

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA KULIT BUAH
MAJAPAHIT (*Crescentia Cujete*) DENGAN LCMS
(*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) DAN
ANALISA TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach**

SKRIPSI



Oleh :

MAYA SRI ASHIRA

1913206024

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

STIKES KARYA PUTRA BANGSA

TULUNGAGUNG

JULI 2023

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA KULIT BUAH
MAJAPAHIT (*Crescentia Cujete*) DENGAN LCMS
(*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) DAN
ANALISA TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina* Leach**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar
Sarjana Farmasi (S.Farm) Program Studi S1 Farmasi
STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung



Oleh :

MAYA SRI ASHIRA

1913206024

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

JULI 2023

HALAMAN PERSETUJUAN

SKRIPSI

IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA KULIT BUAH MAJAPAHIT (*Crescentia Cujete*) DENGAN LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) DAN ANALISA TOKSISITAS TERHADAP *Artemia Salina Leach*

SKRIPSI

Yang diajukan oleh :

MAYA SRI ASHIRA

1913206024

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Rahma Diyan Martha, S.Si, M.Sc

NIDN. 0710029101

apt. Choirul Huda, M.Farm

NIDN. 0726038502

PERNYATAAN

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

Tulungagung, Juli 2023

Penulis,

Maya Sri Ashira

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA KULIT BUAH
MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN LCMS
(*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) DAN
ANALISA TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach**

MAYA SRI ASHIRA

Prodi SI Farmasi

INTISARI

Kanker merupakan salah satu penyakit yang memiliki kematian tertinggi. Pengobatan kanker dapat ditangani dengan penanganan secara non medis seperti pengobatan tradisional salah satunya dengan penggunaan tanaman majapahit. Tanaman majapahit merupakan tanaman yang bersifat toksik terhadap sel kanker, hal ini dapat dilihat dari penelitian yang ada, terutama pada bagian kulit buah majapahit. Bagian lain tanaman majapahit juga memiliki potensi yang sama, namun belum begitu banyak yang meneliti seperti pada bagian kulit buah majapahit. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui kandungan dan kadar senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antikanker pada ekstrak infusa kulit buah majapahit menggunakan LCMS, dan untuk mengetahui kadar toksisitas akut (LC_{50}) yang terkandung dalam ekstrak infusa kulit buah majapahit terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT. Pada penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Ekstrak kulit buah majapahit diperoleh dengan cara infundasi menggunakan aquadest, yang kemudian diujikan secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian toksisitas ekstrak kulit buah majapahit menggunakan konsentrasi 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, dan 600ppm yang diberikan pada larva *Artemia salina* Leach selama 24 jam dan menghitung nilai LC_{50} menggunakan analisis probit. Hasil pengujian secara kualitatif dan kuantitatif ekstrak kulit buah majapahit mengandung satu senyawa dengan berat molekul tertinggi yang disebut sebagai marmeline dari golongan alkaloid sebesar 3,17998%. Sedangkan dari hasil pengujian toksisitas akut ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 805,19ppm. Dari nilai LC_{50} yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) memiliki sifat yang toksik terhadap larva dan berpotensi sebagai antikanker dengan ditandai perolehan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm.

Kata kunci : Antikanker, *Artemia salina* Leach, LCMS, Kulit Buah Majapahit, Metode BSLT

**IDENTIFIKASI SENYAWA INFUSA KULIT BUAH
MAJAPAHIT (*Crescentia cujete*) DENGAN LCMS
(*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) DAN
ANALISA TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach**

MAYA SRI ASHIRA

Pharmacy SI Study Program

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases that has the highest mortality. Cancer treatment can be treated with medical treatments such as chemotherapy, radiotherapy and non medical treatment such as traditional medicine such as the use of the majapahit plant. The majapahit plant is a plant that is toxic to cancer cells, this can be seen from existing research, especially on the skin of the majapahit fruit. Other parts of the majapahit plant also have the same potential, but not so much research has been done on the skin of the majapahit fruit. The purpose of this study was to determine the content and levels of secondary metabolites that have anticancer activity in majapahit rind infusion extract using LCMS, and to determine the acute toxicity level (LC_{50}) contained in majapahit rind infusion extract against *Artemia salina* Leach larvae with the BSLT. In this study using experimental methods. Majapahit rind extract was obtained by inundation using squarest, which was then tested qualitatively and quantitatively. Toxicity testing of majapahit rind extract used concentrations of 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, and 600ppm given to *Artemia salina* Leach larvae for 24 hours and calculated the LC_{50} value using profit analysis. The result of qualitative of quantitative testing of majapahit rind extract contained a compound with the highest molecular weight called marmeline from the alkaloid group of 3.17998%. Meanwhile, the results of the acute toxicity test of majapahit (*Crescentia cujete*) rind extract using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method yielded an LC_{50} value of 805,19ppm. From the LC_{50} value obtained, it can be concluded that majapahit (*Crescentia cujete*) rind extract has toxic properties to larvae and has the potential as an anticancer with a marked acquisition of LC_{50} value.

Keywords : Anticancer, *Artemia salina* Leach, LCMS, Majapahit Fruit Skin, BSLT Method

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena dengan rahmat, karunia, serta taufik dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Identifikasi Senyawa Infusa Kulit Buah (*Crescentia cujete*) Dengan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) Dan Analisa Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach**, ini dengan baik meskipun masih terdapat banyak kekurangan di dalamnya.

Skripsi ini merupakan salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) pada Jurusan Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKes). Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, semangat, dan doa sehingga proposal penelitian ini dapat selesai. Ucapan terimakasih ini penulis tujukan 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 S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung.
3. Ibu Rahma Diyan Martha, S. Si., M.Sc. selaku pembimbing I yang telah mendidik dan memberikan arahan serta bimbingan selama penyusunan naskah.
4. Bapak apt. Choirul Huda, M. Farm selaku pembimbing II yang telah mendidik dan memberikan arahan serta bimbingan selama penyusunan naskah.
5. Ibu Afidatul Muadifah, S. Si., M. Si. selaku pembimbing III yang telah memberi bimbingan selama masa penyusunan naskah.
6. Ibu apt. Amalia Eka Putri, M. Farm selaku pembimbing IV yang telah memberi bimbingan selama masa penyusunan naskah.
7. Segenap laboran laboratorium Program Studi Farmasi dan Civitas Akademika Fakultas Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa yang telah membantu dalam proses perkuliahan dan penyusunan skripsi.
8. Kedua orang tua saya yang memberikan dukungan dan doa selama penyusunan skripsi.

9. Diri saya sendiri, yang telah mampu kooperatif dalam mengerjakan tugas akhir ini. Terimakasih karena selalu berpikir positif Ketika keadaan sempat tidak berpihak, dan selalu berusaha mempercayai diri sendiri, hingga akhirnya diri saya mampu membuktikan bahwa saya bisa mengandalkan diri sendiri.
10. Seluruh teman Angkatan 2019 Jurusan Farmasi yang telah memberikan dukungan semangat dan doa.
11. Teman sekelompok dari Departemen Kimia “Tim Majapahit” yang telah memberikan dukungan semangat.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak sangat diharapkan untuk memperbaiki skripsi. Penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberi manfaat bagi pembaca dan menambah pengetahuan bagi semua pihak. Terima kasih.

Tulungagung, Juli 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
INTISARI	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR PERSAMAAN.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Relevansi Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kanker.....	6
2.2 Tinjauan Umum Tanaman Majapahit.....	7
2.2.1 Deskripsi Tanaman Majapahit	7
2.2.2 Morfologi Tanaman	8
2.2.3 Manfaat atau Khasiat.....	8
2.3 Kandungan Senyawa	8
2.3.1 Alkaloid.....	9
2.3.2 Flavonoid	10
2.3.3 Saponin.....	10
2.3.4 Tanin	11
2.4 Ekstrak.....	11
2.4.1 Definisi Ekstrak.....	11

2.4.2	Penggolongan Ekstrak.....	11
2.4.2.1	Ekstrak Cair	11
2.4.2.2	Ekstrak Kental	11
2.4.2.3	Ekstrak Kering.....	11
2.5	Ekstraksi	12
2.5.1	Definisi Ekstraksi	12
2.5.2	Jenis Metode Ekstraksi.....	12
2.5.2.1	Maserasi.....	12
2.5.2.2	Perkolasi	13
2.5.2.3	Infundasi	13
2.5.2.4	Soxhletasi	13
2.5.2.5	Refluks.....	14
2.5.2.6	Digesti	14
2.5.2.7	Destilasi (Penyulingan)	14
2.5.3	Pemilihan Metode Ekstraksi	14
2.6	Pelarut.....	15
2.6.1	Air	15
2.6.2	Aseton	15
2.6.3	Etanol	16
2.6.4	Metanol	16
2.6.5	Kloroform.....	16
2.6.6	Eter	16
2.6.7	N-heksana.....	17
2.6.8	Etil Asetat.....	17
2.6.9	DMSO (<i>Dimetil sulfoksida</i>)	17
2.7	Metode Identifikasi Senyawa	17
2.7.1	Alkaloid.....	17
2.7.2	Flavonoid	18
2.7.3	Saponin.....	18
2.7.4	Tanin	19
2.8	Evaporasi	19
2.8.1	Metode Pemanas Air	20
2.8.2	Metode Oven.....	20

2.8.3	Metode Hot Plate.....	20
2.8.4	Metode Evaporator Tabung.....	20
2.9	LCMS (<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>).....	20
2.9.1	Deskripsi LCMS (<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>).....	20
2.9.2	Prinsip Kerja LCMS (<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>).....	21
2.9.3	Komponen Dasar LCMS.....	22
2.9.3.1	Solvent Manager.....	22
2.9.3.2	Sample Manager.....	22
2.9.3.3	Kolom.....	22
2.9.3.4	Mass Analyzer.....	23
2.9.3.5	Detektor.....	24
2.9.3.6	Komputer.....	24
2.10	Uraian Larva Udang (<i>Artemia salina</i> Leach).....	24
2.10.1	Deskripsi <i>Artemia salina</i> Leach.....	24
2.10.2	Tahap Proses Penetasan Kista <i>Artemia salina</i> Leach.....	25
2.10.3	Perkembangan dan Siklus Hidup <i>Artemia salina</i> Leach.....	26
2.11	Perlakuan <i>Artemia salina</i> Leach.....	27
2.12	Larva <i>Artemia salina</i> Leach Sebagai Hewan Uji.....	27
2.13	Uji Toksisitas.....	28
2.13.1	Uji Toksisitas In Vitro.....	29
2.13.2	Uji Toksisitas In Vivo.....	29
2.13.2.1	Uji Toksisitas Akut.....	30
2.13.2.2	Uji Toksisitas Subkronis.....	30
2.13.2.3	Uji Toksisitas Kronis.....	30
2.14	Uraian Toksisitas Terhadap <i>Artemia salina</i> Leach Dengan Metode BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>).....	31
2.15	BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>).....	31
2.16	Penentuan Nilai LC ₅₀ Dengan Metode Probit.....	32
2.17	Hipotesis.....	33
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....		34
3.1	Jenis Penelitian dan Lokasi.....	34
3.1.1	Jenis Penelitian.....	34
3.1.2	Lokasi Penelitian.....	34

3.2	Alat dan Bahan	34
3.2.1	Alat.....	34
3.2.2	Bahan.....	34
3.3	Populasi Penelitian.....	34
3.4	Metode Pengambilan Sampel	35
3.5	Variabel Penelitian.....	35
3.5.1	Variabel Bebas	35
3.5.2	Variabel Kontrol.....	35
3.5.3	Variabel Terikat	36
3.6	Metode Penyarian	36
3.7	Metode Penelitian	36
3.7.1	Determinai Tanaman	36
3.7.2	Pengambilan Sampel.....	36
3.7.3	Pengolahan Sampel	36
3.7.4	Pembuatan Infusa Kulit Buah Majapahit.....	36
3.8	Uji Rendemen	37
3.9	Skrinning Uji Fitokimia.....	37
3.8.1	Pengujian Alkaloid.....	37
3.8.2	Pengujian Flavonoid	37
3.8.3	Pengujian Saponin.....	38
3.8.4	Pengujian Tanin	38
3.10	Analisis LCMS (<i>Liquid Chromatography mass Spectrometry</i>)	38
3.10.1	Persiapan Sampel	38
3.10.2	Analisis LCMS.....	38
3.11	Skrining Analisa Toksisitas dengan Metode BSLT.....	39
3.10.1	Pembuatan Air Laut Buatan.....	39
3.10.2	Penetasan Larva Udang Artemia.....	39
3.10.3	Pembagian Kelompok Perlakuan	39
3.12	Pembuatan Larutan Stok.....	40
3.13	Perlakuan Uji Toksisitas	40
3.14	Analisis Data Toksisitas	42
3.15	Kerangka Penelitian.....	42
	BAB IV PEMBAHASAN.....	43

4.1	Determinasi Tanaman	43
4.2	Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Majapahit	43
4.3	Uji Rendemen	44
4.4	Skrinning Fitokimia	45
4.4.1	Uji Alkaloid	45
4.4.2	Uji Flavonoid	47
4.4.3	Uji Saponin	48
4.4.4	Uji Tanin	49
4.5	Identifikasi Senyawa Infusa Kulit Buah Majapahit Menggunakan LCMS (<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometri</i>)	51
4.6	Skrinning Analisa Toksisitas dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	53
4.6.1	Pembuatan Air Laut Buatan	54
4.6.2	Penetasan Telur <i>Artemia salina</i> Leach	54
4.6.3	Uji Toksisitas Dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	54
BAB V PENUTUP		59
5.1	Kesimpulan	59
5.2	Saran	59
DAFTAR PUSTAKA		60
LAMPIRAN		66

DAFTAR GAMBAR

Gambar	
Gambar 2.1	Pohon Majapahit (<i>Crescentia cujete</i> L.)..... 7
Gambar 2.2	<i>Artemia salina</i> Leach..... 25
Gambar 2.3	Tahapan Perkembangan Kista artemia menjadi nauplii 26
Gambar 2.4	Siklus Hidup <i>Artemia salina</i> Leach..... 26
Gambar 3.1	Transformasi persentase menjadi probit..... 41
Gambar 4.1	Persamaan Pereaksi Mayer 46
Gambar 4.2	Persamaan Pereaksi Dragendroff..... 46
Gambar 4.3	Hasil Uji Alkaloid dengan Pereaksi Mayer 46
Gambar 4.4	Hasil Uji Alkaloid dengan Pereaksi Dragendroff..... 47
Gambar 4.5	Persamaan Reaksi Fenol dengan $FeCl_3$ 47
Gambar 4.6	Hasil Uji Flavonoid..... 48
Gambar 4.7	Persamaan Pereaksi Saponin dengan Air 48
Gambar 4.8	Hasil Uji Saponin..... 49
Gambar 4.9	Reaksi Antara Tanin dan $FeCl_3$ 50
Gambar 4.10	Hasil Uji Tanin 50
Gambar 4.11	Hasil Kromatogram LCMS 52
Gambar 4.12	Hasil Mass Spectrometri senyawa marmeline..... 52
Gambar 4.13	Grafik regresi linier..... 57

DAFTAR TABEL

Tabel

Tabel 2.1 Kategori Toksisitas Bahan.....	31
Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Perlakuan	40
Tabel 3.2 Model Tabel Data Probit Analisis	41
Tabel 4.1 Hasil Rendemen Ekstrak	44
Tabel 4.2 Hasil Skrining Fitokimia	45
Tabel 4.3 Hasil Deteksi Dan Identifikasi Senyawa Menggunakan LCMS	52
Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Kematian Larva dari Uji Pendahuluan	55
Tabel 4.5 Tabel Prosentasi Kematian Larva	56
Tabel 4.6 Data Pengamatan Kematian Larva Udang	56

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 3.1 37
Persamaan 3.2 40
Persamaan 3.3 40
Persamaan 3.4 41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Lampiran. 1 Hasil Determinasi Kulit Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)... 66

Lampiran. 2 Dokumentasi Penelitian 67

Lampiran. 3 Orientasi Untuk Mendapatkan Seri Konsentrasi 72

Lampiran. 4 Perhitungan Nilai LC₅₀ 75

Lampiran. 5 Jadwal Penelitian 76

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu penyakit yang memiliki tingkat kematian tertinggi yaitu kanker. Kanker merupakan masalah utama kesehatan baik di negara maju maupun negara berkembang. Pengobatan penyakit kanker, sebagian besar menimbulkan resistensi, menyebabkan efek samping dan biayanya relatif mahal. Upaya eksplorasi bahan alam sebagai obat kanker merupakan salah satu hal yang dapat dilakukan dalam mengembangkan pengobatan alternatif yang lebih murah (Ilyas dkk., 2015). Kanker adalah segolongan penyakit yang ditandai pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (invasi) atau dengan migrasi sel ketempat yang jauh (Setiawan, 2015).

Kanker merupakan pembelahan sel yang ditandai dengan beberapa faktor diantaranya faktor eksternal yang dapat memicu terjadinya kanker yaitu mengonsumsi alkohol berlebihan, merokok, radiasi dan faktor internal yaitu hormon, kekebalan, mutase acak, dan mutase bawaan. Faktor lainnya yaitu faktor pola makan, disebabkan oleh jamur maupun virus, obesitas, dan kurangnya aktivitas fisik (Aliwikarta dkk., 2016).

Pengobatan kanker dapat ditangani dengan penanganan secara medis dan non medis. Pengobatan penyakit kanker secara konvensional (medis) telah dikembangkan dengan berbagai macam pengobatan dari terapi farmakologi, radioterapi, kemoterapi, hormonoterapi, imunoterapi, bahkan tindakan pembedahan dengan resiko yang timbul sehingga pasien penderita kanker memerlukan pendekatan sistemik pada pengobatan penyakit tersebut. Efek samping dari pengobatan konvensional yaitu gejala gastrointestinal, seperti mual, muntah, kehilangan berat badan, perubahan rasa, konstipasi, diare, rambut rontok dan perubahan emosi maupun perubahan pada sistem saraf (Setiawan, 2015). Efek samping merugikan dari pengobatan konvensional, maka adanya alternatif obat

baru yaitu efektivitas yang sama tetapi dengan efek samping yang lebih kecil yaitu pengobatan secara alternatif (non medis) yang aman untuk pengobatan kanker dengan menggunakan pemilihan obat tradisional.

Pemilihan obat tradisional salah satu tanaman yang digunakan masyarakat sebagai obat tradisional yaitu tanaman majapahit. Tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) umumnya bisa dijumpai di daerah tropis. Tanaman majapahit merupakan jenis tanaman dikotil berbunga yang berasal dari Grenada (Fardilla & Hidajati, 2018). Tanaman majapahit merupakan salah satu tanaman tradisional yang berpotensi untuk pengobatan penyakit kanker (Martha & Fatimah, 2021). Khasiat yang terdapat pada tanaman majapahit diantaranya sebagai gangguan pernapasan, hipertensi, antidiabetes, antiinflamasi, antioksidan dan antikanker (Rahmaningsih & Andriani, 2017). Ekstrak kulit buah majapahit diketahui memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder berupa senyawa alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, saponin, tanin dan ekstrak daging buah majapahit mengandung senyawa flavonoid yang diduga bersifat sitotoksik terhadap *Artemia Salina* Leach (Ratnawati, 2012).

Senyawa kimia pada tanaman diperlukan ekstraksi. Penelitian ini kulit buah majapahit dilakukan dengan menggunakan metode infundasi yang menghasilkan ekstrak infusa. Infusa merupakan sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi simplisia nabati dengan menggunakan pelarut air pada suhu 90°C. Pembuatan infusa dengan cara pemanasan simplisia pada pemanas air selama 15 menit sesekali diaduk. Penyarian dilakukan dalam keadaan panas (Mulyana dkk., 2013). Infundasi dipilih karena lebih efektif, efisien, dan dapat mengurangi limbah organik.

LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectometry*) merupakan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa apa saja yang berperan sebagai antikanker. LCMS merupakan kombinasi dari *Liquid Chromatography* (LC) yaitu memisahkan komponen sampel dan *Mass Spectrometer* (MS) membuat dan mendeteksi ion bermuatan (Saibaba dkk., 2016). Metode LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectometry*) hasil yang didapat berupa alur tinggi peak dan bobot molekul dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak untuk mengetahui jumlah senyawa yang dikandung pada setiap sampel. Data LCMS berupa

informasi mengenai berat molekul, struktur, identitas dan jumlah komponen dalam sampel dengan prinsip menggabungkan kemampuan analisis kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa (Mangurana dkk., 2019).

