun & Sabiu, 2021). Tanaman ini memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, fenol, saponin, steroid, tanin dan alkaloid (Ejelonu *et al.*, 2011). Pada kandungan senyawa kulit batang tanaman majapahit sendiri terbukti memiliki kandungan senyawa seperti tanin sebesar 24,05 %, fenolat sebesar 13,85 %, flavonoid sebesar 9,91 %, dan saponin sebesar 9,30 % (Martha & Fatimah, 2020).

Mendapatkan suatu senyawa kimia pada suatu tanaman diperlukan ekstraksi atau penyarian. Pada kulit batang tanaman majapahit menggunakan metode ekstraksi infundasi dengan perendaman sampel menggunakan pelarut *aquadest* dan dengan pemanasan pada suhu 90°C selama 15 menit. Infundasi dipilih karena

efektif, efisien dan dapat mengurangi limbah organik. Cara pembuatan secara infundasi mendekati cara pembuatan obat tradisional yang telah lama digunakan oleh masyarakat, sehingga mempermudah penggunaanya (Sritiasni *et al.*, 2021).

Pembuktian bahwa suatu senyawa terkandung dalam suatu tanaman tersebut perlu dilakukan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada suatu bahan alam (Vifta & Advistasari, 2018). Hasil yang didapat dari skrining fitokimia belum cukup akurat karena hanya menggunakan reagen pendeteksi, sehingga perlu dilakukan analisis yang lebih detail yaitu menggunakan LCMS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*). Analisis LCMS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) akan mendeteksi dan mengidentifikasi yang akan memberikan data informasi mengenai kuantitas dan identitas senyawa spesifik, berat molekul, struktur senyawa, dan jumlah komponen pada suatu sampel dengan prinsip menggabungkan kemampuan analisis kromatografi cair dengan spesifitas deteksi spektrometri massa (Saibaba *et al.*, 2016).

Penelitian yang dilakukan oleh Martha & Fatimah (2020) pada ekstrak batang tanaman majapahit dengan uji spektrofotometri menunjukkan adanya senyawa tanin, fenolat, flavonoid, dan saponin dan pada uji kuantitatif menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang tanaman majapahit memberikan efek toksik terhadap larva udang *Artemia salina* sehingga dapat digunakan untuk sumber antikanker. Metode larva udang atau yang lebih dikenal BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) adalah metode yang paling dasar dan sering digunakan untuk uji toksisitas akut pada kandungan suatu senyawa pada tanaman. Prinsip metode ini berdasarkan pada tingkat mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach terhadap ekstrak uji. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC_{50} (*median lethal concentration*), dimana LC_{50} merupakan kondisi kematian 50% hewan uji (larva udang) akibat respon terhadap konsentrasi zat ekstrak uji setelah masa inkubasi selama 24 jam. Ekstrak uji dikatakan toksik apabila nilai $LC_{50} < 1000\mu\text{g/mL}$ (Idris, 2019). Metode ini memiliki keuntungan, seperti efektif, efisien, dan sampel yang dibutuhkan relatif sedikit dan uji yang masih dasar. Metode ini dapat digunakan sebagai bioassay awal sebelum memulai pengujian yang lebih kompleks untuk aktivitas farmakologi tertentu (Rasyid *et al.*, 2022).

Penelitian yang dilakukan oleh Fatimah dkk (2020) menggunakan analisis LCMS pada penelitian dari ekstrak metanol kulit batang majapahit menunjukkan adanya 12 senyawa flavonoid dan 10 senyawa diantaranya memiliki potensi sebagai antikanker.

Berdasarkan uraian dan bukti pendukung bahwa tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete*) memiliki potensi sebagai anti kanker, pada penelitian ini peneliti akan membuktikan kandungan senyawa optimum infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia Cujete*) menggunakan analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) dan menunjukkan potensi efek toksisitas kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia Cujete*) sebagai salah satu kandidat untuk terapi antikanker yang diekstraksi dengan pelarut *aquadest* menggunakan dengan metode infundasi. Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*).

1.2 Rumusan Masalah

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

- 1.2.1 Senyawa metabolit sekunder apa saja yang terkandung dalam ekstrak infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia kujete*)?
- 1.2.2 Bagaimana hasil identifikasi senyawa pada infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia kujete*) dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) puncak tertinggi ?
- 1.2.3 Berapakah nilai LC_{50} dari pengujian toksisitas akut infusa kulit batang tanaman majapahit terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1.3.1 Untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia kujete*)
- 1.3.2 Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa pada infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia kujete*) dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*).

1.3.3 Untuk mengetahui LC_{50} dari pengujian toksisitas infusa kulit batang majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach yang digunakan untuk mengetahui potensi antikanker.

1.4 Batasan Masalah

1.4.1 Sampel yang digunakan adalah kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) yang di Jawa Timur dikenal dengan tanaman maja dan diperoleh di kawasan Wates, Sumbergempol, Kabupaten Tulungagung

1.4.2 Metode ekstraksi yaitu dengan menggunakan infundasi yang menghasilkan infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*).

1.4.3 Uji toksisitas yang dilakukan pada kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) hanya merupakan *screening test* menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang dihitung analisisnya dengan LC_{50} (*Median Lethal Concentration*) terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach.

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

1.5 Relevansi Penelitian

Penelitian ini memiliki relevansi dengan penelitian sebelumnya yaitu:

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

1.5.2 Penelitian lain yang diteliti oleh Rahma Diyan Martha dan Fatimah pada tahun 2020 yang berjudul “Uji Toksisitas Ekstrak Etanolik Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) Terhadap *Artemia Salina* Leach”. Adapun hasil

dari penelitian ini adalah ekstrak etanolik kulit batang tanaman majapahit pada uji spektrofotometri, yang membuktikan bahwa konsentrasi terbesar dari ekstrak etanolik batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) adalah tanin yang diikuti dengan senyawa fenolat, senyawa flavonoid, dan senyawa saponin. Sedangkan uji toksisitas komponen teraktif ekstrak batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap *Artemia salina* Leach menunjukkan pada konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,04 $\mu\text{g/mL}$ yaitu dengan persentase dibawah 50 %.

1.5.3 Penelitian lain yang diteliti oleh Fatimah, Rahma Diyan Martha, dan Danar pada tahun 2022 yang berjudul “Analisis toksisitas dan potensi antikanker ekstrak metanol daun Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*”. Adapun hasil dari penelitian ini adalah pada ekstrak metanol daun majapahit terdapat senyawa alkaloid, tanin, saponin, fenolat, dan terpenoid dan pada ekstrak metanol daun majapahit diketahui berpotensi dikembangkan untuk sumber antikanker. Hal tersebut ditandai dengan hasil uji toksisitas ekstrak yang memiliki nilai $\text{LC}_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*)

2.1.1 Uraian Umum Tanaman Majapahit

Tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) yang dalam bahasa Inggris lebih dikenal dengan *Calabas*, dan *Calabassier* dalam bahasa Prancis merupakan tanaman asli dari Amerika Tengah, Kamerun, dan beberapa negara bagian Afrika. Di Indonesia bagian Jawa Tengah dan Jawa Timur, tanaman ini dikenal sebagai berenuk dan majapahit. Secara tradisional tanaman ini banyak digunakan sebagai antidiare, antiradang, dan antiinflamasi (Bahroni & Istianah, 2017). Di Filipina, *Crescentia cujete* dianggap sebagai "buah ajaib", bagi penduduk sekitar karena telah membuktikan efek kesehatan yang mengkonsumsi ekstrak dari buah dan daunnya sebagai antimikroba, antibakteri, antihelmintik, antikolesterol, antidiabetes, antioksidan dan antiinflamasi (Gonzales *et al.*, 2022). Kandungan kimia yang dimiliki oleh tanaman majapahit diantaranya adalah flavonoid (*quercetin*), tannin, fenol, saponin, anthraquinon, dan cardenolides ((Ejelonu *et al.*, 2011).

2.1.2 Morfologi Tanaman Majapahit

Klasifikasi tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) menurut Materi Medika

Indonesia (2022) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Scrophulariales
Suku	: Bignoniaceae
Marga	: Crescentia
Jenis	: <i>Crescentia cujete</i> L



Gambar 2.1 Tanaman Majapahit (Dugua *et al.*, 2012)

Tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) yang dikenal sebagai pohon labu memiliki ciri buah labu yang kaku, cangkang kayu dan daging buah seperti agar-agar (Parente *et al.*, 2016). Tanaman majapahit merupakan pohon dengan tinggi antara 6 sampai 10 meter dengan batang lebar dengan cabang yang panjang berwarna coklat dan biasa digunakan sebagai tanaman hias di perkarangan rumah (Ejelonu *et al.*, 2011). Tanaman ini tumbuh di tempat teduh, dan merupakan tumbuhan yang sangat baik untuk udara disekitar. Memiliki daun sederhana dengan ujung meruncing dan pangkal membulat dengan lebar sekitar 5-7 cm bertangkai pendek. Buah berbentuk bulat menyerupai labu hijau dengan diameter 12–14 cm berwarna hijau kekuningan dan didalam buah terdapat. Di dalam buah ada biji berbentuk kotak dengan panjang ± 5 mm yang mengandung bubur kertas yang digunakan untuk pengobatan yang membutuhkan waktu sekitar 6-7 bulan untuk buah tersebut matang. Selama proses pematangan, buah berubah dari hijau menjadi kuning dan biasanya dipanen pada musim kemarau. Bunga pada tanaman ini berwarna kuning atau hijau muda berbentuk lonjong lonceng dan memiliki mahkota yang berada pada batang (Balogun & Sabiu, 2021).

2.1.3 Kandungan Kimia Tanaman Majapahit

Tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) yang telah banyak digunakan sebagai bahan obat oleh masyarakat karena memiliki beberapa kandungan metabolit sekunder pada setiap bagian tanaman majapahit seperti pada bagian buahnya teridentifikasi memiliki mengandung senyawa flavonoid (flavon dan flavanon), saponin, tanin, alkaloid, fenol, hidrogen sianida, dan kardenolida, pitosterol,

jantung glikosida, terpenoid, serta asam sabit, asam tartarat, dan asam sitrat dan tanat dan beberapa minyak atsiri seperti metil ester, asam n-heksadekanat, asam benzenapropanoat, fenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-, dan 2,4-bis(1,1-dimethylethyl). Kandungan pada bagian daun tanaman majapahit ini juga terdapat senyawa alkaloid, tanin, saponin, polifenol, flavonoid, glikosida, gula pereduksi, pitosterol, dan minyak atsiri (seperti *heksadekanal*, (Z)-9,17- *octadecadienal*, *phytol*, *kaur-16-ene*, *neophytadiene*, *trans-pinane*). Pada batang tanaman majapahit terdapat senyawa glikosida, terpenoid, dan flavonoid (Balogun & Sabiu, 2021). Pada kandungan senyawa kulit batang tanaman majapahit memiliki kandungan senyawa seperti tanin, asam fenolat, flavonoid, dan saponin sebesar sebagai potensi antikanker (Martha & Fatimah, 2020).

Pada kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) terdapat senyawa tanin yang memiliki mekanisme sebagai penekan untuk banyak protein penting dalam beberapa jalur pensinyalan onkologis yang bekerja dengan cara menghambat transkripsi gen yang bergantung pada SMAD (*S-mothers against decapentaplegic*) sebagai bentuk respons terhadap TGF- β (*Transforming growth factor beta*), sehingga menghambat transkripsi gen target TGF- β β 1 (*Transforming growth factor beta*). Menghambat VEGF/VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor*), menghambat jalur pensinyalan angiogenesis utama pada kanker. Senyawa tanin ini juga memiliki mekanisme dalam penghambatan ekspresi gen SOX2 pada kanker payudara dan menghambat jalur pensinyalan EGF/EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) yang berakibat pada pertumbuhan dan proliferasi sel (Youness *et al.*, 2021). Senyawa asam fenolat terdapat dalam kulit batang tanaman majapahit, senyawa ini memiliki mekanisme sebagai antikanker yang terhadap efek antikarsinogeniknya dengan pengambatan proliferasi sel (*extracellular signal-regulated kinase* (Erk)1/2, *cyclins* tipe-D, dan *cyclin-dependent kinases* (CDKs)), faktor VEGF (faktor pertumbuhan endotel vaskular dan MIC-1), kaskade PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) dan dapat menginduksi apoptosis, dan mencegah migrasi seluler dan metastasis (Abotale *et al.*, 2020).

Senyawa flavonoid yang terdapat dalam kulit batang tanaman majapahit memiliki mekanisme pada golongan *quercetin* dengan menghambat modulasi ekspresi gen tumor *necrosis factor-alpha* (TNF- α) yang merupakan salah satu

sitokin proinflamasi yang terlibat dalam patogenesis penyakit inflamasi kronis dan dimodulasi oleh stres oksidatif (Baghel *et al.*, 2012). Stres oksidatif ini terjadi dikarenakan sifat ROS yang sangat reaktif di dalam tubuh sehingga mampu memicu terjadinya perubahan berbagai molekul seperti DNA, protein dan lipid (Santoso dkk., 2022). Kemampuan antioksidan yang memiliki keterkaitan dengan kanker dalam mempertahankan tingkat ROS/RNS (*Reactive Oxygen Species/ Reactive nitrogen species*) dan memperbaiki kerusakan sel oksidatif karena keduanya berperan utama dalam perkembangan kanker (Baghel *et al.*, 2012). Flavonoid juga dapat berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi (Muaja dkk., 2013). Senyawa saponin memiliki aktivitas sebagai antikanker yang bekerja dengan menargetkan berbagai protein terkait kanker dan jalurnya, penghentian siklus sel, induksi apoptosis, aktivasi stres ER (*Endoplasmic reticulum*), penghambatan invasi dimana sel kanker menembus jaringan sekitarnya dan berproliferasi, dan pembalikan MDR (*Multidrug Resistance*) (Yanuartono, dkk., 2017; Xu *et al.*, 2016).

2.1.4 Manfaat Tanaman Majapahit

Penggunaan tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) pada daging buah tanaman dapat digunakan untuk mengobati gangguan pernapasan dan juga sebagai pencahar. Rebusan kulit kayu dimanfaatkan untuk diare dan untuk membersihkan luka. Rebusan buah tanaman ini dapat digunakan untuk mengobati bronkitis, diare, sakit perut, uretritis, pilek, batuk dan asma. Daun dan kulit kayu menunjukkan aktivitas antiinflamasi dan antibakteri dan potensi terapeutik pada proses penyakit yang disebabkan oleh destabilisasi membran biologis (Parente *et al.*, 2016).

Selain itu tanaman majapahit memiliki berbagai sifat farmakologis yang diantaranya sebagai antioksidan, antidiabetes, antiinflamasi, anthelmintik, antibakteri, antikolesterol, antivenom, penyembuhan luka, potensi keamanan, sitotoksik, pelindung saraf, antiangiogenik, aktivitas antioksidan, antibakteri, dan antikanker (Balogun & Sabiu, 2021). Seluruh tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) sebagai tanaman obat yang bermanfaat. Penggunaan umum pada bagian berbeda tanaman majapahit dengan pengaplikasian untuk ramuan dan infus untuk menyembuhkan berbagai penyakit tertera pada (Tabel 2.1) (Gonzales *et al.*, 2022).

Tabel 2. 1 Penggunaan Obat Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) (Gonzales *et al.*, 2022).

No	Bagian Tanaman	Persiapan dan Cara Penggunaan	Pengaplikasian Pada Penyakit
1.	Buah	Dekoksi, Maserasi; Konsumsi oral	Pneumonia, penyakit selesema, TBC
2.	Bunga	Penggorengan; Secara topikal	Sakit telinga
3.	Buah dan akar	Dekoksi, Konsumsi oral	Penyakit kelamin
4.	Buah	Dekoksi, Ekstraksi Jus, Maserasi; Konsumsi oral	Penyakit selesema
5.	Buah	Dekoksi; Konsumsi oral	Kesejukan (frialdad) di rahim, menstruasi tidak teratur
6.	Daun	Ekstraksi Getah, Maserasi; Konsumsi oral	Cicatrization, Ulkus
7.	Daun	Infusa; Konsumsi Oral	Palpitasi, hipertensi, flu, radang paru-paru, batuk, radang selaput lendir hidung, diare
8.	Daun	Dekoksi; Konsumsi Oral	Diare, diabetes, gangguan pencernaan, jantung berdebar, iritasi saraf
9.	Daun, bunga, dan ranting	Infusa; Mandi	Pembasuh vagina
10.	Daun	Ekstraksi Getah; Penggunaan lokal	Jerawat, bintik-bintik
11.	Daun	Meserasi gigi; Konsumsi oral	Sakit gigi
12.	Kulit luar	Dekoksi; Konsumsi oral	Memudahkan proses kelahiran

Tabel 2.1 Lanjutan

13.	Kulit luar	Dekoksi, Meserasi; Penggunaan lokal	Wasir, prurigo pada alat kelamin, kolik vagina, batuk rejan
14.	Kulit bagian dalam	Ekstraksi jus; Penggunaan lokal	Memar pada mata
15.	Buah	Dekoksi; Konsumsi oral	Iritasi saluran pernapasan, asma Iritasi saluran pernapasan, asma bronkitis, iritasi gastrointestinal (kolik, konstipasi, hepatitis), radang paru-paru, radang, uretritis
16.	Buah	Ekstraksi Getah, Dekoksi; Konsumsi oral	Obat perangsang haid
17.	Buah	Ekstraksi Jus; Konsumsi oral, Penggunaan lokal	Induksi kelahiran, ejeksi plasenta/janin mati
18.	Buah	Dimasak; Konsumsi oral	Anti diare, anti inflamasi
19.	Buah	Mentah; Konsumsi oral	Pencahar

2.2 Kanker

2.2.1 Definisi kanker

Kanker merupakan sekelompok penyakit ganas yang ditandai dengan pertumbuhan dan penyebaran sel abnormal secara tidak terkendali dan ketiakkemampuannya berfungsi sebagaimana mestinya, tahap penyebaran ini disebut dengan metastatis (Mathur *et al.*, 2015). Pertumbuhan sel kanker sangat berbeda dengan pertumbuhan sel normal biasanya. Pertumbuhan sel normal dengan cara membelah secara terkendali yang menghasilkan sel sel baru dan berfungsi untuk

menjaga imun pada tubuh. Secara umum jika suatu sel mengalami kerusakan atau sudah dalam waktu yang lama di tubuh maka akan terjadi kematian sel dan membentuk perbaruan sel. Namun pada kanker, kanker terus berkembang biak dan membentuk sel abnormal yang baru dan tumbuh menjadi jaringan yang lain (*grow into other tissues*), hal yang tidak bisa dilakukan oleh sel normal pada umumnya. Perkembangannya dan pertumbuhan sel diluar kendali dan meyerang jaringan lain inilah yang membuat sel tersebut menjadi sel kanker (Mitra *et al.*, 2018). Kanker didefinisikan sebagai gangguan ireversibel dalam homeostasis seluler. Gangguan bisa terkait sumber internal seperti hilangnya/berkurangnya fungsi seluler, apoptosis (kematian sel yang terprogram), stres oksidatif, mutasi dan hipoksia (kadar oksigen yang menurun), atau bisa dari sumber eksternal seperti paparan radiasi yang berkepanjangan, sinar ultraviolet, polusi, kebiasaan merokok, dan alkohol (Abotaleb *et al.*, 2020).

2.2.2 Pengelompokan Jenis Kanker

Menurut Mitra *et al* (2018), Jenis kanker dapat dikelompokkan kedalam kategori yang lebih luas, meliputi :

2.2.2.1 Karsinoma, kanker yang dimulai pada kulit atau jaringan yang menyusun, melapisi atau menutupi organ dalam. Ada beberapa karsinoma diantaranya adenokarsinoma, karsinoma sel basal, karsinoma sel skuamosa, dan karsinoma sel transisional.

2.2.2.2 Sarkoma, kanker yang dapat ditemukan pada sel tulang rawan, lemak, otot, pembuluh darah. Leukimia terjadi di jaringan pembentuk darah seperti sumsum tulang belakang dan menyebabkan memproduksi sel darah abnormal dan menyebar masuk ke dalam darah.

2.2.2.3 Leukemia, kanker yang dimulai pada jaringan pembentuk darah seperti sumsum tulang dimana dapat menyebabkan sejumlah sel darah yang besar yang diproduksi secara abnormal dan masuk kedalam darah

2.2.2.4 Limfoma dan myeloma, kanker yang terjadi pada sel sel sistem kekebalan tubuh.

2.2.2.5 Kanker sistem saraf pusat, dimana terjadi di jaringan sel sel otak dan sumsum tulang belakang.

2.2.3 Patofisiologi Kanker

Karsinogenesis adalah proses alami yang terjadi pada sel tubuh normal bertransformasi menjadi sel kanker. Menurut Watson (2018), karsinogenesis dibagi menjadi tiga fase utama yaitu fase inisiasi, promosi dan progresi.

2.2.3.1 Inisiasi

Fase ini merupakan tahap pertama ketika mutasi awal terjadi yang mungkin akan menyebabkan lebih dari satu perubahan seluler yang secara spontan atau paparan langsung karsinogen. Pada tahap perubahan sel ini akan menciptakan potensi sel yang terinfeksi berkembang menjadi sel kanker. DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) pada manusia adalah yang bertanggung jawab mengatur pertumbuhan dan perbaikan sel normal atau biasa yang disebut onkogen. Mutasi terjadi pada DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) memungkinkan sel untuk terus tumbuh melampaui kebutuhan tubuh yang akan menyebabkan perubahan struktur dan fungsi sel sehingga proses aktivasi gen terjadi dan mengubah siklus sel normal. Hal tersebut akan mengakibatkan pertumbuhan cepat dan menghambat, menghentikan gen supresor yang berfungsi sebagai penahan pembelahan sel. Sel baru yang muncul biasanya memiliki keunggulan yang lebih selektif dan reproduktif dibandingkan sel asli yang normal dan dapat menunjukkan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kematian sel yang terprogram (apoptosis).

2.2.3.2 Promosi

Promosi merupakan tahap kedua di mana sel yang diubah (atau diinisiasi) dirangsang untuk melakukan pembelahan sel. Hal yang dapat mempengaruhi perkembangan sel bisa dari lingkungan dalam (intraseluler) dan di luar (ekstraseluler). Pada tahap ini terjadi perubahan siklus sel sehingga aktif berproliferasi dan akan menyebabkan mutasi yang tersebar pada sel baru dan terbentuklah jaringan sel yang ganas.

2.2.3.3 Progresi

Pada tahap ini selama perkembangan, sel tumor bersaing satu dengan yang lain untuk bertahan hidup, mengarah lebih banyak mutasi yang membuat sel lebih agresif. Ketika tumor bertambah besar, sel-sel mengalami mutasi atau bertransformasi lebih lanjut akan menyebabkan peningkatan heterogenitas populasi sel. Dengan meningkatnya heterogenitas, sel sel kanker dalam populasi yang ganas

yang ditemukan dapat terlihat dan bertindak secara cepat dan berbeda yang membuat diagnosis dan pengobatan semakin sulit.

2.3 Simplisia

Simplisia merupakan bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu dalam pengeringan tidak lebih dari 60°C (BPOM RI, 2019). Simplisia terdiri dari tiga macam yaitu :

2.3.1 Simplisia Nabati

Simplisia merupakan bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain pada suhu pengeringan tidak lebih dari 60°C Simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman (isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya ataupun zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia murni) (Utami dkk., 2013).

