

**UJI AKTIVITAS DAUN BIDARA ARAB (*Ziziphus spina-christ* L.)  
SEBAGAI ANTIKANKER PADA SEL KANKER KOLON (WiDr)  
MELALUI METODE MTT DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF  
DENGAN METODE LC-MS**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**RADEN AJENG ZALIHANA PUTRI**  
NIM. 13630121



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2017**

**UJI AKTIVITAS DAUN BIDARA ARAB (*Ziziphus spina-christ* L.)  
SEBAGAI ANTIKANKER PADA SEL KANKER KOLON (WiDr)  
MELALUI METODE MTT DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF  
DENGAN METODE LC-MS**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**RADEN AJENG ZALIHANA PUTRI**  
NIM. 13630121

Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2017**

**UJI AKTIVITAS DAUN BIDARA ARAB (*Ziziphus spina-christ* L.)  
SEBAGAI ANTIKANKER PADA SEL KANKER KOLON (WiDr)  
MELALUI METODE MTT DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF  
DENGAN METODE LC-MS**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**RADEN AJENG ZALIHANA PUTRI**  
NIM. 13630121

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 11 Desember 2017

**Pembimbing I**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

**Pembimbing II**



**Ahmad Hanapi, M.Sc**  
NIDT. 19830125 20160801 2 068

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

**UJI AKTIVITAS DAUN BIDARA ARAB (*Ziziphus spina-christ* L.)  
SEBAGAI ANTIKANKER PADA SEL KANKER KOLON (WiDr)  
MELALUI METODE MTT DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF  
DENGAN METODE LC-MS**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**RADEN AJENG ZALIHANA PUTRI**  
NIM. 13630121

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 11 Desember 2017

**Penguji Utama** : Rachmawati Ningsih, M.Si  
NIP. 19810811 200801 2 010

**Ketua Penguji** : Dr. Roihatul Muti'ah, S.F., M.Kes., Apt  
NIP. 19800203 200912 2 003

**Sekretaris Penguji** : Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

**Anggota Penguji** : Ahmad Hanapi, M.Sc  
NIDT. 19851225 20160801 1 069

(.....)  
(.....)  
(.....)  
(.....)



Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Kimia

**Elok Kamilah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

## SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Raden Ajeng Zalihana Putri

NIM : 13630121

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.)  
Sebagai Antikanker pada Sel Kanker Kolon (WiDr) Melalui Metode MTT dan  
Identifikasi Senyawa Aktif dengan Metode LC-MS

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 11 Desember 2017

Yang membuat pernyataan,



R.A Zalihana Putri

NIM. 13630121

MOTTO

مَنْ جَدَّ وَ جَدَّ

**“Siapa yang bersungguh-sungguh pasti akan berhasil”**

مَنْ صَبَرَ ظَفِرَ

**“Siapa yang bersabar akan beruntung”**

Hai orang-orang yang beriman, jadikanlah sabar dan shalat sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar.

(QS.Al-Baqarah:153)

Great things never came from comfort zones.

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah kupakanatkan kepada Allah SWT atas karunia serta kemudahan yang telah Engkau berikan sehingga akhirnya skripsi ini dapat terselesaikan. Sholawat serta salam juga selalu terlimpahkan keharibaan Rasulullah Muhammad SAW.

Dengan ini, penulis persembahkan karya skripsi ini untuk :

Ayahanda (Alm) R.B. Moh.Hasan, M.Si yang kasih sayangnya selalu terlimpahkan semasa hidupnya dan selalu memberikan rasa rindu yang berarti.

Untuk Ibunda Mutmaina atas limpahan doa dan kasih sayang tak terhingga dan selalu memberikan yang terbaik.

Untuk kakak tercinta R.A Mira Hawaniar , adik tercinta R.A Yuniar Maimuna serta seluruh keluarga besar penulis yang telah memberikan doa dan dukungannya selama ini.

Untuk Mas Muhammad Rizqi Lazuardi Ramadhan yang selama ini telah memberikan dukungan bimbingan serta menemani penulis dalam menyusun skripsi ini

Tidak lupa untuk seluruh teman-teman seperjuangan Antikanker Squad, Chemistry C'13, serta seluruh guru dan dosen yang telah memberikan doa, dukungan, ilmu dan bimbingannya selama ini kepada penulis . Serta semua pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu.

Semoga Allah SWT membalas jasa budi kalian dikemudian hari dan memberikan kemudahan dalam segala hal, aamiin...

## KATA PENGANTAR

*Assalamua'alaikum Wr. Wb.*

*Alhamdulillah* *rabbil'alam*, segala puji bagi Allah SWT pencipta seluruh alam semesta yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi berjudul “Uji Aktivitas Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christ* L.) Sebagai Antikanker pada Sel Kanker Kolon (WiDr) Melalui Metode MTT dan Identifikasi Senyawa Aktif dengan Metode LC-MS” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) dengan semaksimal mungkin. Penulis menyadari bahwa dalam laporan hasil penelitian ini masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, akan tetapi semoga segala usaha yang dilakukan dapat bermanfaat bagi semua, sebagai ilmu yang bermanfaat dan barokah.

Penulis menyadari bahwa selama berlangsungnya penyusunan laporan hasil penelitian ini tak lepas dari dukungan serta bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu iringan do'a dan ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada:

1. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku dosen pembimbing utama.
2. Ibu Dr. Roihatul Mutiah, S.F., M.Kes., Apt selaku dosen konsultan.
3. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc, selaku dosen pembimbing agama.
4. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku penguji utama.

Yang telah meberikan banyak dukungan, nasihat, dan motivasi sehingga dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini dengan sempurna.

Penulis juga menyampaikan ucapan terimakasih kepada pihak-pihak yang selalu mendukung baik secara moril dan material hingga terselesaikannya skripsi, yaitu kepada:

1. Kedua orang tua, Bapak saya R.B Moh.Hasan, M.Si (Alm) dan Ibu saya Mutmaina serta saudara tercinta dan keluarga besar saya yang telah memberikan nasihat, do'a, dan dukungan moril maupun material untuk penulis dalam menuntut ilmu, sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Bapak Prof. Dr. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Segenap dosen Jurusan Kimia atas segala ilmu dan bimbingannya.
6. Seluruh staf administrasi dan laboran atas bantuan dan layanan dalam melaksanakan penelitian ini.
7. Teman-teman angkatan 2013 yang telah saling memotivasi dan membantu terselesainya skripsi ini.
8. Seluruh pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Penyusun sangat menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih terdapat banyak kesalahan serta kekurangan. Sebagai manusia yang tak lepas dari kekhilafan maka penulis meminta maaf yang sebesar-besarnya apabila dalam

penyusunan ini masih banyak terdapat kesalahan. Untuk itu dengan segala kerendahan hati penyusun mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan dan peningkatan kualitas serta profesionalitas dalam dunia pendidikan. Terlepas dari segala kekurangan, semoga laporan penelitian ini dapat memberikan informasi dan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua. Aamiin.

*Wa'alaikumus salam Wr. Wb.*

Malang, Desember 2017

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>MOTTO .....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.5 Batasan Masalah.....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tanaman Dalam Perspektif Islam .....	8
2.2 Tanaman Bidara Arab .....	9
2.2.1 Morfologi .....	9
2.2.2 Klasifikasi.....	10
2.2.3 Manfaat Tanaman Bidara Arab .....	10
2.2.4 Senyawa Aktif yang Terkandung dalam Tanaman Bidara Arab...	11
2.3 Metode Pemisahan Senyawa Aktif Daun Bidara Arab .....	12
2.4 Uji Fitokimia .....	14
2.4.1 Alkaloid .....	14
2.4.2 Flavonoid.....	16
2.4.3 Tanin.....	16
2.4.4 Saponin.....	17
2.4.5 Triterpenoid .....	18
2.4.6 Steroid .....	19
2.4.7 Kuinon .....	20

2.5 Metode Uji Sitotoksik .....	21
2.6 Kanker .....	23
2.6.1 Kanker Kolon .....	24
2.6.2 Sel WiDr.....	25
2.6.3 Sel Vero.....	26
2.7 LC-MS/ <i>liquid Chromatography-Mass Spectrometer</i> .....	27

### BAB III METODOLOGI

3.1 Pelaksanaan Penelitian .....	30
3.2 Alat dan Bahan .....	30
3.2.1 Alat .....	30
3.2.2 Bahan.....	30
3.3 Metode Analisis .....	31
3.4 Tahapan Penelitian .....	31
3.5 Pelaksanaan Penelitian .....	32
3.5.1 Determinasi Tanaman .....	32
3.5.2 Persiapan Sampel .....	32
3.5.3 Analisis Kadar Air.....	32
3.5.4 Ekstraksi Senyawa Aktif .....	33
3.5.5 Identifikasi Golongan Senyawa dengan Uji Fitokimia .....	35
3.5.6 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT .....	36
3.5.7 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan LC-MS .....	39
3.6 Analisis Data .....	40

### BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Determinasi Tanaman .....	42
4.2 Preparasi Sampel .....	42
4.3 Analisis Kadar Air .....	43
4.4 Ekstraksi Senyawa Aktif .....	43
4.4.1 Ekstraksi Maserasi .....	43
4.4.2 Ekstraksi Cair-Cair.....	44
4.5 Uji Fitokimia Senyawa dengan Reagen .....	45
4.5.1 Alkaloid .....	46
4.5.2 Flavonoid.....	47
4.5.3 Triterpenoid/Steroid .....	48
4.6 Uji Antikanker dengan Metode MTT.....	49
4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan LC-MS .....	60

**BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan..... 65  
5.2 Saran ..... 65

**DAFTAR PUSTAKA**..... 66

**LAMPIRAN** ..... 73



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman bidara arab .....	10
Gambar 2.2 Struktur senyawa alkaloid .....	15
Gambar 2.3 Kerangka dasar flavonoid .....	16
Gambar 2.4 Struktur dasar tanin .....	17
Gambar 2.5 Struktur dasar saponin steroid dan triterpenoid .....	18
Gambar 2.6 Contoh struktur triterpenoid .....	19
Gambar 2.7 Struktur inti senyawa steroid .....	19
Gambar 2.8 Reaksi reduksi MTT .....	22
Gambar 2.9 Kromatogram ekstrak metanol buah bidara arab .....	29
Gambar 4.1 Dugaan Reaksi Senyawa Alkaloid dengan Reagen Mayer .....	47
Gambar 4.2 Dugaan reaksi senyawa alkaloid dengan reagen dragendorf ...	47
Gambar 4.3 Dugaan Reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat .	48
Gambar 4.4 Morfologi Sel WiDr .....	52
Gambar 4.5 Morfologi Sel Vero .....	53
Gambar 4.6 Proses respirasi sel secara umum .....	54
Gambar 4.7 Proses transport elektron .....	54
Gambar 4.8 Reaksi MTT .....	55
Gambar 4.9 Struktur natrium dodesil sulfat .....	56
Gambar 4.10 Kromatogram UPLC hasil pemisahan .....	61
Gambar 4.11 Spektra massa dari dugaan senyawa kuersetin I .....	62
Gambar 4.12 Fragmentasi dugaan senyawa kuersetin I.....	63
Gambar 4.13 Spektra massa dari dugaan senyawa kuersetin II .....	63
Gambar 4.14 Fragmentasi dugaan senyawa kuersetin II.....	64

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia pada Daun Bidara Arab.....	45
Tabel 4.2 Nilai IC <sub>50</sub> Daun Bidara Arab terhadap Sel WiDr dan Sel Vero ...	57
Tabel 4.3 SI ( <i>Selectivity Index</i> ) Daun Bidara Arab terhadap Sel WiDr.....	57



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1</b> Tahapan Penelitian.....	73
<b>Lampiran 2</b> Skema kerja.....	74
L.2.1 Preparasi Sampel .....	74
L.2.2 Analisis Kadar Air .....	74
L.2.3 Ekstraksi Komponen Aktif .....	75
L.2.4 Uji Fitokimia .....	75
L.2.3.1 Uji Flavonoid.....	75
L.2.3.2 Uji Alkaloid .....	76
L.2.3.3 Uji Tanin .....	76
L.2.3.4 Uji Saponin.....	76
L.2.3.5 Uji Steroid/Triterpenoid .....	76
L.2.3.6 Uji Kuinon .....	77
L.2.5 Uji Aktivitas Antikanker Metode MTT .....	77
L.2.5.1 Penyiapan Sel .....	77
L.2.5.2 Penghitungan Sel Kanker .....	78
L.2.5.3 Peletakan Sel pada <i>Plate</i> .....	79
L.2.5.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada <i>Plate</i> .....	79
L.2.5.5 Pemberian Larutan MTT .....	80
L.2.6 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan LC-MS....	80
<b>Lampiran 3</b> Pembuatan Larutan dan Reagen.....	81
L.3.1 Pembuatan Reagen Dragendorff.....	81
L.3.2 Pembuatan Reagen Mayer .....	81
L.3.3 Pembuatan Larutan Metanol 50 %.....	81
L.3.4 Pembuatan Pembuatan Reagen FeCl 1 % .....	82
L.3.5 Pembuatan Larutan HCl 1 M (b/b) .....	82
L.3.6 Pembuatan Larutan HCl 2 % .....	83
L.3.7 Pembuatan Larutan NaOH 1 M .....	83
L.3.8 Pembuatan Larutan SDS 10%.....	84
L.3.9 Pembuatan Larutan Stok 1000 ppm Ekstrak Sampel.....	84
L.3.10 Pembuatan Larutan Stok MTT (5 mg/mL) .....	84
L.3.11 Pembuatan Larutan Stok 250 ppm Ekstrak Sampel.....	85
<b>Lampiran 4</b> Data dan Perhitungan Hasil Penelitian .....	86
L.4.1 Analisis Kadar Air .....	86
L.4.2 Perhitungan Rendemen .....	87
L.4.3 Perhitungan Data dan Hasil Uji Aktivitas Antikanker Secara <i>In Vitro</i> .....	88
<b>Lampiran 5</b> Dokumentasi .....	101
<b>Lampiran 6</b> Hasil Determinasi Tanaman .....	104
<b>Lampiran 7</b> Kode Etik .....	105

## ABSTRAK

Putri,R.A.Z. 2017. **Uji Aktivitas Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) Sebagai Antikanker pada Sel Kanker Kolon Melalui Metode MTT dan Identifikasi Senyawa Aktif dengan Metode LC-MS.**Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Hanapi, M.Sc; Konsultan: Dr. Roihatul Muti'ah, S.F.,M.Kes.,Apt

**Kata Kunci :** Antikanker, Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christ* L.), MTT, Sel WiDr, Sel Vero, LC-MS

---

Kanker kolon adalah salah satu kanker dengan angka kematian tertinggi di dunia dan menempati urutan kejadian kanker ketiga di seluruh dunia, dengan lebih dari 1 juta angka kejadian tiap tahunnya. Salah satu jenis pengobatan yang saat ini banyak dikembangkan untuk penyembuhan kanker adalah dengan obat herbal seperti daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi*) sebagai anti kanker kolon jenis WiDr.

Daun bidara arab yang digunakan berasal dari daerah Sumenep, Madura. Ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96 %, yang kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut kloroform dan n-heksan. Selanjutnya dilakukan uji fitokimia pada ekstrak etanol maupun fraksi kloroform dan fraksi n-heksan. Dan dilakukan uji aktivitas anti kanker dengan metode MTT. Identifikasi senyawa aktif dengan metode kromatografi LC-MS.

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol mengandung alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid. Sedangkan fraksi kloroform mengandung alkaloid, flavonoid, steroid, dan triterpenoid. Fraksi n-heksan mengandung alkaloid, steroid, tanin, dan triterpenoid. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol, fraksi kloroform, dan fraksi n-heksan daun bidara arab terhadap sel kanker WiDr berturut-turut yaitu 83,459; 93,564; dan 131,933 ppm. Sedangkan pada sel normal Vero memiliki nilai  $IC_{50}$  berturut-turut adalah 218,143; 256,448; dan 275,647 ppm. Hasil uji ekstrak etanol daun bidara arab menggunakan kromatogram LC-MS diduga senyawa mengandung kuersetin.

## ABSTRACT

Putri, R.A.Z. 2017. **Activity Test of Leaves Lote Tree (*Ziziphus spina-christi* L.) as Anti Cancer to Colon Cancer Cells by MTT Method and Identification of Active Compounds Using LC-MS.** Essay. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor of Religion: Ahmad Hanapi, M.Sc; Consultant: Dr. Roihatul Muti'ah, S.F.,M.Kes.,Apt

**Key Word :** Anti cancer, Leaves Lote Tree (*Ziziphus spina-christ* L.), MTT, Cell WiDr, Cell Vero, LC-MS

---

Colon cancer is one of the world's highest cancer deaths and ranks third in cancer worldwide, with more than 1 million annual incidence rates. One type of treatment that is currently widely developed for the cure of cancer is with herbal remedies such as leaves lote tree (*Ziziphus spina-christi*). This study aims to determine the activity of lote tree leaf (*Ziziphus spina-christi*) as anti-cancer colon type WiDr.

Leaves lote tree which is used comes from Sumenep region, Madura. The extraction used in this study used a maceration method with 96% ethanol solvent, which was then fractionated using chloroform and n-hexane solvents. Phytochemical tests on ethanol extract and chloroform fraction and n-hexane fraction were then performed. And tested anticancer activity with MTT method. Identification of active compounds by LC-MS chromatography method.

Based on the results of phytochemical tests that have been done, it can be seen that ethanol extract contains alkaloids, flavonoids, and triterpenoids. While the chloroform fraction contains alkaloids, flavonoids, steroids, and triterpenoids. The n-hexane fraction contains alkaloids, steroids, tannins, and triterpenoids. The value of IC50 ethanol extract, chloroform fraction, and n-hexane fraction of aromatic bidara arabs of WiDr cancer cells were 83,459; 93,564; and 131,933 ppm. While in normal cell Vero has the value of IC50 is 218,143; 256,448; and 275,647 ppm. The result of ethanol extract test of leaves lote tree using LC-MS chromatogram was suspected compound containing quercetin.

## ملخص البحث

فوترى، ر أ.ز. 2017. اختبار النشاط الأوراق بدارا عرب (*Ziziphus spina-christ* L.) كما المضادة للسرطان في الخلايا السرطانية القولون بطريقة ثقافة صغرى تيكراز و ليوم الملح وتحديد المركب النشط بطريقة فصل كروماتوغرافيا السائل-مطيا ف الكتلى. البحث الجامعى. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا الجامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرفة الأولى: إلوك كاملة حياة، الماجستير؛ المشرف الثانى: أحمد حنفي، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: المضادة للسرطان ، الأوراق بدارا عرب (*Ziziphus spina-christ* L.) ، ثقافة صغرى تيكراز و ليوم الملح ، خلايا WiDr ، خلايا Vero ، فصل كروماتوغرافيا السائل-مطيا ف الكتلى

سرطان القولون هو واحد من السرطان مع وفيات الأعلى في العالم، و تحتل المرتبة الثالثة من حوادث السرطان في جميع أنحاء العالم، مع حدوث أكثر من مليون الوفيات في سنة. واحد من العلاج الذي يتم تطويره على نطاق واسع حاليا لعلاج السرطان هو مع العلاجات العشبية مثل الأوراق بدارا عرب (*Ziziphus spina-christi*). يهدف هذا البحث إلى تحديد اختبار النشاط الأوراق بدارا عرب (*Ziziphus spina-christ* L.) كما المضادة للسرطان في الخلايا السرطانية القولون يعنى WiDr

الأوراق بدارا عرب المستخدمة هي من سومنب، مادورا. استخراج المستخدمة في هذا البحث هو باستخدام النقع مع 96% الإيثانول، ثم يقيم تجزئة باستخدام الكلوروفورم ون الهكسان. وأجريت اختبارات كيميائية نباتية على استخراج الإيثانول او جزء الكلوروفورم و ن- الهكسان. واجرى الاختبار النشاط المضادة للسرطان مع طريقة ثقافة صغرى تيكراز و ليوم الملح. تحديد المركب النشط بطريقة اللوني فصل كروماتوغرافيا السائل-مطيا ف الكتلى

وبناء على نتائج اختبار الكيميائي النباتي ، يمكن أن يعرف استخراج الإيثانول يحتوي على قلويدات، فلافونيدات و و تريترينويد. جزء الكلوروفورم يحتوي على قلويدات، الفلافونويدات، الستيرويد، و تريترينويد. الجزء ن الهكسان يحتوي على قلويدات، الستيرويد ، التانين، و تريترينويد. قيمة  $IC_{50}$  من استخراج الإيثانول، جزء الكلوروفورم ون وجزء ن-الهكسان الأوراق بدارا عرب على خلايا السرطانية WiDr على التوالي 83.459. 93.564 و 131,933 جزء في المليون. بينما في الخلية العادية Vero لديه قيمة  $IC_{50}$  على التوالي 218,143. 256,448. و 275,647 جزء في

المليون. نتيجة اختبار استخراج الإيثانول الأوراق بدارا عرب باستخدام اللوي فصل كر و ما تو غراف  
الساعل-مطيا ف الكتلى. المركب يحتوي على كويرسيتين



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Ada berbagai jenis tanaman yang tumbuh di bumi ini dengan memiliki beragam manfaat bagi manusia, salah satunya sebagai obat herbal. Semua yang diciptakan oleh Allah SWT di muka bumi ini memang tidak ada yang sia-sia. Hal sekecil apapun yang ada di bumi ini pasti memiliki manfaat bagi kelangsungan hidup makhluk lainnya. Apabila manusia berpikir dengan baik, maka manfaat-manfaat tersebut dapat ditemukan. Seperti yang telah Allah firmankan dalam QS. Ali ‘Imran (3) : 191

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ  
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya : (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia. Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka” (QS. Ali ‘Imran [3] : 191)

Kata *وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ* berarti dan mereka memikirkan tentang kejadian langit dan bumi. Maksud dari ayat ini menjelaskan bahwa orang-orang yang berakal selalu merenungkan penciptaan langit dan bumi, dan keunikan yang terkandung di dalamnya (Shihab, 2002). Dalam tafsir jalalain kata *بَاطِلًا* berarti dengan sia-sia dan *سُبْحَانَكَ* memiliki arti Maha Suci Allah. Hal ini menjelaskan bahwa semua yang telah Allah ciptakan tidak ada yang sia-sia, termasuk tanaman. Oleh karena itu manusia harus berpikir dengan akal dan pikiran

yang telah diberikan oleh Allah SWT untuk menemukan manfaat tanaman, salah satunya yaitu manfaat tanaman sebagai obat.

Semua penyakit yang diciptakan oleh Allah SWT telah diciptakan pula penyembuhnya, bahkan banyak hadist yang menjelaskan tentang hal ini, salah satunya hadist dari Jabir bin ‘Abdullah radhiallahu ‘anhu, bahwa Rasulullah Shallallahu‘alaihiwasallam bersabda :

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَءَ أَبَدًا بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

“Setiap penyakit ada obatnya, dan bila telah ditemukan dengan tepat obat suatu penyakit, niscaya akan sembuh dengan izin Allah Azza wa Jalla” (HR. Muslim).

Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat herbal adalah tanaman bidara arab yang memiliki nama ilmiah *Ziziphus spina-christi* L. Bidara arab telah umum digunakan pada *Traditonal Chinese Medicine* untuk mengobati berbagai penyakit seperti gangguan pencernaan, kelemahan, keluhan hati, obesitas, masalah kemih, diabetes, infeksi kulit, hilangnya nafsu makan, demam, faringitis, bronkitis, anemia, diare, insomnia, dan kanker (Brown 1995; Him-Che 1985;. Plastina dkk, 2012). Sejak dahulu tanaman ini telah digunakan untuk mengobati berbagai penyakit di Saudia Arabia seperti gangguan pencernaan, kelemahan, keluhan hati, obesitas, diabetes, infeksi kulit, demam, bronkitis, anemia, diare, dan insomnia (Basuny, 2013).

Tanaman bidara arab ini ditemukan banyak tumbuh di daerah Sumenep (Madura). Senyawa utama yang terkandung dalam tanaman bidara arab yaitu flavonoid, alkaloid, triterpenoid, saponin, lipid, dan protein. Daunnya diketahui mengandung betulnik, asam seanotik, berbagai senyawa flavonoid, saponin, tanin,

dan triterpenoid (Asgarpanah, 2012). Berdasarkan penelitian Kusriani (2015) diketahui bahwa ekstrak daun bidara arab dengan pelarut etanol mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan steroid/triterpenoid. Dari penelitian ini juga diketahui bahwa daun bidara arab memiliki aktivitas antioksidan paling baik dibandingkan dengan ekstrak buah, dan biji dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 127,87 ppm.

Jafarian (2014) menyatakan bahwa heksana, kloroform, kloroform-metanol, butanol, metanol-air dan ekstrak air dari daun bidara arab secara signifikan mengurangi kelangsungan hidup sel Hela dan MAD-MB-468. Dari hasil ini diketahui sifat sitotoksik ekstrak kloroform-metanol daun bidara arab lebih kuat daripada ekstrak lainnya. Sedangkan Farmani (2016) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun bidara arab memiliki efek sitotoksik untuk sel MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 0,02 mg/mL.

Seperti yang telah diketahui selama ini bahwa senyawa flavonoid memiliki aktivitas sebagai antikanker terhadap berbagai sel kanker. Flavon apigenin, baicalein, luteolin, nobiletin, dan tangeretin telah terbukti menjadi flavonoid yang paling efektif terhadap karsinoma perut, sedangkan luteolin bahkan telah diusulkan untuk menjadi obat kanker pada lambung. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam tanaman bidara arab ini diharapkan juga memiliki aktivitas antikanker, terutama pada kanker kolon (Chahar, 2011).

Kanker sampai saat ini tercatat sebagai salah satu masalah kesehatan utama, baik di negara maju maupun negara berkembang. Angka kematian disebabkan oleh kanker termasuk tinggi. Di seluruh dunia sekitar 14,1 juta kasus baru dan 8,2 juta kematian akibat kanker (Torre dkk., 2015). Data *Global action against cancer* (2005) dari WHO (*World Health Organization*) menyatakan

bahwa kematian akibat kanker dapat mencapai angka 45% dari tahun 2007 hingga 2030, yaitu sekitar 7,9 juta jiwa menjadi 11,5 juta jiwa kematian. Kanker merupakan salah satu masalah utama kesehatan di masyarakat dengan angka kejadian 4,3 per 1000 penduduk dan menjadi penyebab kematian kelima setelah stroke, tuberculosis, diabetes mellitus dan trauma kepala di Indonesia (Depkes RI., 2009).

