

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA ALKALOID DARI  
TANAMAN ANTING-ANTING (*Acalypha indica* L.) PADA SEL KANKER  
PAYUDARA T47D**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
NUR LAILY MASFUFAH  
NIM. 12630042**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2016**

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA ALKALOID DARI  
TANAMAN ANTING-ANTING (*Acalypha indica* L.) PADA SEL KANKER  
PAYUDARA T47D**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
NUR LAILY MASFUFAH  
NIM. 12630042**

**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  
2016**

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA ALKALOID DARI  
TANAMAN ANTING-ANTING (*Acalypha indica* L.) PADA SEL KANKER  
PAYUDARA T47D**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**NUR LAILY MASFUFAH**  
NIM. 12630042

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 29 Desember 2016

**Pembimbing I**

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

**Pembimbing II**

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

  
Mengetahui,  
**Ketua Jurusan Kimia**  
**Elok Kamilah Havati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA ALKALOID DARI  
TANAMAN ANTING-ANTING (*Acalypha indica* L.) PADA SEL KANKER  
PAYUDARA T47D**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**NUR LAILY MASFUFAH**  
NIM. 12630042

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 29 Desember 2016

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(  )
Ketua Penguji	: 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

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nur Laily Masfufah

NIM : 12630042

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Isolasi dan Uji Aktivitas Senyawa Alkaloid dari Tanaman  
Ating-ating (*Acalypha indica* L.) pada Sel Kanker  
Payudara T47D

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan 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 2016

Yang membuat pernyataan,



Nur Laily Masfufah

NIM. 12630042

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufiq, serta hidayah-Nya kepada penulis, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “isolasi dan uji aktivitas senyawa alkaloid dari tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) pada sel kanker payudara T47D” Sholawat serta salam, tidak lupa penulis ucapkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang telah menunjukkan jalan kebenaran melalui ajaran agama Islam.

Laporan hasil penelitian ini disusun sebagai tahapan untuk menyelesaikan tugas akhir sebagai salah satu upaya mencapai gelar Strata 1 serta sebagai pengaplikasian ilmu yang telah didapat.

Ucapan terimakasih juga tidak lupa penulis sampaikan kepada:

1. Bapak dan Ibu tercinta sebagai orang tua serta saudara-saudara kami yang selalu memberi motivasi kepada kami.
2. Prof. Dr. H.Mudjia Rahardjo, M,Si selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Hj.Bayyinatul M, drh, M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku dosen pembimbing Fakultas, yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi, mengarahkan penulis.
6. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt selaku dosen konsultan yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi dan mengarahkan penulis.

7. Nur Aini, M.Si selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
9. Teman-teman Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang khususnya angkatan 2012, yang telah memberi motivasi, informasi, dan masukannya pada penulis.
10. Kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah ikut memberikan bantuan dan motivasi selama penyusunan proposal ini.

Penulis menyadari, bahwa masih terdapat kekurangan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, kritik dan saran dari para pembaca sangat dibutuhkan agar penulis lebih baik lagi dalam menyusun skripsi maupun karya tulis lainnya. Semoga skripsi ini bermanfaat.

Malang, Desember 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xi
<b>ABSTRAK</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Batasan Masalah .....	6
1.5 Manfaat Penelitian .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>8</b>
2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam .....	8
2.2 Klasifikasi Tanaman Anting-Anting .....	10
2.3 Alkaloid .....	11
2.4 Senyawa Alkaloid Sebagai Anti Kanker .....	13
2.5 Metode Ekstraksi Senyawa Alkaloid pada Tanaman Anting-Anting .....	16
2.6 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid Menggunakan Reagen Dragendorff dan Mayer .....	19
2.7 Kromatografi Lapis Tipis .....	22
2.8 Uji Toksisitas .....	23
2.8.1 Uji Aktivitas Secara <i>In Vitro</i> .....	24
2.9 Kanker Payudara .....	26
2.9.1 <i>Cell Line</i> Kanker Payudara T47D .....	26
2.10 <i>Microplater Reader (ELISA Reader)</i> .....	27
2.11 Identifikasi Senyawa dengan LC-MS .....	27
<b>BAB III METODOLOGI</b> .....	<b>30</b>
3.1 Pelaksanaan Penelitian .....	30
3.2 Alat dan Bahan .....	30
3.2.1 Alat .....	30
3.2.2 Bahan .....	30
3.3 Rancangan Penelitian .....	31
3.4 Tahapan Penelitian .....	31
3.5 Cara Kerja .....	32
3.5.1 Preparasi Sampel .....	32
3.5.2 Analisis Kadar Air .....	32
3.5.3 Ekstraksi dan Fraksinasi Senyawa Alkaloid .....	33



3.5.4 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid .....	34
3.5.5 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Menggunakan UPLC-MS .....	35
3.5.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLT .....	35
3.5.6.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) .....	35
3.5.6.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) .....	36
3.5.7 Uji Aktivitas Anti Kanker dengan Metode MTT .....	37
3.5.7.1 Penyiapan Sel .....	37
3.5.7.2 Perhitungan sel kanker .....	37
3.5.7.3 Peletakan sel pada <i>plate</i> .....	38
3.5.7.4 Pembuatan Larutan Sampel pada dan pemberian larutan sampel pada <i>plate</i> .....	38
3.5.7.5 Pemberian Larutan MTT .....	38
3.5.8 Analisis Data .....	39
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>40</b>
4.1 Preparasi Sampel .....	40
4.2 Analisis Kadar Air .....	40
4.3 Ekstraksi Maserasi Tanaman Anting-anting .....	41
4.4 Fraksinasi (Partisi) Senyawa Alkaloid .....	43
4.5 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid dengan Penambahan Reagen Dragendorff dan Mayer .....	45
4.6 Hasil Identifikasi Menggunakan UPLC-MS .....	46
4.7 Pemisahan Senyawa Alkaloid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ..	59
4.7.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) .....	59
4.7.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) .....	62
4.8 Uji Aktivitas Antikanker secara <i>In Vitro</i> terhadap Sel Kanker Payudara T47D .....	64
4.9 Pemanfaatan Tanaman Anting-anting sebagai Obat dalam Perspektif Islam .....	69
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>72</b>
5.1 Kesimpulan .....	72
5.2 Saran .....	72
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>73</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>80</b>
<b>MOTTO .....</b>	<b>107</b>
<b>LEMBAR PERSEMBAHAN .....</b>	<b>108</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Konstanta dielektrik dan tingkat kelarutan beberapa pelarut .....	16
Tabel 2.2	Hasil uji fitokima tanaman anting-anting .....	21
Tabel 4.1	Hasil maserasi serbuk tanaman anting-anting .....	42
Tabel 4.2	Hasil partisi ekstrak kasar tanaman anting-anting .....	45
Tabel 4.3	Data hasil uji fitokimia dengan reagen .....	45
Tabel 4.4	Hasil dugaan senyawa analisis menggunakan instrument UPLC-MS .....	48
Tabel 4.5	Data penampakan noda senyawa alkaloid hasil KLTA ekstrak kasar alkaloid tanaman anting-anting .....	60
Tabel 4.6	Hasil KLTA ekstrak kasar alkaloid dari tanaman anting-anting menggunakan eluen kloroform : metanol (9,5:0,5).....	61
Tabel 4.7	Hasil KLT preparatif senyawa alkaloid .....	63
Tabel 4.8	Data nilai IC <sub>50</sub> uji aktivitas antikanker .....	68

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman anting-anting ( <i>Acalypha indica</i> L.) .....	11
Gambar 2.2	Contoh struktur senyawa alkaloid .....	12
Gambar 2.3	Siklus pembelahan sel transisi fase G1 ke S .....	14
Gambar 2.4	Reaksi alkaloid dengan basa .....	19
Gambar 2.5	Reaksi dugaan alkaloid dengan reagen Dragendroff .....	20
Gambar 2.6	Reaksi dugaan alkaloid dengan reagen Mayer .....	20
Gambar 2.7	Reaksi reduksi MTT menjadi formazan .....	25
Gambar 4.1	Reaksi alkaloid dengan asam kuat .....	43
Gambar 4.2	Reaksi pembebasan amina dengan cara pembasaan .....	44
Gambar 4.3	Kromatogram UPLC-MS ekstrak kasar alkaloid tanaman anting-anting .....	47
Gambar 4.4	Spektra massa senyawa puncak 1 .....	48
Gambar 4.5	Struktur senyawa trigonelin.....	49
Gambar 4.6	Spektra massa senyawa puncak 2 .....	49
Gambar 4.7	Pola fragmentasi senyawa berberin .....	50
Gambar 4.8	Spektra massa senyawa puncak 3 .....	50
Gambar 4.9	Struktur senyawa penacetin.....	51
Gambar 4.10	Spektra massa senyawa puncak 4 .....	51
Gambar 4.11	Struktur senyawa N-metilnikotinium .....	52
Gambar 4.12	Spektra massa senyawa puncak 5 .....	52
Gambar 4.13	Struktur senyawa coptisin.....	53
Gambar 4.14	Spektra massa senyawa puncak 6 .....	53
Gambar 4.15	Struktur pola fragmentasi senyawa evosantin .....	54
Gambar 4.16	Spektra massa senyawa puncak 7 .....	54
Gambar 4.17	Spektra senyawa 4-Aminonaptalimid.....	54
Gambar 4.18	Spektra massa senyawa puncak 8 .....	55
Gambar 4.19	Pola fragmen senyawa palmatin .....	55
Gambar 4.20	Spektra massa senyawa puncak 9 .....	56
Gambar 4.21	Struktur senyawa dauricin .....	56
Gambar 4.22	Spektra massa senyawa puncak 10 .....	56
Gambar 4.23	Struktur dari senyawa lysergol .....	57
Gambar 4.24	Spektra massa senyawa puncak 11 .....	57
Gambar 4.25	Pola fragmentasi dari senyawa tannin terhidrolisis .....	58
Gambar 4.26	Spektra massa senyawa puncak 12 .....	58
Gambar 4.27	Struktur dari senyawa jatrorrhizin .....	59
Gambar 4.28	Ilustrasi KLTA .....	61
Gambar 4.29	Penampakan morfologi sel T47D setelah di <i>treatment</i> .....	66

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema kerja penelitian .....	80
Lampiran 2	Diagram alir .....	81
Lampiran 3	Perhitungan pembuatan larutan .....	89
Lampiran 4	Data dan perhitungan hasil penelitian .....	92
Lampiran 5	Perhitungan persen luas area .....	103
Lampiran 6	Perhitungan nilai Rf .....	104
Lampiran 7	Dokumentasi .....	105

## ABSTRAK

**Masfufah, N.L. 2016. Isolasi dan Uji Aktivitas Senyawa Alkaloid dari Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) pada Sel Kanker Payudara T47D.**  
Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Nur Aini, M.Si;  
Konsultan: Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt

---

**Kata Kunci :** Anting-anting (*Acalypha indica* L.), sel kanker payudara T47D, *in-vitro*, *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (UPLC-MS) dan metode MTT.

Anting-anting merupakan gulma yang sering dijumpai dipinggir jalan yang sering dimanfaatkan sebagai obat. Hampir seluruh bagian dari tumbuhan ini mengandung golongan senyawa alkaloid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa alkaloid yang ada dalam ekstrak kasar alkaloid menggunakan instrumen UPLC-MS dan uji aktivitas antikanker dari ekstrak kasar, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid hasil pemisahan KLTP terhadap sel kanker payudara T47D.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol dan dipartisi (fraksinasi) dengan etil asetat. Ekstrak hasil maserasi dan partisi diuji fitokimia. Ekstrak kasar alkaloid hasil partisi diidentifikasi menggunakan instrument UPLC-MS. Pemisahan golongan senyawa aktif dengan KLTA untuk mengetahui eluen terbaik. Hasil partisi yang diperoleh di pisahkan dengan menggunakan KLT Preparatif dengan pelarut terbaik hasil pemisahan KLTA yaitu kloroform:metanol (9,5:0,5). Isolat alkaloid hasil KLT Preparatif yang didapat diuji aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D secara *in-vitro* dengan metode MTT.

Hasil pengukuran kadar air diperoleh 6,41 %. Randemen hasil maserasi diperoleh 12,44 %. Hasil randemen partisi diperoleh 1,136 %. Berdasarkan hasil analisis dengan instrument UPLC-MS diduga ada golongan senyawa alkaloid trigonelin, berberin, penacetin, N-metil nikotinium, coptisin, evosantin, 4-aminonaptalimid, palmatin, dauricin, lysergol dan jatrorrhizine. Hasil berat isolat alkaloid pemisahan dengan KLTP adalah 4,6 mg. Hasil uji aktivitas antikanker ekstrak kasar, ekstrak kasar alkaloid, dan isolat alkaloid berturut-turut diperoleh nilai  $IC_{50}$  920, 670  $\mu\text{g/mL}$ , 611,709  $\mu\text{g/mL}$ , 303,061  $\mu\text{g/mL}$ .

## ABSTRACT

**Masfufah, N.L. 2016. Isolation and Activity Test of Alkaloid Compound from Anting-anting Plant (*Acalypha indica* L.) Against Cell of Breast Cancer T47D.**

Advisor I : Elok Kamilah Hayati, M.Si ; Advisor II: Nur Aini, M.Si; Consultant : Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt

---

---

**Key Word :** Anting-anting (*Acalypha indica* L.), Cell of breast cancer T47D, *in-vitro*, *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (UPLC-MS) and MTT Method.

Anting-anting is weeds which often found on the edge of road and often used as medicines. Almost the whole part of this plant contains a group of alkaloid compound. The purpose of this research is to know the existence of alkaloid compound in alkaloid crude extract using UPLC instrument and the anticancer activity from crude extract, alkaloid crude extract and isolate alkaloid as isolation results of KLTP against T47D cancer cell.

Extraction method that used is maceration extraction using methanol solvents and partitioned (fractionation) by etil aasetat. Extract results from maceration and partition are phytochemically tested. Alkaloid crude extract as partition results is identified by UPLC instrument. The Active compound group is isolated by KLTA to know the best eluent. The Partition result obtained is isolated by using preparative KLT along with best solvent from the result of KLTA isolations i.e chloroform : methanol (9,5:0,5). The alkaloid isolate as the result of preparative KLT obtained is tested the anticancer activity against T47D cancer cell with *in-vitro* procedures by using MTT method.

Measurement results of water content is 6,38 %. Yield as maceration results is 12,44 %. Yield results of partition is 1,136 %. According the analysis result by using UPLC instrument, there is an existency supposition of trigoneline, berberine, phenacetine, N-methyl nikotinium, coptisine, evosantine, 4-aminonaptalimide, phalmatine, dauricine, lysergol and jatrorrhizine alkaloid compound. The weight of isolate alkaloid which isolated by KLTP is 4,6 mg. The anticancer activity of Crude extract, alkaloid crude extract and isolate alkaloid are continually obtained at value  $IC_{50}$  920, 670  $\mu\text{g/mL}$ , 611,709  $\mu\text{g/mL}$ , 303,061  $\mu\text{g/mL}$ .

## ملخص البحث

مصفوفة, ن.ل. ٢٠١٦. التعزيل و تجريب نشاط المستحضر القلوانيات من النبات أنتيغ أنتيغ علي خلايا سرطان الثدي T47D. إشراف أول: ايلوك كاملة حياتي الماجستير, إشراف ثاني: نور عيني الماجستير, مستشار: رائحة المطيعة الماجستير

الكليمان الرئيسية: انتيغ-انتيج, خلايا سرطان الثدي T47D, *in-vitro*, كيفية MTT  
*Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*  
(UPLC-MS)

النبات "أنتيغ-أنتيغ" هو الاعشاب الضارة التي توجد كثيرا في جانب الطريق و غالبا تنفع دواءً. يحتوي معظم أجزاء هذا النبات على فئة من المستحضر القلوانيات. يهدف هذا البحث لتعريف فئة من المستحضر القلوانيات الموجودة في المستخرج الخام عند القلوانيات باستخدام آلة UPLC-MS، و تجريب النشاط المضاد للسرطان من المستخرج الخام، المستخرج الخام من القلوانيات وعزل القلوانيات من نتيجة فصل KLTP علي خلايا سرطان الثدي T47D.

طريقة الإستخراج المستخدم هو إستخراج التغميس مع مسيل الميثانول والتقسيم مع خلات الإيثيل. يجرب المستخرج من نتيجة التغميس و التقسيم بإختبار المواد الكيميائية النباتية. يعرف المستخرج الخام في القلوانيات من نتائج التقسيم باستخدام أداة UPLC-MS. كان تفصيل الفيئة من المستحضر النشط مع KLTA يهدف ليعرف أفضل شاطئ. نتائج التقسيم الذي تم الحصول عليه تفصل باستخدام KLT Preparatif مع أفضل المسيل من نتائج تفصيل KLTA وهي الكلوروفورم: الميثانول (٩,٥:٠,٥). تعزيل القلوانيات من نتائج KLT Preparatif الذي تم الحصول عليه يجرب نشاط المضاد للسرطان على خلايا سرطان الثدي T47D بكيفية *in-vitro* بطريقة MTT.

النتيجة التي تتواجد من نتائج القياس على قدر الماء هي ٦,٤١%. رانديمين من نتائج التغميس هو ١٢,٤٤%. النتيجة من رانديمين في التقسيم هي ١,١٣٦%. وفقا علي التحليل الذي يستخدم آلة UPLC-MS فيظن وجود الفيئة من المستحضر القلوانيات تريغونولين، بربارين، فيناجيتين، ن - متيل نيكوتينيوم، ففتيسين، ايفوسانتين، ٤-امينونافتاليميد، فالمتين، داوراسين، لسرغل و جاتراريزين. وأما نتائج النقل من تعزيل القلوانيات التي تفصل مع KLTP هي ٤,٦ ميليغرام. النتيجة من تجريب النشاط على مضاد السرطان بالمستخرج الخام، الإستخراج الخام من القلوانيات و تعزيل القلوانيات هي ٩٢٠,٦٧٠ µg/mL

IC<sub>50</sub> ٣٠٣,٠٦١ µg/mL, ٦١١,٧٠٩ µg/mL,

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Kanker merupakan salah satu penyakit yang paling ditakuti, hal ini dikarenakan proses penyembuhan dan pengobatannya yang sangat mahal. Faktor eksternal dari penyakit kanker diantaranya adalah radiasi, radikal bebas, sinar ultra violet, virus, infeksi, rokok dan bahan kimia dari makanan. Sementara faktor internal yang menyebabkan kanker yaitu faktor genetik atau bawaan, faktor hormonal, faktor kejiwaan, dan kekebalan tubuh. Penyebab kematian ketiga di negara-negara berkembang adalah kanker. Menurut WHO, tahun 2015 diperkirakan ada 9 juta orang meninggal karena kanker dan tahun 2030 diperkirakan meningkat menjadi 11,4 juta kematian yang disebabkan sel kanker. Jumlah penderita kanker tiap tahunnya meningkat hingga mencapai 6,25 juta orang dan dua pertiganya berasal dari Negara berkembang seperti Indonesia (Sukmarianti, 2013).