2.3.2 Simplisia Hewani

Simplisia hewani yang merupakan hewan utuh, sebagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni (Utami dkk., 2013).

2.3.3 Simplisia Pelikan atau Mineral

Simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah dengan cara yang sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Utami dkk., 2013).

2.4 Metode Ekstraksi

2.4.1 Jenis Jenis Metode Ekstraksi

Salah satu cara untuk mendapatkan senyawa kimia dari kandungan bahan alam suatu tanaman maka diperlukan penyarian atau lebih dikenal dengan teknik ekstraksi. Ekstraksi merupakan metode pemisahan zat target dan zat yang tidak digunakan berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut (*solute*) antara dua pelarut atau lebih yang saling bercampur dimana pelarut yang digunakan sesuai dalam standar prosedur ekstraksi. Secara umum metode ekstraksi dibedakan menjadi

ekstraksi dengan cara pemanasan dan ekstraksi dengan cara dingin (Sudarwati & Fernanda, 2019).

2.4.1.1 Ekstraksi Cara Dingin

Metode digunakan terhadap senyawa kimia yang tidak tahan proses pemanasan, dengan tujuan untuk menghindari rusaknya senyawa akibat proses pemanasan. Berikut jenis ekstraksi cara dingin menurut dingin Sudarwati & Fernanda (2019) :

a. Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut yang sesuai. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dengan karena adanya perbedaan konsentrasi.

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses penyarian simplisia dengan jalan melewati pelarut yang sesuai secara perlahan pada simplisia dalam suatu alat percolator dengan tujuan supaya zat berkhasiat tertarik seluruhnya dan biasanya dilakukan untuk zat berkhasiat yang tahan ataupun tidak tahan pemanasan.

2.4.1.2 Ekstraksi Cara Panas

Metode ini melibatkan pemanasan dalam prosesnya. Dengan adanya proses pemanasan secara otomatis akan mempercepat proses penyarian dibandingkan cara ekstraksi dingin. Berikut ekstraksi cara panas menurut dingin Sudarwati & Fernanda (2019) :

a. Reflux

Merupakan salah satu metode sintesis senyawa anorganik. Metode ini digunakan apabila dalam sintesis tersebut menggunakan pelarut yang volatil. Prinsip metode ini adalah penguapan pelarut volatil pada suhu yang akan didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut yang menguap akan mengembun pada kondensor dan turun lagi ke dalam wadah reaksi sehingga reaksi berlangsung pelarut akan tetap ada (Sudarwati & Fernanda, 2019).

b. Sokletasi

Proses pemisahan suatu komponen dengan cara penyaringan berulang ulang yang terdapat dalam zat padat dengan menggunakan pelarut tertentu, sehingga

dapat terisolasi semua komponen yang dibutuhkan. Dengan cara pemanasan, sehingga uap yang timbul setelah dingin secara kontinyu akan membasahi sampel, pelarut secara teratur dimasukkan ke dalam labu kembali dengan membawa senyawa kimia yang akan diisolasi tersebut. Pelarut yang telah membawa senyawa kimia pada labu distilasi yang diuapkan dengan rotary evaporator sehingga pelarut tersebut dapat diangkat lagi bila suatu campuran organik berbentuk cair atau padat ditemui pada suatu zat padat, maka dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut yang diinginkan (Sudarwati & Fernanda, 2019).

c. Infundasi

Infundasi merupakan metode ekstraksi atau penyarian dengan pelarut *aquadest*. Pada waktu proses infundasi berlangsung, temperatur pelarut harus mencapai suhu 90°C selama 15 menit. Rasio berat bahan dan pelarut adalah 1 : 10, artinya jika berat bahan 100 gr maka volume *aquadest* sebagai pelarut adalah 1000 ml. Cara yang biasa dilakukan adalah simplisia bahan dipanaskan dalam panci dengan *aquadest* secukupnya selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C sambil diaduk sekali kali. Apabila bahan mengandung minyak atsiri, penyaringan dilakukan setelah dingin (Sudarwati & Fernanda, 2019).

Cara penyarian dengan infusa dapat dilakukan dengan bentuk bahan segar ataupun bahan kering. Bahan lunak yang digunakan pada ekstraksi ini seperti daun dan bunga dan pada bahan yang keras seperti akar, ranting, kayu dan klika. Bahan lunak dididihkan menggunakan panci infusa selama 15 menit, sedangkan bahan keras dididihkan selama 30 menit (Widyawati, 2019).

2.4.2 Pemilihan Metode Ekstraksi

Pemilihan metode ekstraksi pada kulit batang tanaman majapahit menggunakan ekstraksi dengan cara panas dengan teknik infundasi. Teknik infundasi dipilih karena metode penyarian yang diterapkan hampir menyerupai pembuatan obat tradisional masyarakat awam dan menggunakan alat yang sederhana. Metode ini menggunakan pelarut polar yaitu *aquadest*. Senyawa yang bersifat polar akan lebih mudah tertarik atau terlarut dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama, sehingga ekstraksi infusa kulit batang tanaman majapahit adalah cara yang efektif untuk melarutkan senyawa aktif saponin, tanin,

flavonoid dan fenolat karena senyawa-senyawa tersebut dapat larut dalam pelarut *aquadest* yang bersifat polar (Khafidhoh dkk., 2015).

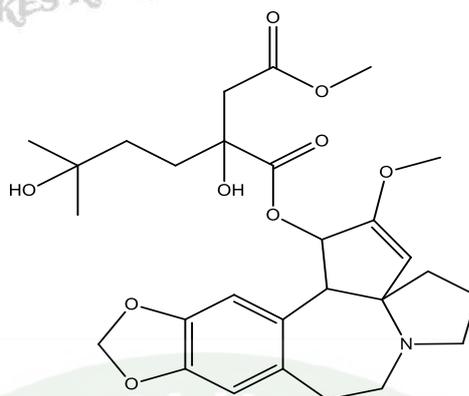
Keuntungan menggunakan ekstraksi infundasi adalah menggunakan alat dan proses yang dilakukan sederhana yang mudah untuk masyarakat pada umumnya dan tidak membutuhkan peralatan berteknologi tinggi, sehingga biaya lebih terjangkau, waktu yang dibutuhkan lebih singkat (Yanti dkk., 2017; Failisnur dkk., 2019).

2.5 Skrining Fitokimia

Fitokimia merupakan bagian dari ilmu kimia yang tergolong sifat kimia tumbuhan atau produk tumbuhan (kimia bahan alam). Skrining fitokimia merupakan langkah penting dalam upaya mengungkap potensi sumber tanaman obat (Parbuntari *et al.*, 2018). Skrining ini adalah salah satu cara untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder suatu bahan alam. Tahap pendahuluan untuk memberikan gambaran mengenai suatu bahan alam yang digunakan pada penelitian dilakukan pada skrining fitokimia ini. Tahap ini dapat dilakukan secara kualitatif, semi kuantitatif, maupun kuantitatif sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Metode skrining fitokimia secara kualitatif dapat dilakukan melalui reaksi warna dengan menggunakan suatu pereaksi tertentu. Hal penting yang mempengaruhi dalam proses skrining fitokimia adalah pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. Pelarut yang tidak sesuai memungkinkan senyawa aktif yang diinginkan tidak dapat tertarik secara baik dan sempurna (Vifta & Advistasari, 2018).

2.5.1 Senyawa Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan senyawa organik yang bersifat basa terbanyak yang ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Alkaloid memiliki sifat dimana kandungan atom nitrogen umumnya berasal dari asam amino dan golongan heterogen dan ditemukan berupa kristal atau serbuk amorf, alkaloid yang berbentuk cair yaitu konini, nikotin dan spartein dan tidak berwarna kecuali berberine (Poli aromatik). Alkaloid mempunyai rasa yang pahit, beracun, bersifat optis aktif dan berupa sistem siklik (Heliawati, 2018). Pada (Gambar 2.2) merupakan struktur dasar senyawa alkaloid.



Gambar 2.2 Struktur Senyawa Alkaloid (Chemdraw, 2022)

Uji kualitatif senyawa alkaloid menurut Puspa dkk (2017), dapat dilakukan dengan pereaksi warna dengan cara mengambil 2 mL ekstrak yang sudah dilarutkan dengan DMSO, lalu ditambahkan 9 mL *aquadest* dan ditambahkan dengan 1 mL asam sulfat (H_2SO_4) 2N lalu dipanaskan selama 30 menit. Didiamkan sampai larutan memisah, lapisan asam sulfat diambil dan dibagi kedalam 3 tabung reaksi yang diberikan beberapa pereaksi diantaranya:

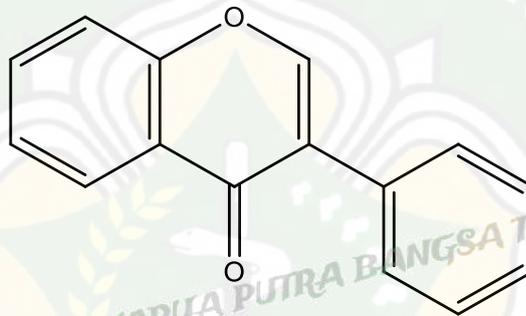
- Uji Dragendroff: Beberapa tetes larutan Dragendroff ditambahkan ke dalam larutan, positif mengandung alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan jingga.
- Uji Mayer: Beberapa tetes reagent Mayer ditambahkan ke dalam larutan kloroform, positif mengandung alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih.
- Uji Wagner: Beberapa tetes larutan Wagner ditambahkan ke dalam larutan, hasil positif alkaloid ditandai terbentuknya endapan coklat.

2.5.2 Senyawa Flavonoid

Senyawa flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan yang tidak terdapat pada alga, mikroorganisme, bakteri, lumut, jamur dan merupakan senyawa turunan fenol terbesar di alam yang memiliki struktur dasar fenilbenzopiron (tokoferol), memiliki kerangka 15 karbon dimana dua cincin benzena (C_6) terikat pada suatu rantai propan (C_3) sehingga membentuk suatu susunan $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ yang terdiri dari satu cincin teroksigenasi dan dua cincin aromatis (Heliawati, 2018). Flavonoid merupakan golongan polifenol yang

diklasifikasikan menjadi flavon, flavanol, isoflavon, flavonol, Flavanon, flavanonol, dan kalkon (Ravishankar *et al.*, 2013).

Senyawa flavanoid termasuk kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Sekitar 5-10% metabolit sekunder tumbuhan adalah flavonoid, dengan struktur kimia dan peran biologis yang sangat beragam. Senyawa flavonoid terdiri dari 15 atom karbon atau lebih yang sebagian besar bisa ditemukan dalam kandungan tumbuhan. Senyawa flavonoid memiliki sifat kima fenol seperti bersifat asam, bersenyawa polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil (Heliawati, 2018). Pada (Gambar 2.3) menunjukkan senyawa golongan flavonoid yaitu isoflavon.



Gambar 2.3 Struktur Senyawa Flavonoid (Chemdraw, 2022).

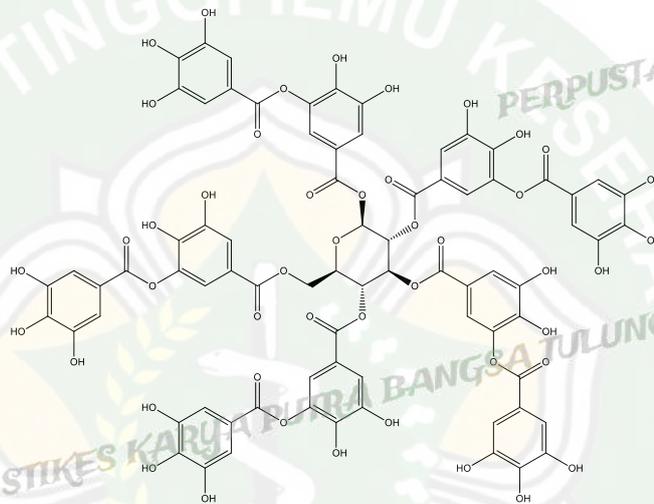
Uji kualitatif senyawa flavonoid dapat dilakukan dengan pereaksi warna dengan cara mengambil ekstrak sebanyak 0,5 gram yang kemudian ditambahkan dengan 5 mL akuades, dipanaskan selama 5 menit, dan saring. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat kemudian dikocok. Uji positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Dewi dkk., 2021).

2.5.3 Senyawa Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa polifenol yang terdapat banyak pada tanaman. Tanin memiliki berat molekul yang sangat besar yaitu lebih dari 1000 g/mol serta dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein. Pada (Gambar 2.4) menunjukkan struktur senyawa tanin yang terdiri dari cincin benzena (C_6) yang berikatan dengan gugus hidroksil ($-OH$) (Noer *et al.*, 2018). Berdasarkan struktur kimianya tanin dapat digolongkan menjadi dua macam, yaitu tanin terhidrolisis (*hidrolizable tannin*) dan terkondensasi (*condensed tannin*) (Sri Irianty & Yenti,

2014). Tanin mudah teroksidasi, bergantung pada banyaknya zat itu terkena air panas atau udara, yang dapat berubah menjadi asam tanat. Asam tanat sebagai salah satu contoh tanin terhidrolisis (Hidjrawan, 2018).

Senyawa tanin bersifat sangat mudah larut dalam air, larut alkohol, larut aseton, larut gliserol hangat dan tidak larut dalam petroleum, kloroform dan eter (Amelia, 2015). Tanin merupakan senyawa yang memiliki gugus fenol dengan rasa yang sepat. Tanin dapat bereaksi dengan protein yang membentuk kopolimer yang tidak larut dalam air (Elya dkk, 2022).



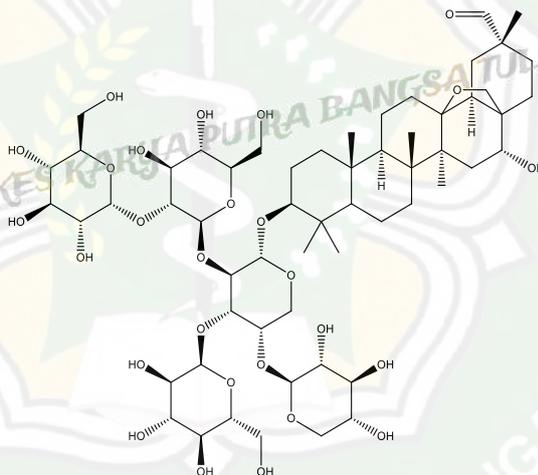
Gambar 2.4 Struktur Senyawa Tanin (Chemdraw, 2022).

Menurut Amelia (2015), metode pengujian kualitatif senyawa tanin dapat dilakukan dengan mengidentifikasi adanya tanin dan jenis tanin dengan cara :

- Dilakukan dengan uji FeCl_3 . Pengujian dilakukan dengan ekstrak ditambahkan tetes larutan FeCl_3 . Hasil positif tanin terhidrolisis akan memberikan endapan biru kehitaman dan hasil tanin terkondensasi memberikan endapan hitam kehijauan.
- Dilakukan dengan uji gelatin test. Ekstrak ditambah larutan gelatin 1% yang mengandung NaCl . Hasil positif tanin jika terjadi endapan.
- Dilakukan uji penambahan kalium ferricyanida dan ammonia. Hasil positif tanin pada ekstrak memberikan reaksi perubahan warna merah tua.
- Test for chlorogenic acid*. Penambahan larutan ammonia pada ekstrak yang kemudian dipapar ke udara, hasil positif tanin memberikan perubahan warna menjadi hijau.

2.5.4 Senyawa Saponin

Saponin merupakan golongan glikosida yang memiliki aglikon berupa steroid dan triterpenoid. Saponin memiliki berbagai kelompok glikosil yang terikat pada posisi C₃, tetapi beberapa saponin memiliki dua rantai gula yang menempel pada posisi C₃ dan C₁₇. Struktur saponin tersebut menyebabkan saponin bersifat seperti sabun atau deterjen sehingga saponin disebut sebagai surfaktan alami. Saponin steroid tersusun atas inti steroid (C₂₇) dengan molekul karbohidrat. dan jika terhidrolisis. Saponin memiliki sifat menyerupai sabun, dan senyawa aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air karena dapat menurunkan tegangan permukaan dan pada konsentrasi rendah dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah. Saponin dalam bentuk aglikon, terdiri dari sapogenin dan saponin steroid atau saraponin (Yanuarto dkk., 2017; Xu dkk., 2016; Elya dkk., 2022).



Gambar 2.5 Struktur Senyawa Saponin (Chemdraw, 2022).

Uji kualitatif senyawa saponin dapat dilakukan dengan cara menggunakan pereaksi warna. Pereaksi HCL 2% yang digunakan dengan cara 1 ml HCl pekat dan dilarutkan dalam 5 ml *aquadest* dan dilakukan pengocokan secara vertikal terlihat busa yang stabil. Hasil positif saponin diperoleh ketika menghasilkan busa stabil dan tidak hilang apabila ditambahkan HCl 2N (Martha & Fatimah, 2020).

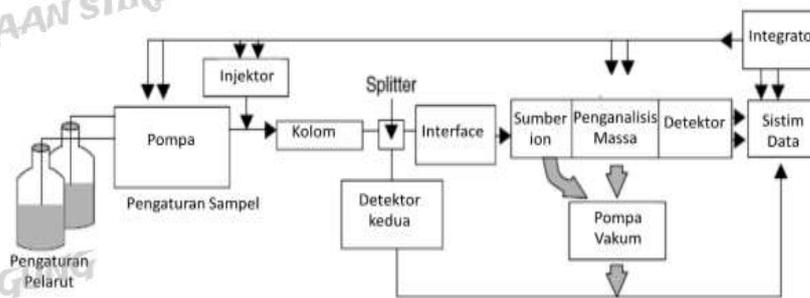
2.6 LCMS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*)

LCMS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) merupakan teknik analisis untuk mendeteksi dan mengidentifikasi informasi kuantitas dan identitas

senyawa spesifik dari suatu ekstrak. LCMS mengombinasikan kemampuan pemisahan fisik *Liquid Chromatography* (LC) yang digunakan untuk pemisahan sampel dan *Mass Spectrometer* (MS) yang mendeteksi muatan ion (Fatimah *et al.*, 2020). Hasil yang didapatkan berupa alur tinggi puncak dan bobot molekul dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak yang akan dikehui jumlah senyawa yang dikandung pada setiap sampel. Data LC-MS berupa informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu. Senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak) (Mangurana dkk., 2019).

Prinsip kerja dari LC-MS adalah dengan pemisahan analit berdasarkan kepolarannya, komponen alatnya terdiri atas kolom (sebagai fasa diam) dan larutan tertentu sebagai fasa geraknya, tekanan tinggi digunakan untuk mendorong fasa gerak. Berdasarkan kepolarannya campuran analit akan terpisah dan perbedaan kecepatan untuk sampai ke detektor (waktu retensinya) yang dapat teramati pada spektrum yang puncaknya terpisah. Bantuan pompa fasa gerak cair dialirkan melalui kolom menuju detektor. Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikan. Pemisahan komponen campuran terjadi di dalam kolom karena perbedaan kekuatan interaksi antara larutan terhadap fasa diam. Larutan yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih dulu. Sebaliknya, larutan yang kuat berinteraksi dengan fasa diam maka larutan tersebut akan keluar kolom, kemudian dideteksi oleh detektor dan direkam dalam bentuk kromatogram (Mangurana dkk., 2019).

Keuntungan analisis menggunakan LC-MS yaitu dapat menganalisis lebih luas dari berbagai komponen pada ekstrak, seperti senyawa termal labil, berpolaritas tinggi, memiliki selektivitas yang tinggi karena dapat mengenali dua sifat fisik analit pada sampel, yaitu rasio m/z dari ion induk dan ion produk, mampu mengidentifikasi analit dengan tepat berdasarkan waktu retensi sehingga meningkatkan spesifitas, bersifat fleksibilitas dalam mengembangkan analisa senyawa baru, karena mampu menghasilkan batas deteksi yang lebih rendah dibandingkan metode lain (Harmita dkk., 2019; Mangurana dkk., 2019).



Gambar 2.6 Skema LCMS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry)
(Mangurana dkk., 2019).

2.6.1 Komponen dasar LC-MS

Instrumen LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) merupakan terdiri atas *solvent reservoir system*, pompa, injektor, kolom, detektor, komputer untuk analisis dan mengolah sinyal detektor, Berikut penjelasannya menurut Harmita dkk (2019) :

2.6.1.1 Solvent manager

Solvent manager terdiri dari wadah dan pompa fase gerak. Wadah fase gerak bersifat bersih dan inert. Reservoir ini dilengkapi dengan sistem penghilangan gas dan penyaring khusus untuk mengisolasi fase gerak dari pengaruh lingkungan. Pompa berfungsi untuk mengalirkan fase gerak dari reservoir secara konstan. Pompa harus mampu menghasilkan tekanan 500 sampai 15000 psi dan menjamin penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan dan bebas dari gangguan. Jenis pompa yang paling umum digunakan adalah pompa tekanan tetap karena harganya yang terjangkau dan dapat bekerja pada berbagai laju alir. Pompa ini terdiri dari kepala pompa (terdapat piston dan seal), badan pompa, Katup check-valve yang dilengkapi inlet dan outlet untuk memungkinkan fase gerak masuk dan keluar ruang pompa dan cam-drive.

2.6.1.2 Sample manager

Merupakan tempat untuk meletakkan vial sampel dan jarum injektor yang berfungsi untuk menyuntikkan sampel ke dalam kolom. Suhu dapat diatur sesuai kondisi yang diinginkan. Injektor berfungsi memasukkan cuplikan ke dalam kolom yang dilakukan secara otomatis menggunakan autosampler. Jenis injektor yang paling umum digunakan adalah injektor loop-katup. Sampel disuntikkan ke loop,

kemudian injektor diaktifkan ke posisi inject. Autoinjektor sampel umumnya menggunakan jenis susunan loop dan katup ini, dengan sistem menarik sampel ke dalam loop. Pencucian pada autoinjektor digunakan untuk menghindari kontaminasi sampel yang terbawa ketika bergerak dari vial ke vial untuk inject berikutnya.

2.6.1.3 Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen di dalam senyawa yang dianalisis. Kolom biasanya terbuat dari bahan seperti stainless steel atau campuran gelas dengan logam untuk menahan tekanan tinggi. Penghubung harus dirancang tanpa ruang kosong. Isi kolom harus homogen dan stabil secara mekanik. Diameter partikel pengisi kolom berukuran $2,0 \mu\text{m}$ dan tekanan yang dihasilkan mencapai 15.000 psi, dengan panjang kolom umumnya berkisar antara 5-15 cm, ukuran tersebut akan menyebabkan efisiensi pemisahan sampel pada kolom menjadi lebih baik dan meningkatkan sensitivitas. Semakin kecil ukuran partikel, semakin pendek jalan difusi pada analit sehingga waktu yang diperlukan lebih singkat.

Spektrometri massa senyawa yang telah terpisah menjadi puncak-kromatografi yang berbeda, diteruskan ke spektrometri massa untuk dianalisis yang mencakup senyawa yang telah terpisah, eluen, dan reagen yang volatil. Komponen dari spektrometri massa adalah *ion source*, *mass analyzer*, dan detektor. Hal yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan *ion Source* (Sumber Pengion) adalah energi internal pada saat proses ionisasi dan sifat fisikokimia dari analit yang dapat diionisasi.

