

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK DAN FRAKSI BIJI KORO
BENGUK (*Mucuna pruriens* (L) DC). *Var pruriens* TERHADAP *HeLa* CELL
LINE KANKER SERVIKS**

SKRIPSI

Oleh:
KHOSIDEH
NIM. 12630094



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

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK DAN FRAKSI BIJI KORO
BENGUK (*Mucuna pruriens* (L) DC). *Var pruriens* TERHADAP HELA
CELL LINE KANKER SERVIKS**

SKRIPSI

Oleh:
KHOSIDEH
NIM. 12630094

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 ANTIKANKER EKSTRAK DAN FRAKSI BIJI KORO
BENGUK (*Mucuna pruriens* (L) DC). *Var pruriens* TERHADAP HeLa CELL
LINE KANKER SERVIKS**

SKRIPSI

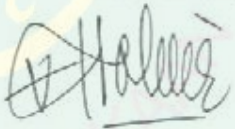
Oleh:
KHOSIDEH
NIM. 12630094

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 29 Desember 2017

Pembimbing I


Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

Pembimbing II


Nur Aini, M. Si
NIDT. 19840608 20160801 2 070



Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia

Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790620/200604 2 002

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK DAN FRAKSI BIJI KORO
BENGUK (*Mucuna pruriens* (L) DC). *Var pruriens* TERHADAP HeLa CELL
LINE KANKER SERVIKS**

SKRIPSI

Oleh:
KHOSIDEH
NIM. 12630094

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 29 Desember 2017

Penguji Utama : Eny Yulianti, M.Si (.....)
NIP. 197606112005 01 2006

Ketua Penguji : Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes.Apt (.....)
NIP. 19800203 200912 2 003

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

Anggota Penguji : Nur Aini, M. Si (.....)
NIDT. 19840608 20160801 2 070

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia


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

LEMBAR PERSEMBAHAN

DENGAN RASA SYUKUR YANG MENDALAM SKRIPSI INI KU
PERSEMBAHKAN KEPADA:

Umi (Ummah), abah (Ghazali), suami saya (Hasbullah), anak saya (Elifa), kakak dan adik (Zainal A dan Wesi'ah) yang telah memberikan dukungan serta menjadi motivator terbaik dalam setiap langkah penulis terutama dalam menyelesaikan studi.

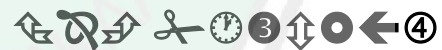
Guru/Dosenku, Asatidz yang dengan sabar dan penuh ikhlas mengajar dan membimbing serta meluangkan waktunya yang tak dapat tergantikan dengan apapun termasuk jua perhatian mereka.

Teman-teman Organisasi Pondok tercinta IMABA, MA IPA 1 dan teman-teman seangkatan Kimia 2012 dan seperjuangan

“Semoga Allah SWT melimpahkan nikmat, Rahmat, Hidayah serta kemudahan kepada mereka Aminn ya Robbal Alamin”

MOTTO

Proses merupakan jalan yang dapat kita benci dan kita cintai. Jika kita benci sebuah proses dan dijalani dengan tergesa-gesa maka ada celah untuk meringankan adanya kesalahan, akan tetapi jika kita menjalani proses dengan senang hati dan mengambil hikmah dijalannya maka kemudahan dan nikmat Allah akan kita dapatkan. "Maka cintailah proses karena kita tidak tau seberapa mudah dan ringankah proses yang sebenarnya kita miliki".



"karena Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan"

(Qs. Al-insyirah 94:5)

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Khosideh

Nim : 12630094

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian :“Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Dan Fraksi Biji Koro Benguk (*Mucuna Pruriens* (L) DC) var *pruriens* Terhadap *HeLa* Cell Line Kanker Serviks”

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, 29 Desember 2017

Yang membuat pernyataan,



Khosideh

NIM. 12630094

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya atas terselesaikan proposal penelitian dengan judul : **“Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Biji Koro Benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var *pruriens* Terhadap HeLa Cella Line Kanker Serviks”** ini tepat pada waktunya. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhoi Allah SWT.

Seiring dengan terselesaikannya penyusunan proposal ini, dengan penuh rasa hormat, kesungguhan, dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Umi dan Abah yang senantiasa memberikan doa dan restunya kepada dalam menuntut ilmu.
2. Suami, Kakak, dan Adik penulis yang selalu memberikan semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M. Ag selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, Dr.Roihatul Muti'ah, M.Kes. Apt, dan Ibu Nur Aini selaku dosen pembimbing skripsi, yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
5. Segenap Civitas Akademika Jurusan Kimia, terutama seluruh dosen, terimakasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
6. Rekan-rekan mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya angkatan 2012 yang telah memberikan semangat, motivasi dan pengalaman yang tak pernah terlupakan.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Amin ya Rabbal Alamin*

Malang, 2 Oktober 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERSEMBAHAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERNYATAAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR PERSAMAAN	xii
DAFTAR TABEL	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRAC	xv
المستخلص	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Batasan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II STUDI PUSTAKA	
2.1 Kanker Leher Rahim (serviks).....	7
2.2 Biji Koro Benguk (<i>Mucuna Pruriens(L)DC</i>) <i>var.pruriens</i>	8
2.3 Ekstraksi Senyawa Aktif.....	10
2.2.1 Ekstraksi Maserasi.....	10
2.2.2 Ekstraksi cair-cair.....	11
2.4 Uji Sitotoksik.....	14
2.5 Metode MTT <i>assay</i>	14
2.6 <i>Microplate Rader (ELISA Reader)</i>	16
2.7 Senyawa Antikanker.....	16
2.8 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLT).....	18
2.9 Identifikasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan reagen.....	22
2.9.1 Alkaloid.....	22
2.9.2 Flavonoid.....	23
2.9.3 Terpenoid/Steroid.....	23
2.9.4 Sponin.....	25
2.9.5 Tanin.....	25
2.10 Fungsi Biji-bijian dalam Kitab Suci Al-quran.....	26
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	29

3.2.1	Alat	29
3.2.2	Bahan	29
3.3	Rancangan Penelitian	30
3.4	Tahapan Penelitian	30
3.5	Pelaksanaan Penelitian	31
3.5.1	Preparasi Sampel	31
3.5.2	Analisis Kadar Air	31
3.5.3	Ekstraksi Maserasi dan Fraksinasi Senyawa Aktif	32
3.5.4	Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT	33
3.5.4.1	Penyiapan Sel Kanker	33
3.5.4.2	Penghitungan Sel Kanker	34
3.5.4.3	Peletakan Sel pada <i>Plate 96-Well</i>	34
3.5.4.4	Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada <i>Plate 96-Well</i>	35
3.5.4.5	Pemberian Larutan MTT	35
3.4.5	Uji Golongan Senyawa Aktif dengan Uji Reagen	36
3.4.5.1	Uji Flavonoid	36
3.4.5.2	Uji Alkaloid	36
3.4.5.3	Uji Tanin.....	37
3.4.5.4	Uji Saponin	37
3.4.5.5	Uji Terpenoid dan Steroid	37
3.4.6	Pemisahan Golongan Senyawa dengan KLT.....	38
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Preparasi Sampel.....	40
4.2	Analisis Kadar Air.....	40
4.3	Ekstraksi Maserasi dan Fraksinasi Sampel Biji Koro Benguk.....	41
4.4	Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT (<i>microtetrazolium</i>).....	46
4.5	Uji Fitokimia dengan Reagen	55
4.5.1	Uji senyawa alkaloid	55
4.5.2	Uji senyawa tanin	57
4.5.3	Uji triterpenoid dan steroid.....	58
4.6	Pemisahan Senyawa Aktif Menggunakan Metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	59
4.6.1	Uji senyawa alkaloid	60
4.6.2	Uji senyawa tanin	63
4.6.3	Uji triterpenoid dan steroid.....	65
4.7	Pemanfaatan Biji Koro Benguk (<i>Mucuna pruriens</i> (L) DC var <i>pruriens</i>) dalam Perspektif Islam	70
BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	73
5.2	Saran	73
DAFTAR PUSTAKA		74

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Polong dan Biji Koro Benguk	9
Gambaar 2.2 Kanker Serviks	10
Gambar 2.3 Reaksi Reduksi MTT	16
Gambar 2.4 Struktur Senyawa Alkaloid	18
Gambar 2.5 Struktur Inti Senyawa Flavonoid	19
Gambar 2.6 Contoh Struktur Senyawa Triterpenoid.....	20
Gambar 2.7 Senyawa Steroid.....	21
Gambar 2.8 Struktur Senyawa Saponin	21
Gambar 2.9 Senyawa Tanin	22
Gambar 4.1 Tampilan morfologi sel HeLa sebelum dan setelah pemberian tripsin.....	43
Gambar 4.2 Tampilan morfologi sel HeLa sebelum dan setelah pemberian reagen MTT.....	46
Gambar 4.3 Grafik Nilai % Viabilitas sel hidup tiap konsentrasi larutan Uji	48
Gambar 4.4 Perkiraan Reaksi Alkaloid Dengan Uji dragendorf.....	51
Gambar 4.5 Perkiraan Reaksi Alkaloid Dengan Uji Mayer.....	52
Gambar 4.6 Perkiraan Reaksi senyawa Tanin Dengan Reagen FeCl ₃	53
Gambar 4.7 Hasil KLT Golongan Senyawa Alkaloid dalam <i>Mucuna pruriens</i> (L) DC <i>var pruriens</i> menggunakan eluen etanol:air (6:4:2)	57
Gambar 4.8 Hasil KLT golongan senyawa tanin dalam <i>Mucuna pruriens</i> (L) DC <i>var pruriens</i> menggunakan eluen butanol:asam asetat glasial:air (4:1:6)	60
Gambar 4.9 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dan steroid dalam <i>Mucuna pruriens</i> (L) DC <i>var pruriens</i>	63

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Pelarut organik dan sifat fisiknya.....	14
Tabel 3.1 fase gerak (eluen pengembang) yang digunakan pada masing-masing senyawa	36
Tabel 4.1 Hasil rendemen ekstrak etanol 96% koro benguk <i>mucunapruriens</i> (L) DC var <i>pruriens</i>	40
Tabel 4.2 Hasil ekstraksi partisi dan rendemen masing-masing fraksi.....	42
Tabel 4.3 Hasil IC ₅₀ ekstrak dan fraksi koro benguk <i>mucunapruriens</i> (L) DC var <i>pruriens</i> terhadap sel HeLa	48
Tabel 4.4 Hasil pengamatan uji fitokimia <i>mucunapruriens</i> (L) DC var <i>pruriens</i>	51
Tabel 4.5 Nilai <i>Rf</i> dan warna pada hasil KLT senyawa alkaloid <i>mucunapruriens</i> (L) DC var <i>pruriens</i> dengan eluen etanol:metanol:air (6:4:2)	57
Tabel 4.6 Nilai <i>Rf</i> dan warna pada hasil KLT senyawa tanin <i>mucunapruriens</i> (L) DC var <i>pruriens</i> dengan eluen n-butanol:asam asetat glasial:air (4:1:5)	60
Tabel 4.7 Nilai <i>Rf</i> dan warna pada hasil KLT senyawa triterpenoid/steroid dalam <i>mucunapruriens</i> (L) DC var <i>pruriens</i>	63

ABSTRAK

Khosideh. 2017. **Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Dan Fraksi Koro Benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC). var *pruriens* terhadap HeLa Cell Line Kanker Serviks.** Pembimbing Utama: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing Agama: Nur Aini. M. Si; Konsultan: Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt

Kata Kunci : Aktivitas Antikanker, Koro Benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*), kanker serviks, *HeLa cell line*

Koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*) merupakan jenis tanaman yang belum banyak dikenal masyarakat. Ciri tanaman ini memiliki polongan dengan kulit yang cukup tajam sehingga jika menyentuh pori kulit dapat menyebabkan gatal. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ekstrak biji tanaman ini memiliki kandungan senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, terpenoid, dan steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antikanker ekstrak etanol 96% dan masing-masing fraksi (n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol dan air) dari biji koro benguk terhadap *HeLa cell line* kanker serviks. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi cair-cair. Uji aktivitas antikanker menggunakan metode MTT. Identifikasi senyawa aktif dilakukan dengan uji fitokimia dan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil uji menunjukkan aktivitas antikanker dari ekstrak etanol 96% = 675.007 $\mu\text{g/mL}$, fraksi n-heksana = 378.667 $\mu\text{g/mL}$, fraksi kloroform = 1152.710 $\mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat = 1422.954 $\mu\text{g/mL}$, fraksi n-butanol = 316.990 $\mu\text{g/mL}$, dan fraksi air = 1038.519 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi n-heksana dan n-butanol menunjukkan aktivitas antikanker yang lebih tinggi dengan nilai IC_{50} yang lebih kecil. Identifikasi golongan dengan KLT terhadap ekstrak biji koro benguk positif mengandung senyawa tanin, steroid, dan terpenoid.

ABSTRACT

Khosideh. 2017. **Test of Anticancer Activity Extract and Fraction Koro Benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*) to HeLa Cell Line Cervical Cancer.** Supervisor: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor of Religion: Nur Aini. M. Si; Consultant: Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt

Key word : Anticancer Activity, Koro Benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*), Cervical Cancer, HeLa cell line

Koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC. var *pruriens*) is a type of plant that has not been widely known to the public. Characteristics of this plant has a leg with a sharp enough skin so that if it touches the skin pores can cause itching. Prior research states that the seed extract of this plant contains alkaloid compounds, tannins, flavonoids, triterpenoids, and steroids. The aim of this study was to investigate the anticancer activity of ethanol extract 96% and each fraction (n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol and water) from koro benguk to HeLa cell line cervical cancer. The method of extraction used is maceration method. Fractionation is done by liquid-liquid partition method. Test anticancer activity using MTT method. The identification of active compound was done by phytochemical test and thin layer chromatography (TLC). The result showed that anticancer activity of extract ethanol 96% = 675.007 $\mu\text{g} / \text{mL}$, fraction of n-hexane = 378.667 $\mu\text{g} / \text{mL}$, fraction of chloroform = 1152.710 $\mu\text{g} / \text{mL}$, ethyl acetate fraction = 1422.954 $\mu\text{g} / \text{mL}$, n-butanol fraction = 316.990 $\mu\text{g} / \text{mL}$, and water fraction = 1038.519 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The fraction of n-hexane and n-butanol showed higher anticancer activity with smaller IC₅₀ values. The identification of classes with TLC on positive seed extracts contained tannins, steroids and terpenoids.

المستخلص

خاسيدة, ٢٠١٧. اختبار نشاط مضاد للسرطان استخراج وفصيل من كورو بنغوك

(mucuna pruriens (L) DC var pruriens) ضد خط خلية هिला سرطان عنق الرحم

المشرفة الأول : إيلوك كاميلة هياتي الماجستير, المشرف الثانية : نور عيني الماجستير,
المستشارة : رةحة المطع كالعيس, شقة.

كلمة البحث : نشاط مضاد للسرطان, كورو بينجوك (*mucuna pruriens (L) DC var pruriens*), سرطان عنق الرحم, خط الخلية هिला

كورو بينجوك (*mucuna pruriens (L) DC var pruriens*) هو نوع من النباتات التي لم تعرف للجمهور. الصفات مصنع البقولية مع الجلد لديها حادة إلى حد ما حتى إذا ما يمس مسام الجلد يمكن أن تسبب الحكمة. وقد اقترحت دراسات سابقة أن هذا النبات استخراج البذور يحتوي على مركبات قلووية، العفص، الفلافونويدات، تيربينويدس، والمنشطات. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد النشاط المضادة للسرطان من استخراج الإيثانول ٩٦٪ وكل جزء (ن الهكسان، الكلوروفورم، وولات الإيثيل، ن بيوتانول والمياه) من الفاصوليا شرس ضد سرطان عنق الرحم خط الخلايا السرطانية هिला. طريقة الاستخراج المستخدمة هي طريقة التسمية. تجزئة يتم عن طريق السائل السائل طريقة التقسيم. اختبار نشاط مضاد للسرطان باستخدام طريقة مت. تم تحديد المركب النشط بواسطة اللوني الكيمائي والطبقة الرقيقة (تلك). وأظهرت نتائج الاختبار النشاط المضادة للسرطان من الإيثانول ٩٦٪ استخراج = ٦٧٥,٠٠٧ µg/mL، وجزء من ن n- الهكسان = ٣٧٨,٦٦٧ µg/mL، والكلوروفورم جزء = ١٥٢,٧١٠ µg/mL، وجزء من إيثيل أسيتات = ١٤٢٢,٩٥٤ µg/mL، من n - بيوتانول جزء = ٣١٦,٩٩٠ µg/mL، وجزء من الماء = ١٣٨,٥١٩ µg/mL. وأظهر جزء من n- الهكسان و n- بيوتانول أعلى نشاط مضاد للسرطان مع قيم IC50 أصغر. مجموعة التماهي مع TLC إلى إيجابي عابس يما استخراج بذور الفول يحتوي العفص، والمنشطات وتيربينويدس.

BAB I

PENDAHULUAN

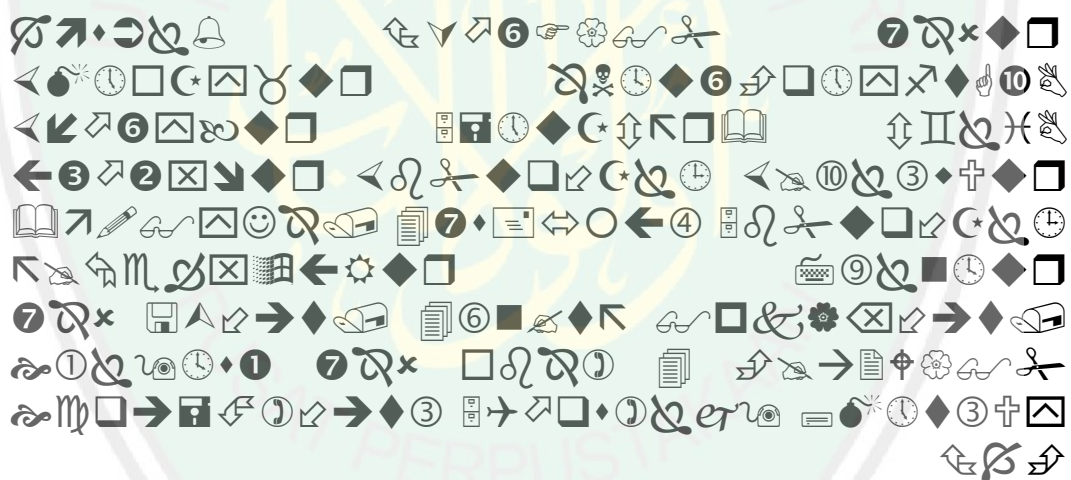
1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan di sekitarnya (*invasive*) serta terus menyebar melalui jaringan dan organ-organ penting dalam tubuh. Sel kanker akan membelah terus meskipun tubuh tidak memerlukannya, sehingga akan terjadi penumpukan sel baru. Penumpukan sel tersebut mendesak dan merusak jaringan normal, sehingga mengganggu organ yang ditempatinya (Mangan, 2009). Jenis kanker yang tak jarang ditemukan dikalangan masyarakat khususnya pada wanita, yaitu kanker serviks (kanker leher rahim).

Kanker servik merupakan penyebab kerusakan yang mengganas dibagian serviks atau leher rahim. disamping penyebab rusaknya alat reproduksi akan tetapi juga menjadi penyebab kematian kedua pada wanita diseluruh dunia (Rachmawati, 2012). Penyebab masih belum diketahui secara pasti. Sejauh ini 99.7% kanker serviks disebabkan oleh adanya *human papilloma virus* (HPV) atau virus *papilloma* manusia. Papiloma virus manusia ini merupakan virus yang menyerang kulit dan membran mukosa manusia dan hewan. Disebut *papilloma*, karena virus ini sering menimbulkan *wart* atau kutil. Menurut YKI (Yayasan Kanker Indonesia) angka kejadian tahun 2010 kanker serviks di Indonesia mencapai 553.000 pada wanita usia subur. Tingginya angka pengidap kanker tersebut disebabkan kondisi ekonomi masyarakat yang lemah, kurangnya

biaya berobat kedokter, tingkat pengetahuan yang rendah, serta kurang kesadaran menjaga kebersihan lingkungan (Puspita. A, 2015).

Salah satu metode pengobatan yang sering digunakan oleh masyarakat adalah dengan obat herbal. Obat herbal merupakan obat yang terbuat dari bahan alam yang tumbuh liar maupun yang telah dibudidayakan. Obat herbal semakin banyak dilakukan karena alasan biaya yang lebih murah, lebih mudah didapat, serta bisa diramu sendiri. Allah menganjurkan kepada seluruh hambanya untuk selalu memahami kebesaran dan kekuasaan-Nya. Allah telah menciptakan tumbuh-tumbuhan agar manusia mengambil pelajaran dan manfaat darinya sebagaimana tercantum dalam surah Ar-Rad ayat 4 yang berbunyi :



Artinya : “Dan dibumi ini terdapat bagian-bagian yang berdaMucuna Pruriensingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman –tanaman dan pohon korma yang bercabang dan tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebagian tanaman-tanaman itu atas sebagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir”.(Qs.Ar rad 6:4).

Dalam tafsir Al-Qurtubhi menyebutkan bahwa firman Allah dengan menyebutkan lafadz **مُتَجَوَّرَاتٍ** “yang berdaMucuna Pruriensingan” menjelaskan bahwa negri-negri yang berbeda namun memiliki satu dan air yang sama. Didalam negri tersebut terdapat kebun dan buah-buahan dan kurma yang relative sama

sebagaimana rasa manis dan masam. Ayat tersebut juga menjelaskan untuk kita melihat pada sebuah batang pohon yang melahirkan buah besar dan kecil, warna serta kelezatan yang berbeda padahal mereka sama-sama disinari matahari dan rembulan yang sama. Hal yang demikian telah menjelaskan kepada cara berfikir tentang keesaan dan kebesaran Allah SWT serta merupakan petunjuk bagi orang-orang yang tidak mengenal Allah (Masridha, 2008). Hikmah yang dapat diambil dari ayat di atas yaitu dari setiap perbedaan rasa maupun bentuk dari tanaman tetaplah memiliki manfaat dan kegunaan yang sama baik sebagai bahan pangan maupun obat seperti halnya tanaman koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var *pruriens*.

Tanaman koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var. *pruriens* merupakan salah satu jenis tanaman herbal yang banyak digunakan di negara berkembang, seperti di Jerman, India dan Indonesia. Pemamfaatan tanaman ini diantaranya, sebagai antibakteri, asam urat, antikanker, diabetes, batu ginjal dan lain-lain. (Retnaningsih, dkk, 2008). Koro benguk termasuk tanaman tropik yang tersebar luas di seluruh daerah Indonesia, seperti di Pulau Jawa, Bali, Sumatra, Sulawesi Utara dan Maluku (Ningsih, dkk, 2011). Koro benguk diketahui mempunyai 4 varietas, yaitu (*Mucuna Pruriens*) v. *hirsula* berbulu sangat padat dan (*Mucuna Pruriens*) v. *utilities* keduanya berbunga ungu tua polongnya tidak berbulu gatal, (*Mucuna Pruriens*) v. *cochinchinensis* berbunga putih polongnya tidak berbulu gatal, serta (*Mucuna Pruriens*) v. *pruriens* berbunga ungu tua polongnya berbulu gatal (Gandjar, dkk, 1973). Dari keenam varites tersebut peneliti akan menggunakan (*Mucuna Pruriens*) v. *pruriens*.

Uji fitokimia biji koro benguk (*Mucuna Pruriens* (L) DC) *v. pruriens* positif mengandung senyawa alkaloid, steroid, flavonoid, fenol, tanin, terpenoid, antrakuinon, catacin dan xanthoprotein (Murugan, 2005). Penelitian sebelumnya menyatakan biji koro benguk (*Mucuna Pruriens*) *v. utilities* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 8,879 $\mu\text{g/mL}$ positif mengandung senyawa flavonoid dan isoflavon (Winarsih, 2007). Uji toksisitas menggunakan metode *Brine shrimp Lethality Test* (BSLT) fraksi n-butanol biji koro benguk (*Mucuna Pruriens*) *v. utilities* menunjukkan nilai LC_{50} 60,890 $\mu\text{g/mL}$ (Yunia, 2013). Hasil tersebut menunjukkan kacang koro *Mucuna Pruriens* mempunyai aktivitas yang baik terhadap penghambat 50 % Larva udang sehingga dapat dikembangkan sebagai uji antikanker.

Berdasarkan uraian diatas, penulis akan melakukan uji aktivitas dari ekstrak dan fraksi biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) *var. Pruriens*. Metode pengujian yang digunakan sebagai antikanker yaitu terhadap sel HeLa secara *invitro*. Pemisahan senyawa aktif biji koro benguk dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol. Ekstrak pekat etanol selanjutnya difraksinasi n-heksan, etil asetat, n-butanol, klorofom, dan air. Hasil ekstraksi dan fraksinasi kemudian dilakukan uji sitotoksik terhadap sel HeLa secara *in vitro*.

Pengujian sitotoksik terhadap *HeLa cell line* kanker serviks menggunakan metode *Microtetrazolium* (MTT). Metode MTT didasari dengan adanya perubahan pada larutan reagen MTT yang berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna ungu. Ekstrak dan fraksi yang memiliki bioaktivitas paling tinggi (optimum) diidentifikasi golongan senyawa aktifnya. Identifikasi

golongan senyawa menggunakan reagen (uji fitokimia) yang kemudian dipisahkan isolat yang didapat menggunakan Kromatografi Lapis tipis (KLT). Hasil dari penelitian yang akan dilakukan diharapkan mendapatkan hasil positif terhadap aktivitas anti kanker sehingga meningkatkan nilai guna biji kacang koro benguk.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana potensi antikanker ekstrak etanol 96% dan hasil fraksinasi biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var. *Pruriens* terhadap *HeLa cell line* kanker serviks dengan metode MTT?
2. Bagaimana profil kromatogram golongan senyawa aktif dari ekstrak dan fraksi biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var. *Pruriens* menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ?

1.3 Tujuan penelitian

1. Mengetahui potensi antikanker ekstrak etanol 96% dan hasil fraksinasi biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var. *Pruriens* terhadap *HeLa cell line* kanker serviks dengan metode MTT.
2. Mengetahui profil kromatogram golongan senyawa aktif dari ekstrak dan fraksi biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var. *Pruriens* menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA).

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah Biji Koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var. *Pruriens* yang diambil dari daerah Karang Ploso Kabupaten Malang.

2. Sel kanker yang digunakan merupakan sel kanker serviks yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.
3. Uji aktivitas antikanker dilakukan dengan menggunakan metode MTT.
4. Uji fitokimia menggunakan reagen di pertegas dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA).