Jenis kanker yang mematikan dan ditakuti oleh perempuan adalah kanker payudara, yang mana kanker payudara merupakan penyebab kematian yang cukup tinggi pada wanita di dunia. Pada umumnya kanker payudara menyerang kaum wanita, kemungkinan menyerang kaum laki-laki sangat kecil yaitu 1: 1000 (Mulyani, 2013). Setiap tahun terdapat lebih dari 1,1 juta wanita penderita kanker payudara yang baru dengan 410.000 kematian (1,6% dari seluruh kematian wanita di dunia). Oleh karena itu, kanker payudara ini telah menjadi masalah penting dalam dunia kesehatan dengan peningkatan lebih dari 5% setiap tahunnya (Andreson, dkk., 2006).



Penyembuhan kanker secara medis biasanya dilakukan dengan kemoterapi, operasi dan radioterapi, namun masyarakat Indonesia sudah mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat sebagai salah satu upaya penyembuhan dari berbagai penyakit termasuk penyakit kanker. Pengembangan pengetahuan membuat tanaman berkhasiat sebagai obat semakin banyak dijadikan objek penelitian. Tanaman-tanaman yang baik yang bisa dijadikan sebagai obat merupakan salah satu bukti nikmat Allah yang ada di bumi. Sesuai dengan firman Allah dalam surat Thaha: 53 berikut ini :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ  
 أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

*Artinya : “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan -jalan dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis- jenis dari tumbuh -tumbuhan yang bermacam- macam (Q.S. Thaha : 53)”*.

Berdasarkan tafsir al Maraghi (1992) Allah menurunkan air hujan dari langit, lalu dengan air hujan tersebut Allah SWT menumbuhkan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan yang baik, yang masam ataupun yang manis. Allah juga mengeluarkannya berbagai manfaat, warna aroma dan bentuk yang cocok untuk umat manusia dan cocok untuk hewan. Hal ini merupakan nikmat Allah SWT yang diberikan kepada setiap makhluk ciptaannya. Salah satu tanaman yang bermanfaat sebagai obat adalah tumbuhan anting-anting.

Anting-anting merupakan gulma yang sering dijumpai dipinggir jalan. Keberadaan yang melimpah dan gampang ditemui inilah yang membuat peluang

tanaman ini dapat ditingkatkan nilai gunanya. Sebagai tanaman yang dapat mengobati penyakit, tanaman anting-anting digunakan hanya sebatas pada khasiat turun-temurun saja. Aktivitas didalam tanaman berkaitan erat dengan metabolit sekunder yang ada dalam tanaman tersebut. Berdasarkan penelitian sebelumnya, anting-anting mengandung senyawa metabolit sekunder dimana salah satu senyawa metabolit sekunder tersebut adalah alkaloid.

Kandungan senyawa yang terdapat didalam tanaman anting-anting didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Hayati, dkk.(2012) uji fitokimia ekstrak etil asetat tumbuhan anting-anting hasilnya terdapat senyawa alkaloid, tanin, triterpenoid. Tukiran, dkk.,(2014) melakukan uji skrining fitokimia terhadap daun anting - anting ekstrak metanol terdapat senyawa alkaloid dalam jumlah yang besar dari pada metabolit sekunder lainnya. Muadifah (2013) ekstrak etanol 80 % tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) mengandung golongan senyawa alkaloid. Wijayakusuma (2012) didalam tanaman anting-anting mengandung senyawa alkaloid, *acalyphine* dan asam galat. Hutapea dalam Karsiwi (2003) penggunaannya antara lain sebagai obat penyakit mata, bronkhitis, tumor, jerawat, kudis, paru - paru dan eksim. Minarti, dkk.(2002) Ekstrak alkaloid secara umum dari beberapa jenis tanaman dilaporkan memiliki fungsi medis dalam bidang kesehatan, seperti *siamine* yang merupakan alkaloid pada *Cassia siamea* memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Kandungan senyawa alkaloid merupakan salah satu senyawa mayor yang terdapat didalam tumbuhan anting-anting.

Ekstrak senyawa aktif alkaloid tersebut diduga memiliki aktivitas sebagai antikanker. Senyawa alkaloid dalam tumbuhan banyak yang memiliki aktifitas antikanker seperti *vincristine* dan *vinblastine* (Dalimartha, 2004). Hal tersebut

didukung dengan adanya beberapa penelitian sebelumnya tentang uji toksisitas terhadap ekstrak senyawa aktif dalam tanaman anting-anting. Halimah (2010) melakukan uji fitokimia dan toksisitas *in vivo* dengan menggunakan metode BSLT pada tanaman Anting-anting, yang mana pada ekstrak etanol, kloroform, dan n-heksana didapatkan hasil  $LC_{50}$  berturut - turut 71,5390 ppm, 149,819 ppm dan 58,8791 ppm. Sriwahyuni (2010) melakukan uji fitokimia dan toksisitas pada tanaman anting-anting yang didapatkan hasil pada ekstrak etil asetat mengandung senyawa triterpenoid, tanin dan alkaloid dengan nilai  $LC_{50}$  21,006 ppm..

Pembuktian efek toksisitas yang dilakukan dalam penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode MTT. Uji MTT digunakan untuk menentukan parameter  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Metode *in vitro* memberikan beberapa keuntungan, antara lain dapat digunakan sebagai langkah awal dalam pengembangan suatu obat, merupakan metode yang cepat, hanya memerlukan sedikit senyawa, secara drastis dapat mengurangi penggunaan hewan laboratorium dan dapat memberikan informasi tentang potensi efeknya pada sel target manusia secara langsung. Sedangkan kelebihan menggunakan metode MTT adalah waktu yang dibutuhkan relatif cepat, sensitif, akurat, dan dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar serta hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan (Doyle dan Griffiths, 2000).

Beberapa penelitian juga pernah menggunakan metode MTT untuk menguji aktivitas antikanker pada sel kanker T47D. Salah satunya penelitian yang dilakukan Mulitiawati (2013) uji toksisitas ekstrak metanol daun benalu kelor

(*Helixanthera sessiliflora* (Merr.) Denser) memiliki potensi sebagai antikanker payudara T47D dengan nilai  $IC_{50}$  33,89 $\mu$ g/mL. Hasil uji fitokimia metabolit sekunder menunjukkan ekstrak metanol daun benalu kelor mengandung senyawa golongan alkaloid. Praveena, dkk.,(2014) Ekstrak kasar alkaloid dari tanaman *Toddalia asiatica*.L. mempunyai aktivitas antikanker yang kuat terhadap sel kanker hati (LO2) yang diujikan secara *in vitro*.

Sampai saat ini belum pernah dilakukan penelitian tentang uji aktivitas antikanker secara *in vitro* pada ekstrak tanaman anting-anting. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas anti kanker menggunakan metode MTT secara *in vitro* terhadap sel kanker payudara T47D. Penelitian ini menggunakan sampel kering tumbuhan anting- anting dan pemisahan senyawa aktif dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak pekat yang diperoleh dilakukan pemisahan senyawa alkaloid menggunakan metode ekstraksi cair-cair secara asam basa dengan menggunakan pelarut etil asetat. Selanjutnya ekstrak kasar alkaloid dilakukan uji fitokimia dan dilakukan identifikasi dengan menggunakan UPLC-MS. Kemudian dilakukan isolasi senyawa alkaloid dengan menggunakan KLT . Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antikanker terhadap sel kanker T47D secara *in vitro* pada ekstrak kasar, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Senyawa alkaloid apakah yang terkandung dalam ekstrak kasar alkaloid tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) berdasarkan hasil identifikasi menggunakan instrumentasi UPLC-MS?

2. Bagaimana aktivitas dari ekstrak kasar, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid tumbuhan anting-anting (*Acalypha indica* L.) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D?

### **1.3 Tujuan**

1. Untuk mengetahui golongan senyawa alkaloid sebagai senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kasar alkaloid tumbuhan anting-anting (*Acalypha indica* L.).
2. Untuk mengetahui aktivitas dari ekstrak kasar, ekstrak kasar alkaloid, dan isolat alkaloid tumbuhan anting-anting (*Acalypha indica* L.) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D.

### **1.4 Batasan Masalah**

1. Senyawa yang akan dianalisis dan diidentifikasi hanya alkaloid yang ada pada tumbuhan anting-anting (*Acalphy indica* L.), dan sampel yang digunakan didapat daridaerah Dinoyo Malang.
2. Ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol, dan penarikan senyawa alkaloid menggunakan metode ekstraksi cair-cair secara asam basa menggunakan pelarut etil asetat.
3. Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antikanker adalah *in vitro* pada sel kanker payudara T47D dengan metode MTT (microtetrazolium).
4. Tingkat sitotoksik ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  yang diukur menggunakan analisis probit SPSS.

5. Instrumen yang digunakan untuk analisis senyawa alkaloid dalam ekstrak kasar alkaloid adalah UPLC-MS.

### **1.5 Manfaat**

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang senyawa metabolit sekunder (alkaloid) yang memiliki aktivitas antikanker yang terkandung didalam tumbuhan anting-anting (*Acalypha indica* L.), sehingga kedepannya dapat dikembangkan oleh dunia farmasi sebagai obat anti kanker.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam

Tumbuhan merupakan karunia yang diberikan oleh Allah kepada manusia. Semua ciptaan Allah SWT tersebut dapat dimanfaatkan oleh manusia jika manusia tersebut berfikir. Anting-anting merupakan salah satu tumbuhan tingkat tinggi yang keberadaannya melimpah dan gampang dijumpai. Allah menjelaskan didalam Al-Quran bahwa telah menciptakan tumbuhan yang memiliki manfaat masing-masing. Terdapat beberapa ayat Al-Qur'an yang menjelaskan tentang tumbuhan, dimana salah satu ayat alquran tersebut terdapat dalam surat al An'am ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا خُجْرًا مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ

إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

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

Surat tersebut menjelaskan bahwa Allah menciptakan tumbuhan-tumbuhan melalui perantara air hujan yang diturunkan dari langit. Tumbuhan-tumbuhan tersebut memiliki keanekaragaman bentuk dan manfaat yang berbeda dari masing-masing tumbuhan, meskipun berasal dari tanah dan air yang sama (Ash-Shiddieqy, 2000). Anting-anting merupakan salah satu tumbuhan yang baik dimana tumbuhan ini banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan untuk dijadikan obat. Sebagaimana Firman Allah SWT dalam surat asy Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

*“Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”*

Allah menciptakan segala sesuatu tidak ada yang main-main. Melainkan semuanya itu diciptakan dengan hikmah yang agung dan tujuan yang mulia (al Qarni, 2008). Obat merupakan cara untuk menyembuhkan penyakit, berdasarkan hadist nabi Muhammad SAW yang diriwayatkan oleh Imam Bukhori dalam shahihnya, dari sahabat Abu Hurairah bahwasannya nabi bersabda,

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

*“Tidaklah Allah turunkan penyakit kecuali Allah turunkan pula obatnya”*

Hadist tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT maha adil dengan cara memberikan suatu penyakit beserta obatnya dan penyakit tersebut akan sembuh sesuai kehendak Allah SWT (Fatah, 2010). Manusia harus berusaha untuk mengembangkan ilmu pengetahuan dengan cara melakukan penelitian untuk



mengembangkan tanaman obat yang bermanfaat dalam dunia medis sebagai bentuk wujud perenungan diri akan nikmat yang diberikan Allah.

## 2.2 Klasifikasi Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.)

Tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) merupakan tanaman liar yang sangat umum ditemukan dan tumbuh di pinggir jalan, di lereng gunung maupun lapangan berumput pada daerah tropis (Muslimah, 2008). Tanaman anting-anting merupakan tumbuhan perdu semusim tumbuh tegak dan berambut, tinggi 30 – 50 cm. batangnya bercabang dengan garis memanjang, letak daun berseling, panjang daun 2,5 – 8 cm, lebar daun 1,5 – 3,5 cm. Bunganya berbentuk kecil-kecil keluar dari ketiak daun, bentuknya mengerucut seperti anting anting sehingga disebut tumbuhan anting anting (Wijayakusuma,2006).

Klasifikasi tanaman anting-anting adalah sebagai berikut (Kartesz dalam Halimah 2000):

Kerajaan	: <i>Plantae</i>
Subkerajaan	: <i>Tracheobionta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsysda</i>
Sub Kelas	: <i>Rosidae</i>
Bangsa	: <i>Euphorbiales</i>
Suku	: <i>Euphorbiaceae</i>
Marga	: <i>Acalipha</i>
Jenis	: <i>Acalypha indica</i> Linn



Gambar 2.1 Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.)

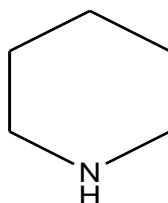
Tanaman anting-anting di beberapa daerah dikenal dengan sebutan cekamas (Melayu) Lelatang (Jakarta), rumput kokosongan (Sunda), rumput bolong bolong (Jawa) (Muslimah, 2008). Nama asing tanaman ini adalah Tie xian (Cina), copperleaf herb (Inggris). Kandungan kimia tanaman anting-anting adalah acalypine, glikosida, inositol metileneter, triacetomamine dan minyak atsiri (Azmahani, dkk, 2002). Halimah (2010) menyebutkan bahwa daun tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) mengandung saponin, tannin, flavonoid, acalypine, dan minyak atsiri. Marga *Acalypha* menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid, amida, glukosida dan sterol (Wei-Feng., dkk, 1994). Menurut Wijayakusuma (2006) tanaman anting anting mengandung senyawa alkaloid, *Acalyphadan* dan asam galat.

### 2.3 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. Hampir lebih dari 5000 senyawa alkaloid yang ditemukan dalam tumbuhan mempunyai keaktifan fisiologis tertentu. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom

nitrogen yang biasanya bersifat basa dan sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Lenny, 2006). Alkaloid biasanya berbentuk garam organik dalam tumbuhan berbentuk padat dan berkilat serta kebanyakan tidak berwarna. Keberadaan alkaloid di dalam daun dan buah segar biasanya memberikan rasa pahit di lidah. Alkaloid memiliki efek dalam bidang kesehatan berupa pemicu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit, anti mikroba, obat penenang, obat penyakit jantung dan lain-lain (Robinson,1995).

Alkaloid dapat juga berbentuk cair, misalnya nikotin dan konin. Pada umumnya alkaloid hanya larut dalam pelarut organik. Kebasaan pada alkaloid menyebabkan senyawa tersebut mudah mengalami dekomposisi terutama oleh panas dan sinar dengan adanya oksigen. Hasil dekomposisi seringkali berupa N-oksida (Lenny,2006). Alkaloid dapat dipisahkan dari sebagian besar komponen tumbuhan yang lain berdasarkan sifat basanya. Oleh karena itu, golongan senyawa ini sering diisolasi dalam bentuk garamnya dengan suatu pelarut HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kristanti, dkk., 2008).



Gambar 2.2 Contoh struktur senyawa Alkaloid (Robinson 1995)

Sebagian besar alkaloid mempunyai kerangka dasar polisiklik termasuk cincin heterosiklik nitrogen serta mengandung substituen yang tidak terlalu bervariasi. Atom nitrogen alkaloid hampir selalu berada dalam bentuk gugus amin

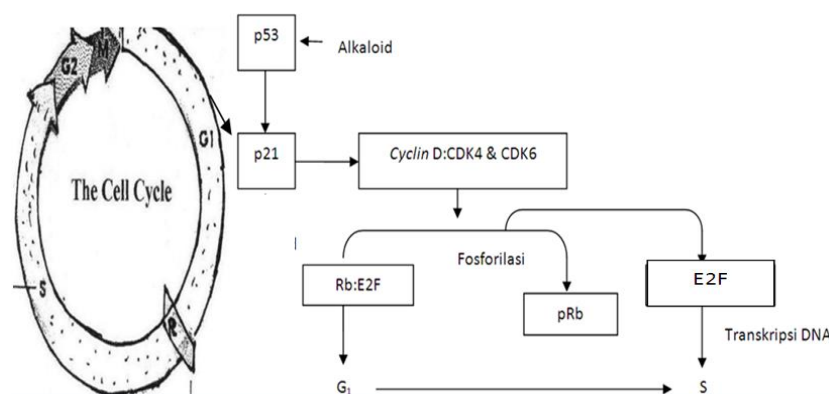
(-NR<sub>2</sub>) atau gugus amida (-CO-NR<sub>2</sub>) dan tidak pernah dalam bentuk gugus nitro (NO<sub>2</sub>) atau gugus diazo. Sedangkan substituen oksigen biasanya ditemukan sebagai gugus fenol (-OH), metoksi (-OCH<sub>3</sub>) atau gugus metilendioksi (-O-CH<sub>2</sub>-O) substituen oksigen ini dan gugus N-metil merupakan ciri sebagian besar alkaloid (Lenny, 2006).

#### **2.4 Senyawa Alkaloid Sebagai Antikanker**

Antikanker adalah senyawa kemoterapeutik yang digunakan untuk pengobatan tumor atau kanker. Obat antikanker sering dinamakan pula sebagai obat sitotoksik, sitostatik atau antineoplasma. Antikanker bekerja dengan cara mempengaruhi metabolisme asam nukleat terutama DNA, atau biosintesis protein (Obie, 2011). Tumbuhan seperti benalu (*Macrosalen cochinchinesis*), buah makasar (*Bruea javanica* (L) Merr.), dan tapak dara (*Catharthus roseus*) mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder jenis alkaloid yang memiliki potensi sebagai antikanker. Senyawa alkaloid yang berpotensi sebagai antikanker pada tumbuhan benalu yaitu  $\beta$ -*amyrin*, yang berfungsi menghambat S<sub>180</sub> dan sel kanker JTC-26. Sedangkan pada buah makasar, alkaloid yang berpotensi sebagai antikanker yaitu jenis brucamarine dan yatamine, dimana alkaloid jenis ini dapat mengobati kanker saluran pencernaan, kanker payudara, dan kanker leher rahim. Sementara ada tumbuhan tapak dara mengandung 70 jenis alkaloid, dimana ada beberapa jenis yang berpotensi sebagai antikanker yaitu vinblastine dan vincristine yang dapat digunakan untuk mengobati leukemia limfotik akut (LLA), leukemia monostik akut (LMA), kanker kelenjar getah bening, dan lainnya (Fowler, 1983).

Alkaloid vinca seperti vinblastine dan vinkristin mempunyai zak aktif yang dapat menghambat sel kanker leukemia maupun sel kanker lainnya. Vinkristin mempunyai aktivitas lebih besar dibandingkan vinblastin karena mempunyai kemampuan penetrasi ke dalam sel kanker yang lebih baik (Fowler, 1983). Penggunaan obat antikanker dimulai dengan ditemukannya mustard nitrogen.