2.6.1.4 Mass analyzer

Ion dipisahkan setelah terbentuk ion fase gas berdasarkan massanya, sifat fisika ion yang diukur oleh mass analyzer adalah rasio massa terhadap muatan (m/z). Mass analyzer yang umum digunakan meliputi quadrupole, ion trap, time-of-flight (TOF). Ion yang masuk ke dalam ruang diantara batang hanya ion yang stabil dengan m/z tertentu yang sampai ke detektor. Jika m/z dan frekuensi tidak sesuai dengan kondisi yang diminta, ion beresilasi dengan jalur yang lebar yang menyebabkan ion bertubrukan dengan batang atau tertarik oleh vakum. Ion trap menganalisis ion dengan menjebak ion pada ruang yang dapat di deteksi oleh

elektroda berbentuk seperti cincin. Elektroda dihubungkan dengan voltase Rf dan dc. Tegangan Rf diberikan berubah-ubah, apabila Rf naik maka orbital ion bermassa berat akan stabil, sedangkan ion yang ringan tidak stabil dan akan terjadi tumbukan dengan dinding elektroda, kemudian di keluarkan menuju detektor. Time-of-flight menganalisis ion dengan mengumpulkan hasil kromatografi cair pada sumur pelat spotter, kemudian sampel dicampur dengan kromofor seperti asam amino krotonat yang menyerap cahaya dari tembakan laser (menggunakan laser UV) intensitas tinggi dalam sumber ion. Molekul target ini kemudian meledak, menjadi fase gas sambil mengionisasinya secara kimia. Fragmen-fragmen tersebut menuju ke flight tube melalui lensa fokus. Flight time dari setiap fragmen tergantung pada rasio m/z -nya. Fragmen yang lebih ringan tiba di detektor lebih dahulu. Untuk mendeteksi fragmen m/z , setiap elemen detektor berarus diode diaktifkan hanya untuk m/z tertentu, yang memungkinkan pemilihan hanya pada massa tunggal per ledakan.

2.6.1.5 Detektor

Detektor berfungsi untuk merekam muatan yang diinduksi atau arus yang dihasilkan ketika ion lewat atau mengenai permukaan yang akhirnya menghasilkan spektrum massa. Macam-macam detektor yang tersedia meliputi *electron multiplier* (EM), *Faraday cup*, *negative-ion detector*, *post-acceleration detector*, *channelectron multiple array* (CEMA), *daly detector*, dan *array detector*.

2.6.1.6 Komputer

Komputer digunakan untuk akuisisi dan pengolahan data yang digunakan secara sederhana sebagai perekam atau integrator, atau digunakan untuk mengendalikan semua komponen sistem dan memperoleh data puncak, mengukur luas area puncak, menentukan berat molekul komponen dari masing-masing puncak, mengidentifikasi ketidakmurnian, dan membandingkan pola fragmentasi puncak dengan database yang diketahui untuk mengidentifikasi senyawa yang pasti ada.

2.7 Uji Toksisitas

Toksisitas merupakan kerusakan yang disebabkan oleh zat kimia apa pun dalam suatu organisme yang dirancang untuk memprediksi konsentrasi racun dan durasi paparannya yang diperlukan untuk menghasilkan efek pada bagian yang

peka didalam maupun dibagian luar tubuh mahluk hidup (Singh & Zahra, 2017). Pada dasarnya, semua zat, bahan dan sediaan kimia baru yang akan digunakan pada manusia, hewan dan lingkungannya perlu diuji keamanannya, kemungkinan terdapat bahaya bagi kesehatan. Uji toksisitas ini sebagai langkah awal untuk mengetahui potensi toksik suatu zat (Astri dkk., 2012). Toksisitas suatu senyawa dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Uji toksisitas *in vitro* adalah suatu pengujian yang dilakukan di luar tubuh makhluk hidup, seperti pada sel, bakteri, organ terisolasi. Uji toksisitas *in vivo* merupakan suatu pengujian yang dilakukan di dalam tubuh makhluk hidup, seperti hewan uji. Uji toksisitas secara *in vivo* diklasifikasikan menjadi dua meliputi uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus. Uji toksisitas umum bertujuan untuk mengevaluasi keseluruhan efek toksik meliputi akut, subkronis dan kronis. Uji toksisitas khusus (teratogenik, mutagenik, dan karsinogenik) merupakan uji lanjutan untuk menentukan efek yang belum ditemukan pada uji toksisitas umum khusus (Aeni dkk., 2022).

Berikut jenis jenis toksisitas berdasarkan efek lamanya (waktu) pajanan (Kurniawidjaja dkk., 2021).

a. Toksisitas Akut

Toksisitas akut memiliki efek langsung setelah terpapar baik dalam hitungan detik, menit, jam, ataupun hari. Paparan akut biasanya berupa dosis tunggal atau serangkaian dosis yang diterima dalam periode waktu 24 jam.

b. Toksisitas Subkronik

Toksisitas subkronik terjadi dari paparan berulang selama beberapa minggu atau bulan. Paparan ini dapat dilihat umumnya untuk beberapa obat-obatan dan agen lingkungan.

c. Toksisitas Kronik

Toksisitas kronis merupakan kerusakan kumulatif pada sistem organ tertentu dan membutuhkan waktu berbulan-bulan atau bertahun-tahun untuk menjadi penyakit yang dapat dikenali. Dengan eksposur berulang atau eksposur jangka panjang secara terus menerus, kerusakannya menumpuk sampai kerusakan melebihi ambang batas toksisitas kronis. Akhirnya, kerusakan menjadi sangat parah sehingga organ tidak dapat lagi berfungsi secara normal dan berbagai efek kronis dapat terjadi.

Uji toksisitas merupakan uji untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat setelah terpapar atau pemberian dalam dosis tertentu dan digunakan untuk mengetahui pengaruh racun yang dihasilkan oleh dosis tunggal dari suatu campuran zat kimia pada hewan coba sebagai uji pra skrining senyawa bioaktif antikanker. Prinsip uji toksisitas adalah bahwa komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah (Jelita dkk., 2020).

Hasil uji toksisitas hanya memberikan petunjuk adanya efek toksik dan toksisitas relatif bila terjadi pada manusia yang tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/ sediaan pada manusia. Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil uji toksisitas secara *in vivo* dapat dipercaya adalah pemilihan spesies hewan uji, galur dan jumlah hewan, cara pemberian sediaan uji, pemilihan konsentrasi uji, teknik dan prosedur pengujian termasuk cara penanganan hewan selama percobaan (BPOM, 2014).

Tabel 2.2 Kategori Toksisitas LC₅₀ Bahan (Hamidi *et al.*, 2014).

Kategori	LC ₅₀
Sangat toksik	0 – 100 µg/ml
Toksik sedang	100 – 500 µg/ml
Toksik rendah	500 – 1000 µg/ml
Tidak toksik	>1000 µg /ml

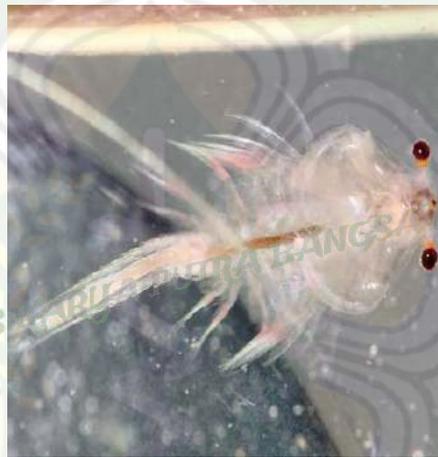
2.8 Uraian *Artemia Salina* Leach

Artemia salina Leach (Gambar 2.7) merupakan golongan udang udangan yang berukuran kecil. Bentuk dewasanya mencapai ukuran 1 cm, kurang lebih sama ukurannya dengan jambret (*Mysidanceae*) yang diklasifikasikan sebagai organisme primitif pada perpatan garam tinggi dengan umur sekitar 100 juta tahun yang lalu, yang dimana pada tahun 1758 Linny menamai dengan *Cýncer salinus*, lalu 61 tahun kemudian pada tahun 1819 diubah menjadi *Artemia salina* oleh Leach dan pertama kali ditemukan di danau Urmia pada tahun 982 oleh seorang ahli geografi Iran. *Artemia salina* memiliki sistem pencernaan, peredaran darah, dan syaraf yang sederhana. Spesies *Artemia* mempunyai nama lokal bermacam-macam sesuai dengan negaranya, *brine shrimp* (Inggris), *brineworm* (Belanda), *saltzierchen* dan

fezzanwurum (Jerman), *Verme de sale* (Italia, Spanyol), *Sofereg* (Rusia), *bahar el dud* (Arab) dan masih banyak lagi. Biasanya ditemukan dan dijual dalam bentuk kaleng dengan berat bermacam-macam : 365 gram, satu pound (453 gram), bahkan ada yang seberat 5 kg. *Artemia* dewasa memiliki ukuran panjang tubuh sekitar 11-13 mm tergantung asal habitatnya. *Artemia* tidak dapat berpindah ke biotop lain kecuali introduksi oleh hewan lain maupun manusia. *Artemia* akan memakan *phytoplankton* dan bakteri yang hidup pada salinitas tinggi (Panggabean, 1984; Dumitrascu, 2011; Maisoni, 2017).

2.8.1 Klasifikasi *artemia salina* Leach

Klasifikasi *Artemia salina* Leach menurut Dumitrascu (2011) :



Gambar 2.7 *Artemia salina* Leach (Dumitrascu, 2011).

Kingdom	: Animal
Phylum	: Arthropoda
Subphylum	: Crustacea
Class	: Branchiopoda
Order	: Anostraca
Family	: Artemiidae
Genus	: Artemia
Species	: <i>Artemia salina</i> (L)

2.8.2 Morfologi *artemia salina* Leach

Tubuh *Artemia salina* (Gambar 2.7) terdiri dari tiga bagian: kepala, dada dan perut. *Artemia salina* menunjukkan dimorfisme seksual, perbedaan morfologi

antara jantan dan betina diamati pada jarak maksimum antara mata majemuk, panjang antena pertama, lebar ruas perut ketiga, panjang total, diameter mata majemuk, panjang perut. Jantan dewasa memiliki panjang mencapai 8-10 mm, dan betina memiliki panjang mencapai 10-12 mm. Warna dari spesies ini bervariasi tergantung konsentrasi garam dalam air. Darah mengandung pigmen hemoglobin. Dalam lingkungan yang cocok seperti panas, sinar matahari, dan berbagai konsentrasi garam memungkinkan mereka untuk mengembangkan populasi ketika kondisinya tepat untuk berkembang biak. Organisme ini dapat mentolerir periode tahap pengeringan dan kista untuk melanjutkan siklus hidup ketika kondisinya tepat untuk berkembang dan bereproduksi. *Artemia* jantan memiliki dua organ reproduksi dan rahim *A. salina* betina dapat mengandung hingga 200 telur. Cara reproduksinya adalah dengan ovovivipar. Spesies ini menghasilkan telur yang mengapung di atas air dan dapat berkembang langsung menjadi nauplia (larva) atau pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (pengeringan air) berubah menjadi kista (bentuk kehidupan yang tidak aktif) yang dapat bertahan dalam periode pengeringan yang lama. Jika kondisi lingkungan membaik, kista hidup kembali dan nauplia menetas. Dalam kondisi alami, *Artemia salina* akan memakan alga, protozoa, dan detritus (Dumitrascu, 2011).

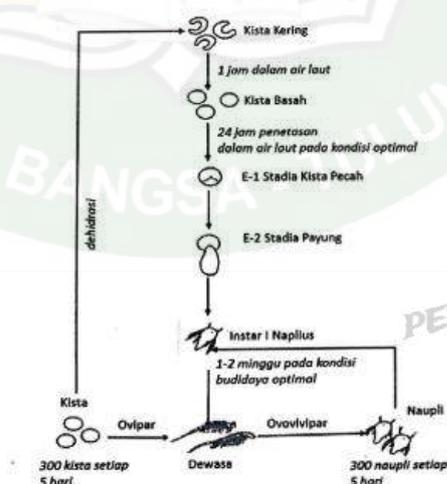
2.8.3 Habitat dan lingkungan hidup *artemia salina* Leach

Artemia salina Leach memiliki pertahanan luar biasa pada perubahan dan dapat bertahan hidup pada variasi salinitas air yang luas dari air laut dalam (2.9-3.5%) sampai *the great salt lake* (25-35%), dan masih dapat bertoleransi pada kadar garam dengan kejenuhan 50%. *Artemia salina* Leach dapat bertahan hidup dengan baik di kondisi kadar garam yang tinggi, karena tidak semua jenis hewan laut dapat hidup, namun meskipun begitu pada perkembangbiakan telur *Artemia salina* Leach membutuhkan air dengan kadar garam yang lebih rendah. *Artemia salina* Leach dapat ditemui di beberapa rawa asin yang hanya pada pedalaman bukit pasir pantai dan juga dapat dijumpai di kolom evaporasi garam dari laut buatan manusia. Insang membantunya agar cocok dengan kadar garam tinggi. Dapat bertahan hidup pada variasi temperatur air yang tinggi pula, dari 6-37°C dengan temperatur optimal untuk reproduksi pada 25°C (suhu kamar). Keuntungan hidup pada tempat berkadar

garam tinggi adalah predator namun sumber makanannya sedikit (Mudjiman A., 1988; Emslie, 2003; *Artemia Reference Center*, 2007).

2.8.4 Reproduksi dan Siklus hidup *Artemia salina* Leach

Perkembangan serta siklus hidup *Artemia salina* dibedakan menjadi dua golongan yaitu, perkembangan secara biseksual dan secara partenogenetik yang dapat terjadi secara ovipar ataupun ovovivipar. Telur terbentuk dalam sepasang ovari yang posisinya disamping saluran pencernaan dibelakang toracopoda. Telur yang telah sempurna dipindahkan dari ovari ke kantung telur (*ovisac*) melalui saluran telur (*oviduct*), anakan yang keluar dari induknya dinamakan nauplis. Precopulasi ditandai dengan penempelan tubuh *Artemia* jantan ke *Artemia* dewasa yang disebut sebagai "*riding position*". Selama proses kopulasi, *Artemia* jantan mentransferkan sperma ke dalam uterus *Artemia* betina sehingga pembuahan terjadi dalam uterus. Perkembangan embrionik terjadi di dalam uterus. Strain parthenogenetik tidak terjadi pembuahan, telur langsung berkembang menjadi nauplius sesaat setelah telur sampai di uterus. Jika tidak, telur akan dilapisi cangkang sehingga membentuk sista. Proses ini dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Jika kondisi lingkungan baik maka naupli akan dilepaskan. Jenis reproduksi ini dikenal sebagai ovovivipar. Jika kondisi lingkungan kurang menguntungkan untuk kelangsungan hidup naupli, embrio akan dilepaskan dalam bentuk sista (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2016).



Gambar 2.8 Siklus hidup *Artemia salina* Leach (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2016).

Naupli yang baru menetas panjangnya sekitar 400 - 500 mikron dan berat 0,002 mg. *Artemia* berkembang dari nauplius menjadi dewasa melalui tahapan perkembangan menjadi metanauplius, post metanauplius dan post larva dengan melakukan 15 kali *moulting* (ganti kulit). Pada tahap 10 larva, morfologi tumbuh dan berfungsi secara baik. Selama pertumbuhan dimensi panjang meningkat sebanyak 20 kali sedangkan biomassa meningkat sebanyak 500 kali. *Artemia* dapat hidup selama 6 bulan. Setelah memasuki masa dewasa, *Artemia* dapat mengeluarkan 30 nauplius/sista dalam satu kali masa produksi dengan interval 5 - 7 hari selama masa hidupnya. Dalam kondisi lingkungan yang baik, *Artemia* berkembangbiak secara ovovivipar (melepaskan nauplius), sedangkan pada kondisi sebaliknya *Artemia* akan mengeluarkan sista untuk menjamin kelangsungan hidup keturunannya. *Artemia* merupakan kelompok hewan yang sangat tahan terhadap lingkungan ekstrem, di mana hingga kadar garam 170 g/L masih dapat bertahan hidup, sementara kelompok organisme lain sudah tidak tahan hingga 90 g/L. Pada kondisi normal (kadar garam di bawah 60 g/L) akan melangsungkan regenerasinya dengan melepaskan naupli secara langsung (ovovivipar), namun jika kadar garam sudah mencapai di atas 120 g/L maka sista akan terbentuk secara sempurna untuk mempertahankan generasinya dikemudian hari saat lingkungan sudah membaik (ovipar) (Kementrian Kelautan dan Perikanan, 2016).

Proses penetasan *Artemia salina* Leach melalui beberapa tahap yang diantaranya (Rachutami *et al.*, 2022):

a. Tahap hidrasi

Pada tahap ini terjadi penyerapan air sehingga kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme.

b. Tahap pecah cangkang

Tahap kedua adalah tahap pecah cangkang yang disusul tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum nauplius keluar dari cangkang

c. Tahap payung atau tahap pengeluaran.

Pada tahap ini terjadi beberapa saat sebelum nauplius keluar dari cangkang.

Hal hal yang harus diperhatikan untuk mendapatkan hasil penetasan yang baik adalah parameter dari air, diantaranya adalah:

a. Suhu

Suhu sangat mempengaruhi lamanya waktu penetasan kista *Artemia salina* Leach, dan suhu optimal untuk penetasan kista *Artemia salina* adalah 26-29°C. Pada suhu dibawah 25°C *Artemia* akan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menetas dan pada suhu diatas 33°C dapat menyebabkan kematian kista (Tombinawa dkk., 2016).

b. pH

pH merupakan salah satu faktor lingkungan yang tidak dapat ditolerir oleh *Artemia*. Keasaman atau pH air media pemeliharaan *Artemia* berkisar antara 7-8,5 dan untuk penetasan *Artemia* mencapai optimal pada pH 8-9, karena pada pH tersebut enzim penetasan bekerja optimal. Media air laut yang digunakan dalam pertumbuhan optimal adalah 7-8,5, penurunan pH di bawah 7 dapat menyebabkan kematian, penetasan kista memerlukan pH yang sedikit basa 8-9 (Aliyas & Samsia, 2019).

c. Oksigen dan Salinitas

Salinitas merupakan faktor lingkungan yang sangat mempengaruhi proses reproduksi dan kelangsungan hidup *Artemia salina* Leach. Salinitas kurang dari 60 ppt dan kandungan oksigen cukup, induk betina akan menghasilkan nauplius, dan jika kondisi perairan memiliki salinitas lebih dari 100 ppt dan kandungan oksigen rendah maka induk betina akan menghasilkan telur yang kemudian mengalami dehidrasi hingga membentuk dormane dan menjadi kista. kista *Artemia* dapat ditetaskan pada media yang mempunyai salinitas 5-35 ppt, walaupun pada habitat aslinya dapat hidup pada salinitas yang sangat tinggi, jika kondisi media perairan normal dengan salinitas yang rendah < 60 ppt dan kandungan oksigen cukup maka induk betina akan melahirkan burayak atau larva yang lebih dikenal dengan nauplius pada stadia instar satu yang bentuknya lonjong dengan pangjang sekitar 0,4 mm dan beratnya 15 µg yang berwarna kemerahan dengan membawa cadangan kuning telur sehingga larva ini belum memerlukan makanan (Tombinawa dkk., 2016).

2.8.5 Perilaku *Artemia salina* Leach

Larva udang *Artemia salina* Leach ini bersifat fototaksis positif yang berarti menyukai cahaya, yang ditunjukkan ketika adanya gerakan menuju sumber cahaya alami ketika di alam, larva ini saat siang hari akan berada di permukaan laut dan pada malam hari akan tenggelam berada di bawah laut. Namun cahaya yang dimaksud tidak terlalu tinggi karena akan menyebabkan respon fototaksis negatif, sehingga cahaya akan ia jauhi. *Artemia salina* Leach yang baru menetas mempunyai perilaku geotaksis positif, yang terjadi akibat efek gravitasi adalah nauplius akan tenggelam ke bawah setelah menetas. Gerakan *phyllopodia* mendorong makanan bergerak ke anterior (lokomosi). Gerakan anggota tubuhnya untuk mendorongnya menuju arah sumber makanan (Hamida, 2016).

2.8.6 Penggunaan *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji

Artemia salina termasuk kedalam jenis udang udangan kecil tingkat rendah yang digolongkan sebagai zooplankton (Tombinawa dkk., 2016). Larva *Artemia salina* Leach dianggap mewakili organisme zoologis untuk uji kematian secara in vivo. Hasil uji menunjukkan adanya korelasi positif dari sifat toksisitas senyawa uji terhadap hambatan proliferasi terhadap karsinoma nasofaring (Chusniasih & Tutik, 2020). Hewan uji *Artemia salina* Leach dapat digunakan tes skrining dalam menentukan toksisitas suatu ekstrak pada tanaman berdasarkan uji yang tepat dan terjangkau. *Artemia salina* Leach digunakan uji toksisitas pada tahap nauplii atau tahap larva yang sering dimanfaatkan sebagai hewan uji aktivitas biologi terhadap ekstrak tanaman, hal ini dikarenakan *Artemia salina* Leach pada tahap nauplii sangat mirip dengan sel kanker manusia dari *DNA-dependent RNA polymerase* pada *Artemia salina* Leach mirip dengan *DNA-dependent RNA polymerase* pada mamalia (Aqiila dkk., 2017).

Penggunaan larva udang *Artemia salina* Leach karena memiliki sifat yang peka terhadap bahan uji, waktu siklus hidup yang lebih cepat, dan mudah dibiakkan. Sifat peka *Artemia salina* kemungkinan disebabkan oleh membran kulitnya yang sangat tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dan lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya (Nuralifah dkk., 2021). Uji dengan larva udang ini sesuai untuk aktifitas farmakologi dalam ekstrak tanaman yang bersifat toksik yang memiliki beberapa keuntungan antara lain efektif, efisien,

mudah, murah, menggunakan alat yang sederhana karena tidak diperlukan teknik aseptik (Sarah *et al.*, 2017).

Berdasarkan uraian tersebut maka larva *Artemia salina* Leach dapat digunakan untuk uji sitotoksik. Larva udang memiliki kulit yang tipis dan peka terhadap lingkungannya sehingga banyak digunakan dalam uji toksisitas. Zat atau senyawa asing yang ada di lingkungan akan terserap ke dalam tubuh secara difusi dan langsung memengaruhi kehidupannya. Larva udang yang sensitif ini akan mati apabila zat atau senyawa asing tersebut bersifat toksik (Jelita dkk., 2020).

2.9 Uraian Metode BSLT Sebagai Pengujian Antikanker

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) diperkenalkan pertama kali oleh Michael., *et al* pada tahun 1956. Metode pengujian ini diusulkan sebagai bioassay sederhana untuk pemantauan aktivitas farmakologi ekstrak bahan alami tumbuhan yang didasarkan pada senyawa aktif dari tanaman dengan sifat toksik dan dapat membunuh larva *Artemia salina* Leach yang dapat digunakan sebagai tes pra skrining untuk aktivitas antikanker. Metode pengujian ini dapat digunakan sebagai bioassay pendahuluan sebelum melanjutkan ke tahap uji yang lebih rumit untuk aktivitas farmakologi tertentu. Keunggulan dari metode ini adalah efektif, murah, membutuhkan relatif sedikit sampel, dan pengujian dan alat yang sederhana. Metode BSLT mampu mengetahui batas keamanan penggunaannya untuk tujuan pengobatan (Rasyid dkk., 2022).