Efek toksik terhadap larva udang dapat digunakan untuk sumber antikanker maka perlu dilakukan dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) sebagai tahap pengujian awalnya hingga kemudian melakukan perhitungan nilai LC_{50} . *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru. Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) ini mempunyai keuntungan diantaranya waktu pelaksanaan yang cepat, biaya lebih murah, praktis, tidak memerlukan teknis yang aseptis, sampel yang relatif sedikit dan hasil ujinya berkorelasi baik dengan beberapa metode uji toksisitas (Saibaba dkk., 2016). Metode ini menggunakan larva *Artemia Salina* Leach untuk pengujiannya serta untuk mengetahui banyaknya larva *Artemia Salina* Leach yang mati. Pengaruh kematian larva *Artemia Salina* Leach yaitu dengan pemberian ekstrak atau senyawa yang terkandung didalam ekstrak yang mempunyai konsentrasi tertentu (Saibaba dkk., 2016). Metode tersebut dilakukan selama 24 jam untuk menentukan nilai LC_{50} dan penentuan nilai LC_{50} (*median lethal concentration*) menggunakan probit analisis. Nilai LC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% kematian larva udang *Artemia Salina* Leach setelah perlakuan 24 jam. Ekstrak uji dikatakan toksik apabila nilai $LC_{50} < 1000\mu\text{g/ml}$ (Purwanto dkk., 2015).

Berdasarkan uraian tersebut bahwa tanaman majapahit mempunyai potensi sebagai antikanker, maka dipenelitian ini peneliti akan membuktikan kandungan senyawa pada kulit buah Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan menggunakan metode LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) dan membuktikan efek toksisitas kulit buah Majapahit (*Crescentia cujete*) sebagai potensi antikanker dengan metode infundasi. Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*).

1.2 Rumusan Masalah

Sesuai dengan latar belakang yang telah dikemukakan diatas, maka yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah :

- 1.2.1 Bagaimana hasil kandungan senyawa infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang diidentifikasi menggunakan LCMS?
- 1.2.2 Bagaimana hasil identifikasi infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) menggunakan LCMS yang memiliki peak tertinggi?
- 1.2.3 Bagaimana hasil LC₅₀ pada infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Untuk mengetahui kandungan senyawa infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang diidentifikasi menggunakan LCMS.
- 1.3.2 Untuk mengetahui hasil identifikasi infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) menggunakan LCMS yang memiliki peak tertinggi.
- 1.3.3 Untuk mengetahui hasil LC₅₀ pada infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap *Artemia Salina* Leach.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1.4.1 Sampel pada penelitian yang digunakan dari tanaman majapahit (*Crescentia Cujete*), yaitu bagian kulit buah majapahit yang diambil dari kawasan Desa Wates, Sumbergempol, Tulungagung.
- 1.4.2 Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian yaitu menggunakan infundasi yang menghasilkan infusa kulit buah dari tanaman majapahit (*Crescentia Cujete*).
- 1.4.3 Uji toksisitas kulit buah majapahit menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*).
- 1.4.4 Identifikasi senyawa dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectometry*) yang mempunyai potensi sebagai antikanker.

1.5 Relevansi Penelitian

Penelitian ini memiliki relevansi dengan penelitian sebelumnya yaitu sebagai berikut :

- 1.5.1 Pada penelitian lain yang diteliti oleh Devi Ratnawati pada tahun 2012 yang berjudul “Uji Aktifitas Biologis Ekstrak Kulit dan Daging Buah

Majapahit Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*'. Adapun hasil dari penelitian tersebut adalah ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia Cujete*) mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, dan ekstrak buah maja mengandung senyawa flavonoid yang diduga mempunyai efek toksik terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} untuk ekstrak kulit dan buah majapahit berturut-turut adalah 47,97 mg/L dan 68,07 mg/L.

1.5.2 Penelitian oleh Rahma Diyan Martha dan Fatimah tahun 2020 yang berjudul "Uji Toksisitas Ekstrak Etanolik Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia Cujete*) Terhadap *Artemia salina* Leach". Adapun hasil penelitian ini yaitu dari pengujian fitokimia yang dilakukan positif mengandung adanya kandungan flavonoid, tanin, saponin, dan fenolat.

1.5.3 Pada penelitian oleh Fatimah, Rahma Diyan Martha dan Danar tahun 2022 yang berjudul "Analisis Toksisitas dan Potensi Antikanker Ekstrak Metanol Daun Majapahit (*Crescentia kujete*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*'. Adapun hasil dari penelitian ini adalah ekstrak metanol daun Majapahit diketahui berpotensi dikembangkan untuk sumber antikanker. Dengan ditandai hasil uji toksisitas ekstrak memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

Kanker merupakan sel-sel jaringan tubuh yang ganas yang ditandai dengan pembelahan sel yang cepat dan tidak terkendali membentuk sel sejenis dengan sel asalnya, akan tetapi dalam bentuk primitif dan tidak sempurna (Prastiwi & Febri, 2013). Pada mekanisme biokimia didalam tubuh, penyebab dari penyakit kanker ada dua yaitu akibat stres oksidatif dan radikal hidroksil, karena pada keadaan stress oksidatif muncul ketidak seimbangan antara radikal bebas dan antioksidan. Tubuh juga memproduksi radikal bebas yang berfungsi untuk memberi sinyal dalam melakukan apoptosis atau kematian sel yang terprogram. Namun jumlah radikal bebas yang berlebihan dalam tubuh dapat menyebabkan rusaknya regulasi, rusaknya aktivitas sel bahkan rusaknya DNA. DNA yang rusak mengakibatkan perubahan genetik secara permanen bahkan dapat menginisiasi terjadinya kanker.

Menurut Chandra (2011) mekanisme terjadinya kanker akibat radikal bebas yang berlebih didalam tubuh dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu : inisiasi atau permulaan yaitu terjadinya perubahan permanen genom sel yang berakhir pada mutagenesis, promosi merupakan sel-sel mutan melakukan ekspansi dan progresi yaitu pada tahap ini, sel tumor bersaing satu dengan yang lain untuk bertahan hidup, mengarah lebih banyak mutasi yang membuat sel lebih agresif. Dengan meningkatnya heterogenitas, sel-sel kanker yang ganas akan bertindak secara cepat dan pengobatan semakin sulit (Chandra dkk., 2011).

Adanya radikal berlebih dalam tubuh dapat dicegah dengan senyawa antioksidan baik itu alami maupun sintetis. Senyawa antioksidan alami dapat diperoleh dari bahan-bahan yang mengandung senyawa flavonoid golongan flavonon sebagai zat antimutagenik, antiinflamasi, antiviral, dan antikanker.

Thymoquinone merupakan senyawa bioaktif yang memiliki efek sebagai antiinflamasi dan antioksidan. *Thymoquinone* memiliki tingkat toksisitas yang cukup baik dibandingkan dengan senyawa lain. Mekanisme *thymoquinone* sebagai antikanker yaitu dengan cara memodulasi target utama serta jalur-jalur yang

terlibat dalam kontrol siklus sel, apoptosis, angiogenesis, invasi sel, metastasis dan transduksi sinyal sehingga pertumbuhan sel kanker terhambat.

2.2 Tinjauan Umum Tanaman Majapahit

2.2.1 Deskripsi Tanaman Majapahit

Menurut (Fatmawati, 2015) tumbuhan majapahit pada (Gambar 2.1) (*Crescentia Cujete*) memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Scrophulariales
Famili	: Bignoniaceae
Genus	: Crescentia
Spesies	: <i>Crescentia kujete</i> L.



(a)



(b)

Gambar 2.1 (a) Pohon Majapahit (*Crescentia kujete* L.), dan (b) Kulit Buah Majapahit (*Crescentia kujete* L.) (Fatmawati, 2015)

Crescentia kujete termasuk golongan dari divisi spermatophyta karena mempunyai ciri ciri antara lain, makroskopis dengan ketinggian bervariasi, bentuk tubuhnya bervariasi, cara hidup fotoautotrof, habitatnya kebanyakan didarat, mempunyai pembuluh floem dan xilem, reproduksi melalui penyerbukan dan pembuahan. Tanaman majapahit juga termasuk kedalam kelas dikotil dengan ciri-ciri memiliki bunga dengan sepasang daun lembaga (kotiledon). Tumbuhan ini juga masuk dalam ordo scrophulariales yang berciri-ciri daun tunggal, jarang majemuk, duduk tersebar atau beradapan, dan tanpa daun penumpu.

Tumbuhan ini juga termasuk dalam famili Bignoniaceae karena daunnya kebanyakan majemuk, duduk tersebar atau berhadapan, tanpa daun penumpu. Bunganya mempunyai warna menarik. Kelopak berbentuk lonceng, mahkota dengan 5 tajuk yang tersusun seperti genting, benang sari 4 atau 2 melekat pada mahkota berseling dengan tajuk mahkota, 1-3 diantaranya mandul atau tereduksi.

Majapahit (*Crescentia Cujete*) biasa disebut Maja memiliki sebutan beragam di tiap daerah, antara lain : Mojo atau Mojo legi (Jawa), Maos (Madura), Bilak (Melayu), dan Kabila (Alor, Nusa Tenggara) (Fatmawati, 2015).

2.2.2 Morfologi Tanaman

Habitus : Pohon, tinggi ± 10 m. Batang : berkayu, bulat, percabangan sympodial, 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 ± 2 mm, coklat. Akar : tunggang, putih kotor (Materia Medika Indonesia, 2022).

2.2.3 Manfaat atau Khasiat

Manfaat buah majapahit dapat digunakan sebagai obat gangguan pencernaan dan penurun demam pada bagian akarnya. Selain itu buah yang matang dapat diiris, dikeringkan dan digunakan sebagai obat disentri kronis, diare, dan sembelit. Kulit batangnya digunakan untuk meracuni ikan. Akar majapahit digunakan sebagai obat penenang debaran jantung, gangguan pencernaan, dan tukak lambung. Daun majapahit mengandung saponin dan tanin, pada akar dan kulit batangnya mengandung flavonoid tanin. Getah majapahit dapat digunakan sebagai obat *pharmaceutical* yang berfungsi sebagai perekat untuk obat-obatan tablet (Patil dkk., 2010).

2.3 Kandungan Senyawa

Majapahit (*Crescentia cujete L*) memiliki kandungan senyawa fenol, flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid (Dewi dkk., 2014). Menurut penelitian Rinawati (2011) bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka untuk

perlakuan kandungan senyawa metabolit dalam ekstrak tersebut lebih banyak sehingga daya racunnya semakin tinggi dengan demikian kematian larva semakin banyak. Peningkatan persentase mortalitas larva dengan semakin tingginya konsentrasi ekstrak selain karena besarnya kadar bahan aktif yang bersifat toksik juga diduga karena kurangnya nutrisi yang dikonsumsi oleh larva. Senyawa-senyawa tersebut meliputi terpenoid dan tanin (Dewi dkk., 2014).

Pada penelitian Amit dan Rashmi (2011) menyatakan bahwa kandungan buah majapahit diantaranya alkaloid, terpenoid, polifenol, saponin, tanin, dan plobatanin. Pada penelitian lain juga disebutkan pula kandungan buah majapahit diantaranya alkaloid, flavonoid, fenol dan tanin sebagai potensi antikanker. Buah majapahit mengandung komponen tanin 9%, sedangkan pada kulit buah majapahit mencapai 20% (Fauzi & Santoso, 2021).

Uraian kandungan senyawa kimia kulit buah tanaman majapahit sebagai antikanker diantaranya adalah :

2.3.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder pada tanaman. Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang banyak ditemukan dalam tumbuhan yang ada di alam. Semua kandungan senyawa alkaloid terdapat atom nitrogen yang mempunyai sifat basa dan merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Alkaloid bersifat polar dan memiliki titik didih berkisar 138°C (Wilantari, 2018).

Mekanisme kerja dari alkaloid sebagai antikanker yaitu dengan menghambat proliferasi sel dengan cara mempengaruhi dinamika mikrotubulus selama mitosis, sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat dan menyebabkan terjadinya apoptosis. Alkaloid memiliki mekanisme sitotoksik dengan cara berikatan dengan tubulin (protein yang menyusun mikrotubulus) sehingga polimerasi protein menjadi mikrotubulus terhambat dan menyebabkan pembentukan benang spindle terhambat. Hal tersebut menyebabkan siklus terhenti pada tahap metaphase sehingga tidak terjadi pembelahan sel dan memicu terjadinya apoptosis (Mondal dkk., 2019).

2.3.2 Flavonoid

Jenis senyawa metabolit sekunder yang paling banyak terkandung dalam tumbuhan adalah flavonoid dan alkaloid. Kedua senyawa ini biasanya berada pada seluruh bagian tanaman, yaitu pada akar, batang, daun, buah, dan bunga. Akan tetapi, kandungan senyawa flavonoid yang berperan penting dalam melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Fungsi umum yang dimiliki oleh flavonoid yaitu pemberi zat warna bunga pada tanaman dan membantu proses penyerbukan. Senyawa flavonoid juga berperan dalam perlindungan diri dari serangan jamur maupun paparan sinar UV-B. Senyawa flavonoid memiliki struktur berupa cincin aromatis yang memberikan gambaran bahwa senyawa ini terbentuk dari jalur biosintesis poliketida (Redha, 2010).

Flavonoid termasuk dalam senyawa fenolik dengan struktur kimia $C_6C_3C_6$ yang terdiri dari satu cincin A dan satu cincin B dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen (Redha, 2010). Flavonoid bersifat polar, flavonoid tidak terurai pada suhu $>90^{\circ}C$. Golongan senyawa flavonoid polifenol quarcetin memiliki efek antikanker dengan menghambat mekanisme modulasi ekspresi gen tumor yang merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang terlibat dalam pathogenesis penyakit inflamasi kronis dan dimodulasi oleh stress oksidatif (Ravishankar dkk., 2013). Antioksidan yang memiliki keterkaitan dengan kanker dalam mempertahankan tingkat ROS/RNS (*reactive oxygen species* /*Reactivenitrogen species*) dan memperbaiki kerusakan sel oksidatif karena keduanya berperan utama dalam perembangan kanker.

2.3.3 Saponin

Saponin merupakan metabolit sekunder dari tanaman. Saponin merupakan glikosida yang tersusun dari gula yang berikatan dengan aglikon (sapogenin) yang terdiri dari rantai triterpenoid atau steroid. Saponin memiliki sifat cenderung polar karena ikatan glikosidanya. Saponin memiliki titik didih yang cukup tinggi yaitu $158^{\circ}C$, selain itu saponin mempunyai karakteristik berupa buih dan busa sehingga ketika direaksikan dengan air dan dikocok maka akan terbentuk buih atau busa yang dapat bertahan lama dan stabil. Saponin mudah larut dalam air dan sulit larut dalam eter. Mekanisme saponin sebagai antikanker yaitu bekerja dengan menargetkan berbagai protein yang terkait kanker, penghentian siklus sel, induksi

apoptosis, aktivasi stress ER (*Endoplasmic reticulum*), penghambatan invasi dimana sel kanker menembus jaringansekitarnya dan berproliferasi, dan pembalikan MDR (*Multidrug Resistance*) (Yildirim & Kutlu, 2015).

2.3.4 Tanin

Senyawa tanin merupakan golongan senyawa fenolik yang dihasilkan dari beberapa metabolisme sekunder tumbuhan. Tanin bersifat polar dan memiliki titik didih $>98^{\circ}\text{C}$. Asam tanat merupakan molekul organik dan merupakan tanin terhidrolisis dengan sifat keasaman yang lemah dan rasa astringen yang kuat memiliki aktivitas antikanker. Asam tanat bekerja dengan cara menghambat transkripsi gen, sehingga menghambat transkripsi gen target. Asam tanat juga menghambat jalur persinyalan angiogenesis utama pada kanker. Senyawa tanin ini juga memiliki mekanisme dalam penghambatan ekspresi gen pada kanker payudara (Youness dkk., 2021).

2.4 Ekstrak

2.4.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Sujudi, 2011).

2.4.2 Penggolongan Ekstrak

Penggolongan ekstrak berdasarkan sifatnya yaitu (Emelda, 2019) :

2.4.2.1 Ekstrak Cair

Merupakan sediaan ekstrak yang memiliki konsistensi lebih encer sehingga mudah dituang.

2.4.2.2 Ekstrak Kental

Merupakan sediaan ekstrak dengan konsistensi kental jika dalam keadaan dingin dan bersifat tidak mudah dituang.

2.4.2.3 Ekstrak Kering

Merupakan sediaan yang memiliki konsistensi kering dan bersifat mudah dituang.

2.5 Ekstraksi

2.5.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Senyawa yang tidak dapat larut contohnya seperti karbohidrat, serat, protein dan lain-lain. Proses ekstraksi dihentikan pada saat sudah tercapainya kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman (Mukhtarini, 2014). Tujuan dari ekstraksi itu sendiri yaitu menarik atau memisahkan senyawa dari campurannya atau simplisia.

2.5.2 Jenis Metode Ekstraksi

Adapun beberapa macam cara untuk melakukan ekstraksi, yaitu ekstraksi cara dingin : maserasi dan perkolasi. Sedangkan ekstraksi cara panas yaitu : infundasi, soxhlet, refluks, digesti dan destilasi (penyulingan). Ekstraksi cara panas lebih cepat untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan karena mampu memperbesar kelarutan suatu senyawa. Sedangkan untuk ekstraksi cara dingin dikhususkan untuk senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan (Tommy dkk., 2011).

2.5.2.1 Maserasi

Maserasi merupakan suatu proses ekstraksi yang tidak menggunakan pemanasan, sedangkan untuk menarik senyawa dalam ekstrak menggunakan kepolaran pelarut. Mekanisme kerja maserasi yaitu dengan melakukan perendaman ekstrak pada suhu kamar dan sesekali dikocok untuk menarik senyawa aktifnya keluar. Proses ekstraksi dihentikan apabila sudah tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa ekstrak dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel ekstrak tanaman. Setelah ekstraksi selesai selanjutnya ekstrak disaring untuk memisahkan sampel dengan pelarut (Suhendar dkk., 2020). Keuntungan dari metode ini yaitu lebih praktis dan tidak memerlukan pemanasan, sedangkan kerugian dari metode ini yaitu memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar.

Namun disisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhtarini, 2014).

2.5.2.2 Perkolasi

Perkolasi yaitu proses ekstraksi dengan pelarut yang dialirkan melalui kolom perkolator yang diisi dengan serbuk simplisia dan ekstrak akan dikeluarkan melalui kran secara perlahan. Parameter berhenti jika perkolat sudah tidak mengandung komponen senyawa yang diambil dengan pengamatan fisik pada ekstraksi bahan alam terlihat tetesan perkolat sudah tiak berwarna. Kelebihan dari metode ini adalah sampel terus dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Mukhtarini, 2014).

2.5.2.3 Infundasi

Infundasi merupakan metode ekstraksi yang umumnya dilakukan menggunakan pelarut air, dipanaskan pada temperatur penangas air atau dalam bejana infus tercelup penangas air mendidih, pada suhu terukur 90°C , selama waktu tertentu 15 menit (Hujjatusnini dkk., 2021). Rasio berat bahan dan pelarut adalah 1:10, yang artinya jika berat bahan 100 gram maka volume pelarut adalah 1000 ml. Cara yang dilakukan yaitu dengan bahan dipanaskan dalam panci dengan air secukupnya selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sekali-sekali diaduk. Saring selagi panas melalui kain flannel, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume yang diinginkan. Apabila bahan mengandung minyak atsiri, penyaringan dilakukan setelah dingin (Sudarwati & Fernanda, 2019).

2.5.2.4 Soxhletasi

Metode soxhletasi, serbuk sampel diletakkan pada sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klongsong yang ditempatkan di atas labu di bawah kondensor. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang sesuai dengan sampel, kemudian pelarut dimasukkan dalam labu dan suhu penangas di atur dibawah refluks. Keuntungan dari metode ini yaitu ekstraksi kontinyu, sampel terekstraksi dengan menggunakan pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak menggunakan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugian dari

metode ekstraksi ini senyawa yang termolabil tidak dapat terdegradasi (Mukhtarini, 2014).

2.5.2.5 Refluks

Refluks merupakan suatu ekstraksi dengan menggunakan pemanasan pada suhu 50°C . Mekanisme kerja dari refluks yaitu pelarut yang digunakan akan menguap ketika pada suhu yang digunakan, namun semua uap tersebut setelah didinginkan menggunakan kondensor akan mengembun kembali dan turun kedalam wadah sehingga selama ekstraksi refluks terjadi tetap terdapat pelarut didalamnya (Suhendar dkk., 2020). Kekurangan dari ekstraksi ini yaitu apabila senyawa bersifat termolabil maka tidak ada terdegredasi.