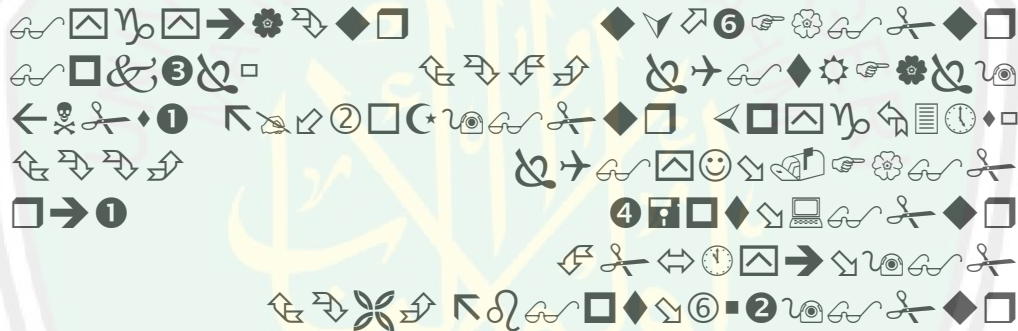
1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi antikanker dari ekstrak etanol biji Koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var. *Pruriens* Terhadap *HeLa cell line* kanker serviks sehingga dapat memberikan kontribusi pada pengembangan biji Koro benguk sebagai agen anti kanker dari bahan alam.

BAB II TINJUAN PUSTAKA

2.1 Fungsi Biji–Bijian dalam Perspektif Islam

Al-Qur'an telah menyebutkan ayat-ayat tentang tanaman dan tumbuhan yang dilengkapi bagian-bagiannya yang diantaranya meliputi buah, kelopak, termasuk bijinya. (Tharayyarah, 2014). Hal demikian penting untuk disyukuri dan dipelajari sebagaimana Allah berfirman dalam surat Ar-Rahman ayat 10-12 yang berbunyi:



Artinya: “Dan Allah telah meratakan bumi untuk makhluk(Nya). Di bumi itu ada buah-buahan dan pohon kurma yang mempunyai kelopak mayang. Dan biji-bijian yang berkulit dan bunga-bunga yang harum baunya” (Qs. Ar rahman 55: 10-12).

Tafsir *Al-aisar* menjelaskan bahwa ayat diatas menunjukkan kebesaran dan kasih sayang Allah SWT. Sebagaimana Allah telah mengokohkan dan membentangkan bumi sebagai tempat tinggal seluruh makhluknya. Pada bumi terdapat buah dan biji-bijian yang dapat dinikmati dan diambil manfaat oleh manusia serta makhluk lainnya (Jabir, 2009).

Ayat di atas telah menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap obyek yang disifati-Nya seperti keanekaragaman hayati atau tumbuhan yang bermacam-macam . Tumbuhan yang baik merupakan tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup termasuk tumbuhan yang dapat digunakan sebagai

pengobatan (Savitri, 2008). Hal tersebut merupakan rahmat yang diberikan Allah SWT terhadap manusia yang harus dimanfaatkan sebaik-baiknya, tidak terkecuali tanaman berbiji lainnya, seperti koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC v. *pruriens*).

2.2 Biji Koro Benguk (*Mucuna Pruriens* (L) Dc) var. *Pruriens*

Mucuna Pruriens merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang dapat tumbuh di tanah yang subur maupun kurang subur dan kering (Bayu Kanetro dan Setyo Hastuti, 2003). Tanaman kacang koro termasuk tanaman tahunan merambat, ketinggian dapat mencapai 3-18 m. Tanaman ini merupakan tanaman asli daerah Afrika dan India. MP Indonesia banyak ditemukan di Jawa, Bali dan Sumatra yang mana memiliki beberapa warna kulit biji abu-abu, hitam, coklat atau bercak-bercak (Windi Atmaka, 1992). Koro benguk diketahui mempunyai 4 varietas, yaitu (*Mucuna Pruriens*) v. *hirsula* berbulu sangat padat dan (*Mucuna Pruriens*) v. *utilities* keduanya berbunga ungu tua polongnya tidak berbulu gatal, (*Mucuna Pruriens*) v. *cochinchinensis* berbunga putih polongnya tidak berbulu gatal, serta (*Mucuna Pruriens*) v. *pruriens* berbunga ungu tua polongnya berbulu gatal (Gandjar, dkk, 1973). Pada penelitian ini menggunakan (*Mucuna Pruriens* (L) DC) v. *pruriens*.

Tanaman kacang koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) v. *pruriens* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheobionta
Super devisi	: Spermatopyta
Devisi	: Magnoliopyta
Kelas	: Magnoliopsoda
Sub kelas	: Rosidae

Ordo : Fabales
 Famili : Fabaceae
 Genus : Mucuna
 Spesies : *Mucuna pruriens* (L) DC v. *pruriens*



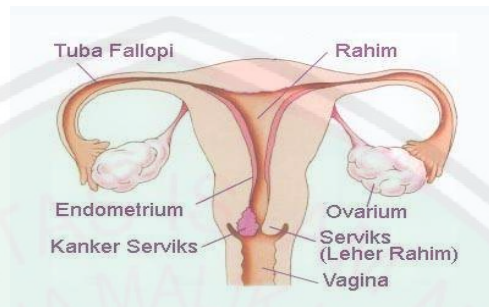
Gambar (2.1) Polong dan Biji Koro Benguk (Grub E, 2015).

Koro Benguk diketahui mengandung beberapa senyawa obat seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, terpenoid (Murugan M dan Mohan V R, 2005). Salah satu senyawa tersebut di India digunakan sebagai antibakteri, asam urat, antikanker, diabetes, batu ginjal dan lain-lain. Negara Jerman juga menggunakan tanaman ini sebagai obat tekanan darah tinggi, kadar kolesterol tinggi, gas pada usus, nyeri otot, rematik, dan cacing usus (Retnaningsih, dkk, 2008).

2.3 Kanker Leher Rahim (*Serviks*)

Serviks atau leher rahim adalah bagian dari sistem reproduksi perempuan yang terletak dibagian bawah yang sempit dari rahim (uterus atau *womb*). Sedangkan rahim adalah suatu organ berongga yang berbentuk buah pada bagian perut bagian bawah. Adapun penghubung rahim menuju vagina adalah mulut rahim. Selama periode menstruasi, darah mengalir dari uterus melalui serviks di dalam vagina. Melalui vagina, darah akan keluar dari tubuh. Jika serviks mengalami gangguan, maka bisa jadi aliran darah menstruasi mengalami

gangguan. Hal ini dapat memicu terjadinya kanker leher rahim (serviks) (Puspita A, 2015).



Gambar 2.2 Kanker Serviks (Paschel J, 2013)

Kanker serviks merupakan kanker yang berada di urutan pertama paling sering ditemukan pada wanita. Kanker serviks 99.7 % disebabkan oleh adanya *human papilloma virus* (HPV) atau virus *papilloma* manusia. Papiloma virus manusia ini merupakan virus yang menyerang kulit dan membran mukosa manusia dan hewan. Disebut *papilloma*, karena virus ini sering menimbulkan *wart* atau kutil (Puspita A, 2015). Umumnya kanker ini dapat hadir dengan siklus haid yang tidak teratur dan pendarahan vagina intermenstrual, tetapi gejala kanker ini tidak terlihat sampai kanker memasuki stadium yang lebih jauh (Marlina, 2008).

Sel kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel HeLa (*HeLa cell line*). Sel HeLa diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (serviks) manusia. Sel ini diisolasi tahun 1951 dari rahim wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang berusia 31 tahun. Sel HeLa tumbuh sebagai sel yang semi melekat (ATTC, 2011). Sel HeLa dapat digunakan untuk tes antitumor, transformasi, uji tumorigenesis, biologi sel dan invasi bakteri (Doyle dan Griffiths, 2000).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Medium RPMI 1640 mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney, 1986).

2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstraksi merupakan proses pemisahan substansi dari campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Umumnya yang perlu dilakukan dalam mengekstraksi adalah membunuh jaringan tumbuhan untuk mencegah terjadinya oksidasi atau hidrolisis oleh enzim (Kristanti, 2008). Harborne (1996) menyatakan ekstraksi adalah proses yang secara selektif mengambil zat terlarut dari suatu campuran dengan bantuan pelarut. Metode ekstraksi bergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Berdasarkan fase yang terlibat, terdapat dua jenis ekstraksi, yaitu ekstraksi padat-cair (maserasi) dan ekstraksi cair-cair (partisi).

2.4.1 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dalam pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang akan diekstraksi. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena sampel tumbuhan akan mengalami pemecahan dinding dan membran sel.

Pecahnya dinding dan membran sel. Pecahnya dinding dan membran sel diakibatkan oleh perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan bahan alam dalam pelarut tersebut (Guenther, 2011).

Setelah dilakukan maserasi, untuk menghilangkan pelarut dilakukan penguapan. Proses penguapan umumnya menggunakan *rotary evaporator vakum* pada tekanan rendah atau dengan kenaikan temperatur dan kecepatan terbesar pada titik didih larutan. Cairan organik yang memiliki titik didih rendah, tekanan permukaan akan rendah, sehingga akan mudah menguap. Labu evaporator dipanaskan pada temperatur tertentu di atas *waterbath* dan diputar selama evaporasi. Sehingga terjadi pencampuran yang sempurna, mencegah bumping, dan juga akan memiliki permukaan yang relatif lebih kuat. Pelarut menguap dari campuran kemudian terkondensasi oleh erlenmeyer dan jatuh pada labu penampung (Vogel, 1978).

2.4.2 Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair merupakan pemisahan komponen kimia diantara dua fase pelarut (pelarut organik dan air) yang tidak saling bercampur, dimana sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagian larut pada fase kedua. Selanjutnya kedua fase yang mengandung zat terdispersi dilakukan pengocokan beberapa kali dan didiamkan hingga terjadi pemisahan secara sempurna dan membentuk dua lapisan fase cair. Senyawa kimia akan terpisah ke dalam kedua

fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi yang tetap (Dinda, 2008). Prinsip metode ini didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu. Kesempurnaan ekstraksi tergantung pada banyaknya ekstraksi yang dilakukan. Hasil yang baik diperoleh apabila jumlah ekstraksi yang dilakukan berulang-ulang dengan penambahan jumlah pelarut sedikit demi sedikit (Khopkar, 2003). Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya.

Prinsip kelarutan yang dipakai adalah *like dissolve like* artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar (Khopkar 2008). Pelarut yang umum digunakan dalam proses ekstraksi adalah pelarut polar (untuk melarutkan garam alkaloid, glikosida dan bahan penyamak) dan pelarut non polar (untuk melarutkan minyak atsiri) (Nur dan Adijuwana, 1989). Komponen aktif yang dapat diekstrak dari suatu bahan tergantung pada kepolaran pelarut yang digunakan. Senyawa yang terikat pada pelarut polar antara lain alkaloid, steroid dan saponin. Sedangkan senyawa yang terikat pada pelarut semi polar antara lain peptida dan depsipectida. Senyawa yang terikat pada pelarut non polar antara lain hidrokarbon, asam lemak dan terpenoid (Hardiningtyas, 2009).

Penelitian ini menggunakan pelarut etanol. Etanol mempunyai polaritas yang tinggi sehingga dapat mengekstrak senyawa aktif dalam tumbuhan yang lebih banyak dibandingkan jenis pelarut organik yang lain. Etanol mempunyai titik didih yang rendah yaitu 79 °C sehingga memerlukan panas yang lebih sedikit

untuk proses pemekatan. Selain itu, etanol juga tidak terlalu beracun dan berbahaya sehingga cenderung aman (Sudarmadji dkk., 2003).

Table 2.1 pelarut organik dan sifat fisiknya (Nur dan Adijuwana, 1989)

Pelarut	Titik Didih (°C)	Konstanta Dielektrikum	Massa jenis (g/mL)
Etanol	79	30	0,789
n-heksana	69	2.0	0.655
Kloroform	61	4.8	1.498
Etil asetat	77	6.0	0.894
n-butanol	118	18	0.810
Air	100	80	1.000

Lenny (2006) mengatakan bahwa pelarut-pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder secara maksimal. Salah satu pelarut alkohol yang digunakan untuk ekstraksi maserasi adalah etanol. Etanol mempunyai beberapa kelebihan sebagai pelarut ekstraksi karena termasuk pelarut universal, tidak menyebabkan pembengkakan sel, menghambat kerja enzim, memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut, mengendapkan protein, dan melarutkan hampir semua senyawa organik (baik polar, semi polar maupun non polar), sehingga menghasilkan bahan aktif yang optimal (Arifin, dkk, 2006).

2.5 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik merupakan uji invitro dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi tingkat ketoksikan suatu senyawa. Sistem

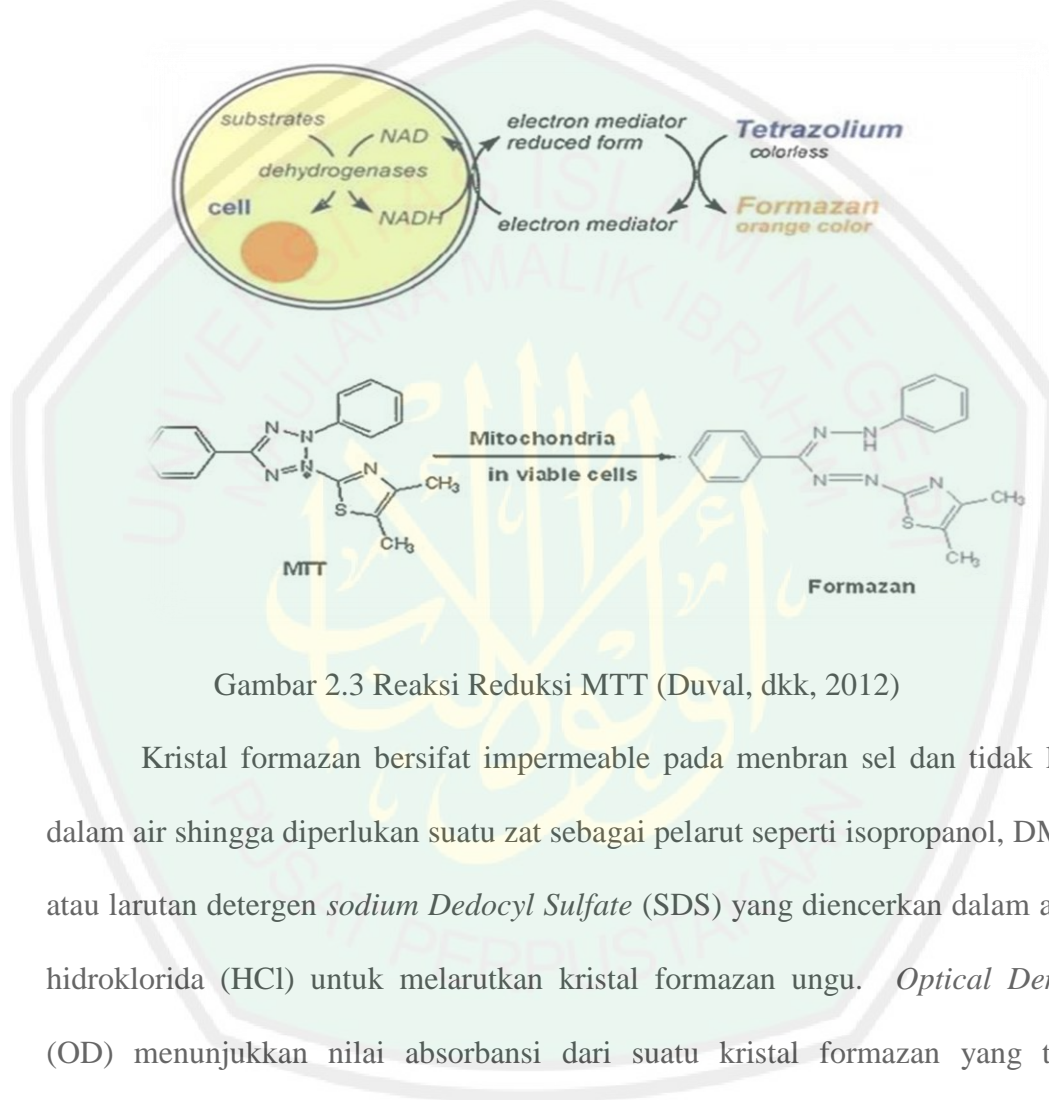
tersebut merupakan uji kualitatif dengan menetapkan kematian sel. Dasar dari percobaan tersebut antara lain, penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel (Anggrianti, 2008).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai tersebut menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan poliferasi sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai IC_{50} yang menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa, semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik begitupula sebaliknya. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik adalah memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Amalina, 2009).

2.6 Metode MTT assay

Uji sitotoksitas dengan metode MTT didasarkan pada aktivitas enzim yang dapat diukur secara kolorimetri. Metode ini cepat, sensitif, akurat dan sejumlah besar sampel dapat diuji secara otomatis menggunakan spektrofotometer. Metode ini mengukur sel yang hidup (baik yang masih membelah ataupun tidak membelah) dan juga aktivasi metabolik atau penghambatan sel (Doyle dan Griffiths, 2000). Prinsip uji MTT adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan kemampuan enzim *mitokondria reduktase* pada mitokondria dalam mereduksi garam *Methylthiazol Tertazolium* (MTT). Ketika bermetabolisme sel-sel hidup, akan menghasilkan

enzim *mitokondria reduktase*. Enzim ini bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka jumlah sel hidup semakin banyak (Junaedi, 2000).



Gambar 2.3 Reaksi Reduksi MTT (Duval, dkk, 2012)

Kristal formazan bersifat impermeable pada membran sel dan tidak larut dalam air sehingga diperlukan suatu zat sebagai pelarut seperti isopropanol, DMSO atau larutan detergen *sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) yang diencerkan dalam asam hidroklorida (HCl) untuk melarutkan kristal formazan ungu. *Optical Density* (OD) menunjukkan nilai absorbansi dari suatu kristal formazan yang telah dilarutkan diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 490–570 nm (Heti, 2008). Nilai absorbansi ini menunjukkan tingkat daya proliferasi sel sebagai manifestasi tingkat kekebalan seluler (Berata, 2000).

Uji MTT dilakukan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Dimana nilai tersebut menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi

sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai tersebut merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Menurut Lisdawati (2002), suatu ekstrak dianggap toksik terhadap sel jika memiliki nilai IC_{50} kurang dari 1000 ppm. Akhir dari uji MTT adalah memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Amalina, 2008).

2.7 *Microplate Rader (ELISA Reader)*

Microplate Rader adalah suatu spektrofotometer khusus yang disusun untuk membaca lempeng mikro (*microplate*). *Microplate Rader* menggunakan prinsip spektrofotometri yang sama seperti metode konvensional, tetapi dapat menghasilkan peningkatan jumlah sampel yang dapat dianalisis. Perbedaan dengan spektrofotometer konvensional yang memfasilitasi pembacaan pada berbagai panjang gelombang, *Microplate Rader* memiliki filter atau kisi-kisi difraksi yang membatasi rentang panjang gelombang yang digunakan dalam *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, umumnya antara 400 sampai 750 nm (Heredia, dkk, 2006).

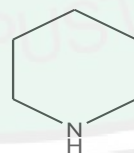
Beberapa *microplate rader* bekerja dalam rentang ultraviolet dan melakukan analisis antara 340-700 nm. Sistem optik yang dimanfaatkan oleh banyak produsen serat optik untuk menyuplai cahaya sumur lempeng mikro yang berisi sampel. Berkas cahaya yang melewati sampel memiliki diameter yang berkisar antara 1 sampai 3 nm. Suatu sistem mendeteksi cahaya yang berasal dari sampel, menguatkan sinyal dan menentukan absorbansi sampel. Selanjutnya

suatu sistem pembacaan mengubahnya menjadi data yang memungkinkan interpretasi hasil pengujian (WHO, 2008).

2.8 Identifikasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder menggunakan Reagen

2.8.1 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Lenny, 2006). Senyawa alkaloid bekerja secara spesifik pada fase mitosis (M). Zat ini akan berikatan dengan mikrotubulus dan mengganggu pembentukan spindle sehingga kromosom tidak terpisah pada saat mitosis. Merusak fungsi lain mikrotubulus (yaitu mobilitas dan transport membran) dan aktivitas enzim (Rogers, 1990).

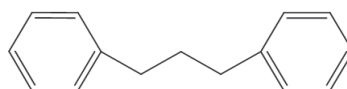


Gambar 2.4 Struktur senyawa Alkaloid (Robinson, 1995)

Identifikasi alkaloid dapat menggunakan perekasi mayer dan Dragendroff. Uji positif senyawa alkaloid dengan menggunakan pelarut Dragendroff akan membentuk endapan berwarna coklat muda-kuning. Uji alkaloid menggunakan reagen Mayer ditunjukkan dengan endapan putih/kekuningan (Sastrohamidjojo, 1996).

2.8.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa $C_6-C_3-C_6$ yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C_6 (cincin benzen tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon (Robinson, 1995). Flavonoid merupakan senyawa polar yang akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, air dan sebagainya. Aglikon yang kurang polar seperti isolavon, flavonon, flavonol dan flavon cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988). Senyawa golongan flavonoid mampu menghambat proses karsinogenesis baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penghambatan terjadi pada tahap inisiasi, promosi maupun progresi (Ren, dkk, 2003). Fase inisiasi kanker seringkali diawali melalui oksidasi DNA yang menyebabkan mutasi oleh senyawa karsinogen (Kakizoe, 2003).



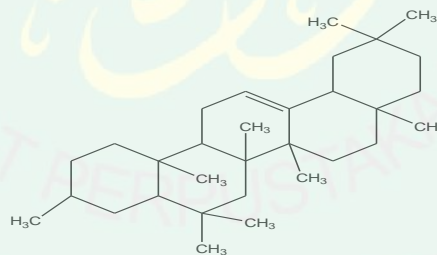
Gambar 2.5 Struktur inti senyawa Flavonoid (Robinson, 1995)

Identifikasi flavonoid dapat dilakukan dengan metode Wilstater yakni melarutkan sejumlah ekstrak dengan senyawa alkohol panas, ditambahkan HCl

pekat dan serbuk Magnesium. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna jingga (flavon), merah tua (flavonol/flavonon). Jika terbentuk warna oranye, merah, kuning, hijau sampai biru menandakan adanya aglikon/glikosida (Dermawan, 2012).

2.8.3 Terpenoid/Steroid

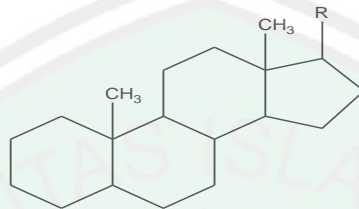
Triterpenoid merupakan komponen tumbuhan yang mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan sebagai minyak atsiri. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Mekanisme kerja senyawa triterpenoid terhadap kanker yaitu dengan cara memblokir siklus sel pada fase M (mitosis atau pembelahan sel) (Crowel, 1996).



Gambar 2.6 Contoh struktur senyawa Triterpenoid (Harborne, 1987)

Steroid adalah senyawa golongan lipida yang mengalami penyatuan cincin karbon. Steroid tidak mengandung asam lemak ataupun gliserol sehingga tidak mengalami penyabunan (Hart, 1990). Senyawa steroid mengandung gugus $-OH$ sering disebut dengan sterol dengan sifat yang cenderung lebih polar. Senyawa

steroid dapat bekerja sebagai proliferasi sel kanker yaitu dengan cara memblokir fase S (Mustafida dkk., 2014; Albert, dkk, 2008).

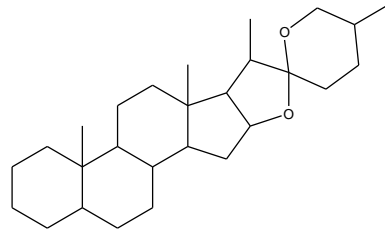


Gambar 2.7 Senyawa steroid (Harbone, 1987)

Identifikasi terpenoid dan steroid secara umum menggunakan reagen Lieberman-Burchard. Uji positif untuk triterpenoid menghasilkan endapan violet (Harborne, 1987). Hasil positif adanya senyawa steroid dengan adanya endapan hijau biru (Robinson, 1995).

2.8.4 Saponin

Saponin berasal dari bahasa latin *sapo* yang berarti sabun, karena sifatnya menyerupai sabun. Saponin adalah glikosida triterpenoid dan sterol (Robinson, 1995). Saponin merupakan senyawa yang berasa pahit, berbusa dalam air dan larut dalam air dan alkohol dan tidak larut dalam eter. Saponin paling cocok diekstraksi dengan menggunakan metanol dan etanol (Robinson, 1995). Senyawa saponin diketahui dapat menghambat pembentukan protein caspase-3 yang diekspresikan terlalu rendah dan dapat pula memicu *G1 cell cycle arrest* (Fitriani, dkk, 2011).

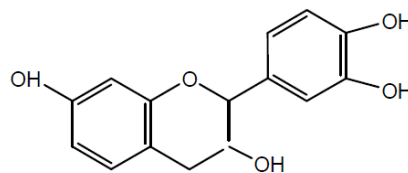


Gambar 2.8 Struktur senyawa saponin (Robinson, 1995)

Identifikasi senyawa saponin dapat dilakukan dengan cara menambahkan air panas (1:1) pada sampel sambil dikocok selama \pm 30 menit. Ditambahkan HCl 1 N jika menimbulkan busa dan busa stabil selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, menunjukkan positif senyawa saponin (Soebagio, 2007).

2.8.5 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa fenol yang terdapat pada daun, buah yang belum matang. Umumnya tumbuhan yang mengandung tanin dihindari oleh serangga pemakan tumbuhan karena memiliki rasa yang sepat. Tanin merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan flavonoid (Robinson, 1995). Senyawa tanin juga dapat dinobatkan sebagai agen antikanker yaitu dengan cara memblok fase S. fase S akan mensintesis DNA sehingga terjadi proses replikasi kromosom (Mustafida dkk., 2014; Albert, dkk, 2008).



Gambar 2.9 Senyawa tanin (Harbone, 1987)

Identifikasi senyawa tanin dapat menggunakan reagen FeCl_3 1 % dan gelatin. Reagen FeCl_3 1 % ditunjukkan dengan timbulnya warna biru tua atau hijau kehitaman, sedangkan larutan gelatin ditunjukkan dengan adanya endapan putih. Hal tersebut menunjukkan adanya senyawa tanin (Harborne, 1987).

2.9 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah suatu teknik pemisahan yang pertama kali digunakan untuk memisahkan zat-zat warna tanaman yang didasarkan atas istilah yang digunakan yaitu *kroma* yang berarti zat warna. Metode pemisahan kromatografi didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen dalam dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak yang berbeda tingkat kepolarannya. Apabila molekul-molekul komponen berinteraksi secara lemah dengan fasa diam maka komponen tersebut akan bergerak lebih cepat meninggalkan fasa diam (Gandjar, 2007).