BSLT merupakan salah satu metode awal yang sering dipakai untuk mengamati toksisitas senyawa dan merupakan metode penapisan senyawa kimia untuk aktivitas antikanker dalam ekstrak tanaman. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) telah diterapkan sebagai teknik bioassay yang alternatif untuk menyaring toksisitas ekstrak tumbuhan, toksisitas logam berat dan ion logam, toksisitas *cyanobacteria* dan ganggang, sitotoksitas bahan gigi, toksisitas nanopartikel (Hamidi *et al.*, 2014).

Uji toksisitas yang terdapat pada metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) merupakan uji toksisitas akut yang memerlukan penentuan waktu yang relatif singkat selama 24 jam setelah pemberian larutan uji terhadap efek toksik dari suatu senyawa. Prosedur pada metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) adalah

dengan menentukan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration*) yang di dapatkan dari aktivitas zat aktif suatu tanaman terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Tingkatan pada nilai toksisitas ekstrak dapat ditentukan menggunakan hasil dari perhitungan nilai LC_{50} nya. LC_{50} merupakan konsentrasi dari suatu senyawa kimia di udara atau dalam air yang dapat menyebabkan 50% kematian pada suatu populasi hewan uji atau makhluk hidup tertentu. Penggunaan LC_{50} dimaksudkan untuk pengujian ketoksikan dengan perlakuan terhadap hewan uji secara berkelompok yaitu pada saat hewan uji dipaparkan suatu bahan kimia melalui udara maka hewan uji tersebut akan menghirupnya atau percobaan toksisitas dengan media air. Nilai LC_{50} dapat digunakan untuk menentukan tingkat efek toksik suatu senyawa sehingga dapat juga untuk memprediksi potensinya sebagai antikanker. Perhitungan nilai LC_{50} akan diketahui menggunakan analisis probit. Analisis probit merupakan salah satu jenis regresi yang digunakan untuk menganalisis variabel respon binomial. Probit analisis umumnya digunakan dalam toksikologi untuk menentukan toksisitas relatif bahan kimia hewan hidup. Hal ini dilakukan dengan menguji respons suatu organisme di bawah berbagai konsentrasi bahan kimia dan kemudian membandingkan konsentrasi terjadinya respon (Singh & Zahra, 2017). Persentase data kematian pada larva *Artemia* setelah pengujian toksisitas dapat dikonversikan menjadi nilai probit untuk dilanjutkan dalam menentukan LC_{50} . Apabila suatu ekstrak memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ maka senyawa yang telah diuji tersebut dapat diidentifikasi sebagai senyawa toksik dan dapat disimpulkan bahwa tanaman tersebut dapat digunakan dalam pengujian lanjutan yakni pengujian antikanker menggunakan biakan sel kanker secara *in vivo* (Jelita dkk., 2020; Salam & Agustina, 2021).

2.10 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

- 2.10.1 Senyawa bioaktif yang terkandung dalam infusa kulit batang tanaman majapahit memiliki potensi sebagai kandidat antikanker.
- 2.10.2 Uji toksisitas yang terkandung dalam infusa kulit batang tanaman majapahit terhadap larva udang *Artemia salina* Leach memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi, neraca analitik (*Kern*), panci (*Maspion*), pisau (*Freemir*), corong (*Swan house*), kompor (*Rinnai*), tabung gas LPG, kertas saring (*Whatman*), spatula stainless, beaker gelas (*Pyrex*), pipet (*Onemed*), rotary vacuum evaporator PC 620 select, termometer (*GEA*), aerator (*Hikari*), akuarium, alat pengatur oksigen AA-350, vial, kaca pembesar (*Joyko*), *Shimadzu LC-MS*.

3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*), aquadest, pereaksi kloroform, pereaksi ammonia, H₂SO₄ pekat (*Merck*), pereaksi mayer (*Merck*), dragendorff (*Merck*), HCL (*Merck*), DMSO, Mg (*Merck*), HCl, FeCl₃ 5% (*Merck*), CH₃COOH (*Merck*), ragi (*Fermipan*), garam ikan, larva udang *Artemia salina* Leach.

3.3 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Botani Prodi Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung. Laboratorium Kimia Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

3.4 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah tumbuhan majapahit (*Crescentia cujete*) yang diperoleh di Desa Wates, Sumbergempol, Tulungagung.

3.5 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) yang diperoleh di pekarangan balai Desa Wates, Sumbergempol, Kabupaten Tulungagung.

3.6 Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan sesuatu hal yang telah ditetapkan oleh peneliti dalam bentuk apapun yang dipergunakan untuk memperoleh informasi keterkaitan logis dengan variabel lain berdasarkan teori dan paradigma ilmu yang mendasarinya, sebagai indikator, dimensi, dan pilihan instrumen keilmuan yang akan digunakan data penelitian beserta turunannya, berkaitan tentang hal tersebut untuk dipelajari dan kemudian dapat diambil kesimpulannya (Ulfa, 2021). Dalam penelitian ini variabel yang dipergunakan meliputi variabel bebas, variabel kontrol dan variabel terikat.

3.6.1 Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel dari suatu kondisi atau nilai yang menjadi penyebab atau memiliki pengaruh terhadap variabel lain, variabel ini bisa dirancang dan diimplementasikan oleh peneliti yang berdampak pada hasilnya (Ulfa, 2021). Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan adalah infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dengan variasi konsentrasi 1000ppm, 900ppm, 800ppm, 700ppm, 600ppm, 500ppm, 400ppm, 300ppm, 200ppm, 100ppm yang dilakukan pengujian toksisitas akut menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Letality Test*).

3.6.2 Variabel kontrol

Variabel kontrol merupakan variabel yang dapat dikendalikan sehingga didapatkan hasil konstan yang dapat mempengaruhi variabel bebas terhadap variabel terikat (Ulfa, 2021). Dalam penelitian ini variabel kontrolnya adalah air laut buatan, pH air laut buatan 7 sampai 8, suhu dalam proses penetasan larva udang 25⁰C sampai 30⁰C, wadah yang digunakan dan usia larva *Artemia salina* (selama 48 jam) dalam uji BSLT.

3.6.3 Variabel terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang muncul yang disebabkan oleh adanya perubahan akibat variabel bebas (Ulfa, 2021). Variabel terikat pada penelitian ini adalah senyawa yang muncul pada infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dan nilai LC₅₀ yang diperoleh.

3.7 Determinasi Tanaman

Sampel tanaman kulit batang majapahit (*Crescentia cujete*) dideterminasi di UPT Materia Medika Batu Malang, Jawa Timur pada bulan Oktober 2022. Tujuan dilakukannya determinasi tanaman untuk mengetahui dan memastikan identitas tanaman yang akan digunakan (Idris, 2019).

3.8 Penyiapan Sampel

3.8.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan purposive sampling yaitu pengambilan sampel berdasarkan kriteria yang diinginkan (Mangurana dkk., 2019). Sampel kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan pengambilan di pekarangan balai desa yang terletak di Desa Wates, Sumbergempol, Tulungagung.

3.8.2 Pengolahan Sampel

Setelah pengambilan sampel kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan bahan baku atau sampel kulit batang dari kotoran-kotoran atau bahan asing lainnya yang masih melekat pada kulit batang. Setelah itu sampel dipotong kecil kecil.

3.9 Pembuatan Infusa

Pembuatan infusa pada kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan menimbang kulit batang yang telah dipotong kecil sebanyak 1500 gram untuk di letakkan di panci menggunakan pelarut *aquadest* sebanyak 3000 ml (Morilla *et al.*, 2015). Sampel kemudian di rebus diatas kompor dan diatur suhunya dengan termometer dengan suhu yang stabil 90°C, selama 30 menit, lebih lama dari daun karena kulit batang bertekstur keras sehingga membutuhkan waktu lebih lama sedikit, waktu terhitung setelah suhu dalam panci mencapai 90°C, sambil sesekali diaduk. Hasil rebusan disaring dengan menggunakan saringan selagi masih hangat. Kemudian dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* dengan tujuan untuk menghilangkan pelarut dari hasil infusa. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\%Rendemen = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat bahan baku (kering)}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.1})$$

3.10 Skrining Uji Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan pengujian terhadap golongan senyawa metabolit sekunder pada suatu ekstrak yang akan diuji dalam suatu tumbuhan. Dalam penelitian ini, skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi tertentu dengan hasil yang menunjukkan ada atau tidaknya senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan tersebut (Syaron dkk., 2020).

3.10.1 Alkaloid

Skrining fitokimia senyawa alkaloid infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2 gram ekstrak, yang sudah dilarutkan dengan DMSO, lalu ditambahkan 9 mL *aquadest* kemudian ditambahkan dengan 1 mL asam sulfat (H_2SO_4) 2N lalu dipanaskan selama 30 menit. Didiamkan hingga sampai larutan terbentuk dua lapisan (memisah). Lapisan atas (asam sulfat) diuji dengan pereaksi dragendorff, mayer, dan wagner sebanyak 4 sampai 5 tetes. Hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan jingga pada pereaksi Dragendorff, terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer dan terbentuknya endapan coklat pada pereaksi Wagner (Puspa dkk., 2017).

3.10.2 Flavonoid

Skrining fitokimia senyawa flavonoid infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,5 gram ekstrak yang kemudian ditambahkan dengan 5 mL akuades, dipanaskan selama 5 menit, dan disaring. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat kemudian dikocok. Uji positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Dewi dkk., 2021).

3.10.3 Tanin

Skrining fitokimia senyawa tanin infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara mengambil 0,2 g ekstrak dengan DMSO 1 ml, kemudian dilakukan pengadukan hingga larut. Kemudian tambahkan dengan $FeCl_3$ 2 sampai 3 tetes. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya hitam kebiruan hingga hijau (Sri Irianty & Yenti, 2014).

3.10.4 Saponin

Skrining fitokimia senyawa saponin infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara penambahan 1 ml ekstrak dilarutkan

pada 5 ml *aquadest*. Kemudian ditambahkan pereaksi HCL 2% 1 ml dan dilakukan pengocokan secara vertikal sehingga terlihat busa yang stabil. Hasil positif saponin diperoleh ketika menghasilkan busa stabil dan tidak hilang (Martha & Fatimah, 2020).

3.11 Analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

Identifikasi senyawa infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) setelah di *rotary evaporator* akan dianalisa menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*). Pada uji ini sampel infusa kental kulit batang tanaman majapahit dilakukan di Laboratorium Kimia UMM (Universitas Muhammadiyah Malang) yang kemudian di analisa senyawa.

3.12 Penyiapan Uji Toksisitas Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode uji sitotoksik yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker yang berasal dari suatu tanaman. Metode ini dipilih karena mudah dikerjakan dan tidak membutuhkan waktu yang lama dan terbukti cukup akurat dalam hasilnya. Metode dari BSLT ini adalah dengan menghitung LC_{50} dari konsentrasi suatu ekstrak uji, terhadap kematian larva udang setelah masa inkubasi selama 24 jam (Muaja dkk., 2013).

3.12.1 Pembuatan Air Laut Buatan

Pembuatan air laut buatan 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).

3.12.2 Penetasan Telur *Artemia salina* Leach

Penetasan larva udang dilakukan dibawah penerangan sinar lampu ruangan dan diaerasi selama 24 jam pada suhu kamar di akuarium yang telah dilengkapi aerator. Larva udang *Artemia salina* Leach digunakan untuk uji setelah berusia 48 jam. Penambahan larutan ragi 0,06% setelah larva berumur 24 jam untuk setiap 1 liter air laut buatan pada wadah penetasan untuk menghindari kematian larva setelah 24 jam (Aqiila dkk., 2017).

3.12.3 Pembuatan Konsentrasi Perlakuan Ekstrak

Rancangan percobaan dalam penelitian ini terdapat 6 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 10 kelompok perlakuan (konsentrasi). Total 11 perlakuan akan direplikasi menjadi tiga kali setiap kelompok. Setiap konsentrasi berisi sepuluh larva udang *Artemia salina* Leach.

Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Konsentrasi	Replikasi	Jumlah <i>A. Salina</i>
Kontrol negatif	3	30
1000 ppm	3	30
900 ppm	3	30
800 ppm	3	30
700 ppm	3	30
600 ppm	3	30
500 ppm	3	30
400 ppm	3	30
300 ppm	3	30
200 ppm	3	30
100 ppm	3	30

3.13 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Uji

Pembuatan larutan stok ekstrak uji sampel dengan cara menyiapkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/ml sebanyak 100 ml dengan cara melarutkan 100 mg ekstrak kental kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dengan DMSO 2% yang kemudian ditambahkan air garam (air laut buatan) sampai 100 ml. Setelah itu dibuat dengan seri konsentrasi 1000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, 100 ppm dengan cara mengambil masing masing 10 ml, 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml dari larutan induk kemudian ditambahkan sampai 10 ml air laut buatan pada setiap vial.

3.14 Pelaksanaan Uji Toksisitas

Pelaksanaan uji toksisitas akut menggunakan larva *Artemia salina* Leach dilakukan dalam dengan cara membagi larva udang yang telah berumur 48 jam pada tempat atau wadah (vial) yang dilakukan dengan memasukkan 1 mL air laut buatan yang berisi 10 ekor larva udang dan ditambahkan konsentrasi 1000ppm, 900ppm, 800ppm, 700ppm, 600ppm, 500ppm, 400ppm, 300ppm, 200ppm, 100ppm dari larutan stok ekstrak (1000 µg/mL). Volume setiap vial dicukupkan hingga 10 ml dengan penambahan air laut. Setiap konsentrasi ekstrak diuji sebanyak tiga kali replikasi (Chusniasih & Tutik, 2020). Diamkan dan diamati kematian larva tiap-tiap kelompok perlakuan dalam 24 jam. Kriteria standar untuk mengukur kematian larva udang yaitu apabila larva udang *Artemia salina* Leach tidak menunjukkan pergerakan selama 10 detik pengamatan. maka larva *Artemia salina* Leach dapat dikatakan mati (Idris, 2019). Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan % kematian. Rumus presentase kematian larva (Rasyid *et al.*, 2022). Dapat dilihat pada Persamaan (3.2)

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

(Persamaan 3.2)

Namun, apabila pada kontrol negatif ada larva yang mati, maka % kematian ditentukan dengan menggunakan rumus (Rasyid *et al.*, 2022) pada persamaan 3.3

$$= \frac{\% \text{ kematian larva} - \text{jumlah larva yang mati} - \text{jumlah larva kontrol negatif yang mati}}{\text{jumlah larva awal uji}} \times 100\%$$

(Persamaan 3.3)

Setelah mengetahui kematian larva *Artemia salina* Leach, kemudian dicari angka probit melalui gambar berikut :

%	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 Transformation of Percentages to Probits (Hamidi et al., 2014).

Setelah data % kematian dan nilai probit didapatkan ditransformasikan ke dalam log konsentrasi, lalu dimasukkan data hasil yang diperoleh seperti dibawah ini :

Tabel 3.2 Hasil Model Tabel Data Probit Analisis

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Probit	% dead	Mortality	Total Larva
Kontrol negatif					30
1000 ppm					30
900 ppm					30
800 ppm					30
700 ppm					30
600 ppm					30
500 ppm					30
400 ppm					30
300 ppm					30
200 ppm					30
100 ppm					30

Pengujian toksisitas akut pada penelitian ini kemudian diolah menggunakan *Microsoft Excel* untuk mencari regresi linier berdasarkan grafik garis (Idris, 2019). Dari grafik tersebut didapatkan persamaan 3.4

$$y = mx + b \quad (\text{Persamaan 3.4})$$

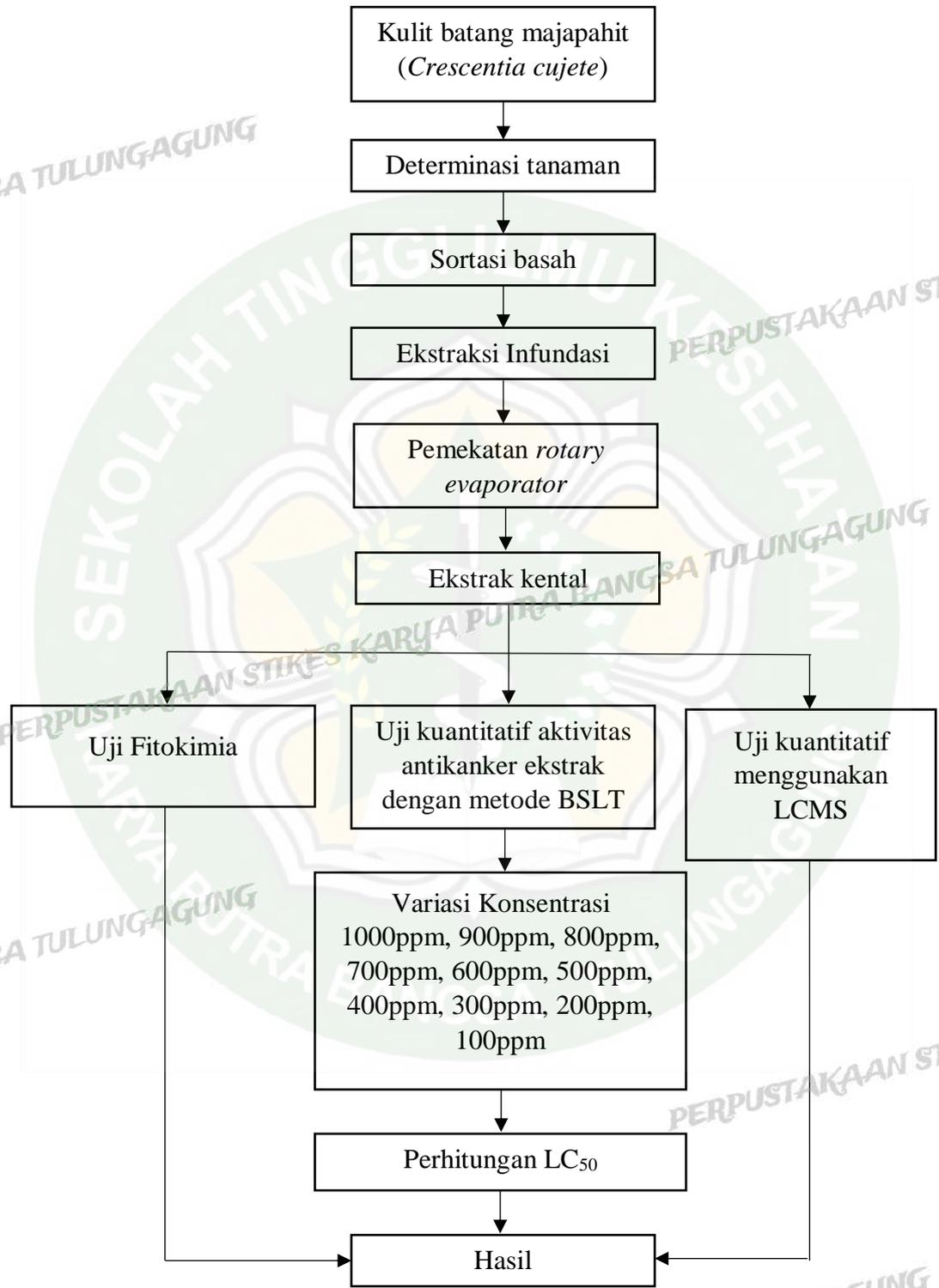
Keterangan :

$b = \text{intersept}$ (titik pertemuan x dan y)

$m = \text{slope}$

Slope merupakan nilai koefisien regresi untuk variabel X, sedangkan *intersept* merupakan nilai rata-rata variabel Y apabila variabel X memiliki nilai 0. Berdasarkan hasil persamaan linier yang didapatkan. Perhitungan LC_{50} dapat ditentukan dengan nilai x, dan memasukkan nilai 5 untuk variabel y, dimana 5 adalah probit dari 50% kematian hewan. Kemudian nilai x dari LC_{50} dikonversikan ke bentuk antilog, dan didapatkan hasil LC_{50} .

3.15 Kerangka Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Penelitian

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Botani STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung, Laboratorium Kimia yang bertempat di Universitas Brawijaya Malang, pada tanggal 13 Februari 2023 – 19 Februari 2023, serta di ruang Instrumentasi LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) bertempat di Universitas Muhammadiyah Malang, pada tanggal 21 Februari 2023 - 26 Maret 2021. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut (LC_{50}) infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, dengan tahapan penelitian yang dimulai dari pembuatan infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dengan metode infundasi, dilanjutkan dengan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* yang bertempat di Universitas Brawijaya, kemudian pengujian secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan analisis LCMS, dan pengujian toksisitas menggunakan metode BSLT (*Bhrine Shrimp Lethality Test*). Hasil penelitian yang sudah dilakukan, didapatkan hasil sebagai berikut:

4.1 Determinasi Tanaman

Sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tanaman majapahit. Kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan determinasi untuk mengetahui dan memastikan kepastian identitas tanaman yang akan digunakan. Determinasi tanaman majapahit dilakukan di Materia Medika, Batu. Berdasarkan buku “FLORA: untuk sekolah di Indonesia” karangan Van Steenis, CGGJ (2008) hasil determinasi tanaman majapahit adalah sebagai berikut:

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

Jenis : *Crescentia cujete* L

Nama umum : Majapahit, mojomahit, mojom, maja, berenuk, berunuk (Jawa); tabu kayu (Melayu); bila balanda (Makasar); buah no (Ternate).

Berdasarkan hasil determinasi tersebut menunjukkan apabila tanaman majapahit yang digunakan dalam penelitian dapat dipastikan merupakan dari jenis *Crescentia cujete* dan suku Bignoniaceae. Hasil keterangan determinasi tanaman majapahit dapat dilihat pada lampiran 1.

4.2 Penyiapan Sampel

Proses penyiapan sampel kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan beberapa tahap yaitu, pengumpulan bahan baku kulit batang yang sudah terpisah dengan daunnya. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode purposive sampling yang artinya pengambilan sampel berdasarkan kriteria yang diinginkan oleh peneliti. Sampel kulit batang ditimbang sebanyak 1500gram. Tahap selanjutnya yaitu, dilakukan sortasi basah pada sampel kulit batang yang sudah ditimbang. Dilakukan sortasi basah bertujuan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada sampel yang akan digunakan (Rina dkk., 2014). Hasil setelah dilakukan sortasi basah selanjutnya kulit batang dipotong kecil kecil menggunakan pisau. Pemotongan kulit batang bertujuan untuk memperkecil luas permukaan yang akan meningkatkan kontak dan interaksi dengan pelarut sehingga mempermudah proses ekstraksi. Hasil akhir dari pemotongan sampel kulit batang bisa digunakan untuk proses ekstraksi dengan metode infundasi.

4.3 Pembuatan Infusa

Proses ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode infundasi. Metode infundasi dipilih karena efektif, efisien, dapat mengurangi limbah organik dan juga cara pembuatan secara infundasi mendekati cara pembuatan obat tradisional yang telah lama digunakan oleh masyarakat, sehingga mempermudah penggunaannya (Sritiasni dkk., 2021). Pada metode infundasi ini, sampel yang digunakan adalah sampel segar kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) sebanyak 1500gram sampel yang telah dipotong kecil kecil. Sampel kulit batang kemudian dimasukkan kedalam panci dengan pelarut *aquadest* sebanyak 3000 mL dengan suhu 90°C selama 30 menit, pengukuran suhu dilakukan dengan termometer.

Perebusan kulit batang tanaman majapahit menggunakan waktu yang lebih lama dari pada daun dan bunga karena kulit batang merupakan bahan keras, waktu dihitung ketika suhu mencapai 90°C (Widyawati, 2019).