Kanker kolon atau dikenal dengan kanker usus besar adalah penyakit keganasan yang terjadi pada kolon, rektum, dan appendix (usus buntu). Kanker kolorektal menempati urutan kejadian kanker ketiga di seluruh dunia, dengan lebih dari 1 juta angka kejadian tiap tahunnya. Kanker kolorektal adalah salah satu kanker dengan angka kematian tertinggi di dunia (Ferlay dkk., 2013; Siegel dkk., 2014). Kanker kolorektal adalah jenis keganasan di bagian gastroenterohepatologi yang menempati urutan kedua sesudah kanker hepatoseluler di Indonesia (Kurniawati dan Tenggara, 2011).

Dari berbagai penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa daun bidara arab yang diekstrak dengan pelarut yang berbeda akan menghasilkan sifat sitotoksik yang berbeda terhadap beberapa jenis sel kanker. Hal ini membuktikan bahwa dengan perbedaan sifat pelarut akan melarutkan senyawa yang berbeda juga. Sesuai dengan prinsip *like dissolve like*. Oleh karena itu, peneliti akan mencoba mengekstrak daun bidara arab dengan pelarut etanol dan hasil ekstrak aktifnya akan difraksinasi menggunakan kloroform, dan n-heksan. Dari hasil ini diharapkan dapat mengetahui pelarut yang tepat untuk membuat ekstrak daun bidara arab sebagai antikanker sel WiDr.

Berbagai macam metode telah digunakan untuk mencari dan menemukan senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan untuk suatu penyakit.

Salah satu metode yang dapat dipergunakan untuk mencari dan menemukan senyawa bioaktif adalah pendekatan fitofarmakologi (*Phytopharmacologic approaches*) dan pendekatan skrining fitokimia (*Phytopharmacologic screening approaches*) (Linskens, 1963 dalam Abraham 2007:13). Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti (Kristianti dkk., 2008). Sedangkan Untuk memperoleh senyawa aktif tersebut dapat dilakukan dengan mengisolasi senyawa aktif itu. Senyawa murni hasil isolasi dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi obat-obatan modern. Terdapat beberapa peralatan atau instrument laboratorium yang dapat digunakan untuk melakukan analisa kualitatif dan kuantitatif maupun untuk isolasi senyawa aktif dalam tanaman obat, salah satunya adalah LC-MS (*Liquid Chromatography–Mass Spectroscopy*). Instrumen ini berfungsi untuk memisahkan

beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya, setelah campuran senyawa tersebut terpisah maka senyawa murni yang dihasilkan akan diidentifikasi berdasarkan berat molekulnya. Pada *output* data yang dihasilkan jarang sekali terjadi pola fragmentasi dikarenakan tidak ada proses fragmentasi. Sehingga yang didapatkan adalah berat molekul ditambah beberapa muatan, terkadang ditambah lagi dengan berat molekul pelarut.

Oleh karena itu, peneliti akan melakukan pengujian aktivitas antikanker secara *in-vitro* terhadap sel kanker kolon WiDr dengan metode *Microtetrazolium* (MTT). Metode MTT memiliki beberapa kelebihan diantaranya dapat digunakan untuk mengetahui aktifitas biologi secara langsung dari senyawa kompleks, terutama kemampuan suatu senyawa untuk menghambat pertumbuhan sel, selain itu metode MTT relatif lebih murah, mudah dilakukan, hanya membutuhkan peralatan

sederhana dan interpretasi hasilnya relatif mudah dan akurat (Kusumaningtyas, dkk., 2008).

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antikanker ekstrak daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) dengan variasi pelarut terhadap sel kanker kolon WiDr ?
2. Apakah senyawa di dalam ekstrak daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) yang bersifat antikanker pada sel kanker kolon WiDr menggunakan identifikasi dengan instrument LC-MS?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antikanker ekstrak daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) dengan variasi pelarut terhadap sel kanker kolon WiDr.
2. Untuk mengetahui senyawa pada ekstrak daun Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) yang bersifat sebagai antikanker untuk sel kanker kolon WiDr.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini dapat diketahui pengaruh Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) terhadap sel kanker WiDr (sel kanker kolon) yang nantinya dapat digunakan untuk pengobatan secara formal. Selain itu, penelitian yang dilakukan ini dapat membantu proses standarisasi.

## 1.5 Batasan Masalah

1. Tanaman bidara arab diperoleh dari Sumenep Madura.
2. Pelarut yang digunakan adalah etanol, klorofom dan n-heksan.

3. Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker kolon WiDr.
4. Metode antikanker dengan metode MTT.
5. Identifikasi golongan senyawa aktif dengan spektrofotometer LC-MS.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tanaman dalam Perspektif Islam

Tanaman merupakan salah satu makhluk hidup ciptaan Allah yang memiliki banyak sekali manfaat. Salah satu manfaat dari tumbuhan yaitu memiliki beberapa zat yang dapat dimanfaatkan oleh manusia di dalam menjaga kesehatannya secara promotif, preventif, kuratif dan rehabilitatif. Hal ini dikarenakan pada tanaman mengandung makronutrien dan mikronutrien. Dalam firman-Nya Allah menjelaskan dalam QS Al-an'am (99) :

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ

Artinya : “Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.”(QS Al-An'am: 99).

Kata *به* berarti dengan air itu dan *نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ* memiliki arti segala macam tumbuh-tumbuhan. Dalam tafsir jalalain air yang dimaksud dalam ayat ini adalah air hujan, Allah menumbuhkan segala macam tumbuhan di bumi ini dengan air hujan yang telah diturunkanNya. Tumbuhan mengalami proses pertumbuhan yang sangat rumit. Mulai dari berkecambah dengan melakukan penyerapan air dari dalam tanah lalu tumbuhan memulai perkembangannya. Biji yang tadinya tumbuh menjadi

kecambah kulitnya pun mulai robek karena perkembangannya. Selanjutnya tumbuhan mulai mengeluarkan akar dan menembus kedalam tanah untuk mencari makanan dan masih panjang lagi perjalanan tumbuhan menjalani proses pertumbuhannya.

Menurut Shihab (2002), lafaz خَضِرًا (tanaman yang hijau) berarti bagian pohon yang berwarna hijau, terutama pada daun. Daun itu ibarat pabrik yang mengolah komposisi zat gula, minyak, protein, berbagai zat karbohidrat dan zat tepung untuk didistribusikan ke bagian-bagian pohon yang lain, termasuk biji dan buah. Oleh karena itu bagian tumbuhan yang memiliki berbagai kandungan senyawa adalah daun. Seperti halnya dalam daun bidara arab yang memiliki berbagai senyawa yang bermanfaat sebagai antikanker.

## **2.2 Tanaman Bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.)**

### **2.2.1 Morfologi**

*Ziziphus spina-christi* L. merupakan pohon tropis yang berasal dari Sudan yang biasa disebut "Sidr", "Nebeq", "Nabg" di Arab Saudi. Tanaman ini banyak tumbuh di Afrika Timur, Asia Barat termasuk Mesir, Arab Saudi, dan Iran Selatan. Bidara arab ini merupakan pohon berduri yang tahan terhadap panas dan kekeringan. Memiliki akar tunggang yang sangat kuat, tinggi pohonnya bisa mencapai 20 m dengan diameter 60 cm. Tanaman ini sering disebutkan dalam Al-Qur'an maupun hadist, karena tanaman ini digunakan sebagai alat ruqyah dan untuk memandikan jenazah (Orwa, 2009).



**Gambar 2.1** Tanaman Bidara Arab (Allan, 2012)

### 2.2.2 Klasifikasi (Adzu, 2001) :

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Rosales
Famili	: Rhamnaceae
Genus	: Ziziphus
Spesies	: Christi
Nama binomial	: <i>Ziziphus spina-christi</i> L.

### 2.2.3 Manfaat Tanaman Bidara Arab

Secara umum, *Z. spina-christi* L. memiliki banyak kegunaan yang menguntungkan. Misalnya daun digunakan sebagai pakan untuk hewan dan ranting-ranting yang digunakan untuk pagar. Kayu yang digunakan untuk konstruksi dan furniture. Semua bagian tanaman (buah, daun, akar, kulit kayu) yang digunakan dalam obat tradisional. Untuk itu tanaman ini sering disebut tanaman serbaguna (Dafni dkk., 2005; Saied dkk., 2008; Shtayeh dkk., 1998). Ada banyak kegunaan tradisional untuk *Z.spina-christi* L., orang-orang Arab dan Badui telah menggunakan pasta dari akarnya untuk pengobatan gusi. Orang Badui menggunakan teh dari buahnya untuk meningkatkan produksi ASI dan untuk mengobati hati (Allan, 2012).

Di Sudan ranting digunakan secara eksternal untuk mengobati rematik dan sengatan kalajengking. Selain itu, di Uni Emirat Arab air rebusan dari daunnya digunakan untuk mengobati rambut rontok (Saied dkk., 2008). Ada banyak laporan tentang efek medis dari ekstraksi yang berbeda dari berbagai belahan dari *Z. spina-Christi*. Ekstrak metanol kulit batang mengurangi diare pada tikus (Adzu dkk., 2003) sedangkan ekstrak metanol daun melindungi terhadap hati *carcinogenicity* pada tikus (Abdel-Wahhab dkk., 2007). Ekstrak butanol daun bidara arab dapat mengontrol kadar glukosa pada tikus dengan aman (Abdel-Zaher dkk., 2005). Ekstrak kulit akar memiliki aktivitas *antinociceptive* (Adzu dkk., 2002), dan efek sentral depresan (Adzu, dkk., 2002) pada tikus. Serbuk dari bijinya menunjukkan aktivitas tinggi terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* (Nazif, 2002). Selanjutnya, Avizeh dkk. (2010) menemukan bahwa ekstrak alkohol dari buah *Z. spinachristi* menurunkan kadar glukosa darah pada anjing. Dalam pengobatan tradisional Iran daunnya digunakan sebagai obat sakit perut, emolien (pencegah kekeringan pada kulit), antiulcer (pengikat asam lambung), desinfektan, dan anti jamur (Ghannadi, dkk., 2013).

#### **2.2.4 Senyawa Aktif yang Terkandung dalam Tanaman Bidara Arab**

Studi mengungkapkan bahwa bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) memiliki beragam senyawa kimia aktif termasuk alkaloid seperti spinanin A, tanin, sterol seperti  $\beta$ -sitosterol, flavonoid seperti rutin, kuarsetin derivatif, triterpenoid, saponin, dan saponin seperti asam betulunik (Godini, dkk., 2009; Abalaka, dkk., 2010). Seperti yang dijelaskan dalam penelitian sebelumnya kandungan kimia yang berperan sebagai pengobatan dalam tanaman bidara antara lain alkaloid, fenol, flavonoid, kuercetin, rutin, dan terpenoid (Adzu, dkk., 2007).

Komposisi kimia tanaman ini telah diteliti secara luas dan telah diketahui komposisi kimianya. Konstituen utama dari minyak esensial adalah  $\alpha$ -terpineol (16,4%) dan linalool (11,5%). Hidrokarbon netral dalam bentuk n-pentacosane adalah (81%). Metil ester yang diisolasi dari daun termasuk metil palmitat, metil stearat dan metil miristat.  $\beta$ -sitosterol, asam oleanolik dan asam maslinik adalah aglikon utama dari glikosida terdapat dalam daun bidara. Kandungan gula dalam daun bidara adalah laktosa, glukosa, galaktosa, arabinosa, xilosa dan rhamnosa, dan juga berisi empat glikosida saponin. Kandungan flavonoid tertinggi ditemukan dalam daun (0,66%). Terdapat kandungan quercetin 3-O-rhamnoglucoside 7-O-rhamnoside yang merupakan senyawa flavonoid utama pada semua bagian tanaman. Komposisi kimia tanaman bidara terbukti sangat kompleks dan lengkap, selain alkaloid, terdapat zizyphine-F, jubanine-A dan amphibine-H, sebuah peptida baru alkaloid spinanine-A telah diisolasi dari kulit batang pohon bidara. Spinanine-A adalah salah satu dari 14 jenis cyclopeptide alkaloid jenis amphibine-B (Adzu, dkk., 2007).

### 2.3 Metode Pemisahan Senyawa Aktif Daun Bidara Arab

Ekstraksi atau penyarian merupakan proses penarikan zat aktif dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang telah dipilih sehingga zat yang diinginkan akan terlarut (Anief, 2010). Semua atau hampir semua pelarut diupayakan untuk mendapatkan senyawa yang khas (zat aktif) dalam suatu tumbuhan (Harborne, 1987). Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sumber bahan alami dan senyawa yang akan diisolasi. Cara penyarian dapat dibedakan menjadi infundasi, maserasi, perkolasi, dan penyarian berkesinambungan. Secara umum penyarian akan bertambah baik apabila semakin luas permukaan simplisia yang bersentuhan dengan pelarut (Sarker, dkk., 2008).

Struktur kimia zat aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, logam berat, udara, cahaya dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya zat aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan cairan penyari dan cara penyarian yang tepat (Ditjen POM, 1986). Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor, yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, tidak mempengaruhi zat berkhasiat dan diperbolehkan oleh peraturan. Untuk proses penyarian Farmakope Indonesia menetapkan bahwa sebagai cairan penyari adalah air, etanol, etanol-air. Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada skala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Untuk meningkatkan penyarian biasanya digunakan campuran antara etanol dan air (Ditjen POM, 1986).

Maserasi adalah proses penyarian simplisia dengan menggunakan pelarut melalui beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Cairan penyari akan menembus dinding sel simplisia dan akan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel, sehingga larutan yang pekat didesak ke luar. Peristiwa tersebut terjadi secara berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Ditjen POM, 1986).

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang bersifat lunak seperti daun dan bunga tetapi banyak juga yang menggunakan metode ini untuk menyari simplisia

yang keras seperti akar dan korteks karena cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diperoleh. Pada penyarian dengan cara maserasi perlu dilakukan pengadukan untuk menghomogenkan konsentrasi larutan di luar serbuk simplisia, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel (Ditjen POM, 1986).

## **2.4 Uji Fitokimia**

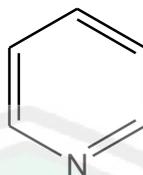
Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa kimia di dalam tumbuhan. Tumbuhan umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, saponin, triterpenoid, dan lain-lain. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan hama penyakit untuk tumbuhan itu sendiri atau lingkungannya (Lenny, 2008).

### **2.4.1 Alkaloid**

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung nitrogen yang sering kali terdapat dalam cincin eterosiklik, tetapi ada yang terdapat dalam struktur alifatiknya, bersifat basa (Lenny,2008).

Penggolongan alkaloid dilakukan berdasarkan sistem cincinnya, misalnya piridina, piperidina, indol, isokuinolina, dan tropana. Meskalina dan efedrina merupakan golongan alkaloid yang nitrogennya terdapat dalam struktur alifatik, Senyawa ini biasanya terdapat dalam tumbuhan sebagai garam berbagai senyawa

organik dan sering ditangani di laboratorium sebagai garam dengan asam hidroklorida dan asam sulfat (Robinson,1995).



**Gambar 2.2** Struktur senyawa alkaloid (Robinson,1995)

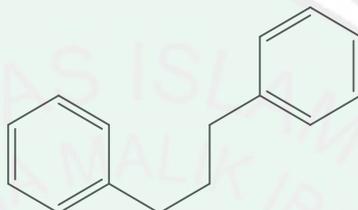
Cara untuk mengklasifikasi alkaloid adalah dengan klasifikasi yang didasarkan pada jenis tumbuhan dari mana alkaloid ditemukan. Alkaloid dapat dipisahkan dari sebagian besar komponen tumbuhan berdasarkan sifat dasarnya. Oleh karena itu, senyawa golongan ini cenderung sering diisolasi dengan HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> garam ini atau alkaloid bebasnya berbentuk padat membentuk kristal yang tidak berwarna. (Kristanti, dkk.,2008).

Pelarut atau pereaksi alkaloid biasanya menggunakan kloroform, aseton, amoniak, dan metilena klorida. Pereaksi Mayer (kalium tetraiodomerkurat) paling banyak untuk mendeteksi alkaloid karena pereaksi ini mengendapkan hampir semua alkaloid, pereaksi ini akan menghasilkan endapan kekuningan bila menunjukkan hasil positif pada sampel. Pereaksi lain yang sering digunakan seperti pereaksi Wagner (iodium dalam kalium iodida), asam silikotungstat 5%, asam tanat 5%, pereaksi Dragendorff (kalium tetraiodobismutat), iodoplatinat dan larutan asam pikrat jenuh (Robinson,1995).

#### **2.4.2 Flavonoid**

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C<sub>6</sub> (cincin benzene tersubstitusi)

disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Pengelompokan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan pada rantai C3, sesuai struktur kimianya yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanon, katekin, antosianidin, dan kalkon (Robinson, 1995).



**Gambar 2.3** Kerangka Dasar Flavonoid (Robinson, 1995)

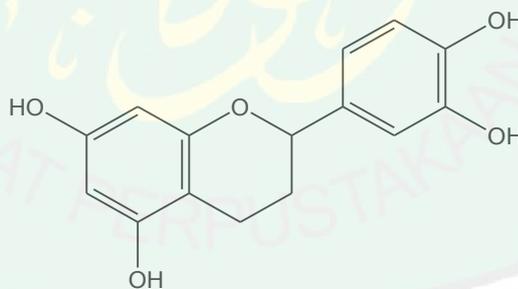
Beberapa kemungkinan lain fungsi flavonoid bagi tumbuhan adalah sebagai zat pengatur tubuh, pengatur proses fotosintesis, sebagai zat mikroba, antivirus, dan antiinsektisida. Beberapa flavonoid sengaja dihasilkan oleh jaringan tumbuhan sebagai respon terhadap infeksi atau luka yang kemudian berfungsi menghambat fungi yang menyerangnya. Pereaksi yang biasa digunakan untuk flavonoid adalah HCl pekat yang akan merubah warna sampel menjadi merah atau jingga jika sampel mengandung flavonoid. (Kristanti, dkk., 2008).

#### 2.4.3 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan flavonoid, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Secara kimia tanin dibagi menjadi dua golongan, yaitu tanin

terkondensasi atau katekol dan tanin terhidrolisis atau tanin galat (Harborne,1987). Tanin yang direaksikan dengan  $\text{FeCl}_3$  1% akan menghasilkan perubahan warna menjadi hijau kebiruan (Hayati, 2008).

Tanin terkondensasi merupakan oligomer atau polimer flavonoid (flavan-3-ol atau flavan-3,4-diol) di mana ikatan C-C tidak mudah untuk dihidrolisis, biasanya disebut juga dengan nama proantosianidin. Tanin terkondensasi terdapat dalam paku-pakuan, gimnospermae, dan angiospermae terutama pada jenis tumbuh-tumbuhan berkayu. Tanin terhidrolisis merupakan molekul dengan poliol (umumnya D-glukosa) sebagai pusatnya. Gugus  $-\text{OH}$  pada karbohidrat sebagian atau seluruhnya teresterefikasi dengan gugus karboksil pada asam galat atau asam elagat. Salah satu fungsi tanin dalam tumbuhan adalah sebagai penolak hewan pemakan tumbuhan (Harborne,1994). Beberapa tanin terbukti memiliki aktivitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti “reverse” transkriptase dan DNA topoisomerase (Robinson,1995).

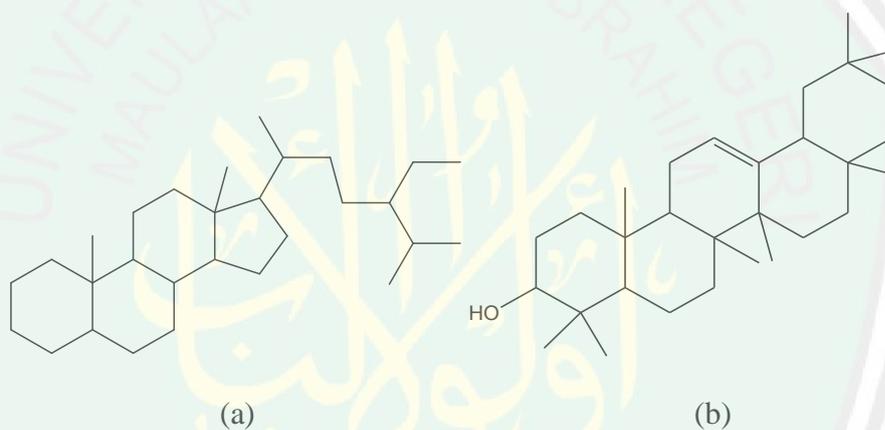


Gambar 2.4 Struktur dasar tanin (Harborne,1987)

#### 2.4.4 Saponin

Saponin berasal dari bahasa latin *sapo* yang berarti sabun, karena sifatnya menyerupai sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dengan air dan pada konsentrasi yang rendah

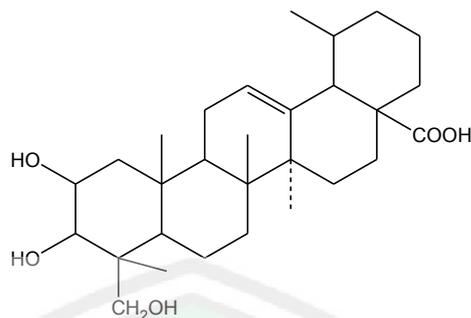
sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Saponin dalam larutan yang sangat encer dapat sebagai racun ikan, selain itu saponin juga berpotensi sebagai antimikroba, dapat digunakan sebagai bahan baku sintesis hormon steroid. Dua jenis saponin yang dikenal yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid. Aglikonya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam asam atau menggunakan enzim (Robinson, 1995). Sampel yang mengandung saponin akan menghasilkan busa yang bertahan selama 10 menit apabila direaksikan dengan asam klorida 1 M (Hayati, 2008).



**Gambar 2.5** (a) Struktur dasar saponin steroid, dan (b) Struktur dasar saponin triterpenoid (Robinson, 1995)

#### 2.4.5 Triterpenoid

Triterpenoid ini paling umum ditemukan di tumbuhan berbiji. Triterpenoid terdiri dari kerangka dengan 3 siklik 6 yang bergabung dengan siklik 5 atau berupa 4 siklik 6 yang mempunyai gugus pada siklik tertentu (Lenny, 2006). Uji yang banyak digunakan adalah reaksi Liebermann-Burchard (anhidrida asetat- $H_2SO_4$  pekat) yang dengan kebanyakan triterpena dan sterol memberikan warna hijau-biru (Harborne, 1987). Arifin, dkk. (2006) menyatakan bahwa ekstrak daun jamblang (*Eugenia Cumini* Merr.) mengandung senyawa triterpenoid yang disemprot dengan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) pekat 10% didapatkan noda yang berwarna merah ungu.

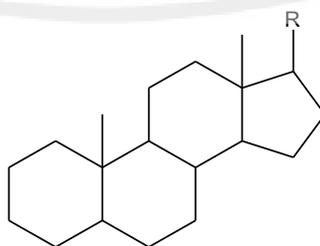


**Gambar 2.6** Contoh Struktur Triterpenoid (Robinson, 1995)

#### 2.4.6 Steroid

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan 3cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormone seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid (Poedjiadi,1994).

Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol. Beberapa senyawa ini jika terdapat dalam tumbuhan akan berperan menjadi pelindung. Senyawa ini tidak hanya bekerja menolak beberapa serangga tetapi juga menarik beberapa serangga lain (Robinson,1995).



**Gambar 2.7** Struktur inti senyawa steroid (Robinson,1995)

Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi Liebermann-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi warna yang

lain pada steroid dilakukan dengan Brieskorn dan Briner (asam klorosulfonat dan Sesolvan NK) menghasilkan warna coklat (Robinson,1995).

#### 2.4.7 Kuinon

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan memiliki kromofor dasar seperti kromofor dasar pada benzokuinon, yang terdiri dari 2 gugus karbonil yang berkonjugasi dengan 2 ikatan rangkap. Kuinon untuk tujuan identifikasi dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu benzokuinon (kuinon dengan kromofor yang terdiri dari 2 gugus karbonil yang berkonjugasi dengan 2 ikatan rangkap karbon-karbon), naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama biasanya terhidroksilasi dan bersifat senyawa fenol serta mungkin secara *in vivo* terdapat dalam bentuk gabungan dengan gula sebagai glikosida atau dalam bentuk kuinon tanpa warna dan juga terkadang dalam bentuk dimer. Dengan demikian diperlukan hidrolisis asam untuk melepaskan kuinon bebasnya. Senyawa kuinon yang terdapat sebagai glikosida mungkin larut sedikit dalam air, tetapi umumnya kuinon lebih mudah larut dalam lemak dan akan terdeteksi dari tumbuhan bersama-sama dengan karetenoid dan klorofil (Harborne,1987).

Kuinon secara khas berbentuk pigmen warna yang sangat kuat mencakup seluruh aneka warna yang tampak, namun kuinon hanya ditemukan pada daerah internal dari tumbuhan dan warnanya tidak tampak pada bagian eksterior tumbuhan. Beberapa senyawa kuinon dalam pengobatan berfungsi sebagai anti hepatitis dan anti kanker (Kauffman, dkk.,1999).

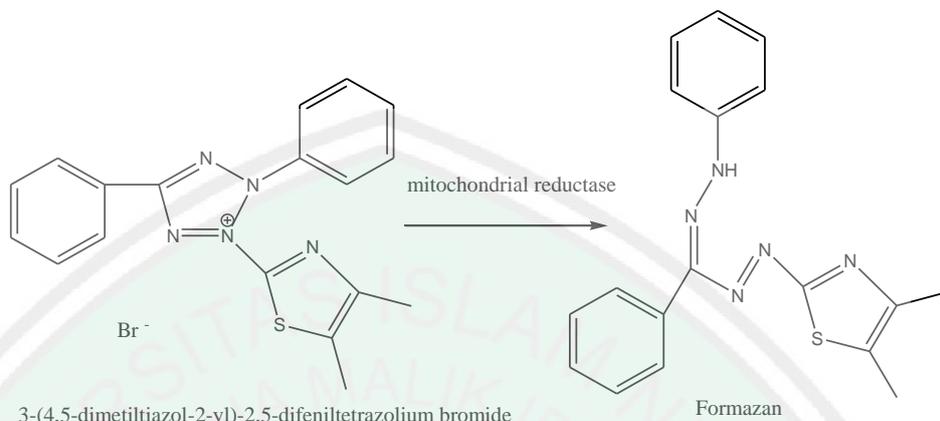
Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada kuinon adalah dengan menambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. Apabila larutan membentuk warna merah maka larutan tersebut mengandung kuinon (Djamil,2009).