2.5.2.6 Digesti

Digesti merupakan metode maserasi kinetik dengan cara pengadukan kontinu pada temperature yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, secara umum dilakukan pada temperatur $40-45^{\circ}\text{C}$ (Hujjatusnini dkk., 2021).

2.5.2.7 Destilasi (Penyulingan)

Destilasi pada merupakan suatu proses pemisahan campuran dari dua atau lebih cairan berdasarkan titik didih dari zat-zat penyusunnya. Zat yang memiliki titik didih rendah akan menguap terlebih dahulu. Pada proses pendinginan, senyawa dan uap air akan terkondensasi dan terpisah menjadi destilat air dan senyawa yang diekstraksi. Cara ini umum digunakan untuk menyari minyak atsiri dari tumbuhan (Tania dkk., 2018).

2.5.3 Pemilihan Metode Ekstraksi

Pemilihan metode ekstraksi pada kulit buah majapahit dilakukan dengan menggunakan metode infundasi. Metode infundasi ini dipilih karena metode penyarian yang dilakukan menyerupai pembuatan obat tradisional pada masyarakat awam dengan menggunakan alat yang sederhana. Pada metode infundasi ini menggunakan pelarut polar yaitu air. Senyawa yang memiliki kepolaran yang sama, akan lebih mudah tertarik atau larut dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama, sehingga infusa kulit buah majapahit adalah cara efektif untuk mendapatkan isolasi komponen senyawa aktif alkaloid,

terpenoid, steroid dan flavonoid karena senyawa-senyawa tersebut dapat larut dalam pelarut air (Khafidhoh dkk., 2015).

2.6 Pelarut

Pelarut adalah zat yang digunakan sebagai media untuk melarutkan zat lain. Keberhasilan penentuan senyawa biologis aktif dari bahan tumbuhan sangat tergantung pada jenis pelarut yang digunakan dalam prosedur ekstraksi. Sifat pelarut yang baik untuk ekstraksi yaitu toksisitas dari pelarut yang rendah, mudah menguap pada suhu yang rendah, dapat mengekstraksi komponen senyawa dengan cepat, dapat mengawetkan dan tidak menyebabkan ekstrak terdisosiasi (Tiwari dkk., 2011).

Pemilihan pelarut juga akan tergantung pada senyawa yang ditargetkan. Faktor-faktor yang mempengaruhi pemilihan pelarut adalah jumlah senyawa yang akan diekstraksi, laju ekstraksi, keragaman senyawa yang akan diekstraksi, kemudahan dalam penanganan ekstrak untuk perlakuan berikutnya, toksisitas pelarut dalam proses bioassay, potensial bahaya kesehatan dari pelarut (Tiwari dkk., 2011). Pada penelitian digunakan beberapa pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya, yaitu air, etanol, metanol, aseton, klorofom, eter, n-heksana, etil asetat, dan DMSO.

2.6.1 Air

Air merupakan pelarut universal yang sering digunakan, biasanya digunakan untuk menyari produk tumbuhan dengan aktivitas antimikroba. Walaupun pengobatan secara tradisional menggunakan air sebagai pelarut, tetapi ekstrak tumbuhan dari pelarut organik telah ditemukan memberikan aktivitas antimikroba yang lebih konsisten dibandingkan dengan ekstrak air. Air juga dapat melarutkan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Tiwari dkk., 2011).

2.6.2 Aseton

Aseton merupakan pelarut yang dapat melarutkan beberapa komponen senyawa hidrofilik dan lipofilik dari tumbuhan. Keuntungan dari pelarut ini yaitu dapat bercampur dengan air, mudah menguap, dan memiliki toksisitas yang

rendah. Aseton digunakan terutama untuk studi antimikroba dimana banyak senyawa fenolik yang dapat disari dengan aseton (Tiwari dkk., 2011).

2.6.3 Etanol

Ekstraksi menggunakan pelarut etanol menunjukkan aktivitas antimikroba yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut air. Hal ini dikaikan dengan adanya jumlah polifenol yang lebih tinggi dari senyawa flavonoid terdeteksi dengan etanol 70% dikarenakan polaritasnya lebih tinggi dibandingkan etanol murni. Etanol lebih mudah untuk menembus membran sel untuk menyari senyawa yang terdapat pada intraseluler dari tanaman. Metanol lebih polar daripada etanol namun lebih bersifat toksik, sehingga tidak cocok untuk ekstraksi (Tiwari dkk., 2011).

2.6.4 Metanol

Metanol merupakan pelarut yang yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang sifatnya polar dan nonpolar. Metanol mampu menarik alkaloid, steroid, saponin dan flavonoid dari tanaman. Keuntungan dari penggunaan pelarut metanol adalah titik didih yang rendah dan mudah menguap sehingga mudah dipisahkan dan didapatkan ekstrak yang pekat (Tiwari dkk., 2011).

2.6.5 Kloroform

Kloroform memiliki nama umum triklorometana (CHCl_3). Pada suhu ruang kloroform memiliki wujud cair bening, mudah menguap, serta memiliki bau yang khas. Kloroform merupakan pelarut yang bersifat semipolar dan biasa digunakan untuk menyari senyawa seperti tanin dan terpenoid (Tiwari dkk., 2011).

2.6.6 Eter

Eter semakin polar dari pada alkena, namun tidak sepolar alkohol, ester, ataupun anida. Walau demikian, keberadaan dua pasangan elektron menyendiri pada atom oksigen eter, memungkinkan eter berikatan hidrogen dengan molekul air. Eter dapat dipisahkan secara sempurna menempuh destilasi. Eter biasanya di gunakan secara selektif untuk menyari kumarin dan asam lemak (Tiwari dkk., 2011).

2.6.7 N-heksana

N-heksana memiliki bentuk cairan bening. Kurang padat dari air dan tidak larut dalam air. Uap lebih berat dari pada udara. Digunakan sebagai pelarut, cat thinner, dan media reaksi kimia. N-heksana memiliki karekteristik sangat tidak polar, volatile, mempunyai bau khas yang dapat menyebabkan pingsan. Berat molekulnya 86,2 gram/mol dengan titik leleh 94,3°C. Titik didih n-heksan pada tekanan 760 mmHg yaitu 66°C sampai 71°C (Tiwari dkk., 2011).

2.6.8 Etil Asetat

Etil asetat adalah pelarut dengan karakteristik semi polar. Etil asetat secara selektif akan menarik senyawa yang bersifat semi polar seperti fenol dan terpenoid (Tiwari dkk., 2011).

2.6.9 DMSO (*Dimetil sulfoksida*)

DMSO atau dimetil sulfoksida adalah senyawa organosulfur yang mempunyai rumus kimia $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ dan merupakan pelarut polar aprotik dapat digunakan sebagai pelarut senyawa polar maupun non polar, DMSO juga larut dalam berbagai pelarut organik maupun air. Pelarut DMSO 2% merupakan pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal. Selain itu, pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa polar maupun non polar adalah DMSO 2%. DMSO dapat digunakan sebagai pengencer ekstrak untuk memperoleh ekstrak dengan kadar konsentrasi tertentu. DMSO memiliki ciri-ciri tidak berwarna, tidak berbau, agak higroskopik, dan juga merupakan pelarut bagi bahan uji anorganik dan organik (Anggraini & Masfufatun, 2017).

2.7 Metode Identifikasi Senyawa

2.7.1 Alkaloid

Senyawa alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang banyak ditemukan di alam. Secara organoleptik, daun-daunan, senyawa alkaloid dapat ditemukan pada akar, biji, ranting, dan kulit kayu. Semua alkaloida mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang bersifat basa dan sebagian atom nitrogen merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Senyawa alkaloid memiliki beberapa sifat diantaranya mengandung atom nitrogen yang umumnya berasal dari asam amino dan golongan heterogen, umumnya mempunyai rasa

yang pahit, sering beracun, bersifat optis dan berupa sistim siklik, dan sampel yang mengandung alkaloid setelah bereaksi akan berwarna merah (Heliawati, 2018).

Uji kualitatif alkaloid dapat dilakukan dengan cara 0,5 g ekstrak diencerkan secara terpisah untuk 10 ml dengan alkohol asam, direbus dan disaring. 5 ml filtrat ditambahkan 2 ml encer ammonia. 5 ml kloroform diekstraksi dengan 10 ml asam asetat, dan dibagi dalam 3 bagian, dan diuji sebagai berikut :

- a. Uji Dragendroff : beberapa tetes larutan Dragendroff ditambahkan kedalam larutan kloroform, hasil positif ditandai dengan adanya endapan coklat kemerahan.
- b. Uji Mayer : beberapa tetes reagent Mayer ditambahkan ke dalam larutan kloroform, jika terbentuk endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.
- c. Uji Wagner : beberapa tetes larutan Wagner ditambahkan ke dalam larutan kloroform, hasil positif adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan coklat.

2.7.2 Flavonoid

Senyawa flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan, mikroorganisme, bakteri dan jamur. Senyawa flavonoid terdiri dari 15 atom karbon atau lebih yang sebagian besar bisa ditemukan dalam kandungan tumbuhan. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, buah dan biji. Flavonoid merupakan pigmen yang diproduksi oleh sejumlah tanaman sebagai pewarna yang dihasilkan pada bunga (Heliawati, 2018).

Uji kualitatif senyawa flavonoid dapat dilakukan dengan cara sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, sebanyak 2 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 , apabila terbentuk warna ungu menunjukkan positif terhadap flavonoid.

2.7.3 Saponin

Saponin merupakan golongan glikosida yang memiliki aglikon berupa steroid dan triterpenoid. Saponin bersifat seperti sabun yang dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Uji kualitatif senyawa saponin dapat dilakukan

dengan cara menggunakan pereaksi warna. Pereaksi HCl yang digunakan, dengan cara 1 ml HCl pekat dilarutkan dalam aquadest dan dilakukan pengocokan. Hasil positif saponin diperoleh ketika menghasilkan busa stabil (Martha & Fatimah, 2021).

2.7.4 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa polifenol yang terdapat pada banyak tanaman. Senyawa tanin bersifat sangat mudah larut dalam air, larut alkohol, larut aseton, larut gliserol hangat dan tidak larut dalam kloroform dan eter (Rizky Amelia, 2015).

Pengujian kualitatif senyawa tanin dapat dilakukan dengan mengidentifikasi adanya jenis tanin dengan cara :

- a. Pengujian dilakukan dengan ekstrak ditambahkan larutan FeCl_3 . Hasil positif tanin terhidrolisis ditandai dengan adanya endapan biru kehitaman sedangkan hasil tanin terkondensasi memberikan hasil positif adanya endapan hitam kehijauan.
- b. Pengujian dilakukan penambahan larutan ammonia pada ekstrak yang kemudian dipapar keudara, hasil positif tanin memberikan perubahan warna hijau.

2.8 Evaporasi

Evaporasi merupakan proses penguapan yang dilakukan dengan memberi kalor ke zat cair agar menguapkan sebagian dari pelarut didapatkan larutan cair pekat yang konsentrasinya lebih tinggi, dimana zat tadi terdiri dari zat terlarut yang mudah menguap dan tidak mudah menguap sehingga jika dilakukan pemanasan maka akan terjadi pengurangan dari ekstrak dan menguapkan zat yang mudah menguap tadi dan meninggalkan ekstrak yang lebih pekat dengan konsentrasi senyawa lebih besar dan memudahkan penyimpanan (Hujjatusnini dkk., 2021).

Penguapan dilakukan sebelum ekstrak diproses lebih lanjut. Proses pemanasan dapat dilakukan dengan berbagai macam yaitu :

2.8.1 Metode Pemanas Air

Metode pemanas air merupakan metode yang paling mudah yaitu hanya dengan menggunakan penangas air, dimana dengan cara menyimpan ekstrak di dalam wadah yang diletakkan di atas pemanas air memerlukan waktu yang cukup lama kemungkinan terjadi senyawa yang terurai (Hujjatusnini dkk., 2021).

2.8.2 Metode Oven

Cara penguapan dengan menggunakan metode oven ini sangat cocok untuk penguapan yang kadar cairannya tidak terlalu banyak. Penguapan oven memiliki kelebihan yaitu dapat diatur dan disesuaikan dengan titik didih cairan penyari (Hujjatusnini dkk., 2021).

2.8.3 Metode Hot Plate

Metode hot plate yaitu dapat digunakan dengan mudah seperti menggunakan penangas air. Pada penggunaan car ini ekstrak di taruh didalam wadah gelas kimia yang steril dan pemanasan ini memerlukan waktu yang cukup lama. Kelebihan metode ini yaitu dapat mengkontrol suatu ekstrak dengan menggunakan thermometer yang dimasukkan kedalam ekstrak dan digantung menggunakan penyanggah, agar ujung thermometer tidak menyentuh dasar dari gelas kimia, hal tersebut dilakukan agar suhu yang kita ukur mendapatkan data akurat (Hujjatusnini dkk., 2021).

2.8.4 Metode Evaporator Tabung

Metode evaporator tabung merupakan alat yang modern dimana alatnya memiliki bentuk seperti tabung. Alat ini bekerja pada suhu rendah sekitar 40-50°C dan dibantu dengan alat vakum udara sehingga titik didih pelarut sangat rendah. Penguapan ini bekerja dengan sangat cepat sehingga kemungkinan terjadinya penguraian senyawa yang termolabil dapat dihindari sehingga senyawa yang ada tetap optimal (Hujjatusnini dkk., 2021).

2.9 LCMS (*Liquid chromatography mass spectrometry*)

2.9.1 Deskripsi LCMS (*Liquid chromatography mass spectrometry*)

Liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) merupakan teknik analisis kombinasi dari kromatografi cair sebagai pemisah komponen-komponen analit dalam sampel, dengan spektrometri massa sebagai detector (Harmita dkk.,

2019). *Liquid chromatography mass spectrometry* (LCMS) yaitu teknik analisis kuat menggabungkan penyelesaian kekuatan kromatografi cair dengan kekususan deteksi spektrometri massa (Saibaba dkk., 2016). Hasil data yang didapatkan berupa bobot molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relative dengan lapisan kimia partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak) (Mangurana dkk., 2019).

Keuntungan analisis menggunakan LCMS 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).

2.9.2 Prinsip Kerja LCMS (*Liquid chromatography mass spectrometry*)

Prinsip kerja LCMS yaitu dengan memisahkan beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya. Senyawa yang telah terpisahkan akan menghasilkan senyawa murni yang mana bobot molekulnya diidentifikasi menggunakan *Mass Spectrum* (Yuliana & Arianti, 2020). Komponen alatnya terdiri atas kolom sebagai fasa diam dan larutan tertentu sebagai fasa geraknya.

Berdasarkan kepolaranya 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).

Analisis LCMS dilakukan menggunakan pelarut methanol, dilengkapi dengan pompa biner. Pelarut yang digunakan adalah methanol dengan penambahan 0,3% asam format. Pelarut dialirkan pada laju air total 0,1 ml/menit. Pelarut berjalan dengan elusi isokratik, yaitu sampel diinjeksikan ke dalam kolom dan komposisi fase geraknya tidak berubah selama proses analisis sampai sampel terelusi dari kolom (Yuliana & Arianti, 2020).

2.9.3 Komponen Dasar LCMS

Instrument LCMS terdiri dari solvent reservoir system, pompa, injector, kolom, detector, komuter untuk analisis dan mengolah sinyal detektor.

2.9.3.1 Solvent Manager

Solvent manager terdiri dari wadah dan pompa fase gerak. Wadah fase gerak bersifat bersih dan inert. Reservoir ini dilengkapi dengan system penghilangan gas dan penyaring khusus untuk mengisolasi gerak dari pengaruh lingkungan. Pompa berfungsi untuk mengalirkan fase gerak dari reservoir secara konstan. Jenis pompa yang paling umum digunakan dalam pompa tekanan, pompa ini terdiri dari kepala pompa, badan pompa, katup check-valve yang dilengkapi inlet atau outlet untuk memungkinkan fase gerak masuk dan keluar ruang pompa dan cam-drive (Harmita dkk., 2019).

2.9.3.2 Sample Manager

Merupakan tempat untuk meletakkan vial sampel dan jarum injector yang berfungsi untuk menyuntikkan sampel ke dalam kolom. Suhu dapat diatur sesuai kondisi yang diinginkan. Jenis injector yang digunakan yang paling umum digunakan adalah injector loop-katup. Sampel disuntikkan ke loop, kemudian injector diaktifkan ke posisi inject. Autoinjector sampel umumnya menggunakan jenis susunan loop dan katup, dengan sistem menarik sampel ke dalam loop. Pencucian pada autoinjector digunakan untuk menghindari kontaminasi sampel yang terbawa Ketika bergerak dari vial ke vial untuk inject berikutnya (Harmita dkk., 2019).

2.9.3.3 Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen di dalam senyawa yang dianalisis. Penghubung harus dirancang tanpa ruang kosong. Isi

kolom harus homogen dan stabil secara mekanik. Diameter partikel pengisi kolom berukuran 2,0 μm 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 (Harmita dkk., 2019).

2.9.3.4 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. (Harmita dkk., 2019).

2.9.3.5 Detektor

Detector memiliki fungsi untuk merekam muatan yang diinduksi atau arus yang dihasilkan ketika ion lewat atau mengenai permukaan yang akhirnya menghasilkan spektrum massa. Adapun macam detector yang tersedia meliputi electron multiplier (EM), faraday cup, negative-ion detector, post-acceleration detector, chennelectron multiple array (CEMA), daly detector, dan array detector (Harmita dkk., 2019).

2.9.3.6 Komputer

Komputer berfungsi untuk 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 (Harmita dkk., 2019).

2.10 Uraian Larva Udang (*Artemia salina* Leach)

2.10.1 Deskripsi *Artemia salina* Leach

Menurut (Dumitrascu, 2011) pada (Gambar 2.2), klasifikasi *Artemia salina* Leach yaitu :

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



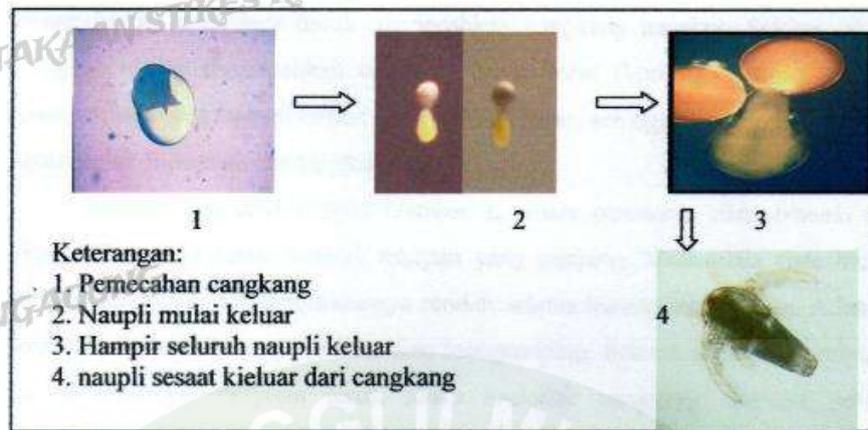
Gambar 2.2 *Artemia salina* Leach (Dumitrascu, 2011)

Artemia salina Leach banyak ditemukan di pasaran dalam bentuk telur yang sering disebut kista. Kista ini berbentuk bulatan kecil berwarna coklat, berdiameter 200-300 mikron yang diselubungi oleh cangkang yang tebal dan kuat. Cangkang ini berguna untuk melindungi embrio yang tidak aktif terhadap pengaruh kekeringan, benturan keras, sinar ultra violet dan mempermudah pengapungan (Arcanjo dkk., 2012).

2.10.2 Tahap Proses Penetasan Kista *Artemia salina* Leach

Penetasan kista artemia dapat dilakukan menggunakan dua metode, yaitu metode tanpa dekapsulasi dan metode dekapsulasi. Penetasan dekapsulasi yaitu dengan proses penghilangan lapisan luar kista dengan menggunakan larutan hipoklorit tanpa mempengaruhi kelangsungan hidup embrio. Sedangkan penetasan tanpa dekapsulasi yaitu dengan cara tanpa melakukan proses penghilangan lapisan luar kista, tetapi secara langsung ditetaskan dalam wadah penetasan. Pada metode tanpa dekapsulasi kista artemia hanya direndam dalam air tawar selama 15 menit. Tujuannya direndam air tawar yaitu untuk melunakkan kista artemia (Widodo dkk., 2016).