Penelitian yang dilakukan Ariati (2015) Ekstrak kloroform daun *A.flava* diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar  $122 \mu\text{g/mL}$  dalam menghambat sel kanker kolon WiDr, dugaan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kloroform adalah senyawa alkaloid isokuinolin seperti senyawa berberin, jatrorozin dan palmatin. Isparning, dkk (2015) menyatakan senyawa berberin yang termasuk dalam golongan senyawa alkaloid yang terkandung dalam daun *Arcangelisia flava* memiliki potensi antikanker terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $135,74 \pm 16,82 \mu\text{g/mL}$ . Senyawa alkaloid merupakan senyawa antikanker yang dapat menghambat pertumbuhan sel dengan cara memblokir fase  $G_1$  pada siklus sel. Pada fase tersebut sel akan tumbuh dan melakukan persiapan untuk proses sintesis DNA. Berikut Gambar 2.3 yang menunjukkan siklus sel pada fase  $G_1$ .



Gambar 2.3 Siklus pembelahan sel transisi fase  $G_1$  ke S (Asmuddin, 2004)

Faktor utama pada fase  $G_1$  ke fase S adalah terbentuknya kompleks *cyclin* D-CDK4 dan *cyclin* D-CDK6. Kompleks *cyclin* D-CDK4 dan *cyclin* D-CDK6 akan masuk ke dalam inti dan akan terfosforilasi terhadap kompleks Rb-E2F menjadi protein *Retino-blastoma* (pRb) dan E2F. Kompleks Rb-E2F dapat menghambat transkripsi dari beberapa gen yang terlibat dalam fase S (Asmuddin, 2004). pRb merupakan penghambat transkripsi dan merupakan gen penekan tumor karena keberadaannya akan menonaktifkan E2F yang merupakan faktor transkrip yang akan memicu terjadinya transkrip gen yang akan digunakan pada fase S (Murti, dkk., 2007).

*Cyclin Dependent Inhibitor* (CDI) p53 dan p21 merupakan faktor penghambat siklus sel kanker. CDI berfungsi untuk menghambat pembentukan kompleks *cyclin* D-CDK4 dan *cyclin* D-CDK6. Jika kedua *inhibitor* tersebut meningkat maka tidak akan terbentuk kompleks *cyclin* D-CDK4 dan *cyclin* D-CDK6, sehingga kompleks Rb-E2F tidak akan terfosforilasi (Murti, dkk., 2007).

Senyawa alkaloid sebagai senyawa antikanker akan memblokir fase  $G_1$  melalui peningkatan p53 (Asmuddin, 2004). Jika p53 sebagai supresor kanker meningkat maka *inhibitor* p21 juga meningkat. Peningkatan *inhibitor* tersebut akan menghambat sel kanker untuk masuk ke fase S yang menyebabkan kompleks *cyclin* D-CDK4 dan *cyclin* D-CDK6 tidak terbentuk, sehingga kompleks Rb-E2F tidak terfosforilasi. Tidak adanya fosforilasi terhadap kompleks tersebut menyebabkan E2F nonaktif sehingga gen tidak mampu mentranskripsikan DNA dan akan tetap berada pada fase  $G_1$ . Sel yang berhenti akan masuk ke  $G_0$  dan diperbaiki. Jika sel tidak dapat diperbaiki maka sel akan mengalami apoptosis (Murti, dkk., 2007).

## 2.5 Metode Ekstraksi Senyawa Alkaloid pada Tanaman Anting-anting

Ekstraksi adalah salah satu metode pemisahan suatu senyawa dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Brian, 1989). Pemilihan pelarut harus sesuai dengan tujuan yang ingin dicapai. Terdapat dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut, yaitu pelarut yang mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut tidak berbahaya (Bernasconi, 1995).

Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Semakin besar konstanta dielektrik, maka akan semakin besar kepolaran pelarut tersebut. Prinsip dasar dari metode ekstraksi adalah *like dissolve like* artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar (Khopkar, 2008).

Tabel 2.1 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut

Jenis pelarut	Konstanta dielektrikum	Tingkat kelarutan dalam air	Titik didih (°C)
Heksana	1,9	TL	68,7
Petroleum eter	2,28	TL	60
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Metil asetat	6,68	S	57
Metil klorida	9,08	S	39,75
Propanol	20,1	L	97,22
Etanol	24,30	L	78,5
Metanol	33,60	L	64
Air	78,4	L	100

**Keterangan:** TL = tidak larut; S = sedikit; L = larut dalam berbagai proporsi  
 Sumber: Fesenden dan Fesenden (1997), dan Mulyono (2009)

Pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam porses isolasi senyawa organik bahan alam. Hal ini karena dapat

melarutkan senyawa metabolit sekunder secara maksimal. Salah satu pelarut alkohol yang digunakan adalah metanol. Metanol memiliki beberapa kelebihan sebagai pelarut ekstraksi karena termasuk pelarut universal yang dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang bersifat polar, semi polar dan non polar, menghambat kerja enzim, memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut, mengendapkan protein, lebih selektif, dan titik didih pelarut metanol sangat rendah yaitu 64°C, selain itu dikhawatirkan alkaloid masih terikat dengan gugus gula sehingga menggunakan pelarut polar. Kristanti (2008).

Metode ekstraksi yang digunakan untuk mengekstrak bahan alam dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Metode ekstraksi meserasi dilakukan dengan merendam sampel dalam pelarut organik. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif tersebut akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif yang ada didalam sel, sehingga larutan yang terpekat akan terdesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar dan di dalam sel (Cheong, 2005). Metode meserasi merupakan metode ekstraksi yang paling mudah dan cepat. Prinsip dari metode ini adalah penghancuran dan perendaman bahan dalam pelarut. Keuntungan dari metode ini tidak membutuhkan suhu tinggi sehingga cocok untuk mengekstrak bahan yang tidak tahan panas (komposisi volatil). Kelemahan metode ini adalah kebutuhan bahan pelarut yang cukup banyak dibandingkan dengan metode lain (Meloan, 1999).

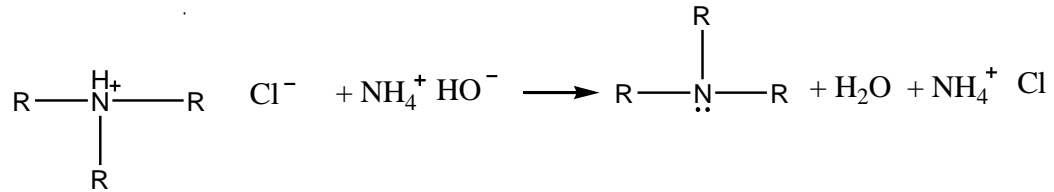
Penelitian ini juga menggunakan metode ekstraksi cair-cair secara asam basa dalam pengambilan senyawa alkaloid. Ekstraksi cair-cair merupakan



pemisahan komponen kimia diantara dua fase pelarut (pelarut organik dan air) yang tidak saling bercampur, dimana sebagian komponen yang larut pada fase pertama dan ada sebagian yang akan 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).

Salah satu metode penarikan senyawa alkaloid adalah dengan disekat pada pH tertentu dengan menggunakan pelarut organik (*Asas Keller*). Prinsip dari metode ini yaitu alkaloida dalam sampel sebagai bentuk garam dari proses pengasaman yang akan dibebaskan dari ikatan garam menjadi alkaloida bebas. Oleh karena itu ditambahkan dengan basa lain yang sifatnya lebih kuat dari pada basa alkaloid. Alkaloid yang bebas dapat diekstraksi menggunakan pelarut tertentu, misalnya menggunakan etil asetat. Alkaloid biasanya diperoleh dengan cara mengekstrak bahan menggunakan air yang telah diasamkan, proses pengasaman dilakukan dengan penambahan HCl. Hal tersebut bertujuan untuk menarik alkaloid dan membentuk garam alkaloid amina serta memperbesar kelarutan alkaloid didalam air. Alkaloid amina yang bereaksi dengan asam kuat akan membentuk garam alkilamonium. Jenis Reaksi ini digunakan untuk memisahkan amina dari zat netral maupun zat yang larut dalam air yang bersuasana asam. Garam alkaloid dari hasil pengasaman akan dibasakan dengan penambahan  $\text{NH}_4\text{OH}$ , sehingga garam alkaloid membentuk basa bebas alkaloid

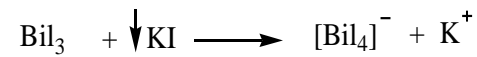
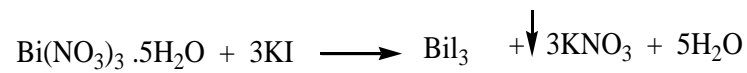
(Robinson, 1995). Berikut reaksi alkaloid dengan basa secara umum dapat dilihat pada reaksi berikut:



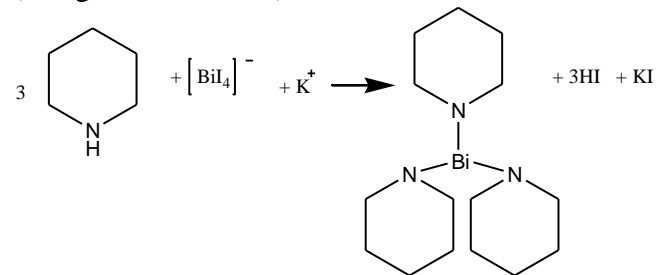
Gambar 2.4 Reaksi Alkaloid dengan basa (Titis, 2013)

## 2.6 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid dengan Menggunakan Reagen Dragendorff dan Mayer

Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa didalam tumbuhan (Lenny, 2006). Uji fitokimia senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan uji Dragendorff dan Mayer. Prinsip dasar dari pengujian dengan menggunakan reagen Dragendorff adalah senyawa alkaloid dapat mengalami kompleks logam dengan ditandai terbentuknya endapan jingga karena bereaksi dngan tetraiodobismut. Pereaksi Dragendorf jika disemprotkan pada plat KLT yang mengandung senyawa alkaloid maka akan terbentuk warna jingga pada plat dan berwarna kuning orange jika dideteksi dibawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm (Widodo, 2007). Sedangkan prinsip kerja dari uji Mayer adalah senyawa alkaloid dapat mengalami kompleks logam dengan ditandai adanya endapan putih kekuningan karena bereaksi dengan tetraiodomerkurat (Robinson, 1995). Reaksi dugaan antara alkaloid dengan reagen Dragendroff ditunjukkan pada Gambar 2.5



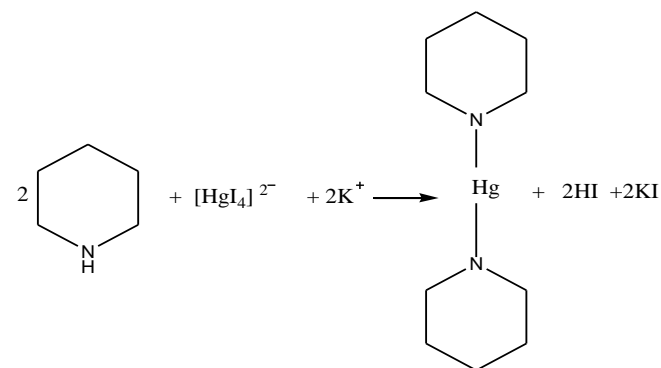
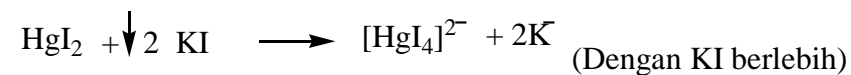
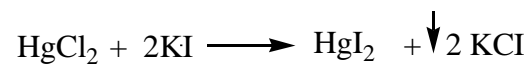
(Dengan KI berlebih)



kompleks logam dengan alkaloid (endapan jingga)

Gambar 2.5. Reaksi dugaan alkaloid dengan reagen Dragendroff (Rahmah, 2014)

Reaksi dugaan yang terjadi antara alkaloid dengan reagen Mayer ditunjukkan pada gambar 2.6



Kompleks logam dengan alkaloid (endapan putih kekuningan)

Gambar 2.6 Reaksi dugaan alkaloid dengan pereaksi Mayer (Rahmah, 2014)

Mamidala,dkk (2014) telah melakukan uji fitokimia pada tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) yang diekstrak dengan metanol, aseton, etil asetat, kloroform, n-heksan, dan diperoleh data seperti pada Tabel 2.2

Tabel 2.2 Hasil Uji Fitokimia Tanaman Anting-anting (Mamidala,dkk 2014)

<b>Golongan Senyawa</b>	<b>Pelarut</b>				
	Metanol	Aseton	Etil asetat	Kloroform	n-heksana
<b>Alkaloid</b>	+++	+++	+++	+++	+++
Protein	+++	+	++	+++	+++
Glikosida	+++	+++	+++	+++	+++
Saponin	–	–	–	–	–
Fenol	–	+	–	++	+++
Karbohidrat	+++	+++	+++	++	++

Sriwahyuni, (2010) telah melakukan uji fitokimia pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menggunakan pereaksi mayer dan dragendorf. Diperoleh ekstrak positif senyawa alkaloid yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih kekuningan dan endapan jingga. Sementara Hayati, dkk., (2012) melakukan uji fitokimia dengan KLT pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menggunakan pereaksi Dragendorf. Pereaksi Dragendorf disemprotkan pada plat dan diperoleh warna kuning orange pada spot yang positif senyawa alkaloid. Selain itu, Rahmah (2014) melakukan uji fitokimia senyawa alkaloid dengan reagen pada fraksi etil asetat tanaman anting-anting menggunakan pereaksi mayer dan dragendorf. Diperoleh ekstrak positif senyawa alkaloid yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih kekuningan dan endapan jingga.

## 2.7 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis atau disingkat KLT adalah salah satu jenis kromatografi yang bertujuan untuk mendapatkan isolat senyawa yang diinginkan dengan menggunakan eluen terbaik. Menurut (Gritter, 1991) kromatografi lapis tipis adalah kromatografi serapan, dimana sebagai fasa tetap (diam) berupa zat padat yang disebut adsorben (penyerap) dan fasa gerak adalah zat cair yang disebut larutan pengembang. Penyerap untuk KLT ialah silika gel, alumina, kiselgur, dan selulosa.

Kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan tujuannya dibedakan menjadi 2 yaitu untuk tujuan analitik dan untuk tujuan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisa senyawa organik dalam jumlah kecil. Sedangkan KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya, selanjutnya fraksi tersebut dikumpulkan menjadi satu dan digunakan untuk analisa berikutnya (Sastrohamidjojo, 2005).

Untuk identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan  $R_f$ . Harga  $R_f$  untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga  $R_f$  standart. Harga  $R_f$  dapat dihitung dengan rumus berikut (Sastrohamidjojo, 2005):

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Eluen yang dipilih pada penelitian ini disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang akan dianalisis. Berdasarkan penelitian Lutfillah (2008) menyatakan bahwa eluen terbaik untuk pemisahan alkaloid dengan KLT dari hasil

isolat kulit batang angret adalah campuran metanol: kloroform (0,5:9,5) dengan pereaksi dragendroff yang menghasilkan 8 noda yang memiliki Rf antara 0,22-0,85 dengan 5 noda berwarna biru dan 2 noda berwarna kuning serta 1 noda berwarna merah setelah disinari dengan lampu UV. Selain itu Husna (2011) menganalisis ekstrak etil asetat tanaman anting-anting dengan menggunakan KLT dengan fase gerak kloroform:metanol (9,5:0,5) pendeteksi UV 366 nm serta penampakan noda dragendroff dan dihasilkan senyawa alkaloid dengan Rf 0,37-0,97. Penelitian lainnya Rahmah (2014) menyatakan bahwa eluen terbaik untuk memisahkan alkaloid dengan KLT dari tanaman anting-anting adalah campuran kloroform:metanol (9,5:0,5) dengan pendeteksi UV 254 nm dan 366 nm serta dengan pereaksi dragendroff menghasilkan 7 noda dengan memberikan nilai Rf 0,21-0,92. Muhtadi (2008) mengekstrak alkaloid kulit kayu mimba dan memisahkan fraksi-fraksi senyawa dengan menggunakan metode KLT dengan pendeteksi UV 254 dan 366 nm dengan beberapa penampakan noda dengan menggunakan eluen kloroform :etil asetat (8:2) dengan nilai Rf 0,5 (fraksi non polar) dan Rf 0,55 dan 0,65 (fraksi semi polar) adalah senyawa alkaloid.

## 2.8 Uji Toksisitas

Uji sitotoksik merupakan uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendekati tingkat ketoksikan suatu senyawa. Sistem tersebut merupakan uji kualitatif dengan menetapkan kematian sel. Dasar dari percobaan tersebut antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel (Anggraini, 2008).

Uji toksisitas dapat dilakukan dengan menggunakan hewan coba secara *in vivo* atau menggunakan kultur sel secara *in vitro*. Tetapi, metode yang sering digunakan adalah *in vitro* dengan menggunakan kultur sel, sedangkan prinsip dasar menumbuhkan sel secara *in vitro* adalah merancang sistem kultur agar menyerupai keadaan *in vivo*. Sel yang akan diteliti dari jaringan asalnya, kemudian didapatkan dalam wadah kultur untuk mendapatkan tempat pertumbuhan dan nutrisi yang cukup pada temperature 37° C dan pH lingkungan yang terjaga.

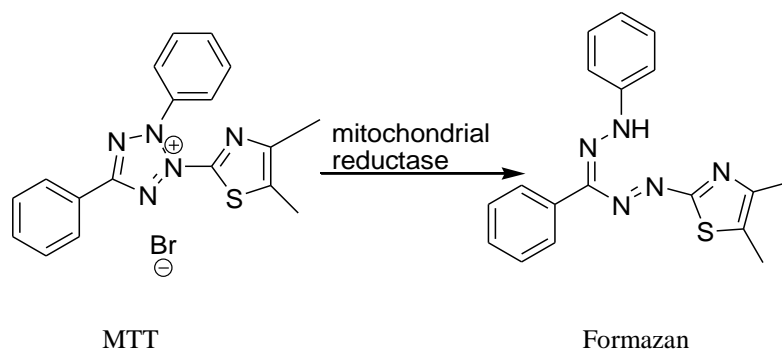
Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter IC<sub>50</sub> (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga IC<sub>50</sub> maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel. 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, 2008).

### **2.8.1 Uji Aktivitas Secara *In Vitro***

Salah satu metode yang digunakan untuk analisis sel kanker secara *in vitro* adalah metode MTT. Metode uji MTT memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan. Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. Uji MTT merupakan uji yang sensitif, reaksi MTT

merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan (Basmal, 2009). Prinsip uji MTT adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan kemampuan enzim mitokondria reduktase pada mitokondria dalam mereduksi garam Methylthiazol Tetrazolium (MTT) membentuk kristal formazan berwarna biru. Konsentrasi formazan yang berwarna biru dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosman, 1983).

Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup, sehingga jika intensitas warna biru semakin besar, maka jumlah sel hidup semakin banyak (Mosman, 1983). Absorbansi larutan berwarna ini kemudian dapat diukur menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang antara 500 dan 600 nm, yang mana semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Reaksi reduksi MTT dapat dilihat pada Gambar 2.7 (Meiyanto, dkk., 1999):



Gambar 2.7 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Meiyanto, 1999)



## 2.9 Kanker Payudara

Karsinoma payudara merupakan salah satu tumor ganas paling sering ditemukan pada wanita. Perubahan patologi yang terjadi di dalam sel dan jaringan tubuh sebagai akibat kanker yang menyebar, penyebarannya melalui darah dan pembuluh limfe ke daerah lain dari tubuh (Port & Matfin, 2005).

Kanker payudara ditandai dengan pertumbuhan sel yang abnormal pada jaringan payudara seseorang. Payudara wanita terdiri dari lobulus (kelenjar susu), duktus (saluran susu), lemak dan jaringan ikat, pembuluh darah dan *limfe*. Sebagian besar kanker payudara bermula pada sel-sel yang melapisi duktus (kanker duktal), beberapa bermula di lobulus (kanker lobular), serta sebagian kecil bermula di jaringan lain (Ellis, E.O., dkk, 2003).

### 2.9.1 *Cell Line* Kanker Payudara T47D

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall et al., 2003). Sel kanker payudara T47D merupakan protein p53 yang termutasi (Schafer dkk., 2000). Media yang digunakan pada sel T47D adalah *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 serum. Media RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum mengandung hormon pertumbuhan sel, albumin merupakan protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral merupakan kofaktor enzim. Seluruh komponen dalam media RPMI tersebut berguna untuk memberikan

nutrisi yang cukup pada sel untuk tetap bertahan hidup dan memperbanyak diri (Amalina, 2008).

### **2.10 *Microplate Reader (ELISA Reader)***

*Microplate reader* adalah suatu spektrofotometer yang disusun untuk membaca lempeng mikro (*mikroplate*). *Microplate reader* menggunakan prinsip spektrofotometri yang sama seperti metode konvensional, tetapi dapat menghasilkan peningkatan jumlah sampel yang dianalisa (Heredia, dkk., 2006). Perbedaan antara spektrofotometer konvensional dan *microplate reader* terletak pada panjang gelombang yang dapat digunakan untuk analisa. Spektrofotometer konvensional dapat melakukan pembacaan pada berbagai macam panjang gelombang, sedangkan *microplate reader* memiliki filter atau kisi-kisi difraksi yang membatasi rentang panjang gelombang yang digunakan dalam ELISA, umumnya panjang gelombang yang digunakan antara 400 sampai 750 nm. Beberapa *microplate reader* bekerja dalam rentang ultraviolet dan melakukan analisis antara 340 sampai 700 nm (World Health Organization, 2008).

### **2.11 Identifikasi Senyawa dengan LC-MS (*Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*)**

Kromatografi merupakan salah satu teknik pemisahan yang mana solut atau zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan ini diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam. Penggunaan kromatografi cair dapat berjalan dengan baik dipengaruhi berbagai macam diantaranya kondisi operasional seperti fasa gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel (Gandjar dan Rohman, 2008).

*Mass spectrometer* (MS) merupakan alat yang dapat memberikan informasi mengenai bobot molekul dan struktur senyawa organik. Selain itu, alat ini juga dapat mengidentifikasi dan menentukan komponen-komponen suatu senyawa tanpa melibatkan interaksi antara REM, akan tetapi melibatkan elektron dengan kecepatan tinggi atau energi tinggi (70 eV) dalam vakum tinggi (Sastrohamidjojo, 2005). Pada LC-MS, sampel yang telah dipisahkan dalam kolom akan diuapkan pada suhu tinggi, kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan ( $m/z$ ), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik (Maryam, 2007).

Spektrum massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda tingginya. Bentuk spektrumnya tergantung dari sifat molekul, potensial ionisasi, mudah tidaknya sampel tersebut dapat menguap, dan konstruksi alat. Untuk dapat menghasilkan spektrum massa, dalam proses ionisasi berkas elektron dipergunakan minimal 7-15 mV (Khopkar, 2008).

Metode spektroskopi massa berbeda dengan metode spektroskopi yang lain. Dalam spektrometer ini, suatu sampel dalam keadaan cair akan ditabrak atau ditembak oleh elektron yang berenergi tinggi. Penembakan tersebut akan menyebabkan lepasnya sebuah elektron dari suatu sampel membentuk suatu ion organik. Ion yang dihasilkan oleh penembakan elektron tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen fragmen kecil, baik berbentuk radikal maupun dalam bentuk ion positif dan negatif. Dalam sebuah spektroskopi massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif akan dideteksi oleh rekorder (Supratman, 2010).

Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi dengan detektor spektrometer massa.

Penggunaan LC-MS untuk penelitian bio analisis dimulai pada akhir 1980-an.

Adapun kelebihan dari teknologi LC-MS sebagai berikut:

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor.
2. Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spectrometer masa klasik, penerapan LC-MS tidak terbatas untuk molekul volatile (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.
3. Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.
4. Kaya informasi. Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter (Michael dkk dalam Ginting, 2012)

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Juli 2016 di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Kimia Analisis Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan diantaranya blender, pisau, ayakan 100 mesh, oven, loyang, cawan penguap, desikator, *neraca* analitik, penjepit kayu, gelas arloji, spatula, erlenmeyer 500 mL, *aluminium foil*, *shaker incubator*, gelas ukur 100 mL, *beaker glass* 100 mL, *shaker*, kertas saring, klem dan statif, pengaduk gelas, penyaring *buchner*, corong pisah, pipet ukur 10 mL, bola hisap, *rotary evaporator*, plat silika gel GF<sub>254</sub>, bejana pengembang, lampu UV, mikroskop, botol vial, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, *vortex*, *sentrifuge*, pipet ukur 5 mL, mikropipet 200, 1000  $\mu$ L, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, *96-well plate*, *Conical Tube*, *Yellow tip*, *Blue tip*, *Culture Dish*, *Hemocytometer*, *ELISA reader*, instrument UPLC-MS.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman anting-anting, metanol, aquades, etil asetat, larutan HCl 2 M, NH<sub>4</sub>OH, HCl 2%, reagen

Dragendoff, reagen Mayer, kloroform, gas N<sub>2</sub>, PBS, tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25 %), media kultur RPMI, DMSO, MTT 5 mg/mL (50 mg MTT dan 10 mL PBS), SDS 10 % dalam 0,1 N HCl.

### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini bersifat pengujian eksperimental di laboratorium. Langkah pertama tumbuhan anting anting dibersihkan, kemudian dikeringkan dan diblender serta dihitung kadar airnya. Selanjutnya dilakukan ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak pekat yang diperoleh dilakukan pemisahan senyawa alkaloid kasar menggunakan metode ekstraksi cair-cair secara asam basa dengan menggunakan pelarut etil setat. Ekstrak kasar alkaloid diidentifikasi dengan menggunakan reagen (uji fitokimia) dan menggunakan instrumen UPLC-MS. Pemisahan senyawa aktif dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis untuk memperoleh isolat alkaloid. Kemudian ekstrak pekat metanol, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid dilakukan pengujian terhadap sel kanker payudara T47D. kemudian dilakukan analisis data.

### **3.4 Tahapan Penelitian**

Adapun tahapan dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut:

1. Persiapan sampel
2. Analisis kadar air
3. Ekstraksi secara maserasi dan penarikan senyawa alkaloid
4. Uji fitokimia senyawa alkaloid dengan penambahan reagen
5. Identifikasi menggunakan instrumen UPLC-MS
6. Pemisahan senyawa aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis

- a. Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)
  - b. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)
7. Uji Aktivitas Antikanker secara *in vitro* terhadap sel kanker payudara T47D
  8. Analisis Data.

### 3.5 Cara Kerja

#### 3.5.1 Preparasi Sampel

Seluruh bagian tumbuhan anting-anting sebanyak 5 kg dibersihkan dari pengotornya, dicuci dengan air sampai bersih, ditiriskan dan dikeringkan tanpa terkena sinar matahari atau diangin-anginkan sehingga tidak ada kontak langsung dengan sinar matahari. Kemudian potong kecil – kecil dan dikeringkan dalam oven pada suhu  $40^{\circ} \text{C} \pm 5$  jam. Selanjutnya diblender sampai halus dan diayak menggunakan ayakan 100 mesh.

#### 3.5.2 Analisis Kadar Air

Sampel kering hasil dari preparasi, dianalisis kandungan kadar airnya dengan analisis gravimetri metode penguapan. Langkah awal yaitu dipanaskan cawan pada suhu  $105^{\circ} \text{C}$  selama  $\pm 15$  menit untuk menghilangkan kadar airnya. Kemudian didinginkan di dalam desikator selama 10 menit. Cawan ditimbang dan diulangi perlakuan sampai diperoleh berat konstan. Selanjutnya sampel ditimbang sebanyak 5 gram dan dipanaskan dalam oven pada suhu  $105^{\circ} \text{C}$  selama 1 jam untuk menguapkan air yang terkandung pada sampel. Sampel kering kemudian didinginkan dalam desikator selama  $\pm 15$  menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan:

a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

Hasil yang diperoleh diharapkan kadar air sampel kering tidak melebihi 10 % untuk menghindari tumbuhnya mikroba dan jamur yang dapat merusak senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam tanaman.

### **3.5.3 Ekstraksi dan Fraksinasi Senyawa Alkaloid (Rohmah, 2014 dan Titis, dkk., 2013)**

Ekstraksi alkaloid kasar dilakukan dengan cara maserasi/ perendaman dengan cara serbuk tanaman anting-anting ditimbang sebanyak 300 gram. Selanjutnya dibagi menjadi tiga masing-masing 100 gram untuk proses ekstraksi secara maserasi menggunakan 400 mL metanol. Proses ekstraksi dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan selama 3 jam menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm kemudian disaring. Ampas yang diperoleh direndam kembali dengan menggunakan 400 mL pelarut metanol sampai diperoleh hasil filtrat yang berwarna bening. Ekstrak metanol yang didapatkan digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C sampai diperoleh ekstrak pekat metanol. Hasil ekstrak pekat metanol yang diperoleh kemudian ditimbang, dan disisakan 10 mg untuk dilakukan uji aktivitas antikanker dan 3 mg untuk uji fitokimia.

Ekstrak pekat metanol yang diperoleh dilakukan pemisahan senyawa alkaloid kasar dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair secara asam basa. Ekstrak pekat metanol yang telah didapatkan dilarutkan dengan air 50 mL,



kemudian diasamkan dengan HCl 2 M hingga pH larutan menjadi 3. Larutan yang bersifat asam kemudian diekstraksi menggunakan etil asetat 50 mL. Hasil ekstraksi akan terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan asam dan lapisan etil asetat. Selanjutnya kedua lapisan dipisahkan. Lapisan asam dibasakan dengan penambahan NH<sub>4</sub>OH hingga pH larutan mencapai 9. Kemudian diekstrak kembali menggunakan 50 mL etil asetat. Hasil ekstraksi akan terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan basa dan lapisan etil asetat. Selanjutnya kedua lapisan dipisahkan. Lapisan basa yang diperoleh dilakukan replikasi sebanyak 5 kali menggunakan pelarut etil asetat hingga larutan bewarna bening kekuningan. Lapisan etil asetat yang diperoleh digabungkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak alkaloid kasar. Hasil ekstrak alkaloid kasar yang diperoleh kemudian dilakukan penimbangan.

#### **3.5.4 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid (Hayati dan Halimah 2010)**

Uji fitokimia senyawa yang diduga alkaloid dilakukan dengan menggunakan uji reagen dari ekstrak kasar alkaloid hasil ekstraksi tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.). Sebanyak 3 mg ekstrak kasar alkaloid tumbuhan anting-anting dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan yang diperoleh dibagi dalam dua tabung reaksi. Tabung satu ditambah dengan 2-3 tetes reagen Dragendoff dan tabung dua ditambah reagen 2-3 tetes reagen Mayer. Jika tabung satu terbentuk endapan bewarna jingga dan tabung dua terbentuk endapan bewarna kekuningan menunjukkan senyawa tersebut mengandung alkaloid. Perlakuan tersebut diulangi untuk ekstrak pekat metanol.

### 3.5.5 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Menggunakan UPLC-MS

Identifikasi menggunakan LC-MS pada ekstrak kasar alkaloid digunakan untuk mengetahui struktur dari senyawa alkaloid yang didapatkan. Ekstrak kasar hasil partisi ditimbang 20 mg. Eluen yang digunakan adalah campuran dua pelarut disaring melalui 0,45  $\mu\text{m}$  membran filter; pelarut A:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% formic acid, pelarut B: Acetonitrile + 0,1 % formic acid yang disaring dengan menggunakan saringan nilon berdiameter 1,7 $\mu\text{m}$  dengan bantuan pompa vakum (Spesifikasi alat terdapat pada L.2.5).

Tahap selanjutnya yaitu penyuntikan sampel pada UPLC. Ekstrak kasar hasil partisi diambil sebanyak 5  $\mu\text{L}$  (0,005 mL) dan disuntikkan secara langsung menggunakan *micro syringe* ke dalam eluen yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom dan akan teridentifikasi senyawa dengan MS dilakukan dengan cara menghubungkan system UPLC dengan sumber ESI.

### 3.5.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Rohmah, 2014)

#### 3.5.6.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Kromatografi Lapis Tipis Analitik dilakukan untuk menentukan eluen yang terbaik. Sebelum dilakukan penjenjuran campuran eluen kloroform: metanol (9,5:0,5) (Rohmah,2014), didalam bejana kromatografi selama 1 jam.

Selama proses penjenjuran, dilakukan proses pengaktifan plat silika gel  $\text{GF}_{254}$  dengan pemanasan didalam oven dengan suhu 100  $^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Sebelumnya, masing-masing plat dengan ukuran 1 x 10 cm diberikan batas bawah 1 cm dan batas atas 1 cm. Ekstrak alkaloid kasar sebanyak 50 mg dilarutkan kedalam 5 mL metanol. Kemudian ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler dibagian tengah plat yang sudah diberikan batas sebanyak 20 kali. Selanjutnya

plat diangin- anginkan sebentar. Setelah kering, plat dimasukkan dalam larutan pengembang yang sudah dijenuhkan. Proses elusi dihentikan ketika larutan pengembang sampai pada garis batas.

Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Spot yang nampak disemprot dengan reagen Dragendoff dan dihitung nilai  $R_f$ -nya. Hasil eluen dengan noda-noda yang terbaik akan digunakan untuk pengujian Kromatografi Lapis Tipis Preparatif. Perlakuan ini diulangi sebanyak 3 kali. Berikut campuran larutan pengembang atau eluen yang digunakan.

1. Kloroform : metanol (9,5:0,5) (Rahmah, 2014)
2. Kloroform : metanol (9:1) (Praveena, dkk., 2014)
3. Kloroform : etil-asetat (8:2) (Muhtadi, 2008)

### **3.5.6.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)**

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dilakukan untuk menentukan isolat senyawa yang diinginkan. Pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 10 X 20 cm. Sebelum dilakukan pemisahan campuran eluen terbaik dari hasil KLTA dilakukan penjenuhan terlebih dahulu didalam bejana kromatografi selama 1 jam. Ekstrak hasil partisi ditotolkan sepanjang plat pada batas bawah. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan larutan pengembang hasil terbaik dari KLTA. Setelah elusi sampai dengan garis batas, proses elusi dihentikan. Hasil pemisahan di deteksi dengan cara menyemprotkan reagen Dragendorff . Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan dihitung nilai  $R_f$ -nya. Isolat yang terbentuk dikerok dan ditimbang. Kemudian isolat dilarutkan

dalam 5 ml etil asetat, divortex dan disentrifuge. Isolat yang didapatkan diuapkan pelarutnya.

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

#### **3.5.7.1 Penyiapan Sel**

Sel kanker payudara T47D didapat dari koleksi laboratorium parasitologi Universitas Gajah Mada (UGM) dikeluarkan dari *freezer* (-80°C). selanjutnya dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37 °C selama 2 – 3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan ke dalam *culture dish* yang telah berisi 10 ml media RPMI, kemudian diinkubasi selama 3 – 4 jam pada suhu 37 °C/ 5 % CO<sub>2</sub>, selanjutnya disentrifugasi untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan media RPMI. Pelet yang terbentuk diamati dibawah mikroskop untuk melihat apakah sel melekat di dasar *culture dish* dan bila jumlah sel di dalam *culture dish* mencapai 70 – 85 % (konfluen), dilakukan pemanenan sel.

Tahapan pemanenan sel yakni, dicuci sel 2 x dengan PBS, ditambahkan trispsin-EDTA secara merata dan diinkubasi selama 3 menit, kemudian ditambahkan media RPMI 5 mL untuk menginaktifkan sel serta dilakukan resuspensi. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop *inverted*, dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam.

#### **3.5.7.2 Perhitungan Sel Kanker**

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

$$\sum \text{sel yang dihitung} = \frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4 \dots (3.2)$$

### 3.5.7.3 Peletakan Sel pada *Plate*

Peletakan sel pada *plate* harus diketahui terlebih dahulu berapa jumlah mL panen sel yang akan diletakkan pada setiap sumuran. Jumlah panen sel dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

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

(3.3)

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

### 3.5.7.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada *Plate*

Ditimbang ekstrak pekat metanol, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid sebanyak 10 mg dalam 100 µL DMSO dan diaduk dengan vortex agar sampel lebih cepat larut. Kemudian diambil sel dari inkubator, dan dibuang media sel dengan cara dibalikkan *plate* 180° di atas tempat pembuangan dan ditekan secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan dalam *plate*. Selanjutnya dimasukkan 100 µL PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu dimasukkan larutan sampel sebanyak 100 µL dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 ppm dan perlakuan ini diulang sebanyak 3 x (triplo). Kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam.

### 3.5.7.5 Pemberian larutan MTT

Dibuang media sel dan dicuci dengan PBS, ditambahkan larutan MTT 100 µL ke setiap sumuran kecuali kontrol sel. Inkubasi kembali selama 3 – 4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Apabila formazan telah terbentuk

diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*, lalu ditambahkan *stopper* SDS 10 % dalam 0,1 N HCl, dibungkus *plate* dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.

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

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

....(3.4)

### 3.5.8 Analisis Data

Data dari hasil prosentase sel hidup kemudian dianalisis menggunakan aplikasi SPSS (*probit analysis*) untuk mengetahui nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak pekat metanol, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid.