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap yang berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10–30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiennya dan resolusinya (Gandjar, 2007). Fase diam yang dapat digunakan adalah silika atau alumina yang dilapiskan pada lempeng kaca atau aluminium. Jika fase diamnya berupa silika gel maka bersifat asam, jika fase diamnya berupa alumina maka bersifat basa. Fase gerak atau larutan pengembang biasanya digunakan pelarut organik atau bisa juga campuran pelarut organik-anorganik (Gritter, *et.al.*, 1991).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga Rf. Harga Rf didefinisikan sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 2007):

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \quad \text{Pers ... (2.1)}$$

Harga-harga Rf untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standart. Harga-harga Rf yang diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan. Harga-harga Rf untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standart. Harga Rf dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam KLT diantaranya adalah struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya, jenis eluennya, serta jumlah cuplikan yang digunakan tidak terlalu berlebihan (Sastrohamidjojo, 1996).

Efek elusidasi akan naik dengan naiknya tingkat kepolaran pelarut. Misalnya, n-heksana non polar memiliki efek elusidasi lemah, kloroform cukup kuat dan metanol yang polar memiliki efek elusidasi yang kuat. Tetapan dielektrik membeikan informasi tentang tingkat kepolaran suatu senyawa. Laju rambat tergnatung pada viskositas pelarut dan tentu saja kapda stuktur lapisan (Stahl, 1985). Bercak pemisahan pada plat KLT umumnya merupakan bercak yang tidak bewarna. Untuk menentukannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Mengamati lempeng dibawah lampu ultraviolet yang dipasang pada panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan solute sebagai bercak

yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam (Gandjar, 2007).



BAB III

METODELOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2016 - Januari 2017 di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Malang dan Laboratorium Protho, Parasitologi Jurusan Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain oven, cawan penguap, desikator, spatula, neraca analitik, penjepit kayu, loyang, kaca arloji, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer tutup 250 ml, pengaduk, *shaker incubator*, *aluminium foil*, gelas beker 100 ml, kertas saring whatman, penyaring *buchner*, *rotary evaporator*, corong gelas, gelas vial, corong pisah, micropipet 200, 1000 μ m, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, *96-well plate*, Conical Tube, Yellow tip dan Blue tip, *hemacytometer*, *incubator*, *LAF Hood*, *microscop inverted*, dan *ELISA reader*, pipet ukur, pipet tetes, tabung reaksi, lampu UV, lemari asam, *vortexs*, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, penggaris, pipa kapiler, cawan petri, pingset, dan bejana pengembang.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji koro benguk (*Mucuna pruriens (L) DC*) yang di ambil dari Karang plosong Malang, Jawa Timur,

etanol 96 %, aquades, etil asetat, n-butanol, etil asetat, kloroform, dan n-heksana. *Phospat buffer saline* 1x, media kultur (DMEM/RPMI/MEM), DMSO, MTT 5 mg/ml, PBS (50 MTT dan 10 ml PBS), SDS 10 % dalam 0,1 N HCL, Ialuminium foil, dan tissue makan, reagen drgendorff, reagen mayer, reagen FeCl₃ 1%, reagen Liberman-Burchard, HCL pekat, HCL 2 %, Logam Mg, asam asetat anhidrat, dan H₂SO₄ pekat, asam asetat (p.a), metanol (p.a), aseton, dan amoniak pekat.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Tahapan awal yang dilakukan yaitu sampel yang diambil dari biji koro Benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC). *v pruriens* dicuci bersih dan dikering anginkan selama seminggu. Setelah kering sampel digiling menggunakan mesin penggiling di pusat pelayanan Badan Materia Medika (BMM) Batu. Serbuk yang diperoleh dianalisis kadar airnya (sampel kering) kemudian diekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96 %. Maserasi dilakukan berulang-ulang hingga filtrat yang digunakan tampak bening, lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang didapat selanjutnya difraksinasi menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air.

Ekstrak pekat yang dihasilkan dari masing-masing fraksinansi diuji aktivitas antikanker secara *in vitro* dengan metode MTT. Uji toksisitas menggunakan metode MTT dengan seri konsentrasi 500: 250: 125: 62,5: 31,25 µg/ml. Ekstrak maserasi etanol dan fraksinasi kemudian diuji golongan senyawa aktifnya menggunakan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis).

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut :

1. Preparasi sampel
2. Analisis Kadar Air Biji Koro benguk (*Mucuna pruriens (L) DC*)
3. Ekstraksi dan Fraksinasi Biji Koro benguk (*Mucuna pruriens (L) DC*)
4. Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT
5. Uji Fitokimia Golongan Senyawa Aktif dengan Penambahan Reagen
6. Pemisahan golongan senyawa dengan KLT.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel

Sampel biji koro benguk dicuci hingga bersih untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel pada sampel. Sampel basah kemudian dikering anginkan selama 1 minggu pada suhu ruang. Sampel kering dihaluskan dengan cara diseleb di pusat pelayanan BMM Batu, sehingga didapat luas permukaan yang lebih besar. Luas permukaan sampel tersebut dapat mempercepat proses ekstraksi.

3.4.2 Analisis Kadar Air Metode Oven (AOAC, 1995)

Kadar air diukur menggunakan metode oven biasa karena kandungan bahan volatil pada sampel cukup rendah dan sampel tidak terdegradasi pada suhu 100°C. Cawan kosong dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 15 menit kemudian didinginkan dalam desikator selama 5 menit atau sampai tidak panas lagi. Cawan ditimbang dan dicatat beratnya. Lalu ditimbang sampel sebanyak 5 gram di dalam cawan tersebut. Dikeringkan sampel dalam oven

sampai beratnya konstan (perubahan berat tidak lebih dari 0.003 gram). Setelah itu didinginkan cawan yang berisi sampel kering di dalam desikator. Ditimbang berat akhirnya. Dihitung kadar air dengan persamaan sebagai berikut:

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

Keterangan: x = berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan (g)
 y = berat cawan dan sampel setelah dikeringkan (g)
 a = berat cawan kosong (g)

3.4.3 Ekstraksi Maserasi Dan Fraksinasi senyawa aktif

Ekstraksi senyawa aktif menggunakan metode maserasi atau perendaman dan ekstraksi cair-cair. Sampel sebanyak 423 gram dalam 5 L pelarut etanol 96%. Pemilihan pelarut tersebut karena etanol merupakan pelarut yang mudah dalam melarutkan semua zat yang bersifat polar, semi polar, dan non polar. Menurut Robinson (1995), senyawa fenolik dapat larut dalam air maupun pelarut organik yang polar dan flavonoid dalam tumbuhan dapat diekstraksi menggunakan air maupun etanol. Sampel kemudian dilakukan pengadukan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm (*rotation per minute*) selama 24 jam. Larutan ekstrak kemudian disaring menggunakan pompa *vacum* untuk memisahkan filtrat dan ampasnya. Ampa hasil penyaringan kemudian dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama hingga filtrat yang dihasilkan bening. Semua ekstrak yang diperoleh kemudian digabung dan dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak kemudian disimpan dan ditutup menggunakan aluminium foil.

Ekstrak pekat etanol biji koro benguk kemudian difraksinasi menggunakan pelarut yang berbeda yaitu : pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol dan air. Ekstraks pekat dilarutkan dalam air yang kemudian difraksinasi dengan n-heksana dalam corong pisah dengan perbandingan (1:1), dan dikocok. Dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan, yaitu dengan adanya lapisan n-heksana dan lapisan air. Perlakuan ini dilakukan sampai 4 kali pengulangan sampai lapisan n-heksana terlihat jernih. Kemudian lapisan air yang didapat dilakukan perlakuan seperti diatas dengan menggunakan pelarut kloroform, etil asetat, dan n-butanol. Fraksi yang didapatkan adalah fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air. Kemudian diuapkan dengan rotary evaporator sehingga didapatkan masing-masing fraksi yang kental. Ekstrak dari masing-masing fraksi yang didapatkan kemudian dihitung rendemennya menggunakan persamaan 3.2

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \quad (3.2)$$

3.4.4 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (CCRC, 2009).

3.4.4.1 Penyiapan Sel Kanker

Sel HeLa diambil dari koleksi Universitas Gajah Mada (UGM). Sel kanker dikeluarkan dari *freezer* (-80 °C), dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37 °C selama 2-3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan ke dalam *conical tube* yang telah berisi 10 ml media RPMI, diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37 °C / 5 % CO₂, 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 didalam *culture dish* mencapai 70-85% (konfluen) dilakukan panen sel.

Tahapan panen sel yakni, dicuci sel 2 kali dengan PBS, ditambahkan tripsin-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 CO₂ selama 24 jam.

3.4.4.2 Penghitungan Sel Kanker

Diambil 10 µL panen sel dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Diamati dan dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel kanker dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\sum \text{sel yang dihitung} = \frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4 \quad (3.3)$$

3.4.4.3 Peletakan Sel pada *Plate 96- Well*

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

$$\Sigma \text{pemanenan mL panen sel yang ditransfer} = \frac{\Sigma \text{total sel yang diperlukan}}{\Sigma \text{mL sel terhitung/mL}} \quad (3.4)$$

Diletakkan sel dan ditambahkan media RPMI sesuai perhitungan kedalam *plate 96-well* dan diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Akan tetapi 12 sumuran bagian bawah disisakan untuk kontrol sel dan kontrol media.

3.4.4.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada Plate 96- Well

Ditimbang masing-masing ekstrak dan fraksi yaitu fraksi ekstrak pekan etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol dan fraksi air sebanyak 10 mg dalam botol wadah berbeda, dilarutkan masing – masing ekstrak pekat dalam 100 µL DMSO dan diaduk dengan vortex untuk mempercepat pelarutan sampel, diambil sel dalam inkubator, kemudian dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate 96-well* 180 °C diatas tempat buangan dan ditekan secara perlahan diatas tissue untuk meniriskan sisa cairan, dimasukkan 100µL PBS kedalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu dimasukkan sampel sebanyak 100 µL dengan onsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml dan diulang sebanyak 3 kali, diinkubasi kembali selama 24 jam (Ernawati F, 2010).

3.4.4.5 Pemberian Larutan MTT

Dibuang media sel dan dicuci dengan PBS, ditambahkan larutan MTT 100 µL kedalam setiap sumuran kecuali sel kontrol. Inkubasi kembali selama 3-4 jam didalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Apabila formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *interved*, lalu ditambahkan *stopper* SDS 10

% dalam 0,1 N HCl, dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali ditempat yang gelap (suhu ruangan) semalaman.

Selanjutnya yaitu pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA *reader* untuk mengetahui nilai IC₅₀ setiap ekstrak. Adapun tahapan-tahapan penggunaan alat ini yaitu dengan menghidupkan ELISA *reader* dan ditunggu hingga *progressing* selesai, dibuka pembungkus *plate* kemudian dimasukkan kedalam ELISA *reader*, dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 550-600 nm, dimatikan kembali ELISA *reader*. Data absorbansi yang diperoleh dapat ditentukan prosentase sel yang terhambat dengan menggunakan sumuran sebagai berikut :

$$\text{Presentase sel hidup} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100 \% \quad (3.5)$$

Hasil presentase sel hidup kemudian dimasukkan kedalam aplikasi SPSS untuk kemudian dianalisis menggunakan *probit analysis* dicari nilai IC₅₀ dari ekstrak dan fraksi masing-masing.

3.4.5 Uji Golongan Senyawa Aktif dengan Uji Reagen (Indrayani, dkk, 2006; Halimah, 2010)

Metode uji golongan senyawa aktif dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder biji koro benguk dari ekstrak dan fraksi yang memiliki potensi sebagai antikanker serviks.

3.4.5.1 Uji Flavonoid

Ekstrak biji koro benguk (*Mucuna pruriens (L) DC*) diambil 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi diuapkan sampai kering. Kemudian

dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50 %. Setelah itu ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid (Hayati, 2012).

3.4.5.2 Uji Alkaloid

Ekstrak biji koro benguk (*Mucuna pruriens (L) DC*) diambil 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 1 mL HCl 1 % dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendroff, tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Hasil positif alkaloid apabila terbentuk endapan berwarna merah bata, merah, jingga (dengan reagen Dragendorf) dan endapan putih atau kekuning-kuningan (dengan reagen Meyer) menunjukkan adanya alkaloid.

3.4.5.3 Uji Tanin

Ekstrak biji koro benguk (*Mucuna pruriens (L) DC*) diambil 0,5 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 3-4 tetes larutan FeCl_3 1 %. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua, maka ekstrak tersebut mengandung tanin Katekol (Halimah, 2010).

3.4.5.4 Uji Saponin

Ekstrak biji koro benguk (*Mucuna pruriens (L) DC*) diambil 0,5 ml, dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah air (1:1) dan sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan 2 tetes HCl 1 N, busa yang

terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-10 cm, maka ekstrak positif mengandung saponin (Depkes RI, 1995).

3.4.5.5 Uji Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) 0,5 ml, dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut maka ekstrak tersebut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika hasil yang diperoleh terbentuk warna hijau kebiruan maka ekstrak tersebut menunjukkan adanya steroid (Evans, 1989).

3.4.6 Pemisahan Golongan Senyawa dengan KLT

Hasil uji reagen golongan senyawa yang positif pada masing-masing ekstrak selanjutnya dilakukan identifikasi masing-masing golongan metabolit sekunder dengan menggunakan KLT. Metode modifikasi Sriwahyuni (2010) dilakukan terhadap hasil uji fitokimia dengan uji reagen. Ekstrak biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var. *pruriens* diperoleh dengan melarutkan ekstrak kasar sebanyak 10 mg dengan 1 mL etanol 96 %.

Pemisahan dengan KLT menggunakan plat silika GF₂₅₄ yang diaktivasi terlebih dahulu di dalam oven pada suhu 100°C untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat. Selanjutnya masing-masing plat diberi ukuran 6x10 cm². Ekstrak aktif kemudian ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan

pipa kapiler dan dalam 1 plat KLT diberi 1 totolan, dan dalam 1 tempat totolan diberikan 9–11 kali penotolan. Plat yang sudah berisi totolan tersebut, kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak (eluen).

Eluen untuk pengembangan ini dilakukan penjenuhan terlebih dahulu dalam suatu bejana tertutup, sehingga proses elusi bisa lebih cepat dan eluen bisa naik secara merata, serentak dan teratur. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas atas (\pm 1cm dari tepi atas plat) elusi dihentikan. Noda-noda yang terbentuk kemudian diamati dengan reagen penampak noda (disemprot), dan diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing nodanya. Bercak noda yang dihasilkan pada plat KLT dihitung nilai Rf-nya.

Adapun fase gerak (eluen pengembang) yang digunakan pada masing-masing senyawa dapat dilihat pada Tabel 3.1.

No	Nama Senyawa	Reagen Semprot (Penampak Warna)	Eluen Pengembang
	Alkaloid	Reagen Dragendorff	Etanol:Metanol:air (6:4:2) (v/v)
	Flavonoid	Reagen Uap Amoniak	Etil asetat: Metanol (9:1) (v/v)
	Saponin	H ₂ SO ₄	Kloroform:aseton (4:1) (v/v)
	Tanin	Pereaksi FeCl ₃	Butanol:Asam Asetat:Air (4:1:5) (v/v)
	Triterpenoid/ Steroid	Reagen Libermann-Burchard	Etil asetat:kloroform (1:1) (v/v) n-heksana:etil asetat (4:2) (v/v) etil asetat:metanol (9:1) (v/v)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi antikanker dari ekstrak dan fraksi biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) .var *pruriens*. Adapun beberapa proses yang dilakukan dalam penelitian, yaitu preparasi sampel, analisis kadar air, ekstraksi maserasi dan fraksinasi, uji antikanker dengan metode MTT (CCRC, 2009), serta identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak dan fraksi yang mempunyai potensi sitotoksik terhadap *HeLa cell line* kanker serviks. Tahap identifikasi tersebut meliputi uji fitokimia dengan reagen dan pemisahan golongan senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel meliputi beberapa tahap yaitu pencucian, pengeringan, dan penyerbukan. Pencucian sampel bertujuan untuk menghilangkan kotoran seperti debu yang menempel pada biji koro benguk. Pengeringan dilakukan dengan dikering anginkan untuk menghilangkan kadar air, mempermudah penggilingan serta terhindar dari berkembangbiakan mikroba. Langkah terakhir yaitu penyerbukan yang dilakukan untuk mempermudah dalam proses ekstraksi.

4.2 Analisis Kadar Air Biji Koro Benguk *Mucuna pruriens* (L) DC) .var *pruriens*

Penentuan kadar air dilakukan pada serbuk biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L)DC). var *pruriens*. Proses analisis pada serbuk sampel untuk menentukan kadar air, *acceptability*, kesegaran dan daya tahan suatu sampel.

Apabila kadar air kecil maka kestabilan optimum suatu bahan akan tercapai dan pertumbuhan mikroba dapat dihindari (Winarno, 2002). Analisis kadar air dilakukan dengan metode oven biasa, hal ini karena sifat sampel tidak terdegradasi pada suhu 100°C (AOAC, 1995). Selisih berat sampel sebelum dan sesudah pengeringan menunjukkan banyaknya air yang telah diuapkan dan kadar air biji koro benguk 8.949 % (b/b). Sampel biji koro benguk memiliki kadar air yang cukup baik untuk dilakukan proses ekstraksi secara optimal, karena dibawah 10%. Tingginya kadar air dapat mempengaruhi proses penguapan pelarut dalam sampel pada saat ekstraksi dan pemekatan ekstrak. Pengaruh tersebut terjadi karena bercampurnya titik didih pelarut organik dengan air (Kumala, 2007).

4.3 Ekstraksi Maserasi dan Fraksinasi Sampel Biji Koro Benguk

Metode ekstraksi senyawa aktif yang digunakan adalah ekstraksi maserasi. Prinsip metode maserasi yakni, merendam sampel menggunakan pelarut dan beberapa kali dilakukan pengocokan dalam suhu ruang. Hal ini dikarenakan diperlukannya waktu kontak yang cukup antara sampel dengan pelarut yang secara terus menerus. Sehingga dapat mengakibatkan pemecahan dinding dan membran sel, kemudian senyawa aktif yang berada dalam sitoplasma akan terambil dan masuk dalam pelarut (Djarwis, 2004).

Tahap maserasi pada proses penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96 %. Pemilihan pelarut etanol 96% karena lebih mudah dalam melarutkan semua zat yang bersifat polar, semi polar, dan non polar. Hal ini cukup efektif untuk melarutkan senyawa seperti fenolik yang dapat larut dalam air maupun pelarut organik yang polar dan flavonoid dalam tumbuhan dapat diekstraksi dengan air

maupun etanol. Proses maserasi juga dilakukan pengadukan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 3 jam agar larutan bahan cepat jenuh dan homogen (Vogel, 1978). Proses tersebut perlunya untuk dilakukan pergantian pelarut setiap harinya hingga diperoleh filtrate yang bening yang mengindikasikan senyawa telah terekstrak secara maksimal (Voigh, 1995).

Proses pengambilan filtrat yaitu melalui penyaringan. Penyaringan merupakan metode pemisahan partikel yang terdapat didalam suatu bahan cair sehingga diperoleh filtrat yang diinginkan (Helda, 2015). Penyaringan bertujuan untuk memisahkan antara filtrate dan residu. Proses penyaringan penelitian ini menggunakan penyaringan *vacuum* yang dilengkapi dengan corong buchner untuk mempercepat proses penyaringan. Prinsip penyaringan dengan corong Buchner adalah penyaringan secara mekanis berdasarkan ukuran molekul, sehingga molekul yang berukuran besar akan tertahan pada kertas saring (Vogel, 1978). Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* untuk menghilangkan atau menguapkan pelarut etanol 96% sehingga yang didapat merupakan ekstrak pekat dari biji koro benguk. proses ini dihentikan ketika pelarut sudah tidak menetes lagi pada labu alas bulat. Prinsip utama dari *rotary evaporator* adalah adanya penurunan tekanan dengan dipercepatnya putaran labu alas bulat sehingga pelarut akan menguap 5-10 °C pada suhu dibawah titik didih pelarut (Vogel, 1978).

Pemekatan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* menghasilkan ekstrak pekat yang berupa padatan berwarna kuning kecoklatan dan pelarut yang dapat digunakan lagi. Ekstrak pekat yang didapat dialiri N₂ untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut yang mungkin masih ada dalam ekstrak, sehingga ekstrak tersebut

yang dihasilkan benar-benar murni dan bebas dari pelarutnya. Hasil ekstrak pekat ditunjukkan pada Tabel 4.1 dengan perhitungan rendemen di lampiran 5.

Tabel 4.1 Hasil Rendemen Ekstrak etanol 96% koro bengkok *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*

Pelarut	Serbuk+pelarut yang digunakan	Perubahan warna filtrate	Warna ekstrak pekat	Berat ekstrak pekat	Rendemen (%) (b/b)
Etanol 96%	423,44 g +5000 mL	Kuning	Coklat pekat	23,62 g	11,377

Rendemen merupakan salah satu parameter untuk mengetahui seberapa besar produk yang dihasilkan dari hasil produksi, yang dinyatakan dengan perbandingan antara jumlah produk yang dihasilkan dengan jumlah bahan yang digunakan (Warsono, dkk, 2013). Nilai rendemen ekstrak kasar etanol 96% biji koro bengkok pada penelitian ini cukup tinggi yaitu 11,377 %. Hasil penelitian yang dilakukan Sundari (2010) juga menggunakan pelarut etanol 96 % untuk mengekstrak biji buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) diperoleh ekstrak kental sebanyak 10,953 gr gram, sehingga dapat rendemen sebesar 7,302 %.

Ekstrak pekat etanol yang didapat terlebih dahulu disisihkan sebanyak 2,62 gram yang nantinya juga akan diuji aktivitas antikankernya sebagai sampel satu. Sisa ekstrak pekat etanol biji koro bengkok sebesar 21 dilarutkan dalam air sampai larut sebanyak 50 mL air. Larutan ekstrak selanjutnya disaring sehingga terpisah dengan residunya. Filtrat yang didapat selanjutnya diekstraksi partisi (fraksinasi) menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, dan n-butanol. Hal ini bertujuan untuk memisahkan senyawa polar dan nonpolar yang terdapat dalam filtrate air ekstrak etanol. Prinsip dari ekstrak cair-cair adalah adanya distribusi komponen target pada dua pelarut yang tidak saling larut. Sebagai

komponen larut pada fase pertama dan sebagian larut pada fase kedua (Khopkar, 2008).

Fraksinasi pertama dilakukan antara filtrate air dari ekstrak etanol dengan pelarut n-heksana perbandingan (1:1) sehingga terbentuk dua lapisan organik yaitu lapisan atas fraksi n-heksana (kuning kecoklatan) dan lapisan bawah fraksi air (coklat tua). Perbedaan massa jenis pelarut mengakibatkan fraksi n-heksana berada diatas karena massa jenis n-heksana (0,655 g/mL) lebih kecil daripada massa jenis air (1 g/mL). Fraksinasi kedua antara fraksi air dengan pelarut kloroform perbandingan (1:1) terbentuk dua lapisan organik. Kedua lapisan organik menunjukkan lapisan atas fraksi air (coklat tua) dan lapisan bawah fraksi kloroform (putih kecoklatan). Fraksi kloroform berada dibawah kerana kloroform mempunyai massa jenis 1,498 g/mL.

Fraksinasi ketiga antara fraksi air dan pelarut etil asetat perbandingan (1:1) yang kemudian terbentuk dua lapisan organik yaitu lapisan atas fraksi etil asetat (coklat pudar) dan lapisan bawah fraksi air (coklat tua). Fraksi etil asetat berada diatas karena etil asetat mempunyai massa jenis 0,894 g/mL. Pada fraksinasi terakhir antara fraksi air dan pelarut n-butanol dengan perbandingan (1:1) terbentuk dua lapisan organik yaitu lapisan atas fraksi n-butanol (merah bata) dan lapisan bawah fraksi air (coklat tua). Fraksi n-butanol berada diatas karena n-butanol mempunyai massa jenis 0,810 g/mL. Adapun hasil ekstraksi cair-cair ditunjukkan pada Tabel 4,2 dengan perhitungan rendemen pada Lampiran 5.

Tabel 4.2 Hasil Ekstraksi Partisi Dan Rendemen Masing-Masing Fraksi

Pelarut	Serbuk + sampel yang digunakan	Warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Berat ekstrak pekat	Rendemen (%) (b/b)
Air	21 g+ 50 mL	Kuning	Coklat tua	4,47 g	21,285 %
n-heksana	50 mL + 50 mL	Kuning bening	Kuning kecoklatan	5,66 g	26,95 %
Kloroform	50 mL + 50 mL	Kuning	Putih kecoklatan	1,70 g	8,09 %
Etil asetat	50 mL + 50 mL	Kuning	Coklat pudar	0,039 g	0.1857 %
n-butanol	50 mL + 50 mL	Kuning	merah bata	6,72 g	32 %

Nilai rendemen fraksi n-butanol dan fraksi n-heksana lebih besar dibandingkan fraksi air, kloroform, dan etil asetat. Diduga kebanyakan senyawa metabolit sekunder yang ada didalam biji koro benguk lebih bersifat non polar. Menurut Murugan (2005) biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L)DC). *var pruriens* mengandung senyawa alkaloid, tannin, saponin, flavonoid, dan triterpenoid. Selanjutnya ekstrak dan masing-masing fraksi yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antikanker dengan metode MTT (*Microculture tetrazolium*) (CCRC, 2009, ilhami, dkk, 2013).

4.4 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT (*microtetrazolium*) (CCRC, 2009; Ilhami, dkk, 2013).

Ekstrak dan masing-masing fraksi diuji aktivitas antikanker secara *in vitro* menggunakan kultur terhadap sel kanker serviks dengan metode MTT (*Microculture tetrazolium*). Metode MTT merupakan pengujian aktivitas sel berdasarkan perubahan warna atau reaksi kolorimetri pada *bio-reduction* garam tetrazolium ke formazan (Goodwin, dkk., 1995). Metode perubahan warna tersebut digunakan untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Sel yang mengalami

poliferasi, mitokondria akan menyerap MTT sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu akibat terbentuknya Kristal tetrazolium (formazan) (Depamede, dkk, 2009).

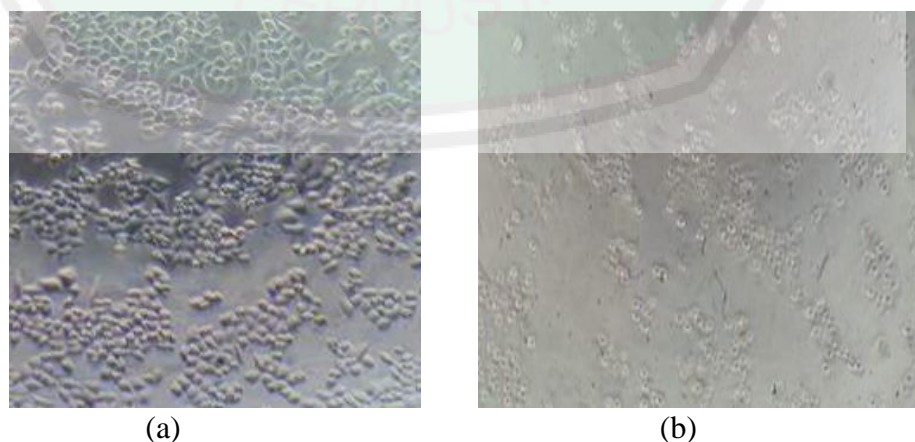
Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas penghambatan sel secara *in vitro* melalui penentuan nilai IC_{50} dengan menghitung pembentukan Kristal formazan yang berwarna ungu (Doyle dan Griffith, 2000). Metode ini dipilih karena tidak bertentangan dengan azas *animal welfare* (keamanan lingkungan). Percobaan ini dilakukan diluar tubuh sehingga kondisi lingkungan (kultur) dan keseragaman (homogenitas) populasi sel lebih dapat dikontrol. Pengujian dilakukan pada sel HeLa kanker serviks. Sel HeLa merupakan sel yang diisolasi dari rahim wanita yang berusia 31-54 tahun. Sel HeLa tumbuh sebagai sel yang semi melekat (ATTC, 2011). *HeLa cell line* sering digunakan dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, kemampuan dalam replikasi tidak terbatas, homogenitas tinggi serta mudah diganti *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (AATC, 2015).