## 2.5 Metode Uji Sitotoksik

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *Microculture Tetrazolium Salt* (MTT) yang merupakan salah satu uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi tingkat ketoksikan suatu senyawa. Metode MTT (*Microculture Tetrazolium*) banyak dimanfaatkan untuk menyelidiki mekanisme aktivasi sel dan kerusakan sel yang pengujiannya secara kolorimetri dan didasarkan pada *bioreduction* garam tetrazolium ke formazan (Goodwin, dkk., 1995). Metode uji MTT digunakan dalam penelitian ini karena memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan. Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. Uji MTT merupakan uji yang sensitif, reaksi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan (Basmal, 2009).

Prinsip dari metode ini adalah adanya reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolium bromid) berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan (Basmal dkk, 2009). Metode perubahan warna tersebut digunakan untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Sel yang mengalami proliferasi akan menyerap MTT sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu akibat terbentuknya kristal tetrazolium (formazan). Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang antara 500 dan 600 nm, yang mana semakin

besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Reaksi reduksi MTT dapat dilihat pada Gambar 2.10 berikut (Meiyanto, dkk.,2008):



**Gambar 2.8** Reaksi reduksi MTT (Mosman, 1983)

Uji sitotoksik ini digunakan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*). Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitostatik. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Padmi, 2008). Ekstrak dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 1.000 mg/mL setelah waktu kontak 24 jam (Meiyanto, dkk., 2008).

Uji sitotoksik terhadap kanker dengan metode MTT dilakukan dengan cara :  
 Sel kanker dengan konsentrasi  $3 \times 10^3$  sel/100  $\mu$ L didistribusikan kedalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam didalam inkubator  $CO_2$  agar sel beradaptasi dan menempel di sumuran. Selanjutnya pada tiap sumuran ditambahkan 100  $\mu$ L media kultur (MK) yang mengandung sampel dengan variasi kadar dan diinkubasi kembali selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan 100  $\mu$ L PBS (*phosphate Buffered saline*). Kemudian kedalam

asing-masing sumuran ditambahkan 100  $\mu$ L media kultur yang mengandung MTT dan diinkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37<sup>0</sup> C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Setelah 4 jam, pada tiap sumuran ditambahkan reagen stopper untuk membunuh sel dan melarutkan kristal formazan. Plate di shaker selama 10 menit kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam ruang gelap selama semalam. Selanjutnya, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm (Mosmann, 1983).

## 2.6 Kanker

Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal (*Tim Cancer Help*, 2010). Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan akan terus membelah diri. Selanjutnya, sel kanker akan menyusup ke jaringan sekitarnya (invasif) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah, serta menyerang organ-organ penting dan saraf tulang belakang (Desen, 2011).

Kanker sering dikenal sebagai tumor, tetapi tidak semua tumor disebut kanker. Tumor merupakan satu sel liar yang berada dibagian tubuh dan terus membesar di lokasi yang tetap atau tidak menyebar ke bagian tubuh lain. Mengakibatkan terbentuknya benjolan di bagian tubuh tertentu dan jika tidak diobati dengan tepat sel tumor berubah menjadi kanker. Berbeda dengan sel tumor yang tidak menyebar kebagian tubuh lain, sel kanker akan terus membelah diri dengan cepat dan tidak terkontrol menyebabkan sel kanker sangat mudah menyebar ke beberapa bagian tubuh melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening (Aprianti, 2012).

Secara umum, penyebab kanker dapat dibagi dalam 3 kategori, yaitu karsinogen fisik (radiasi sinar UV dan radiasi ionisasi), karsinogen kimiawi (asap tembakau dan asbestos), dan karsinogen biologis (virus, bakteri, dan parasit) (PCC, 2013). Selain itu, kanker dapat timbul karena pola hidup yang tidak sehat. Hampir separuh dari kanker yang terdiagnosis setiap tahun disebabkan oleh gaya hidup yang tidak sehat. Pencetus kanker dapat berasal dari makanan yang kaya akan gula buatan, karbohidrat olahan, pengawet, produk sampingan dari hasil penggorengan (minyak jelantah), mengandung banyak lemak, asupan antioksidan yang kurang, dan minuman yang mengandung bahan kimia (minuman beralkohol) (Mueller, dkk., 2010). Penyebab kanker juga bisa timbul karena kondisi kejiwaan yang tidak stabil dan faktor keturunan. Orang tua yang mengidap kanker sangat mungkin menurunkan pada anaknya (Magdalena, 2014).

### **2.6.1 Kanker Kolon**

Kanker kolon atau kanker usus besar adalah suatu bentuk keganasan yang terdapat pada saluran pencernaan bawah (kolon, rectum, dan appendix), bagian sistem pencernaan atau yang disebut juga traktus gastrointestinal, lebih jelasnya kolon berada di bagian proksimal usus besar dan rectum di bagian distal sekitar 5 – 7 cm di atas anus. Kolon dan rectum mempunyai fungsi untuk menghasilkan energi bagi tubuh dan membuang zat-zat yang tidak berguna (Pezzoli, 2007).

Kanker ini berasal dari sel glandula yang terdapat di lapisan dinding kolon dan rektum.

Di Indonesia kanker kolorektal adalah keganasan yang sering terjadi baik pada pria dan wanita setelah kanker prostat dan kanker payudara dengan persentase 11,5% dari jumlah seluruh pasien kanker di Indonesia.<sup>2</sup> Insidensi kanker kolorektal di Indonesia cukup tinggi, demikian juga angka kematiannya. Insidensi kanker kolorektal pada pria sebanding dengan wanita dan lebih banyak terjadi pada usia produktif. Hal ini berbeda dengan data yang diperoleh di negara berat dimana kanker biasanya terjadi pada pasien usia lanjut. Perbandingan insidensi pada laki-laki dan perempuan adalah 3 berbanding 1 dan kurang dari 50% kanker kolon dan rektum ditemukan di rectosigmoid (Jong, 2013).

Kanker kolon stadium awal biasanya tidak mempunyai gejala. Gejala yang muncul pada stadium lebih lanjut yang mungkin terjadi adalah pendarahan pada rektum, pendarahan saat buang air besar, perubahan kebiasaan usus, kram pada perut bagian bawah. Faktor resiko dari kanker kolon adalah keturunan (kurang dari 10% kanker kolon disebabkan oleh keturunan mutasi gen), riwayat polip kolon, inflamasi usus, obesitas, kurang aktivitas fisik, konsumsi makanan berlemak, rokok dan konsumsi alkohol (American Cancer Society, 2008).

### **2.6.2 Sel WiDr**

Sel WiDr merupakan sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel WiDr merupakan turunan sel kanker kolon yang lain yakni sel HT-29 (Chen dkk, 2007). Sel WiDr memproduksi antigen karsino

embrionik dan memerlukan rentang waktu sekitar 15 jam untuk dapat menyelesaikan satu daur sel.

WiDr merupakan salah satu sel yang memiliki sensitivitas yang rendah terhadap perlakuan dengan 5-fluorouracil (5-FU), agen kemoterapi golongan antimetabolit. Transfeksi WiDr dengan p53 normal pun tidak menyebabkan peningkatan sensitivitasnya terhadap 5-FU (Giovannetti dkk, 2007). Resistensi sel WiDr terhadap 5-FU salah satunya diperantarai dengan terjadinya peningkatan ekspresi enzim timidilat sintetase yang merupakan target penghambatan utama dari 5-FU (Sigmond dkk, 2008). P-glikoprotein (Pgp) pada sel WiDr tidak diekspresikan tinggi sehingga kemungkinan terdapat mekanisme lain yang memperantarai resistensi WiDr terhadap 5-FU (Jansen, 2009). Secara keseluruhan sel WiDr merupakan sel yang sesuai untuk digunakan sebagai model dalam skrining suatu senyawa baru sebagai agen kemoterapi dengan 5-FU.

### 2.6.3 Sel Vero

Sel Vero ATCC CCL-81 merupakan sel epitel non kanker (sel normal). Sel ini berasal dari organ ginjal monyet hijau asal Afrika. Sel Vero merupakan sel *monolayer* berbentuk poligonal dan pipih, *immortal*, *non tumorigenic fibroblasticcell*. Sel ini melekat erat pada substrat yang berbahan polistirena dengan membentuk ikatan kovalen. Pengujian sel Vero dilakukan untuk mempelajari pertumbuhan sel, diferensiasi sel, sitotoksitas, dan transformasi sel yang diinduksi oleh berbagai senyawa kimia (Goncalves, dkk., 2009).

## 2.7 LC-MS / *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*

Kromatografi merupakan teknik pemisahan suatu zat terlarut berdasarkan perbedaan kepolaran. Pemisahan solut diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam. Keberhasilan dalam menggunakan kromatografi cair dipengaruhi oleh jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan alir fase gerak suhu kolom dan ukuran sampel (Gandjar dan Rohman, 2007). Larutan yang interaksinya kurang kuat dengan fase diam akan keluar dulu dari kolom, sedangkan larutan dengan interaksi kuat dengan fase diam akan keluar lebih lama dari kolom (Hendayana, 2006).

Setiap komponen campuran yang keluar kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah peak menyatakan jumlah komponen, sedangkan luas peak menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran. Komputer digunakan untuk mengontrol kerja sistem kromatografi cair, mengumpulkan dan mengolah data hasil pengukuran kromatografi cair (Hendayana, 2006).

Fase gerak atau eluen terdiri atas campuran pelarut yang berperan dalam daya elusi dan resolusi. Fase normal terdiri dari fase diam yang lebih polar daripada fase gerak sehingga kemampuan untuk mengelusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Fase terbalik terdiri dari fase diam yang kurang polar daripada fase gerak sehingga kemampuan untuk mengelusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Gandjar dan Rohman, 2007).

Fase gerak yang sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan buffer dengan methanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorinasi atau

menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol (Gandjar dan Rohman, 2007). Pada penelitian ini menggunakan fase terbalik karena menggunakan fase gerak campuran H<sub>2</sub>O dan methanol.

Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) atau dengan cara bergradien (komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi). Elusi bergradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang kuat (Gandjar dan Rohman 2007)

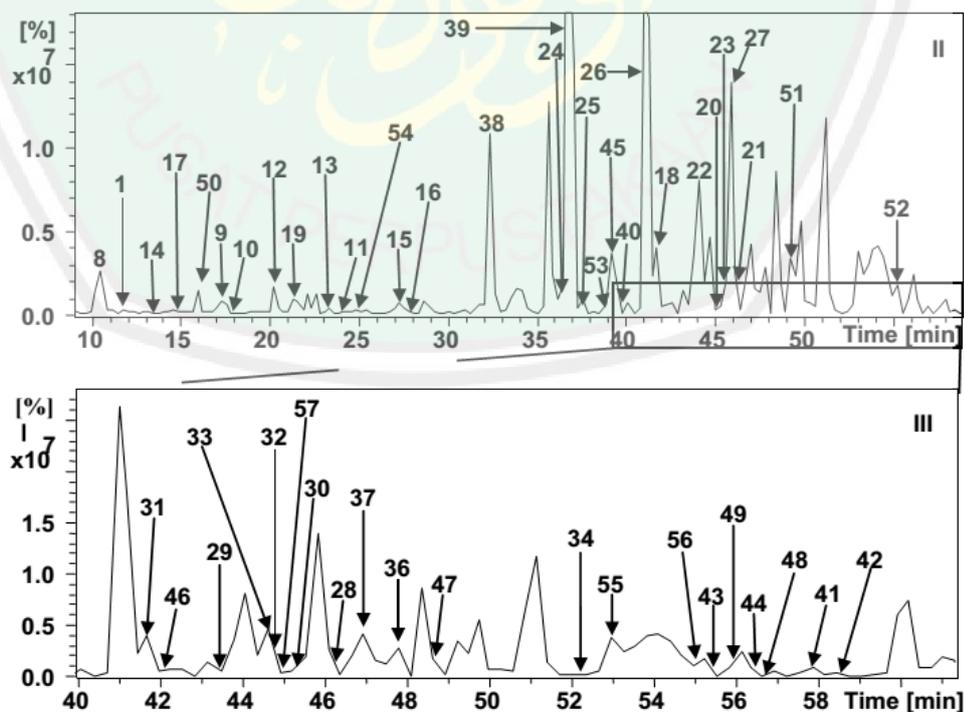
Detektor pada HPLC dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu detektor universal seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa dan golongan detektor spesifik seperti detektor UV-Vis, detektor floresensi, dan elektrokimia. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah HPLC Alliance 2695 (waters) yang dilengkapi dengan detektor *photodiode-array* (PDA). Detektor PDA memberikan lebih banyak informasi mengenai komposisi sampel dan memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses (Gandjar dan Rohman, 2007)

Detektor pada alat yang digunakan ini langsung dihubungkan dengan alat spektroskopi massa. Spektroskopi massa dapat menyeleksi molekul-molekul gas yang bermuatan berdasarkan massa atau beratnya. Sampel yang ditembaki dengan berkas elektron menghasilkan suatu ion molekul atau fragmen ionik. Fragmen tersebut dapat dipisahkan berdasarkan massanya (Khopkar, 2010).

Instrumen LC-MS digunakan untuk memisahkan senyawa yang bersifat termolabil, non volatil dan senyawa yang memiliki berat molekul yang tinggi. Keuntungan identifikasi menggunakan LC-MS diantaranya dapat digunakan untuk

senyawa-senyawa dengan titik lebur tinggi, berat molekul besar, termolabil, dan non volatil (Williams and Fleming, 1997).

Identifikasi senyawa aktif pada ekstrak metanol daun bidara arab di Sudan diketahui mengandung (epi)catechin, (epi)gallocatechin, gallocatechin, catechin, asam chlorogenic, asam caffeic, apigenin, phloretin, diosmetin, isorhamnetin, kaempferol, dan kuersetin beserta turunannya. Senyawa (epi)catechin memiliki nilai  $m/z$  593; (epi)gallocatechin sebesar 609; gallocatechin sebesar 305; catechin sebesar 289; asam chlorogenic sebesar 353; asam caffeic sebesar 341; apigenin sebesar 593; phloretin sebesar 597; diosmetin sebesar 769; isorhamnetin sebesar 623; kaempferol sebesar 593, dan senyawa kuersetin beserta turunannya memiliki nilai  $m/z$  1047, 725 609, 607, 597, 591, 579, 505, 463, 447, 433, dan 431. Pada Gambar 2.6 dibawah ini merupakan kromatogram hasil analisis LC-MS terhadap ekstrak methanol daun bidara arab (Karar, dkk., 2016) :



Gambar 2.9 Kromatogram ekstrak metanol daun bidara arab (Karar, dkk., 2016)

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei - Juli 2017 di Laboratorium Analitik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Biologi Jurusan Biologi Universitas Brawijaya, Laboratorium Protho, Parasitologi Jurusan Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada dan Puslabfor Polri.

### **3.2 Alat dan Bahan**

#### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik, gelas arloji, spatula, pengaduk gelas, *beaker glass*, blender, *oven*, pipet ukur, seperangkat alat LC-MS, botol semprot, *ELISA reader*, seperangkat alat gelas, inkubator CO<sub>2</sub>, *rotary vacuum vaporator*, dan corong pisah.

#### **3.2.2 Bahan**

Daun bidara arab (diperoleh dari tanaman di daerah Sumenep), aquades, etanol, klorofom n-heksan, reagen Dragendorff, methanol, FeCl<sub>3</sub> 1%, HCl, NaOH 1 N reagen Mayer sel kanker kolon WiDr, sel Vero, *Fetal Bovine Serum* (FBS), media kultur *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), media kultur M199, *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), reagen MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,-difeniltetrazolium bromid*), *sodium duodecyl sulphate* (SDS), doksorubisin.

### 3.3 Metode Analisis

Penelitian ini bersifat kuantitatif dengan menggunakan metode Hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas biologis obat (HKSA). Metode ini merupakan bagian penting rancangan obat, dalam usaha mendapatkan suatu obat baru dengan aktivitas yang lebih besar, selektivitas yang lebih tinggi, toksisitas atau efek samping sekecil mungkin dan kenyamanan yang lebih besar. Selain itu dengan menggunakan model HKSA, akan lebih banyak menghemat biaya atau lebih ekonomis, karena untuk mendapatkan obat baru dengan aktivitas yang dikehendaki, faktor coba-coba ditekan sekecil mungkin sehingga jalur sintesis menjadi lebih pendek.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut :

1. Determinasi tanaman
2. Persiapan sampel
3. Analisis kadar air
4. Ekstraksi senyawa aktif
5. Identifikasi golongan senyawa aktif dengan uji fitokimia
6. Uji aktivitas antikanker pada sel kanker WiDr dengan metode MTT
7. Identifikasi golongan senyawa aktif dengan LC-MS
8. Analisis data

### **3.5 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.5.1 Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Jurusan Biologi Universitas Brawijaya dengan cara mencocokkan ciri-ciri morfologi dari daun, batang, biji, dan buah bidara. Langkah ini dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman bidara arab.

#### **3.5.2 Persiapan Sampel**

Daun bidara arab diperoleh dari Kabupaten Sumenep, kemudian dicuci hingga bersih untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel pada sampel setelah itu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, jangan sampai terpapar sinar matahari secara langsung. Kemudian sampel dipotong kecil-kecil, setelah itu sampel kering dihaluskan dengan blender hingga halus (serbuk) dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Serbuk yang diperoleh merupakan sampel yang siap untuk dianalisis.

#### **3.5.3 Analisis Kadar Air**

Analisis kadar air dilakukan dengan metode *thermogravimetri* yaitu dengan pemanasan. Analisa ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Cawan porselen yang digunakan dipanaskan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 100-105 °C selama ±15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan porselen disimpan dalam desikator selama 10 menit. Cawan tersebut kemudian ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Sampel daun bidara arab dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya. Sampel ditimbang sebanyak 5 gr dan dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam untuk menguapkan air yang terkandung pada sampel. Setelah itu didinginkan dalam desikator selama ±15 menit dan ditimbang kembali (Rizqiyah,

2014). Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus berikut :

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.1)$$

Keterangan : a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \dots\dots\dots (3.2)$$

$$\% \text{ Kadar air terkoreksi} = \text{Kadar air} - \text{Faktor koreksi} \dots\dots\dots (3.3)$$

#### 3.5.4 Ekstraksi Senyawa Aktif

Sampel yang telah dipreparasi dan diuji kadar airnya selanjutnya dilakukan tahap ekstraksi. Langkah awal yang dilakukan yaitu ditimbang serbuk daun bidara arab sebanyak 90 g, dimasukkan ke dalam 3 erlenmeyer 500 mL masing-masing 30 g, lalu diekstraksi dengan perendaman menggunakan 300 mL pelarut etanol p.a selama 24 jam, dan *dishaker* selama 3 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama dan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Pengulangan kedua dan ketiga menggunakan pelarut sebanyak 250 mL. Ketiga filtrat dari 3 erlenmeyer digabung menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum* dengan suhu 60 °C dan dihentikan ketika ekstrak cukup kental dan ditandai dengan berhentinya penetesannya pelarut pada labu alas bulat. Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya dengan persamaan berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.4)$$

Ekstrak pekat etanol dibagi menjadi 3 bagian, yaitu :

- 1) ekstrak pekat etanol ditimbang sebanyak 250 mg sebagai sampel uji
- 2) ekstrak pekat etanol ditimbang sebanyak 3 g, kemudian dipartisi dengan pelarut kloroform dengan cara ditambahkan 50 mL pelarut kloroform dalam corong pisah. Lalu dikocok selama 15 menit dan didiamkan beberapa menit hingga terbentuk 2 lapisan. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 2x. Hasil fraksi kloroform dikumpulkan menjadi satu, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum*.
- 3) Ekstrak pekat etanol ditimbang sebanyak 3 g, kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksan dengan cara ditambahkan 50 mL pelarut n-heksan dalam corong pisah. Lalu dikocok selama 15 menit dan didiamkan beberapa menit hingga terbentuk 2 lapisan. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 2x. Hasil fraksi n-heksana dikumpulkan menjadi satu, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum* hingga diperoleh ekstrak yang cukup kental.

Fraksi n-heksan dan fraksi kloroform masing-masing ditimbang dan dihitung rendemennya dengan menggunakan persamaan 3.4. Ketiga ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dilakukan uji fitokimia dengan penambahan reagen untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang ditandai dengan perubahan warna pada ekstrak dan diuji antikanker secara *in vitro*. Setelah didapatkan hasil yang terbaik dari uji aktivitas antikanker dilakukan analisis senyawa aktif dengan menggunakan instrumen LC-MS.

### 3.5.5 Identifikasi Golongan Senyawa dengan Uji Fitokimia

Ekstrak bidara dengan variasi pelarut yang diperoleh dilakukan pengujian reagen meliputi uji alkaloid, flavonoid, triterpenoid, kuinon, tanin, saponin. Untuk uji alkaloid larutan ekstrak uji sebanyak 2 mL diuapkan di atas cawan porselin hingga di dapat residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCl 2 N. Larutan yang didapat kemudian dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan HCl 2 N yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 3 tetes dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi Mayer sebanyak 3 tetes. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Jones and Kinghorn, 2006). Lalu yang selanjutnya uji flavonoid dilakukan dengan cara sampel dipanaskan dengan campuran logam magnesium dan asam klorida 2 %, kemudian disaring. Jika menimbulkan warna merah maka hasilnya positif tetap jika tidak maka hasilnya negatif. Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan. Residu yang diperoleh dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ini ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecokelatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, menunjukkan adanya triterpenoid. Sedangkan bila larutan berubah warna menjadi hijau kebiruan menunjukkan bahwa sampel juga mengandung steroid (Jones and Kinghorn, 2006; Evans, 2009).

Untuk uji saponin ekstrak uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, dinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan HCl 2 N, buih tidak hilang (Depkes RI, 1995). Larutan ekstrak

uji sebanyak 1 mL direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 1%, jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa tanin (Jones and Kinghorn, 2006). Sejumlah lebih kurang 5 mL larutan ekstrak ditambah natrium hidroksida 1 N, Adanya kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

### 3.5.6 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT (CCRC, 2009; Ilhamy, dkk, 2013).

#### a. Penyiapan Sel

Sel kanker kolon WiDr diambil dari koleksi Universitas Gajah Mada (UGM). Sel kanker dikeluarkan dari *freezer* ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), dihangatkan dalam penangas air pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2 – 3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan ke dalam *culture dish* yang telah berisi 10 ml media RPMI, diinkubasi selama 3 – 4 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ , kemudian disentrifugasi untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan media RPMI. Pelet yang terbentuk diamati dibawah mikroskop untuk melihat apakah sel melekat di dasar *culture dish* dan bila jumlah sel di dalam *culture dish* mencapai 70 – 85 % (konfluen), dilakukan panen sel.

Tahapan panen sel yakni, dicuci sel 2 x dengan PBS, ditambahkan trispsin-EDTA secara merata dan diinkubasi selama 3 menit, ditambahkan media RPMI 5 mL untuk menginaktifkan sel serta dilakukan resuspensi, diamati dibawah mikroskop *inverted*, kemudian diinkubasi dalam inkubator  $\text{CO}_2$  selama 24 jam.

Tahapan penyiapan sel ini juga dilakukan pada sel vero dengan perlakuan yang sama tetapi dengan menggunakan media yang berbeda, yaitu dengan media M199.

### b. Perhitungan Sel Kanker

Diambil 10  $\mu\text{L}$  panen sel dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Diamati dan dihitung dibawah mikroskop inverted dengan *counter*. Jumlah sel kanker dan sel vero dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\Sigma \text{ sel yang dihitung} = \frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4 \dots (3.5)$$

### c. Peletakan Sel pada Plate

Peletakan sel pada *plate* harus diketahui berapa jumlah mL panen sel yang akan diletakkan pada setiap sumuran, dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\Sigma \text{ panen mL panen sel yang ditransfer} = \frac{\Sigma \text{ total sel yang diperlukan}}{\Sigma \text{ sel terhitung / mL}} \dots (3.6)$$

Diletakkan sel dan ditambahkan media RPMI sesuai perhitungan ke dalam *plate 96-well* dan diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$ , akan tetapi 12 sumuran bagian bawah disisakan untuk kontrol sel dan kontrol media. Untuk sel vero juga dilakukan perlakuan yang sama tetapi dengan menggunakan media M199.

### d. Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada Plate

Ditimbang masing-masing sampel ekstrak pekat yakni ekstrak pekat etanol, ekstrak hasil hidrolisis, fraksi n-heksana, dan fraksi kloroform sebanyak 10 mg dalam wadah yang berbeda, dilarutkan masing- masing ekstrak pekat dalam 100  $\mu\text{L}$  DMSO dan diaduk dengan vortex agar lebih cepat dalam melarutkan sampel, diambil sel dari inkubator, kemudian dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate*  $180^\circ$  di atas tempat pembuangan dan ditekan secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan, dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu dimasukkan larutan sampel

sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90625; 1,953125 ppm dan diulang sebanyak 3 x (triplo), diinkubasi kembali selama 24 jam.

**e. Pemberian Larutan MTT**

Dibuang media sel dan dicuci dengan PBS, ditambahkan larutan MTT 100  $\mu\text{L}$  ke setiap sumuran kecuali kontrol sel. Inkubasi kembali selama 3 – 4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Apabila formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*, lalu ditambahkan *stopper* SDS 10 % dalam 0,1 N HCl, dibungkus *plate* dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.

Langkah selanjutnya yakni pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA *reader* untuk mengetahui nilai  $\text{IC}_{50}$  setiap ekstrak. Tahapan awalnya ini dihidupkan ELISA *reader* dan ditunggu hingga *prosessing* selesai, dibuka pembungkus *plate* kemudian dimasukkan ke ELISA *reader*, dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 550 – 600 nm, dimatikan kembali ELISA *reader*. Lalu dihitung prosentase sel hidup dengan persamaan sebagai berikut:

Prosentase sel hidup =

$$\frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100. \quad (3.7)$$

Data dari prosentase sel hidup kemudian dianalisis untuk mengetahui nilai  $\text{IC}_{50}$  dengan regresi linier menggunakan Ms.Excel.

**3.5.7 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*)**

Identifikasi menggunakan instrumen LC-MS dilakukan terhadap ekstrak dengan hasil terbaik dari uji antikanker menggunakan metode MTT. Sampel yang

digunakan sebanyak 10  $\mu\text{L}$  (0,01 mL). Spektra yang dihasilkan lalu dianalisa untuk mengetahui kemungkinan senyawa-senyawa yang terdapat di dalamnya. Tahap awal merupakan tahap preparasi eluen untuk LC. Eluen disaring terlebih dahulu dengan menggunakan saringan nilon berdiameter 1,7  $\mu\text{m}$  dengan bantuan pompa vakum. Kemudian tahap selanjutnya adalah penyuntikan sampel pada LC, sampel diambil sebanyak 5  $\mu\text{L}$  (0,005 mL) dan disuntikkan secara langsung menggunakan *micro syringe* ke dalam eluen yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom. Tahap terakhir yaitu identifikasi senyawa dengan MS yang dilakukan dengan menghubungkan sistem LC dengan sumber ion ESI.