Konsentrasi (ppm)	Hambatan(Persen Hidup)	Max
1000		100
500		100
250		100
125		100
62,5		100
31,25		100
15,625		100

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Preparasi Sampel**

Preparasi sampel merupakan tahapan penyerbukan sampel yang bertujuan untuk memperbesar luas permukaan pada sampel, sehingga proses ekstraksi akan berjalan semakin maksimal. Tahapan preparasi sampel meliputi pencucian, pengeringan dan penyerbukan sampel. Sampel tanaman anting-anting yang diperoleh dicuci dengan menggunakan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang berupa debu, tanah atau pengotor lainnya yang dapat mengganggu proses ekstraksi. Pengeringan dilakukan dengan dianginkan pada suhu ruang yang bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam sampel serta untuk menghindari pertumbuhan mikroba. Pengeringan dengan menggunakan suhu ruang agar senyawa aktif yang ada dalam sampel tidak rusak. Serbuk dengan penghalusan yang tinggi kemungkinan sel-sel yang rusak juga akan semakin besar sehingga memudahkan pengambilan senyawa aktif oleh pelarut (Voight, 1995). Serbuk tanaman anting-anting yang diperoleh digunakan untuk proses maserasi.

#### **4.2 Analisis Kadar Air**

Penentuan kadar air pada sampel kering bertujuan untuk mengetahui kandungan air yang ada pada sampel yang akan digunakan. Penentuan kadar air merupakan tahapan yang penting karena menentukan kualitas dan daya tahan sampel. Apabila kadar air dalam sampel kecil maka kestabilan optimum suatu bahan akan tercapai dan pertumbuhan mikroba dapat dihindari (Winarno, 2002).

Prinsip dari analisis kadar air menggunakan metode gravimetri adalah menghilangkan kadar air dalam sampel dengan cara pemanasan menggunakan oven pada suhu 105°C agar air yang terikat secara fisik dalam sampel dan sesudah dilakukan pengeringan menunjukkan banyaknya air yang telah diuapkan. Didapatkan hasil analisis kadar air dalam sampel kering tanaman anting-anting yakni 6,41 % (b/b). Hasil analisis kadar air dalam sampel tanaman anting-anting cukup baik untuk dilakukan proses ekstraksi karena keberadaan air yang tinggi akan mempersulit proses ekstraksi (Kumala, 2007), selain itu dapat mempengaruhi proses pemekatan ekstrak yang disebabkan pelarut air yang bercampur dengan pelarut organik.

#### **4.3 Ekstraksi Maserasi pada Tanaman Anting-anting**

Metode ekstraksi senyawa aktif yang digunakan adalah ekstraksi maserasi. Prinsip dari ekstraksi maserasi adalah merendam sampel dengan pelarut dengan beberapa kali pengocokan dalam suhu ruang, sehingga terjadinya kontak yang cukup antara sampel dengan pelarut secara terus menerus (Djarwis, 2004).

Pengadukan bertujuan untuk meratakan konsentrasi larutan yang berada diluar serbuk sampel (Baraja, 2008). Proses pengadukan dibantu dengan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm. Sampel yang telah dimaserasi selama 24 jam kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan corong Buchner dengan bantuan pompa vakum. Hal ini bertujuan untuk mempercepat proses penyaringan. Pompa vakum akan memperkecil tekanan yang ada dalam erlenmeyer, sehingga secara otomatis tekanan yang diluar akan semakin besar dan filtrat akan terdorong masuk kedalam erlenmeyer. Perubahan filtrat yang



diperoleh dari sampel tanaman anting-anting dengan 3 kali proses ekstraksi terjadi perubahan warna dari hijau tua hingga bewarna hijau bening.

Filtrat yang diperoleh, dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 50 °C untuk menguapkan pelarut sehingga didapatkan ekstrak yang pekat. Prinsip dari *rotary evaporator vacuum* adalah penurunan tekanan sehingga pelarut akan menguap dan terpisah pada suhu dibawah suhu titik didihnya. Pelarut menguap dibawah titik didihnya dikarenakan adanya pompa vakum yang berfungsi untuk menurunkan tekanan. Perurunan tekanan menyebabkan titik didih pelarut menjadi turun sehingga pelarut akan lebih mudah menguap. Uap dari pelarut akan terkondensasi menjadi wujud cair yang tertampung dalam labu destilasi sedangkan ekstrak tetap dalam labu alas bulat yang bebas dari pelarut (Abraham, 2013).

Proses pemekatan dihentikan ketika ekstrak sudah pekat dengan ditandai pelarut berhenti menetes pada labu alas bulat. Selanjutnya ekstrak diuapkan dengan dialiri gas N<sub>2</sub> untuk menguapkan pelarut yang masih tersisa didalam ekstrak. Hasil maserasi tanamana anting-anting ditunjukkan pada Tabel 4.1 dengan perhitungan randemen berat ekstrak pekat pada Lampiran 4.2.

Tabel 4.1 Hasil maserasi serbuk tanaman anting-anting (*Acalypha indica L.*)

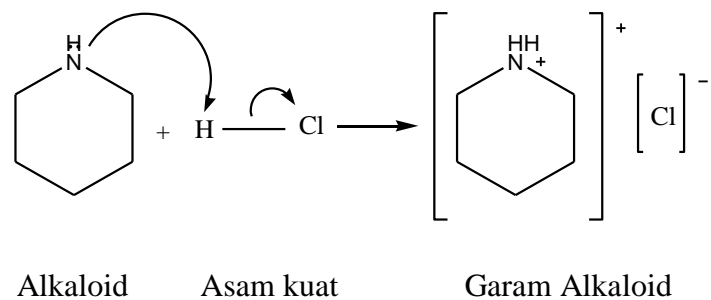
<b>Pelarut</b>	<b>Perubahan warna filtrat</b>	<b>Warna ekstrak pekat</b>	<b>Serbuk (g)+pelarut (mL)</b>	<b>Berat ekstrak pekat (g)</b>	<b>Rendemen (%) (b/b)</b>
Metanol	Hijau Bening	Hijau Pekat	300 gram + 3600 mL	37,3202	12, 44 %

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui randemen hasil maserasi serbuk tanaman anting-anting sebesar 12, 44 %. Ekstrak pekat yang diperoleh dilakukan

fraksinasi untuk mengambil senyawa alkaloid yang ada pada sampel, dan disisakan 1 gram untuk dilakukan uji aktivitas antikanker.

#### 4.4. Fraksinasi (Partisi) Senyawa Alkaloid

Isolasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan metode ekstrak cair-cair secara asam basa. Ekstrak pekat 10 gram dilarutkan dengan menggunakan aquades 50 mL. Setelah larut sempurna larutan ekstrak diasamkan dengan HCl 2 M sampai pH larutan menjadi 3 untuk membentuk garam alkaloid -Cl serta memperbesar kelarutan alkaloid dalam air. Alkaloid akan bereaksi dengan asam kuat dan akan membentuk garam alkaloid. Garam alkaloid -Cl mudah larut dalam air, sehingga komponen tersebut dapat dipisahkan dari komponen lainnya. Adapun reaksi yang terjadi ketika penambahan HCl dapat dilihat pada Gambar 4.1 berikut ini (Robinson, 1995):

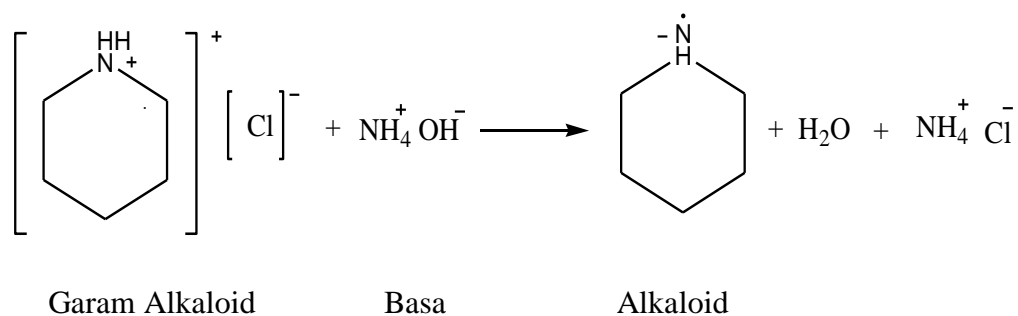


Gambar 4.1. Reaksi alkaloid dengan asam kuat

Larutan yang sudah diasamkan diekstrak menggunakan etil asetat 50 mL dan dilakukan pengocokan hingga terbentuk 2 lapisan. Tujuan penambahan etil asetat berfungsi untuk mengambil senyawa-senyawa lemak dan lilin yang ada pada larutan asam. Lapisan atas (fase organik) yang berwarna hijau tua dan lapisan

atas (fasa air) berwarna coklat orange. Kedua pelarut yang digunakan memiliki berat jenis dan kepolaran yang berbeda. Berat jenis etil asetat  $0,9 \text{ g/cm}^3$  dan berat jenis air  $1 \text{ g/cm}^3$ , sehingga lapisan organik berada diatas karena memiliki densitas lebih kecil. Alkaloid dalam bentuk garamnya akan mudah larut dalam fasa air (Robinson, 1995).

Alkaloid yang terlarut dalam lapisan air ditambahkan dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$  sampai alkalis (9-10). Lapisan air yang dibasakan bertujuan agar garam alkaloid membentuk basa bebas alkaloid kembali dan membebaskna alkaloid dari garamnya akibat penambahan asam. Berikut reaksi yang terjadi:



Gambar 4.2. Reaksi pembebasan amina dengan cara pembasaan (Titis dkk., 2013)

Lapisan air yang sudah dibasakan diekstrak kembali dengan menggunakan etil asetat 50 mL, sehingga didapatkan 2 lapisan yaitu lapisan air dan lapisan organik. Lapisan air yang diperoleh berwarna coklat dan lapisan organik berwarna kuning. Kedua lapisan yang diperoleh dipisahkan, dan lapisan air dilakukan replikasi sebanyak 5 kali.

Lapisan organik yang diperoleh dipekatkan kembali dengan menggunakan *rotary evaporator vacuum* hingga diperoleh ekstrak kasar alkaloid. Kemudian dihitung randemennya seperti Tabel 4.2 dan Lampiran 4.2.

Tabel 4.2 Hasil partisi ekstrak kasar tanaman anting-anting (*Acalypha indica L.*)

<b>Ekstrak</b>	<b>Perubahan warna filtrat</b>	<b>Warna ekstrak pekat</b>	<b>Berat sampel (g)</b>	<b>Berat ekstrak pekat (g)</b>	<b>Rendemen (%) (b/b)</b>
Ekstrak kasar	Kuning bening	kecoklatan	30	0,3408	1,136 %

Hasil ekstrak alkaloid kasar dilakukan identifikasi dengan menggunakan LC-MS, uji fitokimia menggunakan reagen, isolasi dan dilakukan uji aktivitas antikanker payudara T47D.

#### **4.5 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid dengan Penambahan Reagen Dragendorff dan Mayer**

Uji Fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam sampel. Uji fitokimia senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan uji Dragendorff dan Mayer. Prinsip dari analisis ini adalah reaksi pengujian warna (*spot test*) dan busa degan suatu pereaksi warna (Kristanti, dkk., 2006). Hasil positif senyawa alkaloid dengan penambahan reagen Mayer akan terbentuk endapan putih kekuningan dan endapan jingga ketika ditambahkan dengan reagen Dragendroff (Harbone, 1987). Tujuan penambahan HCl 2% dalam uji alkaloid karena alkaloid bersifat basa sehingga biasanya diekstrak dengan pelarut yang mengandung asam (Harbone, 1987). Hasil pengujian golongan senyawa aktif ekstrak metanol, ekstrak kasar alkaloid ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Data hasil uji fitokimia dengan reagen

<b>Uji Fitokimia</b>	<b>Pereaksi</b>	<b>Hasil</b>	<b>Kesimpulan</b>
Alkaloid	Dragendroff	Terbentuk endapan jingga	Positif
	Mayer	Terbentuk endapan putih kekuningan	Positif

Berdasarkan uji fitokimia, dapat diketahui bahwa ekstrak metanol dan ekstrak kasar alkaloid positif mengandung senyawa alkaloid. Endapan terbentuk karena adanya pembentukan senyawa kompleks antara ion logam dari reagen dengan senyawa alkaloid (Harbone, 1997). Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (Vogel, 1990). Uji alkaloid dengan menggunakan pereaksi Mayer menghasilkan endapan berwarna putih kekuningan. Terbentuknya endapan tersebut diperkirakan nitrogen pada senyawa alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomercurat(II) membentuk kalium alkaloid yang mengendap (Setyowati dkk., 2014). Kebanyakan alkaloid bereaksi dengan pereaksi-pereaksi tersebut tanpa membedakan kelompok alkaloid (Sastrohamidjojo, 1996).

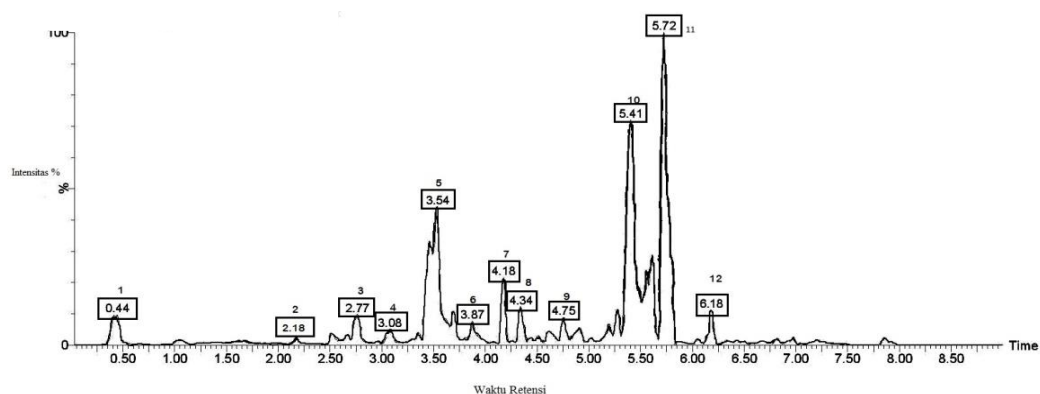
Hasil positif alkaloid menggunakan pereaksi Dragendorff ditandai dengan terbentuknya endapan jingga. Endapan tersebut adalah kalium alkaloid. Senyawa alkaloid dengan menggunakan pereaksi Dragendorff akan membentuk garam tetraiodobismut yang berwarna jingga (Setyowati, dkk., 2014).

#### **4.6 Hasil Identifikasi Menggunakan UPLC-MS**

Ekstrak kasar hasil partisi dilakukan analisis kandungan senyawa yang ada dalam ekstrak menggunakan UPLC-MS. Hal ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa alkaloid yang ada dalam ekstrak. Analisis kualitatif ditunjukkan dengan jumlah senyawa berdasarkan jumlah puncak yang ada dalam kromatogram. Prinsip dari LC-MS yaitu memisahkan senyawa yang tidak menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi berdasarkan perbedaan distribusi antara

fasa gerak dan fasa diam. Fase gerak akan membawa sampel melalui kolom, didalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen campuran karena adanya perbedaan interaksi antara fase gerak dan fasa diam. Interaksi antara fase gerak yang kurang kuat dengan fasa diam menyebabkan fase gerak keluar lebih cepat dari kolom. Sebaliknya fase gerak yang kuat dengan fasa diam menyebabkan fase gerak tertahan didalam kolom lebih lama. Sampel yang telah dipisahkan dalam kolom akan diuapkan pada suhu tinggi, kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk akan terfragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan ( $m/z$ ) yang selanjutnya akan dideteksi secara elektrik menghasilkan spektra massa (Khopkar, 2008).

Hasil kromatogram UPLC-MS ekstrak kasar alkaloid tanaman anting-anting ditampilkan dalam Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Kromatogram UPLC-MS ekstrak kasar alkaloid tanaman Anting-anting

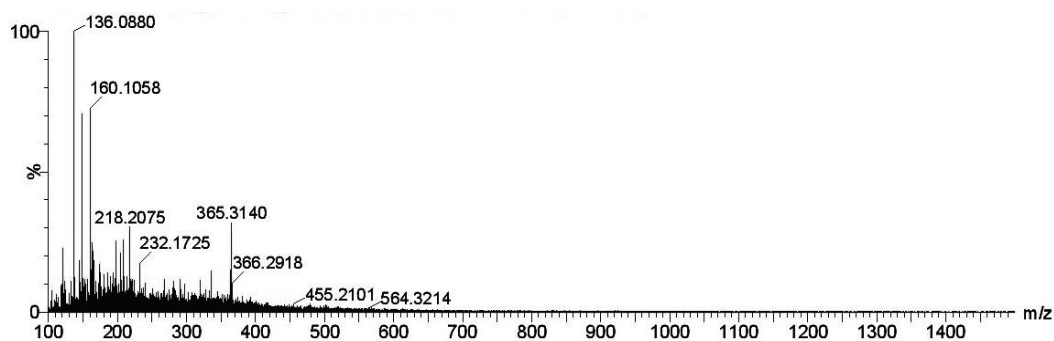
Hasil identifikasi menggunakan UPLC-MS pada ekstrak kasar alkaloid menunjukkan adanya 12 puncak. Waktu retensi ( $t_R$ ) yang dibutuhkan senyawa untuk keluar dari kolom dan dideteksi oleh detektor berkisar antara 0,50 menit – 8,50 menit. Berikut hasil dugaan senyawa analisis menggunakan instrumen UPLC-MS yang ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil dugaan senyawa analisis menggunakan instrumen UPLC-MS

No	Waktu Retensi	m/z	Dugaan Senyawa
1	0,44 menit	136	Trigonelin
2	2,18 menit	336	Berberin
3	2,77 menit	179	Penacetin
4	3,08 menit	177	N-metil nikotinium
5	3,54 menit	318	Coptisin
6	3,87 menit	283	Evosantin
7	4,18 menit	211	4-aminonaptalimid
8	4,34 menit	353	Palmatin
9	4,75 menit	624	Dauricin
10	5,41 menit	256	Lysergol
11	5,72 menit	607	Tannin terhidrolisis
12	6,18 menit	338	Jatrorrhizin

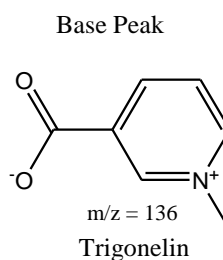
Fase gerak yang digunakan cenderung bersifat polar, sedangkan fase diam yang digunakan cenderung bersifat non polar (C18). Berdasarkan hasil yang diperoleh semakin lama interaksi antara senyawa dengan fase diam menyebabkan senyawa yang kepolarannya rendah akan tertahan lebih lama didalam fase diam. Sedangkan senyawa yang lebih polar akan terelusi lebih cepat dan akan terbawa oleh fase gerak.

Puncak 1 dengan waktu retensi 0,44 menit memiliki spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.4.