Penetasan perkembangan kista artemia menjadi nauplii terdiri dari beberapa tahapan yaitu proses penyerapan air, pemecahan dinding kista oleh embrio, embrio terlihat jelas masi diselimuti membrane, menetas dimana nauplius berenang bebas yang membutuhkan waktu sekitas 24 jam (Widodo dkk., 2016). Adapun perkembangan kista artemia menjadi naupli, dapat dilihat pada (Gambar 2.3)



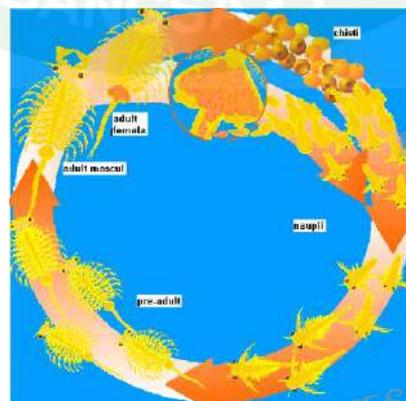
Gambar 2.3 Tahapan Perkembangan Kista artemia menjadi nauplii

(Dumitrascu, 2011)

2.10.3 Perkembangan dan Siklus Hidup *Artemia salina* Leach

Berdasarkan cara berkembangbiaknya *Artemia salina* Leach dibedakan menjadi dua yaitu, secara biseksual dan partenogenetik. Keduanya dapat terjadi secara ovovivipar maupun ovipar. Ovovivipar yaitu anakan yang keluar induknya yang berupa arak atau burayak. Sedangkan ovipar yaitu keluar dari induknya berupa telur bercangkang tebal, yang biasa disebut siste (sista) atau kista. Kondisi ovovivipar bisa terjadi saat keadaan lingkungan yang cukup baik, dengan kadar garam kurang dari 150 per ml dan kandungan oksigen yang cukup (Nastiti dkk., 2017).

Perkembangbiakan *Artemia salina* Leach, yang sudah dewasa dapat hidup sampai enam bulan. Induk betina bisa beranak maupun bertelur setiap 5 hari sekali, dan dapat menghasilkan 50 sampai 300 telur atau nauplius. Nauplis akan dewasa setelah berumur 14 hari, dan akan siap untuk berkembangbiak.



Gambar 2.4 Siklus Hidup *Artemia salina* Leach (Dumitrascu, 2011)

Adapun tahapan pada saat proses penetasan *Artemia salina* Leach. ini yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang, tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif dalam bermetabolisme. Tahap pecah cangkang dan tahap pengeluaran terjadi pada saat sebelum nauplius keluar dari cangkang (Arimbi dkk., 2015).

2.11 Perlakuan *Artemia salina* Leach

Larva udang *Artemia salina* Leach bersifat fototaksis positif yang berarti menyukai cahaya. Namun cahaya yang dimaksud tidak terlalu tinggi karena akan menyebabkan respon fototaksis negatif. Stimulus cahaya mempengaruhi penetasan *Artemia* kista secara signifikan. Sorgeloos menjelaskan bagaimana perkembangan embriologis embrio terhidrasi yang tidak distimulasi oleh cahaya, dapat ditunda sampai pemicu cahaya diterapkan. Kista mulai menetas setelah terkena cahaya, yang memberikan perbedaan yang signifikan secara statistik antara rangkaian gelap dan terang (Mentor dkk., 2014).

2.12 Larva *Artemia salina* Leach Sebagai Hewan Uji

Brine Shrimp Lethality Test adalah salah satu cara yang digunakan untuk mengetahui kemampuan toksik terhadap sel (sitotoksik) dari suatu senyawa yang dihasilkan oleh ekstrak tanaman dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. sebagai bioindikator. Keistimewaan *Artemia salina* Leach yaitu memiliki toleransi (kemampuan beradaptasi dan mempertahankan diri) pada kisaran kadar garam yang sangat luas. *Artemia salina* Leach dapat dimanfaatkan sebagai hewan uji dalam penentuan ketoksikan suatu ari atau senyawa yang diwujudkan sebagai racun. Alasan utama air asin digunakan untuk pengujian toksisitas ekstrak tumbuhan karena ketersediaan telur yang sangat komersial, kemudahan budidaya, dipanen dalam jumlah besar dari danau air asin (Aqiila dkk., 2017).

Keunggulan penggunaan larva udang *Artemia salina* Leach. untuk BSLT yaitu sifatnya yang peka terhadap bahan uji, waktu siklus hidup yang lebih cepat, mudah dibiakkan, dan harganya yang murah. Sifat peka *Artemia salina* Leach. disebabkan oleh keadaan membrane kulitnya yang sangat tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya. Mekanisme kematian pada larva *Artemia salina*

Leach. disebabkan oleh adanya senyawa metabolit pada ekstrak yang berperan sebagai *stomach poisoning* (racun perut). Hal ini menyebabkan larva mengalami gangguan pada saluran cernanya. Selain itu senyawa ini juga menghambat reseptor rasa yang berada di permukaan mulut larva *Artemia salina* Leach. sehingga larva tidak bisa mendeteksi makanan dan akhirnya mati karena kelaparan (Nuralifah dkk., 2021).

2.13 Uji Toksisitas

Toksisitas merupakan kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan pada organisme hidup. Pengujian toksisitas penting dilakukan untuk memperkirakan derajat kerusakan yang diakibatkan suatu senyawa terhadap material biologi maupun nonbiologi (Sasmito dkk., 2015). Toksisitas zat dapat diamati dengan mempelajari eksposur yang tidak disengaja ke suatu zat, studi *in vitro* menggunakan sel, dan paparan *in vivo* pada hewan percobaan (Parasuraman, 2011).

Uji toksisitas pada hewan uji dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil terhadap manusia untuk mencari dosis yang aman. Pengujian toksisitas umumnya menggunakan paling tidak 3 dosis (rendah, sedang dan tinggi) serta menggunakan kontrol untuk membandingkan efek dari kelompok perlakuan. Uji toksisitas akan dihasilkan data berupa dosis-dosis respon dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi paparan pada manusia. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan/sediaan pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi paparan pada manusia (PerKB POM, 2014).

Uji toksisitas sebuah obat baru dilakukan melalui serangkaian uji farmakologi dan toksikologi baik yang dilakukan pada hewan uji (praklinik) maupun secara klinik. Perkembangan metode *in vitro* sebagai alternatif pengganti pengujian menggunakan hewan uji mempunyai relevansi yang cukup baik yang bertujuan untuk mendeteksi potensi ketoksikan suatu obat pada manusia. Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya

reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji (PerKBPOM, 2014).

Keuntungan metode *in vitro* antara lain : hanya dibutuhkan sedikit senyawa uji dalam penelitian, dapat digunakan sebagai tahap atau langkah awal dalam mengembangkan suatu obat untuk berbagai tujuan penggunaan kultur sel primer dari berbagai organ target, dapat memberikan informasi secara langsung tentang potensi efeknya pada sel target manusia, yang secara langsung memberikan hasil yang lebih valid dan dengan metode ini dapat mengurangi jumlah hewan laboratorium secara drastis. Hasil uji toksisitas dapat digunakan untuk mengetahui tingkat toksisitas suatu senyawa, efek samping yang dapat ditimbulkan oleh suatu senyawa dan batasan maksimum penggunaan suatu senyawa (Meles, 2010).

Uji toksisitas obat dibagi dalam dua bagian yaitu uji toksisitas *in vitro* (suatu uji diluar tubuh hewan coba), sebagai contoh uji dengan BSLT, antiinfeksi, antikanker, antivirus, dan uji toksisitas *in vivo* (didalam tubuh hewan coba), contohnya antihelminik, dan uji obat-obat untuk terapi penyakit degeneratif (Meles, 2010).

2.13.1 Uji Toksisitas In Vitro

Uji toksisitas *in vitro* adalah suatu uji untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu bahan yang di uji menggunakan media biakan bahan biologi tertentu yang merupakan subjek dari pengujian. Informasi yang diperoleh dari hasil uji toksisitas *in vitro* adalah mengetahui besarnya konsentrasi bahan uji yang dapat membunuh 50% (*lethal concentration 50% = LC₅₀*) dari bahan biologi yang di kultur/di benihkan, disamping juga dapat menentukan aktivitas suatu bahan uji dalam menghambat atau membunuh penyebab penyakit secara *in vitro* (Meles, 2010).

2.13.2 Uji Toksisitas In Vivo

Uji toksisitas *in vivo* adalah suatu uji toksisitas yang dilakukan pada hewan coba, dengan tujuan menentukan tingkat ketoksikan suatu zat/bahan terhadap perubahan fungsi fisiologis maupun perubahan yang bersifat patologis pada organ vital dalam kurun waktu tertentu (Meles, 2010). Berdasarkan lama waktu

terjadinya efek toksik maka uji toksisitas umum dibagi menjadi tiga bagian yaitu uji toksisitas akut, uji toksisitas subkronis dan uji toksisitas kronis :

2.13.2.1 Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu zat/bahan yang dilakukan dalam kurun waktu tidak lebih dari 24 jam, dengan dosis tunggal atau dosis berulang. Tujuan dilakukan uji toksisitas akut adalah untuk menentukan bahaya pemaparan suatu bahan secara akut, untuk menentukan batas keamanan suatu bahan dengan menentukan dosis yang menyebabkan kematian 50% pada hewan coba. Rute pemberian dalam pelaksanaan uji toksisitas akut pada hewan coba dilakukan dengan 2 cara yakni cara pemberian yang disarankan untuk dipakai di klinik dan cara pemberian intravena, jika memungkinkan, hal ini dimaksudkan untuk meyakinkan bila terjadi pemaparan bahan uji secara sistemik. Hewan coba yang dipakai sedikitnya dua spesies berdasarkan jenis kelamin (Meles, 2010).

2.13.2.2 Uji Toksisitas Subkronis

Uji toksisitas subkronis adalah suatu uji untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu zat/bahan dengan dosis berulang dalam kurun waktu 14-90 hari. Tujuan dari pelaksanaan uji toksisitas subkronis adalah untuk mengetahui adanya efek toksik setelah pemberian bahan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu khususnya terhadap organ yang berfungsi vital di dalam tubuh hewan coba, serta untuk mempelajari efek kumulatif bahan uji dalam tubuh (Meles, 2010).

2.13.2.3 Uji Toksisitas Kronis

Uji toksisitas kronis adalah suatu uji untuk menentukan tingkat ketoksikan suatu bahan uji pada hewan coba dengan dosis berulang dalam kurun waktu sepanjang umur hewan coba. Tujuan dari uji toksisitas kronis adalah untuk mengetahui profil toksisitas suatu bahan uji secara berulang dalam jangka panjang. Karena waktu yang diperlukan untuk pelaksanaan uji toksisitas kronis sangat panjang maka dalam pelaksanaannya dilakukan bersamaan dengan uji klinik. Persyaratan yang berlaku pada pelaksanaan uji toksisitas kronis seperti

hewan coba, dosis bahan uji serta rute pemberian sama dengan persyaratan seperti pada pelaksanaan uji toksisitas subkronis (Meles, 2010).

2.14 Uraian Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Pada uji toksisitas dengan menggunakan hewan coba berupa *Artemia salina* Leach digunakan pada pengujian toksisitas yaitu pendahuluan sebelum pengujian sitotoksik dimana nilai LC₅₀ dari uji toksisitas lebih kecil dari 1000 µg/ml. parameter yang ditunjukkan pada *Artemia salina* Leach dilihat dari jumlah kematian dari *Artemia salina* Leach (Andini dkk., 2021). tingkat toksisitas ditunjukkan pada tabel (Tabel 2.1) dibawah ini.

Tabel 2.1 Kategori toksisitas bahan (Andini dkk., 2021)

Kategori	LC ₅₀ (ppm)
Sangat Toksik	≤30 mg/L
Toksik	≤1000 mg/L
Tidak Toksik	>1000 mg/L

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan pengujian senyawa umum untuk mendeteksi beberapa bioaktivitas dan sitotoksik terhadap 9kB sel karsinoma nasofaring maupun sel P-388 leukimia manusia secara *in vivo* seperti antikanker, antitumor, antimikroba, dan antimalaria. Hal yang menyebabkan senyawa memiliki aktivitas dapat dideteksi dengan metode BSLT karena *Artemia salina* Leach memiliki keasaman tanggapan dengan mamalia seperti tipe DNA-dependent RNA polymerase (Andini dkk., 2021).

Dalam mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa dalam sel yang menghambat daya makan larva dimana senyawa yang terkandung tersebut bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut, sehingga senyawa yang masuk kedalam tubuh larva menggagalkan timbulnya rasa stimulus untuk mengenali makanannya (Andini dkk., 2021).

2.15 BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) merupakan langkah pertama untuk uji toksisitas suatu ekstrak atau senyawa. Metode ini merupakan metode hayati yang sederhana, cepat, murah, dan dapat dipercaya. Daya toksisitas

senyawa dapat diketahui dengan menghitung jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach dengan parameter *Lethal concentration 50* (LC₅₀). Suatu ekstrak dinyatakan bersifat toksik menurut metode BSLT ini jika memiliki LC₅₀ kurang dari 1000 µg/ml. Jika hasil uji BSLT menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan bersifat toksik maka dapat dikembangkan kepenelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa sitotoksik tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat alternatif anti kanker (Maria dkk., 2014). Pengujian efek toksik dengan larva *Artemia salina* Leach dihitung dengan metode LC₅₀ yang mana kematian setelah 6 jam pemaparan dimasukkan dalam kategori LC₅₀ akut dan pemaparan setelah 24 jam digolongkan LC₅₀ kronis, dan dalam pengerjaannya biasanya digunakan LC₅₀ setelah 24 jam meningkat kelarutan ekstrak yang sukar larut membutuhkan waktu lebih Panjang (Maria dkk., 2014).

Metode ini sering digunakan untuk pra skrining terhadap senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tanaman karena murah, mudah (tidak perlu kondisi aseptis) dan dapat dipercaya. Sifat sitotoksik dapat diketahui berdasarkan jumlah kematian larva pada konsentrasi tertentu. Suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 1000 µg/ml setelah waktu 24 jam (Rasyid dkk., 2022).

Uji toksisitas larva *Artemia salina* (*Brine Shrimp Lethality Test*) sering dianalogkan dengan kemampuan suatu bahan obat yang memiliki efek antikanker. Metode ini disarankan untuk digunakan pada skrining senyawa bioaktif bahan alam karena menunjukkan adanya korelasi dengan metode sitotoksik *in vitro* lainnya (Maria dkk., 2014). Penggunaan larva udang *Artemia salina* untuk uji BSLT ini adalah sifatnya yang peka terhadap bahan uji, waktu siklus hidup yang lebih cepat, dan mudah dibiakkan. Sifat peka *Artemia salina* kemungkinan terjadinya difusi zat dan lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya (Nuralifah dkk., 2021).

2.16 Penentuan Nilai LC₅₀ Dengan Metode Probit

Analisis probit merupakan jenis regresi yang digunakan untuk menganalisis variabel respon binomial. Analisis probit merupakan metode statistik dalam memahami hubungan dosis respon dan membandingkan hubungan antara variabel respon atau variabel dependen terhadap variabel independent.

Analisis ini umumnya digunakan dalam toksikologi untuk menentukan toksisitas relative dari bahan kimia untuk organisme hidup dengan menguji respon organisme pada berbagai konsentrasi masing-masing bahan kimia (Degiannakis, 2015).

Regresi adalah pengukur hubungan dua variabel atau lebih yang dinyatakan dalam bentuk hubungan atau fungsi. Untuk menentukan bentuk hubungan (regresi) diperlukan pemisahan antara variabel bebas yang diberi symbol X dengan variabel tidak bebas dengan symbol Y. Kedua variabel bersifat kausal atau memiliki hubungan sebab akibat yaitu saling berpengaruh.

2.17 Hipotesis

2.17.1 Hasil kandungan senyawa infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) diduga memiliki kandungan alkaloid dan terpenoid (Ratnawati, 2012).

2.17.2 Hasil identifikasi senyawa infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) diduga memiliki kandungan senyawa terbesar yaitu alkaloid (Ratnawati, 2012).

2.17.3 Nilai LC_{50} pada infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach yaitu 68,07ppm (Ratnawati, 2012).

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian dan Lokasi

3.1.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian kualitatif yang dilakukan dengan skринning fitokimiadan uji kuantitatif yang dilakukan dengan mengidentifikasi senyawa ekstrak dengan menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) serta eksperimental dengan menggunakan uji toksisitas infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

3.1.2 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratotium Kimia dan Botani Prodi Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu timbangan analitik, seperangkat alat gelas (PYREX), seperangkat alat infudasi, pipet, kertas saring, *rotary evaporator* buchi, thermometer, flakon, batang pengaduk, alumunium voil, kain mori, vial, kaca pembesar (JOYKO), aerator (ARMADA), aquarium, dan instrument LCMS SHIMADZU.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian diantaranya kulit buah segar majapahit (*Crescentia cujete* L.), aquadest (ONEMED), telur artemia (SUPREME PLUS), ragi (FERMIPAN), garam laut (ASW), DMSO (MERCK), kloroform (ONEMED), ammonia (GLATT CHEMICAL), H₂SO₄, FeCl₂ (MERCK), asam sulfat (GLATT CHEMICAL), pereaksi Mayer, pereaksi Dragendrof, dan HCl pekat.

3.3 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang ada di kawasan Desa Wates, Kecamatan Sumbergempol, Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur.

3.4 Metode Pengambilan Sampel

Metode pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah penentuan metode dengan pertimbangan tertentu. Alasan menggunakan metode *purposive sampling* ini karena banyaknya populasi yang akan digunakan dalam penelitian. Sampel penelitian ini adalah kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) segar yang ditandai dengan bentuk buah yang utuh serta berwarna hijau.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian merupakan segala sesuatu yang diterapkan oleh peneliti dalam bentuk apapun sebagai hal yang digunakan untuk dipelajari sehingga dapat diperoleh informasi untuk diambil kesimpulan (Sugiyono, 2013). Variabel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, variabel bebas, variabel kontrol, dan variabel terikat.

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang dapat menjadi penyebab atau yang mempengaruhi perubahan atau munculnya variabel dependen (terikat) (Ulfa, 2017). Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan variasi konsentrasi yang dilakukan saat pengujian toksisitas dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Letality Test*) terhadap *Artemia salina* Leach yaitu 1000ppm, 900ppm, 800ppm, 700ppm, dan 600ppm.

3.5.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dapat dikendalikan sehingga didapatkan hasil yang konstan dapat mempengaruhi variabel bebas terhadap variabel terikat dan tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti (Ulfa, 2017). Variabel kontrol yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

- a. Usia larva *Artemia salina* Leach adalah 48 jam
- b. Air laut buatan dan pH air laut yang digunakan yaitu 7 sampai 8
- c. Suhu dalam proses penetasan sekitar 25°C sampai 30°C
- d. Tempat yang digunakan untuk percobaan BSLT

3.5.3 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang menjadi akibat atau yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas (Ulfa, 2017). Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian yaitu senyawa apa saja yang terdapat pada ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dan berapa nilai LC₅₀ yang akan diperoleh.

3.6 Metode Penyarian

Infundasi merupakan proses perebusan kulit segar buah majapahit (*Crescentia cujete*) menggunakan pelarut air yang dipanaskan pada temperatur penangas air atau dalam bejana infus tercelup penangas air mendidih, pada suhu terukur 90°C, selama waktu tertentu 15 menit.

3.7 Metode Penelitian

3.7.1 Determinasi Tanaman

Sampel kulit buah majapahit dideterminasi di UPT Materia Medica Batu, Jawa Timur. Tujuan determinasi yaitu untuk mengetahui kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian (Susanti dkk., 2015).

3.7.2 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*), kulit buah majapahit diambil yang segar, berwarna hijau. Sampel diambil dari kawasan Desa Wates, Kecamatan Sumbergempol, Kabupaten Tulungagung.

3.7.3 Pengolahan Sampel

Pengolahan sampel dimulai dari sampel yang sudah ada dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran maupun bahan asing. Kemudian dilakukan pencucian sampel dengan menggunakan air bersih atau air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang masih melekat, kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan tidak terkena sinar matahari langsung.

3.7.4 Pembuatan Infusa Kulit Buah Majapahit

Pembuatan infusa kulit buah majapahit (*crescentia cujete*) dengan menggunakan metode infundasi. Kulit buah majapahit segar ditimbang sebanyak 100 gram, dimasukkan dalam panci maserasi dengan menggunakan pelarut

aquades sebanyak 1000 ml. Kemudian direbus diatas kompor dengan mengatur suhu menggunakan termometer dengan suhu stabil 90°C, selama 15 menit, sambil sesekali diaduk. Air rebusan disaring dengan menggunakan saringan masih dalam keadaan panas (Saputri dkk., 2020). Kemudian dilakukan pemekatan ekstrak dengan *rotary evaporator* yang tujuannya untuk menghilangkan pelarut dari hasil infusa (Sudarwati & Fernanda, 2019) .