Parameter analisis yang digunakan dalam analisa adalah sebagai berikut :

Alat : LC Alliance 2695 (Waters) with photodiode-array (PDA) Detector  
2996 (Waters)

Column : Acquity C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1x50 mm

Flowrate : 0,3 mL min, injection 5 microliter (0,005 mL)

Eluent : A. H<sub>2</sub>O (LC grade) – metanol

Kondisi alat Spektroskopi Massa adalah sebagai berikut :

Alat : XEVO – G2QTOF (Waters)

Analyser MS : TOF (*Time of Flight*) dengan *electrosprayer* modus positif (ES+) dan negative (ES-) dari m/z 100 sampai m/z 2000

*Desolvation temperature* : 300 °C

*Source temperature* : 110 °C

*Desolvation gas flow* : 500 L/jam

### 3.6 Analisis Data

Potensi ekstrak dalam menghambat atau membunuh sel kanker kolon WiDr dapat diketahui dengan melakukan uji  $IC_{50}$ , menggunakan Analisa Ms.Excel untuk masing-masing konsentrasi 125; 62,5; 31,25; 15,625; dan 7,8125 ppm. Penggunaan data absorbansi yang diperoleh dari pengukuran dapat ditentukan persentase sel yang hidup dengan menggunakan rumus seperti persamaan 3.5.

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan data yang *terinput* merupakan data hubungan antara konsentrasi dengan prosentase sel hidup serta nilai maksimum sebesar 100. Selanjutnya dilakukan analisa regresi linier yang akan memunculkan nilai  $IC_{50}$  tiap ekstrak dan grafik. Menurut *National Cancer Institute* (NCI) suatu ekstrak dinyatakan aktif memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki nilai  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ , moderate aktif apabila memiliki nilai  $IC_{50} 30 - 100 \mu\text{g/ml}$  dan dikatakan tidak aktif apabila nilai  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$  (Rahmawati, 2013). Ekstrak uji dengan nilai  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$  tetap dinyatakan toksik dan memiliki antiproliferasi (menghambat pertumbuhan sel) meskipun nilainya kecil (Meiyanto, dkk., 2008).

Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh dari ekstrak daun bidara arab dengan sel normal Vero kemudian dibagi dengan nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak daun bidara arab dengan sel kanker WiDr untuk mengetahui nilai *selectivity index* (SI). Nilai ini untuk mengetahui apakah ekstrak daun bidara arab bersifat selektif atau tidak terhadap sel kanker kolon. Apabila nilai  $SI > 3$  maka dapat dikatakan bahwa ekstrak daun bidara arab bersifat selektif terhadap sel kanker kolon WiDr (Prayong, 2008).

Data yang diperoleh dari hasil kromatogram LC-MS dapat digunakan untuk menganalisis dugaan senyawa apa saja yang terkandung dalam ekstrak daun bidara

arab (*Ziziphus spina-christi* L.) di daerah Sumenep, Madura yang diduga memiliki potensi sebagai antikanker terhadap sel WiDr.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Determinasi Tanaman

Sampel uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun bidara arab. Sebelum dilakukannya penelitian, sampel uji terlebih dahulu dilakukan uji determinasi di Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Pengembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya. Tujuan determinasi ini untuk mengetahui kebenaran identifikasi sampel uji yang akan dianalisis dan menghindari kesalahan pengambilan sampel analisis (Harborne, 1987). Hasil dari determinasi tanaman ini menunjukkan bahwa sampel uji yang digunakan adalah daun bidara arab dengan nama latin *Ziziphus spina-christi* L.

#### 4.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan tahapan pertama dalam penelitian ini. Preparasi sampel bertujuan untuk mempermudah dalam proses maserasi, karena dengan memperkecil ukuran sampel maka akan semakin banyak kontak yang terjadi antara sampel dengan pelarut sehingga proses maserasi berjalan cepat dan maksimal. Tahapan dalam preparasi sampel ini meliputi pencucian, pengeringan, dan penyerbukan sampel. Pencucian sampel bertujuan untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel pada daun bidara arab, pengeringan dilakukan untuk menghilangkan kadar air dalam sampel agar sampel terhindar dari perkembangbiakan mikroba. Proses pengeringan dilakukan dengan cara di angin-anginkan pada suhu ruang agar senyawa aktif yang terkandung dalam sampel tidak rusak. Penyerbukan dilakukan untuk menyamakan ukuran sampel yaitu dengan ukuran 60 mesh.

### 4.3 Analisis Kadar Air

Analisis kadar air yang dilakukan pada sampel kering bertujuan untuk mengetahui kualitas simplisia yang digunakan atas kandungan air yang terkandung. Air merupakan media tumbuh dan berkembangnya jamur. Persyaratan kadar air simplisia menurut parameter standar yang berlaku adalah tidak lebih dari 10% (Febriani, *et al*, 2015). Analisis kadar air yang telah dilakukan menggunakan metode *thermogravimetri*, yaitu dengan cara memanaskan sampel menggunakan oven pada suhu 100-105 °C selama 30 menit hingga diperoleh berat konstan. Selisih berat sampel sebelum dan sesudah proses pengeringan menunjukkan banyaknya air yang telah menguap. Dari hasil ini diketahui kadar air dari simplisia daun bidara arab sebesar 3,7524% (b/b). Sehingga dapat diketahui bahwa simplisia cukup aman dari kontaminasi jamur selama proses penyimpanan.

### 4.4 Ekstraksi Senyawa Aktif

#### 4.4.1 Ekstraksi Maserasi

Teknik penyarian dengan metode maserasi dilakukan dengan merendam simplisia dengan cairan penyari tertentu. Proses penyarian terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi di luar dan di dalam sel, cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel, maka larutan yang pekat didesak ke luar. Peristiwa ini terjadi berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Dwitiyanti, 2015).

Ekstrak pekat yang diperoleh berwarna hijau pekat dengan berat 14,19 gram dan hasil rendemen sebesar 15,77 %. Ekstrak pekat etanol yang diperoleh kemudian diambil sebanyak 6 gram untuk ekstraksi cair-cair dengan n-heksan dan kloroform, masing-masing menggunakan ekstrak pekat sebanyak 3 gram.

#### 4.4.2 Ekstraksi Cair-Cair

Ekstrak pekat yang diperoleh diduga memiliki berbagai kandungan senyawa dengan kepolaran yang berbeda. Ekstraksi cair-cair ini berfungsi untuk melarutkan senyawa-senyawa yang masih terikat pada sampel dengan kepolaran yang berbeda. Oleh karena itu, pada ekstraksi cair-cair ini digunakan 2 pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda juga, yaitu kloroform dan n-heksan. Penggunaan kloroform untuk mendapatkan senyawa yang bersifat semipolar, sedangkan pelarut n-heksan untuk mendapatkan senyawa non-polar yang terkandung dalam daun bidara arab.

Pada proses ekstraksi cair-cair ini terbentuk 2 lapisan, dimana massa jenis yang lebih besar akan berada di lapisan bawah. Kloroform sendiri memiliki massa jenis sebesar 1,49 g/mL dan massa jenis n-heksan sebesar 0,695 g/mL. Sedangkan etanol memiliki massa jenis sebesar 0,7893 g/mL. Sehingga hasil ekstraksi cair-cair dari pelarut kloroform fase organiknya berada di lapisan bawah sedangkan pada hasil n-heksan fase organiknya berada di lapisan bawah. Ekstraksi cair-cair ini dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Filtrat yang diperoleh dari kedua pelarut ini kemudian masing-masing dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum*. Fraksi kloroform diperoleh sebesar 0,61 gram dengan rendemen sebesar 20,33% dan untuk fraksi n-heksan sebesar 0,72 gram dengan rendemen sebesar 24%.

#### 4.5 Uji Fitokimia Senyawa dengan Reagen

Uji fitokimia ini merupakan salah satu uji kualitatif yang berguna untuk mengidentifikasi kandungan senyawa-senyawa aktif yang terdapat dalam sampel. Golongan senyawa metabolit sekunder yang diuji meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, triterpenoid, dan kuinon. Uji reagen dilakukan pada ekstrak etanol 96%, fraksi kloroform, dan fraksi n-heksan. Hasil dari identifikasi kandungan golongan senyawa metabolit sekunder ditunjukkan pada table 4.1 berikut ini :

**Tabel 4.1** Hasil Uji Fitokimia pada Daun Bidara Arab

Senyawa aktif	Etanol 96%	Fraksi Kloroform	Fraksi n-Heksana
Alkaloid			
- Dragendorf	+	+	+
- Mayer	+	+	+
Flavonoid	+	+	-
Saponin	-	-	-
Steroid	-	+	++
Triterpenoid	+	+	+
Tanin	-	-	-
Kuinon	-	-	-

**Keterangan :**

- ++ = Mengandung senyawa (warna cukup pekat)
- + = Mengandung senyawa (terjadi perubahan warna)
- = Tidak terkandung senyawa

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kusriani (2015), yang menyatakan bahwa ekstrak etanol daun bidara arab di Nusa Tenggara Barat mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid.

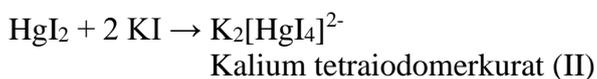
Sedangkan fraksi kloroform mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, dan triterpenoid. Fraksi n-heksan mengandung senyawa alkaloid, steroid, dan triterpenoid.

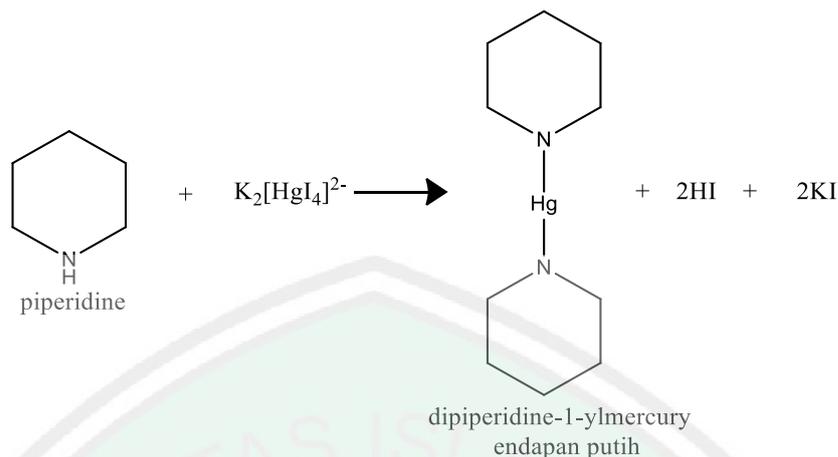
#### 4.5.1 Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan reagen Mayer dan Dragendorf. Hasil uji positif dengan reagen Mayer adalah terbentuknya endapan berwarna putih, sedangkan dengan reagen Dragendorf terbentuk endapan berwarna orange. Sebelum penambahan reagen, sampel ditambahkan dengan HCl karena alkaloid bersifat basa sehingga perlu untuk diekstrak menggunakan pelarut asam (Harbone, 1996).

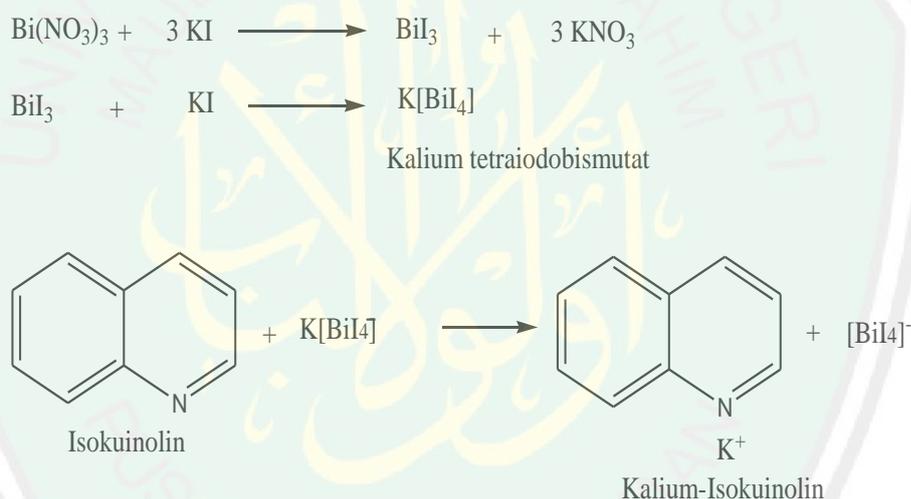
Pada pengujian alkaloid dengan reagen Mayer akan terjadi reaksi pengendapan karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid mengganti ion iod dalam pereaksi Mayer. Hal ini mengakibatkan terbentuknya endapan putih kekuningan karena nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks mercury-alkaloid yang mengendap (Dewi, dkk., 2013).

Hasil uji alkaloid dengan reagen Dragendorf berwarna orange karena reaksi senyawa alkaloid dengan reagen Dragendorf menghasilkan tetraiodobismutat. Tetraiodobismutat terbentuk karena alkaloid mampu bergabung dengan logam bismuth (Sastrohamidjojo, 1996). Dugaan reaksi uji alkaloid dengan reagen Mayer dan Dragendorf ditunjukkan pada Gambar 4.1 dan 4.2 (Abraham, 2013) :





**Gambar 4.1** Dugaan reaksi senyawa alkaloid dengan reagen Mayer (Abraham, 2013)

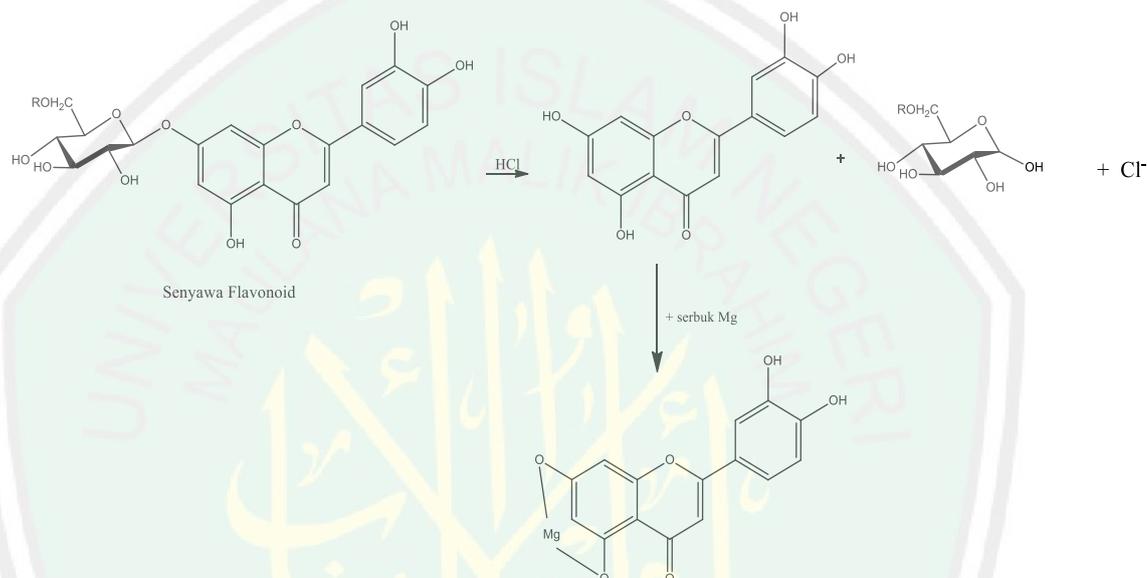


**Gambar 4.2** Dugaan reaksi senyawa alkaloid dengan reagen Dragendorff (Marliana, 2005)

#### 4.5.2 Flavonoid

Hasil uji positif flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah pada larutan sampel. Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan ekstrak etanol, fraksi kloroform, dan fraksi n-heksan dengan metanol panas kemudian HCl pekat dan logam Mg. Penambahan metanol panas untuk memaksimalkan kelarutan flavonoid, sedangkan penambahan HCl pekat untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Flavonoid yang tereduksi

dengan HCl dan Mg dapat memberikan warna merah, kuning atau jingga (Baud, 2014). Hasil uji flavonoid menunjukkan hasil positif pada ekstrak etanol dan fraksi kloroform dengan terbentuknya warna jingga pada larutan sampel. Berikut ini dugaan reaksi yang terjadi pada uji flavonoid (Hidayat, 2004 dalam Sriwahyuni, 2010) :



**Gambar 4.3** Dugaan reaksi flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl pekat (Hidayat, 2004 dalam Sriwahyuni, 2010)

#### 4.5.3 Triterpenoid/Steroid

Uji triterpenoid/steroid dilakukan dengan menambahkan larutan kloroform, asam anhidrat, dan ditetesi dengan asam sulfat pekat melalui dinding tabungnya. Hasil positif dari uji triterpenoid yaitu terbentuknya cincin coklat pada batas larutan dan perubahan warna hijau kebiruan untuk uji steroid ketika penambahan asam sulfat pekat (Robinson, 1995). Perubahan warna ini terjadi

pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Prinsip reaksi dalam mekanisme reaksi uji triterpenoid yaitu adanya kondensasi atau pelepasan H<sub>2</sub>O dan penggabungan karbokation. Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrida. Gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas sehingga terbentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti dengan pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan munculnya cincin coklat dan warna hijau kebiruan (Siadi, 2012).

Ekstrak etanol, fraksi kloroform dan fraksi n-heksan menunjukkan hasil positif pada uji triterpenoid, hal ini kemungkinan jenis triterpenoid yang larut dalam ketiga sampel berbeda. Karena pada pelarut yang digunakan dalam penelitian ini memiliki sifat kepolaran yang berbeda, maka jenis senyawa triterpenoid yang terekstrak juga berbeda. Pada uji steroid ekstrak etanol tidak menunjukkan hasil positif, sedangkan pada fraksi kloroform dan n-heksan menunjukkan hasil positif.

#### **4.6 Uji Antikanker dengan Metode MTT**

Pengujian antikanker ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol, fraksi kloroform, dan fraksi n-heksan dari daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon dalam berbagai variasi konsentrasi, yaitu 125; 62,5; 31,25; 15,625; dan 7,8125 µg/mL. Uji antikanker ini

dilakukan secara *in vitro* menggunakan sel kanker kolon WiDr dengan metode MTT (Microculture tetrazolium) selain itu juga dilakukan uji potensi sampel terhadap sel vero yang merupakan sel normal manusia.

Penggunaan metode MTT memiliki beberapa keuntungan yaitu sederhana, efisien, dan sensitif sehingga banyak digunakan dalam uji sitotoksik. Prinsip metode MTT adalah spektroskopi dengan menentukan nilai absorbansi formazan. MTT akan diserap ke dalam sel dan masuk ke dalam sistem respirasi sel dalam mitokondria. Mekanisme kerja enzim aktif dalam sel mitokondria adalah dengan memetabolisme garam tetrazolium, sehingga cincin tetrazolium terputus oleh enzim dehydrogenase (Pebriana, dkk., 2008).

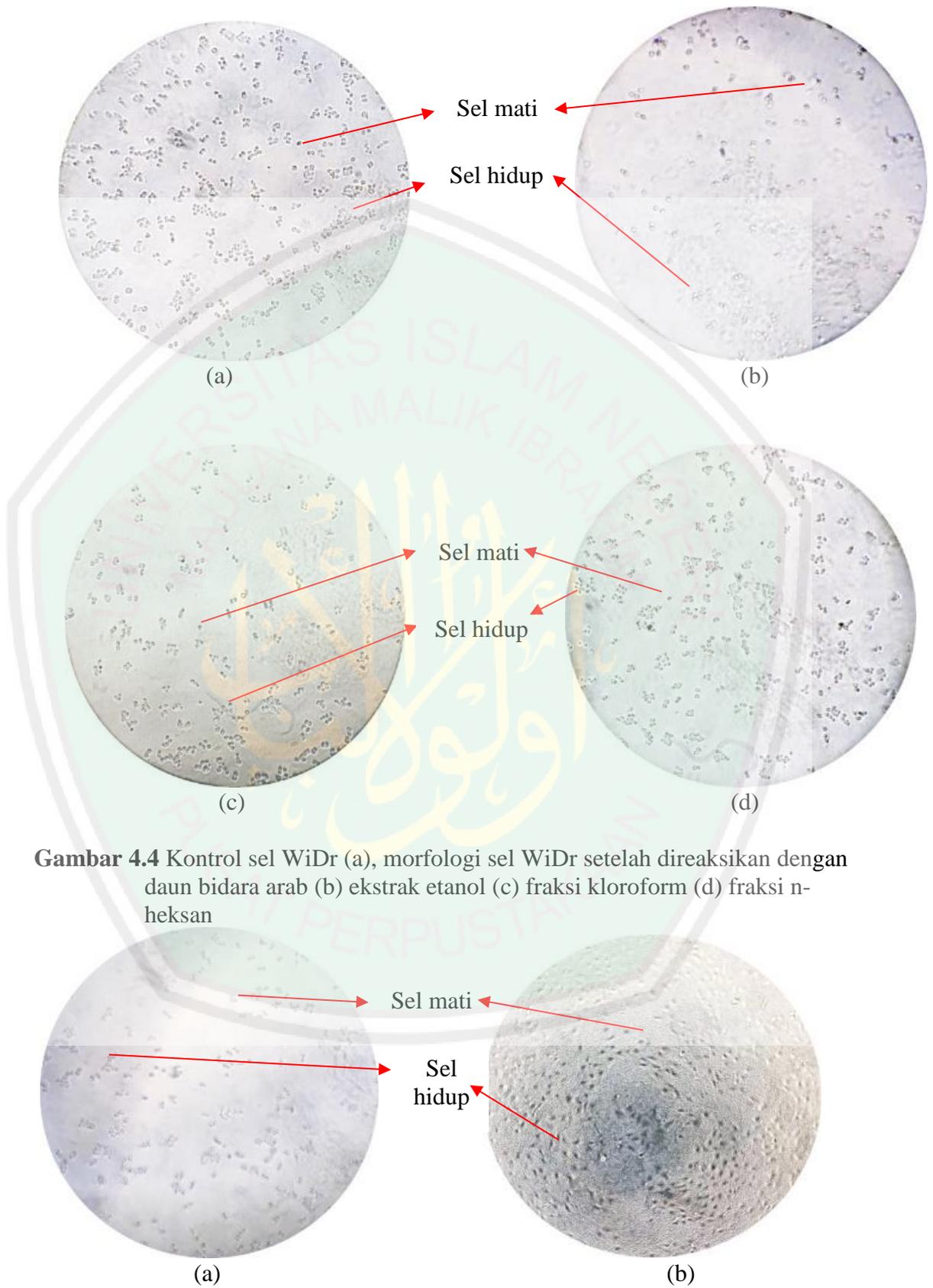
Tahap pengujian antikanker secara *in vitro* yaitu penyiapan, perhitungan, dan panen sel, uji sitotoksitas, pemberian reagen MTT, dan pembacaan absorbansi. Pada penyiapan sel dilakukan penghidupan kembali pada sel inaktif dan ditumbuhkan kembali dengan penambahan media kulturnya hingga sel mencapai konfluen. Konfluensi sel ditandai dengan tumbuhnya sel secara homogen atau merata sebagai sel monolayer hingga menutupi cawan petri. Media kultur untuk sel WiDr adalah RPMI sedangkan untuk sel vero menggunakan media M199. Media kultur berfungsi sebagai sumber nutrisi dan respirasi agar sel tetap hidup dan dapat memperbanyak diri (Abcam, 2007). Setelah sel mencapai konfluen maka dilakukan panen sel kemudian dilakukan perhitungan sel di bawah mikroskop menggunakan *hemocytometer* untuk mengetahui jumlah sel hidup yang diperoleh. Hasil perhitungan sel WiDr diperoleh sebanyak  $230 \times 10^4$ /mL sedangkan pada sel Vero sebanyak  $100 \times 10^4$ /mL. Perhitungan sel yang diletakkan pada *plate* untuk sel WiDr sebanyak 0,5 mL dan untuk sel Vero sebanyak 1 mL sesuai dengan hasil perhitungan

pada Lampiran 4.3. Penambahan media sel pada masing- masing sel dilakukan sampai volume mencapai 10 mL. Masing-masing sumuran pada *plate* diisi sel sebanyak 100  $\mu$ L.

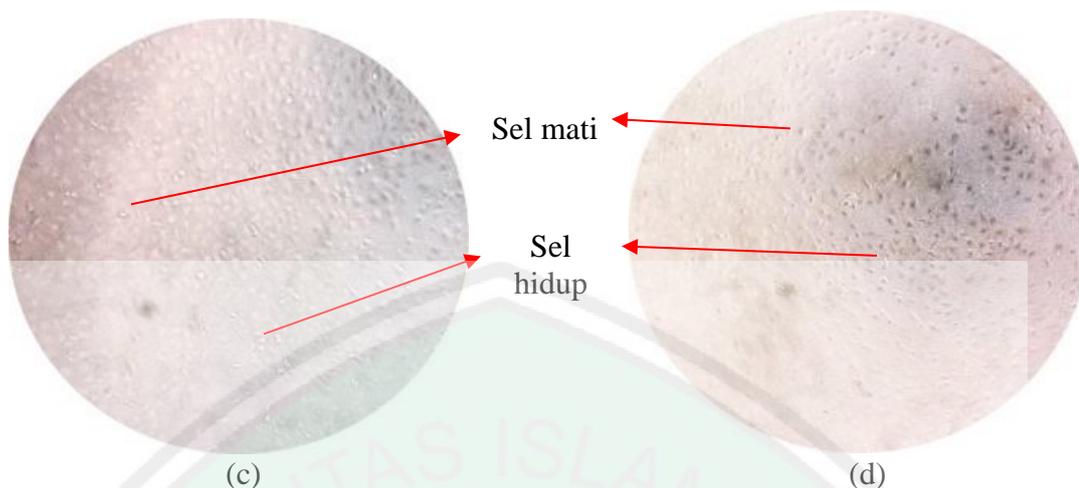
Larutan sampel stok dibuat dengan melarutkan sampel dengan menggunakan pelarut DMSO (dimetil sulfoksida). Dari larutan sampel stok diambil sebanyak 10  $\mu$ L kemudian diencerkan sesuai dengan perhitungan pada Lampiran 4.5.