Pemilihan pelarut *aquadest* pada ekstraksi ini karena *aquadest* merupakan pelarut yang lebih polar daripada metanol dan etanol. Senyawa polar akan lebih mudah tertarik atau terlarut dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama, yang diharapkan mampu melarutkan senyawa aktif seperti saponin, tanin, flavonoid dan alkaloid yang bersifat polar (Khafidhoh dkk., 2015). Pelarut *aquadest* mudah didapat dengan harga terjangkau dibandingkan dengan pelarut yang lainnya serta pelarut *aquadest* bersifat netral dan tidak berbahaya (Harnanda & Murni, 2019). Tahap setelah dilakukan perebusan, ekstrak disaring menggunakan kain dan dimasukkan kedalam wadah botol plastik. Hasil infusa yang didapat kemudian dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* yang dilakukan di Universitas Brawijaya Malang. Pemekatan dilakukan untuk memungkinkan pelarut dipisahkan dari zat terlarut tanpa pemanasan tinggi, agar senyawa yang terkandung tidak berubah atau rusak (Santoso., dkk, 2021).

Tabel 4.1 Hasil perhitungan rendemen kulit batang majapahit (*Crescentia cujete*)

Sampel	Bobot awal	Bobot akhir	%Hasil
Kulit batang Majapahit (<i>Crescentia cujete</i>)	1500 gram	68,6 gram	4,57%

Hasil filtrat yang didapatkan setelah pemekatan, seberat 68,6 gram. Rendemen dihitung berdasarkan Persamaan (3.1). Nilai rendemen yang dihasilkan adalah sebesar 4,57%. Tinggi rendahnya hasil rendemen yang dihasilkan dipengaruhi oleh metode ekstraksi yang digunakan. Menurut Febrina dkk (2015) menyebutkan bahwa beberapa hal yang mempengaruhi hasil rendemen adalah jumlah pelarut dimana semakin banyak pelarut yang digunakan maka hasil yang didapatkan semakin tinggi karena meluasnya permukaan kontak akibat distribusi partikel dalam pelarut menyebar, begitupun dengan waktu, semakin lama waktu ekstraksi maka hasil yang didapat juga semakin banyak. Selain itu, ukuran sampel juga berpengaruh terhadap besar kecilnya rendemen, dimana bahan yang memiliki

luas permukaan kecil akan memperluas kontak dan meningkatkan korelasi dengan pelarut (Sineke dkk., 2016).

Pada penelitian ini ada beberapa faktor yang menyebabkan hasil rendemen, yaitu jenis pelarutnya. Pada ekstraksi ini pelarut yang digunakan memiliki sifat polar, dengan demikian senyawa yang terekstraksi hanya senyawa yang memiliki sifat kepolaran yang sama. Penyebab kedua adalah ukuran sampel yang berukuran besar dan tidak memberikan ruang kontak pelarut sehingga mempersulit penyerapan. Selanjutnya adalah waktu ekstraksi pada penelitian cukup singkat yaitu hanya 1x30 menit.

4.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan pada infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung didalam sampel tersebut, skrining fitokimia ini dilakukan dengan kualitatif menggunakan pereaksi kimia yang menghasilkan perubahan warna atau adanya endapan (Vifta & Advistasari, 2018). Skrining fitokimia infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan di Laboratorium Kimia STIKES Karya Putra Bangsa pada tanggal 25 Februari 2023. Beberapa golongan senyawa yang diuji pada penelitian ini adalah alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin.

Pada kulit batang tanaman majapahit sendiri menurut penelitian Martha & Fatimah (2020) menyatakan bahwa ekstrak etanolik kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) terdapat kandungan senyawa flavonoid, tanin, dan saponin. Senyawa senyawa tersebut memiliki aktivitas sebagai antikanker. Mekanisme senyawa flavonoid sebagai antioksidan yang memiliki keterkaitan dengan kanker dalam mempertahankan tingkat ROS/RNS (*Reactive Oxygen Species/ Reactive nitrogen species*) dan memperbaiki kerusakan sel oksidatif karena keduanya berperan utama dalam perkembangan kanker. Mekanisme pada senyawa tanin adalah penghambatan ekspresi gen SOX2 pada kanker payudara dan menghambat jalur pensinyalan EGF/EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) yang berakibat pada pertumbuhan dan proliferasi sel. Mekanisme senyawa saponin bekerja dengan penghentian siklus sel, induksi apoptosis, aktivasi stres ER (*Endoplasmic reticulum*), penghambatan invasi dimana sel kanker menembus jaringan sekitarnya

dan berproliferasi. Hasil penelitian tersebut diharapkan pada infusa kulit batang juga mengandung senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antikanker. Berikut hasil skrining fitokimia infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dan gambar hasil identifikasi senyawa dapat dilihat pada lampiran 2 hal 80.

Tabel 4.2 Hasil Skrining Fitokimia Kulit Batang Majapahit (*Crescentia cujete*)

Golongan Senyawa	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Pereaksi Dragendorff	-	Tidak terbentuk endapan jingga
	Pereaksi Mayer	-	Tidak terbentuk endapan putih
	Pereaksi Wagner	-	Tidak terbentuk endapan coklat
Flavonoid	Mg + HCl pekat	+	Perubahan warna ungu kehitaman
Tanin	Larutan FeCl ₃	+	Perubahan warna hitam kehijauan
Saponin	HCl 2%	+	Terbentuk busa stabil

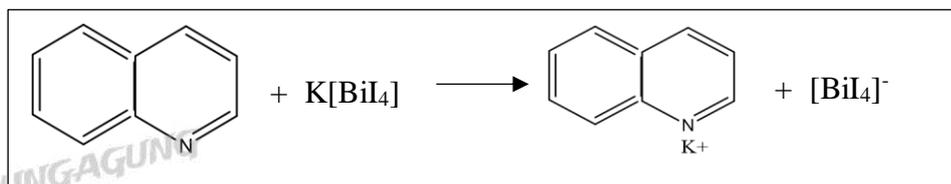
Keterangan: (+)terdapat kandungan senyawa, (-)tidak terdapat kandungan senyawa

4.4.1 Uji Alkaloid

Senyawa alkaloid merupakan senyawa golongan metabolit sekunder yang bersifat basa yang biasanya dapat ditemukan pada akar, biji, ranting, dan kulit kayu pada suatu tanaman (Heliawati, 2018). Uji alkaloid dilakukan dengan mengambil infusa kulit batang majapahit sebanyak 2gram yang sudah dilarutkan dengan DMSO, lalu ditambahkan *aquadest* dan H₂SO₄ lalu dipanaskan 30 menit. Lalu didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas diuji dengan pereaksi dragendorff, mayer, dan wagner. Positif mengandung alkaloid jika terbentuknya endapan. Penambahan H₂SO₄ yang bersifat asam akan mengekstraksi alkaloid yang bersifat basa sehingga menimbulkan terbentuknya garam alkaloid. Endapan yang terbentuk merupakan hasil reaksi ion K⁺ dari reagen yang berikatan dengan atom N pada alkaloid yang akan membentuk kompleks kalium-alkaloid (Hanifa dkk., 2021).

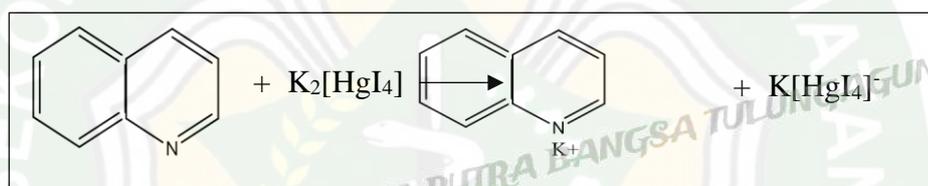
Pada pereaksi Dragendorff terbentuk endapan jingga, karena atom nitrogen pada alkaloid membentuk ikatan kovalen dengan ion K⁺ dari kalium

tetraiodobismutat membentuk endapan kalium-alkaloid. Reaksi yang terbentuk antara alkaloid dengan pereaksi Dragendroff adalah sebagai berikut:



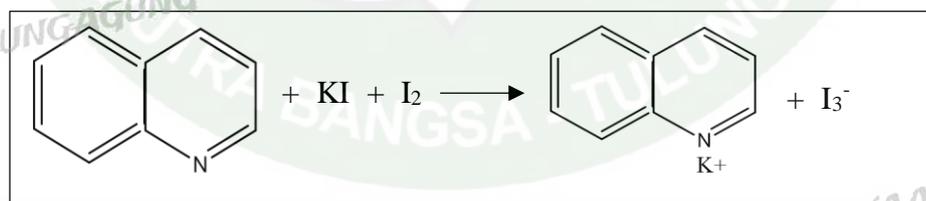
Gambar 4.1 Reaksi identifikasi alkaloid dengan pereaksi Dragendroff

Pada pereaksi Mayer, alkaloid memiliki pasangan elektron bebas pada atom nitrogen (N) nya, yang dapat membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) yang ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Reaksi antara alkaloid dengan pereaksi mayer adalah sebagai berikut:



Gambar 4.2 Reaksi identifikasi alkaloid dengan pereaksi Mayer

Pada pereaksi Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat, karena ion K^+ pada kalium iodida akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid. Warna yang timbul pada endapan terjadi karena iodin (I_2) bereaksi dengan ion I^- dari kalium iodide menghasilkan ion I_3^- .

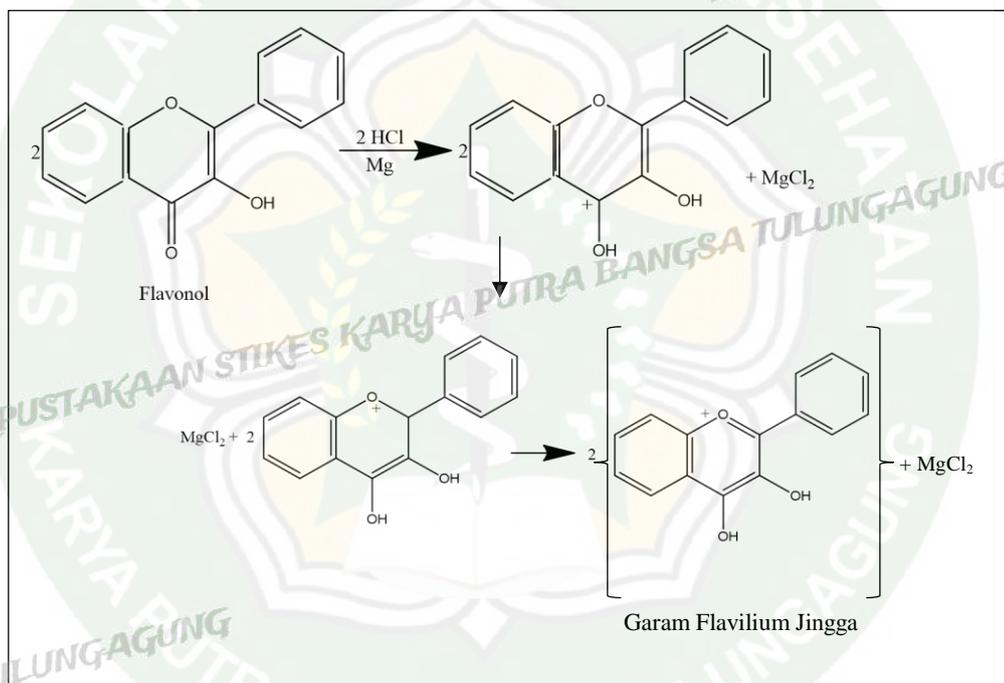


Gambar 4.3 Reaksi identifikasi alkaloid dengan pereaksi Wagner

Hasil dari uji alkaloid pada ketiga pereaksi (dragendroff, mayer, dan wagner) tidak menunjukkan adanya endapan putih, coklat, maupun jingga, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada infusa kulit batang tanaman majapahit tidak mengandung senyawa alkaloid.

4.4.2 Uji Flavonoid

Uji flavonoid infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara mengencerkan ekstrak dengan DMSO yang dilarutkan dengan 5 mL akuades, kemudian dipanaskan selama 5 menit, dan disaring. Filtrat ditambah serbuk Mg dan HCl pekat. Uji positif flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna merah, kuning, atau jingga. Perubahan warna yang terjadi tersebut karena penambahan HCl dan serbuk Mg yang mereduksi inti benzopiron pada struktur flavonoid dan terbentuk garam flavilium (Sulasmi dkk., 2018). Dalam suasana asam, Mg bereaksi dengan HCl membentuk ion Mg^{2+} dan gas H_2 sehingga membentuk gelembung pada larutan uji (Dewi dkk., 2021).



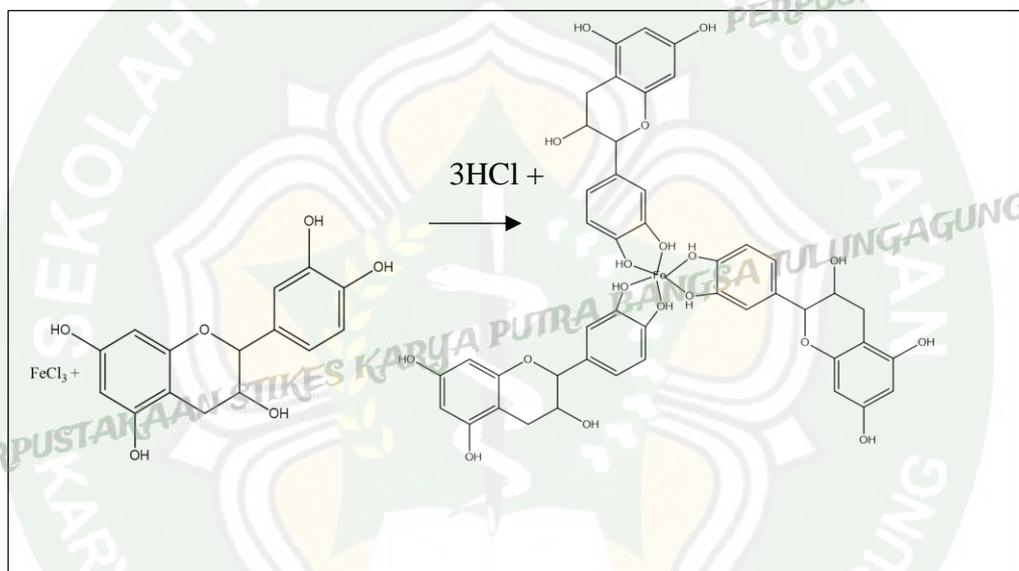
Gambar 4.4 Reaksi Flavonoid dengan logam Mg dan HCl

Hasil dari uji flavonoid pada infusa kulit batang majapahit dari ketiga replikasi menunjukkan adanya perubahan warna menjadi merah jingga dan sedikit terbentuknya gelembung, sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel positif mengandung senyawa flavonoid.

4.4.3 Uji Tanin

Pada uji tanin infusa kulit batang tanaman majapahit dilakukan dengan cara ekstrak yang dilarutkan dengan DMSO hingga larut, dan ditambahkan $FeCl_3$ 2

sampai 3 tetes. Hasil positif mengandung senyawa tanin ditunjukkan dengan terbentuknya hitam kebiruan, hitam kehijauan atau bahkan coklat kehitaman tergantung dari jenis senyawa tannin. Pada uji tannin ini hasil yang didapatkan adalah perubahan warna menjadi coklat kehitaman dengan sedikit warna hijau. Hal ini sesuai dengan penelitian Sulasmi *et al* (2018), dimana dengan perubahan warna tersebut terdeteksi dengan adanya senyawa tanin terhidrolisis yaitu senyawa yang mengandung ikatan ester antara gugus hidroksilnya. Terbentuknya warna ini diduga karena adanya reaksi sampel dengan penambahan FeCl_3 menjadi 3,4,5-trihidroksifenol (asam galat) yang kemudian membentuk warna coklat kehitaman.



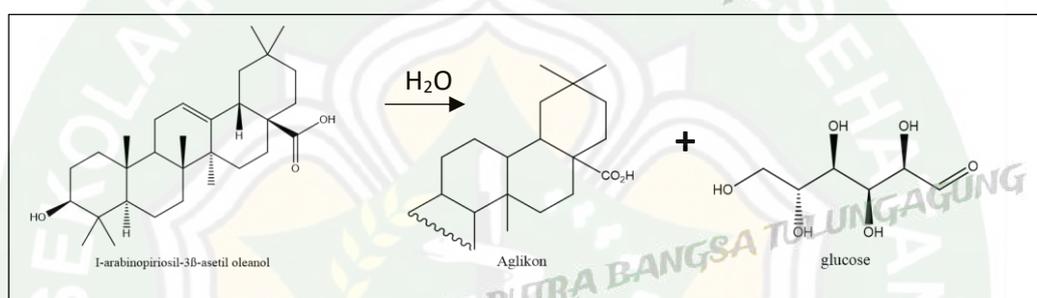
Gambar 4.5 Reaksi Identifikasi Senyawa Tanin dengan Larutan FeCl_3

Senyawa tanin merupakan senyawa polifenol, maka cara klasik untuk mendeteksi senyawa fenol sederhana yaitu menambahkan ekstrak dengan larutan FeCl_3 dalam air, yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru dan hitam kuat yang disebabkan karena tanin dapat mengkompleks ion logam berat/ion Fe^{3+} (Sri Irianty & Yenti, 2014). Hasil uji tanin pada penelitian ini didapatkan perubahan larutan menjadi coklat kehitaman, hal ini dapat disimpulkan bahwa infusa kulit batang tanaman majapahit positif mengandung senyawa tanin.

4.4.4 Uji Saponin

Uji saponin infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan cara penambahan ekstrak dengan pereaksi HCl 2% dan dilakukan

pengocokan secara vertikal selama 1 menit dan diamati busa yang terbentuk. Hasil positif saponin ditunjukkan ketika sampel menghasilkan busa yang stabil dan tidak hilang setelah penambahan HCl 2%. Pembentukan busa dikarenakan saponin merupakan senyawa yang memiliki gugus hidrofilik dan hidrofobik. Gugus hidrofilik berikatan dengan air, dan gugus hidrofobik berikatan dengan udara sehingga membentuk busa ketika dilakukan pengocokan. Penambahan HCl bertujuan agar tingkat kepolaran bertambah, sehingga gugus hidrofilik memiliki ikatan yang lebih kuat dan busa yang terbentuk lebih stabil. Gugus polar menghadap ke luar dan gugus non polar menghadap ke dalam pada struktur misel dan kondisi ini yang tampak membentuk busa (Dewi dkk., 2021).



Gambar 4.6 Reaksi hidrolisis senyawa saponin dalam air

Hasil dari uji saponin pada infusa kulit batang majapahit menunjukkan adanya busa yang stabil setelah penambahan HCl. Busa tersebut menandakan adanya kandungan glikosida yang dapat membentuk busa di dalam air (Sulasmidkk., 2018). Dapat disimpulkan bahwa infusa kulit batang tanaman majapahit positif mengandung senyawa saponin.

4.5 Identifikasi Senyawa Infusa Kulit Batang Majapahit (*Crescentia cujete*) Dengan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) merupakan teknik analitik yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik cairan kromatografi (HPLC) dengan kemampuan analisis spektrometri massa (MS) (Kumar *et al.*, 2016). Analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) digunakan untuk mengidentifikasi senyawa- senyawa yang terkandung dalam sampel infusa kulit batang tanaman majapahit. Hasil data yang didapat berupa informasi tentang alur tinggi puncak, komposisi senyawa, struktur kimia, *exact mass*, massa ion dan

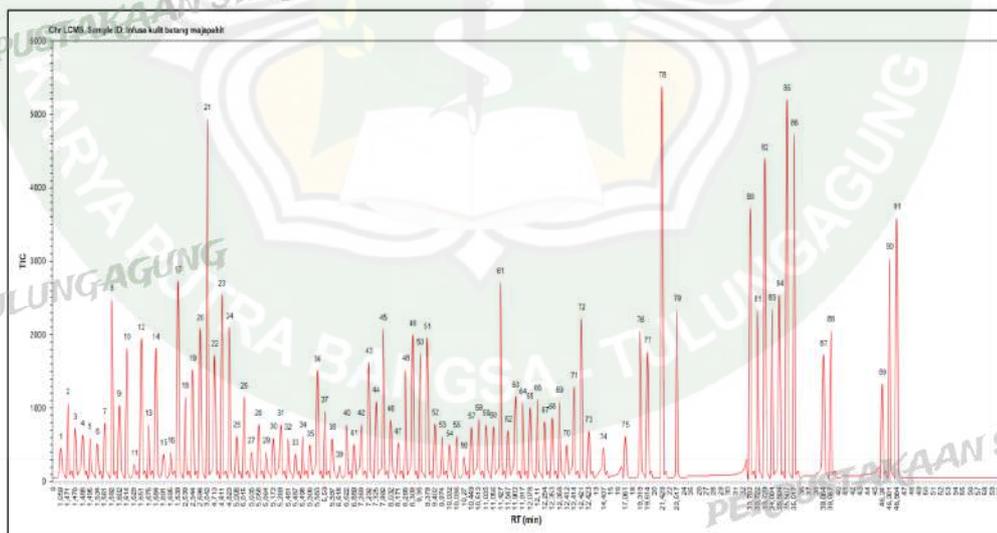
bobot molekul dari senyawa yang terdapat dalam suatu sampel. Validasi penentuan senyawa menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) bertujuan untuk memastikan senyawa dengan spektrum yang luas, karena mampu untuk menganalisis senyawa yang lebih besar, polar, ionik, tidak stabil secara termal, dan tidak mudah menguap (Saibaba *et al.*, 2017).

Prinsip kerja dari LCMS adalah sampel yang akan dianalisis akan masuk ke HPLC untuk dilakukan pemisahan berdasarkan kepolarannya dimana sampel akan didorong oleh fase gerak bertekanan tinggi (larutan tertentu) pada suatu kolom sebagai fase diam, larutan yang kurang kuat interaksinya dengan fase diam akan keluar lebih dahulu, dan larutan yang kuat interaksinya dengan fase diam akan keluar lebih lama dari kolom. Larutan akan diteruskan masuk ke spektrofotometri massa yang akan mengionisasi senyawa kimia untuk menghasilkan partikel bermuatan atau fragmen molekul dan dengan mengukur rasio massa terhadap muatan dan langsung akan dideteksi oleh detektor. Hasil akan direkam dalam bentuk kromatogram (Kumar *et al.*, 2016).

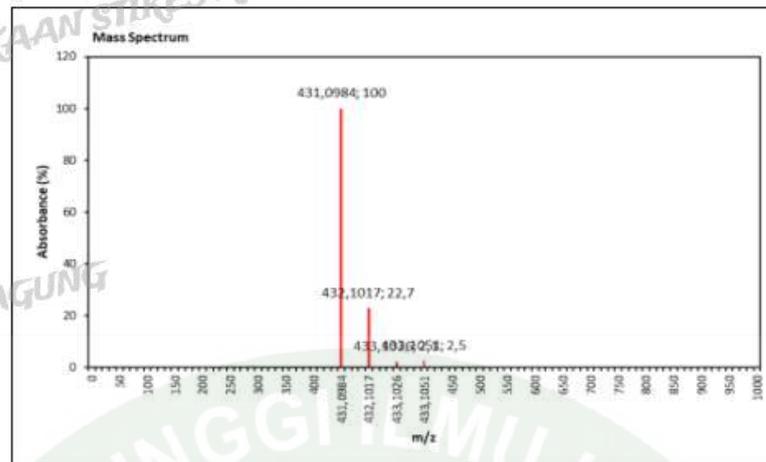
Analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) pada penelitian ini dilakukan diruang instrumentasi LCMS yang bertempat di Universitas Muhammadiyah Malang. Analisis LCMS dilakukan menggunakan *Shimadzu LCMS – 8040 LC/MS® Shimadzu Shim Pack FC-ODS* dengan ukuran kolom 2 mm x 150 mm, 3 μm , dengan temperatur kolom 35°C. Fase gerak yang digunakan adalah metanol 90% dengan air. Laju air 0,5 ml/min dengan volume injeksi 1 μl , rentang analisis massa 10-1000 m/z dengan energi 5,0 Volt.