Pengujian antikanker ini dilakukan untuk mengetahui potensi dari ekstrak dan fraksi biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC). *var pruriens* dalam menghambat atau membunuh kanker. Beberapa tahapan yang dilakukan, yaitu: 1) penyiapan sel kanker, 2) panen sel, 3) uji sitotoksisitas, 4) pemberian reagen MTT, dan 5) pembacaan absorbansi. Tahapan penyiapan sel kanker meliputi penghidupan kembali sel yang telah ditidurkan (inaktif sel) dan ditumbuhkan hingga mencapai konfluen. Konfluenitas sel merupakan tumbuhnya sel secara homogen atau meratanya sel sebagai sel monolayer sampai menutupi *cover glass*.

Sel dikatakan konfluen apabila sel tersebut sudah menempel dan berkembang memenuhi wadah kultur (Djati, 2006).

Panen sel adalah tahapan penumbuhan dan pengembangbiakkan sel dengan penambahan media kultur. Media kultur berfungsi sebagai sumber nutrisi dan respirasi, serta memberi dukungan pada kehidupan sel yang dibiakkan agar dapat tumbuh (Bambang, 2009). Media kultur yang digunakan pada penelitian ini adalah RPMI karena mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, glukosa dan serum. Serum yang digunakan adalah FBS (*Fetal Bovine Serum*), mengandung hormon yang dapat memacu pertumbuhan sel, albumin sebagai protein transpor, lipid yang diperlukan sel untuk pertumbuhannya dan mineral sebagai kofaktor enzim (Freshney, 2000).

Pada tahapan panen sel, sel yang menempel pada dasar wadah kultur (*culture dish*) perlu ditambahkan tripsin agar terlepas. Morfologi sel HeLa akan terlihat lonjong seperti daun ketika menempel pada wadah kultur, sedangkan sel yang lepas dari wadah kultur akan terbentuk bulat – bulat dan terlihat mengapung dipermukaan (Gambar 4.4).



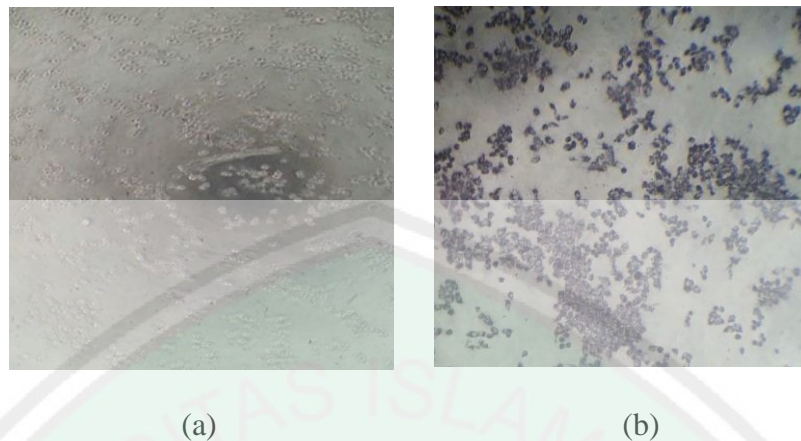
Gambar 4.4 tampilan morfologi sel HeLa (a) sebelum pemberian tripsin dan (b) setelah pemberian tripsin.

Sel sebelum pemberian tripsin terlebih dahulu dibuang media kultur dan ditambahkan PBS sebagai pencuci wadah kultur dari media yang mengandung serum FBS, karena serum ini dapat menghambat kerja tripsin (Freshney, 2000). Pemberian tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara glikoprotein dan proteoglikan dengan dasar wadah kultur, akibatnya sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada dasar wadah dan mengapung (Doyle dan Griffith, 2000). Penghitungan sel dilakukan menggunakan alat *hemocytometr* dengan pengamatan dibawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui konsentrasi sel yang akan dipakai uji sitotoksisitas. Hasil perhitungan sel yang diperoleh adalah 76×10^4 / mL. Jumlah sel yang dihitung kemudian digunakan untuk mengetahui jumlah sel yang dibutuhkan untuk mengisi *plate 96-well*. Berdasarkan perhitungan diketahui jumlah sel yang dibutuhkan adalah 1,3 ml yang ditanda bataskan menjasi 10 ml dengan media RPMI dalam *conicel tube*.

Uji sitotoksisitas meliputi preparasi sampel dan *treatment* sel. Preparasi sel dilakukan dengan melarutkan sampel kedalam Dimetil sulfoksida (DMSO) dengan seri konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Seri konsentrasi yang digunakan untuk mengetahui signifikasi peningkatan dosis konsentrasi dengan efek peningkatan proliferasi sel yang dihasilkan (Winarno, 2011). Dimetil sulfoksida (DMSO) merupakan cairan tak berwarna yang memiliki rumus $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar (Morshed, dkk, 2012). DMSO pada penelitian ini juga digunakan sebagai kontrol sampel, karena menurut Djajanegara dan Wahyudi (2009) DMSO tidak toksik terhadap sel kanker sehingga DMSO juga dapat digunakan sebagai kontrol sampel.

Sampel yang telah dibuat seri konsentrasi selanjutnya di-*tratment* kedalam *plate 96-well* yang sudah terisi sel kanker. Sampel kemudian diamati aktivitasnya terhadap sel kanker HeLa menggunakan reagen MTT (3-(4,5-dimethiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide). Tahapan yang akan terjadi pada perlakuan ini yaitu, enzim dehidrogenase pada mitokondria sel akan mengubah MTT berwarna kuning yang larut air menjadi bentuk formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Intensitas warna ungu tersebut menyatakan banyaknya sel aktif yang hidup, sebab enzim mitokondria pada sel aktif memitabolisme garam tetrazolium sehingga terjadi penutupan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan (Mostmann, 1983).

Sel dan sampel yang telah ditambahkan MTT kemudian diinkubasi selama 4 jam untuk membentuk reaksi antara sel yang hidup dengan reagen. Selanjutnya, reaksi dihentikan dengan SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 10%. Penambahan SDS sebagai larutan stopper dengan cara mendenaturasi protein mmenjadi unit polipeptida dan membentuk kompleks SDS-polipeptida. Hasil pengamatan menunjukkan reaksi yang terjadi antara sel HeLa dengan garam MTT membentuk perubahan warna ungu. Hal ini menunjukkan kemungkinan aktivitas sampel terhadap sel HeLa untuk menghambat proliperatif sel. Karena warna ungu yang tampak menunjukkan semakin banyaknya kristal formazan yang terbentuk. Pengamatan sel HeLa sebelum dan sesudah direaksikan dengan reagen MTT diamati pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 Tampilan morfologi sel HeLa (a) sebelum ditambahkan reagen MTT (b) setelah ditambahkan reagen MTT.

Tahapan selanjutnya yaitu pembacaan absorbansi pada sel yang telah membentuk kompleks berwarna ungu. Absorbansi dibaca dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Larutan dengan warna ungu kebiruan dapat diserap oleh panjang gelombang 595 nm yang mana dapat menyerap warna kuning didaerah warna tampak tersebut (Effendy, 2007). Absorbansi yang didapatkan dijadikan acuan untuk menghitung persentase sel hidup dan menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing larutan uji. Nilai IC_{50} dari masing-masing larutan uji setelah dilakukan analisis probit menggunakan SPSS dapat diamati pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Hasil IC_{50} ekstrak dan fraksi koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC). *var pruriens* terhadap sel HeLa

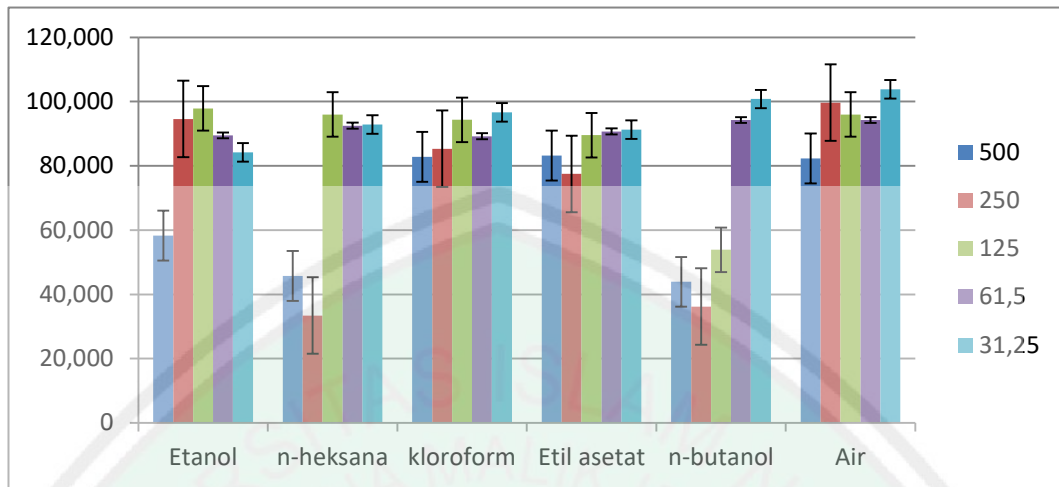
No	Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD*
1	Ekstrak Etanol 96%	675.007 \pm 53.777
2	Fraksi n-Heksana	378.667 \pm 1.403
3	Fraksi Kloroform	1152.710 \pm 48.9717
4	Fraksi Etil asetat	1422.954 \pm 97.8492
5	Fraksi n-Butanol	316.990 \pm 17.720
6	Fraksi Air	1038.519 \pm 68.8881

*Rata-rata \pm Standar Deviasi yang diperoleh dari eksperimen kali pengulangan yang berbeda

Nilai IC_{50} (Tabel 4.3) menunjukkan bahwa semua sampel memiliki aktivitas yang berbeda terhadap sel HeLa. Menurut Dia dkk (2015), terdapatnya perbedaan aktivitas pada ekstrak sampel dimungkinkan karena adanya pengaruh dari bahan baku yang ada pada sampel. Hal ini juga menunjukkan sifat dari senyawa aktif pada senyawa alam yang ikut terekstrak pada sampel. Senyawa triterpenoid dan steroid memiliki sifat nonpolar, sedangkan senyawa tanin dan alkaloid memiliki sifat polar. Berdasarkan variasi larutan sampel uji yang digunakan maka dimungkinkan senyawa tersebut akan terdistribusi pada sifat kepolaran yang sama.

Nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi koro benguk berkisar antara 316 $\mu\text{g/ml}$ -1422 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki efek toksik sangat lemah terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} yang berturut-turut (675.007;1152.710;1422.954; 1038.519) $\mu\text{g/ml}$. Fraksi n-heksana dan fraksi n-butanol memiliki efek toksik yang lebih baik dengan nilai IC_{50} lebih kecil yakni, 378.667 $\mu\text{g/ml}$ (n-heksana) dan 316.990 $\mu\text{g/ml}$ (n-butanol). Menurut Machana (2011) sampel yang memiliki nilai $IC_{50} < 500$ $\mu\text{g/ml}$ dapat bersifat toksik terhadap sel kanker. Sedangkan menurut Malihah (2014) semakin kecilnya nilai IC_{50} , maka semakin besar efek toksik terhadap sampel uji.

Berdasarkan Tabel 4.3 dapat dibuat grafik hubungan antara % viabilitas sel hidup pada tiap konsentrasi larutan uji terhadap sel HeLa.



Gambar 4.3 Grafik nilai % viabilitas sel hidup tiap konsentrasi larutan uji

Berdasarkan nilai viabilitas sel (Tabel 4.3), ekstrak (*Mucuna pruriens* (L) DC). *var pruriens* menunjukkan nilai yang berbeda pada masing-masing konsentrasi larutan uji. Kematian sel pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi kloroform terjadi pada 125 µg/ml. Sedangkan pada masing-masing n-butanol dan air menunjukkan kematian sel pada konsentrasi yang terkecil, yaitu pada 31,25 µg/ml.

Berdasarkan hasil perbandingan pada Tabel 4.3 nilai viabilitas sel dan konsentrasi berbanding terbalik yaitu semakin kecil konsentrasi nilai viabilitasnya semakin besar. Hal ini menunjukkan semakin kecil konsentrasi sampel, maka persentase sel yang hidup semakin banyak. Sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menyatakan bahwa, pada ekstrak etanol daun benalu kersen (*D. Pentandra L. miq*) menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak uji, maka semakin rendah persentase sel yang hidup (korelase negatif) (Nirwana, 2015). Selanjutnya masing-masing larutan uji dilakukan identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder meliputi uji fitokimia dengan reagen.

4.5 Uji Fitokimia dengan Reagen

Uji fitokimia adalah metode untuk mengetahui golongan senyawa aktif secara kualitatif pada suatu ekstrak tanaman. Prinsip dari pengujian ini adalah reaksi uji warna (*spot test*) dan busa dengan suatu pereaksi warna (Kristanti, dkk, 2006). Uji fitokimia pada penelitian ini, meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan triterpenoid pada ekstrak dan fraksi koro benguk (Ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi kloroform, fraksi n-butanol dan fraksi air). Hasil ekstrak fraksi etil asetat memiliki rendemin yang sangat sedikit sehingga pada penelitian ini tidak dilakukan uji fitokimia. Menghindari kurangnya ekstrak pada tahap uji selanjutnya, identifikasi senyawa terhadap ekstrak etil asetat hanya dilakukan pemisahan senyawa menggunakan KLT.

Hasil uji fitokimia ekstrak koro benguk menunjukkan positif mengandung senyawa alkaloid, tanin, triterpenoid, dan steroid. Hasil positif uji senyawa alkaloid ditunjukkan pada fraksi kloroform dan fraksi n-heksana. Hasil positif uji tanin, ditunjukkan pada ekstrak etanol, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air. Hasil uji senyawa triterpenoid positif pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi kloroform dan air. Sedangkan fraksi butanol positif menunjukkan senyawa steroid (Tabel 4.3). Hasil uji fitokimia dengan senyawa aktif ekstrak *Mucuna pruriens* (L) DC . var *pruriens* ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.4 Hasil pengamatan uji fitokimia *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*

Sampel	alkaloid		Flavonoid	Tanin	Saponin	Triterpenoid	steroid
	Mayer	Dragendorff					
Etanol	-	-	-	+	-	+	-
n-heksana	+	+	-	-	-	+	-
Kloroform	+	+	-	+	-	+	-
Etil asetat							
n-butanol	-	-	-	+	-	-	+
Air	-	-	-	+	-	+	-
Keterangan hasil positif	Endapan coklat muda	Endapan jingga		Hijau kehitaman		Cincin violet/cincin coklat	Biru kehijauan

Keterangan (+) positif adanya senyawa (-) negatif adanya senyawa tidak diuji

Berdasarkan data uji fitokimia diatas menunjukkan hasil dari beberapa senyawa nonpolar (triterpenoid dan steroid) serta senyawa polar (tanin dan alkaloid). Pada penelitian ini, seharusnya hanya menunjukkan positif pada sampel dengan kepolaran yang sama. Namun, pada penelitian ini senyawa non polar ada yang menunjukkan positif pada ekstrak dengan pelarut polar, begitu pula sebaliknya. Sedangkan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar yaitu alkaloid, saponin, tanin, dan senyawa yang bersifat semi polar yaitu senyawa golongan fenolik termasuk flavonoid sedangkan senyawa non polar yaitu steroid dan triterpenoid.

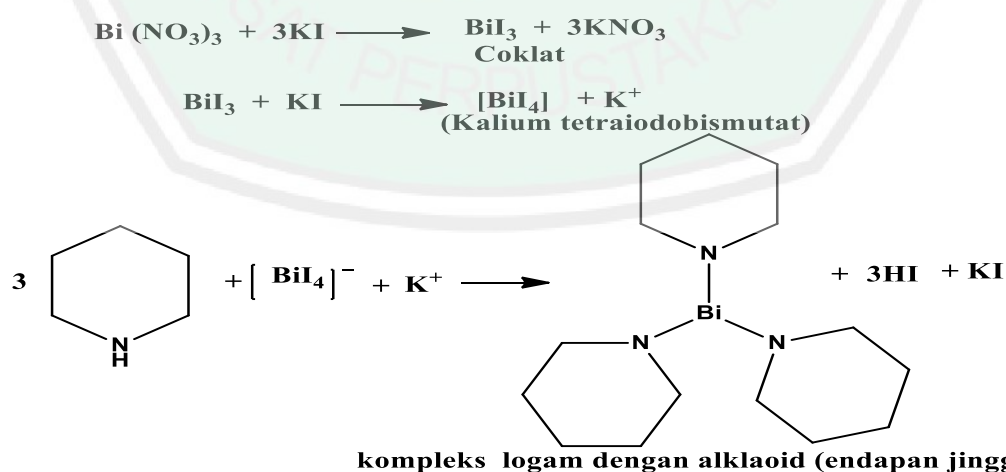
Larutnya senyawa polar terhadap larutan yang non polar diduga ekstraksi senyawa yang dilakukan. Ekstraksi senyawa aktif pada penelitian ini tidak melakukan metode hidrolisis sebelum dilakukan fraksinasi. Hidrolisis adalah reaksi yang terjadi antara suatu senyawa dengan air membentuk reaksi keseimbangan dengan bantuan katalis. Senyawa metabolit sekunder yang dialam pada umumnya terikat dengan glukosa. Senyawa metabolit sekunder yang bersifat non polar jika terikat dengan glukosa akan bersifat polar. Ikatan glikosida ini akan

membuat sifat fisika, sifat kimia dan aktivitas biologi ddari senyawa tersebut (Harborne, 1987; Kristanti, 2008).

4.5.1 Uji senyawa alkaloid

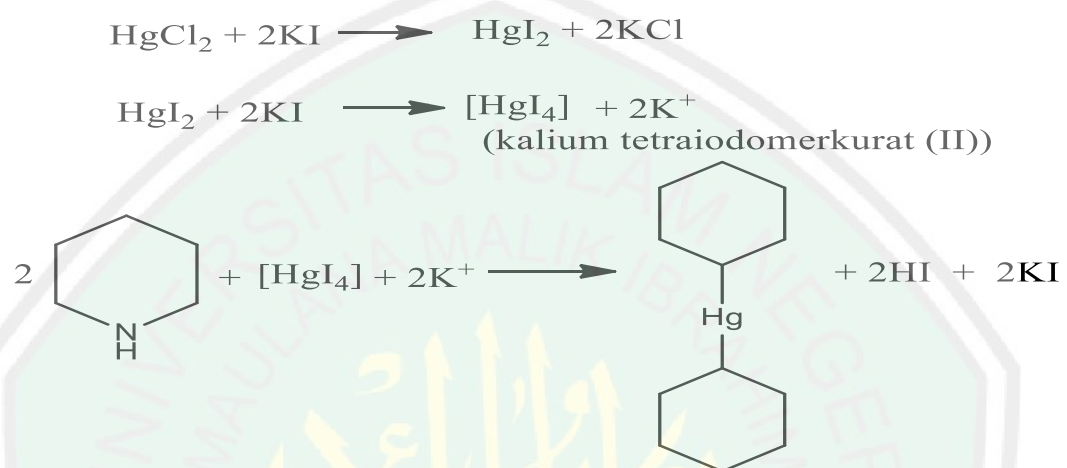
Alkaloid merupakan senyawa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, dalam bentuk gabungan biasanya merupakan bagian dari sistem siklik yang bersifat polar (Pratiwi, 2014). Hasil uji fitokimia senyawa alkaloid koro benguk menunjukkan positif pada fraksi kloroform dan n-heksana yang ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda pada uji Mayer dan endapan jingga pada uji Dragendorff.

Prinsip dasar dari uji dragendorf adalah senyawa alkaloid dapat membentuk senyawa kompleks dengan logam Bi^{+3} dengan ditandai adanya endapan jingga karena berekasi dengan tetraiodobismut. Perkiraan reaksi yang terjadi pada uji Dragendorff hingga terbentuk endapan ditunjukkan pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Perkiraan Reaksi Alkaloid dengan Uji Mayer (Setyowati, dkk, 2014).

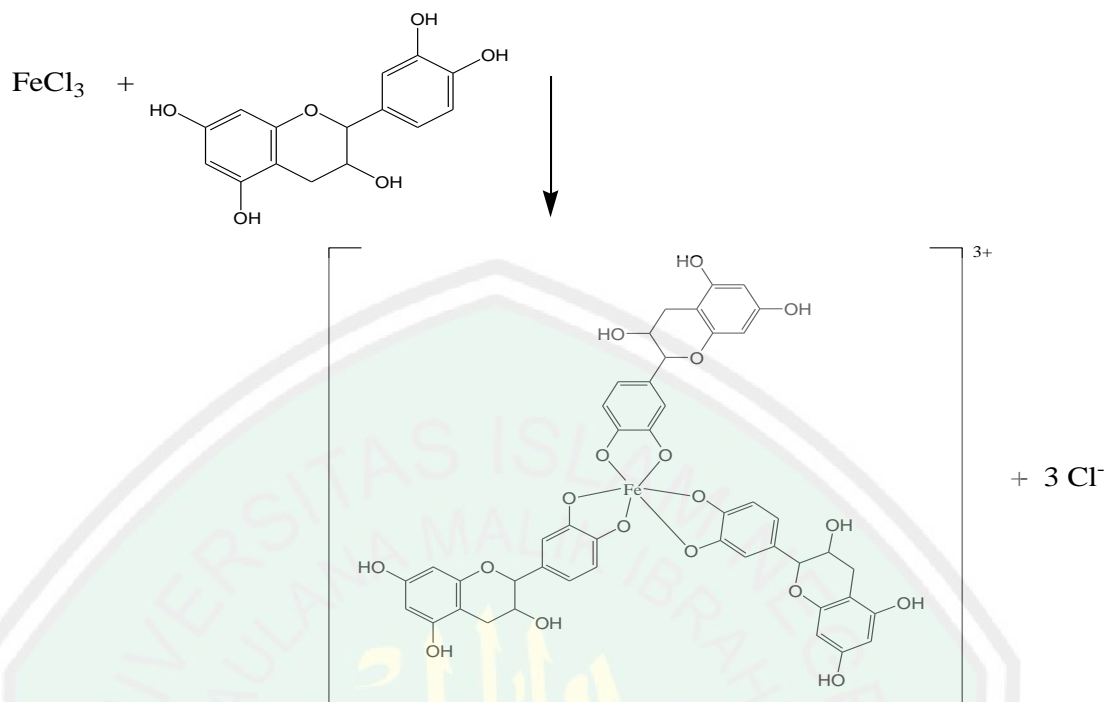
Sedangkan prinsip dasar dari uji mayer yaitu senyawa alkaloid dapat membentuk senyawa kompleks dengan logam Hg yang ditandai adanya endapan putih kekuningan-coklat bening (Sastrohamidjojo, 1996). Reaksi pada uji Mayer ditunjukkan pada Gambar 4.5



Gambar 4.5 Perkiraan reaksi Alkaloid dengan uji Mayer (Rahmah, 2014).

4.5.2 Uji Tanin

Senyawa tanin adalah senyawa yang bersifat polar karena adanya gugus OH. Senyawa tanin akan membentuk warna biru tua atau hijau kehitaman setelah penambahan FeCl_3 (Jones dan Kinghorn, 2006; Robinson, 1995). Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol dan ekstrak hasil fraksinasi *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* diperoleh perubahan warna hijau kehitaman setelah penambahan FeCl_3 1%. Hal ini menunjukkan ekstrak koro benguk positif mengandung golongan senyawa tanin. Dermawan, (2012) menyatakan terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta pada ekstrak setelah ditambahkan dengan FeCl_3 merupakan senyawa tanin, karena tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} yang dapat diamati pada Gambar 4.6



Gambar 4.6 Perkiraan reaksi senyawa tanin dengan reagen FeCl_3 (Dermawan, 2012).

4.5.3 Uji Triterpenoid Dan Steroid

Uji fitokimia yang banyak digunakan untuk mengidentifikasi adanya triterpenoid dan steroid adalah reaksi Libermann-Burchard (anhidrat asetat- H_2SO_4 pekat). Pengujian steroid/triterpenoid didasarkan pada kemampuan senyawa untuk membentuk warna dengan H_2SO_4 pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna kecoklatan yang menunjukkan adanya kandungan triterpenoid. Sedangkan adanya steroid ditandai dengan perubahan warna dari violet menjadi biru atau hijau. Perubahan warna ini disebabkan karena terjadinya reaksi oksidasi pada golongan triterpenoid/steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Dewi., dkk, 2013; Tomahayu, 2014).

Berdasarkan Tabel 4.3 menunjukkan senyawa triterpenoid positif pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi air yang ditandai dengan adanya cincin kecoklatan. Sedangkan pada fraksi butanol menunjukkan positif mengandung senyawa steroid yang ditunjukkan dengan penampakan warna berupa warna biru kehijauan. Triterpenoid adalah salah satu turunan dari senyawa terpenoid (Fessenden, 1992).

4.6 Pemisahan Senyawa Aktif Menggunakan Metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Uji kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan sebagai uji penegasan terhadap kandungan senyawa metabolit sekunder dalam *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* yang positif pada uji fitokimia. Penelitian ini menggunakan fase diam plat silika G 60 F₂₅₄ dengan 6 cm x 10 cm yang akan dielusi menggunakan beberapa variasi eluen untuk memisahkan senyawa alkaloid, tanin, triterpenoid, dan steroid. Pemisahan dengan metode KLT terlebih dahulu dilakukan aktivasi pada plate silika G 60 F₂₅₄ dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C selama 30 menit. plat KLT silika G 60 F₂₅₄ harus melakukan aktivasi dengan cara dioven pada suhu 100°C selama ± 1 jam untuk menghilangkan kadar airnya. Adanya air dalam silika gel dapat mempengaruhi proses elusi dengan cara, air akan menutup sisi aktif silika gel (Ganjar dan Rohman, 2007).

Ekstrak koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*) kemudian ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler sebanyak 11 totolan. Penotolan sampel masing-masing ekstrak koro benguk pada plat menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Perbedaan tersebut dapat diamati pada sampel ekstrak n-butanol dan air, dimana hasil ppenotolan cenderung melebar

pada kondisi yang sama. Keadaan ini diduga terjadi karena ekstrak yang digunakan cenderung bersifat polar. Sehingga, ekstrak lebih tertahan dan terdistribusi pada fase diamnya. Plat kemudian dikeringkan dan dielusidasi dengan eluen senyawa masing-masing.