3.8 Uji Rendemen

Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Rumus perhitungan pesen rendemen yaitu :

$$\text{Rendemen ekstrak \%} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.1})$$

3.9 Skrining Uji Fitokimia

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

3.8.1 Pengujian Alkaloid

Sebanyak 2 ml ekstrak ditambahkan, kemudian ditambah 2 ml kloroform dan 2 ml ammonia kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 3-5 tetes H₂SO₄ pekat lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Kemudian ditambahkan pereaksi Mayer dan Dragendrof 4-5 tetes. Hasil positif mengandung alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan dengan pereaksi Mayer memberikan endapan berwarna putih, sedangkan pereaksi Dragendroff memberikan endapan berwarna kuning kemerahan (Manongko dkk., 2020).

3.8.2 Pengujian Flavonoid

Skrining fitokimia senyawa flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan ekstrak, kemudian ditambahkan 5 ml etanol dan beberapa tetes FeCl₃ sampai terjadi perubahan warna. Kandungan flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru, ungu, hijau, merah maupun hitam. Apabila sampai 20 tetes FeCl₃ belum terjadi perubahan warna, maka flavonoid negatif (Kumalasari & Andiarna, 2020).

3.8.3 Pengujian Saponin

Dengan cara penambahan 1 ml ekstrak dilarutkan pada aquadest. Kemudian ditambahkan HCl 2% 1 ml dan dilakukan pengocokan secara vertical. Hasil positif saponin diperoleh Ketika menghasilkan busa dan tidak hilang (Manongko dkk., 2020).

3.8.4 Pengujian Tanin

Dengan cara 0,2 gram ekstrak dilarutkan dalam DMSO 1 ml, kemudian dilakukan pengadukan hingga larut. Kemudian ditambahkan dengan FeCl_2 2 sampai 3 tetes. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya hitam kebiruan hingga hijau (Manongko dkk., 2020).

3.10 Analisis LCMS (*Liquid Chromatography mass Spectrometry*)

3.10.1 Persiapan Sampel

Menimbang 2 mg ekstrak kulit buah majapahit diencerkan menggunakan metanol pro analisa sebanyak 10 ml metanol hingga mencapai konsentrasi 100 ppm dengan perbandingan sampel yaitu 1:5. Larutan disaring menggunakan filter cellulose acetate 0,45 μm , kemudian dilakukan proses degassing untuk menghilangkan gas dalam sampel (Fatimah dkk., 2020).

3.10.2 Analisis LCMS

Analisis LCMS dilakukan dengan UPLC-MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*) yang dilengkapi dengan pompa biner. LC (*Liquid Chromatography*) dihubungkan spektrometer massa *Quadrupole Time-of-Flight* (QTOF) dilengkapi dengan sumber ionisasi *Electrospray Ionization* (ESI). *Mass spectrometry* (MS) yang digunakan, yaitu system QTOF dengan mode ionisasi positif. Fase gerak menggunakan metanol, asetonitrile dan air dengan perbandingan berturut-turut 40:15:45 (v/v/v). Laju aliran fase gerak 0,5 ml/min dengan rentang waktu analisis selama 9 menit dengan suhu kapiler 350°C dan gas pengabut 60 ML/HR dengan sumber tegangan 5,0 V. Fase diam yang digunakan yaitu kolom UPLC yang digunakan Shimadzu Shim Pack FC-ODS (2mm x 150mm, 3 μm) dengan mode ionisasi positif. Rentang m/z full scan dari 100-5000 dilakukan dengan suhu 100°C (Fatimah dkk., 2020).

3.11 Skrining Analisa Toksisitas dengan Metode BSLT

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode uji ketoksikan yang memiliki korelasi positif terhadap aktivitas antitumor atau antikanker, selain itu metode ini juga memiliki beberapa keunggulan yaitu mudah dilakukan, sederhana, memerlukan sedikit bahan uji, tidak membutuhkan waktu yang lama dan tidak memerlukan tindakan aseptik. Prosedur dari metode BSLT yaitu dengan menentukan nilai LC_{50} dari konsentrasi suatu sampel dalam kematian hewan uji selama 24 jam menggunakan regresi linier (Arter dkk., 2013).

3.10.1 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)

3.10.2 Penetasan Larva Udang Artemia

Penetasan telur *Artemia salina* Leach dilakukan dengan merendam 1 gram telur *Artemia salina* Leach pada sisi terang. Stimulus cahaya mempengaruhi penetasan Artemia kista secara signifikan. Proses penetasan Penetasan larva dilakukan dibawah penerangan sinar lampu ruangan dan diaerasi selama 24 jam pada suhu kamar di aquarium yang telah dilengkapi aerator. Larva udang yang digunakan untuk uji yaitu yang sudah berusia 48 jam. Penambahan larutan ragi digunakan sebagai makanan untuk menghindari kematian larva (Aqiila dkk., 2017).

3.10.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Pembagian kelompok perlakuan pada metode BSLT menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebanyak 180 ekor. Larva-larva tersebut dibagi dalam lima kelompok uji dan satu kelompok kontrol. Setiap kelompok berisi 10 larva *Artemia salina* Leach yang nantinya akan direplikasikan sebanyak tiga kali, seperti tabel dibawah ini :

Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Konsentrasi	Replikasi
Kontrol (-)	3
1000ppm	3
900ppm	3
800ppm	3
700ppm	3
600ppm	3

3.12 Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan larutan stok dilakukan dengan membuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 μ g/ml sebanyak 100 ml dengan cara melarutkan 100 mg ekstrak dengan menggunakan pelarut DMSO dan ditambahkan air laut buatan ad 100 ml. Setelah itu dibuat seri konsentrasi dengan menggunakan pengenceran konsentrasi dari larutan induk kemudian ditambahkan ad 10 ml air laut buatan pada setiap vial.

3.13 Perlakuan Uji Toksisitas

Pada uji toksisitas akut menggunakan larva *Artemia salina* Leach dilakukan dengan cara membagi larva pada flakon-flakon yang telah disiapkan, dimana flakon telah berisi 10 ml air laut buatan, DMSO, dan ekstrak. Setelah larva dibagi dan diberi larutan uji. Kemudian diamkan larva selama 24 jam, setelah 24 jam amati pergerakannya selama 10 detik, apabila larva *Artemia salina* Leach tidak ada pergerakan selama 10 detik maka larva *Artemia salina* Leach dapat dikatakan mati. Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan dengan persen kematian. Rumus prosentase kematian larva yaitu :

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

Apabila pada kotrol negatif ada larva yang mati, maka % kematian dapat ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Kematian larva} = \frac{T - K}{10} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3.3})$$

Keterangan : T = Jumlah larva uji yang mati

K = Jumlah larva kontrol yang mati

10 = Jumlah larva uji

Setelah mengetahui kematian larva, kemudian dicari angka probit dapat dilihat pada (Gambar 3.1).

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,24	3,36	3,45	3,52	3,59	3,65
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	4,29	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

Gambar 3.1 Transformasi persentase menjadi probit (Nigar dkk., 2021)

Dari persamaan tersebut kemudian dihitung LC₅₀ dengan memasukkan nilai probit yang dibentuk seperti tabel dibawah ini :

Tabel 3.2 Model Tabel Data Probit Analisis

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

Setelah mengetahui kematian larva *Artemia salina*, kemudian dicari angka probit melalui tabel dan dibuat persamaan garis yang dapat diolah dengan menggunakan Microsoft Excel :

$$y = mx + b \tag{Persamaan 3.4}$$

Keterangan : y = persentase respon kematian dalam satuan probit

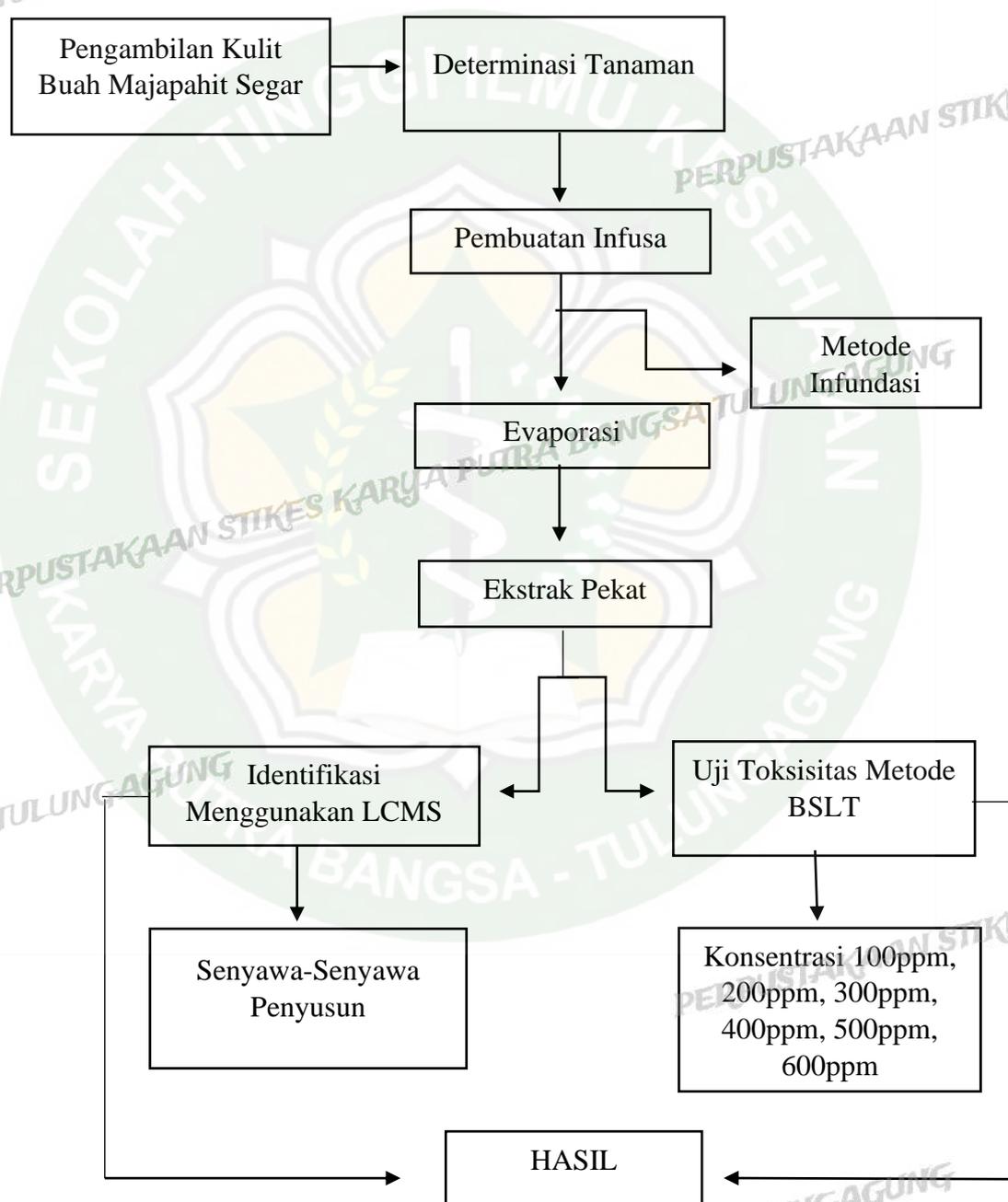
m = log konsentrasi

Berdasarkan hasil persamaan linier yang didapatkan, perhitungan LC₅₀ dapat ditentukan dengan nilai x, dan memasukkan nilai 5 untuk variabel y, dimana 5 adalah probit 50% dari kematian hewan. Kemudian nilai x dari LC₅₀ dikonversikan ke bentuk antilog, dan didapatkan hasil LC₅₀.

3.14 Analisis Data Toksisitas

Data hasil penelitian uji toksisitas diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari uji toksisitas tersebut akan dianalisis dengan analisis probit serta menggunakan Microsoft office excel untuk mencari regresi linier berdasarkan grafik garis (Fadli dkk., 2019).

3.15 Kerangka Penelitian



BAB IV

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Botani STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung, di Laboratorium Universitas Brawijaya tanggal 13 Februari-17 Februari 2023, serta diruang Instrumentasi LCMS Universitas Muhammadiyah Malang, tanggal 21 Februari 2023-24 Maret 2023. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas akut LC50 ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia Cujete*), dengan tahapan penelitian dimulai dari pembuatan ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia Cujete*), dilanjutkan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif dengan LCMS, dan pengujian toksisitas menggunakan metode BSLT. Hasil penelitian yang sudah dilakukan, didapatkan hasil sebagai berikut :

4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi adalah membandingkan suatu tumbuhan lain yang sudah dikenal sebelumnya (dicocokkan atau dipersamakan), sehingga pentingnya determinasi yaitu dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti. Tanaman majapahit (*Crescentia kujete*) yang digunakan dalam penelitian ini dideterminasi di Materia Medika Batu. Hasil dari determinasi dengan kunci determinasi 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b-16b-286a-287a;Bignoniaceae1b-3a;Crescentia-3:C.cujete menunjukkan apabila tanaman majapahit yang digunakan dalam penelitian dapat dipastikan merupakan dari jenis *Crescentia kujete* L. dan suku Bignoniaceae. Hasil identifikasi tanaman majapahit dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Majapahit

Proses ekstraksi kulit buah majapahit (*Crescentia kujete*) dilakukan menggunakan metode infundasi. Infundasi dipilih karena proses pengerjaannya yang mudah dan peralatan yang cukup sederhana. Pada infundasi ini, digunakan kulit buah majapahit (*Crescentia kujete*) sebanyak 1200 gram dengan aquadest sebanyak 2400 ml.

Proses pembuatan ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan dengan memilih kulit buah yang masih segar, dan berwarna hijau. Pemilihan warna hijau pada kulit buah majapahit yaitu senyawa yang terkandung dalam buah masih tinggi. Setelah didapatkan kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan sortasi basah, dengan tujuan kulit buah majapahit yang akan diuji tidak tercampur dengan bagian tanaman lain maupun material-material lain yang tidak dibutuhkan. Sebelum dilakukan perebusan, kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dipotong-potong dengan ukuran yang sama. Tujuan dari pemotongan kulit buah majapahit yaitu untuk mempermudah proses perebusan. Kulit buah majapahit direbus diatas kompor dengan suhu 90°C selama 15 menit, sambil sesekali diaduk (Hujjatusnini dkk., 2021). Air rebusan disaring dengan menggunakan saringan dalam keadaan panas (Saputri dkk., 2020). Kemudian dilakukan pemekatan ekstrak dengan *rotary evaporator* yang tujuannya untuk menghilangkan pelarut dari hasil infusa (Sudarwati & Fernanda, 2019).

4.3 Uji Rendemen

Tabel 4.1 Hasil Rendemen Ekstrak

Sampel	Bobot Simplisia	Bobot Ekstrak	%Hasil
Kulit Buah Majapahit (<i>Crescentia cujete</i>)	1200 g	36 g	3%

Mutu suatu ekstrak, dapat dilihat dari hasil rendemen ekstrak yang didapat. Rendemen merupakan perbandingan antara simplisia awal dengan ekstrak yang didapat. Rendemen ekstrak dihitung berdasarkan perbandingan berat akhir ekstrak dengan berat awal yang digunakan kemudian dikalikan 100%. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin banyak ekstrak yang didapatkan. Hasil penelitian menunjukkan rendemen ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang telah dihitung berdasarkan rumus pada persamaan 3.1 menghasilkan rendemen sebesar 3%, yang mana persyaratan rendemen berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia adalah 10%. Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa setelah melalui proses ekstraksi kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) kehilangan berat sebesar 97%. Hal ini menunjukkan bahwa rendemen yang dihasilkan rendah. Rendahnya nilai rendemen juga dipengaruhi oleh metode ekstraksi, suhu ekstraksi, waktu ekstraksi, jenis dan jumlah dari pelarut, maupun ukuran sampel

(Wijaya dkk., 2018). Pada proses penyarian dengan metode ekstraksi, menggunakan waktu yang cukup singkat yaitu 15 menit, sehingga kesempatan bereaksi antara bahan dengan pelarut hanya sebentar, hal ini menyebabkan proses penetrasi pelarut ke dalam bahan tidak efektif dan menyebabkan sedikitnya senyawa yang berdifusi keluar sel (Wijaya., 2018).

4.4 Skrinning Fitokimia

Skrinning fitokimia ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) bertujuan untuk memastikan keberadaan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Skrinning fitokimia dilakukan dengan metode pengujian warna serta dengan pereaksi warna. Hasil dari skrinning fitokimia dapat dilihat pada (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Hasil skrinning fitokimia

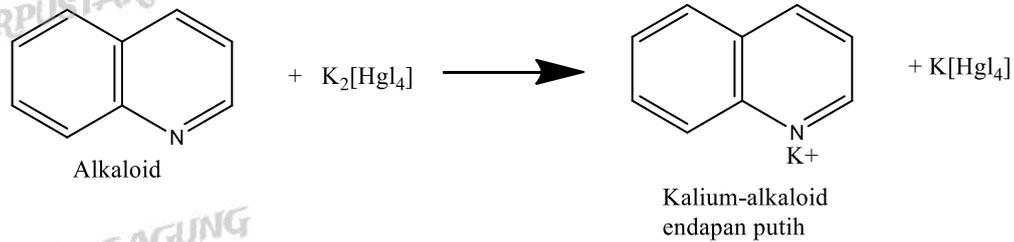
Senyawa	Pereaksi	Perubahan warna	Hasil
Alkaloid	$\text{CHCl}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{mayer} + \text{dragendrorf}$	Mayer =endapan putih	+
		Dragendrorf = endapan berrwarna jingga-merah	+
Flavonoid	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{FeCl}_3$	Berwarna kemerahan	+
Saponin	HCl pekat	Terbentuk busa	+
Tanin	FeCl_2	Hitam kehijauan	+

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

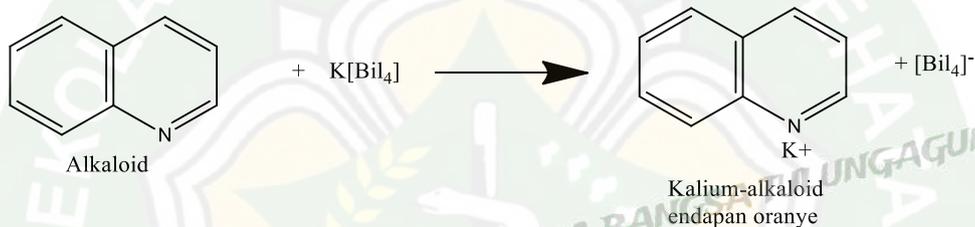
4.4.1 Uji Alkaloid

Uji alkaloid ini dilakukan untuk mengetahui terdapatnya senyawa alkaloid dalam ekstrak kulit buah majapahit. Adanya alkaloid dengan pereaksi Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium alkaloid yang mengendap. Perkiraan reaksi yang terjadi pada uji Mayer ditunjukkan pada (Gambar 4.1).

Gambar 4.1 Persamaan Pereaksi Mayer (Ergina dkk., 2014)



Sedangkan pada pereaksi Dragendroff ditandai dengan terbentuknya endapan jingga-merah, endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Dragendroff, bismuth nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismuth mudah terhidrolisis membentuk ion bismutil, yang reaksinya ditunjukkan pada (Gambar 4.2).



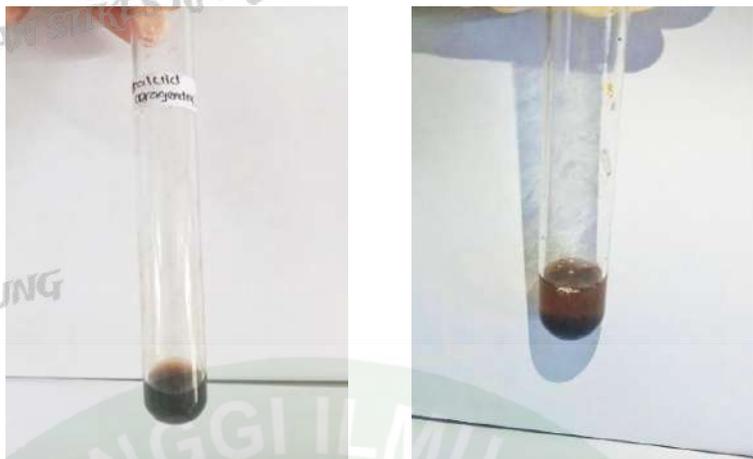
Gambar 4.2 Persamaan Pereaksi Dragendroff (Ergina dkk., 2014)

Hasil uji alkaloid ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) pada (Gambar 4.3) dan (Gambar 4.4) adalah positif, ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna putih pada pereaksi Mayer, sedangkan pereaksi Dragendroff endapan jingga-merah. (Manongko dkk., 2020).