Data kromatogram dari analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) menunjukkan bahwa terdapat 91 senyawa yang terkandung dalam infusa kulit batang tanaman majapahit. Kandungan senyawa pada infusa kulit batang majapahit diketahui dari puncak-puncak yang muncul pada rentang waktu retensi (t_R) pada kromatogram dari hasil data LCMS yang disajikan pada Gambar (4.7). Waktu retensi merupakan seberapa lama waktu yang dibutuhkan untuk analisis sampel, dimana pada fase terbalik zat yang lebih polar akan terelusi lebih dulu dan memiliki waktu retensi yang lebih cepat dibanding zat non polar (Aulia dkk., 2016).

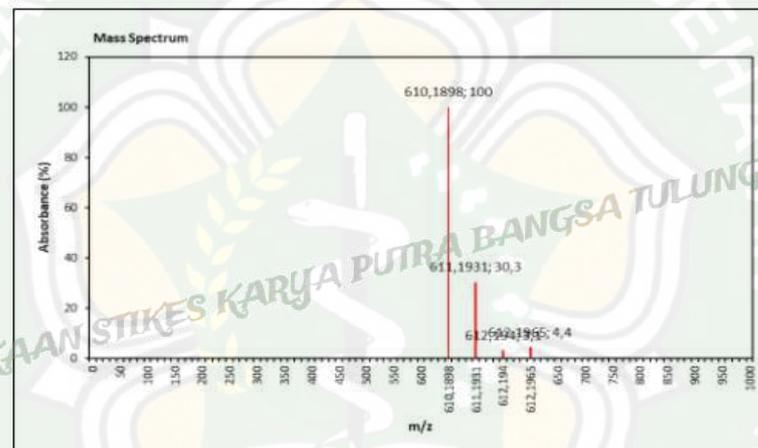
Hasil kromatogram LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) diketahui terdapat empat puncak tertinggi. Senyawa dengan puncak utama yang teridentifikasi adalah *Kaempferol-3-O-rhamnoside* yang ditempati oleh puncak nomor 78 dengan komposisi 4,11678%, senyawa kedua adalah *hesperidin* yang ditempati oleh puncak nomor 85 dengan dengan komposisi 3,98050%, senyawa ketiga adalah *gallic acid* yang ditempati oleh puncak nomor 21 dengan komposisi 3,7796%, dan yang terakhir adalah senyawa *rutin* yang ditempati oleh puncak nomor 86 dengan komposisi sebesar 3,61971%. Kemunculan senyawa ini memiliki waktu retensi yang berturut turut adalah 21,429, 35,507, 3,042, 35, 517. Perbedaan waktu retensi ini dikarenakan senyawa yang bersifat polar akan lebih cepat keluar dan terdeteksi daripada senyawa non polar. Hasil dari keempat senyawa tersebut diketahui melalui *mass spectrum* yang memunculkan massa atom atau molekul pada setiap masing masing senyawa yang teridentifikasi dan disajikan pada Gambar (4,8) *mass spectrum* dari senyawa utama *Kaempferol-3-O-rhamnoside*, Gambar (4,9) *mass spectrum* dari *hesperidin*, Gambar (4.10) *mass spectrum* dari *gallic acid*, dan Gambar (4.11) *mass spectrum* dari *rutin*.



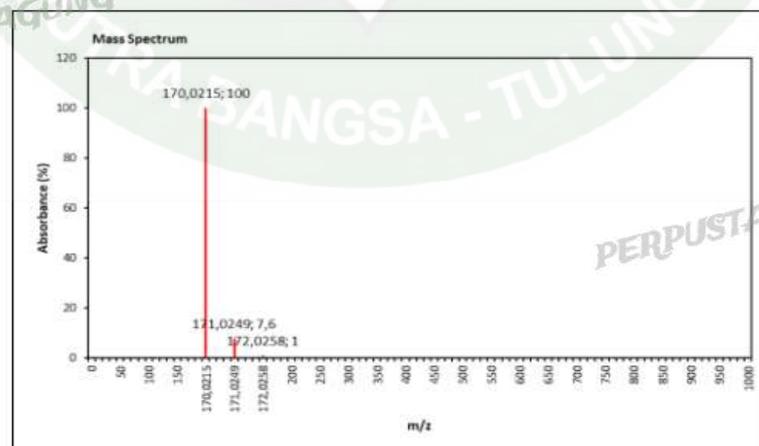
Gambar 4.7 Hasil kromatogram LCMS infusa kulit batang majapahit



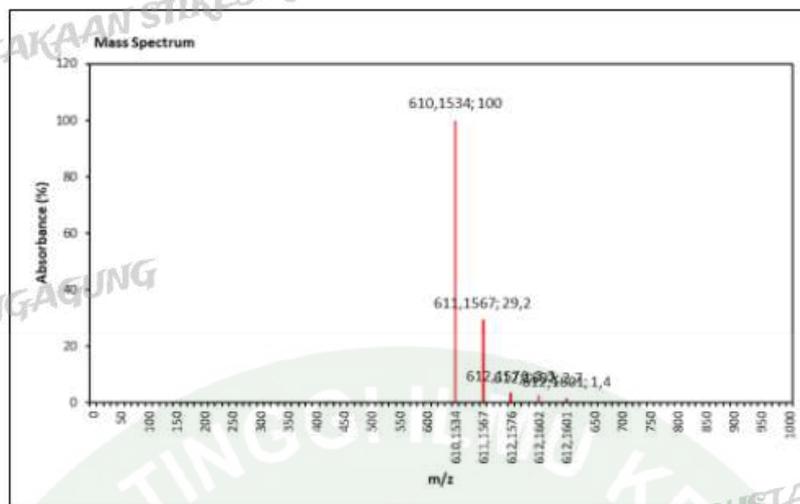
Gambar 4.8 Spektrum Massa *Kaempferol-3-O-rhamnoside*



Gambar 4.9 Spektrum Massa Senyawa *Hesperidin*



Gambar 4.10 Spektrum Massa Senyawa *Gallic acid*



Gambar 4.11 Spektrum Massa Senyawa *Rutin*

Hasil data LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) juga memuat tentang struktur senyawa pada suatu sampel yang dianalisis. Struktur senyawa pada hasil LCMS disajikan pada Gambar (4.12), (4.13), (4.14), dan (4.15).

Tabel 4.3 Hasil Deteksi dan Identifikasi Senyawa Menggunakan LCMS

No. puncak	Nama senyawa	Waktu retensi (min)	Area kurva	Komposisi (%)	Analisis senyawa
78	<i>Kaempferol-3-O-rhamnoside</i>	21,429	5375,47681	4,11678	Rumus kimia: $C_{21}H_{20}O_{10}$ Berat Molekul: 432,3810 m/z: 432,1056
85	<i>Hesperidin</i>	35,507	5197,52719	3,98050	Rumus kimia: $C_{28}H_{34}O_{15}$ Berat Molekul: 610,5650 m/z: 610,1898
21	<i>Gallic acid</i>	3,042	4933,05810	3,7796	Rumus kimia: $C_7H_6O_5$ Berat Molekul: 170,1200 m/z: 170,0215
86	<i>Rutin</i>	35,517	4726,41929	3,61971	Rumus kimia: $C_{27}H_{30}O_{16}$ Berat Molekul: 610,5210 m/z: 610,1534

Pada Tabel (4.2) diatas, disajikan rincian hasil dari analisis LCMS yang berupa informasi identitas dan kuantitas dari keempat senyawa dengan komposisi yang terbesar dari 91 senyawa yang muncul pada puncak kromatogram.

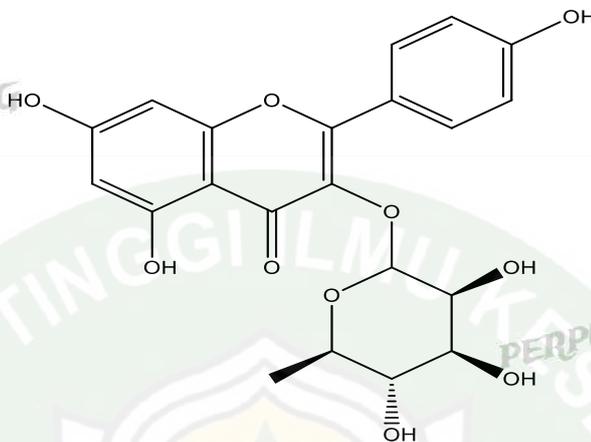
4.5.1 Senyawa *Kaempferol-3-O-rhamnoside*

Senyawa Senyawa utama analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) yaitu *Kaempferol-3-O-rhamnoside*, pada penelitian ini selaras oleh penelitian yang dilakukan oleh Fatimah dkk (2020), yang menyatakan bahwa senyawa *Kaempferol-3-O-rhamnoside* merupakan golongan senyawa yang teridentifikasi terkandung dalam kulit batang tanaman majapahit dan juga memiliki komposisi tertinggi sebesar 4,072%.

Kaempferol-3-O-rhamnoside adalah senyawa turunan *kaempferol* yang merupakan senyawa golongan flavonoid yang berwarna kuning (Kim & Choi, 2013). *Kaempferol* juga merupakan salah satu flavonoid aglikon yang paling banyak ditemui dalam bentuk glikosida yaitu, tetrahidroksiflavon ditunjukkan dengan keempat gugus hidroksi terletak di posisi 3, 5, 7, dan 40 (Imran *et al.*, 2019). *Kaempferol* dan turunan glikosilasinya telah terbukti memiliki aktivitas kardioprotektif, neuroprotektif, antiinflamasi, antidiabetes, antioksidan, antimikroba, antitumor, dan antikanker yang diantaranya kanker pada organ tubuh seperti kulit, hati, usus besar, ovarium, pankreas, lambung, dan kandung kemih (Imran *et al.*, 2019). Sebagian besar pencegahan kanker dilakukan dengan menghambat proliferasi sel kanker melalui peningkatan apoptosis, hal ini sesuai dengan aktivitas *Kaempferol* yaitu dengan mengurangi terjadinya proliferasi dan secara signifikan mengurangi ekspresi faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) dengan dengan menekan jalur *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-NF κ B-cMyc-p21-VEGF, yang menandakan angiogenesis, dalam sel kanker (Kim & Choi, 2013).

Beberapa studi menyebutkan bahwa senyawa *kaempferol* yang termasuk golongan flavonoid ini terbukti secara *in vitro* memiliki aktivitas pada kanker kandung kemih, kanker darah, kanker tulang, kanker otak, kanker payudara, kanker serviks, kanker kanker usus besar, kanker ginjal, kanker hati, kanker pancreas,

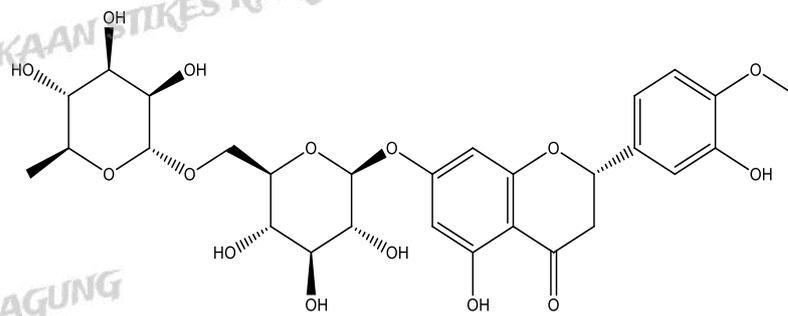
kanker ovarium, kanker paru paru, kanker oral, kanker perut, dan kanker prostat (Imran *et al.*, 2019).



Gambar 4.12 Struktur Kimia *Kaempferol-3-O-rhamnoside*

4.5.2 Senyawa *Hesperidin*

Senyawa dengan komposisi terbesar kedua adalah *hesperidin* atau biasa dikenal dengan *7-rutinoside* (Aggarwal *et al.*, 2020). *Hesperidin* merupakan senyawa golongan flavonoid jenis flavanon (Heliawati, 2018). *Hesperidin* diidentifikasi memiliki aktivitas antiinflamasi, antikanker, dan antioksidan yang potensial. Senyawa alami ini mampu merangsang kematian sel terprogram (apoptosis) dan mampu menghambat proliferasi sel. *Hesperidin* sebagai agen antikanker bekerja dengan menekan modulasi stres oksidatif, peradangan, kematian sel dan meningkatkan apoptosis melalui jalur *NF- κ B*, *mTOR*, *PI3K/AKT*. *Hesperidin* juga mampu menurunkan regulasi mediator dan enzim proinflamasi (*IL-1/6*, *TNF*, *COX-2*) dalam sel tumor (Aggarwal *et al.*, 2020). Senyawa ini terbukti secara *in vivo* efektif dalam berbagai kasus kanker, seperti kanker usus besar (adenoma dan adenokarsinoma), kanker payudara, melanoma, kanker prostat, karsinoma hepatoseluler, dan pengurangan metastasis. Diketahui juga bahwa di paru-paru, hati, kanker payudara, perut, dan usus besar, *hesperidin* mungkin bertindak melalui promosi apoptosis sel kanker (Stanisic *et al.*, 2018).

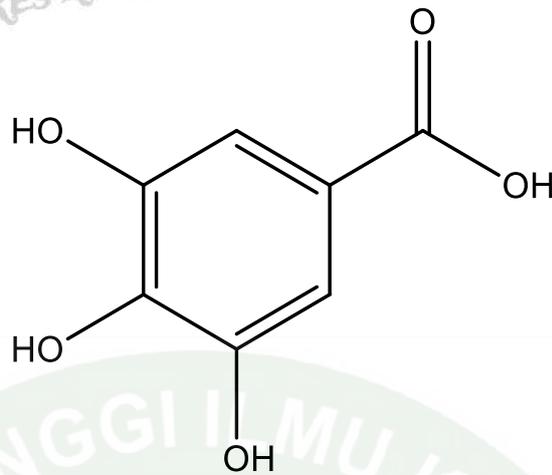


Gambar 4.13 Struktur Ki mia Senyawa *Hesperidin*

4.5.3 Senyawa *Gallic acid*

Senyawa terbesar ketiga adalah *gallic acid* atau yang biasa dikenal yang juga dikenal sebagai *asam 3,4,5-trihidroksibenzoat*, yang termasuk dalam senyawa fenolik yang berasal dari asam hidroksibenzoat yang tergolong asam fenolik sederhana. (Hilma *et al.*, 2018). *Gallic acid* merupakan senyawa trifenol dengan berat molekul rendah yang memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidatif yang sangat baik dan juga memiliki beberapa efek farmakologis yang telah terbukti antara lain sebagai antitumor, antibakteri, antidiabetes, antiobesitas, antimikroba dan antiiskemia miokard. *Gallic acid* bekerja sebagai antioksidan alami untuk melindungi sel dari bahaya yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif (ROS) dengan mengais radikal hidroksil dan hidrogen peroksida (Wulandari dkk., 2022).

Gallic acid merupakan antioksidan kuat, penghambat siklooksigenase dan lipooksigenase dan penginduksi apoptosis dengan efek vasokonstriktor. Senyawa ini memiliki aktivitas dalam berbagai macam kanker seperti leukemia, kanker prostat, kanker paru-paru, kanker payudara, kanker lambung, kanker usus besar, kanker leher rahim, kanker melanoma dan kanker kerongkongan. *Gallic acid* memiliki mekanisme yang sangat baik sebagai pemulung radikal, menghambat perkembangan kanker dan mencegah konversi menjadi sel kanker ganas. Mekanisme aktivitas antikanker asam galat m engungkapkan bahwa apoptosis adalah salah satu penyebab kematian sel kanker tanpa merusak sel normal (Celep *et al.*, 2022). Dalam penelitian lain menyebutkan bahwa *gallic acid* memiliki efek antikanker terhadap sel kanker payudara MCF7 dengan menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis (Arsianti dkk., 2020).



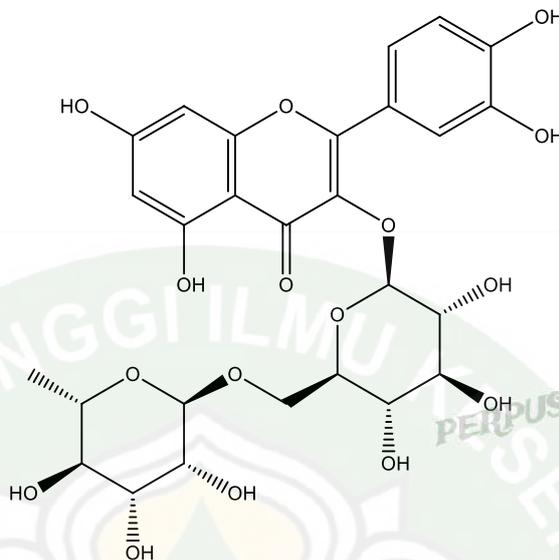
Gambar 4.14 Struktur Kimia Senyawa *Gallic acid*

4.5.4 Senyawa *Rutin*

Senyawa terbesar keempat adalah *Rutin* atau *rutoside* atau *sophorin* yang merupakan jenis glikosida kuersetin. Kuersetin sendiri merupakan jenis flavonol yang masuk kedalam senyawa golongan flavonoid (Bustanul & Sanusi, 2018). *Rutin* memiliki ikatan rangkap pada cincin C dan lebih banyak hidroksil pada C-3. Banyak penelitian mengungkapkan bahwa *rutin* memiliki aktivitas antiinflamasi, antikarsinogenik, pelindung saraf, antiproliferatif, antimetastatik, dan antioksidan. Beberapa studi melaporkan bahwa aktivitas *rutin* dikaitkan dengan beberapa tumor seperti usus besar, kanker, karsinoma hepatoseluler, leukemia, neuroblastoma, kanker paru-paru, dan kanker payudara, melalui penghambatan peroksidasi lipid dan ameliorasi stres oksidatif (Satari *et al.*, 2021).

Diantara flavonoid dengan efek anti kanker, rutin memiliki salah satu kegunaan yang paling luas sebagai antioksidan, agen antitumor, dan memberikan efek antiinflamasi oleh regulasi ekspresi siklooksigenase-2, *Inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang merupakan sinyal pertahanan utama mekanisme pada kanker, dan sebagai penekan peradangan sekresi sitokin. *Rutin* menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel sel kanker (Satari *et al.*, 2021). Dalam penelitian lain menunjukkan bahwa rutin memiliki sifat antikanker terhadap banyak kanker yang melibatkan penghambatan proliferasi sel, penurunan GSH dan induksi apoptosis pada sel kanker. Hal hal tersebut dikatakan bahwa peran *rutin* dalam

pencegahan dan pengobatan kanker dengan kontrol seluler induksi proliferasi dan apoptosis (Prasad *et al.*, 2019).



Gambar 4.15 Struktur Kimia Senyawa Rutin

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

Tahap selanjutnya pada penelitian ini adalah hasil dari pemekatan infusa kulit batang majapahit menggunakan *rotary evaporator*, dilakukan uji toksisitas dengan memanfaatkan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini menggunakan larva udang sebagai hewan uji. Uji toksisitas menggunakan BSLT ditentukan dari jumlah kematian udang *Artemia salina* Leach akibat dari pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam yang diberikan. Metode ini merupakan pra-skrining senyawa aktif dari ekstrak tumbuhan karena murah, cepat, mudah, dan berkorelasi positif dengan uji sitotoksik menggunakan kultur sel kanker (Pohan *et al.*, 2023).

Pada penelitian ini sebanyak 10 ekor larva udang dimasukkan ke dalam pot salep 10 mL dengan menggunakan pipet tetes pada setiap vial yang sudah berisikan ekstrak infusa kulit batang tanaman majapahit dengan konsentrasi masing masing 1000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, 100 ppm dan kontrol negatif yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh air garam maupun faktor lain terhadap kematian larva udang *Artemia salina*, sehingga kematian larva dapat dipastikan karena efek dari ekstrak/partisi

yang digunakan. Setelah 10 larva udang dimasukkan kedalam pot salep maka di *add* kan menggunakan air laut buatan hingga volume menjadi 10 mL. Dilakukan tiga kali replikasi pada setiap konsentrasi untuk mendapatkan hasil yang sesungguhnya. Larva udang ditunggu dan kemudian diamati selama 1x24 jam pada tiap tiap kelompok perlakuan. Larva udang dikatakan mati apabila selama 10 detik pengamatan tidak menunjukkan pergerakan. Pengamatan kematian larva udang menggunakan kaca pembesar yang dilakukan di bawah lampu terang untuk mengamati pergerakan dari larva udang.

Mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach terhadap infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) pada masing masing konsentrasi ditunjukkan pada Tabel 4.4. Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa infusa kulit batang majapahit terhadap kematian larva udang *Artemia salina* Leach memberikan pengaruh yang berbeda pada setiap konsentrasi.

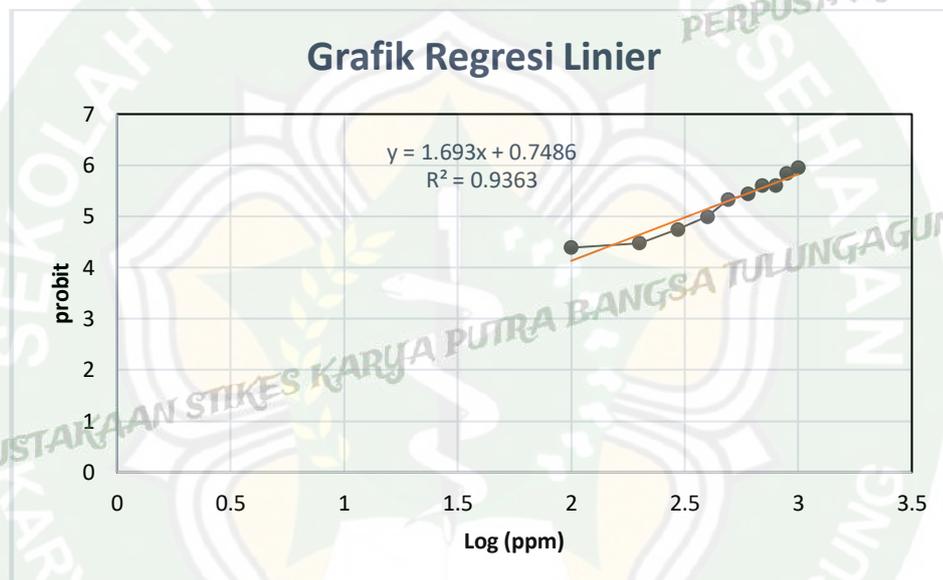
Tabel 4.4 Hasil Model Tabel Data Probit Analisis

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Probit	% dead	Mortality	Total Larva
Kontrol negatif	-	0	0 %	0	30
1000 ppm	3,00	5,95	83 %	25	30
900 ppm	2,95	5,84	80 %	24	30
800 ppm	2,90	5,61	73 %	22	30
700 ppm	2,84	5,61	73 %	22	30
600 ppm	2,78	5,44	67 %	20	30
500 ppm	2,69	5,33	63 %	19	30
400 ppm	2,60	5,00	50 %	15	30
300 ppm	2,47	4,75	40 %	12	30
200 ppm	2,30	4,48	30 %	9	30
100 ppm	2,00	4,39	27 %	8	30

Ditunjukkan berdasarkan Tabel 4.4 bahwa pada konsenrasi 400 ppm dapat menyebabkan kematian 50% pada larva udang *Artemia salina* Leach. Pada konsentrasi 1000 ppm menunjukkan kematian tertinggi sebesar 25 dari total larva 30. Hal ini berarti semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak memberikan efek yang lebih besar terhadap kematian larva udang. yang berarti meningkatnya efek toksik. Penggunaan konsentrasi pada penelitian ini didasarkan pada penelitian Meyer (1982) yang mengemukakan bahwa pada metode BSLT, suatu ekstrak dapat dikatakan

memiliki aktivitas ketoksikan jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50% pada hewan uji dengan konsentrasi kurang dari 1000 ppm (Pohan dkk., 2023).