Noda yang terbentuk selanjutnya dideteksi menggunakan pereaksi semprot sesuai golongan senyawa yang diamati. Pereaksi semprot digunakan untuk menambah kepekaan deteksi dengan menghasilkan perubahan warna yang berkaitan dengan struktur senyawa yang bersangkutan. Selain menggunakan pereaksi semprot, pengamatan juga dilakukan dengan menggunakan lampu UV pada λ 366 nm dan nilai *R_f* masing-masing oda.

4.7.1 Uji Senyawa Alkaloid

Identifikasi golongan senyawa alkaloid dalam *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* menggunakan eluen etanol : metanol : air (6:4:2) dengan reagen semprot Dragendrof. Senyawa alkaloid akan menunjukkan positif dengan membentuk warna jingga karena membentuk senyawa kompleks dengan reagen Dragendroff (Gambar 4.5) yang berwarna orange (Setyowati, dkk, 2014). Hasil pemisahan komponen-komponen senyawa pada uji alkaloid dapat diamati pada Tabel 4.4.

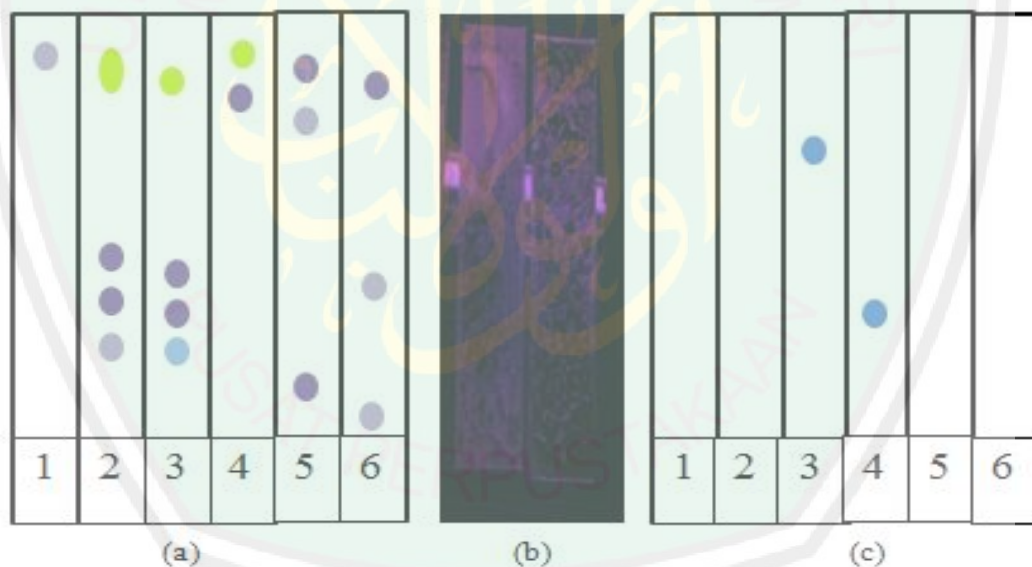
Tabel 4.4 Nilai R_f dan warna pada noda hasil KLT senyawa alkaloid *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* dengan eluen etanol : metanol : air (6:4:2)

Sampel	Noda	Sebelum ditambah reagen Dragendroff 366 nm	Sesudah ditambah reagen Dragendroff 366 nm	Nilai R_f
Etanol	1	Ungu	-	0,9
Fraksi n-heksana	4	Kuning kehijauan	-	0,85
		Ungu	-	0,81
		Ungu	-	0,41
		Ungu pudar	-	0,26
Fraksi kloroform	4	Kuning kehijauan	Biru	0,85
		Ungu	-	0,5
		Ungu	-	0,42
		Biru	-	0,21
Fraksi etil asetat	3	Hijau	-	0,9
		ungu	-	0,82
		-	Biru	0,6
Fraksi n-butanol	3	Ungu	-	0,85
		Ungu pudar	-	0,78
		Ungu	-	0,11
Fraksi air	3	Ungu	-	0,87
		Ungu pudar	-	0,65
		Ungu pudar	-	0,075

Hasil pemisahan komponen-komponen senyawa menunjukkan pemisahan yang baik dengan terbentuknya beberapa noda. Penggunaan secara langsung (tanpa lampu UV) sebelum direaksi dengan reagen Dragendroff, tidak dapat diamati terbentuknya noda dan warna. Sementara pengamatan pada UV λ 366 nm menunjukkan terbentuknya noda dengan warna ungu, kuning kehijauan dan biru. Pengamatan secara langsung (tanpa lampu UV) setelah direaksikan dengan reagen Dragendroff, tidak dapat diamati terbentuknya noda yang berwarna pada plat. Semua bagian plat nampak berwarna orange, adapun warna orange yang teramati tersebut diduga merupakan warna dasar reagen Dragendroff. Sedangkan pengamatan dibawah lampu UV λ 366 nm menunjukkan adanya noda berwarna

biru pada fraksi kloroform dan fraksi etil asetat dengan warna hitam gelap pada dasar plat.

Menurut Husna, (2014) senyawa alkaloid hasil uji KLT menunjukkan penampakan noda berwarna jingga, coklat dan kering kehijauan setelah dideteksi dibawah lampu UV λ 366 nm dengan reagen dragendroff. Noda dengan warna jingga, coklat dan kuning tersebut terjadi karena senyawa alkaloid membentuk kompleks dengan Dragendroff. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat dinyatakan bahwa eluen yang digunakan untuk memisahkan senyawa alkaloid dalam ekstrak koro benguk belum mampu menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Visualisasi hasil KLT senyawa alkaloid dapat diamati pada Gambar 4.7.



Keterangan:

- Bercak noda sebelum direaksikan dengan Dragendroff pengamatan UV λ 366 nm
- Bercak noda setelah direaksikan dengan Dragendroff pengamatan UV λ 366 nm
- Bercak noda setelah direaksikan dengan Dragendroff pengamatan UV λ 366 nm

Gambar 4.7 Hasil KLT golongan senyawa alkaloid *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* menggunakan eluen stanol : metanol : air (6:4:2)

4.7.2 Uji Tanin

Identifikasi senyawa tanin dalam sampel *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* menggunakan eluen n-butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5) dengan senyawa tanin membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} (Gambar 4.6). Hasil uji KLT (Tabel 4.5) pemisahan senyawa tanin menunjukkan pemisahan yang kurang baik ditandai dengan terbentuknya beberapa noda yang berekor sebelum maupun sesudah direaksikan dengan pereaksi $FeCl_3$. Noda yang memiliki ekor (*tailing*), dimungkinkan terjadi karena teknik penotolan yang kurang baik. Penotolan yang kurang baik memberikan hasil yang kurang baik, jadi nodayang memiliki ekor tersebut sebenarnya terdapat 2 noda (Masruroh, 2015).

Tabel 4.5 Nilai R_f dan warna noda hasil KLT golongan senyawa tanin dalam *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* dengan eluen butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5).

Sampel	Noda	Sebelum ditambah Reagen $FeCl_3$ 1%	Setelah ditambah Reagen $FeCl_3$ 1%	Nilai R_f	Dugaan senyawa
Ekstrak Etanol 96%	4	Hijau	-	0,97	-
		Hijau muda	-	0,92	-
		Hijau	Hijau	0,68	-
		Ungu	Ungu	0,35	Tanin
Fraksi n-heksana	4	Merah	Merah	0,93	-
		Kuning	-	0,88	-
		Biru	-	0,66	-
		Ungu	Ungu	0,36	Tanin
Fraksi kloroform	2	Merah	Merah	0,95	-
		ungu	Ungu	0,84	-
Fraksi etil asetat	3	Ungu	Merah	0,39	-
		hijau	-	0,33	Tanin
		Ungu	Ungu	0,95	-
Fraksi n-butanol	2	Hujau	-	0,69	-
		Ungu	Ungu	0,35	Tanin
Fraksi air	2	Hijau	-	0,49	-
		Ungu	Ungu	0,33	Tanin

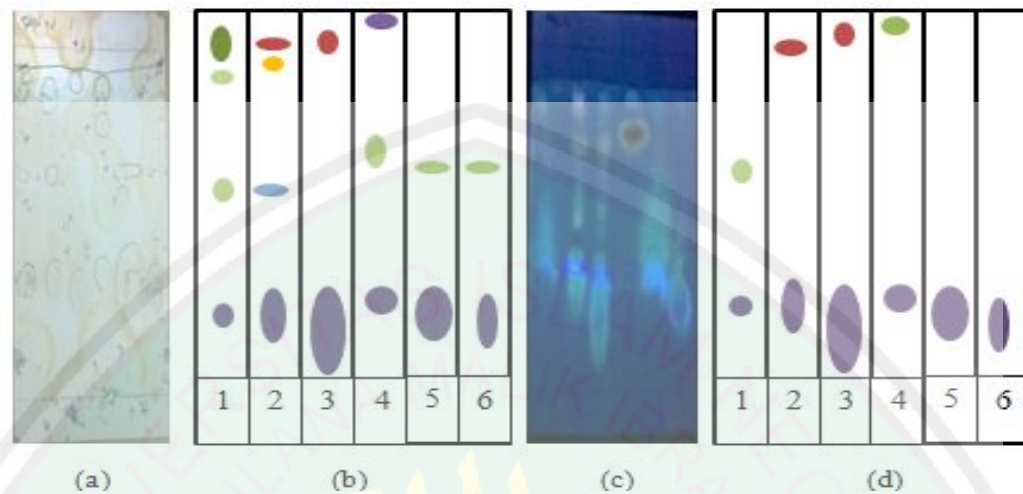
Noda yang terbentuk dari hasil pengamatan menunjukkan warna ungu, hijau, dan merah setelah ditambahkan reagen semprot FeCl_3 1%. Senyawa tanin jika dideteksi dibawah lampu UV pendek dengan pereaksi FeCl_3 menunjukkan warna lembayung (ungu) (Harborne, 1996). Hayati (2010) menyatakan bahwa noda hasil KLT yang diduga senyawa tanin adalah berwarna ungu kehitaman. Sehingga, noda berwarna ungu yang terbentuk dari ekstrak koro benguk diduga merupakan golongan senyawa tanin.

Tabel 4.3 uji fitokimia menunjukkan senyawa tanin positif pada sebagian besar ekstrak sampel, kecuali pada fraksi n-heksana menunjukkan hasil yang negatif. Sementara pada KLT, senyawa tanin menunjukkan positif pada ekstrak n-heksana. Perbedaan hasil uji ini memungkinkan karena senyawa tanin dalam sampel fraksi n-heksana memiliki komposisi yang sedikit. Sedikitnya komposisi senyawa tanin dalam fraksi n-heksana dapat diamati pada hasil KLT yang ditandai dengan noda warna ungu nampak tidak terlalu terang (padat).

Dugaan senyawa tanin pada noda berwarna ungu juga dapat ditunjukkan dengan nilai R_f (*retardation factor*) atau waktu retensi merupakan nilai antara 0-1 yang menunjukkan kecepatan elusi dari suatu senyawa. Nilai R_f berhubungan dengan kepolaran senyawa yang terdistribusi. Noda yang diduga merupakan senyawa tanin (warna ungu) pada penelitian ini memiliki R_f antara 0,33-0,39. Noda dengan R_f tersebut menunjukkan senyawa yang terdistribusi merupakan senyawa yang cenderung bersifat polar karena noda lebih tertarik pada eluennya yang lebih bersifat polar atau bisa disebut $C_{stasioner} < C_{mobil}$. Penelitian dengan sampel daun rumput bambu juga terdeteksi senyawa tanin dengan nilai R_f 0,17-

0,78 dengan warna ungu setelah ditambahkan reagen FeCl_3 1% (Masruroh, 2015).

Berikut hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.8.



Keterangan:

- Bercak noda sebelum di reaksikan dengan reagen FeCl_3 1%
- Bercak noda sebelum di reaksikan dengan reagen FeCl_3 1% pengamatan UV λ 366 nm
- Bercak noda setelah di reaksikan dengan reagen FeCl_3 1% pengamatan UV λ 366 nm
- Bercak noda setelah di reaksikan dengan reagen FeCl_3 1% pengamatan UV λ 366 nm

Gambar 4.8 Hasil KLT golongan senyawa tanin dalam *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* menggunakan eluen butanol:asam asetat glasial:air (4:1:6).

4.7.3 Uji Triterpenoid dan Steroid

Identifikasi senyawa triterpenoid dan steroid dalam *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* khusus senyawa triterpenoid dan steroid pada penelitian ini menggunakan beberapa variasi eluen dengan pereaksi Liberman-Burchard. Penggunaan variasi eluen dilakukan karena hasil pemisahan menunjukkan hasil yang kurang baik (tidak terbentuk pemisahan) pada beberapa ekstrak koro benguk. Hasil pemisahan senyawa triterpenoid dan steroid pada setiap ekstrak koro benguk sesuai eluaen yang digunakan diamati pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Nilai *R_f* dan warna noda Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid/steroid dalam *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*

Sampel	Eluen	Noda	Sebelumdi tambah reagen Libermann-Burchard	Setelah ditambah reagen Libermann-Burchard	Nilai <i>R_f</i>	Senyawa dugaan
Etanol	-	-	-	-	-	-
Fraksi n-heksana	n-heksana : etil asetat (4:1)	6	Hijau	Ungu	0,61	Triterpenoid
			Ungu	Ungu	0,53	Triterpenoid
			Merah	Merah	0,34	Triterpenoid
			Merah	Merah	0,25	Triterpenoid
			Merah	Merah	0,14	Triterpenoid
			-	Hijau	0,07	Steroid
Fraksi kloroform	Etil asetat : kloroform (1:1)	2	Merah	Merah	0,91	Triterpenoid
			Hijau	Hijau	0,86	Steroid
Fraksi etil asetat	n-heksana : etil asetat (4:1)	5	Hijau	Ungu	0,87	Triterpenoid
			Hijau pudar	Hijau pudar	0,62	Steroid
			Hijau pudar	Hijau pudar	0,45	Steroid
			Hijau pudar	Ungu	0,19	Triterpenoid
			Hijau pudar	Ungu	0,1	Triterpenoid
Fraksi n-butanol	n-heksana : etil asetat (1:1)	5	-	Hijau	0,92	Steroid
			-	Merah	0,84	Triterpenoid
			Ungu	Ungu	0,8	Triterpenoid
			-	Hijau pudar	0,62	Steroid
			-	Hijau	0,52	Steroid
Fraksi air	-	-	-	-	-	-

Hasil pemisahan senyawa triterpenoid dan steroid dari masing-masing eluen yang digunakan memiliki kemampuan yang berbeda dalam memisahkan komponen-komponen senyawa dalam masing-masing sampel. Eluen n-heksana:etil asetat (4:1) yang digunakan berhasil memisahkan komponen-komponen senyawa pada fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dengan membentuk 6 noda (fraksi n-heksana) dan 5 noda (fraksi etil asetat). Noda yang

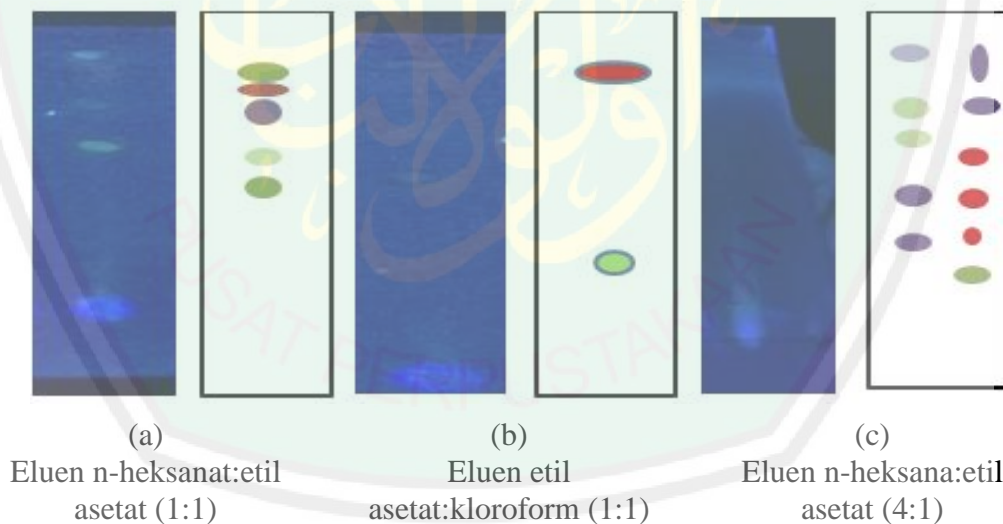
terbentuk pada fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat tersebut, menunjukkan penampilan warna antara lain; ungu, hijau, dan merah. Eluen etil asetat:kloroform (1:1) yang digunakan berhasil memisahkan komponen-komponen senyawa pada fraksi kloroform dengan membentuk 2 noda berwarna merah dan ungu. Sedangkan eluen n-heksana:etil asetat (1:1) berhasil memisahkan komponen-komponen senyawa dalam fraksi n-butanol dengan membentuk 5 noda berwarna hijau dan ungu.

Golongan hasil triterpenoid hasil KLT setelah ditambah dengan reagen Libermann-Burchard (LB) ditunjukkan dengan warna merah, hijau, dan ungu (Fitriyani, dkk, 2011 dan Asih, dkk, 2010). KLT golongan senyawa steroid dengan pereaksi LB menunjukkan terbentuknya noda berwarna hijau, biru, dan ungu sampai coklat setelah dilihat dibawah lampu UV λ 366 nm. Berdasarkan pernyataan tersebut, maka noda yang nampak dengan warna ungu dan merah, diduga merupakan golongan senyawa triterpenoid. Sedangkan noda dengan warna hijau diduga merupakan golongan senyawa steroid.

Berdasarkan nilai R_f yang dihitung pada noda berwarna ungu dan merah yang diduga sebagai senyawa triterpenoid memiliki nilai R_f antara 0,14-0,91. Nilai R_f tersebut menunjukkan koro bengkok memiliki kandungan senyawa triterpenoid. Setiawan (2015) menunjukkan senyawa triterpenoid dalam alga merah (*Eucheuma spinosium*) memiliki nilai R_f 0,17: 0,36: 0,53 dan 0,83. Ningsih (2015) juga menyatakan bahwa senyawa steroid dalam alga merah diduga terdapat pada nilai R_f masing-masing sebesar 0,42: 0,62: 0,77. Sehingga nilai R_f antara 0,07-92 dengan warna nampak hijau diduga merupakan senyawa steroid. Nilai R_f yang diukur menunjukkan noda lebih terdistribusi pada eluennya atau disebut juga

$C_{\text{stasioner}} < C_{\text{mobil}}$. Eluen yang digunakan n-heksana:etil asetat (4:1) (1:1) dan etil asetat:kloroform (1:1) cenderung bersifat non polar. Senyawa triterpenoid dan steroid adalah senyawa yang non polar. Sehingga, noda yang terbentuk pada $R_f > 0$ pada penelitian ini diduga merupakan senyawa triterpenoid dan steroid.

Ekstrak etanol dan fraksi air tidak menunjukkan adanya pemisahan komponen-komponen senyawa pada beberapa variasi eluen yang digunakan. Sehingga dengan demikian, variasi eluen yang digunakan tidak menunjukkan adanya senyawa triterpenoid pada ekstrak tersebut. Hal ini diduga karena komponen—komponen dalam ekstrak *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens* cenderung tertahan pada fase diam yang bersifat polar. Visualisasi hasil pamisahan senyawa triterpenoid/steroid dapat diamati pada Gambar 4.9.



Keterangan:

- Bercak noda fraksi n-butanol setelah direaksikan dengan reagen Libermann-Burchard pengamatan UV λ 366 nm.
- Bercak noda fraksi kloroform setelah direaksikan dengan reagen Libermann-Burchard pengamatan UV λ 366 nm.
- Bercak noda fraksi n-heksana dan etil asetat setelah direaksikan dengan reagen Libermann-Burchard pengamatan UV λ 366 nm.

Gambar 4.9 Hasil KLT golongan senyawa triterpenoid dan steroid dalam *Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*

Berdasarkan Gambar diatas menunjukkan warna noda dapat teramati pada UV λ 366 nm. Hal ini disebabkan karena senyawa triterpenoid dan steroid bukan merupakan hidrokarbon aromatik dan juga bukan merupakan sistem konjugasi. Menurut Nasliyana (2013) timbulnya warna pada noda disebabkan karena adanya interaksi antara gugus fungsional kromofor pada gugus ausokrom dengan sinarUV. Noda yang tidak tampak pada UV λ 366 nm disebabkan karena UV λ 254 nm hanya berinteraksi dengan golongan khas dari sistem aromatik, α dan β karbonil tak jenuh dan sistem konjugasi (Zahro, 2011).

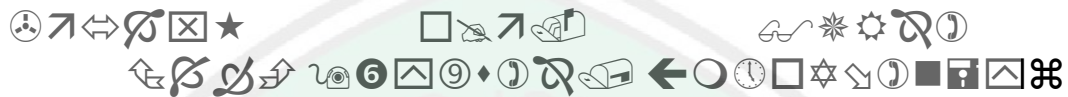
4.7 Pemanfaatan Biji Koro Benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*) dalam Perspektif Islam

Allah telah menciptakan berbagai macam tumbu-tumbuhan yang bermanfaat bagi kehidupan manusia. Salah satu bukti diciptakannya tanaman koro benguk yang memiliki berbagai manfaat bagi kesehatan yaitu sebagai bahan terapi herbal untuk berbagai macam penyakit. Penelitian ini mempelajari tentang penggunaan senyawa aktif biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC) var *pruriens* sebagai bahan uji antikanker. Penelitian ini merupakan suatu upaya untuk mendapatkan penyembuhan yang maksimal, karena setiap penyakit pasti ada obatnya serta dapat sembuh jika telah ditemukan pengobatan dan dosis yang benar. Sebagaimana Rasulullah SAW bersabda:

إِنَّ اللَّهَ خَلَقَ الدَّوَاءَ وَخَلَقَ الدَّاءَ فَإِذَا أَصِيبَ دَوَاءَ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ (رواه ابن حبان)

“*sesungguhnya Allah yang menciptakan segala obat dan yang menciptakan segala penyakit. Apabila obat mengenai penyakit maka sembuhlah ia dengan izin Allah*”. (HR. Ibnu Hibban).

Dalam hadis diatas dapat kita ketahui bahwasannya Allah tidak hanya menciptakan penyakit melainkan juga memberikan obat untuk mengobati penyakit tersebut. Hal tersebut juga dilengkapi dengan firman-Nya dalam surah Al-Qomar ayat 49 sebagai berikut:



Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”. (Q.S Al-Qomar 54:49)

Menurut Tafsir Ibnu Katsir ayat diatas menjelaskan tentang suatu ukuran dan takdir yang memberikan petunjuk terhadap semua makhluk kepada ketetapan tersebut. Oleh karena itu, para ulama sunnah menjadikan ayat yang mulia ini sebagai dalil untuk menetapkan takdir dan ukuran dari Allah SWT bagi suatu makhluk sebelum makhluk itu diciptakan. Hal tersebut juga merupakan ilmu Allah terhadap segala sesuatu sebelum adanya dan pencatatan ketentuan masing-masing makhluk sebelum semuanya tercipta (Abdullah, 2007). Sebagaimana halnya tanaman koro benguk yang dapat dimanfaatkan sebagai obat antikanker dengan kadar tertentu.

Koro benguk merupakan salah satu jenis tanaman berbiji yang mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, triterpenoid dan steroid (Murugan, 2005). Beberapa fungsi yang umum dari senyawa tersebut yaitu sebagai obat herbal antidiabetes, antimalaria, antikanker dan masih banyak yang lainnya. Hasil penelitian koro benguk menunjukkan bahwa dari masing-masing ekstrak larutan uji memiliki kandungan senyawa aktif berupa golongan senyawa alkaloid, terpenoid dan steroid. Masing-masing senyawa memiliki aktivitas proliperatif yang berbeda-beda yang ditunjukkan

dengan nilai IC_{50} yang berkisar antara 316 $\mu\text{g/ml}$.-1422 $\mu\text{g/ml}$. Hal tersebut telah membuktikan bahwa biji koro benguk merupakan salah satu dari sekian banyak tumbuhan yang telah Allah ciptakan dengan memiliki manfaat penting bagi kemaslahatan umat, dan juga lingkungan. Allah SWT berfirman dalam surat Qaff ayat 9 sebagaimana berikut:



Artinya: “dan Kami turunkan dari langit air yang banyak manfaatnya lalu Kami tumbuhkan dengan air itu pohon-pohon dan biji-biji tanaman yang diketam,(Qs.Qaaf/50: 9).

Tafsir *Al-Aisar* menyatakan bahwa ayat-ayat diatas menjelaskan tentang sebuah keyakinan seorang hamba terhadap Allah sebagai Rabb dan Ilah (sembahan) untuk selalu memikirkan kekusaan dan tentang segala apa yang terjadi dimuka bumi ini. Sebagaimana Allah telah menurunkan dari langit air hujan yang membawa begitu banyaknya keberkahan (Jabir, 2009). Keberkahan yang Allah tunjukkan diantaranya tumbuhnya pepohonan yang rindang dan biji-bijian yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan maupun kemaslahatan yang lainnya.

Berdasarkan ayat itu juga kita dituntut untuk selalu memikirkan dan merenungkan keajaiban serta memahami hikmah yang terkandung dalam setiap segala yang ada. Sebagaimana firman Allah dalam surah al Imran ayat 190 yang berbunyi:





Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*”, (Qs. Al-Imran/3:190).

Menurut al Maraghi (1992) *Ulul Albab* adalah orang-orang yang menggunakan pikirannya mengambil faedah serta hidayah dariNya. Orang-orang tersebut juga mau memikirkan tentang kejadian langit dan bumi. Mereka dapat memahami rahasia dan manfaat di dalamnya yang menunjukkan sempurnanya ilmu Allah, serta mampu mengambil hikmah dari segala ciptaan Allah.