Gambar 4.3 Hasil Uji Alkaloid dengan Pereaksi Mayer

- (a) Sebelum Direaksikan
- (b) Hasil Setelah Direaksikan

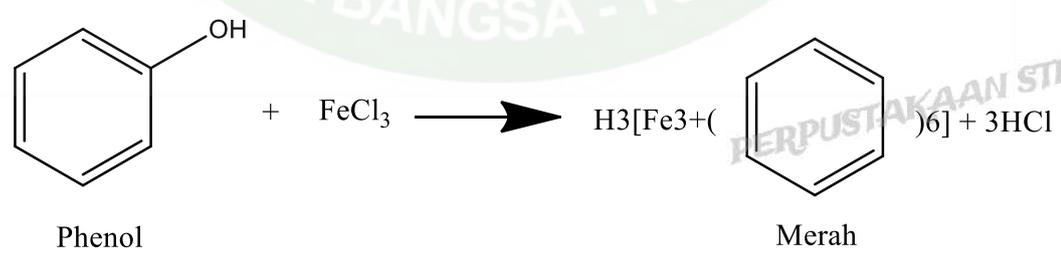


Gambar 4.4 Hasil Uji Alkaloid dengan Pereaksi Dragendroff

- (a) Sebelum Direaksikan
- (b) Hasil Setelah Direaksikan

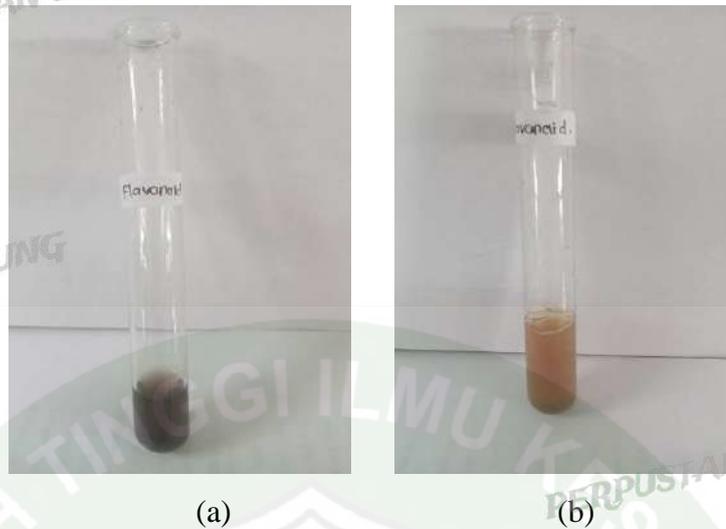
4.4.2 Uji Flavonoid

Uji flavonoid ini dilakukan dengan mengambil sampel ekstrak yang ditambahkan 5 ml etanol dan beberapa tetes FeCl₃ sampai terjadi perubahan warna. Kandungan flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru, ungu, hijau, merah maupun hitam. Apabila sampai 20 tetes FeCl₃ belum terjadi perubahan warna, maka flavonoid negatif. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kulit buah majapahit mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid adalah salah satu senyawa fenol yang mempunyai banyak gugus OH. FeCl₃ yang ditambahkan pada ekstrak kulit buah majapahit mempunyai senyawa fenol yang akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe³⁺ sehingga akan terbentuk larutan yang berwarna kemerahan. Perkiraan reaksi pada uji flavonoid ditunjukkan pada (Gambar 4.5) (Kumalasari & Andiarna, 2020).



Gambar 4.5 Persamaan Reaksi Fenol dengan FeCl₃ (Manongko dkk., 2020)

Hasil uji flavonoid pada (Gambar 4.6) ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) adalah positif dengan adanya perubahan warna menjadi kemerahan.



(a)

(b)

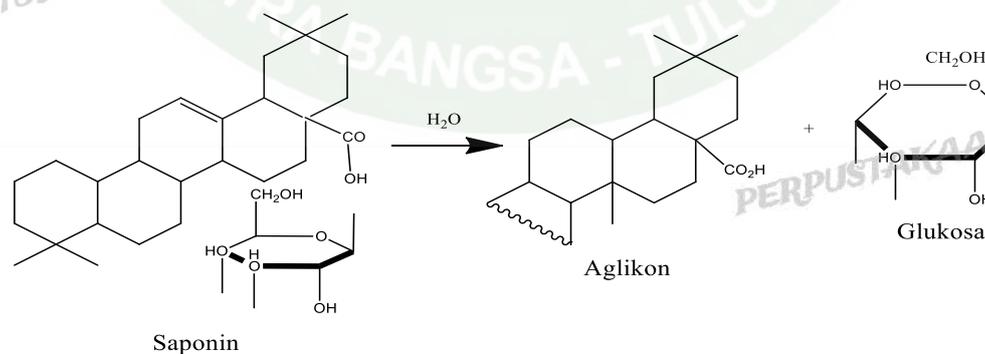
Gambar 4.6 Hasil Uji Flavonoid (a) Sebelum Direaksikan

(b) Hasil Setelah Direaksikan

4.4.3 Uji Saponin

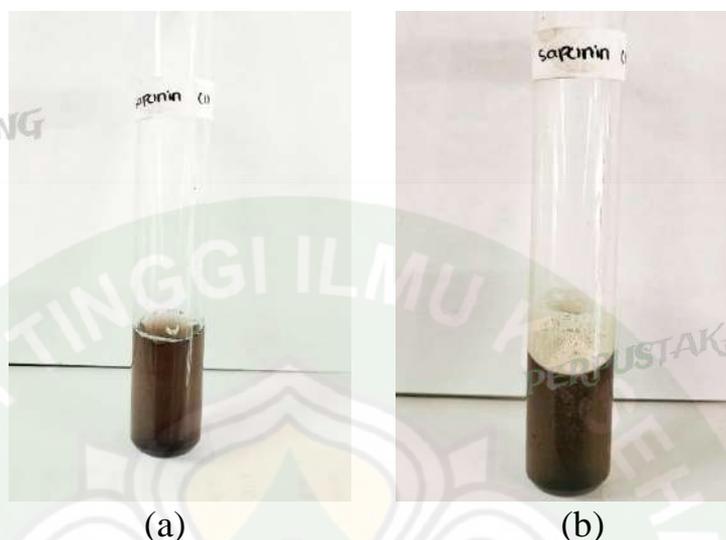
Saponin termasuk glikosida yang tersusun dari gula yang berikatan dengan aglikon (sapogenin) yang terdiri dari rantai triterpenoid atau steroid. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun sehingga ketika direaksikan dengan air dan dikocok maka akan terbentuk buih atau busa (Yildirim & Kutlu, 2015).

Busa yang dihasilkan pada uji saponin disebabkan karena adanya glikosida yang dapat membentuk busa dalam air dan terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Ningsih dkk., 2016). Persamaan reaksi pada uji saponin ditunjukkan pada (Gambar 4.7).



Gambar 4.7 Persamaan Pereaksi Saponin dengan Air (Setiabudi & Tukiran, 2017)

Hasil positif diperoleh dengan terbentuknya busa yang stabil (bertahan lama). Hasil uji saponin pada (Gambar 4.8) ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) adalah positif dengan terbentuknya busa yang stabil.

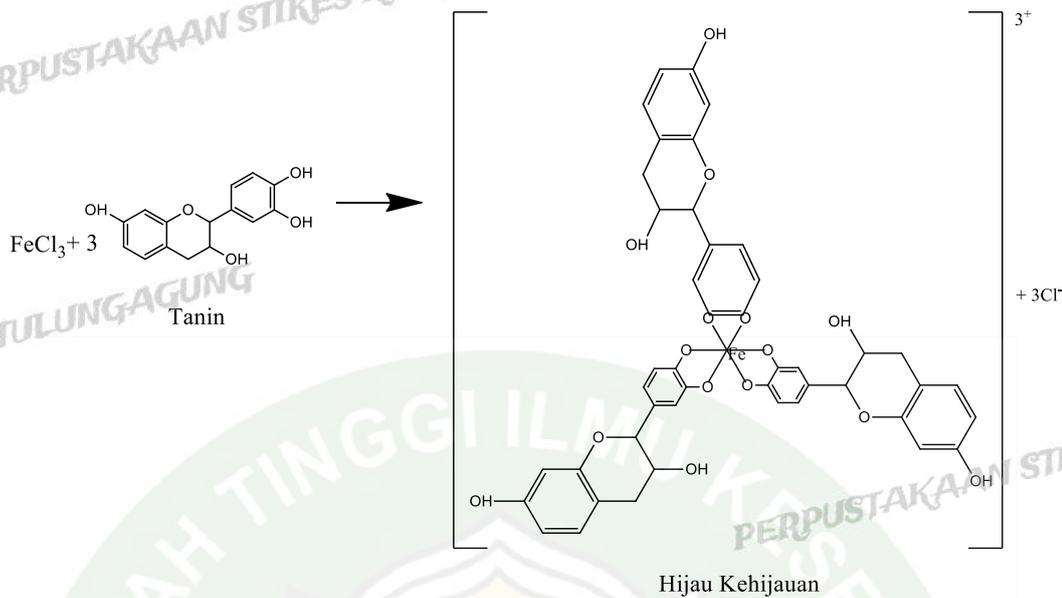


Gambar 4.8 Hasil Uji Saponin (a) Sebelum Direaksikan
(b) Hasil Setelah Direaksikan

4.4.4 Uji Tanin

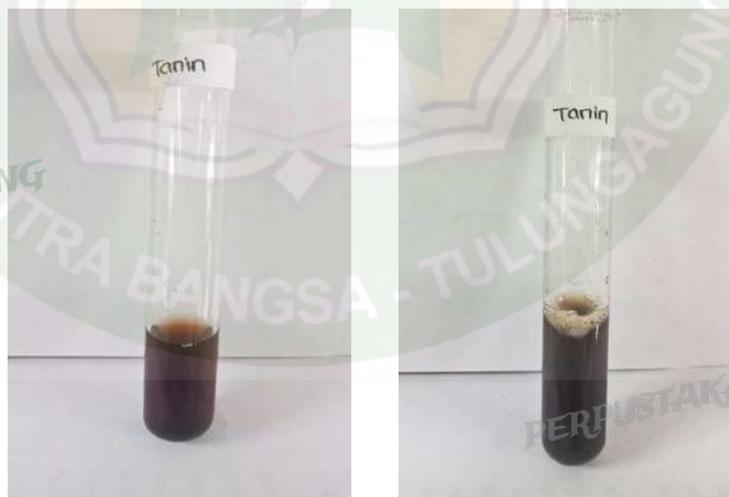
Pada pengujian senyawa tanin ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) yaitu dengan mengambil sampel sebanyak 0,2 gram dilarutkan dalam DMSO 1 ml. Kemudian dilakukan pengadukan hingga larut dan ditambahkan FeCl_3 2-3 tetes.

Uji skrining fitokimia dengan menggunakan FeCl_3 digunakan untuk menentukan apakah sampel mengandung gugus fenol. Adanya gugus fenol ditunjukkan dengan warna hitam kehijauan setelah ditambahkan dengan FeCl_3 sehingga apabila uji fitokimia dengan FeCl_3 memberikan hasil positif dimungkinkan dalam sampel terdapat senyawa fenol dan dimungkinkan salah satunya adalah tanin merupakan senyawa polifenol (Ergina dkk., 2014). terbentuknya warna hitam kehijauan pada ekstrak setelah ditambahkan dengan FeCl_3 karena tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} seperti yang terlihat pada (Gambar 4.9).



Gambar 4.9 Reaksi Antara Tanin dan FeCl₃ (Ergina dkk, 2014)

Hasil positif pada (Gambar 4.10) ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kehijauan. Pengujian ini memperoleh hasil positif dimana hasil yang didapatkan pada ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) terbentuk warna hitam kehijauan yang menandakan terbentuknya senyawa kompleks antara tanin dan Fe³⁺ yang memberikan indikasi perubahan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat (Ergina dkk., 2014).



(a)

(b)

Gambar 4.10 Hasil Uji Tanin (a) Sebelum Direaksikan

(b) Hasil Sesudah Direaksikan

4.5 Identifikasi Senyawa Infusa Kulit Buah Majapahit Menggunakan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometri*)

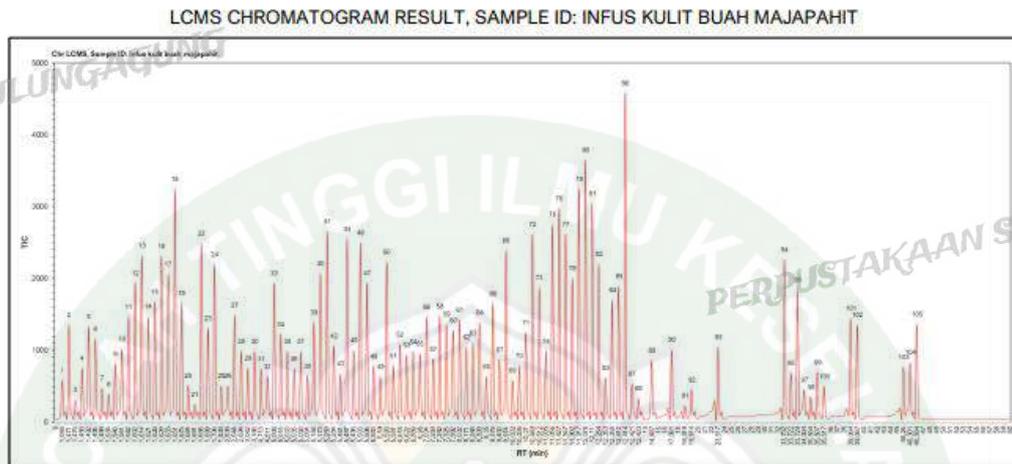
Identifikasi LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometri*) dilakukan di Universitas Muhammadiyah Malang dengan alat Shimadzu LCMS – 8040 LC/MS. Menggunakan fase gerak 90% metanol dengan air dan fase diam menggunakan kolom Shimadzu Shim Pack FC-ODS (2 mm x 150 mm, 3 μ m). Laju aliran fase gerak 0,5 ml per menit dengan rentang waktu analisis selama 60 menit dengan suhu kapiler 350°C. Rentang m/z full scan dari 10 hingga 1000 dengan waktu scan 0,6 detik per scan.

Liquid Chromatography merupakan pemisahan komponen campuran menggunakan fase gerak cair dan fase diam padat. *Mass Spectrometri* atau spektrometri massa adalah teknik analisis berdasarkan pengukuran rasio massa terhadap muatan spesies ion yang terkait dengan analit yang diteliti. Tujuan dari identifikasi ini untuk analisa senyawa organik, anorganik dan biologi dalam suatu sampel kompleks yang umum kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang diuji LCMS berbentuk chromatogram yang dimana seluruh senyawa aktif dipisahkan berdasarkan polaritasnya.

Mekanisme kerja LCMS yaitu dengan penyuntikan sampel yang mengalir bersama fase gerak dan terjadi pemisahan campuran di dalam kolom, karena perbedaan kekuatan interaksi dengan fase diam. Larutan yang dapat berinteraksi akan keluar dari kolom dan menuju detector kemudian direkam menjadi kromatogram. Hasil kromatogram berupa alur tinggi peak yang disertai informasi dari senyawa di dalam ekstrak. Hasil data dari LCMS dapat memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu.

Analisa LCMS senyawa infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan di Universitas Muhammadiyah Malang. Hasil dari analisis LCMS dapat diamati pada (Gambar 4.11) diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) sebanyak 105 senyawa dengan satu senyawa yang memiliki konsentrasi tertinggi yang dapat dilihat pada (Tabel 4.3) bahwa senyawa dengan jumlah komposisi tertinggi dari ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) yaitu marmeline yang muncul pada waktu

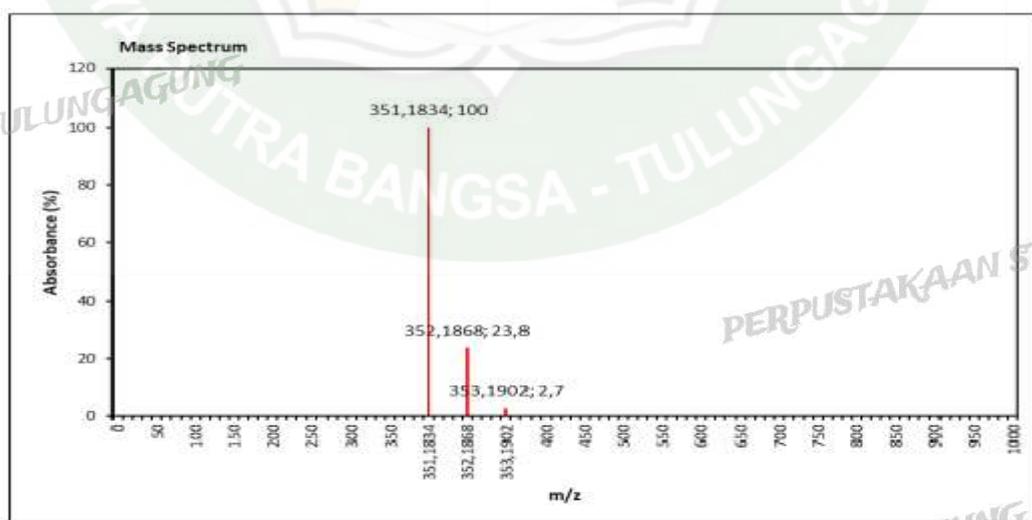
retensi menit ke-12,414. Waktu retensi merupakan lamanya waktu analisis sampel, dimana pada fase terbalik zat yang lebih polar akan terelusi dulu, dan memiliki waktu retensi yang lebih cepat dibandingkan zat non polar (Mangurana dkk., 2019).



Gambar 4.11 Hasil Kromatogram LCMS

Tabel 4.3 Hasil deteksi dan identifikasi senyawa menggunakan LCMS

No	Nama Senyawa	Waktu Retensi (menit)	Komposisi (%)	Analisis
1	Marmeline	12,414	3,17998	Rumus kimia : $C_{22}H_{25}NO_3$ Berat molekul : 351,4460 m/z : 351.1834 (100%)



Gambar 4.12 Hasil Mass Spectrometri senyawa marmeline

Menurut penelitian Mondal dkk., (2019) aktifitas antioksidan dari hasil analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometri*) dipilih puncak tertinggi yang diduga merupakan senyawa alkaloid. Alkaloid bekerja sebagai antioksidan dengan mekanisme kerja yakni dengan menghambat proliferasi sel dengan cara mempengaruhi dinamika mikrotubulus selama mitosis, sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat dan menyebabkan terjadinya apoptosis (Mondal dkk., 2019).

Alkaloid memiliki mekanisme sitotoksik dengan cara berikatan dengan tubulin (protein yang menyusun mikrotubulus) sehingga polimerisasi protein menjadi mikrotubulus terhambat dan menyebabkan pembentukan benang spindle terhambat. Hal tersebut menyebabkan siklus terhenti pada tahap metaphase sehingga tidak terjadi pembelahan sel dan memicu terjadinya apoptosis (Rani dkk., 2022).

4.6 Skринning Analisa Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

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

4.6.1 Pembuatan Air Laut Buatan

Larva udang *Artemia salina* Leach ditetaskan dalam media air laut buatan. *Artemia salina* Leach mempunyai kelenjar garam didalam tubuhnya yang berguna untuk menyesuaikan diri dengan suasana garam dilingkungan hidupnya (Hamidi dkk., 2014). Dalam pembuatan air laut buatan diperlukan natrium klorida sebanyak 35 gram dan aquadest. Natrium klorida dilarutkan dalam aquadest. Setelah semua terlarut merata, air laut yang sudah jadi kemudian diaerasi selama 2 jam, dengan tujuan agar air laut buatan memiliki kandungan oksigen yang cukup untuk kelangsungan hidup *Artemia salina* Leach (Aqiila dkk., 2017).

4.6.2 Penetasan Telur *Artemia salina* Leach

Penetasan telur *Artemia salina* Leach dilakukan dalam aquarium kecil khusus penetasan. Tempat penetasan dilengkapi dengan aerator sebagai suplay oksigen. Telur *Artemia salina* Leach menetas dalam waktu 24 jam yang kemudian menjadi burayak atau nauplius. Burayak atau nauplius yang baru menetas memiliki warna kemerah-merahan. Warna kemerahan tersebut diperoleh karena adanya cadangan makanan didalam tubuhnya. Burayak atau nauplius harus mendapatkan makanan berupa suspense ragi agar dapat bertahan hidup. Suspense ragi dibuat dengan campuran 3 mg ragi dan 5 ml air laut buatan (Suhaimi dkk., 2019).