Berdasarkan tabel diatas, dapat dilakukan penentuan proses perhitungan LC_{50} dengan menggunakan *Microsoft excel*. Penentuan nilai LC_{50} dilakukan dengan regresi linier berdasarkan grafik garis dari nilai probit dan log konsentrasi, maka akan didapatkan hasil persamaan regresi linier dengan persamaan $y = mx + b$ dan nilai square (R^2). Data yang dimasukkan kedalam *Microsoft excel* adalah log pada setiap konsentrasi dan nilai probit pada tiap konsentrasi. Adapun grafik hubungan keduanya disajikan pada Gambar (4.16).



Gambar 4.16 Grafik Regresi Linier Infusa Kulit Batang Majapahit (*Crescentia cujete*)

Berdasarkan grafik diatas terlihat garis *Lethal Concentration* yang relatif lurus yang ditunjukkan oleh nilai R^2 sebesar 0,9363 atau sama dengan 93,63%. R^2 adalah kemampuan variabel bebas (konsentrasi) dalam mempengaruhi variabel terikat (kematian), yang menunjukkan adanya peningkatan nilai probit apabila nilai konsentrasi meningkat (Idris, 2019). Nilai R^2 pada penelitian ni menunjukkan bahwa hubungan antara variabel dalam kategori kuat. Nilai R^2 (koefisien korelasi dikatakan kuat apabila nilai R^2 mendekati 1. Didapatkan hasil persamaan dari grafik linier yaitu $y = 1,693x + 0,7486$, dengan nilai y yang dimasukkan yaitu sebesar 5

yang merupakan probit dari 50%. Perhitungan persamaannya adalah sebagai berikut:

$$y = mx + b$$

$$5 = 1,693x + 0,7486$$

$$x = \frac{5 - 0,7486}{1,693}$$

$$x = 2,5111$$

Didapatkan hasil nilai x adalah sebesar 2,5111 dan kemudian untuk mengetahui nilai LC_{50} dikonversikan kedalam bentuk antilog. Cara untuk mengubah nilai menjadi antilog adalah dengan memasukkan rumus =POWER(10; 2,5111) lalu di tekan enter di *Microsoft excell* dan nilai akan otomatis muncul pada *sheet*. Hasil perhitungan didapatkan 324,339 yang berarti LC_{50} 324,339 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan perhitungan hasil kematian larva udang *Artemia salina* Leach dari konsentrasi 100 ppm hingga 1000 ppm yang dapat menyebabkan kematian 50% pada larva terjadi pada konsentrasi 400 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 400 ppm yang bersifat toksik dapat mewakili nilai ketoksikan yang didapat dari perhitungan LC_{50} sebesar 324,339 $\mu\text{g/ml}$ dari infusa kulit batang majapahit. Nilai LC_{50} pada infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dapat disimpulkan bahwa sampel bersifat toksik dengan kategori sedang yang terletak pada rentang 100 – 500 $\mu\text{g/ml}$ yang dapat dilihat pada Tabel (2.2). Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Pohan dkk (2023), apabila suatu ekstrak memiliki nilai LC_{50} <1000 $\mu\text{g/ml}$ maka senyawa yang telah diuji tersebut dapat diidentifikasi sebagai senyawa toksik yang berpotensi sebagai antikanker.

Pada manusia, senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik pada kadar tertentu, dapat mengakibatkan gangguan pada sistem metabolisme tubuh, dimana senyawa aktif tersebut dapat menjadi inhibitor pada enzim sehingga mengganggu proses replikasi DNA. Fase pertumbuhan larva *Artemia salina* Leach yang digunakan dalam penelitian ini adalah fase nauplius, karena pada fase nauplius merupakan fase yang paling aktif membelah secara mitosis, hal tersebut identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis (Puspa dkk., 2017).

Hasil ketoksikan dari infusa kulit batang tanaman majapahit tersebut berkaitan dengan adanya senyawa yang terkandung dalam ekstrak yang telah dianalisis menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*), yaitu pada senyawa utama *kaempferol-3-O-rhamnoside*, dan tiga senyawa dari empat hasil yang terdeteksi pada analisis LCMS termasuk kedalam golongan flavonoid. Hal ini memperkuat bahwa mortalitas larva *Artemia salina* Leach diakibatkan dari senyawa flavonoid yang terkandung dalam infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*). Senyawa flavonoid memiliki mekanisme kerja senyawa yang terdapat pada infusa kulit batang majapahit yang mempunyai kemampuan sebagai *stomach poisoning* atau racun perut sehingga dapat menghambat daya makan larva. Ketika senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva maka akan mengakibatkan larva tidak mampu memperoleh stimulus rasa, sehingga tidak mampu mengenali makanannya yang pada akhirnya mengakibatkan kematian pada larva dikarenakan larva dalam kondisi kelaparan (Aqiila dkk., 2017).

Senyawa flavonoid pada antikanker memiliki mekanisme sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis sel pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi ini diawali dengan dilepasnya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Efek lainnya adalah flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor/kanker yang salah satunya dengan menginhibisi aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan keganasan sel kanker. Flavonoid juga berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi (Muaja *et al.*, 2013).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

5.1.1 Pengujian skrining fitokimia, senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam infusa kulit batang tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid, tanin dan saponin.

5.1.2 Hasil identifikasi senyawa (*Crescentia cujete*) dengan analisis LCMS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) didapatkan 91 senyawa yang terkandung dalam infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*), dan diambil serta dianalisis senyawa yang mempunyai puncak *chromatogram* tertinggi dengan komposisi terbesar yaitu 4,11678% dengan nama senyawa *Kaempferol-3-O-rhamnoside*, diikuti dengan *hesperidin* sebesar 3,98050%, *gallic acid* sebesar 3,7796%, dan rutin sebesar 3,61971%.

5.1.3 Pengujian potensi antikanker infusa kulit batang tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*), dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menunjukkan adanya potensi sebagai antikanker yang ditandai hasil dari nilai (*Lethal Concentration*) $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$, yakni sebesar 324,329 $\mu\text{g/ml}$, dimana dari hasil LC_{50} tersebut termasuk kategori ketoksikan sedang karena masuk pada rentang $LC_{50} 100 - 500 \mu\text{g/ml}$.

5.2 Saran

Pada hasil pengujian potensi antikanker infusa kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menunjukkan hasil yang berpotensi sebagai antikanker, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan seperti penggunaan model organisme lain yang lebih representative terhadap manusia seperti hewan uji atau sel kultur kanker secara langsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2020). Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules*, *10*(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/biom10020221>
- Aeni, Q., Aini, S. R., & Pratama, I. S. (2022). Kajian pustaka toksisitas tanaman nanas (*Ananas comosus* [L.] Merr). *Sasambo Journal of Pharmacy*, *3*(1), 49–62. <https://doi.org/10.29303/sjp.v3i1.164>
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Thakral, F., Singhal, P., Aggarwal, D., Srivastava, S., Pandey, A., Sak, K., Varol, M., Khan, M. A., & Sethi, G. (2020). Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. *Experimental Biology and Medicine*, *245*(5), 486–497. <https://doi.org/10.1177/1535370220903671>
- Aguirre-Dugua, X., Eguiarte, L. E., González-Rodríguez, A., & Casas, A. (2012). Round and large: Morphological and genetic consequences of artificial selection on the gourd tree *Crescentia cujete* by the Maya of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Annals of Botany*, *109*(7), 1297–1306. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs068>
- Aliyas, & Samsia. (2019). Pengaruh Salinitas Yang Berbeda Terhadap Penetasan *Artemia* sp Di Balai Benih Udang Desa Sabang Kecamatan Galang. *Jurnal Penelitian*, *1*(1), 7–12.
- Amelia, F. R. (2015). Penentuan jenis tanin dan penetapan kadar tanin dari buah bungur muda (*lagerstroemia speciosa* pers.) secara spektrofotometri dan permanganometri. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, *4*(2), 1–20. <https://journal.ubaya.ac.id/index.php/jimus/article/view/2093>
- 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.
- Arsianti, A., Bahtiar, A., Fadilah, F., Wangsaputra, V. K., Paramita, R. I., Azizah, N. N., Nadapdap, L. D., Fajrin, A. M., Tanimoto, H., & Kakiuchi, K. (2020). Synthesis, characterization, and cytotoxicity evaluation of gallic acid nanoparticles towards breast T47D cancer cells. *Pharmacognosy Journal*, *12*(2), 321–327. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.51>
- Astri, Y., Sitorus, T., Sigit, J. I., & Sujatno, M. (2012). Toksisitas akut per oral ekstrak etanol daun dewa (*gynura pseudochina* (lour.) DC) terhadap kondisi lambung tikus jantan dan betina galur wistar. *Majalah Kedokteran Bandung*, *44*(1), 38–43. <https://doi.org/10.15395/mkb.v44n1.71>
- Aulia, S. S., Sopyan, I., & Muchtaridi. (2016). Penetapan Kadar Simvastatin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) :Review. *Farmaka*, *14*(4), 70–78.

- Baghel, S. S., Shrivastava, N., Baghel, R. S., & Rajput, S. (2012). A review of quercetin : antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 146–160.
- Bahroni, & Istianah. (2017). Pemanfaatan buah berenuk (*Crescentia cujete* Linn) sebagai bahan baku pembuatan biotenaol. *Uin Syarif Hidayatullah Jakarta*, 1–7. <https://doi.org/10.31227/osf.io/2kxcv>
- 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. <https://doi.org/10.1155/2021/6683708>
- Bustanul, A., & Sanusi, I. (2018). Struktur , Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid Structure , Bioactivity and Antioxidan of Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21–29.
- Celep, A. G. S., Demirkaya, A., & Solak, E. K. (2022). Antioxidant and anticancer activities of gallic acid loaded sodium alginate microspheres on colon cancer. *Current Applied Physics*, 40(July), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2020.06.002>
- Chusniasih, D., & Tutik, T. (2020). Uji toksisitas dengan metode brine shrimp lethality test (bslt) dan identifikasi komponen fitokimia ekstrak aseton kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.). *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 5(02), 192–201. <https://doi.org/10.23960/aec.v5.i2.2020.p192-201>
- Dewi, I. S., Septawati, T., & Rachma, F. A. (2021). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.). *Prosiding Seminar Nasional UNIMUS*, 4, 1210–1218.
- Dumitrascu, M. (2011). *Artemia salina*. *Balneo Research Journal*, 2(4), 119–122. <https://doi.org/10.12680/balneo.2011.1022>
- Ejelonu, B. C., Lasisi, A. A., Olaremu, A. G., & Ejelonu, O. C. (2011). The chemical constituents of calabash (*Crescentia cujete*). *African Journal of Biotechnology*, 10(84), 19631–19636. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1518>
- Failisnur, F., Sofyan, S., & Silfia, S. (2019). Ekstraksi kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn) dan aplikasinya pada pewarnaan kain katun dan sutera Extraction of sappan wood (*Caesalpinia sappan* Linn) and its application for dyeing of cotton and silk fabric. *Jurnal Litbang Industri*, 9(1), 33–40. <https://doi.org/10.24960/jli.v8i2.5272.33-40>
- 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>
- Febrina, L., Rusli, R., & Muflihah, F. (2015). Optimalisasi ekstraksi dan uji metabolit sekunder tumbuhan libo (*Ficus variegata* Blume). *Journal Of Tropical Pharmacy And Chemistry*, 3(2), 74–81.

<https://doi.org/10.25026/jtpc.v3i2.153>

Gonzales, A. L., Sevilla, U. T. A., & Tsai, P. W. (2022). Pharmacological activities of bioactive compounds from *crescentia cujete* L. plant – a review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(2). <https://doi.org/10.33263/BRIAC132.197>

Hanifa, N. I., Wirasisya, D. G., Muliani, A. E., Utami, S. B., & Sunarwidhi, A. L. (2021). Phytochemical Screening of Decoction and Ethanolic Extract of *Amomum dealbatum* Roxb. Leaves. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(2), 510–518. <https://doi.org/10.29303/jbt.v21i2.2758>

Harmita, K., Harahap, Y., & Supandi. (2019). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (lc-ms/ms). In *PT. ISFI Penerbitan* (1st ed., pp. 1–124). PT ISFI Penerbitan.

Harnanda, P., & Murni, Y. (2019). Pembuatan Serbuk Pewarna Alami Tekstil Dari Ekstrak Daun Jati Muda (*Tectona grandis* Linn. F.) Metode Foam -Mat Drying Dengan Pelarut Etanol. *Jurnal Inovasi Proses*, 4(1), 29–35.

Heliawati, L. (2018). Kimia Organik Bahan Alam. In *Pascasarjana – UNPAK*. Syiah Kuala University Press. <https://doi.org/10.52574/syiahkualauniversitypress.298>

Hidjrawan Yusi. (2018). Identifikasi senyawa tanin pada daun belimbing wuluh (*averrhoa bilimbi* l.). *Jurusan Teknik Industri*, 4(2), 78–82.

Hilma, R., Herliani, & M.Almurdani. (2018). Determination of Total Phenolic, Flavonoid Content Andfree Radical Scavenging Activity of Etanol Extract Sawo Stem Bark (*Manilkara Zapota* (L.)). *Conference Proceedings CelSciTech-UMRI*, 3, 62–68.

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>

Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Gondal, T. A., Saeed, F., Imran, A., Shahbaz, M., Fokou, P. V. T., Arshad, M. U., Khan, H., Guerreiro, S. G., Martins, N., & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. *Molecules*, 24(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24122277>

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.

Kementrian Kelautan dan Perikanan. (2016). *Petunjuk Teknis Budidaya Artemia*. <https://kkp.go.id/djpb/artikel/41671-petunjuk-teknis-budidaya-artemia>

Khafidhoh, Z., Dewi, S. S., & Iswara, A. (2015). Efektivitas infusa kulit jeruk purut (*citrus hystrix* dc.) Terhadap pertumbuhan *candida albicans* penyebab

- sariawan secara in vitro. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(2), 31–37. <https://doi.org/10.21157/j.med.vet..v7i2.2951>
- Kim, S.-H., & Choi, K.-C. (2013). Anti-cancer effect and Underlying Mechanism(s) of Kaempferol, a Phytoestrogen, on the Regulation of Apoptosis in Diverse Cancer Cell Models. *Toxicological Research*, 29(4), 229–234. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.4.229>
- Kumar, P. R., Dinesh, S. R., & Rini, R. (2016). Lcms- A Review and a Recent Update. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(5), 377–391. <https://doi.org/10.20959/wjpps20165-6656>
- Kurniawidjaja, L. M., Lestari, F., Tejamaya, M., & Ramdhan, D. H. (2021). Konsep Dasar Toksikologi Industri. In *Fkm Ui*.
- Lady Jane G. Morilla, Nuñez, O. M., & Uy, M. M. (2015). Brine Shrimp Lethality Test of *Kleinhovia hospita* stem and bark from Agusan del Sur, Philippines. *Extreme Life, Biospeology & Astrobiology International Journal of the Bioflux Society*, 7(1), 61–66.
- Maisoni, A. F. (2017). Petunjuk teknis prosedur produksi biomas artemia di bak. *Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara*, 1–16.
- 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 staring. *Jurnal Biologi Tropis*, 19(2), 131–141. <https://doi.org/10.29303/jbt.v19i2.1126>
- Martha, R. D., & Fatimah, F. (2020). Uji toksisitas ekstrak etanolik batang tanaman majapahit (*crescentia cujete*) terhadap *artemia salina leach*. *Photon: Jurnal Sain Dan Kesehatan*, 11(1), 7–15. <https://doi.org/10.37859/jp.v11i1.2146>
- Mathur, G., Nain, S., & Sharma, P. (2015). Cancer : an overview Cancer : An Overview. *Academic J. Cancer Res*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajcr.2015.8.1.9336>
- 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>
- Mitra, S., Ganguli, S., & Chakrabarti, J. (2018). *Introduction. In Cancer and Noncoding RNAs* (pp. 1-23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-9>
- Noer, S., Pratiwi, R. D., & Gresinta, E. (2018). Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin dan Flavonoid) sebagai Kuersetin Pada Ekstrak Daun Inggu (*Ruta angustifolia* L.). *Jurnal Eksakta*, 18(1), 19–29. <https://doi.org/10.20885/eksakta.vol18.iss1.art3>
- Nuralifah, N., Parawansah, P., & Nur, H. (2021). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Dan Ekstrak Etanol Daun Kacapiring (*Gardenia jasminoides* Ellis) Terhadap

- Larva *Artemia Salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 1(2), 98–106. <https://doi.org/10.37311/ijpe.v1i2.11462>
- Nuroso, I., Sutrisna, E., Aisyah, R., & Rosyidah, D. U. (2021). Potensi tanaman salam (*syzygium polyanthum* (wight) Walp) sebagai terapi kanker: tinjauan literatur. *The 13th University Research Colloquium (Urecol)*. <http://repository.urecol.org/index.php/proceeding/article/download/1337/1304>
- Panggabean, M. G. L. (1984). Teknik penetasan dan pemanenan artemia salina. *Oseana*, IX(2), 57–65.
- Parbuntari, H., Prestica, Y., Gunawan, R., Nurman, M. N., & Adella, F. (2018). Preliminary Phytochemical Screening (Qualitative Analysis) of Cacao Leaves (*Theobroma cacao* L.). *EKSAKTA: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 19(2), 40–45. <https://doi.org/10.24036/eksakta/vol19-iss2/142>
- Parente, F. G. G., de Oliveira, A. P., Rodrigues, C. M. S. de C., de Oliveira Júnior, R. G., Paulo, I. M. M., Nunes, X. P., Delange, D. M., & Almeida, J. R. G. da S. (2016). Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic fraction from the leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(2), 231–236.
- Pohan, D. J., Marantuan, R. S., & Djojoputro, M. (2023). Toxicity Test of Strong Drug Using the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Method. *International Journal of Health Sciences and Research*, 13(2), 203–209. <https://doi.org/10.52403/ijhsr.20230228>
- Prasad, R., Banerjee, S., Kharshiing, C. E., Bhattacharjee, A., & Prasad, S. B. (2019). Rutin-mediated apoptosis and glutathione changes in ascites Dalton's lymphoma cells: In silico analysis of rutin interactions with some antiapoptotic and glutathione-related proteins. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(4), 720–728. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.563>
- Puspa, O. E., Syahbanu, I., & Wibowo, M. A. (2017). Uji Fitokimia dan Toksisitas Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragans* Houtt) Dari Pulau Lemukutan. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 6(2), 1–6.
- R. Hamidi, M., Jovanova, B., & Kadifkova Panovska, T. (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>
- Rachutami, I., Martha, R. D., Muadifah, A., & Manggara, A. B. (2022). Anti-Cancer Activity Testing of Cumin (*Plectranthus Amboinicus*) Ethanol Extract Against *Artemia Salina* Leach by Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. *Walisongo Journal of Chemistry*, 5(1), 19–28. <https://doi.org/10.21580/wjc.v5i1.9086>
- Rasyid, M. I., Yuliani, H., Triandita, N., Angraeni, L., & Anggriawin, M. (2022).

- Toxicity test of laban fruits (*vitex pinnata* linn) by using brine shrimp lethality test (BSLT) Method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1059(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1059/1/012051>
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(12), 2821–2831. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.004>Review
- RI, B. (2019). Peraturan badan pengawas obat dan makanan nomor 32 tahun 2019 tentang persyaratan keamanan dan mutu obat tradisional. *BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN*, 58(12), 1–37. <https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>
- Rina Wahyuni, Guswandi, H. R. (2014). Pengaruh Cara Pengeringan Dengan Oven, Kering Angin dan Cahaya Matahari Langsung Terhadap Mutu Simplisia Herba Sambiloto. *Fakultas Farmasi Universitas Andalas (UNAND) Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang*, 6(2), 126–133.
- Saibaba, M. Sathish Kumar, P. S. P. (2017). Mini Review on Lc / Ms Techniques. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 2381–2395. <https://doi.org/10.20959/wjpps20164-6581>
- Salam, A. A., & Agustina, E. (2021). Pengaruh perbedaan jenis ekstrak, pelarut dan metode ekstraksi pada hasil pengujian toksisitas dengan menggunakan metode brine shrimp lethality test (bslt). *BIOMETRIC Journal of Biology Science and Biodiversity*, 1(1), 40–50.
- Santoso, A., Akrom, A., Nuraini, L. H., & Hidayati, T. (2022). Pengaruh Pemberian Minyak Biji Jinten Hitam Terhadap Kadar Interleukin-6 Pada Perokok Aktif Sehat. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina (JIIS): Ilmu Farmasi Dan Kesehatan*, 7(1), 174–183. <https://doi.org/10.36387/jiis.v7i1.861>
- Santoso, B., Imaduddin, F., Sukanto, H., Triyono, J., Lambang, R. L., Widodo, P. J., & Siswantoro, D. H. (2021). Procurement and Operation Technical For Meniran (*Phyllanthus Niruri*) Extraction Equipment. *Mekanika: Majalah Ilmiah Mekanika*, 20(1), 34–43. <https://doi.org/10.20961/mekanika.v20i1.45487>
- Santoso, H., Chalidyanto, D., & Laksono, A. D. (2021). The Prevalence of Cancer in Indonesia: An Ecological Analysis. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, June. <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v15i3.15791>
- Sarah, Q. S., Anny, F. C., & Misbahuddin, M. (2017). Brine shrimp lethality assay. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 186–189. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.32796>
- Satari, A., Ghasemi, S., Habtemariam, S., Asgharian, S., & Lorigooini, Z. (2021). Rutin: A Flavonoid as an Effective Sensitizer for Anticancer Therapy; Insights into Multifaceted Mechanisms and Applicability for Combination Therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

<https://doi.org/10.1155/2021/9913179>

- Sineke, F. U., Suryanto, E., & Sudewi, S. (2016). Penentuan Kandungan Fenolik Dan Sun Protection Factor (Spf) Dari Ekstrak Etanol Dari Beberapa Tongkol Jagung (*Zea mays L.*). *Pharmacon*, 5(1), 279–280.
- 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
- Sofia, R., Tahlil, T., Keperawatan, M., Keperawatan, F., Syiah Kuala, U., Aceh, B., Keperawatan Komunitas, B., & keperawatan jiwa, B. (2018). Pengalaman Pasien Kanker Dalam Menghadapi Kemoterapi Cancer Patients experience in Dealing with Chemotherapy. *Jurnal Ilmu Keperawatan*, 6(2).
- Sri Irianty, R., & Yenti, S. R. (2014). Pengaruh perbandingan pelarut etanol-air terhadap kadar tanin pada sokletasi daun gambir (*uncaria gambir roxb*). *Sagu*, 13(1), 1–7.
- Sritiasni, Petrus Dominikus Sadsoeitoeboen, & Muhammad Agung Purnomo. (2021). Inovasi infusa kulit kayu akway pada performa ayam broiler umur 3 sampai 4 minggu di kampung warmomi distrik manokwari selatan. *Prosiding Seminar Nasional Pembangunan Dan Pendidikan Vokasi Pertanian*, 2(1), 218–226. <https://doi.org/10.47687/snppvp.v2i1.193>
- Stanisic, D., F. Costa, A., J. Favaro, W., Tasic, L., B. Seabra, A., & Duran, N. (2018). Anticancer Activities of Hesperidin and Hesperetin In vivo and their Potentiality against Bladder Cancer. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 09(05). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000515>
- Sudarwati, T. puji lestari, & Fernanda, M. . H. F. (2019). Aplikasi pemanfaatan daun pepaya (*carica papaya*) sebagai biolarvasida terhadap larva aedes aegypti. In N. R. Hariyati (Ed.), *penerbit graniti* (1st ed., pp. 1–58). penerbit graniti.
- Sulasmis, E. S., Wuriana, Z. F., & Sari, M. S. (2018). Analisis Kualitatif Kandungan Senyawa Aktif (Flavonoid , Alkaloid , Polifenol , Saponin , Terpenoid dan Tanin) pada Ekstrak Metanol Daun dan Rhizoma *Phymatodes scolopendria* (Burm .) Ching di Taman Nasional Baluran. *Prosiding Seminar Nasional VI Hayati, September*, 121–128.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Syaron, P., Sientje, M., Irma, L., & Kimia, P. (2020). Uji senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan tanaman patah tulang (*euphorbia tirucalli L.*). *FMIPA UNSRAT*, 9(2), 64–69.
- Tombinawa, F., Hasim, & Tuiyo, R. (2016). Daya tetas artemia sp. Menggunakan

air bersalinitas buatan dengan jenis garam berbeda. *Jurnal Imiah Perikanan Dan Kelautan*, 4(2), 45–49.