Larutan sampel dengan berbagai variasi konsentrasi kemudian dimasukkan ke dalam sumuran *plate* sebanyak 100  $\mu$ L, sebelumnya *plate* telah diisi dengan sel dan media selnya. Dilakukan inkubasi selama 24 jam untuk memaksimalkan interaksi antara sampel dengan sel WiDr maupun sel Vero.

Setelah 24 jam sel diamati di bawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui reaksi antara sampel uji dengan sel WiDr maupun sel Vero. Dari hasil pengamatan ini diketahui bahwa ekstrak etanol paling berpotensi sebagai antikanker kolon, karena pada ekstrak etanol sel WiDr banyak yang mati dibandingkan dengan sel WiDr yang direaksikan dengan fraksi kloroform maupun fraksi n-heksan. Sedangkan sel Vero yang direaksikan dengan ekstrak etanol tidak banyak yang mati. Sel yang hidup ditandai dengan sel berbentuk lonjong seperti jarum yang saling berdempet dengan sel lainnya dan dinding sel yang terlindungi sehingga terlihat bersinar dan menempel pada dasar wadah kultur. Sedangkan sel yang mati berbentuk bulat, berwarna gelap, tersebar, dan mengapung. Hal ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini :

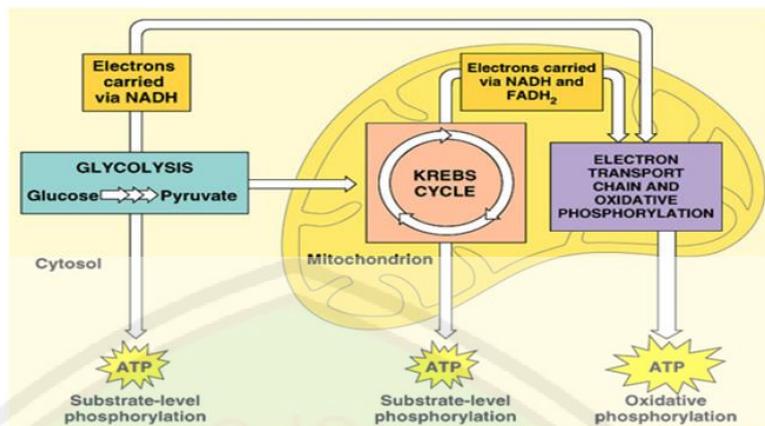


**Gambar 4.4** Kontrol sel WiDr (a), morfologi sel WiDr setelah direaksikan dengan daun bidara arab (b) ekstrak etanol (c) fraksi kloroform (d) fraksi n-heksan



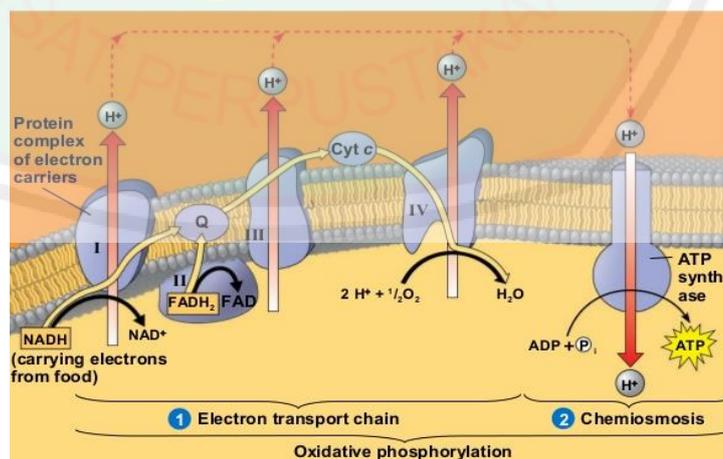
**Gambar 4.5** Kontrol sel Vero (a), morfologi sel Vero setelah direaksikan dengan daun bidara arab (b) ekstrak etanol (c) fraksi kloroform (d) fraksi n-heksan

Prinsip uji sitotoksik dengan metode MTT adalah kemampuan sel hidup mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan. Ditandai dengan perubahan warna yang terjadi karena adanya reaksi redoks di dalam mitokondria sel. Prinsip dari reaksi redoks ini yaitu adanya transfer satu atau lebih elektron dari satu reaktan ke reaktan yang lain. Kemampuan reduksi ini ditunjukkan oleh enzim NADH dehidrogenase mitokondria pada sel yang masih melangsungkan proses respirasi sel hidup. Respirasi adalah reaksi katabolisme yang memecah molekul-molekul gula menjadi molekul anorganik berupa  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$  yang terdiri dari tiga tahap metabolik, yaitu glikolisis, siklus asam sitrat dan fosforilasi oksidatif. Berikut ini merupakan gambar respirasi sel secara umum (Campbell A. Neil & Reece B. Jane., 2008) :



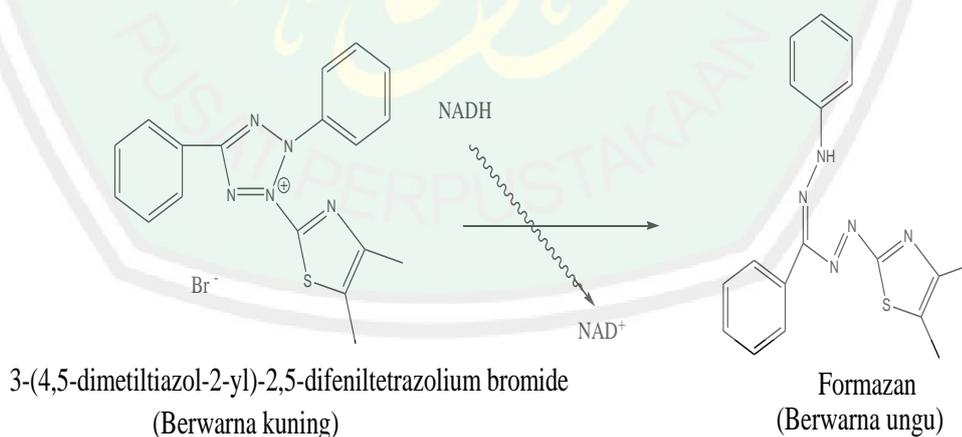
**Gambar 4.6** Proses respirasi sel secara umum (Campbell A. Neil & Reece B. Jane., 2008)

Reaksi redoks antara proses glikolisis dan siklus asam sitrat terjadi pada proses respirasi sel. Proses tersebut terjadi ketika enzim dehidrogenase mentransfer elektron dari substrat ke  $\text{NAD}^+$  yang membentuk  $\text{NADH}$ . Setelah itu, rantai transport elektron menerima elektron dari penguraian produk. Sebagian besar komponen rantai transport elektron adalah protein yang menjadi kompleks multiprotein dan diberi nomor I sampai IV.



**Gambar 4.7** Proses transport elektron (Campbell A. Neil & Reece B. Jane., 2008)

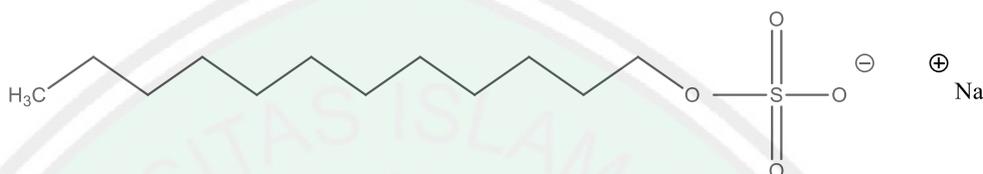
Proses pemecahan garam tetrazolium menjadi formazan terjadi dengan adanya enzim NADH *dehydrogenase* pada kompleks I. Enzim NADH *dehydrogenase* yang mereduksi NADH menyebabkan terjadinya perubahan warna pada reaksi MTT. Enzim NADH *dehydrogenase* akan mereduksi NADH sehingga melepas  $H^+$  pada NADH yang kemudian berikatan dengan tetrazolium. Hal ini menyebabkan pemutusan ikatan (pemecahan) sehingga dapat membuka cincin tetrazolium (berwarna kuning pucat) dan mengubah bentuk menjadi formazan (berwarna ungu). Sumber elektron lain untuk transport elektron adalah  $FADH_2$  yang dihasilkan pada kompleks II dalam proses transport elektron, namun energi yang dihasilkan lebih rendah dari NADH sehingga penyumbang elektron utama adalah NADH. Hal ini juga didukung oleh Berridge, M.V., dkk., (2005) yang menyatakan bahwa secara umum, NADH dan NADPH adalah donor elektron yang lebih efisien daripada suksinat atau glutathione, atau agen pereduksi kimiawi, dithiothreitol atau mercap-toethanol.



**Gambar 4.8** Reaksi MTT (Sukhramani, dkk., 2011)

Tetrazolium formazan tidak larut dalam air, sehingga perlu ditambahkan reagen natrium dodesil sulfat 10 % dalam HCl 0,1 N. Natrium dodesil sulfat 10 %

dalam 0,1 N HCl sebagai penghambat pembentukan kristal sebelum dianalisis. Reagen tersebut akan melisiskan membran sel sehingga kristal formazan dapat keluar dari sel dan melarutkan kristal formazan tersebut.



**Gambar 4.9** Struktur natrium dodesil sulfat (Caligur, 2007)

Natrium dodesil sulfat dapat mendenaturasi polipeptida pada membran sel dengan proses interaksi gugus sulfat bermuatan negatif dengan muatan berlawanan rantai samping asam amino. Ekor hidrofobik dari natrium dodesil sulfat kemudian masuk ke dalam area hidrofobik protein dan mulai menghancurkan atau merusak struktur protein dalam membran sel sehingga kristal formazan dapat larut dan keluar dari sel (Caligur, 2007).

Pembentukan kristal formazan diukur absorbansinya dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm (CCRC, 2009). Penggunaan panjang gelombang 595 nm karena warna yang dihasilkan dari larutan ini adalah ungu kebiruan yang akan menyerap warna kuning dari spektrum sinar tampak (Effendy, 2007). Absorbansi yang dihasilkan dan intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Semakin pekat warna ungu yang dihasilkan dan semakin besar nilai absorbansinya, maka semakin banyak sel yang hidup. Tetapi apabila warna yang dihasilkan pucat (kuning), maka hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak sel yang mati.

Hasil perhitungan prosentase sel hidup yang ditunjukkan pada Lampiran 4.7 kemudian dilakukan analisis regresi linier menggunakan aplikasi komputer Ms.Excel untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  pada setiap sampel.

**Tabel 4.2** Nilai  $IC_{50}$  Daun Bidara Arab terhadap Sel WiDr dan Sel Vero

Sampel	$IC_{50}$ (ppm)	
	Sel WiDr	Sel Vero
Ekstrak etanol	83,459	218,143
Fraksi	93,564	256,448
Fraksi n-heksan	131,933	275,647

**Tabel 4.3** SI (*Selectivity Index*) Daun Bidara Arab terhadap Sel WiDr

Sampel	$IC_{50}$ WiDr (ppm)	$IC_{50}$ Vero (ppm)	SI ( <i>Selectivity Index</i> )
Ekstrak etanol	83,459	218,143	2,614
Fraksi kloroform	93,564	256,448	2,741
Fraksi n-heksan	131,933	275,647	2,089

Pada tabel 4.2 menunjukkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak daun bidara arab terhadap sel kanker WiDr maupun sel normal Vero yang telah diuji sitotoksitasnya menggunakan metode MTT. Hal ini untuk mengetahui tingkat selektifitas dari senyawa yang terkandung dalam daun bidara arab terhadap proses penghambatan sel kanker kolon. Untuk mengetahui nilai selektivitas, maka perlu dicari nilai SI (*Selectivity Index*) dari masing-masing sampel, yaitu dengan cara membagi nilai  $IC_{50}$  dari sel Vero dengan nilai  $IC_{50}$  dari sel WiDr yang ditunjukkan pada tabel 4.3. Dari hasil perhitungan diketahui bahwa ekstrak etanol, fraksi kloroform, maupun fraksi n-heksan memiliki nilai  $SI < 3$ . Menurut Prayong,dkk (2008) ekstrak bersifat selektif apabila memiliki nilai selektifitas indeks yang lebih besar dari 3. Maka dari ketiga

sampel yang telah diuji sitotoksitasnya terhadap sel kanker WiDr dan sel Vero menunjukkan bahwa daun bidara arab bersifat tidak selektif.

Berdasarkan hasil uji fitokimia, diketahui bahwa ekstrak etanol mengandung alkaloid, flavonoid, dan tanin. Flavonoid telah banyak diketahui merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antikanker, sehingga diduga senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol daun bidara arab yang menyebabkan ekstrak ini memiliki aktivitas antikanker. *Screening* pengaruh flavonoid terhadap proliferasi sel dan potensi sitotoksitas telah dilakukan pada lebih dari 30 senyawa terhadap sel kanker kolon jenis Caco-2 dan HT-29. Hampir semua senyawa menunjukkan aktivitas antiproliferatif tanpa efek sitotoksitas. Hubungan antara struktur kimia dengan aktivitas antiproliferatif (SAR = *Structure Activity Relationship*) juga telah dibuktikan berdasarkan subkelas flavonoid yaitu isoflavon, flavon, flavonol, dan flavonon (Rahayu, 2017).

Setelah dilakukan analisis LC-MS terhadap ekstrak etanol diketahui bahwa senyawa kuersetin yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Pada penelitiannya Eun, *et al* (2008) menyebutkan bahwa kuersetin secara signifikan mampu menghambat proliferasi sel dan menginduksi *cell cycle arrest* serta apoptosis pada sel kanker payudara MDA-MB-453. Kuersetin dipercaya memiliki kemampuan untuk menghambat perkembangan sel kanker dengan cara menginduksi mekanisme apoptosis dan proliferasi sel. Eun Jeong Choi *et al* menjelaskan bahwa kuersetin mampu menghambat proliferasi sel MDA-MB- 453 dengan konsentrasi 1-100  $\mu\text{M}$  pada waktu 3, 6, 12, dan 24 jam.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Kusuma, dkk (2010) kuersetin diketahui memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr, dengan nilai IC50 sebesar 1046  $\mu$ M. Kuersetin dapat memacu proses apoptosis pada sel kanker kolon WiDr. Kuersetin dapat menghambat proliferasi sel kanker kolon WiDr.

Sesungguhnya semua tanaman yang ditumbuhkan di bumi oleh Allah SWT adalah tanaman yang memiliki manfaatnya masing-masing baik bagi manusia maupun bagi makhluk hidup lainnya, sebagaimana telah Allah SWT jelaskan dalam al-Qur'an surat Asy-Syu'araa (26) : 7.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? (QS. Asy-Syu'araa [26] : 7).

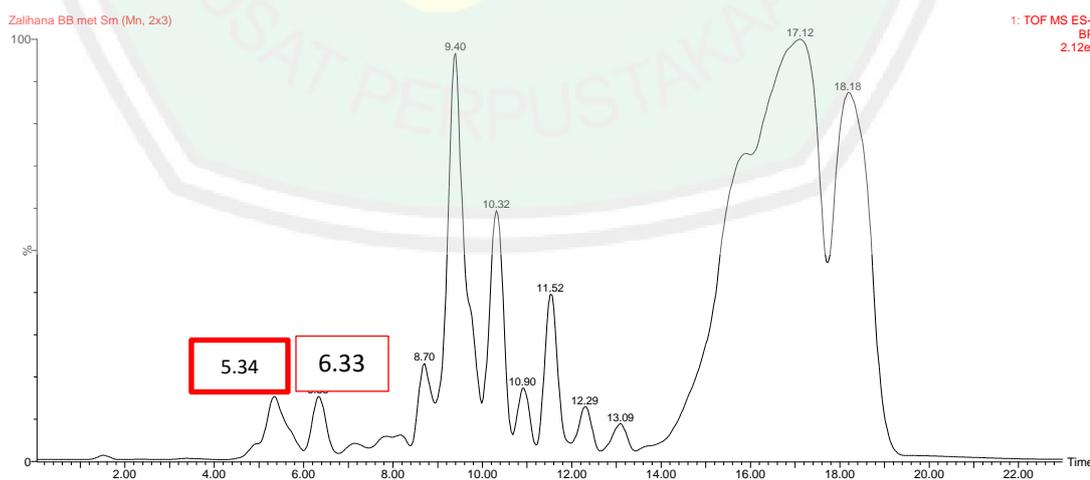
Kata كَرِيمٍ زَوْجٍ كَرِيمٍ berarti beraneka ragam tumbuh-tumbuhan yang mendatangkan manfaat (Shihab, 2002). Ayat ini menjelaskan bahwa Allah menumbuhkan berbagai jenis tumbuhan di bumi ini yang memiliki manfaatnya tersendiri. Salah satu jenis tumbuhan yang ada di bumi ini adalah bidara arab yang memiliki nama ilmiah *Ziziphus spina-christi* L. yang ternyata setelah diuji sitotoksik dengan menggunakan metode MTT pada penelitian ini menunjukkan bahwa tumbuhan ini memiliki aktivitas sebagai antikanker terhadap sel kanker kolon WiDr.

#### 4.7 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan LC-MS

Identifikasi golongan senyawa aktif dengan instrumen LC-MS untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun

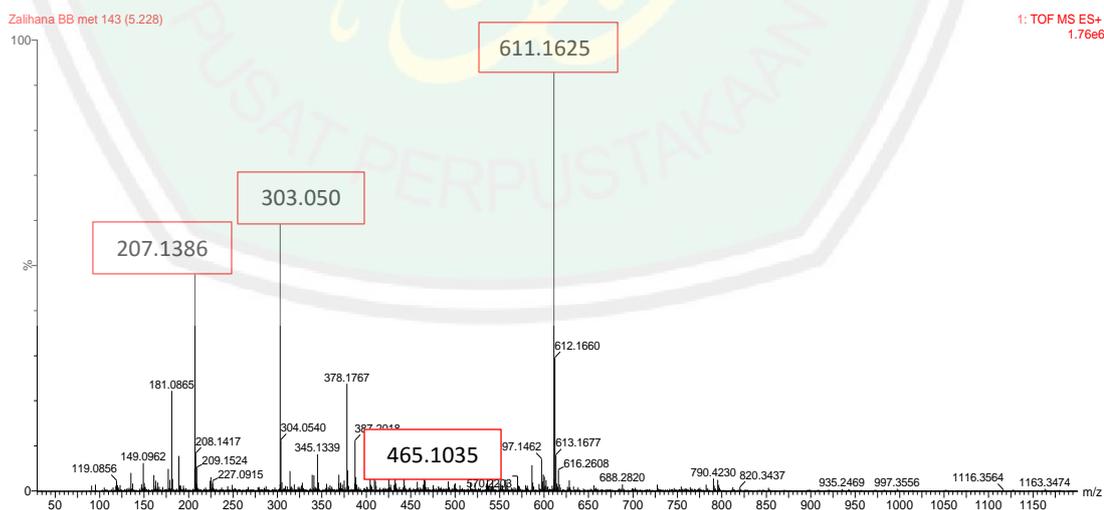
bidara arab. LC-MS adalah teknik yang banyak digunakan untuk berbagai aplikasi yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas sangat tinggi. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometer* menggabungkan kemampuan pemisahan kimia dari LC dengan kemampuan dari spektroskopi massa untuk menyeleksi temuan dan mengkonfirmasi identitas molekuler. MS merupakan salah satu metode yang lebih sensitif dan selektif untuk menganalisis molekuler, serta menyediakan informasi pada berat molekul sebaik pada fragmentasi dari molekul analit (Looi et al, 2013).

Pada analisis ini menggunakan fase diam berupa kolom Sunfire C18, kolom ini merupakan kolom dengan fase terbalik dimana fase diam bersifat non polar dan fase gerak bersifat polar. Fase gerak atau eluen akan berjalan di atas celah atau di atas fase diam yang membawa analit. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini berupa 2 campuran, yaitu air dengan metanol. Kromatogram UPLC hasil pemisahan dari ekstrak etanol dalam Gambar 4.13 di bawah ini :



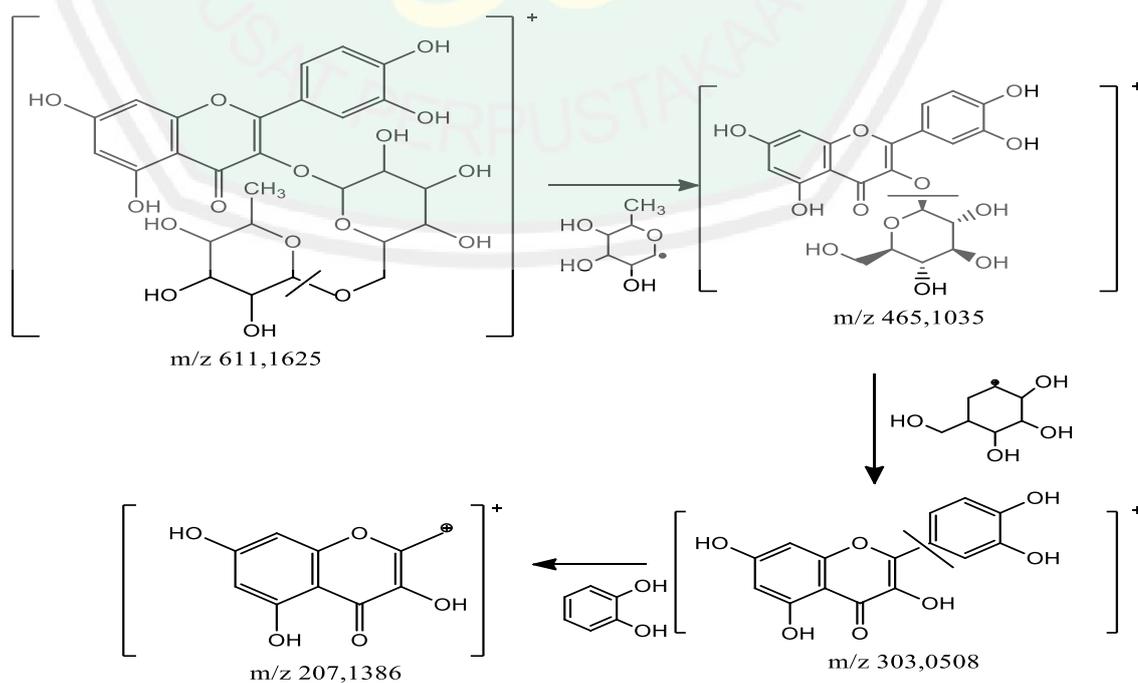
**Gambar 4.10** Kromatogram UPLC hasil pemisahan senyawa dalam ekstrak etanol daun bidara arab

Hasil kromatogram di atas diketahui bahwa terdapat 11 senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun bidara arab, namun yang dapat diidentifikasi hanya 2 puncak. Yaitu pada waktu retensi 5,34 dan 6,33 karena dari hasil kromatogram di atas dapat dilihat bahwa pemisahan kromatogram yang baik pada puncak pertama dan kedua. Kromatogram yang ideal yaitu yang memiliki puncak yang tinggi, ramping dan tidak saling tindih antar satu puncak dengan lain (Day, 2001). Dari kedua puncak ini diduga senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun bidara arab adalah senyawa kuersetin. Kuersetin termasuk golongan senyawa metabolit sekunder flavonoid dengan rumus molekul  $C_{15}H_{10}O_7$  dengan nama 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone. Berdasarkan penelitian Elsadig Karar, dkk (2016) pada analisis daun bidara arab di Sudan menggunakan instrumen LC-MS juga menunjukkan bahwa kuersetin terkandung di dalamnya. Adapun spektra massa dari senyawa kuersetin sebagai berikut :



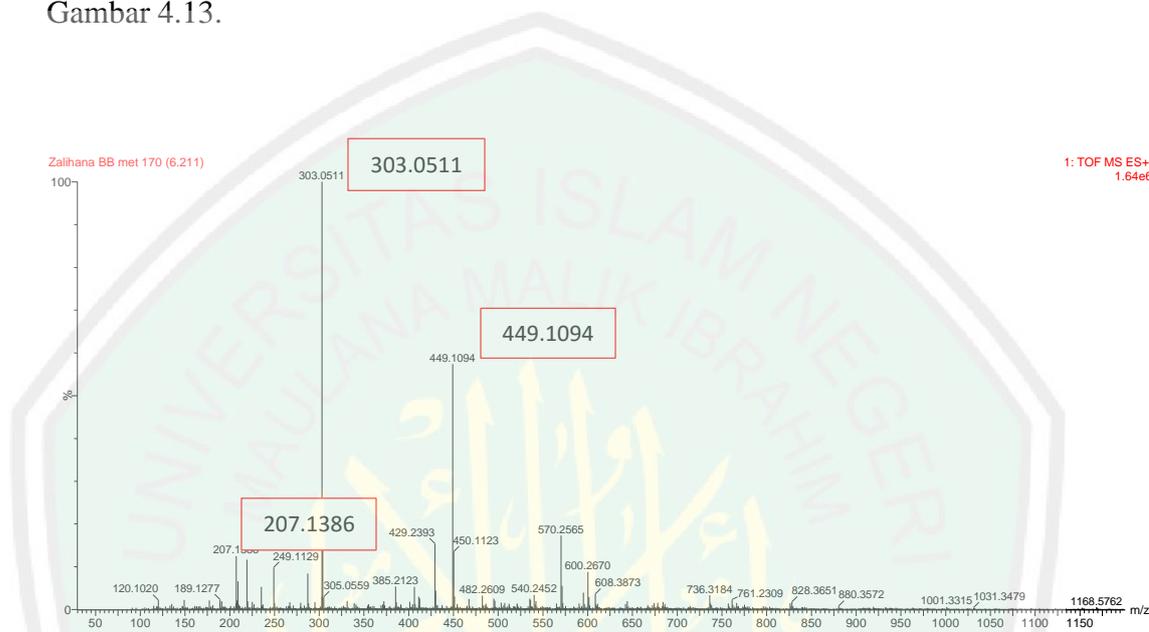
**Gambar 4.11 Spektra massa dari dugaan senyawa kuersetin I**

Berdasarkan spektra massa Gambar 4.11 pada puncak 611,1625 akan terfragmentasi menjadi  $m/z$  465,1035;  $m/z$  303,0508 dan  $m/z$  207,1386. Jika harga kedua puncak spektra massa tersebut diasumsikan sebagai  $[M+H]^+$ , maka harga  $m/z$  sebenarnya dari masing-masing puncak tersebut, berturut-turut adalah 610,1546; 464,0956; 302,0429; dan 206,1307. Puncak pertama dengan intensitas puncak yang besar (100%) diduga senyawa rutin yang kemudian melepas ramnosa ( $C_6H_{12}O_5$ ) sehingga membentuk senyawa isokuersetin dengan intensitas puncak relative besar (68%). Senyawa rutin merupakan glikosida dari senyawa kuersetin yang banyak terdapat pada tumbuhan dengan rumus molekul  $C_{27}H_{30}O_{16}$ . Dan senyawa isokuersetin sendiri banyak ditemukan di berbagai tanaman seperti mangga, apel, daun pagoda, dan daun srikaya. Senyawa isokuersetin diketahui memiliki efek antikanker bagi sel kanker fibrosarcoma, kanker prostat, kanker pankreas, kanker payudara, kanker limfoma, kanker hati, kanker otak, maupun kanker kolon (Orfali GC, dkk., 2016). Gambar 4.12 menunjukkan proses terfragmentasinya senyawa rutin hingga menjadi senyawa kuersetin.