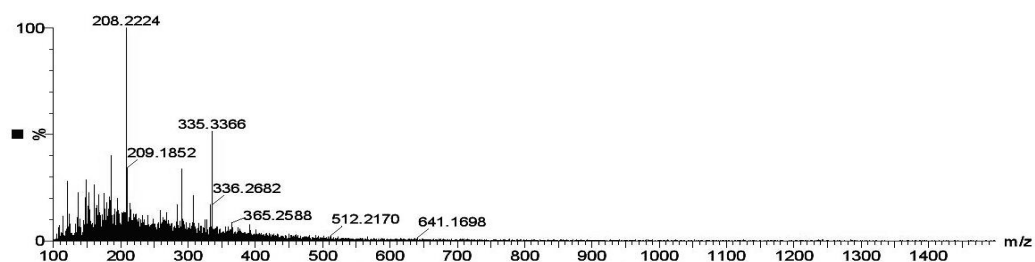
Gambar 4.4. Spektra massa senyawa puncak 1

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa spektra massa pada puncak 1 terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 136, 0880 m/z. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul trigonelin. Adapun struktur senyawa trigonelin pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Struktur senyawa trigonelin

Senyawa pada puncak 2 dengan waktu retensi 2,18 menit memiliki spektra massa pada Gambar 4.6.

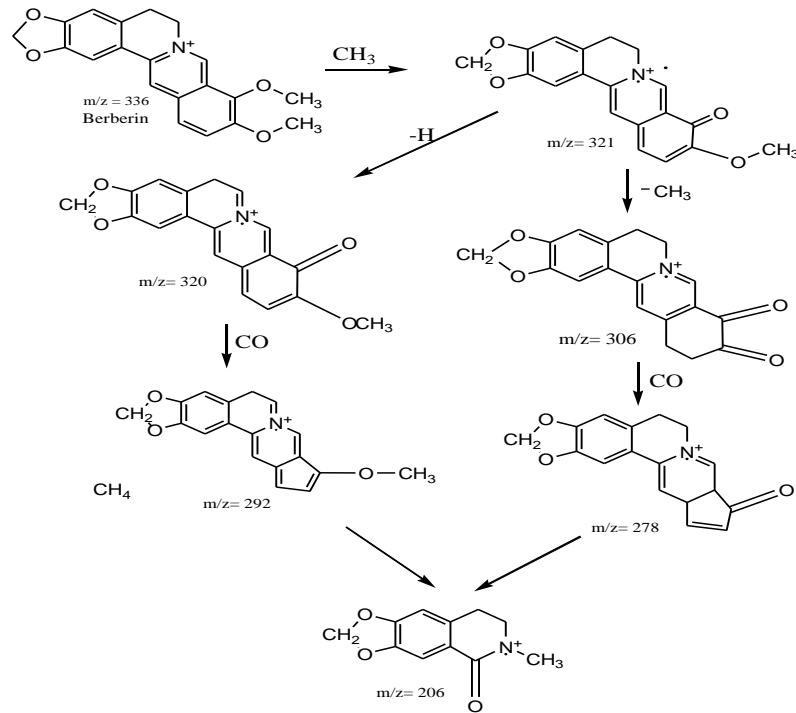


Gambar 4.6. Spektra massa senyawa puncak 2

Puncak 2 terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 336,2682 m/z dan 208,2224 m/z. Nilai m/z 336, 2682 memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari senyawa berberin. Senyawa berberin merupakan senyawa alkaloid

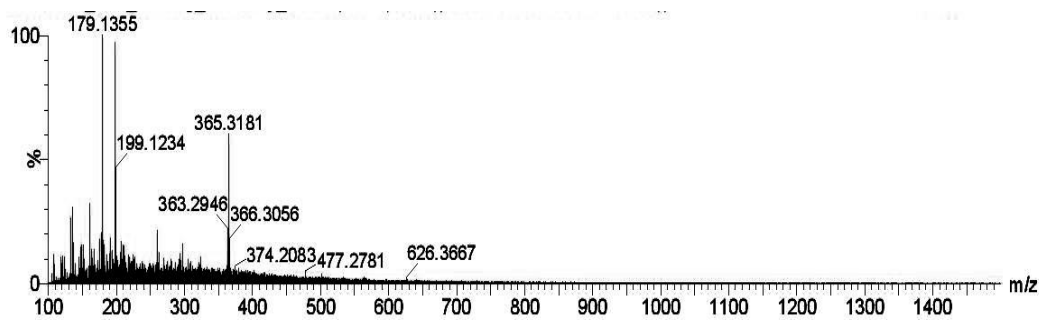


golongan isokuinolin dengan rumus molekul  $C_{20}H_{18}NO_4$ . Berikut pola fragmentasi senyawa berberin Gambar 4.7.



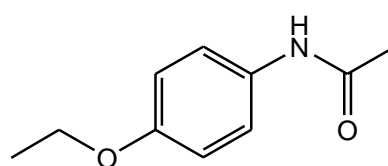
Gambar 4.7. Pola fragmentasi senyawa berberin (Bo Ding, dkk., 2007)

Selanjutnya kandungan senyawa pada puncak 3 dengan waktu retensi 2,77 menit dengan spektra massa pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8. Spektra massa senyawa puncak 3

Hasil spektra pada puncak 3 terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 179, 1355 m/z. Puncak dasar (*base peak*) stabil dengan nilai m/z 179,1355 dengan kelimpahan 100 %, nilai m/z tersebut memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari senyawa penacetin dengan rumus molekul  $C_{10}H_{13}NO_2$ . Berikut struktur senyawa phenacetin pada Gambar 4.9.



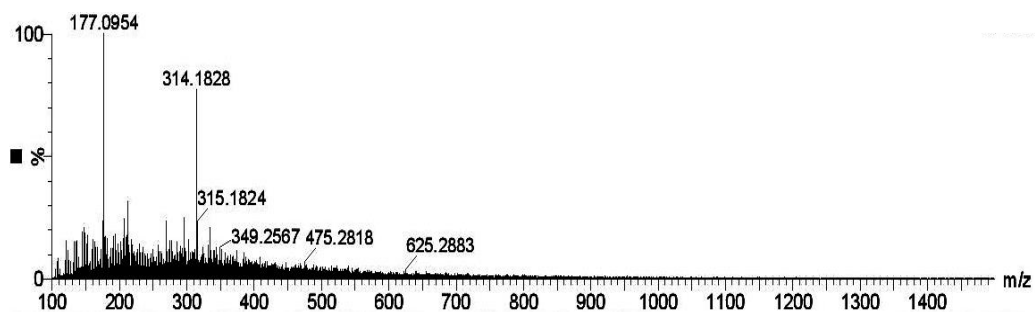
(Base peak)

m/z = 179

Penacetin

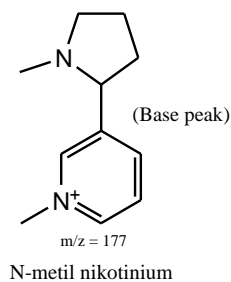
Gambar 4.9. Struktur senyawa produk penacetin

Puncak selajutnya adalah puncak 4 dengan waktu retensi 3,08 menit dengan spektra massa yang ditampilkan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10. Spektra massa senyawa puncak 4

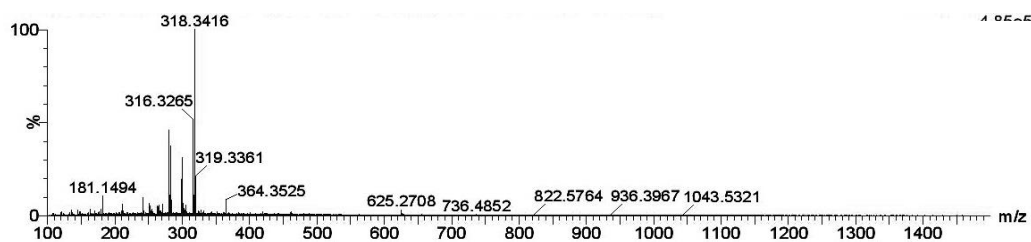
Puncak 4 memiliki terfragmen menjadi ion molekuler 177,0954 m/z. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari senyawa N-metil nikotonium. Adapun struktur dari senyawa N-metil nikotinium pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11. Struktur senyawa N-metil nikotinium

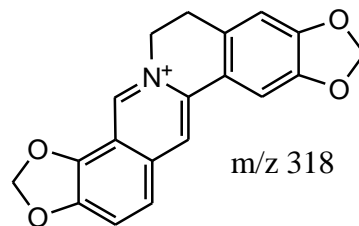
Selanjutnya spektra massa pada puncak 5 dengan waktu retensi 3,54 menit.

Berikut spektra yang ditampilkan pada Gambar 4.12.



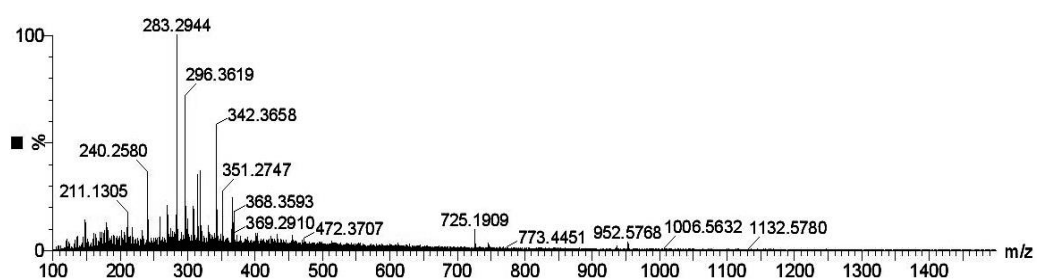
Gambar 4.12. Spektra massa senyawa puncak 5

Hasil spektra massa pada puncak 5 terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 318, 3416 m/z. Puncak dasar (*base peak*) pada puncak 5 memiliki nilai m/z 318,3416 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa coptisin dengan rumus molekul  $C_{19}H_{14}NO_4$ . Berikut struktur senyawa produk pada puncak 5 pada Gambar 4.13.



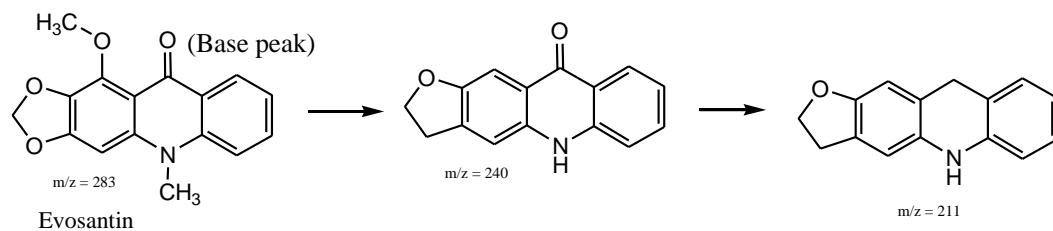
Gambar 4.13. Struktur senyawa coptisin

Puncak 6 dengan waktu retensi 3,87 menit memiliki spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.14.



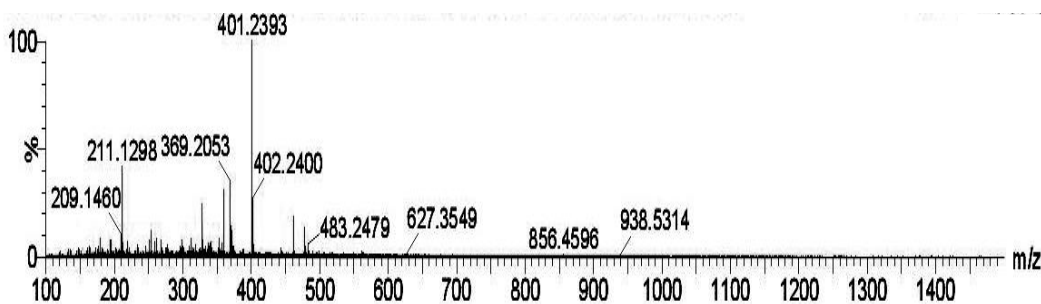
Gambar 4.14. Spektra massa senyawa puncak 6

Spektra massa pada puncak 6 terfragmentasi menjadi beberapa ion molekuler, diantaranya adalah 211, 1305 m/z, 240, 2580 m/z, 283, 2944 m/z. Puncak 6 memiliki puncak dasar (*base peak*) pada nilai m/z 283, 2944 yang memiliki kemiripan terhadap massa molekul relatif senyawa evosantin. Senyawa evosantin merupakan senyawa alkaloid golongan indol dengan rumus molekul  $C_{16}H_{13}NO_4$ . Berikut pola fragmentasi dari senyawa pada puncak 6 yang ditunjukkan pada Gambar 4.15.



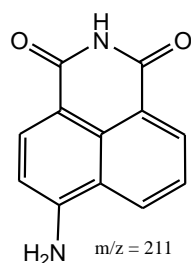
Gambar 4.15. Pola fragmentasi senyawa evosantin

Selanjutnya pada puncak 7 dengan waktu retensi 4,18 menit memiliki spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.16.



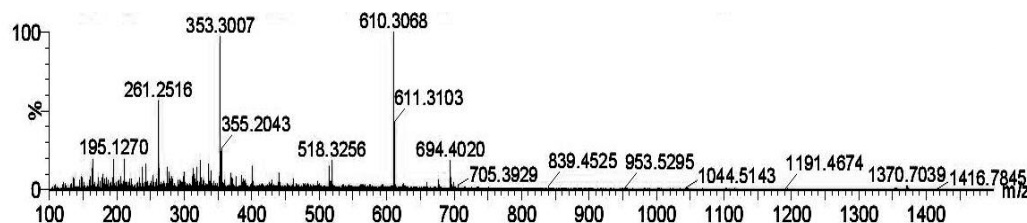
Gambar 4.16. Spektra massa senyawa puncak 7

Pucak 7 terfragmen menjadi beberapa ion molekuler, diantaranya adalah 211,1298 m/z yang memiliki kemiripan dengan senyawa 4-aminonaptalimid dengan rumus molekul  $C_{12}H_8N_2O_2$ . Adapun struktur dari puncak 7 pada Gambar 4.17.



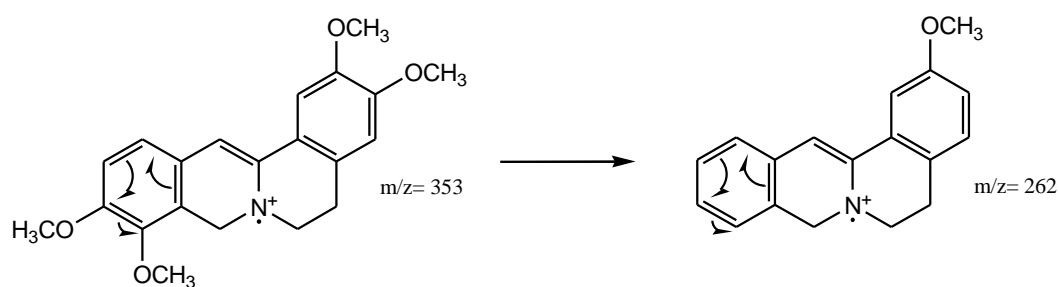
Gambar 4.17 . Struktur senyawa 4-aminonaptalimid

Puncak 8 dengan waktu retensi 4,34 menit memiliki spektra massa ditunjukkan pada Gambar 4.18.



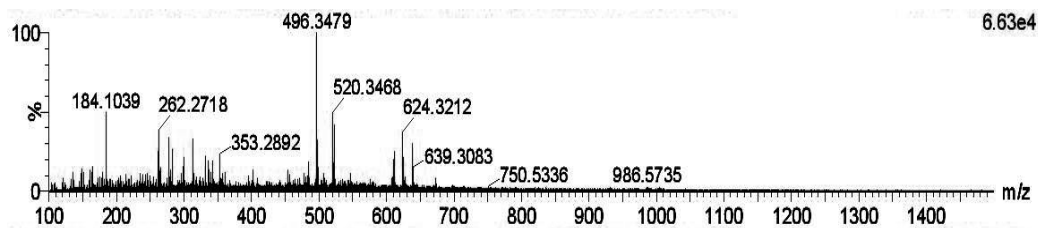
Gambar 4.18. Spektra massa puncak 8

Puncak 8 terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 353, 3007 m/z, 261, 2516 m/z. Puncak dasar (*base peak*) pada puncak 8 memiliki nilai m/z 353, 3007 dengan kelimpahan relatif 100 %. Ion molekuler tersebut memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa palmatin. Senyawa palmatin memiliki rumus molekul  $C_{21}H_{22}NO_4$  yang tergolong sebagai senyawa alkaloid golongan isokuinolin. Hal ini didukung dengan pola fragmen ion seperti Gambar 4.19 berikut:



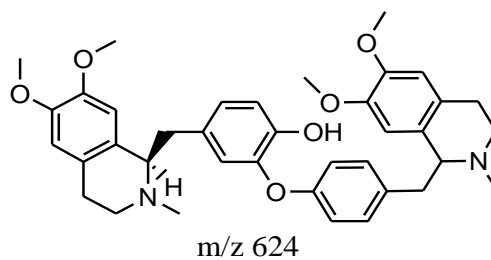
Gambar 4.19 Pola fragmen senyawa palmatin ( Lisiyana, 2016)

Puncak 9 dengan waktu retensi 4,75 menit memiliki spektra massa ditunjukkan pada Gambar 4.20.



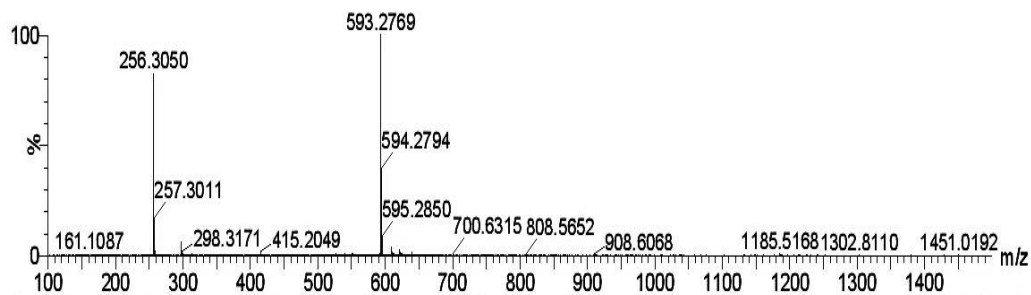
Gambar 4.20. Spektra massa senyawa puncak 9

Puncak 9 terfragment menjadi beberapa ion molekuler. Adapun fragmen dari ion 624,3212 m/z memiliki kemiripan senyawa dauricin dengan rumus molekul  $C_{38}H_{44}N_2O_6$ . Adapun struktur dari senyawa dauricin ditunjukkan pada Gambar 4.21.