Ulfa, R. (2021). Variabel penelitian dalam penelitian pendidikan. *Al-Fathonah: Jurnal Pendidikan Dan Keislaman*, 1(1), 342–351.

Utami, M., Widiawati, Y., & Hidayah, H. A. (2013). Keragaman dan pemanfaatan simplisia nabati yang diperdagangkan di purwokerto. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera A Scientific Journal*, 30(1), 1–10.

Vifta, R. L., & Advistasari, Y. D. (2018). Skrining Fitokimia, Karakterisasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.). *Prosiding Seminar Nasional Unimus*, 1, 8–14.

Wulandari Dyah, D., Nidianti, E., Andini, A., Fitri Awalia, R., & Prisilia, H. (2022). Pengaruh Penyimpanan dan Lama Pemanasan Terhadap Kadar Asam Galat pada Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.). *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 8(2), 196–201. <https://doi.org/10.22487/kovalen.2022.v8.i2.15947>

Xu, X. H., Li, T., Fong, C. M. V., Chen, X., Chen, X. J., Wang, Y. T., Huang, M. Q., & Lu, J. J. (2016). Saponins from chinese medicines as anticancer agents. *Molecules*, 21(10), 1–27. <https://doi.org/10.3390/molecules21101326>

Yanti, Y. N., Farmasi, A., & Al-Fatah Bengkulu, Y. (2017). Infusa daun randu (*ceibapetandraertn*) untuk formulasi obat kumur. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 2(2), 225–231. <https://doi.org/10.36387/jiis.v2i2.102>

Yanuartono, Purnamaningsih, H., Nururrozi, A., & Indarjulianto, S. (2017). Saponin : impact on livestock (a review). *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, 6(2), 79–90. <https://doi.org/10.33230/jps.6.2.2017.5083>

Youness, R. A., Kamel, R., Elkasabgy, N. A., Shao, P., & Farag, M. A. (2021). Recent advances in tannic acid (gallotannin) anticancer activities and drug delivery systems for efficacy improvement; a comprehensive review. *Molecules*, 25(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules26051486>

Zhang, S., Sun, K., Zheng, R., Zeng, H., Wang, S., Chen, R., Wei, W., & He, J. (2021). Cancer incidence and mortality in China, 2015. *Journal of the National Cancer Center*, 1(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2020.12.001>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Determinasi Tanaman Majapahit



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 : **Determinasi Tanaman Majapahit**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama / NIM : DENIATUL MASITOH / 1913206009
EGA NURGLIA 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 : *Crescentia cujete* L.
Nama Umum : Majapahit, mojopahit, mojo, maja, berenuk, berenuk (Jawa); tabu kayu (Melayu); bila balanda (Makasar); buah no (Ternate).
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b-16b-286a-287a: Bignoniaceae-1b-3a: Crescentia-3: *C. cujete*.

2. Morfologi

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

3. Bagian yang digunakan : Daun dan kulit batang.

4. Penggunaan : Penelitian.

5. Daftar Pustaka

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

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

Batu, 27 Oktober 2022



Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian

1. Persiapan sampel



Tanaman majapahit yang terletak di Wates, Sumbergempol



Kulit batang tanaman majapahit



Penimbangan kulit batang (1500g)



Sortasi basah



Sampel dipotong kecil



Perebusan kulit batang majapahit



Penyaringan sampel menggunakan kain



Hasil (ekstrak cair)

2. Evaporasi

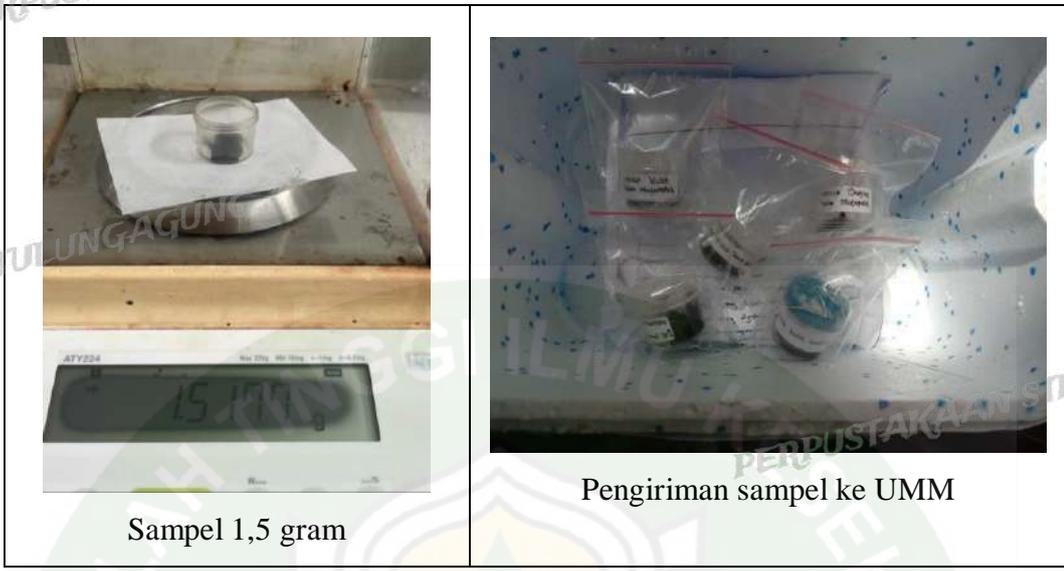


Proses pemekatan menggunakan rotary evaporator



Hasil ekstrak pekat

3. Persiapan analisis LCMS



Sampel 1,5 gram

Pengiriman sampel ke UMM

4. Skrining fitokimia

a. Uji alkaloid

Sebelum perlakuan	Setelah perlakuan	Hasil
		<p>Hasil (-)</p> <p>Tidak mengandung senyawa alkaloid karena tidak terbentuknya endapan berwarna putih</p>

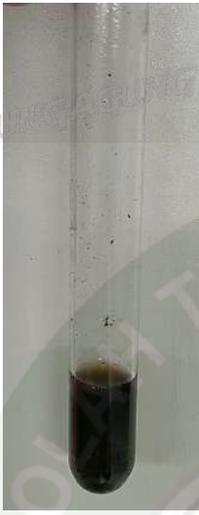
b. Uji Flavonoid

Sebelum perlakuan	Sesudah perlakuan	Hasil
		<p>Hasil (+)</p> <p>Terjadinya perubahan warna menjadi merah hingga jingga dan sedikit terbentuknya gelembung</p>

c. Uji Tanin

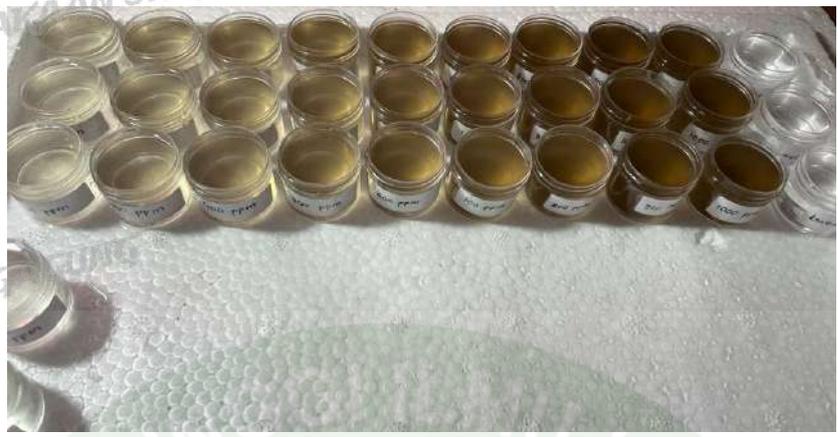
Sebelum perlakuan	Sesudah perlakuan	Hasil
		<p>Hasil (+)</p> <p>Terjadinya perubahan warna menjadi hijau kehitaman</p>

d. Uji saponin

Sebelum perlakuan	Sesudah perlakuan	Hasil
		Hasil (+) Terbentuknya busa yang stabil

5. Penetasan larva udang





Pembagian 10 larva udang ke 1000 ppm – 100 ppm



Perhitungan kematian larva udang

Lampiran 3. Perhitungan Bahan Seri Konsentrasi

1. Pembuatan DMSO 2% dari DMSO 100% sebanyak 50 ml

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

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

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

2. Pembuatan larutan induk 1000 ppm

Larutan induk dibuat dengan menimbang 100 mg ekstrak kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) yang telah dilarutkan dengan DMSO 2% yang kemudian dilarutkan ad 200 ml air laut buatan.

1000 ppm = 100 mg/ 100 ml → Dalam 100 ml sudah diencerkan dengan DMSO 2% → yang dibuat sebanyak 2x

3. Pembuatan seri konsentrasi 1000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, 100 ppm

- a. Konsentrasi 1000 ppm dalam 10 ml

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

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

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

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

- b. Konsentrasi 900 ppm dalam 10 ml

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 900 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{900 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}}$$

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

- c. Konsentrasi 800 ppm dalam 10 ml

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 800 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{800 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}}$$

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

d. Konsentrasi 700 ppm dalam 10 ml

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 700 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{700 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}}$$

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

e. Konsentrasi 600 ppm dalam 10 ml

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 600 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{600 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}}{1000 \text{ ppm}}$$

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

f. Konsentrasi 500 ppm dalam 10 ml

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

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

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

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

g. Konsentrasi 400 ppm dalam 10 ml

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

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

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

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

h. Konsentrasi 300 ppm dalam 10 ml

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

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

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

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

i. Konsentrasi 200 ppm dalam 10 ml

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

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

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

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

j. Konsentrasi 100 ppm dalam 10 ml

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

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

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

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

4. Perhitungan kematian larva tiap 10 ekor

Konsentrasi	Replikasi			Total	Rata rata
	1	2	3		
Kontrol negatif	0	0	0	0	0
1000 ppm	8	8	9	25	8,3
900 ppm	9	7	8	24	8
800 ppm	8	7	7	22	7,3
700 ppm	7	8	7	22	7,3
600 ppm	7	6	7	20	6,7
500 ppm	7	7	5	19	6,3
400 ppm	5	5	5	15	5
300 ppm	3	4	5	12	4
200 ppm	3	3	3	9	3
100 ppm	2	4	2	8	2,7

5. Perhitungan persen kematian

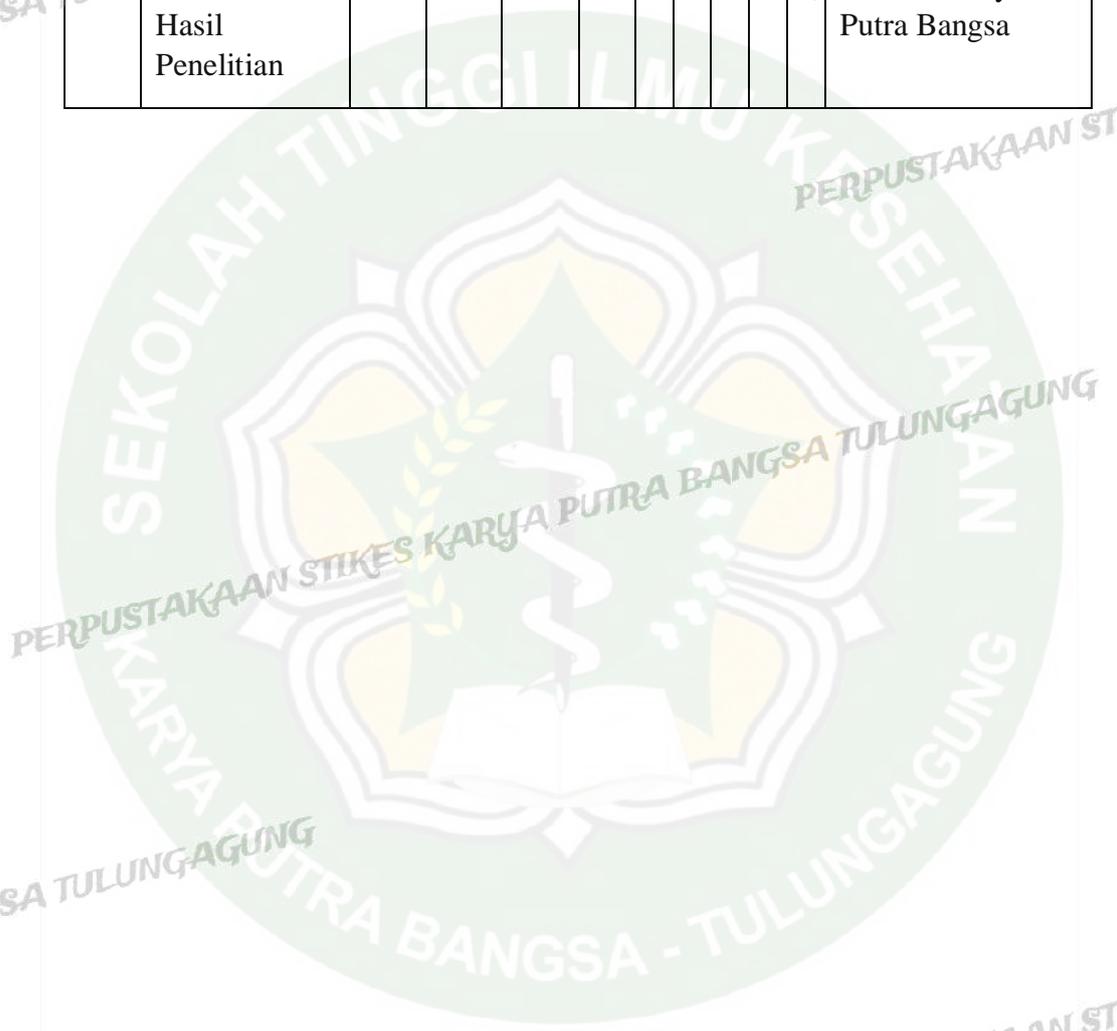
$$\% \text{ kematian larva} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva awal uji}} \times 100 \%$$

- a. Konsentrasi 1000 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{25}{30} \times 100 \% = 83 \%$
- b. Konsentrasi 900 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{24}{30} \times 100 \% = 80 \%$
- c. Konsentrasi 800 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{22}{30} \times 100 \% = 73 \%$
- d. Konsentrasi 700 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{22}{30} \times 100 \% = 73 \%$
- e. Konsentrasi 600 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{20}{30} \times 100 \% = 67 \%$
- f. Konsentrasi 500 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{19}{30} \times 100 \% = 63 \%$
- g. Konsentrasi 400 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{15}{30} \times 100 \% = 50 \%$
- h. Konsentrasi 300 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{12}{30} \times 100 \% = 40 \%$
- i. Konsentrasi 200 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{9}{30} \times 100 \% = 30 \%$
- j. Konsentrasi 100 ppm
 $\% \text{ kematian larva} = \frac{8}{30} \times 100 \% = 27 \%$

Lampiran 4. Jadwal Penelitian

Jadwal Kegiatan		Tahun 2022			Tahun 2023						Tempat	
		Bulan ke-										
		10	11	12	1	2	3	4	5	6		
1.	Pengajuan Judul	√										STIKes Karya Putra Bangsa
2.	Studi Literatur	√	√									STIKes Karya Putra Bangsa
3.	Seminar Proposal				√							STIKes Karya Putra Bangsa
4.	Determinasi tanaman				√							UPT Materia Medika Batu Malang, Jawa Timur
5.	Pembuatan simplisa				√							Lab Botani STIKes Kartrasa
6.	Pembuatan ekstrak				√							Lab Botani STIKes Kartrasa
7.	Penelitian Laboratorium					√						
	a. Skrining Fitokimia					√						Lab Botani STIKes Kartrasa
	b. Analisis LCMS					√						Universitas Muhammadiyah Malang
	c. Pengujian kuantitatif antikanker metode BSLT					√	√					Lab Kimia STIKes Kartrasa
8.	Pengumpulan data laboratorium						√					STIKes Karya Putra Bangsa

9.	Analisis data							√	√		STIKes Karya Putra Bangsa	
10.	Penyusunan laporan akhir								√	√	√	STIKes Karya Putra Bangsa
11.	Pengumpulan laporan akhir										√	STIKes Karya Putra Bangsa
12.	Seminar Hasil Penelitian										√	STIKes Karya Putra Bangsa



Lampiran 5. Tahap Prosedur Kerja Penelitian

1. Pembuatan infusa kulit batang

Kulit batang Majapahit

- Kulit batang majapahit dipisahkan dari daun
- Pengelupasan kulit batang dari batang majapahit
- Dilakukan penimbangan
- Dilakukan sortasi basah
- Kulit batang dikeringanginkan → pemotongan kecil kecil
- Dilakukan perebusan selama 30 menit
- Suhu air rebusan dicek dengan thermometer
- Dilakukan penyaringan menggunakan kain → ekstrak cair
- Dilakuka pemekatan dengan *rotary evaporator*
- Perhitungan rendemen

Hasil ekstrak kental

2. Pengujian skrining fitokimia

a. Uji alkaloid

Ekstrak kental kulit batang

- Mengambil sebanyak 2gram ekstrak kulit batang
- Dilarutkan dengan DMSO → masuk tabung reaksi
- Ditambahkan 9 ml *aquadest* dan 1 mL asam sulfat (H₂SO₄)
- Dipanaskan selama 30 menit
- Didiamkan hingga sampai larutan terbentuk dua lapisan
- Lapisan atas diuji dengan pereaksi dragendorff, mayer, dan wagner sebanyak 4 sampai 5 tetes
- Diamati perubahan → jika terbentuk endapan jingga pada pereaksi Dragendroff, endapan putih pada pereaksi Mayer dan endapan coklat pada pereaksi

Hasil

b. Uji flavonoid

Ekstrak kental
kulit batang

- Mengambil sebanyak 0,5 gram ekstrak
- Ditambahkan 5 mL *aquadest* → masuk tabung reaksi
- Dipanaskan selama 5 menit → disaring
- Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat
- Dilakukan pengocokan
- Diamati perubahan warna → jika terdapat warna merah, kuning, atau jingga → mengandung flavonoid

Hasil

c. Uji tanin

Ekstrak kental
kulit batang

- Mengambil 0,2 g ekstrak → dilarutkan dengan DMSO
- Dilakukan pengadukan hingga larut → masuk tabung reaksi
- Ditambahkan larutan FeCl_3 2 sampai 3 tetes
- Diamati perubahan → jika terdapat warna hitam kebiruan hingga hijau → mengandung senyawa tanin

Hasil

d. Uji saponin

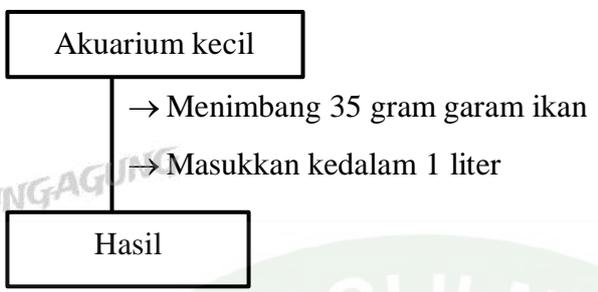
Ekstrak kental
kulit batang

- Mengambil 1 mg ekstrak dilarutkan DMSO
- Ditambahkan 5 ml *aquadest* → masuk tabung reaksi
- Ditambahkan pereaksi HCL 2% 1ml → pengocokan
- Diamati perubahan → jika terbentuk busa stabil → mengandung senyawa saponin

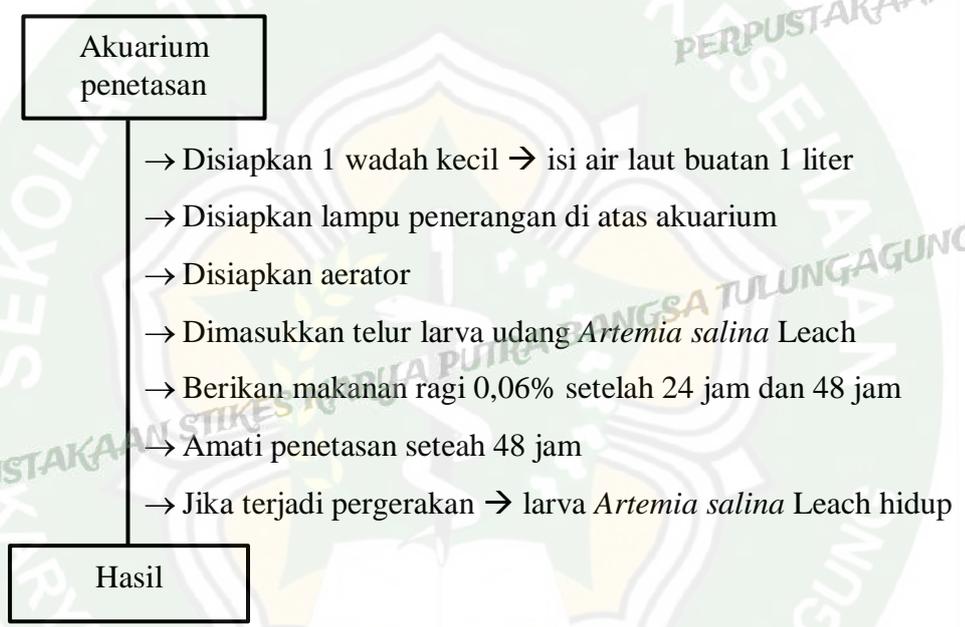
Hasil

3. Uji toksisitas dengan metode BSLT

a. Pembuatan air laut buatan



b. Penetasan larva udang *Artemia salina* Leach



c. Perlakuan pengujian toksisitas terhadap larva