Burayak atau nauplius yang digunakan untuk penelitian ini yaitu burayak atau nauplius yang berusia 48 jam atau 2 hari. Penggunaan burayak berusia 48 jam karena sifat burayak atau nauplius yang lebih peka terhadap zat yang masuk dan organ-organ yang dimiliki sudah lengkap. Sehingga data kematian burayak atau nauplius benar-benar disebabkan oleh ekstrak kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) (Aqiila dkk., 2017).

4.6.3 Uji Toksisitas Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode skrining bioaktivitas suatu ekstrak atau senyawa murni dengan hewan uji larva *Artemia salina* Leach. sampel yang digunakan adalah infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan konsentrasi 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, 600ppm dan kontrol negatif. Konsentrasi tersebut didapat setelah

melakukan uji pendahuluan dengan kadar 1000ppm, 900ppm, 800ppm, 700ppm, 600ppm, dan kontrol negatif. Perhitungan pembuatan serial konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 3. Adanya dilakukan uji pendahuluan dimaksudkan untuk melihat atau mengetahui pengaruh variasi respon yang diberikan terhadap kematian larva. Bila LC_{50} dibawah $1000\mu\text{g/ml}$ dinyatakan toksik, dengan mengetahui prosentase kematian larva dari data prosentase dapat menggambarkan hasil yang lebih linier dan nilai LC_{50} yang diperoleh pada konsentrasi 600ppm menggambarkan hasil yang lebih sebenarnya. Kontrol dibuat 2 yakni kontrol pelarut dan kontrol negatif yang menggunakan DMSO. Hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pelarut dan DMSO terhadap kematian larva sehingga dapat dipastikan kematian larva disebabkan oleh senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kulit buah majapahit. Penambahan DMSO bertujuan untuk melarutkan komponen-komponen nonpolar pada ekstrak ke dalam air laut yang bersifat polar. Hal ini dikarenakan DMSO bertindak sebagai surfaktan yang memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik dari gugus $-\text{CH}_3$ yang dapat mengikat keduanya. Pengujian sampel dilakukan dengan kapasitas 10 ml. Tiap-tiap serial konsentrasi dilakukan 3 kali replikasi dengan tujuan memperoleh keakuratan data dan meminimalisir kesalahan dalam penelitian. Jumlah total larva *Artemia salina* Leach yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 300 ekor yang dimasukkan dalam 30 vial. Setelah 24 jam perlakuan, larva udang diamati menggunakan bantuan kaca pembesar. Pengamatan kematian larva dilihat dari pergerakan larva selama beberapa detik, dan larva yang mati akan mengendap di dasar vial. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Kematian Larva dari Uji Pendahuluan

Replikasi	Kontrol (-)	Konsentrasi (ppm)				
		1000	900	800	700	600
1	0	8	10	8	7	5
2	0	10	9	7	6	5
3	0	10	9	7	7	5
Total kematian	0	28	28	22	20	15
% Kematian	0	93	93	73	65	50

Berdasarkan tabel diatas, LC_{50} didapat pada konsentrasi 600ppm setelah didapatkan hasil uji pendahuluan dapat dilanjutkan untuk uji dengan konsentrasi

100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm dan 600ppm. Hasil prosentase kematian larva tersebut dapat dilihat pada (Tabel 4.5).

Tabel 4.5 Tabel Prosentasi Kematian Larva

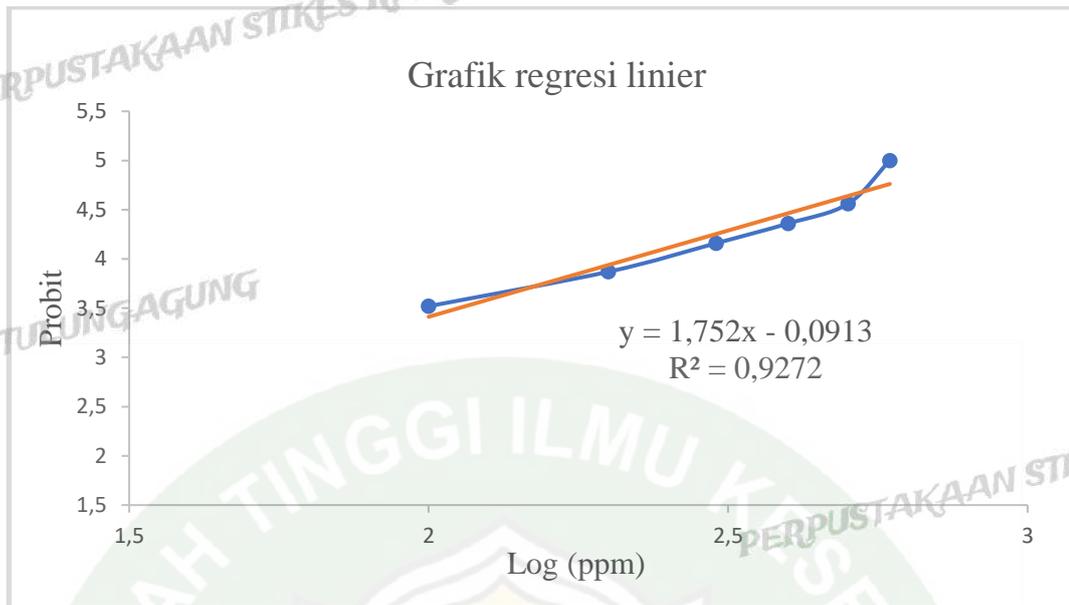
Replikasi	Kontrol (-)	Konsentrasi (ppm)					
		100	200	300	400	500	600
1	0	1	1	3	4	5	5
2	0	0	1	2	3	4	5
3	0	1	2	1	1	1	5
Total kematian	0	2	4	6	8	10	15
% Kematian	0	7	13	20	26	33	50

Setelah pengujian dan mendapatkan jumlah larva yang mati, maka dilakukan perhitungan prosentase kematian untuk memperoleh nilai probit. Nilai probit dapat diperoleh dengan melihat tabel probit. Hasil pengamatan dapat dilihat pada (Tabel 4.6).

Tabel 4.6 Data Pengamatan Kematian Larva Udang Menggunakan Analisa Probit

Konsentrasi (ppm)	Log 10	Probit	% kematian	Mortality	Total hewan uji
K (-)	0	0	0	0	30
100	2,00	3,52	7	2	30
200	2,30	3,87	13	4	30
300	2,48	4,16	20	6	30
400	2,60	4,36	26	8	30
500	2,70	4,56	33	10	30
600	2,77	5,00	50	15	30

Berdasarkan tabel diatas, dapat dilakukan proses perhitungan nilai LC₅₀. Untuk menghitung nilai LC₅₀ dapat menggunakan dua cara yang pertama dengan menghitung *slope* dan *intersept* menggunakan Microsoft excel. Slope merupakan nilai koefisien regresi untuk variabel X, sedangkan intersept merupakan nilai rata-rata variabel Y apabila variabel X memiliki nilai 0. Nilai slope yang diperoleh sebesar 1,752 sedangkan nilai intersept yang diperoleh yaitu -0,0019. Kemudian hitung nilai LC₅₀ persamaan $y = mx + b$, dimana m merupakan nilai *slope* sedangkan, b merupakan nilai dari *intersept*. Cara kedua untuk menghitung nilai LC₅₀ yaitu dengan membuat grafik antara log konsentrasi dengan nilai probit yang telah diperoleh, setelah itu dibuat persamaan garis lurus pada kurva. Grafik dapat dilihat seperti pada (Gambar 4.13) berikut :



Gambar 4.13 Grafik regresi linier ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap nilai probit.

Dari grafik diatas dihitung nilai LC₅₀ nya menggunakan persamaan yang diperoleh yaitu $y = 1,752x - 0,0913$. Pada penelitian ini mencari nilai LC₅₀ maka nilai 50 dari LC yang akan dicari diubah dalam nilai probit terlebih dahulu. Nilai y yang telah diubah menghasilkan nilai 5, sehingga persamaannya menjadi $5 = 1,752x - 0,0913$ dan mendapat nilai LC₅₀ sebesar 805,19ppm.

Dari grafik diatas juga diperoleh nilai R². Dimana R² ini merupakan nilai koefisien dalam hubungan dua variabel X dan Y, yang mengukur kuatnya hubungan antara X dan Y. dari nilai R² dengan taraf kepercayaan 95% dengan nilai 0,9272. Nilai R² tersebut menunjukkan adanya hubungan korelari yang linier antara konsentrasi dan probit, dimana akan ada peningkatan nilai konsentrasi meningkat.

Berdasarkan perhitungan nilai LC₅₀ yang telah didapat, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) memiliki sifat toksik karena nilai LC₅₀ yang dimiliki <1000 ppm. Hal ini sesuai pernyataan (Andini dkk., 2021) yang menyatakan bahwa senyawa dengan nilai LC₅₀ ≤30 ppm memiliki sifat yang sangat toksik, senyawa dengan nilai LC₅₀ ≤100 ppm memiliki sifat toksik, sedangkan senyawa dengan nilai LC₅₀ >1000 ppm memiliki sifat tidak toksik.

Adanya sifat toksik ini dapat berkaitan dengan senyawa tertinggi pada LCMS yaitu senyawa marmeline golongan alkaloid yang terkandung dalam ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*). Kulit buah majapahit yang diuji kualitatif dengan skrinning fitokimia terdapat kandungan alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin, setelah dilakukan uji kuantitatif menggunakan metode LCMS (*Liquid Chromatogram Mass Spectrometry*) terdapat senyawa marmeline tertinggi dari golongan alkaloid. Mekanisme kerja alkaloid dapat menyebabkan kematian larva *Artemia salina* Leach adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Senyawa toksik ini dapat mengganggu alat pencernaan dan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal inilah yang menyebabkan kegagalan larva mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya dan menyebabkan kematian larva. Hasil penelitian ini selaras dengan Ratnawati (2011) yang menyatakan bahwa golongan alkaloid dari ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) memiliki potensi toksisitas terhadap antikanker (Ratnawati, 2011).

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

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

1. Pengujian skrining fitokimia pada ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) menunjukkan bahwa ada kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.
2. Analisis LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometri*) terhadap ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) pada penelitian kali ini terdapat 105 senyawa, dengan 1 senyawa yang memiliki konsentrasi tertinggi yaitu marmeline sebanyak 3,17998%. Senyawa tersebut dari golongan alkaloid.
3. Skrining potensi antikanker ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menunjukkan bahwa adanya potensi sebagai antikanker dengan ditandai perolehan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm, yakni sebesar 805,19ppm.

5.2 Saran

Pada hasil skrining antikanker ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) menunjukkan hasil yang positif atau potensial, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan pada hewan uji atau sel kanker secara langsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Aliwikarta, K., Palupi, N. S., & Giriwono, P. E. (2016). Prevalensi Penyakit Kanker di Indonesia Berdasarkan Pola Konsumsi Pangan dan Gaya Hidup Cancer prevalence in Indonesia Based on Food Consumption Patterns and Lifestyle Newly Weds Foods Asia Pacific 2. *Jurnal Mutu Pangan*, 3(1), 71–78.
- Andini, A., Prayekti, E., Triasmoro, F., & Kamaliyah, I. N. (2021). Pengaruh Penggunaan Jenis Pelarut dalam Uji Sitotoksitas Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) pada Wound Dressing Kolagen-Kitosan. *al-Kimiya*, 8(1), 15–20. <https://doi.org/10.15575/ak.v8i1.10277>
- Anggraini, V., & Masfufatun, M. (2017). EFEKTIVITAS KOMBINASI EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH (*Piper Crocatum*) DAN EKSTRAK BIJI ALPUKAT (*Persea americana*) DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN *Candida albicans*. *Jurnal Kimia Riset*, 2(2), 86. <https://doi.org/10.20473/jkr.v2i2.6196>
- Aqiila, G. R., Taufiqurrahman, I., & Wydiamala, E. (2017). UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN RAMANIA (*Bouea macrophylla* Griffith) TERHADAP MORTALITAS LARVA *Artemia salina* Leach. *Jurnal Kedokteran Gigi Dentino*, 2(2), 170–176.
- Arcanjo, D., Albuquerque, A., Melo-Neto, B., Santana, L., Medeiros, M., & Citó, A. (2012). Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology*, 72(3), 505–509. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000300013>
- Arimbi, N., Hairil, A., & Jayuska, A. (2015). UJI TOKSISITAS DENGAN METODE BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) TERHADAP HASIL FRAKSINASI EKSTRAK KULIT BUAH TAMPOI (*Baccaurea macrocarpa*). 4(1), 75–83.
- Arter, M. D., Koleangan, H. S. J., & Runtuwene, M. R. J. (2013). ANALISIS KANDUNGAN FITOKIMIA DARI UJI TOKSISITAS EKSTRAK METANOL DAUN SOYOGIK (*Sauraula bracteosa* DC) DENGAN MENGGUNAKAN METODE MASERASI. *Jurnal Ilmiah Sains*, 13(2), 98. <https://doi.org/10.35799/jis.13.2.2013.3052>
- Chandra, M., Sharma, S., & Veer, D. (2011). Scholars Research Library. *Scholars Research Library*, 2(4), 373–383.
- Degiannakis, S. (2015). A probit model for the state of the greek gdp growth. *International Journal of Financial Studies*, 3(3), 381–392. <https://doi.org/10.3390/ijfs3030381>
- Dewi, M. K., Ratnasari, E., & Trimulyono, G. (2014). Aktivitas antibakteri ekstrak daun majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu. *Jurnal Lentera Bio*, 3(1), 51–57.
- Dumitrascu, M. (2011). *Artemia salina*. *Balneo Research Journal*, 2(4), 119–122. <https://doi.org/10.12680/balneo.2011.1022>
- Ergina, Nuryanti, S., & Pursitasari, I. D. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi dengan

- Pelarut Air dan Etanol. *J. Akad. Kim*, 3(3), 165–172.
- Fadli, Suhaimi, & 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>
- Fardilla, I., & Hidajati, N. (2018). Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak N-Heksana Daun Tumbuhan Majapahit (*Crescentia Cujete*) Isolation of Secondary Metabolites From N-Hexane Extract of Majapahit Leaf (*Crescentia Cujete*). *Unesa Journal of Chemistry*, 7(1), 34–38.
- Fatimah, Martha, R. D., & Kusumawati, A. (2020). Deteksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS. 3(2), 88–98.
- Fatmawati, I. (2015a). Efektivitas Buah Maja (*Hedyotis corymbosa* (L.) Corr.) sebagai Bahan Pembersih Logam Besi. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*, 9(1), 81–87.
- Fatmawati, I. (2015b). Efektivitas Buah Maja (*Aegle Marmelos* (L.) Corr.) sebagai Bahan Pembersih Logam Besi. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya*, 9(1), 81–87. <https://doi.org/10.33374/jurnalkonservasicagarbudaya.v9i1.164>
- Fauzi, M. N., & Santoso, J. (2021). Uji Kualitatif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Buah Maja (*Aegle Marmelos* (L.) Correa) dengan Metode DPPH. *Jurnal Riset Farmasi*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.29313/jrf.v1i1.25>
- Heliawati, L. (2018). Kimia Organik Bahan Alam. *Kimia Organik Bahan Alam*. <https://doi.org/10.52574/syiahkualaaniversitypress.298>
- Hujjatusnini, M. P., Indah, B., Afitri, E., Widyastuti, R., & Ardiansyah. (2021). *Buku referensi ekstraksi*.
- Ilyas, A., Novianty, I., & Irmayanti, I. (2015). SENYAWA GOLONGAN STERIOD DARI EKSTRAK n-HEKSANA KULIT BATANG KAYU BITTI (*Vitex cofassus*) DAN Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach. *Chimica et Natura Acta*, 3(3), 120–124. <https://doi.org/10.24198/cna.v3.n3.9220>
- Khafidhoh, Z., Dewi, sri sinti, & Iswara, A. (2015). EFEKTIVITAS INFUSA KULIT JERUK PURUT (*Citrus hystrix* DC.) TERHADAP PERTUMBUHAN *Candida albicans* PENYEBAB SARIAWAN SECARA *in vitro*. 2. <https://doi.org/10.21157/j.med.vet.v7i2.2951>
- Kumalasari, M. L. F., & Andiarna, F. (2020). Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L). *Indonesian Journal for Health Sciences*, 4(1), 39. <https://doi.org/10.24269/ijhs.v4i1.2279>
- Mangurana, W. O. I., Yusnaini, Y., & Sahidin, S. (2019). Analisis LC-MS/MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) dan Metabolit Sekunder Serta Potensi Antibakteri Ekstrak n-HEKSANA SPONGS *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>
- Manongko, P. S., Sangi, M. S., & Momuat, L. I. (2020). Uji Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.).

- Jurnal MIPA*, 9(2), 64. <https://doi.org/10.35799/jmuo.9.2.2020.28725>
- Maria, G., Hernandez, Z., Perez, P., & Luis, J. (2014). Cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 5(October 2002), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-17>
- Martha, R. D., & Fatimah. (2021). 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>
- Meles, D. K. (2010). Peran Uji Praklinik Dalam Bidang. *Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP)*, 1–33.
- Mentor, H. R., Jovanova, B., & Panovskan, T. K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(01), 9–18. <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>
- Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A. G., & Bishayee, A. (2019). Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European Journal of Pharmacology*, 858(November 2018), 172472. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172472>
- Mukhtarini. (2014). Mukhtarini, “Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif,” *J. Kesehat.*, vol. VII, no. 2, p. 361, 2014. *J. Kesehat.*, VII(2), 361.
- Mulyana, C., -, R., & Suryaningsih, S. (2013). PENGARUH PEMBERIAN INFUSA DAUN KATUK (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) TERHADAP KADAR TRIGLISERIDA SERUM DARAH KAMBING KACANG JANTAN LOKAL. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(2), 31–37. <https://doi.org/10.21157/j.med.vet..v7i2.2951>
- Nastiti, M., Erwin, & Kusuma, I. W. (2017). SKRINING FITOKIMIA DAN UJI TOKSISITAS PADA DAUN TERAP (*Artocarpus elasticus*) DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT). *Prosiding Seminar nasional kimia*, 60, 69–73.
- Nigar, S., Gupta, N., Trivedi, A., & Gupta, V. (2021). Lead Nitrate Induced Acute Toxicity in the Freshwater Fishes *Channa Punctatus* and *Heteropneustes Fossilis*. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 9(8), 735–743. <https://doi.org/10.12691/aees-9-8-4>
- Ningsih, D. riana, Zufahair, & Kartika, D. (2016). IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER SERTA UJI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN SIRSAK SEBAGAI ANTIBAKTERI. 133(2015), 54507.
- 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>
- Parasuraman, S. (2011). Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2(2), 74–79. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895>
- Patil, D. N., Kulkarni, A. R., & Patil, B. S. (2010). Fruit gum of *Aegle marmelos* as pharmaceutical aid. In *International Journal of Pharmacology* (Vol. 6,

- Nomor 1, hal. 68–71). <https://doi.org/10.3923/ijp.2010.68.71>
- PerKB POM. (2014). Peraturan Badan Pengawasan Obat dan Makanan No 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara In Vivo. *Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia*, 1–165.
- Prastiwi, T., & Febri. (2013). Developmental and Clinical Psychology. *Identitas Diri Remaja Pada Siswa Kelas Xi Sma Negeri 2 Pemalang Ditinjau Dari Jenis Kelamin*, 1(1), 21–27.
- Prof. Dr. Harmita, A., Prof. Dr. yahdiana harahap, M.S.I., A., & Dr. supandi, M. Si., A. (2019). Liquid Chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS). In *Liquid Chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS)*.
- Purwanto, N., Rismawati, E., & Sadiyah, esti R. (2015). Uji Sitotoksik ekstrak biji salak (*Salacca zalacca* (Gaert) Voss dengan menggunakan metode Brine Shrimp lethality test (Bslt). *prosiding penelitian SPeSIA Unisiba prodi farmasi FMIPA*, 616–622.
- Rahmaningsih, S., & Andriani, R. (2017). Aktivitas Biologis Ekstrak Daun Majapahit (*Crescentia Cujete*) Dan Potensinya Sebagai Antibakteri *Vibrio Harveyi* Secara Insilico. *Prosiding Seminar Naional Unirow Tuban*, 80–87.
- Rani, Z., Ridwanto, R., Miswanda, D., Yuniarti, R., Sutiani, A., Syahputra, R. A., & Irma, R. (2022). Cytotoxicity Test of Cocoa Leaf Ethanol Extract (*Theobroma Cacao L.*) With Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. *Indonesian Journal of Chemical Science and Technology (IJCST)*, 5(2), 80. <https://doi.org/10.24114/ijcst.v5i2.37452>
- 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) Methode. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1059(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1059/1/012051>
- Ratnawati, D. (2012). Uji Aktifitas Biologis Ekstrak Kulit Dan Daging Buah Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test. *MJoCE*, 2(1), 17–26.
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(12), 2821–2831. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.004>
- Redha, A. (2010). Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Berlin*, 9(2), 196–202. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-7>
- Rizky Amelia, F. (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.
- Saibaba, S. ., Kumar, M. S., & Pandiyan, P. shanmug. (2016). Mini review on Lc / Ms techniques. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 2381–2395. <https://doi.org/10.20959/wjpps20164-6581>
- Saputri, R., Hadiyanti, R., & Susiani, E. F. (2020). Uji Efek Antidiare Infusa Kulit Buah Pisang Kepok (*Musa paradisiaca L. forma typical*) Terhadap Mencit Jantan Yang Diinduksi Oleum