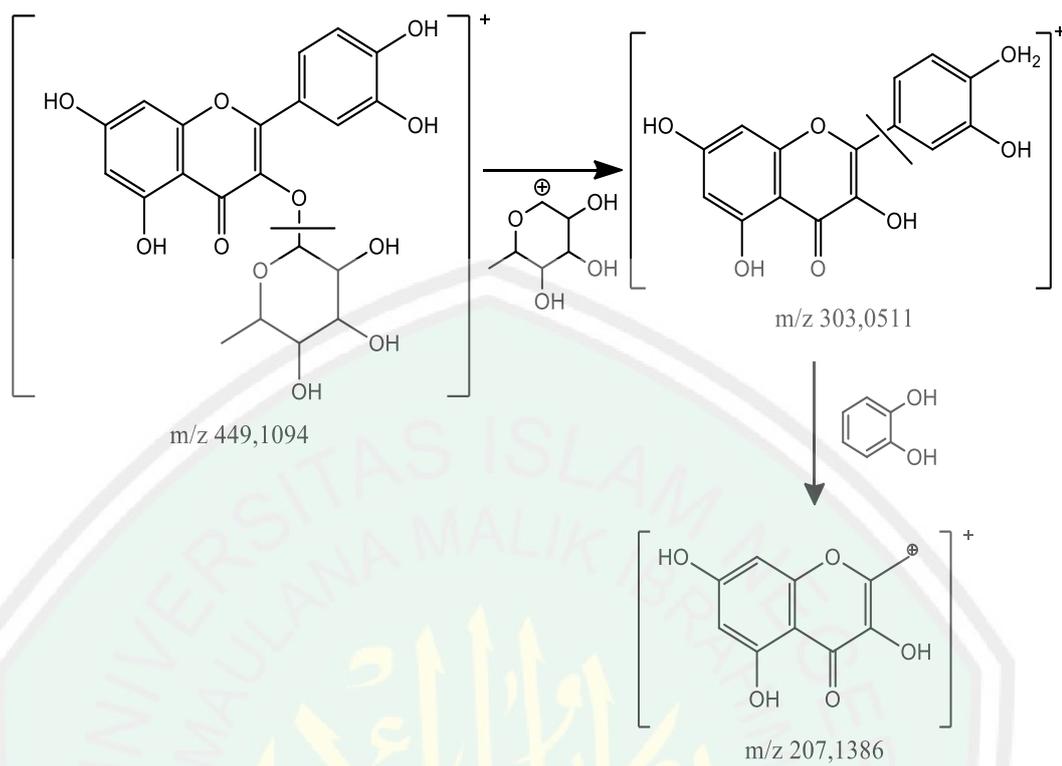
**Gambar 4.12** Fragmentasi dugaan senyawa kuersetin I  
 Pada puncak kedua, yaitu pada waktu retensi 6,33 juga diduga

merupakan senyawa kuersetin yang memiliki spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.13.



**Gambar 4.13** Spektra massa dari dugaan senyawa kuersetin II

Gambar 4.13 menunjukkan spektra massa pada puncak 1 dengan berat molekul 449,1094 dan intensitas puncak sebesar 60%, senyawa ini diduga merupakan golongan senyawa flavonoid, yaitu kuersetin-3-O-rhamnoside. Senyawa kuersetin-3-O-rhamnoside kemudian terfragmentasi menjadi senyawa kuersetin yang memiliki berat molekul yang lebih kecil yaitu 303,0511 dengan intensitas puncak 100%. Puncak m/z 303,0511 mengalami fragmentasi menjadi m/z 207,1386. Hal ini sama dengan fragmentasi yang terjadi pada dugaan senyawa kuersetin I. Bila harga spektra massa ini diasumsikan sebagai  $[M+H]^+$ , maka harga sebenarnya adalah 448,1015; 302,0432; dan 206,1307.



Gambar 4.14 Fragmentasi dugaan senyawa kuersetin II

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol, fraksi kloroform, dan fraksi n-heksan daun bidara arab (*Ziziphus spina-christi* L.) terhadap sel kanker WiDr berturut-turut yaitu 83,459; 93,564; dan 131,933 µg/mL. Sedangkan pada sel normal Vero memiliki nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut adalah 218,143; 256,448; dan 275,647 µg/mL. Ekstrak etanol memiliki aktivitas sebagai antikanker yang lebih baik dibandingkan fraksi kloroform maupun fraksi n-heksan, sehingga ekstrak etanol dilakukan analisis LC-MS untuk mengetahui senyawa aktifnya.
2. Identifikasi golongan senyawa aktif yang dilakukan dengan uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bidara arab mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid. Sedangkan pada analisis menggunakan instrumen LC-MS diperoleh 11 puncak tetapi yang mengalami pemisahan terbaik hanya 2 puncak yaitu keduanya merupakan dugaan senyawa kuersetin.

#### **5.2 Saran**

Untuk penelitian lebih lanjut sebaiknya dilakukan uji antikanker dengan menggunakan senyawa kuersetin standar yang dibandingkan dengan ekstrak daun bidara arab. Untuk membandingkan kemampuan antikanker dari senyawa kuersetin sendiri dengan ekstrak daun bidara arab.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abalaka ME, Daniyan SY, Mann A. 2010. Evaluation of the antimicrobial activities of two *Ziziphus* species (*Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spina-christi* L.) on some microbial pathogens. *Afr J pharm pharmacol*, 4(1): 135-9.
- Abdel-Wahhab, M.A. Omara, E.A. Abdel-Galil, M.M. Hassan, N.S. Somaia, Nada, A. Saeed, A. and Elsayed, M. 2007. *Zizyphus spina-christi* extract protects against aflatoxin B1-initiated hepatic cacenogenicity *Afr. J. Trad. CAM* , 4 (3): 248-256.
- Abdel-Zaher, A.O. Salim, S.Y. Assaf, M.H. and Abdel-Hady, R.H. 2005. Antidiabetic Activity and Toxicity of *Zizyphus spina-chriti* Leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1): 129-138.
- Abraham. 2007. *Penuntun Praktikum Kimia Organik II*. Kendari: Universitas Haluoleo.
- Adzu B, Haruna AK. 2007. Studied on the use of *Ziziphus spina-christi* against pain in rats and mice. *Afr. J. Biotechnol*, 6(11), 1317-1324
- Agilent Technologies.2001. Agilent LC-MS Primer. U.S.A 5988-2045EN.
- Allan, Ali.E.A. 2012. *Ziziphus spina-christi* “Christ’s Thorn”: *In Vitro* Callus and Cell Culture, Qualitative Analysis of Secondary Metabolites and Bioassay. *Palestine Polytechnic*. University Deanship of Higher Studies and Scientific Research.
- Ariati, V. 2015. Uji Sitotoksisitas dan Apoptosis Ekstrak Kloroform Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr.) Terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr *In Vitro*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Avizeh, R. Najafzadeh, H. Pourmahdi, M. and Mirzaee, M. 2010. Effect of Glibenclamide and Fruit Extract of *Zizyphus spina-christi* on Alloxan Induced Diabetic Dogs. *Intern J Appl Res Vet Med*, 8(2).
- Bowers LD. 1989. *High-performance liquid chromatography/mass spectrometry: state of the art for the drug analysis laboratory*. *Clin Chem* 35(2): 1282–7.
- Brown, D. 1995. *Encyclopaedia of herbs and their uses*. London: dorling kindersley.
- CCRC, 2009.,Protokol In Vitro,Cancer Chemoprevention Research Center, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada,Yogyakarta.
- Chahar, M.K., Sharma, N., Mahabeer, P.D., Yogesh, C.J. 2011. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev*. 5(9): 1–12.

- Chen, T.R., Drabkowski, D., Hay, R.J., Macy, M. and Peterson, W. Jr., 2007. WiDr is a Derivative of Another Colon Adenocarcinoma Cell Line, HT-29, *Cancer Genet Cytogenet.* 27(1):125-34.
- Ciddi V, Kaleab A. 2005. Antioxidants of plant origin. *J Nat Prod* 21(3): 3-17.
- Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK., 2010. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl cancer Inst*;85:570-574.
- Covey TR, Lee ED, Henion JD. 1986. High-speed liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of drugs in biological samples. *J. Anal Chem*;58(2): 2453-60.
- Dafni, A. Levy, S. and Lev, E. 2005. The Ethnobotany of Christ's thorn Jujube (*Ziziphus spina-christi*) in Israel, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 1(8).
- Departemen Kesehatan RI (Depkes RI). 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Halaman 266.
- Departemen Kesehatan RI (Depkes RI). 2009. *Profil Kesehatan Indonesia 2008*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Ditjen POM. 1986. *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Halaman 169-171.
- Djamil, Ratna., Tria Anelia.(2009). Penapisan Fitokimia, Uji BSLT, dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol beberapa Spesies Papilionaceae. ISSN 1693-1831.7(2) : 65-71.
- Elia G, Amici C, Rossi A, Santoro MG. 2009. Modulation of prostaglandin A1-induced thermotolerance by quercetin in human leukemic cells: role of heatshock protein 70. *cancer Res*;56:210-217.
- Elsadig, K, Laura Q, Ahmed R, Rakesh J, Maren R. 2016. Phenolic Profile and In Vitro Assessment of Cytotoxicity and Antibacterial Activity of *Ziziphus spina-christi* Leaf Extracts. *Med chem (Los Angeles)* 2016, 6:3
- Eun Jeong Choi, Su Mi Bae, and Woong Shick Ahn., 2008, Antiproliferative Effects of Kuersetin through Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells, *Arch Pharm Res* Vol 31, No 10, 1281-1285.
- Farmani, Fatemeh., Mahmoodreza Moein., Amir Amanzadeh., Hirsra Mastafapour kandelous. 2016. Antiproliferative Evaluation and Apoptosis Induction in MCF-7 Cells by *Ziziphus spina christi* Leaf Extracts. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(3).

- Febriani, Diana., Dina Mulyanti., Endah Rismawati. 2015. Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn). Prosiding Penelitian Sivitas Akademika Unisba (Kesehatan dan Farmasi) Prodi Farmasi Fakultas MIPA Unisba. ISSN 2460 -64
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. 2013. *Global cancer burden rises to 14,1 million new cases in 2012. Incidence and Mortality Worldwide*:IARC Cancer Base. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer
- Fessenden RJ, Fessenden JS. 1986. *Kimia Organik*. Cetakan Ketiga. Diterjemahkan oleh Pudjatmaka AH. Bandung: ITB Press.
- Gandjar, G.H., dan Rohman, A., (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar: Yogyakarta.
- Ghannadi A, Tavakoli N, dkk. (2013). Volatile constituents of the leaves of *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. from Bushehr, Iran. *J Essen Oil Res*, 15(2): 191-198.
- Giovannetti, E., Backus, H.H.J., Wouters, D., Ferreira, C.G., van Houten, V.M.M. and Brakenhoff, R.H., 2007, Changes in the Status of p53 Affect Drug Sensitivity to Thymidylate Synthase (TS) Inhibitors by Altering TS Levels, *British J. Can.*, 96(3): 769-775.
- Godini, A. Kazem, M. Naseri, G. and Badavi, M. 2009. The Effect of *Zizyphus spina-christi* Leaf Extract on the Isolated Rat Aorta. *J Pak Med Assoc*, 59(8).
- Goncalves, E.M., Ventura, C.A., Yano. T., Macedo, M.L.D., dan Ganeri, S.C.2009. Morphological and growth alterations in Vero Cells Transformed by Cysplatin. *Cell Biol*. 30(6): 485-494.
- Hansen RK, Oesterreich S, Lemieux P,. 2007. Quarcetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*;239:851-856.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan kedua*. Penerjemah: Padmawinata K, Soediro I. Bandung: ITB
- Hendayana, Sumar. 2006, *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektrolisis Modern*, Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Him-Che Y. 1985. *Handbook of Chinese herbs and formulas*. Los Angeles, CA: Institute of Chinese Medicine.

- Hofmann J, Fiebig HH, Winterhalter BR,. 2010. Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum(II) by quercetin. *Int J cancer*;45:536-539.
- Hossain, M., Dillip R, Nigel B, Ana B, Catherine B. 2010. Characterization of Phenolics Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem* , 58 (19), pp 10576–10581
- Jafarian A, Zolfaghari B, Shirani K 2014. Cytotoxicity of different extracts of arial parts of *Ziziphus spina-christi* on HeLa and MDA-MB-468 tumor cells. *Adv Biomed Res*, 3(38).
- Jansen, W.J.M., Zwart, B., Hulscher, S.T.M., Giaccone, Pinedo, H.M. and Boven, E., 2009, CPT-11 in Human Colon-Cancer Cell Lines and Xenografts: Characterization of Cellular Sensitivity Determinants, *Int. J. Cancer*, **70**: 335-340.
- Jong D. Buku Ajar Ilmu Bedah. In: Riwanto Ignatius, Hamami AH, Pieter John, Tjambolang Tadjuddin Ahmadisyah Ibrahim. *Usus Halus, Appendiks, Kolon, dan Anorektum*. Jakarta: EGC, 2013. 731-98.
- Kauffman PB., Lj. Cseke. S. Warber., JA. Duke, HL. Brielman. 1999. *Natural Products from Plants*. Boca Raton: CRC Press.
- Kimman M, Norman R, Jan S, Kingston D, dan Woodward M. 2012. The Burden of Cancer in Member Countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, 13: 411-420.
- Klohs WD, Fry DW, Kraker AJ. 2013. Inhibitors of tyrosine kinase. *Curr Opin Oncol*;9:562-568.
- Koishi M, Hosokawa N, Sato M. 2012. Quercetin, an inhibitor of heatshock protein synthesis, inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line. *Jpn J cancer Res*;83:1216-1222.
- Kristanti, A. N, N. S. Aminah. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Jurusan Kimia Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Airlangga. Hal:47-48.
- Kuhlman MK, Horsch E, Burkhardt G,. 2011. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol*;72:536-540.
- Kurniawati, A dan Tenggara, R. 2011. Pengaruh Asam Asetil Salisilat terhadap Penurunan Prevalensi Kanker Kolorektal. *J. CDK*. 186: 38(5): 350-352.

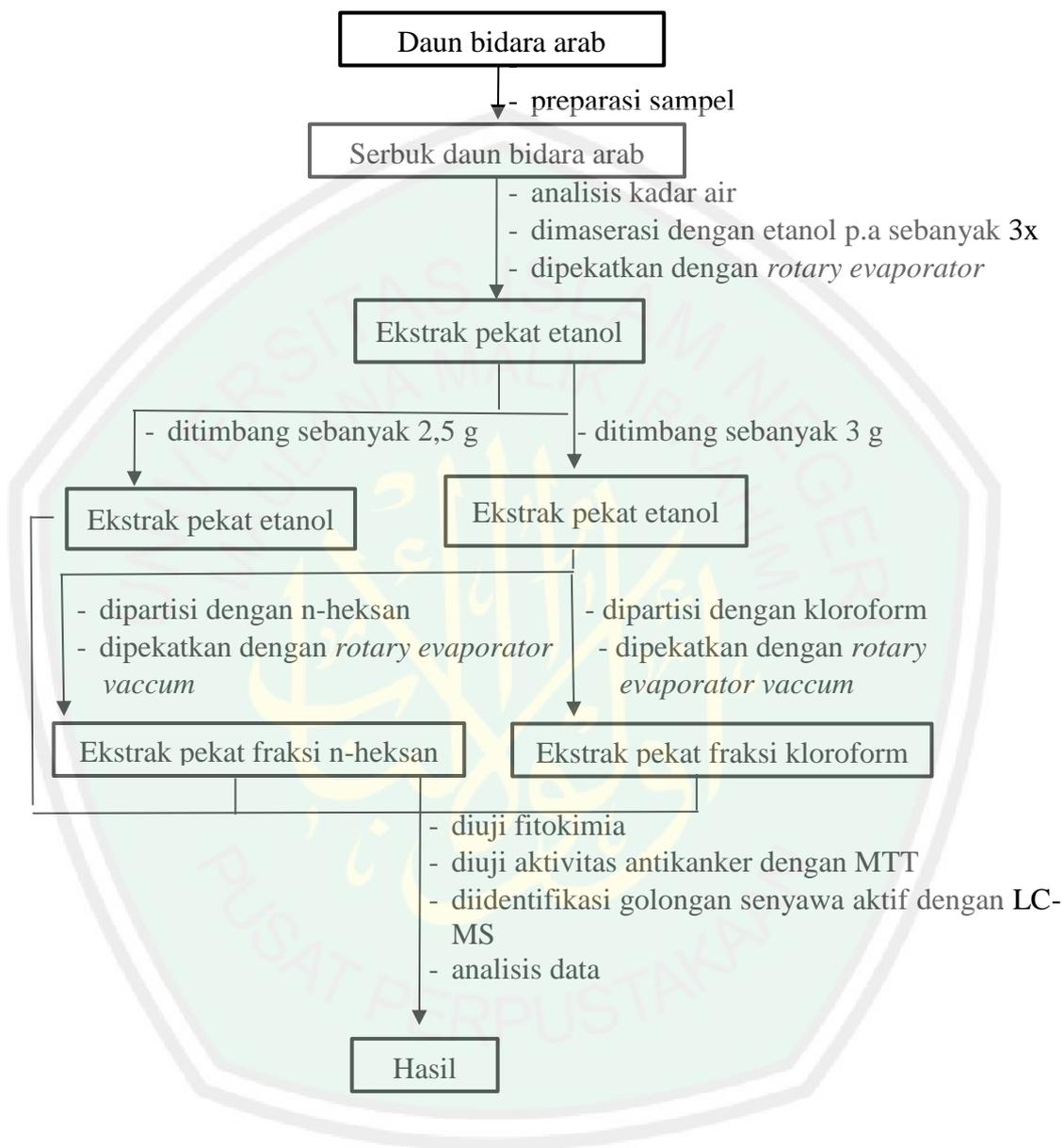
- Kusriani, H. R., As'ari, N., Eko, M. 2015. Penetapan Kadar Senyawa Fenolat Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun, Buah, dan Biji Bidara (*Ziziphus spina-Cristi L.*). *Prosiding SNaPP2015*. Kesehatan. pISSN 2477-2364, eISSN 2477-2356.1(1): 7-15.
- Kusuma, A.W., Nunuk A. N., Dwi H. 2010. Efek Sitotoksik dan Antiproliferatif Kuersetin pada Sel Kanker Kolon WiDr. *Pharmacy*, ISSN:1693-3591. Vol.07.No.03.
- Kusumaningtyas, E., Astuti, E., Darmono, 2008, Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan *Overlay* dalam Penentuan Senyawa Antikapang, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 6 (2): 75-79.
- Lamson, Davis W, MS, ND, and Brignall, Matthew S. ND. 2000. Antioxidants and cancer III: Quercetin, *Alternative Medicine Review* Volume 5 Number 3
- Lenny, S. 2008. Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Brine Shrimp. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Markham, K R. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung : Intitut Teknologi Bandung.
- Maryati & Sutrisna, EM., 2007, Potensi Sitotoksik Tanaman Ceplukan (*Physalis angulata L.*) Terhadap Sel HeLa, *Pharmacon*, 8 (1), 1-6.
- Michael Vogeser, Christoph Seger. 2008. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory-goals for futher development. *Clinical Biochemistry Rev*; 41: 649-662.
- Mursyidi, A. 1989. Analisis Metabolit Sekunder. Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Nazif, N. M. 2002, Phytoconstituents of *Ziziphus spina-chriti L.* Fruits and their Antimicrobial Activity. *Food Chem*, 76: 77-81.
- Nkondjok, A., Shatenstein, B., Maisonnueuve, P., Ghadirian, P. 2003. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detection and Prevention*. 27: 55-66.
- Noguchi, P., Wallace, R., Johnson, J., Early, E.M., O'Brien, S. and Ferrone, S., 1979, Characterization of the WiDr: a Human Colon Carcinoma Cell Line, *In Vitro*, 15(6):401-408.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. 2001. *Thompson and Thompson Genetics in Medicine 6th ed.*, Philadelphia: WB Saunders Company.

- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. 2009. Agroforestree Database, a tree reference and selection guide version 4.0.
- Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Giuseppe, T., Navarra, P. and Ranelletti, F.O. 2005.  $\beta$ -Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-a-Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells, *J.Nutr.*, **135**: 129-136.
- Pezzoli A, Matarese V, Rubini M. 2007. Colorectal cancer screening: Result of 5-year program in asymptomatic subjects at increased risk. *Digestive and Liver Disease*.
- Piantelli M, Maggiano N, Ricci R, et al. 2011. Tamoxifen and quarcetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*;105:248-253.
- Plastina P, Bonofiglio D, Vizza D, et al. 2012. Identification of bioactive constituents of Ziziphus jujube fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *J Ethnopharmacol*, 140: 325-338.
- Poedjiadi, A dan F.M.T.Supriyanti. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Rahayu, Muji., Roosmarinto. 2017. Kajian Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Gude (*Cajanus cajan*) Terhadap Sel Kanker Kolon Secara *In Vitro*. *TEKNOLAB*, Vol.6(1): 30-37
- Rahmawati, Emma ., Sukardiman. 2013. Aktivitas Antikanker Ekstrak n-heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Media Farmasi*, 10(2): 47-55
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Rohman, A., Riyanto,S., Utari, D. 2006. Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolat Total, dan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Buah Mengkudu serta Fraksi-Fraksinya. *Jurnal Farmasi Indonesia* 3(17): 137-8.
- Russo MW., Wei JT., Thiny MT.,Gangarosa LM., Brown A., Ringel Y.,et al. 2004. Digestive and liver diseases statistics. *J. Gastroenterology*.126: 1448-53.
- Saied, S. A. Gebauer, J. and Hmmar, K. 2008. *Ziziphus spina-christi* (L.) Wild.: A Multipurpose Fruit Tree. *Genet Resour Crop Evol*, 55: 929-937.
- Seeff, L.C., Pollack, L.A., Williams, K.N. 2006. Increased Use of Colorectal Cancer Tests-United States, 2002 and 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.55: 308-310.

- Siadi. K.2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal Mipa* 35(2): 77-83
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. 2014. Cancer statistics. *CA Cancer .J. Clin.* 64: 9-29.
- Shtayeh, A. M. S. Yaghmour M.R. Faidi Y. R. Salem, K. and Al-Nuri, M.A. 1998, Antimicrobial Activity of 20 Plants Used in Folkloric Medicine in the Palestinian Area. *J. Ethnopharmacol* 60: 265-271.
- Sigmond, J., Backus, H.H., Wouters, D., Temmink, O.H., Jansen, G. and Peters, G.J., 2008, Induction of Resistance to the Multitargeted Antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr Human Colon Cancer Cells is Associated with Thymidilate Synthase Overexpression, *Biochem. Pharmacol* 8(3).
- Taketo MM. 2010. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part II). *J Natl Cancer Inst*;90:1609-620.
- Torre, L.A., Bay, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Tieulent, J.L., Jemal, A. 2015. Global Cancer Statistic. *Ca Cancer J Clin.* 65: 87-108.
- Verma, S.P., Goldin, B.R., and Lin, P.S., 1998, The Inhibition of the Estrogenic Effects of Pesticides dan Enviromental Chemicals by Curcumin and Isoflavonoids, *Envir. Health Presp*, 106(12): 807-812.
- Widyasari, A., Retnoningsih, D., Lassie, N. 2005. Ekstrak Etanol Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl) Meningkatkan Ekspresi Caspase-3 aktif pada *Cell Line* CA Kolon WiDr. 8(2): 112-120.