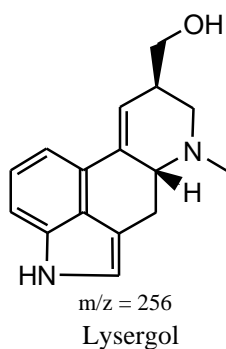
Gambar 4.21. Struktur dari senyawa dauricin

Puncak 10 dengan waktu retensi 5, 41 menit dengan pola fragmentasi yang ditunjukkan pada Gambar 4.22.



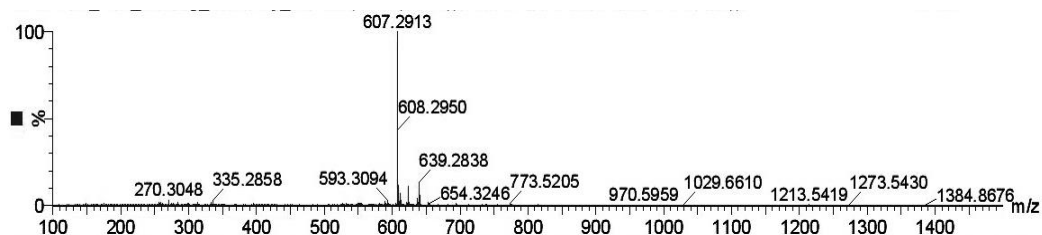
Gambar 4.22. Spektra massa senyawa puncak 10

Puncak 10 terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 256,3050 m/z. Puncak dasar (*base peak*) pada puncak 10 memiliki nilai m/z 256, 3050 m/z dengan kelimpahan relatif 90 %. Ion molekuler tersebut memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa lysergol dengan rumus molekul  $C_{16}H_{18}N_2O$ . Adapun pola fragmentasi dari senyawa lysergol ditunjukkan pada Gambar 4.23.



Gambar 4.23. Struktur dari senyawa lysergol

Puncak selanjutnya adalah puncak 11 memiliki waktu retensi 5,72 menit. Berikut spektra massa dari puncak 11 ditunjukkan pada Gambar 4.24.

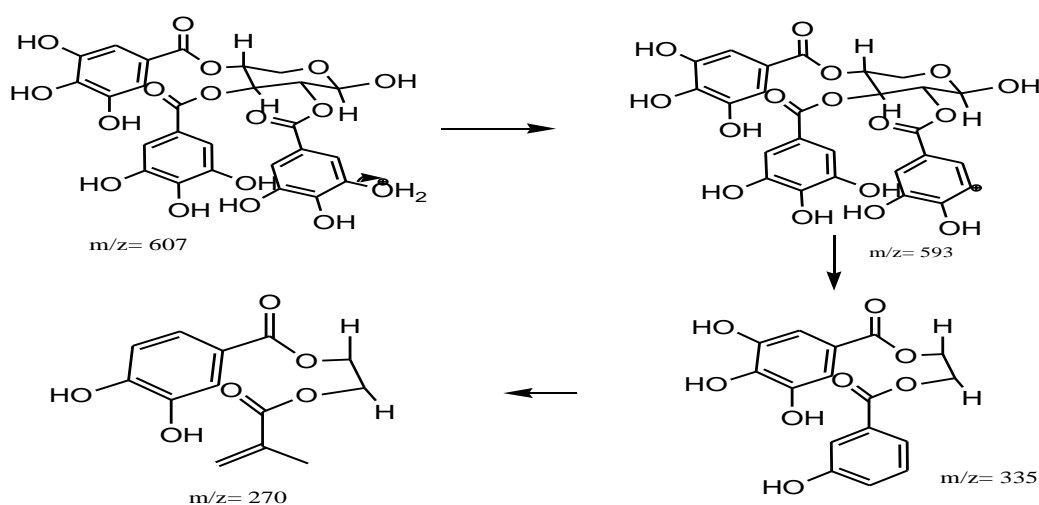


Gambar 4.24. Spektra massa senyawa puncak 11

Spektra massa senyawa pada puncak 11 terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 607, 2913 m/z, 593, 3094 m/z, 335,2858 m/z dan



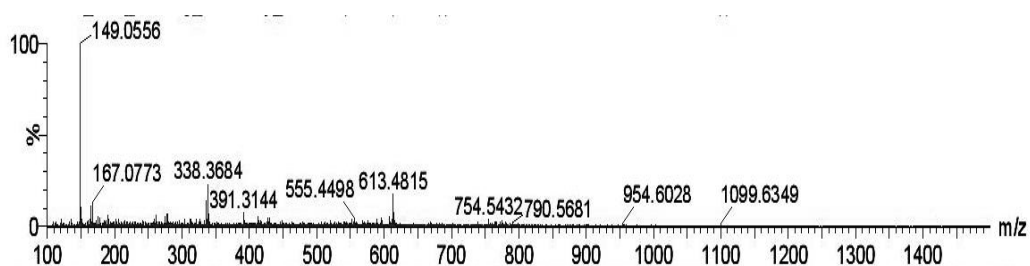
270,3048. Puncak dasar (*base peak*) pada puncak 11 memiliki nilai  $m/z$  607, 2913 dengan kelimpahan relatif 100 % yang memiliki kemiripan dengan senyawa *trigalloyl(2R,3R)-tetrahydro-2H-pyran-2,4,5-tetraol* (tannin terhidrolisis). Senyawa ini mengandung ikatan ester antara suatu monosakarida terutama gugus hidroksilnya (Hagerman *et al.*, 1992). Adapun pola fragmentasi dari senyawa tannin terhidrolisis pada Gambar 4.25.



Gambar 4.25. Fragmentasi dari senyawa tannin terhidrolisis (Firdaus, 2016)

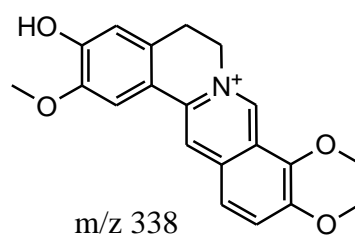
Puncak selanjutnya adalah puncak 12 memiliki waktu retensi 6,18 menit.

Berikut spektra massa dari puncak 12 ditunjukkan pada Gambar 4.26.



Gambar 4.26. Spektra massa senyawa puncak 12

Spektra pada puncak 12 terfragmentasi menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 338,3684 m/z. Puncak tersebut diduga memiliki kemiripan dengan senyawa jatrorrhizine. Adapun struktur dari produk puncak 12 ditunjukkan pada Gambar 4.27.



Gambar 4.27. Struktur dari senyawa jatrorrhizin

#### 4.7 Pemisahan Senyawa Alkaloid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

##### 4.7.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

KLT analitik digunakan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang baik dalam memisahkan senyawa alkaloid. Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa dalam bentuk noda dengan jumlah yang banyak. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antar noda satu dengan noda yang lainnya jelas. Pemilihan eluen yang terbaik diharapkan mampu memisahkan komponen alkaloid yang terkandung dalam tanaman anting-anting. Adapun beberapa eluen terbaik dari penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya, diantaranya kloroform: metanol (9,5:0,5) (Rahmah, 2014), kloroform: metanol (9:1) (Praveena, dkk., 2014), kloroform : etil asetat (8:2) (Muhtadi, 2008).

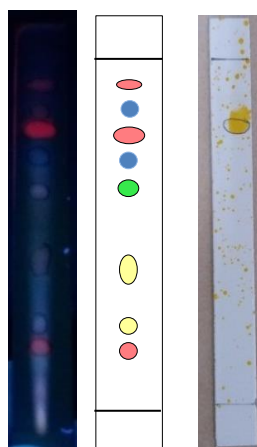
Proses penjuanan eluen dilakukan dengan menutup rapat masing-masing bejana yang terisi 5 mL eluen diatas. Penjuanan berfungsi untuk mempermudah proses elusi dengan adanya tekanan dari uap pelarut. Penjuanan tiap eluen dilakukan selama 1 jam sebelum dilakukan proses elusi. Penelitian ini

menggunakan teknik elusi pengembangan menaik. Penotolan sampel dilakukan dengan menotolkan larutan ekstrak 10000 ppm pada plat silika sebanyak 20x penotolan. Penotolan dilakukan dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin secara bertahap disertai pengeringan antar totolan untuk menghindari penurunan resolusi dan timbulnya bercak yang menyebar dan puncak ganda (Gandjar dan Rohman, 2007). Pemisahan ini terjadi karena adanya perbedaan kepolaran senyawa dengan fase diam berupa plat silika dan fase gerak berupa eluennya. Proses elusi dihentikan bila eluen telah mencapai tanda batas atas. Noda yang dihasilkan dideteksi dengan reagen Dragendorf kemudian diamati dibawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pada  $\lambda$  254 nm, lempeng akan berfluoresensi sedangkan sampel akan tampak bewarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 254 nm karena adanya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng. Sedangkan pada  $\lambda$  366 nm noda akan berfluoresensi dan lempeng akan bewarna gelap. Timbulnya noda pada lampu UV 366 karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh aoksokrom yang ada pada noda (Sudjadi, 1988). Hasil pemisahan senyawa alkaloid pada Tabel 4.5 berikut.

Tabel 4.5 Data penampakan noda senyawa alkaloid hasil KLTA ekstrak kasar alkaloid tanaman anting-anting

No.	Eluen	Jumlah noda	Nilai Rf	Keterangan
1.	Kloroform : metanol (9,5 : 0,5)	8	0,18 ; 0,25 ; 0,43 ; 0,56 ; 0,67 ; 0,74 ; 0,78 ; 0,86	Terpisah
2.	Kloroform : metanol (9 : 1)	3	0,67 ; 0,81 ; 0,94	Terpisah
3.	Kloroform : etil asetat (8 : 2)	3	0,11 ; 0,36 ; 0,72	Terpisah

Tabel 4.5 menunjukkan variasi pelarut kloroform : metanol (9,5 : 0,5) merupakan eluen terbaik yang mampu memberikan pemisahan terbaik dibandingkan dengan variasi lainnya. Eluen ini mampu memisahkan 8 noda dan terdapat noda yang menunjukkan senyawa alkaloid. Berikut penampakan nodanya pada Gambar 4.28.



Gambar 4.28 Ilustrasi KLTA Menggunakan Eluen Kloroform:Metanol (9,5:0,5)

Tabel 4.6 Hasil KLTA ekstrak kasar alkaloid dari tanaman anting-anting menggunakan eluen kloroform : metanol (9,5 : 0,5)

Rf noda	Warna noda dibawah lampu UV pada $\lambda$ 366 nm		Dugaan positif alkaloid
	Sebelum disemprot	Sesudah disemprot	
0,18	Merah	Merah	-
0,25	Kuning pudar	Kuning Pudar	-
0,43	Kuning Pudar	Kuning Pudar	-
0,56	Hijau	Jingga kecoklatan	Alkaloid
0,67	Biru	Biru	-
0,74	Merah	Merah	-
0,78	Biru	Biru	-
0,86	Merah	Merah	-

Pemisahan menggunakan KLTA pada campuran eluen kloroform : metanol (9,5 :0,5) menghasilkan 8 noda dengan nilai Rf yang berbeda. Noda yang diduga sebagai senyawa alkaloid adalah noda no ke-4 yang memiliki Rf 0,56. Dugaan tersebut berdasarkan warna hijau yang dihasilkan dibawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hayati (2012) menggunakan eluen yang sama dihasilkan noda warna hijau dan kuning yang diduga senyawa alkaloid dan setelah disemprot dengan menggunakan reagen Dragendoff menjadi jingga. Penelitian lain yang menggunakan eluen yang sama (Rahmah, 2014) melakukan isolasi alkaloid pada tanaman anting-anting diperoleh noda yang berwarna hijau dan kuning diuga mengandung senyawa alkaloid. Harbone dalam Marlina (2005) melakukan identifikasi pada ekstrak etanol labu siam dihasilkan hijau muda pada UV 366 nm menegaskan adanya kandungan senyawa alkaloid. Husna (2011) noda yang dihasilkan berwarna kuning dan biru kehijauan dan setelah disemprot dengan menggunakan reagen Dragendoff berwarna jingga kecoklatan, coklat dan orange setelah dideteksi dibawah lampu UV 366 nm serta menghasilkan Rf 0,37 – 0,97.

#### **4.7.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)**

Kromatografi lapis tipis analitik digunakan untuk memperoleh isolat senyawa alkaloid. KLTP ini menggunakan plat silika G60F<sub>254</sub> dengan ukuran yang lebih besar yaitu 10 x 20 cm. Senyawa yang dipisahkan diasumsikan berada dalam fase diam dan fase gerak secara bergantian dalam kesetimbangan. Fase gerak disebut pembawa sedangkan fase diam bertindak sebagai penahan. Distribusi zat terlarut dalam dua fase disebut sebagai koefisien distribusi (Wonoraharjo, 2013).

Pemisahan dengan KLTP menggunakan silika sebagai fase diam dan eluen sebagai fase gerak. Eluen yang digunakan merupakan eluen terbaik dari hasil KLTA yaitu campuran kloroform : metanol (9,5 : 0,5). Eluen yang digunakan cenderung memiliki kepolaran yang lebih rendah dibandingkan silika. Noda yang memiliki nilai Rf kecil lebih bersifat polar karena lebih tertahan kedalam plat silika sedangkan noda yang memiliki Rf besar memiliki sifat yang lebih non-polar karena ikut terbawa oleh eluen yang memiliki sifat lebih non polar. Noda dengan koefisien distribusi ke fase diam sedangkan noda dengan koefisien distribusi kecil lebih terdistribusi ke fase gerak. Hasil yang diperoleh dari KLTP disajikan pada Tabel 4.7

Tabel 4.7 Hasil KLT preparatif senyawa alkaloid

No.	Nilai Rf	Warna noda di bawah sinar UV pada $\lambda$ 366 nm	Dugaan Senyawa
1.	0,04	Kuning pudar	-
2.	0,1	Merah muda	-
3.	0,21	Kuning kemerahan	-
4.	0,3	Biru	-
5.	0,35	Merah menyala	-
6.	0,42	Merah menyala	-
7.	0,48	Merah muda	-
8.	0,6	Biru	-
9.	0,71	Hijau	Alkaloid
10.	0,73	Coklat	-
11.	0,82	Merah muda	-
12.	0,87	Merah muda	-
13.	0,9	Merah muda	-
14.	0,92	Merah muda	-
15.	0,95	Merah Hati	-

Berdasarkan Tabel 4.7 Noda yang diduga senyawa alkaloid adalah noda yang berwarna hijau dengan Rf 0,71. Senyawa dengan nilai Rf besar akan

terdistribusi kedalam fase geraknya sedangkan senyawa yang memiliki nilai Rf kecil terdistribusi ke fase diamnya. Berdasarkan penelitian (Rahmah, 2014) melakukan isolasi alkaloid dengan menggunakan eluen yang sama pada tanaman anting-anting diperoleh noda yang berwarna hijau dan kuning positif mengandung senyawa alkaloid. Noda yang berwarna hijau tersebut dikerok dan dilarutkan dengan etil asetat dan disentrifuge untuk memperoleh isolat yang diinginkan. Supernatan hasil sentrifuge diuapkan hingga semua pelarutnya menguap dan diperoleh hasil isolat KLTP sebesar 4,6 mg. Isolat tersebut akan digunakan untuk uji aktivitas antikanker pada sel kanker payudara T47D.

#### **4.8 Uji Aktivitas Antikanker secara *In Vitro* terhadap Sel Kanker Payudara T47D**

Uji aktivitas antikanker ini dilakukan untuk mengetahui potensi dari ekstrak metanol, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid dalam menghambat kanker dengan berbagai macam konsentrasi. Uji aktivitas antikanker ini dilakukan secara *in-vitro* terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode MTT (*Microculture tetrazolium*). Metode MTT merupakan pengujian aktivitas sel berdasarkan perubahan warna pada *bio-reduction* garam tetrazolium ke formazan (Goodwin, dkk., 1995).

Pengujian aktivitas antikanker ini melalui beberapa tahapan yaitu : 1) penyiapan sel kanker, 2) panen sel, 3) uji sitotoksitas, 4) pemberian reagen MTT dan 5) pembacaan absorbansi menggunakan *ELISA Reader*. Penyiapan sel kanker merupakan tahapan menghidupkan sel kembali yang telah ditidurkan (inaktif sel) serta ditumbuhkan kembali hingga sel mencapai konfluen (70 – 80 %). Konfluenitas sel merupakan tumbuhnya sel secara merata atau homogen sebagai

sel monolayer sampai menutupi *cover glass*. Sel dikatakan konfluen apabila sel sudah menempel dan berkembang memenuhi wadah kultur (Djati, 2006).

Panen sel adalah tahapan penumbuhan dan perkembangbiakan 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 dalam penelitian ini adalah RPMI karena mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, glukosa dan serum. Serum yang digunakan adalah PBS (*Fetal Bovine Serum*), yang mengandung hormon yang dapat memacu pertumbuhan sel, albumin sebagai protein transport, lipid yang diperlukan sel untuk pertumbuhannya dan mineral sebagai kofaktor enzim (Freshney, 2000).

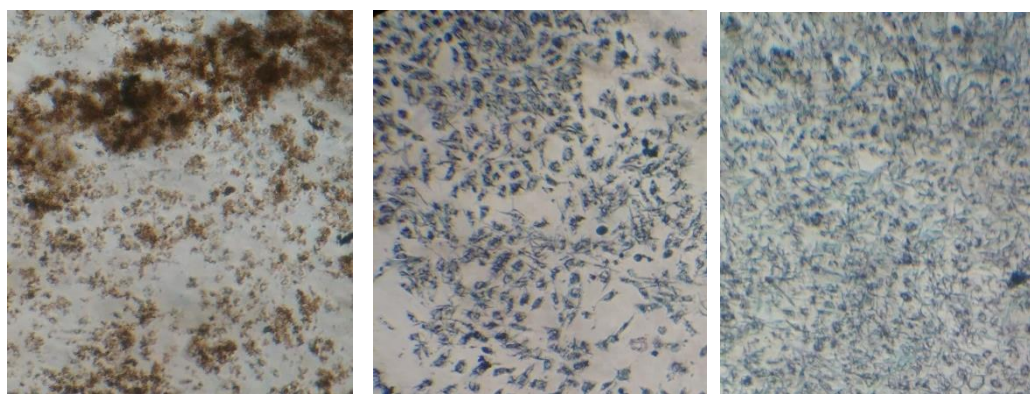
Tahapan panen sel, sel akan menempel pada dasar wadah kultur (*culture dish*) karena mempunyai sifat adhesif yaitu mampu melekat pada substrat, sehingga untuk melepaskan sel yang menempel perlu ditambahkan tripsin. Morfologi sel T47D ketika menempel pada wadah kultur terlihat lonjong seperti daun. Sedangkan sel yang lepas dari wadah kultur akan berbentuk bulat-bulat dan terlihat mengapung dipermukaan.