Koro benguk (*Mucuna pruriens* (L) DC var *pruriens*) adalah biji-bijian yang merupakan salah satu bukti keadilan Allah SWT. Hal ini telah dibuktikan melalui penelitian uji aktivitas antikanker terhadap sel kanker serviks dari ekstrak dan fraksi biji koro benguk diperoleh nilai IC_{50} masing masing ekstrak, untuk ekstrak etanol 96% 675,007 μ g/mL, fraksi n-heksana 378,667 μ g/mL, fraksi kloroform 1152,710 μ g/mL dan fraksi etil asetat 1422,954 μ g/mL, fraksi n-butanol 316,990 μ g/mL dan fraksi air 1038 μ g/mL. Fraksi n-heksana dan n-butanol memiliki aktivitas antikanker yang lebih tinggi dengan nilai IC_{50} lebih kecil. Nilai IC_{50} semakin kecil menunjukkan aktivitas yang lebih besar dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Berdasarkan dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwasannya Allah SWT menciptakan segala sesuatu di alam ini tidaklah sia-sia. Segala penciptaan memiliki hikmah seperti biji koro benguk yang dapat berpotensi sebagai obat antikanker.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan uraian hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa:

1. .potensi antikanker ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksana, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol dan fraksi air koro benguk (*Mucuna pruriens* (L)DC) var *pruriens* terhadap *HeLa cell line* ditunjukkan dengan nilai IC_{50} berturut-turut $675.007 \pm 53,777 \mu\text{g/mL}$, $378.667 \pm 1,403 \mu\text{g/mL}$, $1152.710 \pm 48,9717 \mu\text{g/mL}$, $1422.954 \pm 97,8492 \mu\text{g/mL}$ $316.990 \pm 17,720 \mu\text{g/mL}$, $1038.519 \pm 68,8881 \mu\text{g/mL}$. Fraksi n-heksana dan n-butanol memiliki potensi sitotoksik moderat cukup kuat dalam menghambat pertumbuhan kanker servik.
2. Profil kromatogram dari ekstrak dan fraksi koro benguk menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) positif mengandung senyawa tanin, steroid dan triterpenoid.

5.2 Saran

1. Ekstrak etanol 96% biji koro benguk dalam penelitian ini mampu mengembangkan ekstrak, namun belum menunjukkan aktivitas dalam menghambat perubahan sel kanker, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.
2. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker dari ekstrak dengan instrument HPLC dan GC-MS

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah G. 2007. *Lubabut Tafsir Min Ibni Katsir*. Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Al Maraghi, A.M. 1992. *Terjemahan Tafsir Al-Maraghi 7*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., and Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell Fifth Edition Chapter 17 The Cell Cycle*. Garland Science: New York.
- Amalina, N. 2008. Uji sitotoksik Ekstrak Etanol 70 % Buah Merica Hitam (*Piper nigrum* L) Terhadap Sel Hela. Surakarta : Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Amelia, R., 2011, Uji Praskrining Aktivitas Antikanker Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), Skripsi, Malang: Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.
- American Type Culture Collection* (ATTC). 2011. *MTT Proliferation Assay. Instruction. P.O.Bx 1549, Manasan USA*.
- Anggrianti, P. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70 % Buah Kemukus (*Piper cubeba* L) terhadap Sel Hela. Skripsi Tidak Diterbitkan. Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. AOAC International, Arlington, Virginia.
- Arifin, H.; Anggraini, N.; Dian, H. dan Rasyid, R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia cumini* Merr. *Jurnal Chemistry*. Jakarta: Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Andalas.
- Asih, Kurnia. 2010. Analisis Verba Tatsu Sebagai Polisemi dalam Bahasa Jepang (skripsi). Bandung:ITB
- Bambang, S. T. 2009. *Metode Dasar Kultur Jaringan Hewan*. Jakarta: Universitas Trisakti.
- Bayu Kanetro dan Setyo Hastuti. 2006. *Ragam Produk Olahan Kacang-kacangan*. Yogyakarta. Universitas Wangsa Manggala Press.
- Berata, I.K. 2000. Umur Sapi Bali Berpengaruh pada Respon kekebalan Selular terhadap Virus Penyakit Jembrana Pasca Vaksinasi. *Laboratorium Patologi FKH*. Bali: Universitas Udayana.
- Burke, R.W. diamond stone, B.A. velapoidi. R.A. Menis O. 1974. *Mechanisms of the Liebermann-burchard and Zak Color Reaction for Cholesterol*.

- Clinical Chemistry Journal*. Washington D.C: Analytical Chemistry division, Institute for Materials Research, National Bureau of Standards. Vol.20. No.7.
- CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center). 2009. Preparasi sample, Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.
- Crowell, R.E, Gilliland, F.D, Temes, R.T, Harms, H.J, Neft, R.E., and Heaphy, E. 1996. *Detection of Trisomy 7 Innomalignant Individuals at Risk from Lung cancer, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5: 631-636.
- Depkes. RI. 1995. *Material Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dermawan, R. 2012. *Metode Analisis Uji warna Senyawa Metabolit Sekunder. Artikel Kimia Organik Analisis*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanauddin Makasar.
- Dewi, I.D.A.D.Y., Astuti, K. W. I, & warditiani, N.K. 2013. *Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (Gracinia mangostana L.). Skripsi*. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana. Bali
- Dia, Siluh Putu Sri, Nurjanah, Agus Mardiono Jacob. 2015. *Komposisi Kimia dan Aktivitas antioksidan Akar, kulit batang dan daun lindur*. Jurnal pengolahan Hasil perikanan Indonesia, (online) vol.18 no. 2 Hlm. 201-219, (ipb.ac.id/index.php/jphpi)
- Dian Nuraini, A. 2007. *Ekstraksi Komponen Antibakteri dan Antioksidan dari Biji Teratai (nymphaea pubescenswilld)*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Dinda. 2008. *Ekstraksi*. <http://www.mediafarma.com/ekstraksi>. Diakses pada tanggal 5 Juni 2013.
- Doyle, A., Griffiths, J.B., dan Newell, D.G. 2000. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Edisi ke III. New York: John Wiley & Son.
- Duval, R. E, Clarot, I, Dumarcay-charbornier. F, fontanay. S, Marsura. A. 2012. *Interest Of designed cyclodextrin-tools gen delivery*. Journal. *Annales pharmaceutiques francaices*. No.70 Vol. 360-369
- Effendy. 2007. *Perspektif Baru Kimia Koordinasi Jilid I*. Malang: Banyu Media Publishing
- Ernawati, F. 2010. *Uji Sitotoksik Isolat Aktif Dari Ekstrak Kloroform Rumput Mutiara (Hedyotis corymbosa (L.) Lamk.) Terhadap Sel Hela Dan Siha*. Skripsi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.

- Evans C. W., Treaser and Evans'. 1989. *Pharmacognocny Thirteenth edition*. ELBS Bailliere Tindall. Oxford.
- Fessenden & Fessenden. 1994. *Kimia Organik*. Jakarta: Erlangga
- Fitriani, A, Wnarti L., muslichah S. dan Nuri. 2011. Uji anti imflamasi ekstrak metanol daun sirih merah (*piper crocatum ruiz & pav*) pada tikus putih. *Majalah obat Tradisioanal*, 16 (1): 34-42
- Freshney, R.I. 2000. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Edisi ke IV. Toronto: Willey-Liss
- Gandjar, I., P. S Slamet dan Mulyono. 1973. *Kadar Zat Gizi dalam Tempe Benguk*. Balai Penelitian Gizi Untuk Semboja. Depkes RI. Bogor.
- Gandjar, I.G. dan Rohman A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan II. Yogyakarta: Pustaka pelajar.
- Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S, dan Marshall, N.J., 1995. Microculture Tetrazolium Assays: A comparison Between Two New Tetrazolium Salts, XTT and MTS, *Journal Immunool Methods*, Vol. 197, No. 1, Hal: 95 – 103.
- Gritter, R.J. dan Robbit M. Schwarting S.E. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua. Terjemahan Kosasih Padmawinata*. Bandung: Institut Teknologi Bandung Stahl, 1985.
- Grub, Edward. 2015. <http://www.globalhealingcenter.com/mucuna-pruriens-and-brain-heat>. Diakses pada tanggal 14 mei 2016.
- Guenther, E. 2006. *Minyak Atsiri*. Jilid I. *Terjemahan Ketaren S*. Jakarta: Universitas Jakarta. 2011.
- Gunawan, I.G.; Bawa, G. dan Sutrisnayanti. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). *Jurnal Kimia* 2 (1) ISSN 1907-9850. Bukit Jimbaran: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Hanani, E., A. Mun'im, R. Sekarini dan S. Wir yowidagdo. 2006. Uji Aktivitas Antioksidan Beberapa Spons dari Kepulauan Seribu. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6 (1) : 1-4.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia Penentuan Cara Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah Kosasih Padmawinata Dan Iwang Soediro. Bandung: ITB/1996

- Hardiningtyas, S.D. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Yang Difrakmentasi dan Tidak Difrakmentasi di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. Bogor: ITB.
- Hart, H., (1990), Kimia Organik Suatu Bahan Kuliah Singkat, Jakarta: Erlangga.
- Hayati, E.K., Jannah, A. dan Ningsih, R. 2010. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.). *jurnal kimia*, 7 (1): 20 – 32.
- Heredia, T., Adams, D., Fields, K., Held, P., & Harbertson, J. 2006. Evaluation of a Comprehensive Red Wine Phenolics Assay Using a Microplate Reader. *Am.J. Enol. Vit.*, 57(4), 497-502.
- Heti, D. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Herba Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides Presl*) terhadap Sel T47D. Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Hidayat, M. B. C. 2005. Identifikasi Senyawa Flavonoid Hasil Isolasi dari Propolis Lebah Madu *Apis mellifera* dan uji aktivitasnya sebagai antijamur *Candida Albicans*. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Husna, A. N. 2011. Uji Identifikasi Dan Uji Efektivitas Antimalarial Senyawa Ekstrak Etanol Tanaman Anting-Anting Secara In Vivo Pada Mencit Jantan. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Universitas Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Indrayani, L., Soetjipto, H. dan Sihasale, L. 2006. Skrinning Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Fakultas Sains dan Matematika*. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.
- Jabir Abu Bakar. 2009. Tafsir alqur'an al-aisar. Jakarta: Darus Sunnah
- Jones, W.P., Kinghorn, A.D. 2006. Ekstraktion of Plant Secondary Metabolites. In: Sharker, S.D. Latif Z., Gray A.L, eds. Natural Product Isolation. 2nd edition. Humana Press. New Jersey.
- Junaedi, S. 2000. Uji Sitotoksik Metode MTT. *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta: 1+18 hlm.
- Kakizoe, T., 2003, *Chemoprevention of Cancer Focusing on Cincical Trial*, *Nationa Cancer Center*, *Jpn.J.Clin.Oncol.*, 33(9): 421-442.
- Khopkar, S.M. 2008. Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta: UI Press.

- Koirewo, A.Y., Fatimawali, dan Wiyono, W.I. 2013. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*). Manado. Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT.
- Kristanti, A.N. dkk. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Krisyuninda, M. 2012. Uji Toksisitas Fraksi Spons *Callyspongia* Sp. dengan Metode Brine Shrimp Test Dari Perairan Pasir Putih Situbondo. Institut Teknologi Sepuluh November.
- Lenny, S. 2006. Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah (*Graptophyllum pictum L. Griff*) dengan Metode Uji Brine Shrimp. Medan: USU.
- Lisdawati, V. 2002. Berdasar Uji Penapisan Farmakologi Pada Buah Mahkota Dewa. *Skripsi* tidak diterbitkan. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran UGM.
- Listiani, L., I. Fidriany dan Sukrasno. 2005. Telaah Kandungan Kimia Daun KUCAI (*Allium schoenoprasum L., Liliaceae*). Bandung: jurnal Sekolah Farmasi ITB. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>. Diakses Tanggal 18 April 2016.
- Lutfillah, M. 2008. Karakterisasi Senyawa Alkaloid Hasil solasi dari Kulit Batang Angsret (*Spathoda campanulata Beauv*) serta Uji aktivitasnya sebagai Antibakteri Secara *In Vitro*. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Machana,S., Natthida, W., Sahapat, Barusrux, Apiyada, N., et al. (2011). Cytotoxic and Apoptotic Effects of Six Herbal Plants Against The Human Hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chinese Medicine*. 6: 39.
- Malihah, R. 2014. Sitokstositas Ekstrak etanol Daun Benalu Kemiri (*Dendrothoe sp. Grew on Aleurites moluccana*) Terhadap Sel Kanker Serviks (sel HeLa) dengan metode MTT Secara *In Vitro*. *Skripsi diterbitkan*, Malang: Program Studi Farmasi fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah
- Mangan, Y. 2009. Cara Bijak Menaklukan Kanker. Jakarta :Agromedia Pustaka.
- Mangun wardoyo, H., Cahyaningsih, E., danTepy, U. 2009. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Herba Meniran (*Phyllanthusniruri, L.*) *jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol 7, no. 2. Hal: 57-63.
- Markham, K.R. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Bandung. Penerbit ITB.
- Marlina, S.D., Suryani, V. dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechiumedule jecq. Swartz*) dalam ekstrak etanol. *Biofarmasi*. Vol. 3. NO.1. surakartaFMIPA Universitas Sebelas Maret

- Massridha M. 2008. *Aljami' li Ahkaam Alqur'an*: Tafsir Alqurthubi. Jakarta: Pustaka azzam.
- Microslav, V. 1971. *Detection And Identification Of Organic Compound*. New york: planum Publishing Corporation and SNTC Publishers Of Technical Literature
- Milyasari, C. 2010. Isolasi Senyawa Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *E. Coli* dari Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*AverrhoablindiL.*). Skripsi tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Mulana Malik Ibrahim Malang.
- Morshed, H. Islam, Md.S. Parvin, S. Uddin, M.A. Mostofa, A.G.M dan Sayyed, S.B. 2012. *Antimicrobial and Cytotoxic Activity of the Methanol Extract of Peaderia foetida Linn. Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 02 (01); 2012: 77-80.
- Mostmann, T. 1983. *Rapid Colorometric Assay For Celluler Growth And Survival: Application To Ploriferatif And Cytotoxicity Assay. Jurnal Immunological Methods*. 55,63,65.
- Murugan M, Mohan VR. 2005. Antibacterial activity of *Mucuna pruriens* (L.) Dc. var. *pruriens* – an Ethnomedicinal Plant, *Sci Res Rept* 2011; 1(2): 69 -72.
- Mustafida, R Y., Al Munawir., dan Dewi, R. 2014. Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan* 2 (1): 4-8.
- Ningsih, Eka Mawarni Ayu. 2015. Pemisahan dan identifikasi senyawa steroid fraksi n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah (*Euceoma spinusum*). Skripsi : tidak dipublikasikan. Uin Maulana Malik Ibrahim : Malang
- Nirwana, Ardi Prian. 2015. Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Etanol Daun Benalu Kersen (*Dendroptoe pentandra* L. Miq.) Terhadap Kultur Sel Kanker Nasofaring (Raji *cell line*). Tesis diterbitkan. Surakarta: universitas sebelas maret
- Nur, M.A. dan Adjuwana H.A. 1989. Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologi. Bogor: ITB.
- Obie. 2011. Hubungan Struktur Aktivitas Obat Antikanker. <http://www.obie.blogspot.com>. diakses tanggal 16 April 2016.
- Paschel, Joshua. 2013. <http://joshuapeschel.com/mengenal-kanker-serviks>. Diakses pada tanggal 03 oktober 2013.

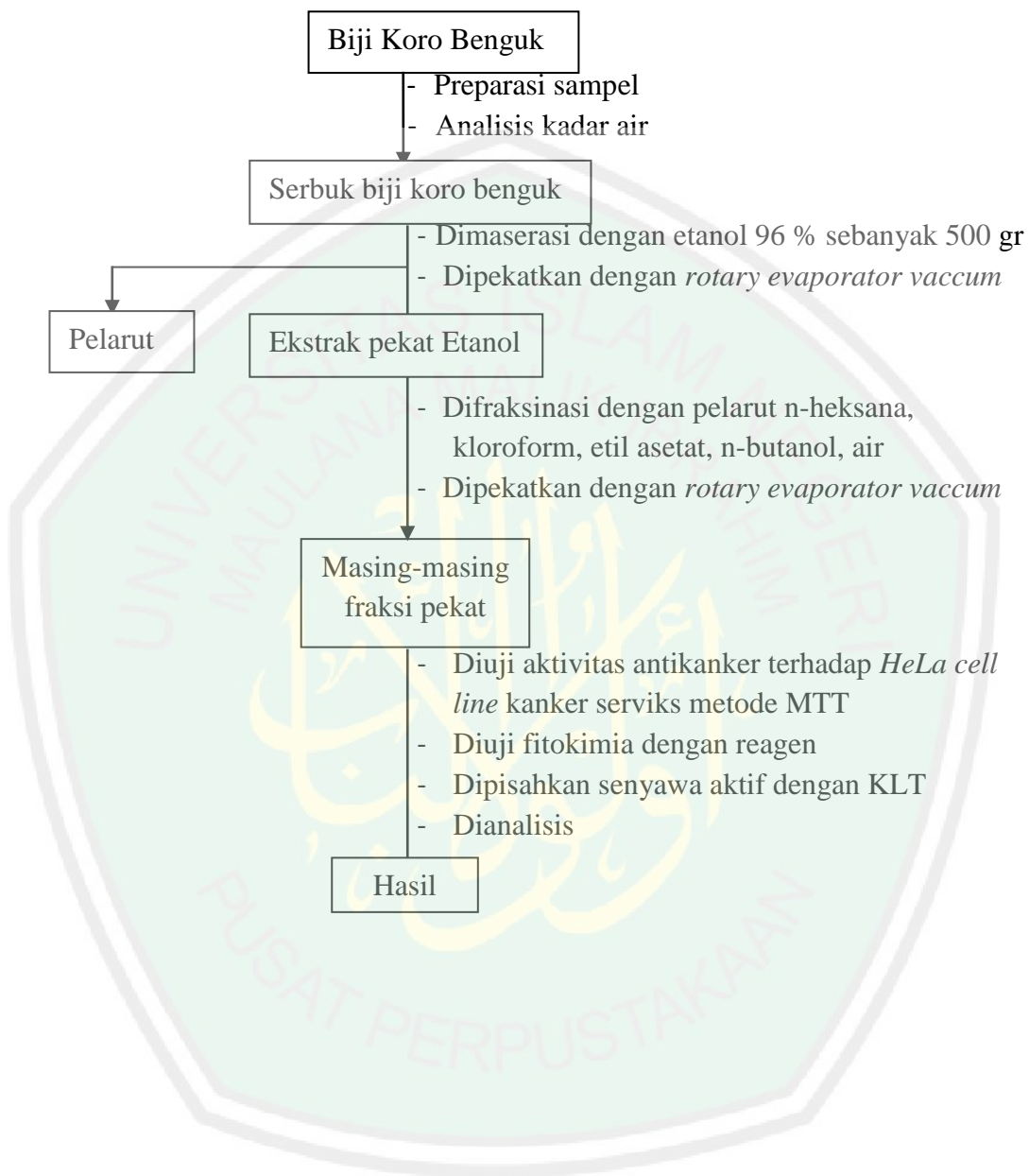
- Pratiwi, R.H. 2014. Potensi Kapuk Randu (*Ceiba Pentandra Gaertn.*) Dalam Penyediaan Obat Herbal. *E-journal Widya Kesehatan Dan Lingkungan* 1 (1): 53-60
- Purwaningsih., Darusman, L. K & Heryanto, R. 2000. Isolasi dan Karakterisasi Terpenoid dari Medium Kultur *Ganoderma sp.*. *jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 2 (2): 8-15
- Puspita A, Sheria, 2015. Stop Kanker Serviks. Yogyakarta. *Notebook*.
- Rachmawati, E. 2012. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh p53. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. 27 No. 1: 28-33
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Review*, 23(4): 519-534.
- Restasari, A., Kusriani, K., dan Fachriyah, E. 2002. Isolasi Dan Identifikasi Fraksi Teraktif Dari Ekstrak Kloroform Daun Ketapang (*Terminalia Catappa* Linn). *Skripsi* Diterbitkan. Jurusan Kimia FMIPA UNDIP Semarang.
- Retnaningsih, Darmono, Budi Widianarko Dan Siti Fatimah Muis, 2008. Potensi Fraksi Aktif Antioksidan, Antikolesterol Kacang Koro (*Mucuna Pruriens*L.) Dalam Pencegahan Aterosklerosis. Semarang : Universitas Katholik Soegijapranata
- Reveny, J. 2009. Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* Linn.). *Jurnal*. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB
- Rogers PR, Huston G, Swain SL. *High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines*. *J. Immunol.*1998; 1661: 3844-52.
- Runadi, D. 2007. Isolasi dan identifikasi Aklaloid dari Herba Komfrey (*Symphytum officinale*L.). *Skripsi* Diterbitkan. Jatinangor: Fakultas Farmasi Universitas Pajdjaran.
- Ruwaida, D.G. 2010. Uji toksisitas senyawa hasil isolasi rumput mutiara (*hedyotis corymbosa* (L.) dengan metode brine shrimp lethality test (BST). *Skripsi*. Universitas sebelas maret. Surakarta
- Santi, S.R. 2009. Penelusuran senyawa sitotoksik pada kulit biji nyemplung (*colophyllum innophyllum* L.) dan Kemungkinan Kerelasi sebagai antikanker. *Jurnal kimia*. 101-108.

- Sastrohamidjojo, H. 1996. Sintesis Bahan Alam. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. Kromatografi. Yogyakarta: UGM Press
- Savitri, E.S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Press.
- Setiawan, Mahdi setiawan. 2015. Isolasi senyawa triterpenoid fraksi petroleum eter alga merah (*Euceoma Spinosum*) hasil hidrolisis ekstrak metanol dan identifikasi menggunakan FTIR. Skripsi : tidak dipublikasikan. Uin Maulana Malik Ibrahim : Malang
- Setyowati, Widiastutik Agustina., Sri Retno Dwi Ariani., Ashadi., Bakti Muliani., Cici Putri Rahmawati. 2014. Skrining Fitokimia Dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio Zibethinis Murr.*) Varietas Petruk. Surakarta:Universitas Sebelas Maret
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol.7 dan 10. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Soebagio, B., 2007, Pembuatan Gel Dengan Aqupec HV-505 dari Ekstrak Umbi Bawang Merah (*Allium cepa, L.*) sebagai Antioksidan. *Jurnal Penelitian Dosen Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran*. Diakses tanggal 16 April 2009.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Ating-anting (*Acalypha indica Linn*) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan *Brine Shrimp* (*Artemia salina Leach*). Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sudarmadji, S.B., Haryono dan Suhardi. 2003. *Analisis Bahan Makanan dan Pertanian*.yogyakarta: Liberty.
- Sukadana, I.M. 2010. Aktifitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Kulit Akar Awar-awar (*Ficus septica Burm F.*). *Jurnal Kimia*. Vol. 4, No. 1: 63-70.
- Sukardiman, Abdul Rahman, Wiwied Ekasari, dan Sismindari. 2005. “ Induksi Apoptosis Senyawa Andrografolida dari Sambiloto (*Andrographispa niculata* Nees) Terhadap Kultur Sel Kanker”. *Media Kedokteran Hewan*.Vol. 21, No. 3
- Susilaningsih, R. 2007. Isolasi, Identifikasi dan Uji Toksisitas Senyawa Alkaloid Fraksi Etil Asetat Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia galanga*). *Tugas Akhir* Tidak Diterbitkan.
- Svehla. 1990. Vogel buku teks analisis anorganik kualitatif makro dan semi makro. Jakarta: PT. Kalman Media Pustaka

- Tomayahu, R.T. 2014. Identifikasi senyawa aktif dan uji toksisitas ekstrak daun binahong (*Anrederacordifolia Ten. Steenis*) dengan metode brine shrimp lethality test (BSLT). *Thesis*. Universitas Negeri Gorontalo.
- Triandani, V. Y. 2013. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Pada Fraksi N-Butanol Dari Ekstrak Etanol Kacang Kara Benguk (*Mucuna Pruriens (L.) Dc.* Skripsi tidak diterbitkan. Jakarta: Universitas Pancasila.
- Vogel. 1978. *Text Book Of Practical Organic Chemistry, 4th Edition*. London: Longman Group Limited.
- Wahyudi, P & Djajanegara, I. 2009. Pemakaian sel raji dalam uji sitotoksitas fraksi etanol biji mimba (*iazadirachta indica*). P3T Bioindustri BPPT. Berkala penelitian hayati 14: 95-99
- Widi, R.K. 2007. Penjaringan dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Batang Kayu Kuning (*Arcangelisiaflava Merr*). *Jurnal ILMU DASAR*, Vol. 8 no. 1: 24-29.
- Widriyanti, Y.N.; Budiarti, A. dan Syahida, I.A. 2005. *Aktivitas Mikolitik In Vitro Ekstrak Etanol Daun Sirih merah (Piper crocotum Ruiz dan Pav.) pada Mukosa Usus Sapi dan identifikasi Kandungan Kimianya*. *Jurnal*. Semarang: Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.
- Winarno, Eko. 2011. Uji Sitotoksik Kapang *Aspergillus Sp.* Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. Skripsi. Universitas Indonesia: Depok
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Windarti, I. 2013. Peran Topoisomerase dalam Proses Biologi Sel. *Jurnal Kedokteran* 3 (1): 76-79.
- Wonohadi, E.; Ayu, D.; Agustin, D.; Liasthirani, S. dan Melani. 2006. Identifikasi Senyawa Anti Mikroba Rimpang Temu Giring (*Curcuma heyneana Val dan Van Zijp*) secara Bioautografi. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Surabaya. *Jurnal Farmasi Indonesia Vol.3 No.2 Juli 2006*: 89-96.
- World Health Organization. 2008. *Maintenance Manual for Laboratory Equipment (2nd ed.)*. Geneva, Switzerland: WHO Press.
- Yulia, R. 2006. Kandungan Tanin dan Potensi Anti *Streptococcus mutans* Daun Teh Var. *Assamica* Pada Berbagai Tahap Pengolahan. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Yunia, Eka J. 2013. Isolasi, Elusidasi Dan Uji Toksisitas Senyawa Kimia Dalam Fraksi N-Butanol Dari Ekstrak Etanol Kacang Kara Benguk (*Mucuna Pruriens (L.) Dc.*) Skripsi tidak diterbitkan. Jakarta: Universitas Pancasila.