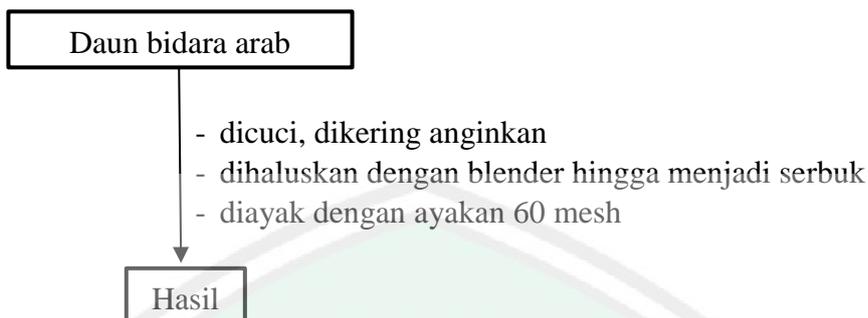
## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Tahapan Penelitian

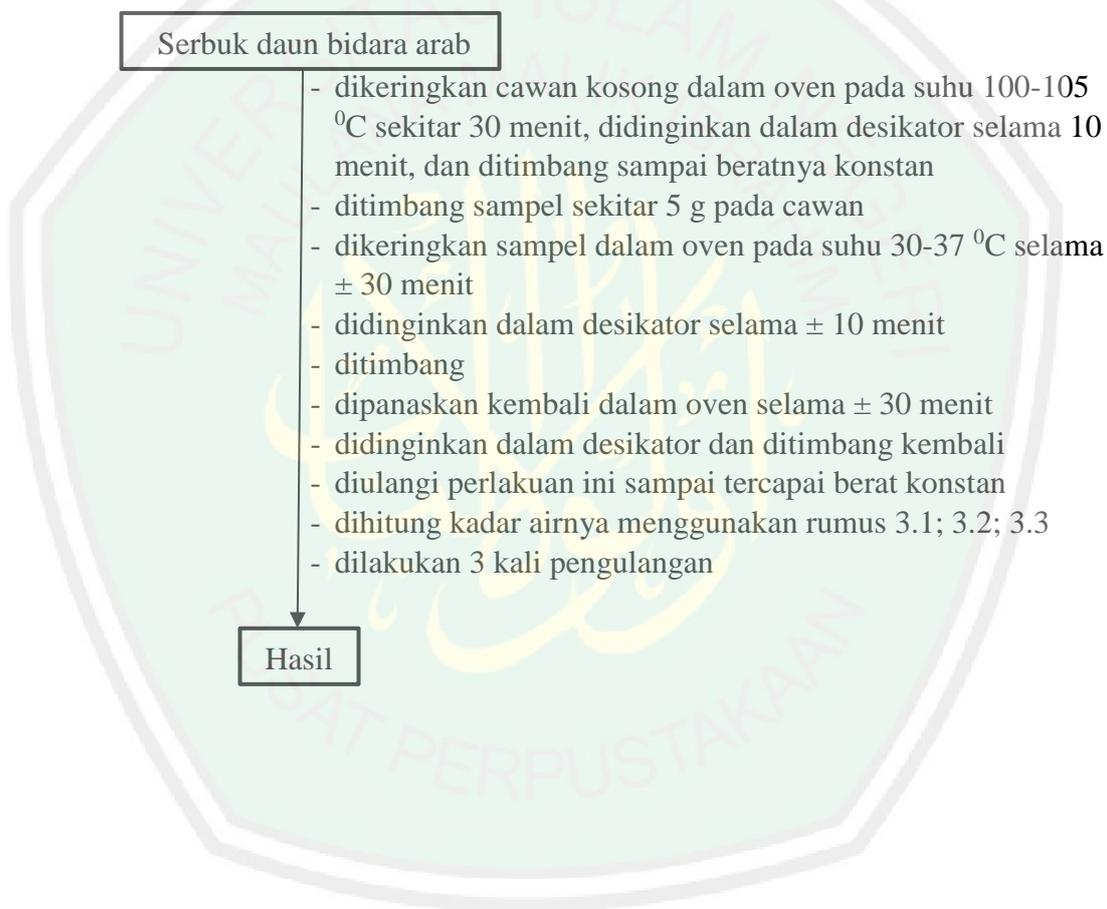


## Lampiran 2. Skema Kerja

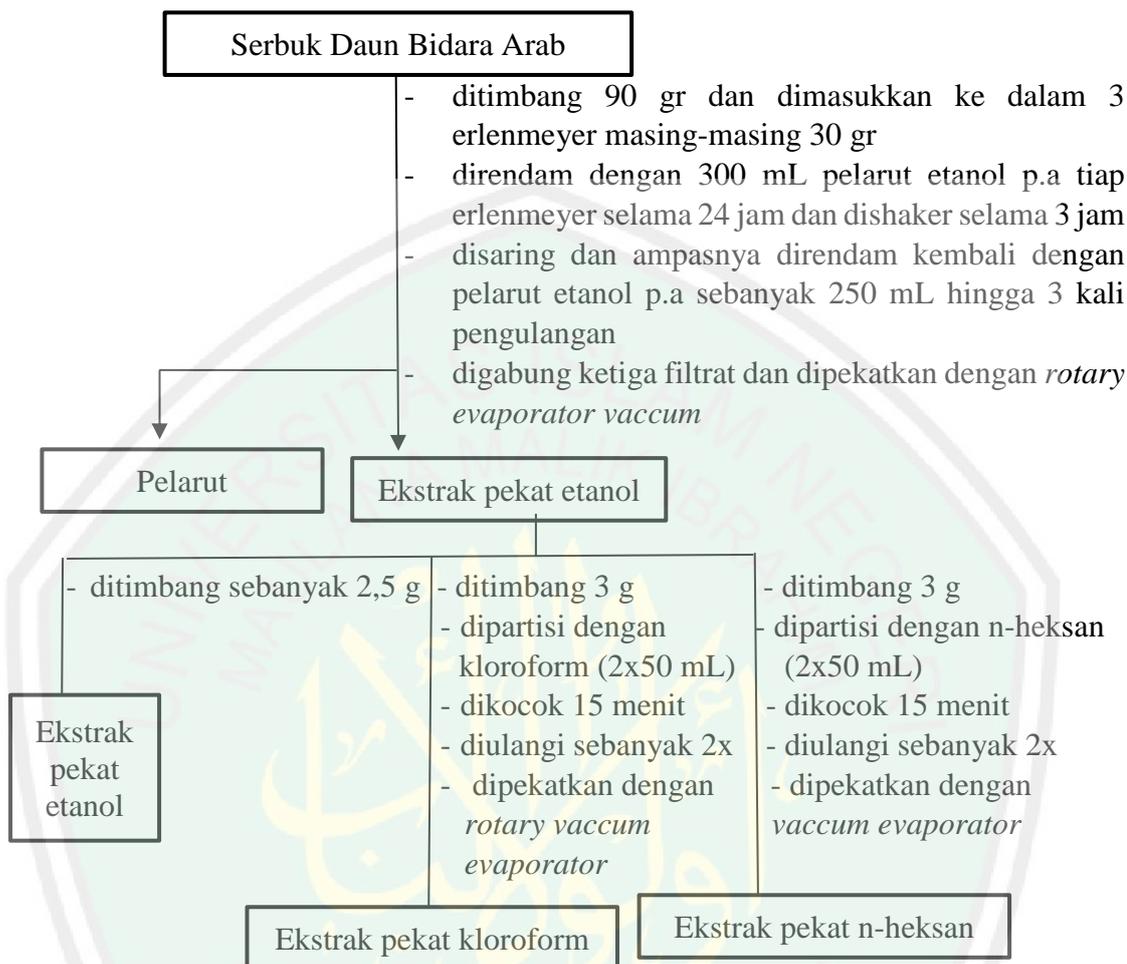
### L.2.1 Preparasi Sampel



### L.2.2 Analisa Kadar Air



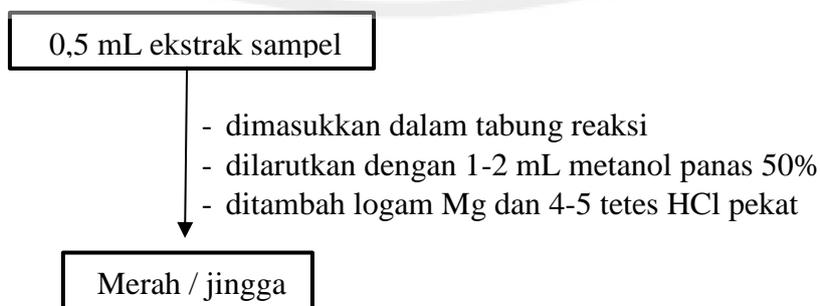
### L.2.3 Ekstraksi Komponen Aktif



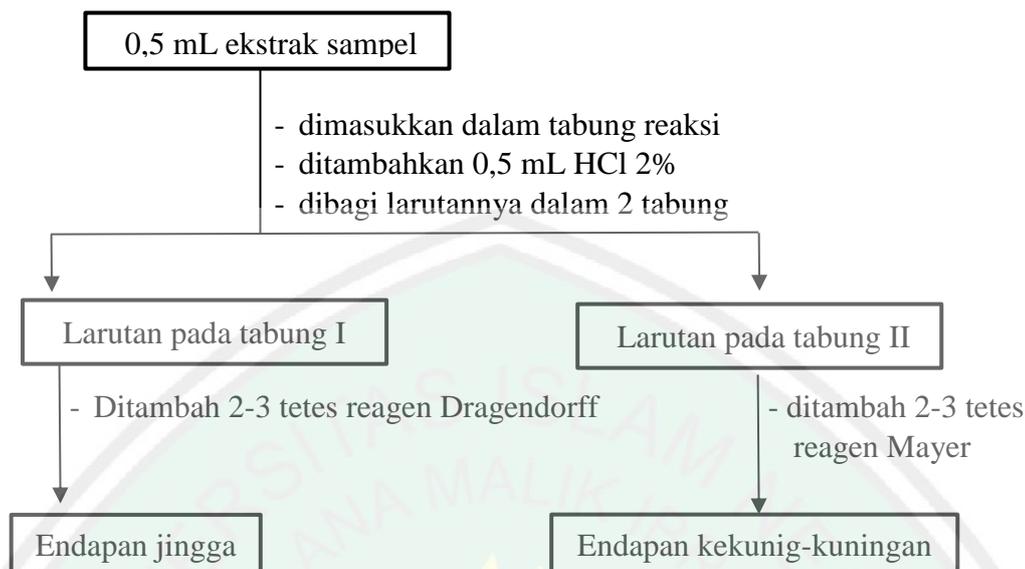
### L.2.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dari ekstrak pekat etanol, ekstrak pekat n-heksan, dan ekstrak pekat kloroform dari daun bidara arab dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya, kemudian dilanjutkan untuk uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan kuinon.

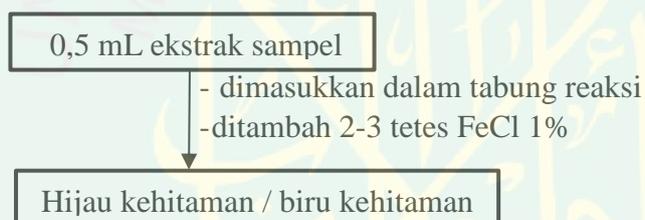
#### L.2.4.1 Uji Flavonoid



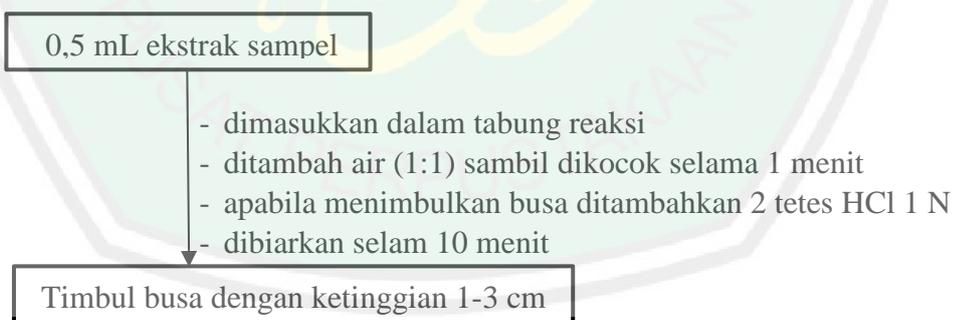
#### L.2.4.2 Uji Alkaloid



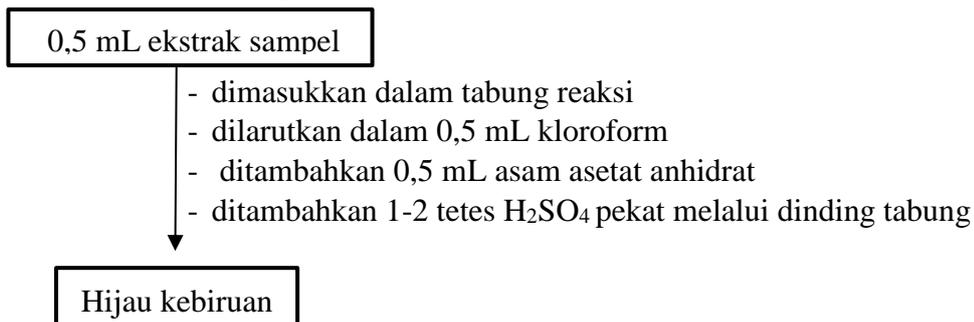
#### L.2.4.3 Uji Tanin



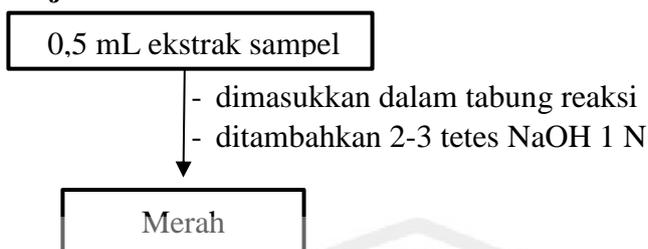
#### L.2.4.4 Uji Saponin



#### L.2.4.5 Uji Steroid/Triterpenoid

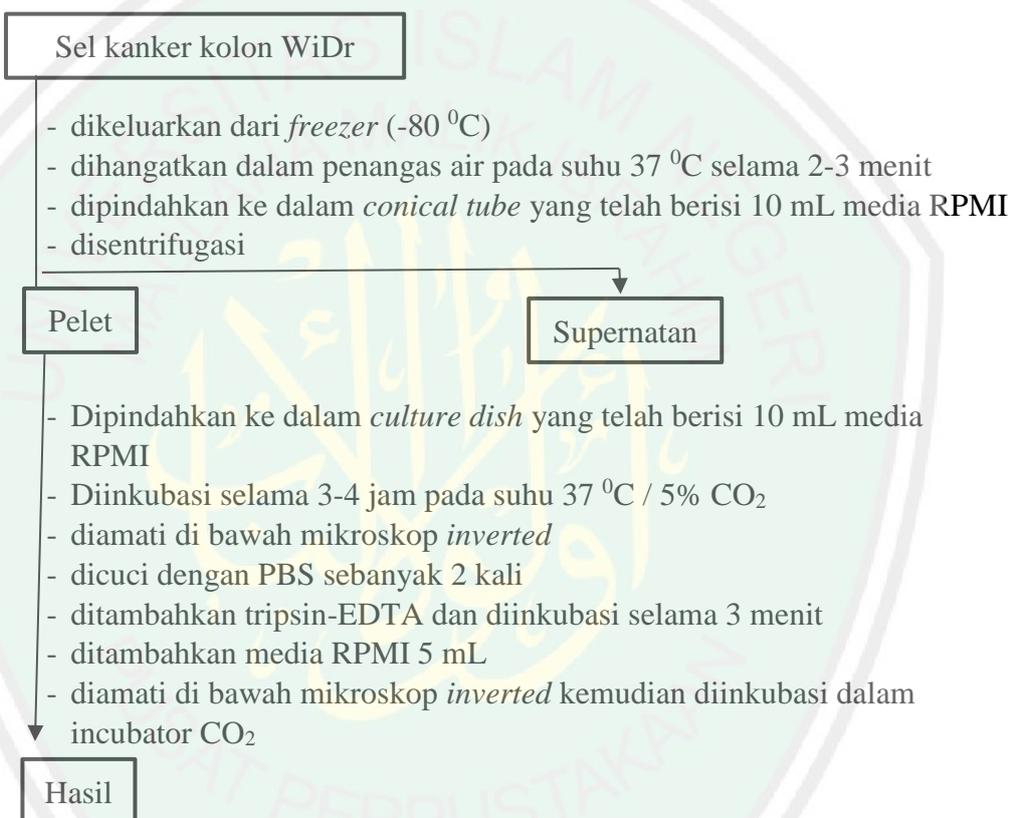


#### L.2.4.6 Uji Kuinon



#### L.2.5 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

##### L.2.5.1 Penyiapan Sel



Sel vero

- dikeluarkan dari *freezer* ( $-80^{\circ}\text{C}$ )
- dihangatkan dalam penangas air pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 2-3 menit
- dipindahkan ke dalam *conical tube* yang telah berisi 10 mL media RPMI
- disentrifugasi

Pelet

Supernatan

- Dipindahkan ke dalam *culture dish* yang telah berisi 10 mL media RPMI
- Diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$
- diamati di bawah mikroskop *inverted*
- dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali
- ditambahkan tripsin-EDTA dan diinkubasi selama 3 menit
- ditambahkan media M199 5 mL
- diamati di bawah mikroskop *inverted* kemudian diinkubasi dalam inkubator  $\text{CO}_2$

Hasil

#### L.2.5.2 Penghitungan Sel Kanker

Sel kanker kolon WiDr

- dipipetkan ke *hemacytometer*
- dihitung di bawah mikroskop *inverted* dengan bantuan *counter*

Hasil

Sel vero

- diambil 10  $\mu\text{L}$
- dipipetkan ke *hemacytometer*
- dihitung di bawah mikroskop *inverted* dengan bantuan *counter*

Hasil

### L.2.5.3 Peletakkan Sel pada Plate

Sel kanker kolon WiDr

- diletakkan sel dan media RPMI sesuai perhitungan ke dalam *plate 96-well*, disisakan 12 sumuran bagian bawah untuk kontrol sel dan media
- diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam

Hasil

Sel vero

- diletakkan sel dan media M199 sesuai perhitungan ke dalam *plate 96-well*, disisakan 12 sumuran bagian bawah untuk kontrol sel dan media
- diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam

Hasil

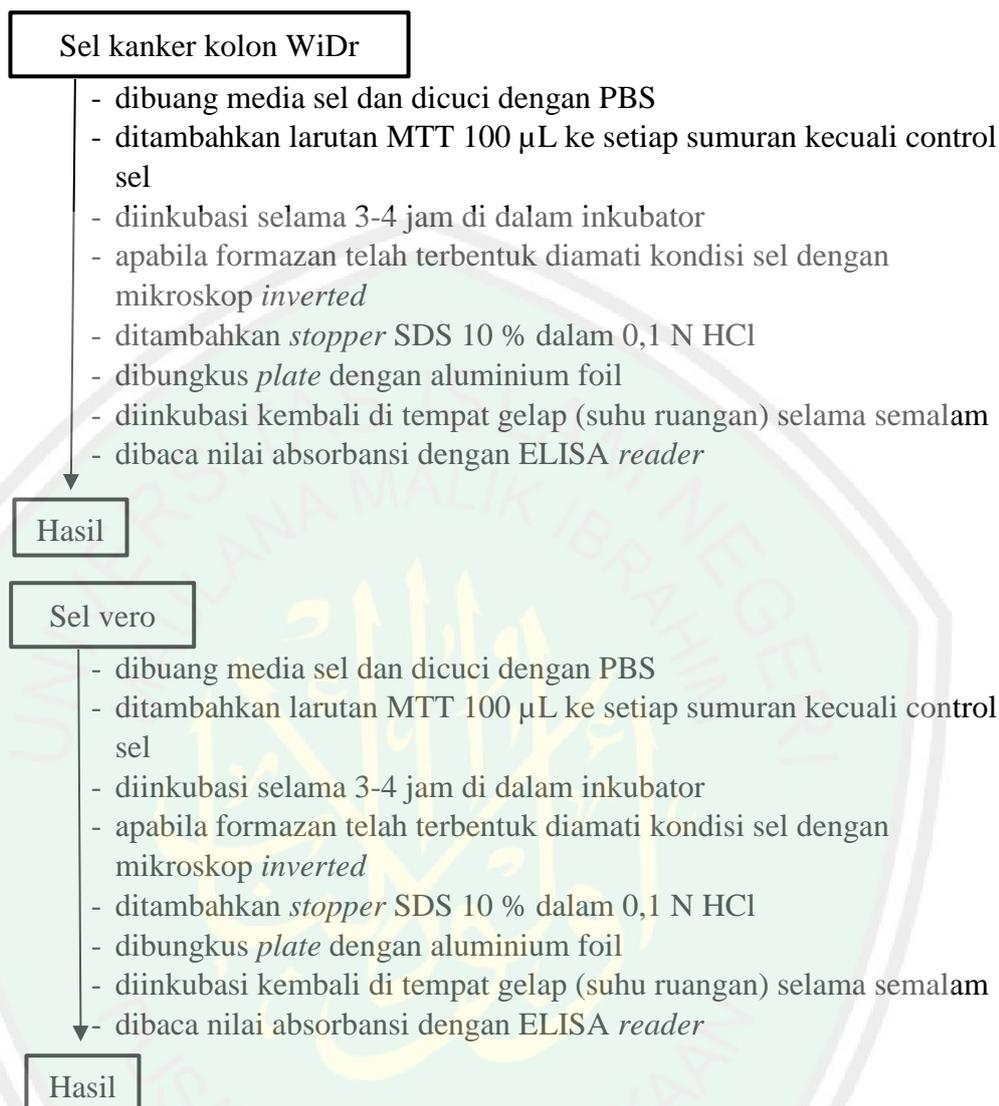
### L.2.5.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada Plate

Masing-masing sampel ekstrak padat

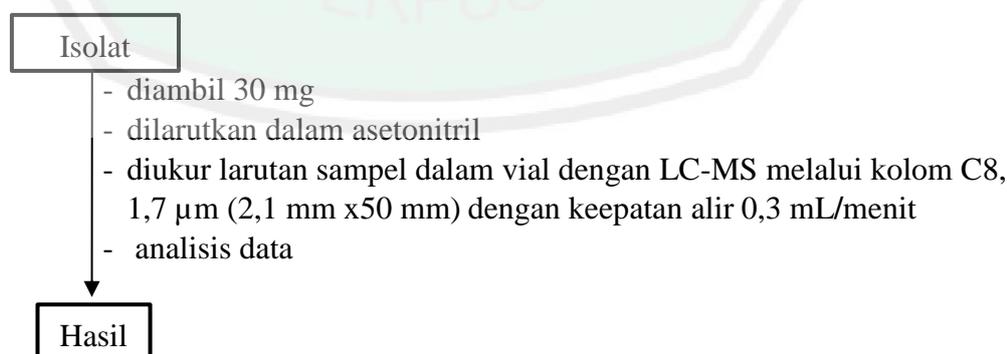
- ditimbang 10 mg dan dimasukkan ke dalam wadah yang berbeda
- dilarutkan masing-masing dalam 10  $\mu$ L DMSO
- diambil sel dari inkubator
- dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate* 180<sup>0</sup>
- dimasukkan 100  $\mu$ L PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali
- dimasukkan sampel sebanyak 100  $\mu$ L dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90625 ppm
- dilakukan pengulangan penambahan konsentrasi sampel sebanyak 3 kali
- dilakukan pemberian sampel pada sel kanker dan sel vero
- diinkubasi kembali selama 24 jam

Hasil

### L.2.5.5 Pemberian Larutan MTT



### L.2.6 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Instrumen LC-MS



### Lampiran 3. Pembuatan Larutan dan Reagen

#### L.3.1 Pembuatan Reagen Dragendorff (Wagner, 2001)

Larutan I. 0,6 g  $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

Larutan II. 6 g KI dalam 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 0,6 g  $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  yang dilarutkan ke dalam 2 mL HCl pekat 10 mL aquades. Larutan II dibuat dengan 6 g KI yang dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Kemudian kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### L.3.2 Pembuatan Reagen Mayer (Manan, 2006)

Larutan I.  $\text{HgCl}_2$  1,358 gr dalam aquades 60 mL

Larutan II. KI 5 gr dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan menimbang  $\text{HgCl}_2$  1,358 gr dengan neraca analitik kemudian dimasukkan dalam beaker glass 100 mL dan dilarutkan dengan menambahkan aquades 60 mL dan larutan II dibuat dengan menimbang KI 5 gr dengan neraca analitik kemudian dimasukan dalam beaker glass 250 mL dan dilarutkan dengan menambahkan aquades 10 mL. Masing-masing dilakukan pengadukan dengan pengaduk gelas sampai larut sempurna. Selanjutnya larutan I dituangkan ke dalam larutan II dan dihomogenkan dengan menggunakan pengaduk gelas. Apabila kedua larutan homogen, campuran larutan tersebut dipindahkan dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas.

#### L.3.3 Pembuatan Larutan Metanol 50 %

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

$$99,8\% \times V_1 = 50\% \times 10 \text{ mL}$$

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

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8% sebanyak 5 mL dengan pipet volum 5 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.3.4 Pembuatan Reagen FeCl<sub>3</sub> 1 %

$$\text{BM FeCl}_3 = 162,2 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa FeCl}_3 = \frac{1\% \times \text{BMFeCl}_3 \times V}{22,4}$$

$$= \frac{1\% \times 162,2 \frac{\text{gr}}{\text{mol}} \times 0,01 \text{ L}}{22,4} = 0,072 \text{ gr} = 72 \text{ mg}$$

Untuk membuat larutan FeCl<sub>3</sub> 1% adalah ditimbang sebanyak 72 mg serbuk FeCl<sub>3</sub> dengan neraca analitik, dimasukkan dalam beaker glass 50 mL kemudian dilarutkan dengan ± 3 mL aquades. Setelah larut, dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan ditandabatkan dengan aquades.

### L.3.5 Pembuatan Larutan HCl 1 M

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

$$\% \text{ Volume} = 37\% (0,37)$$

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

Molaritas HCl (M) :

$$\text{Massa HCl} = \text{BJ HCl pekat} \times \% \text{ volume}$$

$$= 1190 \text{ g/L} \times 0,37$$

$$= 440,3 \text{ gr}$$

$$\text{Mol HCl} = \frac{\text{Massa HCl}}{\text{BM HCl}} = \frac{440,3 \text{ gr}}{36,42 \text{ gr/mol}} = 12,09 \text{ mol}$$

$$\text{Konsentrasi HCl (M)} = \frac{\text{Mol HCl}}{\text{Volume HCl}} = \frac{12,09 \text{ mol}}{1 \text{ L}} = 12,09 \text{ M}$$

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

$$12,06 \times V_1 = 1 \times 100$$

$$V_1 = 100.1/12,06$$

$$V_1 = 8.3 \text{ ml}$$

Cara membuat 100 mL HCl 1 M adalah dimasukkan aquades sebanyak 5 mL ke dalam labu ukur 100 mL dengan pipet ukur 5 mL, diambil larutan HCl pekat sebanyak 8,3 mL dengan pipet ukur 10 mL. Pada saat memasukkan larutan ke dalam labu ukur ujung pipet menyentuh dinding labu ukur. Kemudian ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Proses pembuatan larutan HCl ini harus dilakukan di dalam lemari asam, karena menggunakan larutan HCl dengan konsentrasi tinggi

### L.3.6 Pembuatan Larutan HCl 2 %

$$\% \text{ Volume HCl pekat} = 37\% (0,37)$$

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$37 \% \times V_1 = 2 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,54 \text{ mL}$$

Cara membuat 10 mL HCl 2% adalah diambil larutan HCl pekat sebanyak 0,54 mL dengan pipet ukur 1 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang telah berisi  $\pm$  5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Pada saat memasukkan larutan ke dalam labu ukur ujung pipet menyentuh dinding labu ukur. Proses pembuatan larutan HCl ini harus dilakukan di dalam lemari asam, karena menggunakan larutan HCl dengan konsentrasi tinggi

### L.3.7 Pembuatan Larutan NaOH 1 M

$$M_r \text{ NaOH} = 40 \text{ g/mol}$$

$$V \text{ NaOH} = 100 \text{ mL}$$

$$M \text{ NaOH} = \frac{g \text{ NaOH}}{Mr \text{ NaOH}} \times \frac{1000}{V \text{ NaOH}}$$

$$0,1 = \frac{g \text{ NaOH}}{40 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{100 \text{ mL}}$$

$$g \text{ NaOH} = 0,4 \text{ gram}$$

Cara membuat 10 mL NaOH 1 M adalah diambil NaOH sebanyak 0,4 g; kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang telah berisi ± 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.3.8 Pembuatan Larutan SDS 10%

$$\text{SDS } 10\% = \frac{10 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang 10 gram SDS (*Sodium Deodecyle Sulphate*) dan dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL. kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades.