- RICINI. *Borneo Journal of Pharmascientech*, 4(1), 80–89. <https://doi.org/10.51817/bjp.v4i1.285>
- Sasmito, A., Dwi Wijayanti, A., Fitriana, I., & Wikan Sari, P. (2015). Pengujian Toksisitas Akut Obat Herbal Pada Mencit Berdasarkan Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) The acute toxicity test of herbal medicine in mice based on Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). *Jurnal Sain Veteriner*, 33(2), 235–238.
- Setiabudi T, dian arista, & Tukiran. (2017). Uji skrining fitokimia ekstrak metanol kulit batang tumbuhan klampok watu (*Syzygium litorale*) phytochemical screening on methanol ekstrak from steam bark klampok watu (*Syzygium litorale*). *UNESA Journal of Chemistry*, 6(3), 155–160.
- Setiawan, S. D. (2015). The Effect of Chemotherapy in Cancer Patient to Anxiety. *J Majority*, 4(4), 94–99.
- Sudarwati, T. P. L., & Fernanda, M. A. H. F. (2019). *Aplikasi Pemanfaatan Daun Pepaya (Carica papaya) Sebagai Biolarvasida Terhadap Larva Aedes aegypti* (N. R. Hariyati (ed.)). Penerbit Graniti.
- Suhendar, U., Utami, N. F., Sutanto, D., & Nurdayanty, S. M. (2020). PENGARUH BERBAGAI METODE EKSTRAKSI PADA PENENTUAN KADAR FLAVONOID EKSTRAK ETANOL DAUN ILER (*Plectranthus scutellarioides*). *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 10(1), 76–83. <https://doi.org/10.33751/jf.v10i1.2069>
- Sujudi, A. (2011). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan.pdf*.
- Susanti, N. M. P., Warditiani, N. K., Laksmiani, N. P. ., Widjaja, I. N. ., Rismayanti, A. A. M. ., & Wirasuta, I. M. A. G. (2015). *PERBANDINGAN METODE EKSTRAKSI MASERASI DAN REFLUKS TERHADAP RENDEMEN ANDROGRAFOLID DARI HERBA SAMBILOTO (Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees). V.*
- Tania, L., Efkar, T., & Agustiani, V. (2018). Pengembangan Animasi Berbasis Simulasi Molekul pada Metode Destilasi. *Jurnal Pendidikan dan Pembelajaran Kimia*, 7(2).
- Tiwari, P., Kumar, B., Mandeep, K., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106.
- Tommy, Kurnia, A., Utami, B., Diyani, L. N., Maulana, A., Matematika, F., Ilmu, D. A. N., Alam, P., Farmasi, D., Studi, P., & Ilmu, M. (2011). *UNIVERSITAS INDONESIA KONSEP HERBAL INDONESIA : PEMASTIAN MUTU PRODUK HERBAL.*
- Ulfa, R. (2017). Variabel Dalam Penelitian Pendidikan. *Jurnal Teknodik*, 6115, 196–215. <https://doi.org/10.32550/teknodik.v0i0.554>
- Widodo, A., Mulyana, M., & Mumpuni, F. S. (2016). Pengaruh Lama Waktu Perendaman Dan Larutan Dekapsulasi Terhadap Penetasan Siste Artemia sp. *Jurnal Mina Sains*, 2(1), 31–38. <https://doi.org/10.30997/jms.v2i1.427>
- Wijaya, H., Novitasari, & Jubaidah, S. (2018). Perbandingan metode ekstraksi terhadap rendemen ekstrak daun rambui laut (*Sonneratia caseolaris* L. Engl). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 4(1), 79–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.51352/jim.v4i1.148>

- Wilantari, P. D. (2018). Isolasi Kafein Dengan Metode Sublimasi Dari Dengan Fraksi Etil Asetat Serbuk Daun *Camelia Sinensis*. *Jurnal Farmasi Udayana*, 8(1), 53. <https://doi.org/10.24843/jfu.2018.v07.i02.p03>
- Yildirim, I., & Kutlu, T. (2015). Anticancer agents: Saponin and tannin. *Anticancer agents: Saponin and tannin*, 9(6), 332–340. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.332.340>
- Yuliana, A., & Arianti, W. (2020). Pengukuran Zat Warna *Monascus purpureus* Menggunakan LC- MS. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 20(1), 1–10.



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



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

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



Nomor : 074/ 700/ 102.20-A/ 2022
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Majapahit**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama / NIM : MAYA SRI ASHIRA / 1913206024
DIVA NURANZA / 1913206013
Fakultas : S1-FARMASI, STIKES KARYA PUTRA BANGSA TULUNGAGUNG

1 Perihal determinasi tanaman majapahit

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Scrophulariales
Suku : Bignoniaceae
Marga : *Crescentia*
Jenis : *Crescentia cujete* L.
Nama Umum : Majapahit, mojopahit, moja, 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, pundi 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 : Kulit buah.

4. Penggunaan : Penelitian.

5. Daftar Pustaka

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

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

Batu, 31 Oktober 2022



Lampiran. 2 Dokumentasi Penelitian

1. Kulit Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)



Tanaman Majapahit



Kulit Buah Majapahit

2. Pembuatan Infusa



Pemotongan Kulit Buah Majapahit



Pencucian Kulit Buah Majapahit



Perebusan Kulit Buah Majapahit



Pemerasan Kulit Buah Majapahit



Proses Pemekatan Menggunakan Eyaporator

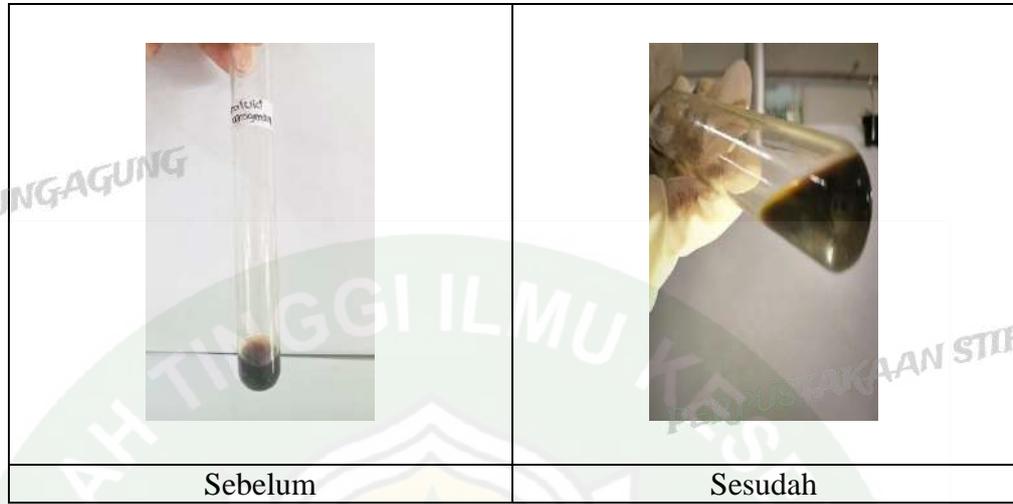


Ekstrak Kental

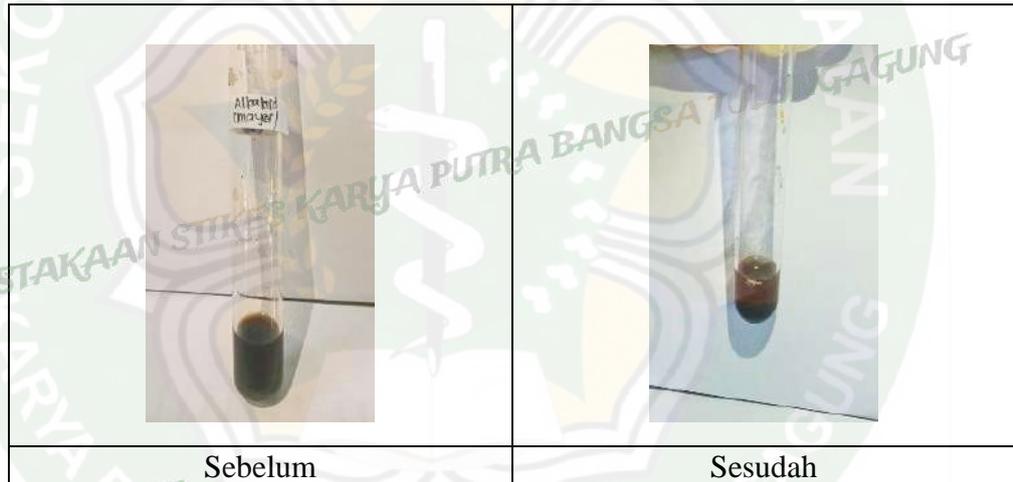
3. Skrinning Fitokimia

a. Uji alkaloid

Dragendorff



Mayer



b. Uji flavonoid



c. Uji saponin



d. Uji tanin



4. Uji Toksisitas

a. Pembuatan seri konsentrasi



b. Penetasan dan pengujian toksisitas



Lampiran. 3 Orientasi Untuk Mendapatkan Seri Konsentrasi Ekstrak Kulit Buah Majapahit (*Crescentia cujete*) yang akan digunakan dalam Pengujian

1. Pembuatan larutan induk 1000ppm

Larutan induk dibuat dengan menimbang 100 mg ekstrak kulit buah majapahit yang telah dilarutkan DMSO dan di ad kan 100 ml air laut buatan. Diperoleh dengan :

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

$$1000\text{ppm} = 100 \text{ mg/ml, dalam 100 ml sudah diencerkan dengan DMSO}$$

2. Pembuatan seri konsentari 1000ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700ppm, dan 600ppm

a. 1000 ppm

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V1 = 1000 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 10 \text{ ml}$$

b. 900 ppm

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V1 = 900 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 9 \text{ ml}$$

c. 800 ppm

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V1 = 800 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 8 \text{ ml}$$

d. 700 ppm

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V1 = 700 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 7 \text{ ml}$$

e. 600 ppm

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V1 = 600 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 6 \text{ ml}$$

3. Jumlah larva yang mati tiap 10 ekor

Replikasi	Kontrol (-)	Perlakuan (ppm)				
		1000	900	800	700	600
1	0	8	10	8	7	5
2	0	10	9	7	6	5
3	0	10	9	7	7	5
Total Kematian	0	28	28	22	20	15
Rata-rata	0	9,3	9,3	7,3	6,6	50

4. Perhitungan persen kematian

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

a. Konsentrasi 1000ppm = $\frac{9,3-0}{10} \times 100\% = 93\%$

b. Konsentrasi 900ppm = $\frac{9,3-0}{10} \times 100\% = 93\%$

c. Konsentrasi 800 ppm = $\frac{7,3-0}{10} \times 100\% = 73\%$

d. Konsentrasi 700ppm = $\frac{6,6-0}{10} \times 100\% = 66\%$

e. Konsentrasi 600ppm = $\frac{5-0}{10} \times 100\% = 50\%$

5. Penentuan dan perhitungan seri konsentrasi

a. Seri konsentrasi ditentukan dengan kelipatan 100 ppm, hal ini dimaksudkan untuk mendapatkan nilai % kematian yang jelas dan stabil.

b. Pembuatan larutan induk 1000 ppm

Larutan induk dibuat dengan menimbang 100 mg ekstrak infusa kulit buah majapahit (*Crescentia cujete*) yang kemudian dilarutkan dengan DMSO dan di ad kan 100 ml air laut buatan.

c. Perhitungan seri konsentrasi 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, dan 100 ppm

- Konsentrasi 500 ppm

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$1000 \text{ ppm} \cdot V1 = 500 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 5 \text{ ml}$$

- Konsentrasi 400 ppm

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

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

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

- Konsentrasi 300 ppm

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

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

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

- Konsentrasi 200 ppm

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

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

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

- Konsentrasi 100 ppm

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

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

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

d. Jumlah larva yang mati tiap ekor dan perhitungan persen kematian

Replikasi	Kontrol (-)	Perlakuan (ppm)					
		100	200	300	400	500	600
1	0	1	1	3	4	5	5
2	0	0	1	2	3	4	5
3	0	1	2	1	1	1	5
Total Kematian	0	2	4	6	8	10	15
Rata-rata	0	0,7	1,3	2	2,6	3,3	5
% Kematian	100%	7%	13%	20%	26%	33%	50%

Perhitungan persen kematian

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

Lampiran. 4 Perhitungan Nilai LC₅₀ Dengan Menggunakan Analisis Probit Terhadap Ekstrak Kulit Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)

a. Harga probit sesuai prosentase

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,24	3,36	3,45	3,52	3,59	3,65
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	4,29	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

b. Data yang diperoleh

Konsentrasi (ppm)	Log 10	Probit	% dead	Mortality	Total hewan uji
100ppm	2,00	3,52	7%	2	30
200ppm	2,30	3,87	13%	4	30
300ppm	2,48	4,16	20%	6	30
400ppm	2,60	4,36	26%	8	30
500ppm	2,70	4,56	33%	10	30
600ppm	2,77	5,00	50%	15	30

c. Coeffisients

Intercept	-0,0913	(b)
Log (ppm)	1,752	(a)

d. Perhitungan persamaan

$$y = ax + b$$

$$y = 1,752x + (-0,0913)$$

$$5 = 1,752x - 0,0913$$

$$x = (5 + 0,0913) : 1,752$$

$$x = 2,9059$$

e. Perhitungan LC₅₀

$$LC_{50} = \text{antilog } x \quad 805,19 \text{ (ppm)}$$

Lampiran. 5 Jadwal Penelitian

Jadwal Penelitian	Tahun 2022 Bulan Ke-			Tahun 2023 Bulan Ke-							Tempat	
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7		
1. Pengajuan Judul	√											Kampus STIKes KARTRASA
2. Studi Pustaka		√										Kampus STIKes KARTRASA
3. Persiapan Penelitian			√									Kampus STIKes KARTRASA
a. Determinasi Tanaman			√									UPT Materia Medica
b. Pembuatan Ekstrak (Infundasi)				√								Kampus STIKes KARTRASA
c. Pembuatan Ekstrak Kental				√								Laboratorium UB
4. Penelitian Laboratorium				√								STIKes KPB
a. Skrinning Fitokimia				√								Laboratorium Botani KPB
b. Pengujian Kadar Senyawa Menggunakan LCMS				√								Laboratorium UMM
c. Uji Aktifitas Antikanker					√							Laboratorium Mikrobiologi KPB
5. Pengumpulan dan Analisis Data						√	√					Kampus STIKes KARTRASA
a. Penyusunan Laporan							√	√				Kampus STIKes KARTRASA
b. Pengumpulan Laporan Akhir									√	√		Kampus STIKes KARTRASA

Lampiran 6. Alur Prosedur Kerja

1. Pembuatan ekstrak infusa kulit buah majapahit

Kulit Buah Majapahit

- Diambil bagian kulit buah majapahit
 - Dilakukan sortasi basah kulit buah majapahit
 - Dilakukan penimbangan menggunakan timbangan analitik
 - Dilakukan pencucian menggunakan air mengalir
 - Dilakukan pemotongan dengan ukuran yang sama
 - Ditimbang dengan neraca analitik sebanyak 1500 gram
 - Ditambahkan aquadest 3000 ml ke dalam panci infundasi
 - Direbus menggunakan suhu 90C selama 15 menit
 - Dilakukan penyaringan menggunakan kain
 - Dilakukan pemekatan menggunakan evaporator → diperoleh ekstrak kental
 - Dilakukan perhitungan persen rendemen
- $$\text{Rendemen ekstrak \%} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

Ekstrak kental kulit buah majapahit

2. Pengujian skrinning fitokimia

a. Uji Alkaloid

Ekstrak Kental

- Ditimbang 200mg → larutkan dengan DMSO
- Diambil 2 ml larutan → dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 2 ml kloroform dan 2 ml ammonia → disaring
- Ditambahkan 3-5 tetes H₂SO₄ pada filtrat
- Ditambahkan pereaksi Mayer dan Dragendroff sebanyak 4-5 tetes
- Diamati perubahan warnanya bila terbentuk endapan berwarna putih pada pereaksi Mayer, dan endapan berwarna kuning kemerahan pada pereaksi Dragendroff maka ekstrak mengandung senyawa alkaloid

Hasil

b. Uji Flavonoid

Ekstrak Kental

- Ditimbang 200 mg → larutkan dengan DMSO
- Ditambahkan 2 ml larutan → dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 5 ml etanol dan $FeCl_3$
- Diamati perubahan warnanya → bila terdapat warna kemerahan maka ekstrak mengandung senyawa flavonoid

Hasil

c. Uji Saponin

Ekstrak Kental

- Ditimbang 200 mg → larutkan dengan DMSO
- Ditimbang 1 ml larutan → dimasukkan dalam tabung reaksi
- Ditambahkan aquadest dan HCl 1 ml → kocok ad berbuisa
- Diamati lama busa yang ada → bila busa bisa bertahan cukup lama atau stabil maka ekstrak mengandung senyawa saponin

Hasil

d. Uji Tanin

Ekstrak Kental

- Ditimbang 200mg → larutkan dengan DMSO
- Ditambahkan $FeCl_2$ 2-3 tetes
- Diamati perubahan warnanya → bila terdapat warna hitam kehijauan maka ekstrak mengandung senyawa tanin

Hasil

3. Uji toksisitas menggunakan metode BSLT

a. Pembuatan air laut buatan

Air laut buatan

- Ditimbang garam ikan sebanyak 35 gram
- Dilarutkan dengan air sebanyak 1 liter aduk ad homogen air laut siap

Hasil

b. Penetasan larva *Artemia salina* Leach

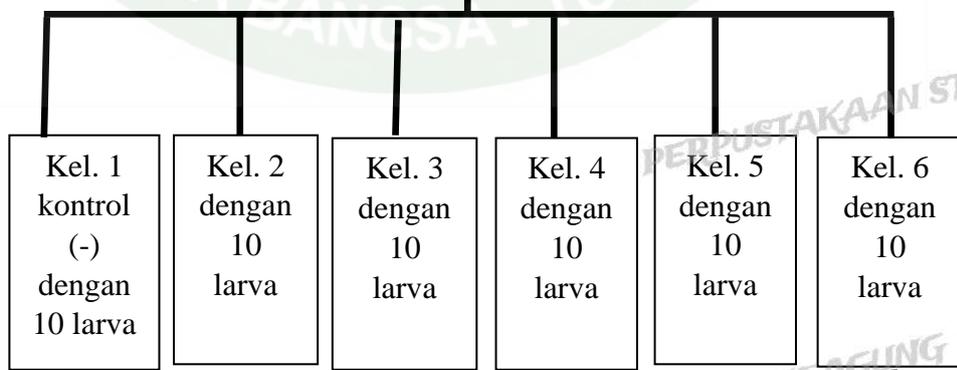
Wadah Penetasan

- Disiapkan 1 wadah untuk penetasan
- Diberikan 1 liter air laut buatan
- Dimasukkan telur artemia pada sisi terang
- Proses penetasan larva dilakukan di bawah penerangan sinar lapu ruangan dan diaerasi
- Larva menetas pada usia 24 jam, dan larva diuji berusia 48 jam

Hasil

c. Pembagian kelompok pengujian ketoksikan ekstrak kulit buah majapahit

Larva udang



3 kali pengulangan

Keterangan :

- Kelompok kontrol negatif → diberikan larutan DMSO
- Kelompok 1 → diberikan larutan ekstrak kulit buah majapahit 100ppm
- Kelompok 2 → diberikan larutan ekstrak kulit buah majapahit 200ppm
- Kelompok 3 → diberikan larutan ekstrak kulit buah majapahit 300ppm
- Kelompok 4 → diberikan larutan ekstrak kulit buah majapahit 400ppm
- Kelompok 5 → diberikan larutan ekstrak kulit buah majapahit 500ppm
- Kelompok 6 → diberikan larutan ekstrak kulit buah majapahit 600ppm