LAMPIRAN 1

1.1. Diagram Alir Penelitian



LAMPIRAN 2

Skema Kerja

L.2.1 Preparasi sampel

Biji Koro Benguk

- Dicuci biji Koro Benguk *Mucuna pruriens (L.) DC.* dengan air bersih
- Dikeringkan dengan oven selama 1 minggu pada suhu 30-37 °C sampai kering
- Diserbukkan dengan cara di blender halus
- Disaring dengan ayakan 100 mesh

Hasil

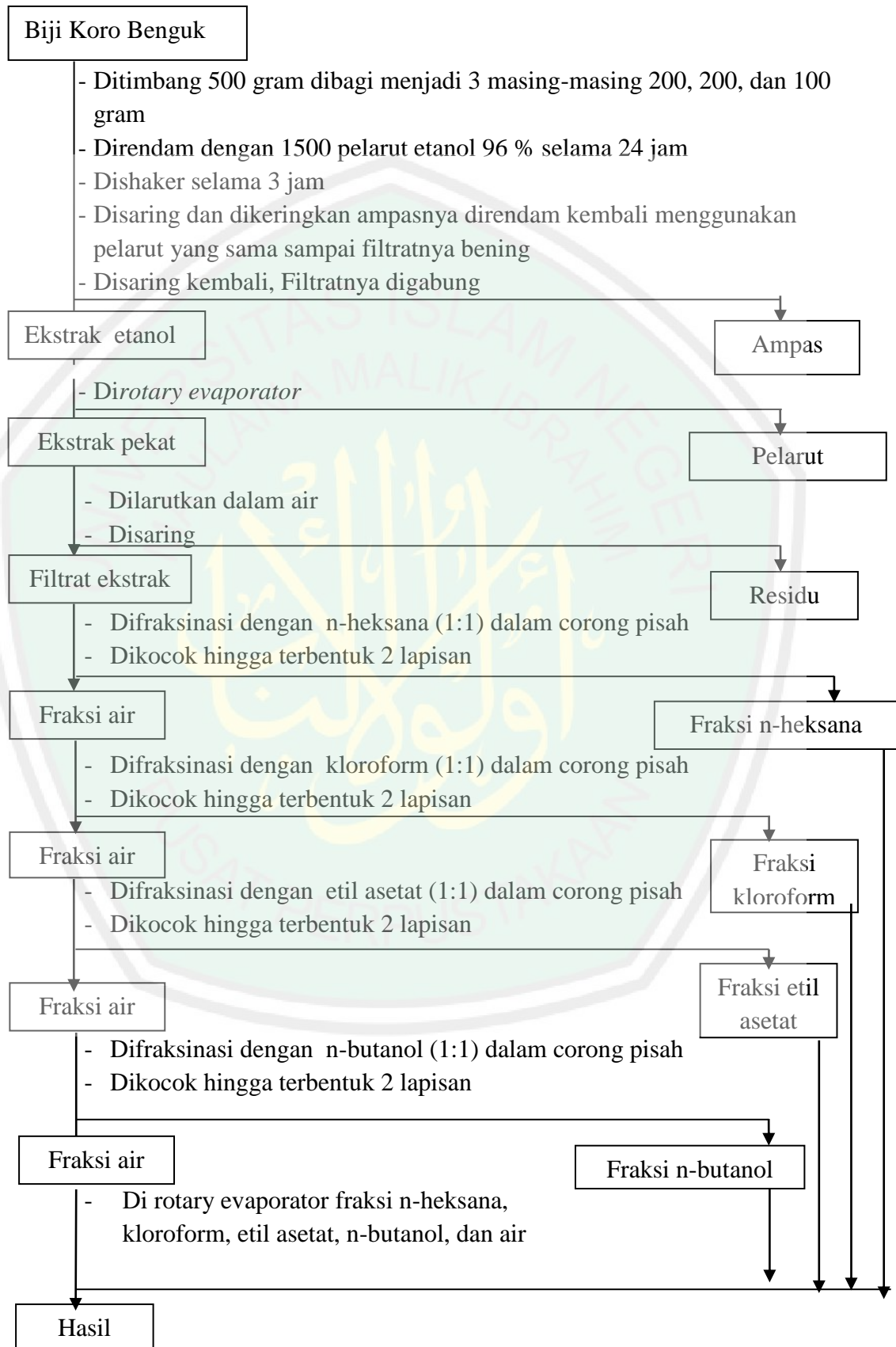
L.2.2 Analisis Kadar Air

Sampel basah dan kering Biji Koro Benguk

- Ditimbang 5 gram sampel
 - Dikeringkan cawan di dalam oven pada suhu 100 – 105 °C sekitar 15 menit, didinginkan dalam desikator selama 5 menit
 - Dilakukan perlakuan yang dan ditimbang sampai beratnya konstan
 - Dikeringkan sampel dalam oven pada suhu 30 – 37 °C selama sekitar ± 30 menit
 - Didinginkan dalam desikator selama ± 10 menit
 - Ditimbang
 - Diulangi perlakuan ini sampai tercapai berat konstan
 - Dihitung kadar airnya
- $$\% \text{ Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$$
- Dilakukan 3 kali pengulangan

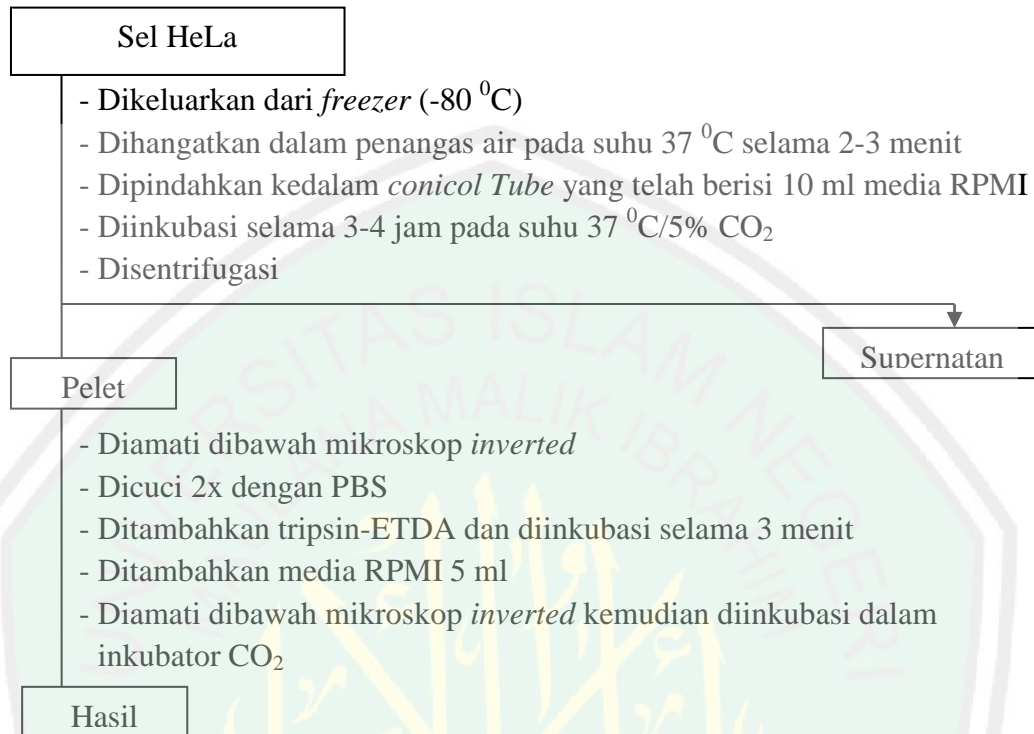
Hasil

1.2.3 Ekstraksi dan Fraksinasi biji Koro Benguk *Mucuna pruriens (L.) DC.*

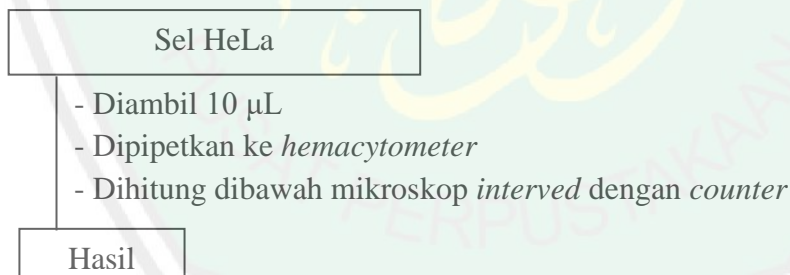


1.2.4 Uji Aktivitas Antikanker Dengan Metode MTT

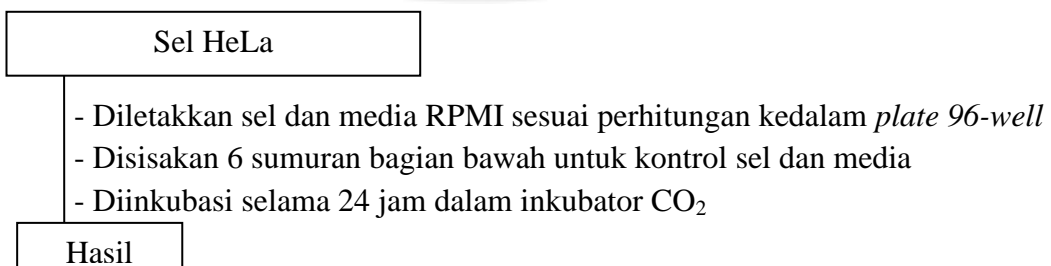
1.2.4.1 Penyiapan Sel



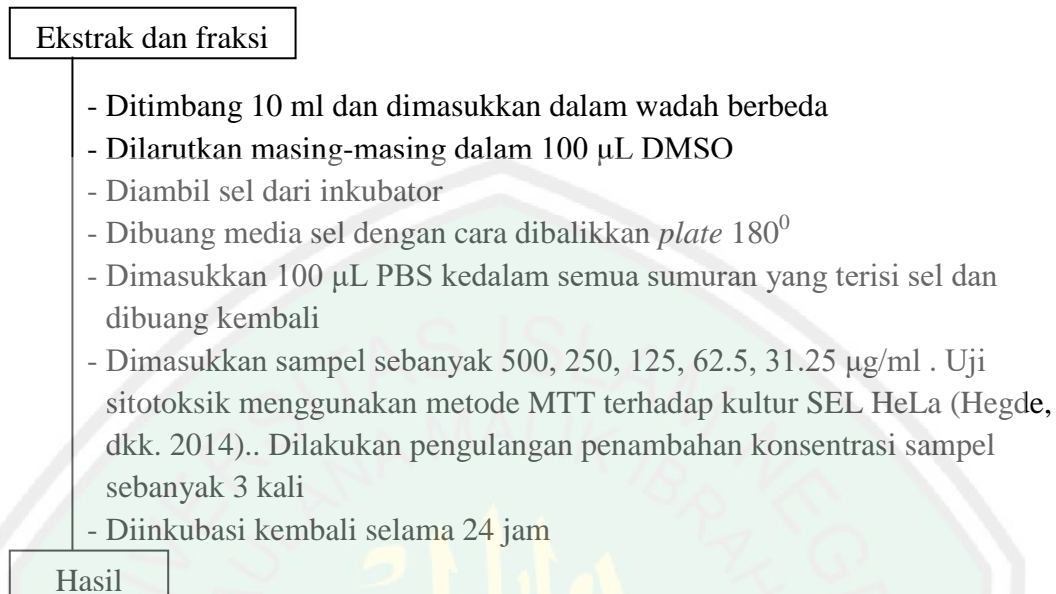
1.2.4.2. Perhitungan Sel Kanker



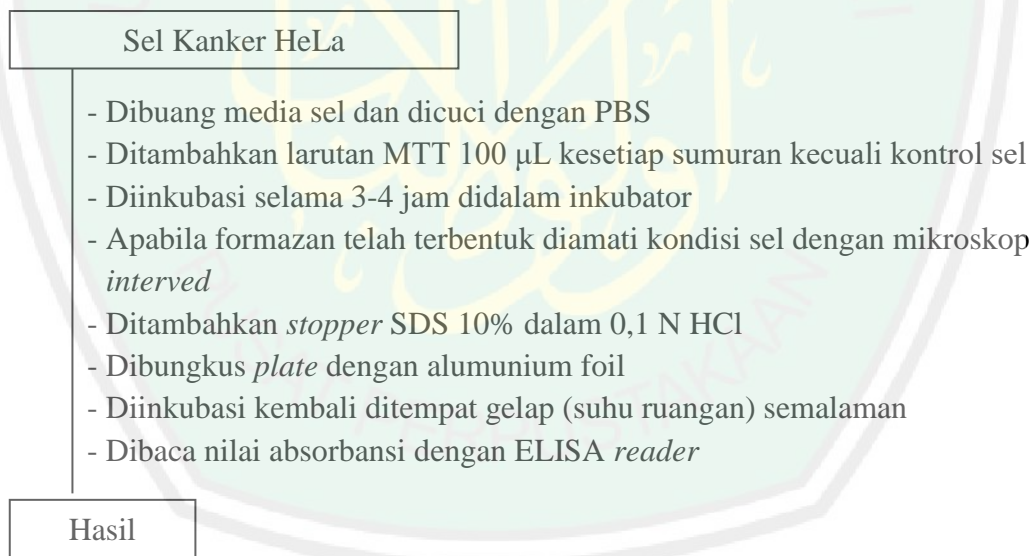
1.2.4.3. Peletakan Sel pada Plate 96-well



1.2.4.4. Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada *Plate*



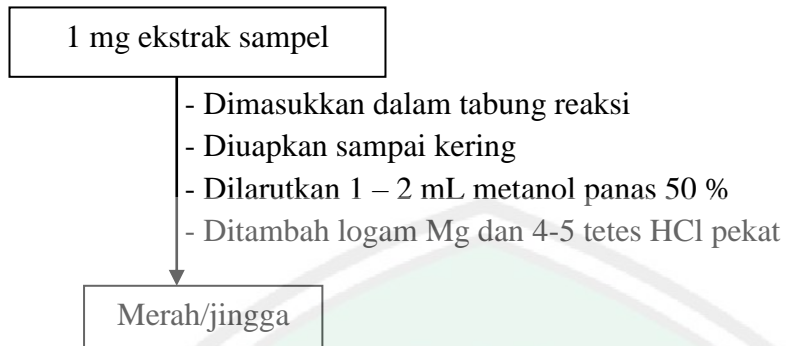
1.2.4.5. Pemberian Larutan MTT



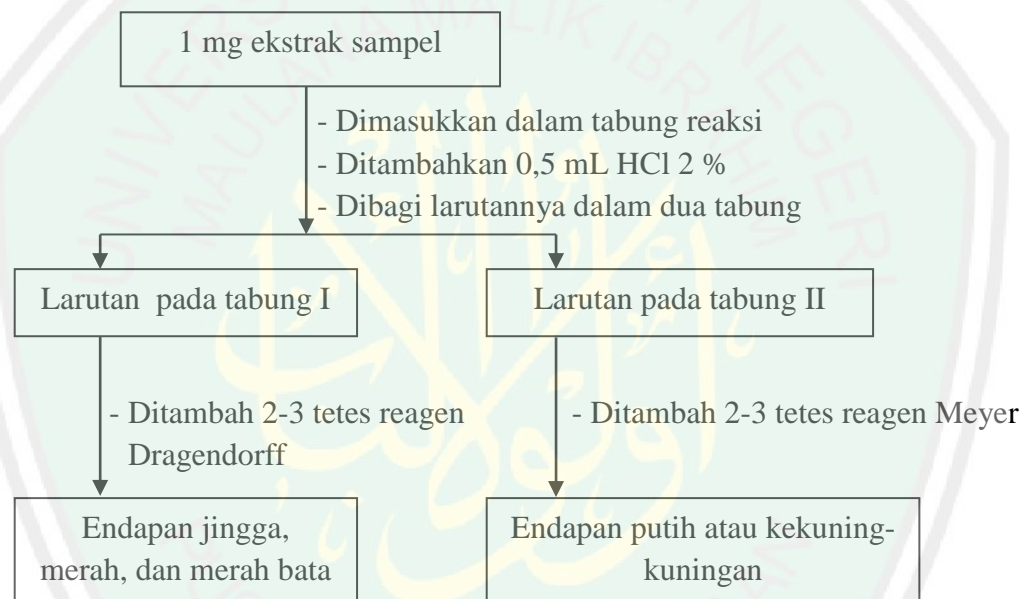
1.2.5 Uji Fitokimia dengan Uji Reagen (Indrayani, *et al.*, 2006; Halimah, 2010)

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dari ekstrak pekat n-heksana, kloroform dan etanol dari daun rumput bambu dilarutkan dengan sedikit masing-masing pelarutnya, kemudian dilakukan untuk uji alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid, steroid dan tanin.

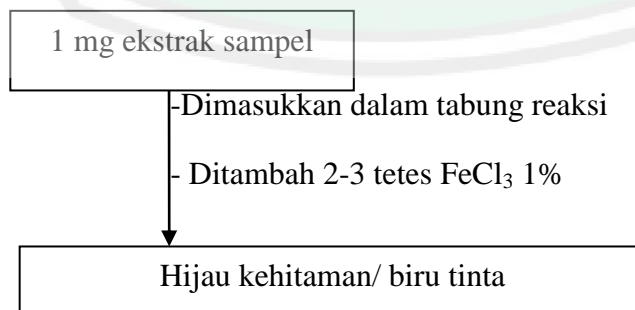
1.2.5.1 Uji Flavonoid



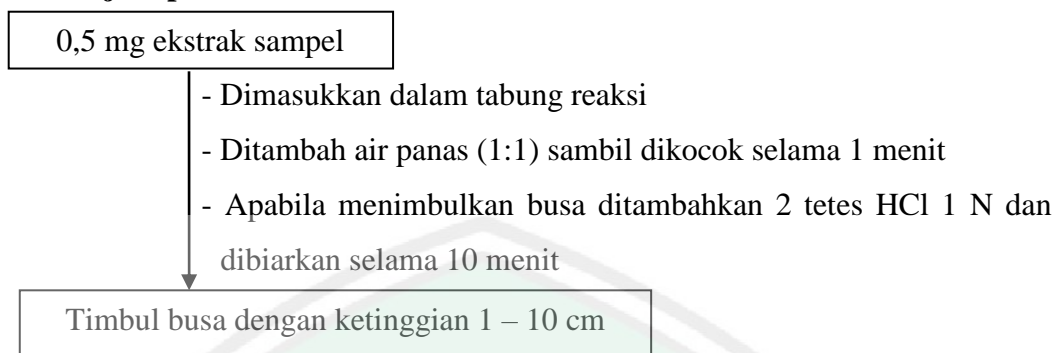
1.2.5.2 Uji Alkaloid



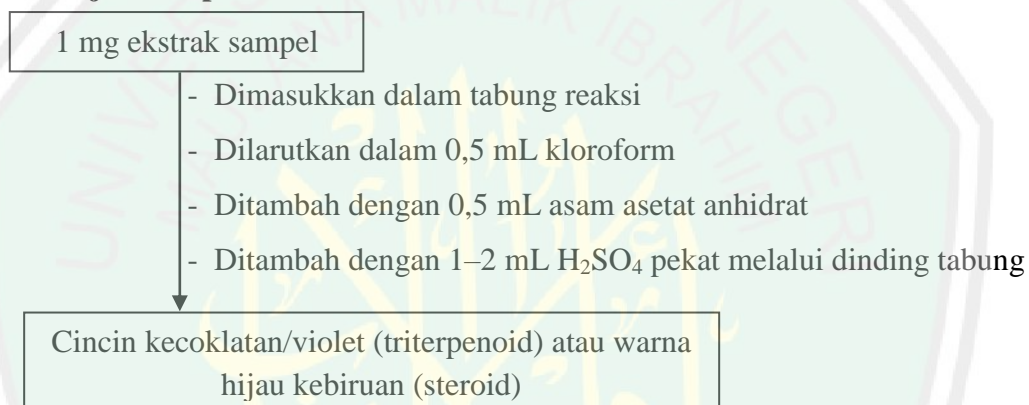
1.2.5.3 Uji Tanin



1.2.5.4 Uji Saponin

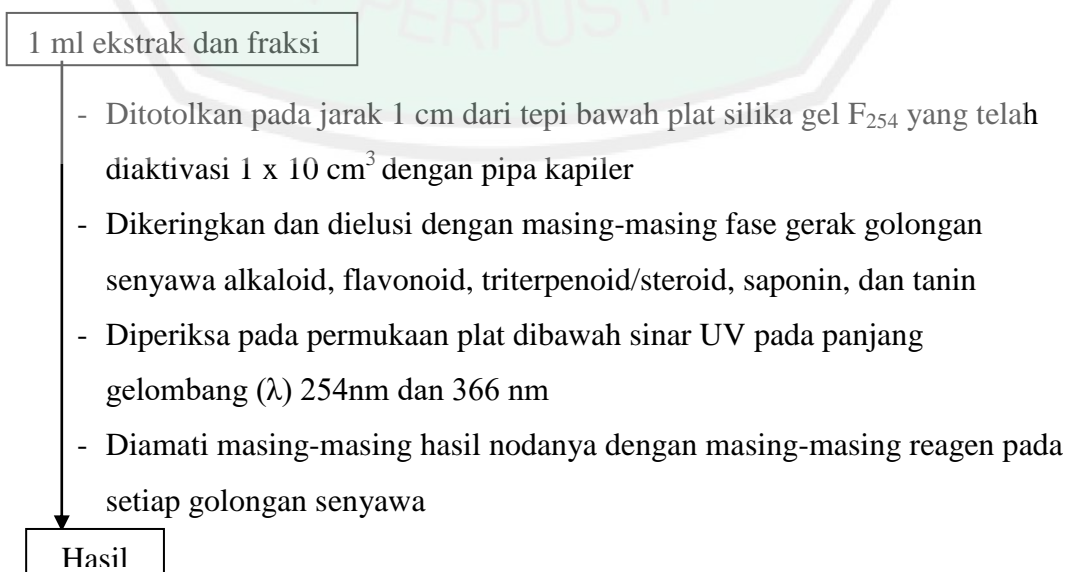


1.2.5.5 Uji Triterpenoid/Steroid



1.2.6. Uji Fitokimia dengan KLT (Sriwahyuni, 2010)

Pengujian fitokimia dengan metode KLT terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil pengujian reagen fitokimia.



Jenis-jenis fasa gerak dan pendeteksi uji KLT untuk metabolit sekunder :

Nama Senyawa	fase gerak	Pendeteksi	Hasil warna Noda
Alkaloid	Kloroform:metano (9,5:0,5)	Pereaksi dragendroff	Ungu kecoklatan-jingga kecoklatan
Flavonoid	1. n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) 2. etil asetat:metanol (9:1)	Diuapi dengan amoniak	Biru kehijauan, merah jingga, lembayung, kuning, biru muda, coklat dan kuning kehijauan
Saponin	Kloroform:aseton (4:1)	H ₂ SO ₄	Merah muda, ungu gelap, hijau dan kuning
Tanin	n-butanol;asam asetat:air (BAA) (4:1:5)	Pereaksi FeCl ₃	Lembayung, hitam, ungu kehitaman, hijau kekuningan
Triterpenoid/Steroid	1. n-butanol:etil asetat (1:1) 2. kloroform:etil asetat (1:1)	Pereaksi Libermann-Burchard	Merah muda keunguan, merah, (triterpenoid) Hijau terang, hijau kekuningan, hijau kecoklatan, ungu merah (steroid)

Lampiran 3.

Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan

L.3.1 Pembuatan Larutan HCl 1 N

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,06 \text{ N} \times V_1 = 1 \text{ N} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,82 \rightarrow 0,8 \text{ ml}$$

Cara pembuatannya adalah dipipet HCl pekat dengan pipet ukur 1 mL sebanyak 0,8 ml dn dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml yang berisi ± 5 ml aquades. Ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogeny. Perlakuan ini dialkukan dalam lemari asam.

L.3.2 Pembuatan HCl 2 %

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

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

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah dipipet larutan HCl pekat 37 % sebanyak 0,5 mL menggunakan pipet volume 0,5 mL dan pengambilannya dilakukan di dalam lemari asam, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang telah berisi ± 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.3 Pembuatan Reagen Dragendorff (Harbone, 1987)

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 H_2O .

Larutan II. 6 g KI dalam 10 mL H_2O .

Cara pembuatannya adalah larutan I dicampur dengan larutan II lalu ditambahkan 7 ml HCl pekat dan 15 H_2O serta diaduk hingga homogeny. Penyimpanan reagen ini didalam botol berwarna gelap.

L.3.4 Pembuatan Reagen Mayer (Manan dan Mubasyir, 2006)

Larutan I. HgCl_2 1,358 g dalam aquades 60 mL

Larutan II. KI 5 g dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya adalah larutan I dituangkan kedalam larutan II, lalu diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 ml.

L.3.5 Pembuatan Reagen Lieberman-Burchard

Asam sulfat pekat	= 5 mL
Anhidrida asetat	= 5 mL
Metanol absolut	= 50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat diambil sebanyak 5 mL dengan pipet volume 5 mL dan pengambilannya dilakukan di dalam lemari asam. Setelah itu larutan asam sulfat tersebut dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL. Kemudian diambil larutan anhidrida asetat sebanyak 5 mL di dalam lemari asam dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi asam sulfat. Selanjutnya diambil larutan etanol absolut 50 mL di dalam lemari asam dan dicampurkan ke dalam asam sulfat dan anhidrida. Kemudian ketiga campuran larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol kaca dan didinginkan di dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, dkk., 2001).

L.3.6 Pembuatan 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 di dalam lemari asam menggunakan pipet volume 5 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.

L.3.7 Pembuatan FeCl₃ 1 %

$$\text{FeCl}_3 \text{ 1\%} = \frac{1 \text{ m}}{100} \times 100 \%$$

$$m = 1$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk FeCl₃.6H₂O sebanyak 1 g menggunakan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL. Kemudian ditambahkan aquades hingga 100 ml.

L3.8 Pembutan Larutan stok MTT (5 mg/ml) (CCRC, 2009)

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

L.3.9 Pembuatan larutan ekstrak koro benguk 10.000 ppm

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

Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang sebanyak 50 mg kemudian diencerkan dengan 5 ml pelarut masing-masing ekstrak, dihomogenkan dengan pengaduk gelas, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 10.000 ppm (ekstrak yang lebih encer sehingga mempermudah dalam identifikasi kualitatif dengan reagen tertentu).

L.3.10 Pembuatan larutan stok 500 ppm

$$\text{berat ekstrak} = 10 \text{ mg}$$

$$\text{volume pelarut} = 100 \text{ }\mu\text{L (DMSO)}$$

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

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

$$1 \text{ ml} \times 500 \text{ }\mu\text{g/mL} = 100.000 \text{ }\mu\text{g/mL} \times V_2$$

$$= 0,005 \text{ mL} = 5 \text{ }\mu\text{L}$$

Larutan stok 500 ppm dibuat dengan mengambil 5 μ L ekstrak yang telah dilarutkan dengan 100 μ L DMSO menggunakan mikropipet, kemudian ditambahkan 995 μ L media kultur RPMI dan diresuspensi hingga homogen.