### L.3.9 Pembuatan Larutan Stok 10.000 ppm Ekstrak Pekat Daun Bidara Arab

$$10.000 \text{ ppm} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = \frac{50 \text{ mg}}{5 \text{ mL}}$$

Cara pembuatannya adalah sampel berupa ekstrak pekat daun bidara arab ditimbang 50 mg, kemudian diencerkan dengan 5 mL pelarut masing-masing ekstrak. Selanjutnya dihomogenkan dengan diaduk menggunakan pengaduk gelas, sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 10.000 ppm. Ekstrak yang diperoleh adalah lebih encer sehingga mempermudah dalam identifikasi kualitatif dengan reagen tertentu.

### L.3.10 Pembuatan Larutan Stok MTT (5 mg/mL) (CCRC, 2009)

Ditimbang 50 mg serbuk MTT, kemudian dilarutkan dalam 10 µL PBS dan diaduk dengan *vortex*.

**L.3.11 Pembuatan Larutan Stok 250 ppm Ekstrak Pekat Daun Bidara Arab**

Berat sampel = 10 mg

Volume pelarut = 100  $\mu$ L (DMSO)

$$M = \frac{10 \text{ mg}}{100 \mu\text{L}} = \frac{10.000 \mu\text{g}}{100 \mu\text{L}} = 100.000 \mu\text{g/mL}$$

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

$$1 \text{ mL} \times 250 \mu\text{g/mL} = 100.000 \mu\text{g/mL} \times V_2$$

$$V_2 = 0,0025 \text{ mL} = 2,5 \mu\text{L}$$

Larutan stok 250 ppm dibuat dengan cara mengambil 2,5  $\mu$ L sampel yang telah dilarutkan dengan 100  $\mu$ L DMSO menggunakan mikropipet. Kemudian ditambahkan 997,5  $\mu$ L media kultur RPMI dan diresuspensi hingga homogen.

#### Lampiran 4. Data dan Perhitungan Hasil Penelitian

##### L.4.1 Analisis Kadar Air

###### ❖ Berat Cawan Kosong

Ulangan Perlakuan	Berat Cawan Kosong (g)
1	74,3861
2	74,3866
3	74,3873
4	74,3879
5	74,3885
6	74,3889
7	74,3888
<b>Rata-Rata Berat Konstan</b>	<b>74,3887</b>

###### ❖ Berat Cawan + Sampel Sebelum Dikeringkan

79,3909 g

###### ❖ Berat Cawan + Sampel Setelah Dikeringkan

Ulangan Perlakuan	Berat Cawan + Sampel (g)
1	79,1702
2	79,1718
3	79,1739
4	79,2019
5	79,2025
6	79,2032
<b>Rata-Rata Berat Konstan</b>	<b>79,2025</b>

###### ❖ Perhitungan Kadar Air Sampel Kering Daun Bidara Arab

Rumus perhitungan kadar air, yaitu :

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \%$$

Keterangan : a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{(79,3909 - 79,2025)}{(79,3909 - 74,3887)} \times 100 \% \\ &= \frac{0,1884}{5,0022} \times 100 \% \\ &= 3,7663 \%\end{aligned}$$

#### L.4.2 Perhitungan Rendemen

1. Ekstrak pekat etanol

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{14,19}{90} \times 100 \% \\ &= 15,77 \%\end{aligned}$$

2. Fraksi kloroform

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,72}{3} \times 100 \% \\ &= 24 \%\end{aligned}$$

3. Fraksi n-heksan

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,61}{3} \times 100 \% \\ &= 20,33 \%\end{aligned}$$

### L.4.3 Perhitungan Data dan Hasil Uji Aktivitas Antikanker Secara *In Vitro*

- ❖ Pengamatan Jumlah Sel WiDr dengan *Hemocytometer* di bawah Mikroskop *Inverted*

Kuadran A 168	Kuadran B 294
Kuadran C 187	Kuadran D 276

- ❖ Pengamatan Jumlah Sel Vero dengan *Hemocytometer* di bawah Mikroskop *Inverted*

Kuadran A 116	Kuadran B 92
Kuadran C 124	Kuadran D 74

- ❖ Jumlah Sel WiDr yang Dihitung ( $\text{mL}^{-1}$ )

$$= \frac{\sum \text{sel kuadran A} + \sum \text{sel kuadran B} + \sum \text{sel kuadran C} + \sum \text{sel kuadran D}}{4} \times 10^4$$

$$= \frac{168 + 294 + 187 + 276}{4} \times 10^4$$

$$= 231,25 \times 10^4 / \text{mL} \longrightarrow 230 \times 10^4 / \text{mL}$$

- ❖ Jumlah Sel Vero yang Dihitung ( $\text{mL}^{-1}$ )

$$= \frac{\sum \text{sel kuadran A} + \sum \text{sel kuadran B} + \sum \text{sel kuadran C} + \sum \text{sel kuadran D}}{4} \times 10^4$$

$$= \frac{116 + 92 + 124 + 74}{4} \times 10^4$$

$$= 101,5 \times 10^4 / \text{mL} \quad \longrightarrow \quad 100 \times 10^4 / \text{mL}$$

❖ **Jumlah mL Panenan Sel WiDr yang Ditransfer**

$$= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung}}$$

$$= \frac{100 \times 10^4}{230 \times 10^4 / \text{mL}}$$

$$= 0,43 \text{ mL} = 0,5 \text{ mL}$$

Banyaknya panenan sel yang ditransfer sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan media RPMI hingga volumenya mencapai 10 mL. Setiap sumuran akan diisi 100  $\mu\text{L}$  RPMI yang berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100  $\mu\text{L}$  x 100 sumuran = 10000  $\mu\text{L}$  atau 10 mL.

❖ **Jumlah mL Panenan Sel Vero yang Ditransfer**

$$= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung}}$$

$$= \frac{100 \times 10^4}{100 \times 10^4 / \text{mL}}$$

$$= 1 \text{ mL}$$

Banyaknya panenan sel yang ditransfer sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan media M199 hingga volumenya mencapai 10 mL. Setiap sumuran akan diisi 100  $\mu\text{L}$  M199 yang berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100  $\mu\text{L}$  x 100 sumuran = 10000  $\mu\text{L}$  atau 10 mL.

## ❖ Data Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

No.	Absorbansi kontrol sel (WiDr)	Absorbansi kontrol media (RPMI)
1.	0,205	0,074
2.	0,209	0,062
3.	0,299	0,076
4.	0,377	0,077
5.	0,344	0,085
6.	0,368	0,073
<b>Rata-rata</b>	<b>0,3003</b>	<b>0,0745</b>

No.	Absorbansi kontrol sel (Vero)	Absorbansi kontrol media (M199)
1.	0,680	0,088
2.	0,632	0,073
3.	0,609	0,073
4.	0,593	0,079
5.	0,688	0,078
6.	0,935	0,093
<b>Rata-rata</b>	<b>0,6895</b>	<b>0,0806</b>

### 1. Ekstrak Etanol Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata - Rata	% Sel Hidup
	Pengulangan	Pengulangan	Pengulangan		
	1	2	3		
125	0,114	0,105	0,105	0,108	14,836
62,5	0,201	0,139	0,128	0,156	36,094
31,25	0,337	0,335	0,234	0,302	100,753
15,625	0,368	0,326	0,287	0,327	111,825
7,8125	0,203	0,190	0,296	0,689	272,143

### 2. Fraksi Kloroform Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata - Rata	% Sel Hidup
	Pengulangan	Pengulangan	Pengulangan		
	1	2	3		
125	0,109	0,112	0,109	0,11	15,722
62,5	0,229	0,246	0,229	0,249	77,428
31,25	0,405	0,374	0,372	0,384	136,921
15,625	0,372	0,325	0,355	0,351	122,306
7,8125	0,363	0,360	0,360	0,361	126,882

### 3. Fraksi N-heksan Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata - Rata	% Sel Hidup
	Pengulangan	Pengulangan	Pengulangan		
	1	2	3		
125	0,158	0,205	0,209	0,191	51,447
62,5	0,239	0,330	0,324	0,298	98,834
31,25	0,364	0,361	0,348	0,358	125,406
15,625	0,345	0,352	0,358	0,352	122,749
7,8125	0,372	0,356	0,348	0,359	125,849

### 4. Ekstrak Etanol Sel Vero Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata - Rata	% Sel Hidup
	Pengulangan	Pengulangan	Pengulangan		
	1	2	3		
125	0,480	0,454	0,514	0,483	66,028
62,5	0,698	0,640	0,695	0,678	98,056
31,25	0,695	0,671	0,688	0,685	99,206
15,625	0,573	0,700	0,651	0,641	92,089
7,8125	0,648	0,640	0,685	0,658	94,771

### 5. Fraksi Kloroform Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata - Rata	% Sel Hidup
	Pengulangan	Pengulangan	Pengulangan		
	1	2	3		
125	0,561	0,427	0,529	0,506	69,805
62,5	0,627	0,611	0,576	0,604	86,011
31,25	0,696	0,599	0,564	0,619	88,53
15,625	0,570	0,621	0,623	0,605	86,066
7,8125	0,666	0,603	0,569	0,613	87,38

### 6. Fraksi N-heksan Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata - Rata	% Sel Hidup
	Pengulangan	Pengulangan	Pengulangan		
	1	2	3		
125	0,511	0,511	0,577	0,533	74,295
62,5	0,542	0,523	0,532	0,532	74,185
31,25	0,540	0,609	0,596	0,582	82,288
15,625	0,579	0,641	0,578	0,599	85,19
7,8125	0,619	0,614	0,783	0,672	97,126

#### ❖ Perhitungan Prosentase Sel Hidup

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \%$$

Keterangan : A = absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel)

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur)

### 1. Ekstrak Etanol Sel WiDr Daun Bidara Arab

$$\text{- Konsentrasi 125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,108-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 14,836 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 62,5 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,156-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 36,094 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 31,25 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,302-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 100,753 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 15,625 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,327-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 111,825 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 7,8125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,689-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 272,143 \%$$

### 2. Fraksi Kloroform Sel WiDr Daun Bidara Arab

$$\text{- Konsentrasi 125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,11-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 15,722 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 62,5 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,249-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 77,428 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 31,25 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,384-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 136,921 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 15,625 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,351-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 122,306 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 7,8125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,361-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 126,882 \%$$

### 3. Fraksi N-heksan Sel WiDr Daun Bidara Arab

$$\text{- Konsentrasi 125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,191-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 51,447 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 62,5 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,298-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 98,834 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 31,25 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,358-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 125,406 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 15,625 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,352-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 122,749 \%$$

%

$$\text{- Konsentrasi 7,8125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,359-0,0745}{0,3003-0,0745} \times 100 \% = 125,849 \%$$

%

#### 4. Ekstrak Etanol Sel Vero Daun Bidara Arab

$$\text{- Konsentrasi 125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,483-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 66,028 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 62,5 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,678-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 98,056 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 31,25 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,685-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 99,206 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 15,625 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,641-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 92,089 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 7,8125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,658-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 94,771 \%$$

#### 5. Fraksi Kloroform Sel WiDr Daun Bidara Arab

$$\text{- Konsentrasi 125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,506-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 69,805 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 62,5 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,604-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 86,011 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 31,25 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,619-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 88,53 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 15,625 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,605-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 86,066 \%$$

%

$$\text{- Konsentrasi 7,8125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,613-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 87,38 \%$$

#### 6. Fraksi N-heksan Sel WiDr Daun Bidara Arab

$$\text{- Konsentrasi 125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,533-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 74,295 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 62,5 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,532-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 74,185 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 31,25 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,582-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 82,288 \%$$

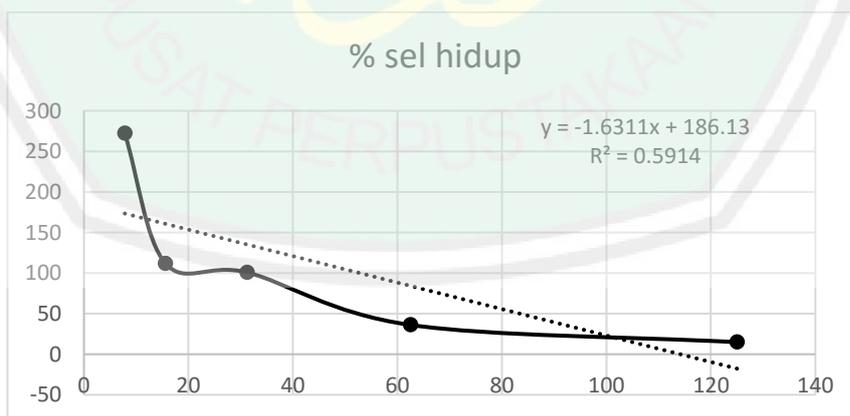
$$\text{- Konsentrasi 15,625 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,599-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 85,19 \%$$

$$\text{- Konsentrasi 7,8125 ppm} \rightarrow \% \text{ sel hidup} = \frac{0,672-0,0745}{0,6895-0,08067} \times 100 \% = 97,126 \%$$

#### ❖ Hasil Perhitungan IC<sub>50</sub> dengan Ms.Excel

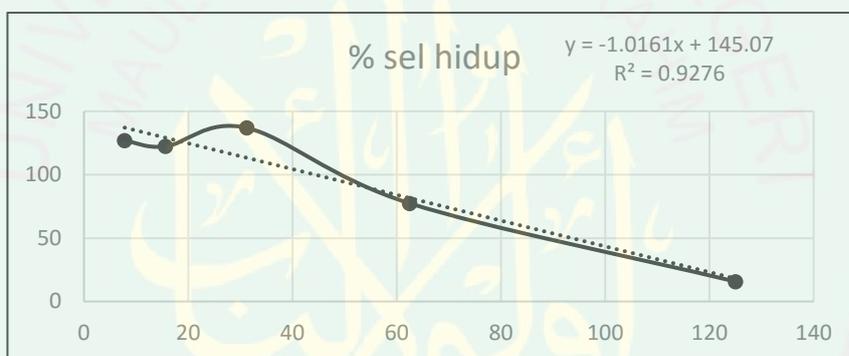
##### 1. Ekstrak Etanol Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	% Sel Hidup
125	15,722
62,5	77,428
31,25	136,921
15,625	122,306
7,8125	126,892



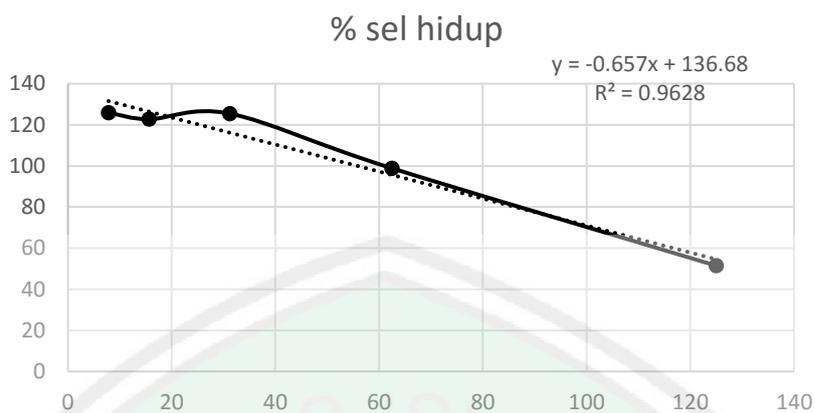
## 2. Fraksi Kloroform Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	% Sel Hidup
125	15,722
62,5	77,428
31,25	136,921
15,625	122,306
7,8125	126,882



## 3. Fraksi N-heksan Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	% Sel Hidup
125	51,447
62,5	98,834
31,25	125,406
15,625	122,749
7,8125	125,849



**4. Ekstrak Etanol Sel Vero Daun Bidara Arab**

Konsentrasi (ppm)	% Sel Hidup
125	66,028
62,5	98,056
31,25	99,206
15,625	92,089
7,8125	94,771



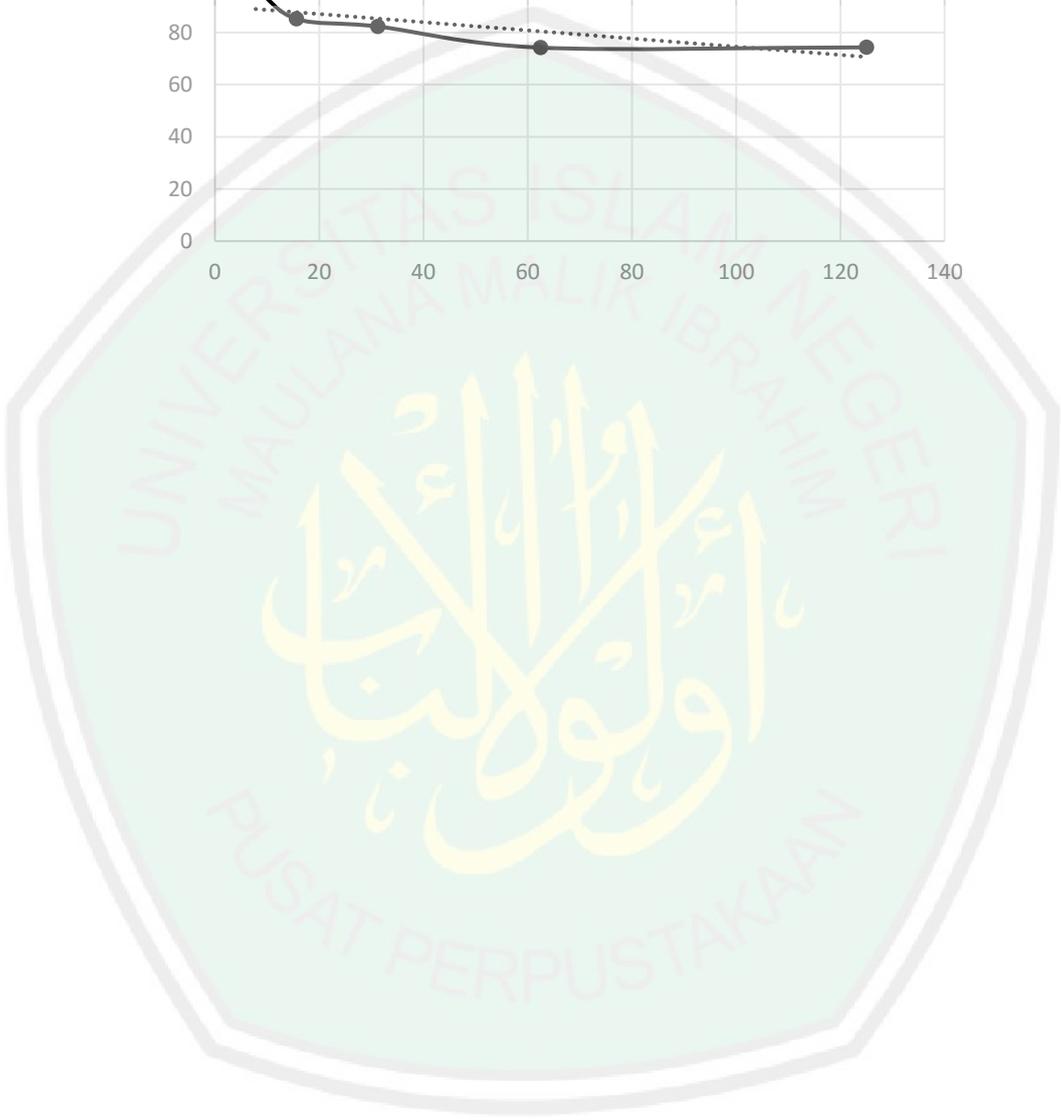
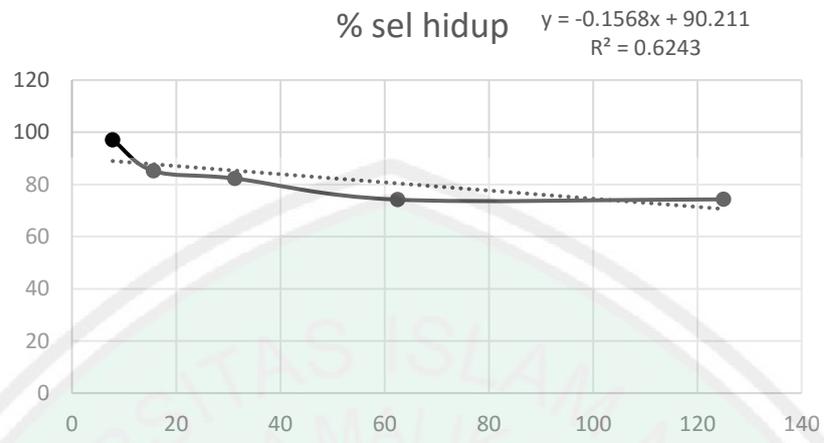
### 5. Fraksi Kloroform Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	% Sel Hidup
125	69,805
62,5	86,011
31,25	88,53
15,625	86,066
7,8125	87,38



### 6. Fraksi N-heksan Sel WiDr Daun Bidara Arab

Konsentrasi (ppm)	% Sel Hidup
125	74,295
62,5	74,185
31,25	82,288
15,625	85,19
7,8125	97,126



Lampiran 5. Dokumentasi



Preparasi Sampel



Analisis Kadar Air



Maserasi



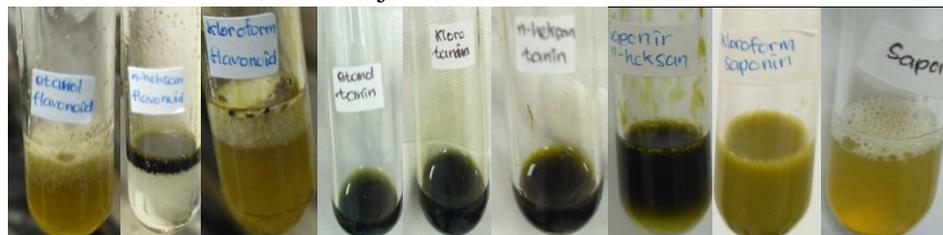
Partisi Kloroform



Partisi N-heksan



Uji Fitokimia



Uji Fitokimia



Perhitungan sel di bawah mikroskop *inverted*



Pemasukan media sel



Pembuatan larutan sampel



Sel WiDr + ekstrak etanol



Sel WiDr + fraksi kloroform



Sel WiDr + fraksi n-heksan



Sel Vero + ekstrak etanol



Sel Vero + fraksi kloroform



Sel Vero + fraksi n-heksan



Plat setelah diuji sitotoksik

Absorbance Report  
Single Wavelength  
Wav: 550nm  
Incubation: 0FF

	1	2	3
A	0.227	0.197	0.231
B	0.188	0.139	0.137
C	0.114	0.195	0.185
D	0.281	0.119	0.108
E	0.217	0.335	0.234
F	0.268	0.326	0.287
G	0.235	0.199	0.296
H	0.205	0.209	0.299
A	0.184	0.099	0.092
B	0.085	0.085	0.084
C	0.158	0.205	0.205
D	0.259	0.330	0.324
E	0.364	0.361	0.348
F	0.345	0.332	0.358
G	0.372	0.356	0.348
H	0.377	0.344	0.368
A	0.375	0.481	0.463
B	0.177	0.203	0.193
C	0.189	0.112	0.139
D	0.273	0.246	0.229
E	0.485	0.374	0.372
F	0.372	0.325	0.355
G	0.363	0.368	0.368
H	0.074	0.062	0.076
A	0.127	0.124	0.118
B	0.158	0.151	0.178
C	0.197	0.171	0.200
D	0.266	0.307	0.290
E	0.342	0.342	0.344
F	0.378	0.368	0.372
G	0.388	0.347	0.337
H	0.077	0.085	0.073

Hasil pembacaan absorbansi sel WiDr

Absorbance Report  
Single Wavelength  
Wav: 550nm  
Incubation: 0FF

	1	2	3
A	0.468	0.394	0.498
B	0.422	0.356	0.379
C	0.408	0.454	0.514
D	0.595	0.648	0.695
E	0.595	0.671	0.688
F	0.575	0.780	0.651
G	0.648	0.648	0.695
H	0.688	0.672	0.689
A	0.189	0.218	0.245
B	0.157	0.142	0.147
C	0.511	0.511	0.577
D	0.542	0.523	0.532
E	0.588	0.689	0.596
F	0.375	0.641	0.578
G	0.619	0.614	0.783
H	0.593	0.688	0.935
A	0.398	0.339	0.384
B	0.395	0.264	0.320
C	0.561	0.427	0.529
D	0.627	0.611	0.576
E	0.596	0.599	0.564
F	0.578	0.521	0.523
G	0.666	0.683	0.589
H	0.088	0.073	0.073
A	0.428	0.426	0.419
B	0.422	0.374	0.388
C	0.597	0.442	0.434
D	0.469	0.485	0.496
E	0.488	0.499	0.482
F	0.597	0.512	0.580
G	0.549	0.479	0.580
H	0.079	0.078	0.093

Hasil pembacaan absorbansi sel Vero



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA  
JURUSAN BIOLOGI**

**Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia, Telp-fax : +62-341-575841  
<http://biologi.ub.ac.id>**

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**

No. 0190/Takso.Identifikasi/03/2016

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : R.A. Zalihana Putri (NIM 13630121)  
Instansi : Jurusan Kimia, Fakultas SAINTEK, UIN Maliki Malang

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume II, halaman 80, diidentifikasi sebagai:

Familia : Rhamnaceae  
Genus : *Ziziphus*  
Species : *Ziziphus spina-christi* (L) Desf.  
Nama lokal : Bidara

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 22 September 2016

Kepala Laboratorium

**Dr. Serafinah Indriyani, M.Si**  
NIP.19630909.198802.2.001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia  
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755  
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 168 / EC / KEPK – S1 / 04 / 2017

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

**JUDUL** : Uji Aktivitas Ekstrak Daun Bidara Arab sebagai Antikanker Kolon dan Ekstrak Daun Bidara Laut dan Korteks Bidara Arab sebagai Antikanker Payudara T47D.

**PENELITI** : Aris Rahmawati  
Muharrofatul Jannah  
RA. Zalihana Putri

**UNIT / LEMBAGA** : S1 Kimia – Fakultas Sains dan Teknologi - Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

**TEMPAT PENELITIAN** : Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

Malang, 27 APR 2017



Ketua  
Komisi Etik Penelitian Kesehatan

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), M.Hum  
NIK 160746683

**Catatan :**

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan  
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy.  
Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).