Lampiran 4. Data dan Perhitungan Hasil Penelitian

L.4.1 Perhitungan Kadar Air

A. Data Pengukuran Kadar Air Sampel Kering biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L)DC).var *pruriens*

Ulangan perlakuan	Berat cawan kosong (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
P1	29,2019	34,6747	34,5552
P2	29,2018	34,6744	34,5548
P3	29,2018	34,6744	34,5548
Rata-Rata Berat Konstan	29,2018	34,6745	34,5549

Berat cawan + sampel sebelum dioven:

- Cawan 1 = 34,2017 g
- Cawan 2 = 39,6780 g
- Cawan 3 = 39,5562 g

Ulangan perlakuan	Berat cawan + Sampel (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
P1	33,7114	39,1870	39,0599
P2	33,7081	39,1872	39,0555
P3	33,7006	39,1843	39,0526
Rata-rata berat konstan	33,7067	39,1862	39,0560

B. Perhitungan Kadar Air Sampel Kering Kering biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L)DC).var *pruriens*

Adapun rumus perhitungan kadar air adalah :

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

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

$$\% \text{ Kadar air terkoreksi} = \text{Kadar air} - \text{Faktor koreksi}$$

❖ **Ulangan ke 1**

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(34,2017-33,7067)}{(34,2017-29,2018)} \times 100 \% \\ &= \frac{0,495}{4,9999} \times 100 \% \\ &= 9,9002 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{100}{100-4,9999 \%} \\ &= \frac{100}{90,0998 \%} \\ &= 1,1098 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air terkoreksi} &= 9,9002 \% - 1,1098 \% \\ &= 8,7904 \% \end{aligned}$$

❖ **Ulangan ke 2**

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(39,6780-39,1862)}{(39,6780 - 34,5549)} \times 100 \% \\ &= \frac{0,4918}{5,0035} \times 100 \% \\ &= 9,8291 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{100}{100-9,8291\%} \\ &= \frac{100}{90,1709 \%} \\ &= 1,1090 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air terkoreksi} &= 9,8291 \% - 1,1090 \% \\ &= 8,7201 \% \end{aligned}$$

❖ **Ulangan ke 3**

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(39,5562-39,0560)}{(39,5562-34,5549)} \times 100 \% \\ &= \frac{0,5002}{5,0013} \times 100 \% \\ &= 10,0014 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{100}{100-10,0014 \%} \\ &= \frac{100}{89,999 \%} \\ &= 1,1111 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\% \text{ kadar air terkoreksi} &= 10,0014\% - 1,1111\% \\ &= 8,8904\%\end{aligned}$$

Hasil rata-rata kadar air dari ulangan ke 1 sampai ulangan ke 3 adalah :

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata kadar air} &= \frac{9,9002\% + 9,8291\% + 10,0014}{3} \\ &= 9,9012\%\end{aligned}$$

Hasil rata-rata faktor koreksi dari ulangan ke 1 sampai ulangan ke 3 adalah :

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata faktor koreksi} &= \frac{1,1098\% + 1,1090\% + 1,1111\%}{3} \\ &= 1,1099\%\end{aligned}$$

Hasil rata-rata kadar air terkoreksi dari ulangan ke 1 sampai ulangan ke 3 adalah :

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata kadar air terkoreksi} &= \frac{8,7904\% + 8,7201\% + 8,8904\%}{3} \\ &= 8,8003\%\end{aligned}$$

Kadar air yang terkandung pada sampel kering **biji koro benguk (*Mucuna pruriens* (L)DC).var *pruriens*** pada setiap pengulangannya adalah :

Sampel	Kadar air yang terkandung dalam sampel			
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-Rata
Biji koro benguk	8,7904 %	8,7201%	8,8904 %	8,8003 %

L.4.2 Perhitungan Rendemen

1. Ekstrak Etanol 96 %

$$\text{Berat sampel} = 423,44 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak pekat} = 23,62 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{23,62 \text{ g}}{423,44 \text{ g}} \times 100 \% = 5,5781 \%$$

2. Fraksi n-heksana

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 21 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak pekat} &= 5,66 \text{ g} \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{5,66 \text{ g}}{21 \text{ g}} \times 100 \% = 26,95 \% \end{aligned}$$

3. Fraksi kloroform

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 21 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak pekat} &= 1,70 \text{ g} \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{1,70 \text{ g}}{21 \text{ g}} \times 100 \% = 8,09 \% \end{aligned}$$

4. Fraksi etil asetat

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 21 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak pekat} &= 0,039 \text{ g} \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{0,039 \text{ g}}{21 \text{ g}} \times 100 \% = 0,1857 \% \end{aligned}$$

5. Fraksi n-butanol

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 21 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak pekat} &= 6,72 \text{ g} \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{6,72 \text{ g}}{21 \text{ g}} \times 100 \% = 32 \% \end{aligned}$$

6. Fraksi air

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 21 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak pekat} &= 4,47 \text{ g} \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{4,47 \text{ g}}{21 \text{ g}} \times 100 \% = 21,285 \% \end{aligned}$$

L.4.3 Perhitungan Data dan Hasil Uji Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro*

A. Perhitungan konsentrasi sel

- Pengamatan jumlah sel dengan *hemocytometr* dibawah mikroskop *inverted*

Kuadran A 67	Kuadran B 73
Kuadran C 85	Kuadran D 79

- Jumlah sel yang dihitung (mL^{-1})

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

$$= \frac{67+73+85+79}{4} \times 10^4$$

$$= 76 \times 10^4 / \text{mL}$$
- Jumlah mL panen sel yang ditransfer (konsentrasi sel)

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

$$= \frac{100 \times 10^4}{76 \times 10^4 / \text{mL}}$$

$$= 1,3 \text{ mL}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 1,3 mL, ditambahkan hingga 10 mL media kultur RPMI (MK) karena setiap sumuran akan diisi 100 μL MK berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100 μL x 100 sumuran = 10000 μL atau 10 mL.

B. Perhitungan Prosentase Sel Hidup

➤ Data Uji aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

No.	Absorbansi kontrol sel	Absorbansi kontrol media
1.	1,095	0,084
2.	1,002	0,099
3.	1,132	0,088
Rata –Rata:	1,076	0,090

1. Ekstrak etanol 96

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan n 1	Pengulangan n 2	Pengulangan n 3		
500	0,651	0,666	0,673	0,663	58,254
250	1,084	0,992	1,028	1,023	94,575
125	1,069	1,051	1,046	1,055	97,877
62.5	0,970	0,986	0,961	0,972	89,488
31.25	0,933	1,004	0,823	0,920	84,198

2. Ekstrakn-heksana

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,548	0,534	0,536	0,539	45,721
250	0,417	0,413	0,422	0,417	33,389
125	1,043	1,014	1,053	1,036	95,990
62,5	1,015	0,993	0,998	1,002	92,486
31,25	0,96	1,072	0,985	1,006	92,857

3. Fraksi kloroform

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,893	0,92	0,906	0,906	82,816
250	0,95	0,862	0,981	0,931	85,309
125	1,102	0,972	0,986	1,020	94,306
62,5	1,004	0,981	0,924	0,969	89,218
31,25	1,065	1,054	1,011	1,043	96,664

4. Fraksi Etil asetat

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,893	0,919	0,918	0,910	83,187
250	0,915	0,952	0,694	0,854	77,493
125	0,972	0,97	0,976	0,973	89,521
62.5	0,928	0,965	1,06	0,984	90,701
31.25	1	0,95	1,02	0,990	91,273

5. Fraksi n-butanol

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,487	0,505	0,572	0,521	43,902
250	0,468	0,418	0,449	0,445	36,184
125	0,721	0,53	0,609	0,620	53,875
62.5	0,948	0,997	1,113	1,019	94,238
31.25	1,111	1,111	1,03	1,084	100,775

6. Fraksi air

konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
500	0,826	0,63	1,248	0,901	82,311
250	0,99	1,119	1,11	1,073	99,663
125	1,045	1,099	0,966	1,037	95,990
62.5	1,022	1,002	1,034	1,019	94,238
31.25	1,094	1,166	1,082	1,114	103,807

➤ 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 96 %

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0,663-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 58,1136 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{1,023-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 94,625 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{1,055-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 97,870 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0,972-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 89,452 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{0,920-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 84,178 \%$

2. Ekstrak Etanol Hasil Hidrolisis

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0,539-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 45,537 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0,417-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 33,164 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{1,036-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 95,943 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{1,002-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 92,494 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{1,006-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 92,901 \%$

3. Fraksi Kloroform

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0,906-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 82,759 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0,931-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 85,294 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{1,020-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 94,320 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0,969-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 89,148 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{1,043-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 96,653 \%$

4. Fraksi Etil Asetat

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0,910-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 83,164 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0,854-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 77,484 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{0,973-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 89,554 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0,984-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 90,669 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{0,990-0,090}{1,076-0,090} \times 100 \% = 91,278 \%$

5. Fraksin-butanol

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0,521-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 43,712 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0,445-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 36,004 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{0,620-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 53,752 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{1,019-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 94,219 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{1,084-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 100,811 \%$

6. Fraksi Air

- ❖ Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0,901-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 82,251 \%$
- ❖ Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{1,073-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 99,696 \%$
- ❖ Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{1,037-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 96,045 \%$
- ❖ Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{1,019-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 94,219 \%$
- ❖ Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{1,114-0,090}{1,076-0,90} \times 100 \% = 103,854 \%$

Sampel ekstrak	Nilai viabilitas sel HeLa pada masing-masing larutan uji					Nilai IC ₅₀
	500	250	125	61,5	31,25	
Etanol	58,254	94,575	97,877	89,488	84,198	675.007
n-heksana	45,721	33,389	95,990	92,486	92,857	378.667
kloroform	82,816	85,309	94,306	89,218	96,664	1152.710
Etil asetat	83,187	77,493	89,521	90,701	91,273	1422.954
n-butanol	43,902	36,184	53,875	94,238	100,775	316.990
Air	82,311	99,663	95,990	94,238	103,807	1038.519

C. Hasil Perhitungan IC₅₀ dengan SPS

1. Ekstrak Etanol 96%

Confidence Limits

		95% Confidence Limits for konsentrasi		
	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.1	1231.819	.	.
	0.2	1040.677	.	.
	0.3	902.850	.	.
	0.4	785.082	.	.
	0.5	675.007	.	.
	0.6	564.933	.	.
	0.7	447.165	.	.
	0.8	309.338	.	.
	0.9	118.196	.	.
	0.91	92.473	.	.
	0.92	64.529	.	.
	0.93	33.803	.	.
	0.94	-514	.	.
	0.95	-39.652	.	.
	0.96	-85.634	.	.
	0.97	-142.164	.	.
	0.98	-217.310	.	.
	0.99	-335.749	.	.

2. Fraksi n-Heksana

Confidence Limits

		95% Confidence Limits for konsentrasi		
Probability		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.1	719.513		
	0.2	602.507		
	0.3	518.138		
	0.4	446.048		
	0.5	378.667		
	0.6	311.285		
	0.7	239.195		
	0.8	154.826		
	0.9	37.820		
	0.91	22.074		
	0.92	4.968		
	0.93	-13.841		
	0.94	-34.847		
	0.95	-58.805		
	0.96	-86.953		
	0.97	-121.557		
	0.98	-167.556		
	0.99	-240.058		

3. Fraksi Kloroform

Confidence Limits

		95% Confidence Limits for konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.1	2120.871	1392.777	5201.086
	0.2	1788.521	1186.396	4329.042
	0.3	1548.873	1037.225	3700.594
	0.4	1344.103	909.363	3164.008
	0.5	1152.710	789.294	2663.033
	0.6	961.316	668.263	2163.022
	0.7	756.546	536.570	1630.267
	0.8	516.898	373.897	1015.321
	0.9	184.548	4.561	306.232
	0.91	139.822	-87.468	253.132
	0.92	91.233	-196.925	204.927
	0.93	37.808	-324.290	158.933
	0.94	-21.861	-471.546	112.575
	0.95	-89.913	-643.139	63.351
	0.96	-169.865	-847.535	8.314
	0.97	-268.156	-1101.124	-57.037
	0.98	-398.817	-1440.370	-141.765
	0.99	-604.755	-1977.557	-272.814

4. Fraksi Etil asetat

		Confidence Limits		
		95% Confidence Limits for konsentrasi		
	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.1	2864.456		
	0.2	2369.618		
	0.3	2012.805		
	0.4	1707.921		
	0.5	1422.954		
	0.6	1137.987		
	0.7	833.103		
	0.8	476.290		
	0.9	-18.548		
	0.91	-85.140		
	0.92	-157.484		
	0.93	-237.030		
	0.94	-325.870		
	0.95	-427.193		
	0.96	-546.235		
	0.97	-692.581		
	0.98	-887.123		
	0.99	-1193.745		

5. Fraksi Butanol

Confidence Limits

		95% Confidence Limits for konsentrasi		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.1	871.791	.	.
	0.2	681.339	.	.
	0.3	544.010	.	.
	0.4	426.667	.	.
	→ 0.5	316.990	.	.
	0.6	207.312	.	.
	0.7	89.969	.	.
	0.8	-47.360	.	.
	0.9	-237.812	.	.
	0.91	-263.442	.	.
	0.92	-291.286	.	.
	0.93	-321.901	.	.
	0.94	-356.094	.	.
	0.95	-395.091	.	.
	0.96	-440.907	.	.
	0.97	-497.233	.	.
	0.98	-572.107	.	.
	0.99	-690.119	.	.

6. Fraksi Air

		Confidence Limits		
		95% Confidence Limits for konsentrasi		
Probability		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.1	1698.781	.	.
	0.2	1472.127	.	.
	0.3	1308.693	.	.
	0.4	1169.045	.	.
	→ 0.5	1038.519	.	.
	0.6	907.993	.	.
	0.7	768.345	.	.
	0.45	1103.260	.	.
	0.8	604.911	.	.
	0.9	378.257	.	.
	0.91	347.755	.	.
	0.92	314.619	.	.
	0.93	278.184	.	.
	0.94	237.491	.	.
	0.95	191.082	.	.
	0.96	136.556	.	.
	0.97	69.524	.	.
	0.98	-19.583	.	.
	0.99	-160.028	.	.

L.4.4 Perhitungan Nilai Rf dari Hasil KLT

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$

1. Uji Alkaloid

a) Fraksi Etanol

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7,2}{8} = 0,9$$

b) Fraksi n-Heksana

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{6,8}{8} = 0,85 \quad \text{Nilai Rf 3} = \frac{3,3}{8} = 0,41$$

$$\text{Nilai Rf 2} = \frac{4,9}{8} = 0,41 \quad \text{Nilai Rf 4} = \frac{2,1}{8} = 0,26$$

c) Fraksi Kloroform

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{6,8}{8} = 0,85 \quad \text{Nilai Rf 3} = \frac{3,4}{8} = 0,42$$

$$\text{Nilai Rf 2} = \frac{4}{8} = 0,5 \quad \text{Nilai Rf 4} = \frac{1,7}{8} = 0,21$$

d) Fraksi Etil asetat

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7,2}{8} = 0,9 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{6,6}{8} = 0,83$$

$$\text{Nilai Rf 3} = \frac{4,8}{8} = 0,6$$

e) Fraksi n-Butanol

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{6,8}{8} = 0,85 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{6,2}{8} = 0,78$$

$$\text{Nilai Rf 3} = \frac{0,9}{8} = 0,11$$

f) Fraksi Air

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7}{8} = 0,87 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{5,2}{8} = 0,65$$

$$\text{Nilai Rf 3} = \frac{0,6}{8} = 0,075$$

2. Uji Tanin

a) Fraksi Etanol

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7,3}{7,5} = 0,97 \quad \text{Nilai Rf 3} = \frac{5}{7,5} = 0,68$$

$$\text{Nilai Rf 2} = \frac{6,9}{7,5} = 0,92 \quad \text{Nilai Rf 4} = \frac{2,6}{7,5} = 0,35$$

b) Fraksi n-Heksana

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7,1}{7,5} = 0,93 \quad \text{Nilai Rf 3} = \frac{5}{7,5} = 0,68$$

$$\text{Nilai Rf 2} = \frac{6,7}{7,5} = 0,88 \quad \text{Nilai Rf 4} = \frac{2,7}{7,5} = 0,36$$

c) Fraksi Kloroform

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7,2}{7,5} = 0,95 \quad \text{Nilai Rf 1} = \frac{2,5}{7,5} = 0,33$$

d) Fraksi Etil asetat

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7,1}{7,5} = 0,96 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{6,2}{7,5} = 0,84$$

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{2,8}{7,5} = 0,38$$

e) Fraksi n-Butanol

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{5,15}{7,5} = 0,69 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{2,6}{7,5} = 0,35$$

f) Fraksi Air

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{3,7}{7,5} = 0,49 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{2,5}{7,5} = 0,33$$

3. Uji Triterpenoid-Steroid

a) Fraksi n-Heksana

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{4,8}{8} = 0,61 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{2,7}{8} = 0,34 \quad \text{Nilai Rf 3} = \frac{1,1}{8} = 0,14$$

$$\text{Nilai Rf 4} = \frac{4,3}{8} = 0,53 \quad \text{Nilai Rf 5} = \frac{2}{8} = 0,25 \quad \text{Nilai Rf 6} = \frac{7,2}{8} = 0,9$$

b) Fraksi Kloroform

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7,2}{8} = 0,91 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{6,8}{8} = 0,86$$

c) Fraksi Etil asetat

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{7,2}{8} = 0,9 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{6,6}{8} = 0,83$$

$$\text{Nilai Rf 3} = \frac{4,8}{8} = 0,6$$

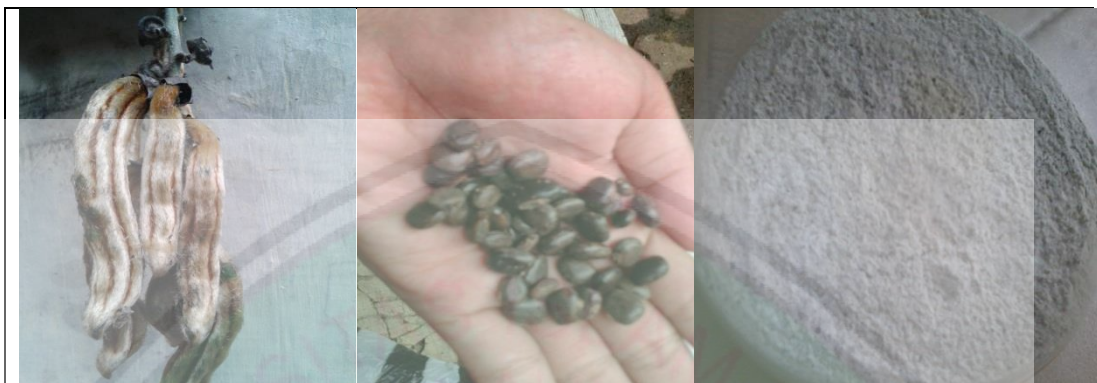
d) Fraksi n-Butanol

$$\text{Nilai Rf 1} = \frac{6,8}{8} = 0,85 \quad \text{Nilai Rf 2} = \frac{6,2}{8} = 0,78$$

$$\text{Nilai Rf 3} = \frac{0,9}{8} = 0,11$$

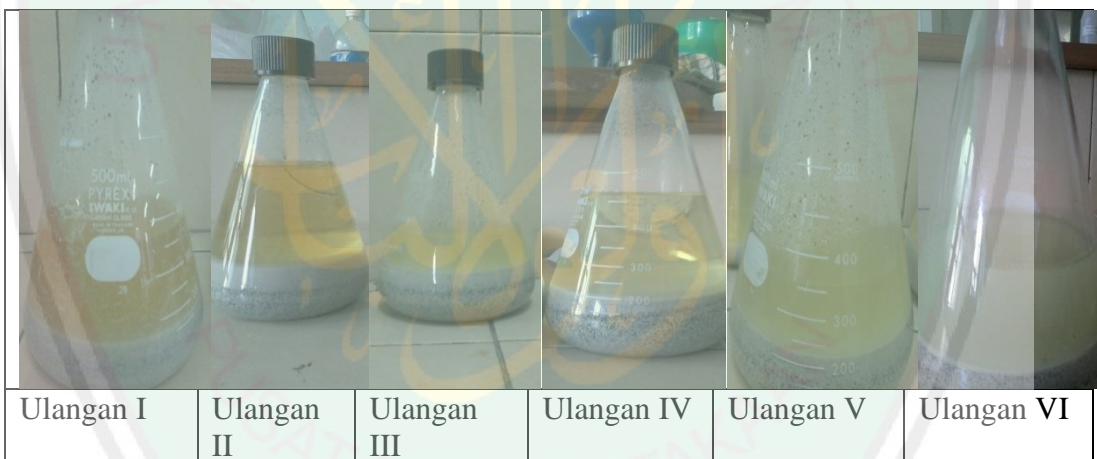
L.5 Dokumentasi

L.5.1 Preparasi Sampel

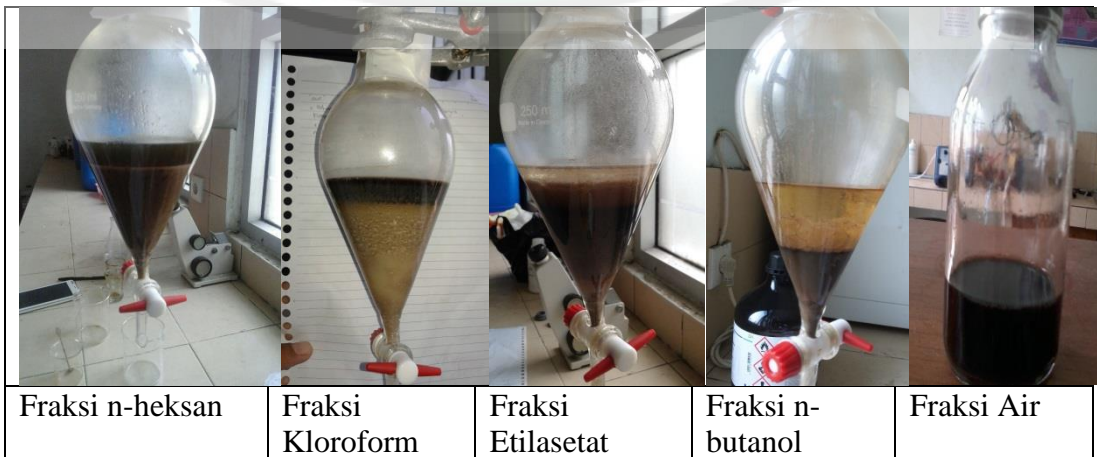


L.5.2 Ekstrak senyawa aktif

- Maserasi



L.5.3 Fraksinasi



L.5.4 Aktivitas Antikanker secara *In-Vitro*



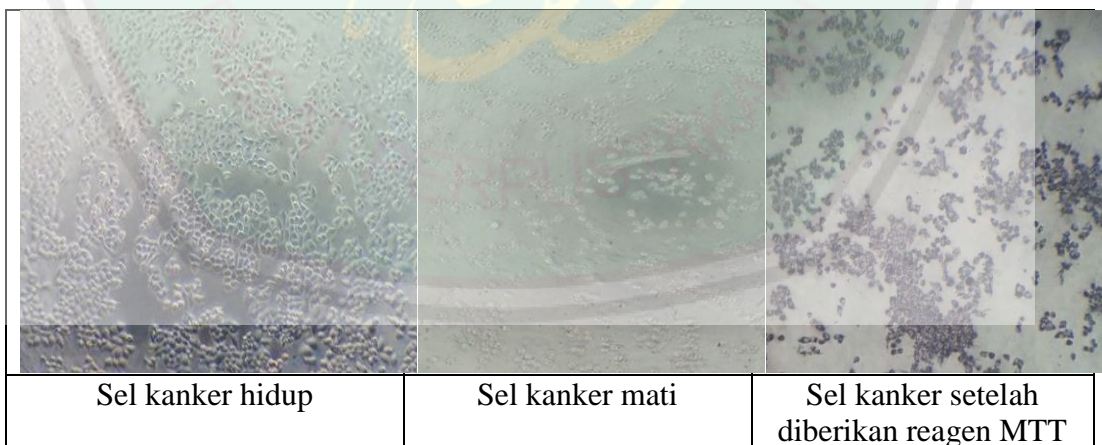
Preparasi sampel



Setelah pemberian MTT dan *stopper* SDS

Hemocytometr




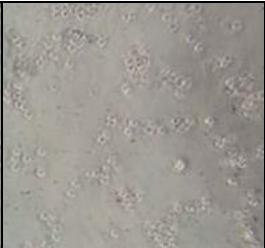
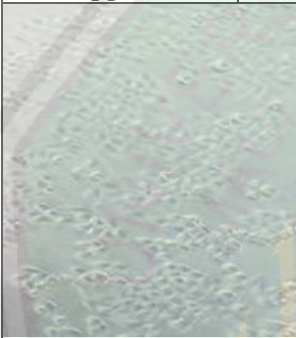
- Pengamatan Sel Kanker dengan Mikroskop *Interved*



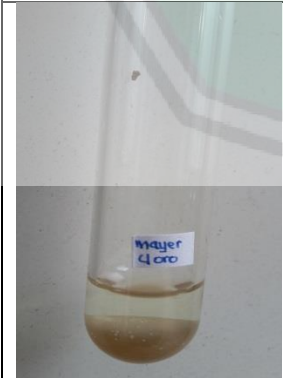

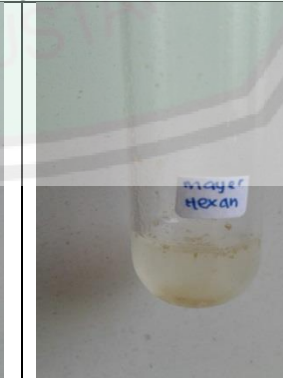

Sel kanker hidup


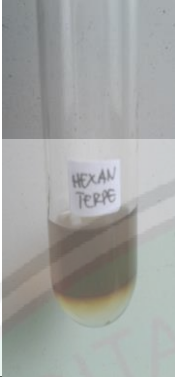
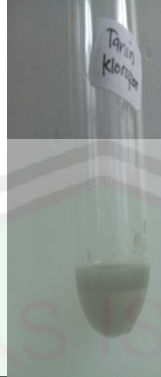
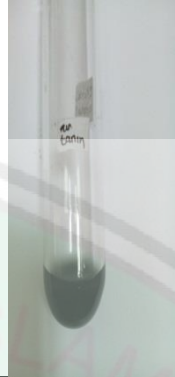
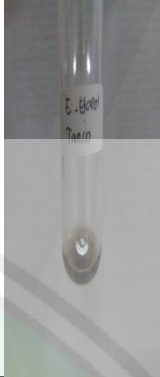
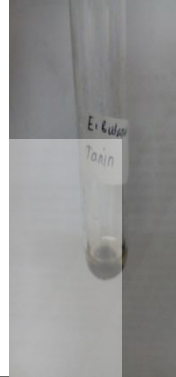
Sel kanker mati

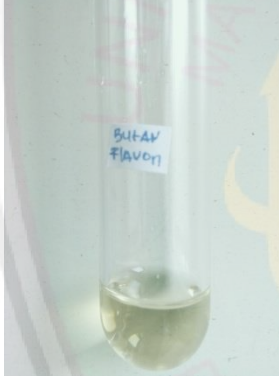


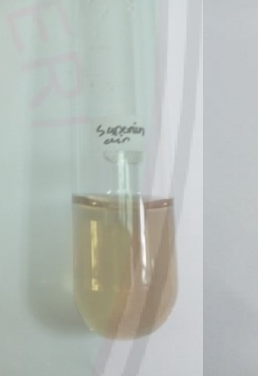
Sel kanker setelah diberikan reagen MTT

			
Treatmen sel + sampel konsentrasi 500 ppm	Treatmen sel + sampel konsentrasi 250 ppm	Treatmen sel + sampel konsentrasi 125 ppm	Treatmen sel + sampel konsentrasi 62,5 ppm
			
Treatmen sel + sampel konsentrasi 31,25 ppm			

L.5.5 Uji fitokimia

• Uji Alkaloid			
			
Fraksi kloroform + pereaksi mayer	Fraksi kloroform + pereaksi dregendrof	Fraksi n-heksana + pereaksi Mayer	Fraksi n-heksana + pereaksi dregendrof

• Uji triterpenoid		• Uji Tanin			
					
Fraksi kloroform	Fraksi n-heksana	Fraksi Kloroform	Fraksi Air	Ekstraks etanol	Fraksi Butanol

• Uji Flavonoid		• Uji Saponin	
			
Fraksi butanol	Fraksi kloroform	Fraksi Kloroform	Fraksi Air