Sebelum pemberian tripsin pada wadah kultur, media kultur terlebih dahulu dibuang dan ditambahkan dengan PBS sebagai pencuci wadah kultur dari media yang mengandung serum FBS. Serum FBS merupakan serum yang 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). Tahapan



perhitungan sel dilakukan dengan menggunakan bantuan alat *hemocytometer* dengan pengamatan dibawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui jumlah sel yang akan dipaka uji sitotoksisitas. Hasil perhitungan sel yang diperoleh adalah  $191,5 \times 10^4$ /mL.

Tahapan uji sitotoksik meliputi preparasi sampel dan *treatment sel*. Ekstrak dan isolat memiliki perbedaan kepolaran jika dilarutkan dalam DMSO. Dimetilsulfoksida (DMSO) merupakan cairan tak berwarna yang memiliki rumus  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ , pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar (Morshed, dkk., 2012). Pengamatan morfologi sel setelah di lakukan *treatment* diamati dibawah mikroskop *inverted* pada masing-masing ekstrak dari konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5; 31,25; 15,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  jumlah sel yang mati lebih banyak jika dibandingkan dengan jumlah sel yang mati pada konsentrasi yang lebih rendah. Sel mati akan terlihat berbentuk bulat jernih dan sel hidup akan terlihat lonjong seperti daun. Hal ini terlihat pada Gambar 4.5



Gambar 4.29 Penampakan morfologi sel T47D setelah ditreatment (a) ekstrak dengan konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (b) ekstrak dengan konsentrasi 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan (c) ekstrak dengan konsentrasi 15,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dibawah mikroskop optik.

Berdasarkan Gambar 4.5 dapat diketahui sel yang mati akan berbentuk bulat dan cenderung tersebar, sedangkan sel yang hidup akan berbentuk seperti jarum yang saling berdempetan dengan sel lain. Hasil dari penampakan morfologi tersebut tidak dapat diamati dengan kasat mata, tetapi harus ditambahkan dengan reagen MTT untuk dapat diketahui jumlah sel yang hidup dan mati. Uji MTT terjadi reaksi kalorimetri. Sel yang masih hidup akan mampu mengabsorbansi garam tetrazolium (reagen MTT) dan dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel, sehingga akan terjadi perubahan warna yang awalnya garam MTT berwarna kuning akan berubah menjadi ungu (formazan), sedangkan sel yang mati akan tetap berwarna kuning.

Formazan merupakan zat berwarna ungu yang tidak larut dalam air sehingga perlu ditambahkan dengan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Intensitas warna ungu tersebut akan diukur nilai absorbansinya menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Penggunaan panjang gelombang 595 nm karena warna yang tampak pada larutan adalah ungu kebiruan yang akan menyerap warna kuning dari spektrum sinar tampak (Effendy, 2007). *Output* data yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup, yang artinya dari nilai absorbansi sudah dapat diketahui potensi sampel dalam menghambat kanker karena semakin besar nilai absorbansi maka semakin banyak jumlah sel yang hidup (Meiyanto, dkk, 1999).

Nilai absorbansi yang diperoleh untuk perlakuan dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 61,25; 31,25; 15,625  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak kasar metanol antara 0,362 – 0,78, *crude* alkaloid rentang 0,113 – 0,8, isolat alkaloid 0,13 – 0,709.

Perhitungan prosentase sel hidup tiap sampel ditunjukkan pada lampiran dan dianalisis menggunakan SPSS probit untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  tiap sampel. Adapun hasil  $IC_{50}$  tiap sampel ditunjukkan pada Tabel 4.8 dan Lamiran 4.3

Tabel 4.8 Data nilai  $IC_{50}$  uji aktivitas antikanker

Sampel	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ekstrak kasar metanol	920, 670
Ekstrak kasar alkaloid	611,708
Isolat alkaloid	303,061

Berdasarkan Tabel 4.4 dapat diketahui bahwa semua sampel memiliki nilai  $IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi sel. Sehingga semakin kecil nilai  $IC_{50}$  sampel maka sampel tersebut semakin toksik. Sifat sitotoksik memiliki tiga tingkatan menurut *National Cancer Institute* (NCI), yaitu sangat aktif apabila nilai  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ , moderate aktif dengan nilai  $IC_{50} 30 - 100 \mu\text{g/mL}$ , dan nilai  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  dinyatakan tidak aktif (NCI dalam Rahmawati, dkk., 2013). Didapatkan hasil nilai  $IC_{50}$  penelitian ini tidak toksik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D.

Isolat alkaloid memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil jika dibandingkan dengan ekstrak metanol dan ekstrak hasil partisi. Hal ini diduga karena perbedaan jumlah kadar senyawa alkaloid dalam 1 gram isolat dengan senyawa alkaloid dalam 1 gram ekstrak. Kadar senyawa alkaloid yang berbeda dapat menyebabkan penurunan aktivitas senyawa sehingga menyebabkan aktivitas antikanker ekstrak metanol dan ekstrak hasil partisi memiliki nilai  $IC_{50}$  lebih besar jika dibandingkan dengan isolat alkaloid.

#### 4.9 Pemanfaatan Tanaman Anting-anting sebagai Obat dalam Perspektif Islam

Penelitian ini mengkaji tentang metabolit sekunder yang ada dalam tanaman anting-anting sebagai antikanker. Mengkaji lebih lanjut tentang ciptaanNya merupakan salah satu bentuk ibadah kepada Allah SWT yakni dengan cara menjalankan perintahNya untuk mencari ilmu dan mengamati kebesaran dan kekuasaan Allah atas segala yang telah diciptakan. Menurut imam al Ghazali jalan untuk mengenal Allah dan mengagungkanNya adalah memikirkan hikmah yang terkandung dalam setiap ciptaanNya. Memikirkan dan merenungkan keajaiban serta memahami hikmah yang terkandung dalam setiap segala yang ada. Allah memberikan gelar *Ulul Albab* pada orang yang berfikir melalui aspek mata akal (fikir dan nadzar), jalan observasi (pengamatan), mata hati (dzikir) dan intropeksi (muhasabah, pengayatan dan perenungan) (Syafuruddin dalam Ahmad, 2003). Sebagaimana firman Allah dalam surat al Imran ayat 190 yang berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾

Artinya : “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silihbergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*” (QS. al Imran: 190).

*Ulul Albab* adalah orang-orang yang menggunakan pikirannya dalam mengambil faedah serta hidayah dariNya, memikirkan tentang kejadian langit dan bumi beserta manfaat dan rahasia yang terkandung didalamnya yang menunjukkan betapa sempurnanya ilmu Allah, serta mampu mengambil hikmah dari segala ciptaan Allah (al Maraghi, 1992).

Maha Sempurna dan Maha Kuasa Allah atas segala yang diciptakan Allah. Segala apa yang ada di bumi ini hanya untuk kemaslahatan hidup manusia atas kasih sayang Allah kepada hambaNya. Allah SWT berfirman dalam surat al Jatsiyah ayat 13:

وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمٰوٰتِ وَمَا فِي الْاَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُۥٓ اِنَّ فِيْ ذٰلِكَ لٰآيٰتٍ لِّقَوْمٍ يَّتَفَكَّرُوْنَ

Artinya : *“Dan Dia telah menundukkan untukmu apa yang di langit dan apa yang di bumi semuanya, (sebagai rahmat) daripada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir”* (QS. al Jatsiyah: 13).

Berdasarkan surat al Jatsiyah ayat 13, Allah telah mencitakan segala sesuatu untuk kemaslahatan manusia supaya manusia mempunyai penghidupan yang cukup. Diantara makhluk-makhluk Allah dilangit yang diciptakan untuk manusia adalah matahari, bulan, bintang, hujan, awan dan angin. Sedangkan di bumi adalah gunung, binatang, tumbuhan yang semuanya merupakan Rahmat Allah. Sementara itu, dalam surat lain disebutkan bahwa Allah menciptakan tumbuh-tumbuhan yang baik dengan segala manfaat dan kandungan yang dimilikinya. Allah berfirman dalam surat Luqman ayat 10 yang berbunyi:

خَلَقَ السَّمٰوٰتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَّرَوْنَہَا وَاَلْقٰی فِي الْاَرْضِ رَوْسٰی اَنْ تَمِیْدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيْہَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ  
وَاَنْزَلْنَا مِنَ السَّمٰءِ مَآءً فَاَنْبَتْنَا فِيْہَا مِنْ كُلِّ رَوْحٍ كَرِیْمٍ ﴿۱۰﴾

Artinya: *“Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik”* (QS. Luqman: 10).

Ayat tersebut memaparkan tentang kekuasaan dan kehebatannya sekaligus sebagai bukti keperkasaannya. Tafsir Al-Mishbah menjelaskan bahwa Allah menumbuhkan dari berbagai macam tumbuhan yang baik, yaitu subur dan bermanfaat. Kata *كريم* yang terdapat dalam surat Luqman ayat 10 tersebut digunakan untuk menyifati segala sesuatu yang baik sesuai obyeknya. Pasangan tumbuhan yang *كريم* adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamannya (Shihab, 2002). Salah satu hasil yang diharapkan dari tanaman adalah pemanfaatannya yang dapat digunakan sebagai obat. Seperti halnya salah satu tumbuhan yang bermanfaat sebagai obat adalah tanaman anting-anting yang bermanfaat sebagai anti inflamasi, hepatoprotektif, antifungi, antitusif dan antibakteri (Jagatheeswari, dkk., dalam Nariko, 2013), antimalaria (Hayati, dkk., 2012). Anting-anting juga memiliki potensi sebagai antikanker namun dengan aktivitas yang rendah. Hal ini telah dibuktikan melalui penelitian uji aktivitas antikanker payudara T47D dari ekstrak metanol, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid. Hasilnya diperoleh nilai  $IC_{50}$  pada ekstrak kasar 920,670  $\mu\text{g/mL}$ , ekstrak kasar alkaloid 611,708  $\mu\text{g/mL}$  dan isolat alkaloid 303,061  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai  $IC_{50}$  semakin kecil menunjukkan semakin baik dalam menghambat sel kanker, sehingga dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwasannya Allah menciptakan segala sesuatu di alam ini tidaklah sia-sia, dan membuktikan bahwa Allah maha adil.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Hasil identifikasi senyawa alkaloid dengan instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS) menunjukkan bahwa dalam ekstrak kasar alkaloid diduga mengandung golongan senyawa alkaloid yang identik dengan senyawa trigonelin, berberin, penacetin, N-metil nikotinium, coptisin, evosantin, 4-aminonaptalimid, palmatin, dauricin, lysergol, dan jatrorrhizin.
2. Aktivitas antikanker pada sel kanker payudara T47D pada tanaman anting-anting dinyatakan tidak toksik dengan didapatkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak kasar, ekstrak kasar alkaloid dan isolat alkaloid berturut-turut 920,670; 611,708; 303,061  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **5.2 Saran**

1. Melakukan pemisahan senyawa lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi kolom untuk diujikan dengan sel kanker payudara T47D.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap sel kanker yang lain, karena berdasarkan identifikasi menggunakan UPLC-MS didapatkan senyawa yang identik dengan senyawa berberin yang merupakan golongan senyawa alkaloid yang dilaporkan memiliki aktivitas antikanker pada kanker usus besar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, D.J. 2003. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery 6<sup>th</sup> Edition Volume 5: Chemotherapeutic Agents. A John Wiley and Sons Inc, Virginia. 744, 758, 766.
- Al-Maraghi, A. M. 1992. *Terjemahan Tafsir Al-Maraghi Jilid 14*. Semarang. CV: Toha Ptra Semarang
- Al Qarni, 'A. 2008. *Tafsir Muyassar Jilid 4 Juz 24-30*. Jakarta: Qisthi Press.
- Anggraini, P. 2008. *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (Piper cubeba L.) Terhadap Sel Hela*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Amalina, N. 2008. Uji sitotoksik Ekstrak Etanol 70 % Buah Merica Hitam (*Piper nigrum* L) Terhadap Sel Hela. Surakarta : Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Anderson, E.T. dan McFarlane, J. 2006. *Buku Ajar Keperawatan Komunitas: Teori dan Praktek (edisi 3)*. Jakarta: EGC.
- Ash Shiddieqy, T.M.H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Asmuddin. 2004. Peran Gen p16 Pada Siklus Sel Terhadap Pembentukan Kanker. *JKM*. 4(1): 63-73.
- Azmahani, dkk. 2002. *In Vitro Anti Bacterial and Anti Fungal Properties of Acalypha Indica (Kucing Galak)*. Proceedings of The Regional Symposium on Environment and Natural Resources. Department of Biomedical Sciences, Faculty Medicine and Health Sciences, University Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan. Malaysia.
- Bambang, S. T. 2009. *Metode Dasar Kultur Jaringan Hewan*. Jakarta: Universitas Trisakti.
- Baraja, M.2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Ficus Elastica Noies ex Blume terhadap Artemia salina Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi Diterbitkan*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Basmal, J., Amini, S., Sugiyono, & Murniyati. 2009. *Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta.
- Bernasconi, G. 1995. *Teknologi Kimia Jilid 2*. Edisi Pertama. Jakarta. PT. Pradaya Paramita.



- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J., & Speirs, V. 2003. Breast cancer cell lines : friend or foe ? *Breast Cancer Research*, 5, 89–95. doi:10.1186/bcr577.
- CCRC. 2009. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, UGM.
- Dinda. 2008. Ekstraksi. <http://www.mediafarma.com/ekstraksi>. Diakses pada tanggal 5 Juni 2013.
- Ding, Bo., Zhou, Tingting., Fan, Guorong., Hong, Zhanying., Wang, W.T., 2007. Qualitative and Quantitative Determination of Ten Alkaloids in Traditional Chinese Medicine *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD. 45: 219 – 226.
- Cheong, W.J. 2005. Determination Of Catechin Compounds In Korea Green Tea Infusions Under Various Extraction Conditions By High Performance Liquid Chromatography. Department of Chemistry and Institute of Basic Research. Inha University, Bull. Korea chem.sec.2005.vol.26, no.5.
- Dalimartha. 2004. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 2*. Jakarta: PT. Pustaka Pembangunan.
- Djarwis, D. 2004. Teknik Penelitian Kimia Organik Bahan Alam, Workshop Peningkatan Sumber Daya Manusia Penelitian dan Pengelolaan Sumber Daya Hutan yang Berkelanjutan. Pelaksana Kelompok Kimia Organik Bahan Alam Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas Padang kerjasama dengan Proyek Peningkatan Sumber Daya Manusia DITJEN DIKTI DEPDKNAS Jakarta.
- Djati, M.S. 2006. *Teknologi Manipulasi dan Kultur Sel Jaringan Hewan*. Malang: UB Press.
- Diasyti, P., Harlia., Sayekti, E. 2013. Karakterisasi Senyawa Alkaloid Dari Fraksi Etil Asetat Daun Kesum (*Polygonum minus* Huds). *JKK*. 2(3): 142-147.
- Doyle, A., Griffiths, J.B., dan Newell, D.G. 2000. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Edisi ke III. New York: John Wiley & Son.
- Effendy. 2007. *Perspektif Baru Kimia Koordinasi Jilid I*. Malang: Banyu Media Publishing.
- Ellis, E.O., Schnitt, S.J., S.-Garau, X., Bussolati, G., Tavassaoli, F.A., Eusebi, V. 2003. *Pathology and Genetic of Tumours of The Breast and Female Genital Organs / WHO Classification of Tumours*. Washington: IARC Press.

- Fattah, A. B. A. B. A. 2010. *Shahih Thibbun Nabawi Panduan dan Metode Pengobatan Nabi SAW*. Buku. Jakarta: Pustaka Imam Ahmad.
- Fessenden, R.J dan Fessenden, J. S, 1994. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 2*. Jakarta: Erlangga.
- Fowler. M.W. 1983. Commercial Application and Economic Aspect of Mass Plant Cell Culture. Plant Biotechnology. Cambridge University Press. England.
- Freshney, I.R. 2000. Culture of animal cells, a manual of basic technique. John Wiley & Sons Inc. Publ, New York.
- Gandjar, I. B., dan Rohman. A. 2008. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Ginting, M.K. 2012. Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat dalam Urin sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena. *Skripsi*. Depok: Program Studi Kimia FMIPA Universitas Indonesia.
- 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 Immunol Methods*, Vol. 197, No. 1, Hal: 95 – 103.
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi. edisi kedua. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata*. Bandung: Penerbit ITB.
- Halimah N. 2010. *Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-anting (Acalypha indica Linn) Terhadap Larva Udang (Artemia salina Leach)*. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah: Padmawinata K, Soedira I. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: Phytochemical methods.
- Hayati, E.K., dan Halimah, N. 2010. Phytochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach Of Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) Plant Extract. 1(2): 53-103.
- Hayati, E.K., Jannah, A., Ningsih, R., 2012. Identifikasi Senyawa Dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* L.). *Molekul*. 7(1): 20-32.

- Heredia, T., Adams, D., Fields, K., Held, P., dan Herberston, J. 2006. Evaluation of a Comprehensive Red Wine Phenolics Assay Usin a Microplate Reader. *Am. J. Enol. Vit.*, 57(4), 497-502.
- Husna, N.A. 2011. Identifikasi Senyawa Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) dan Uji Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Pada Hewan Uji. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ilhamy, F.Y. 2013. Uji Efek Sitotoksik Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol Akar Asam Kandis (*Garcinia Cowa* Roxb.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D dengan Metoda MTT. *Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik III*. ISSN: 2339-2592.
- Isparning, I.Y., Puspitasari, E., dan Pangaribowo, D.A. 2015. Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Daun (*Arcangelisia flava*) Pada Sel Kanker Payudara MCF-7. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Karsiwi, D.P., Solichatun., Anggarwulan., E. 2003. Pertumbuhan, Kadar Klorofil-Karotenoid, Saponin, Aktivitas Nitrat reduktase Anting-Anting (*Acalypha indica* L.) pada Konsentrasi Asam Giberelat ( $GA_3$ ) yang Berbeda. *Biofarmasi*, 2 (1): 1-8.
- Kartesz, J. 2000. *Acalypha indica*. The Plants Database, database (version 5.1.1), National Plant Data Center, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. <http://plants.usda.gov>. Diakses tanggal 08 Januari 2010.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kristanti, novi, 2008. *Buku ajar fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumala S, Siswanto E.B. 2007. Isolation and screening of endophytic from *Morinda citrifolia* and their ability to produce anti-microbial substance. *Microbiol Indones* 1(3): 145-148.
- Lenny, S. 2006. *Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Brine Shrimp*. Jurnal. Medan: USU.
- Lutfilla, M. 2008. Karakterisasi Senyawa Alkaloid Hasil Isolasi dari Kulit Batang Angsret serta Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri Secara *In Vitro*. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya
- Mamidala., Paindla. 2014. Phytochemical and Chromatographic Studies in the Leaves Extract of *Achalipha Indica* Linn. *Online International Interdisciplinary Research Journal vol. IV*

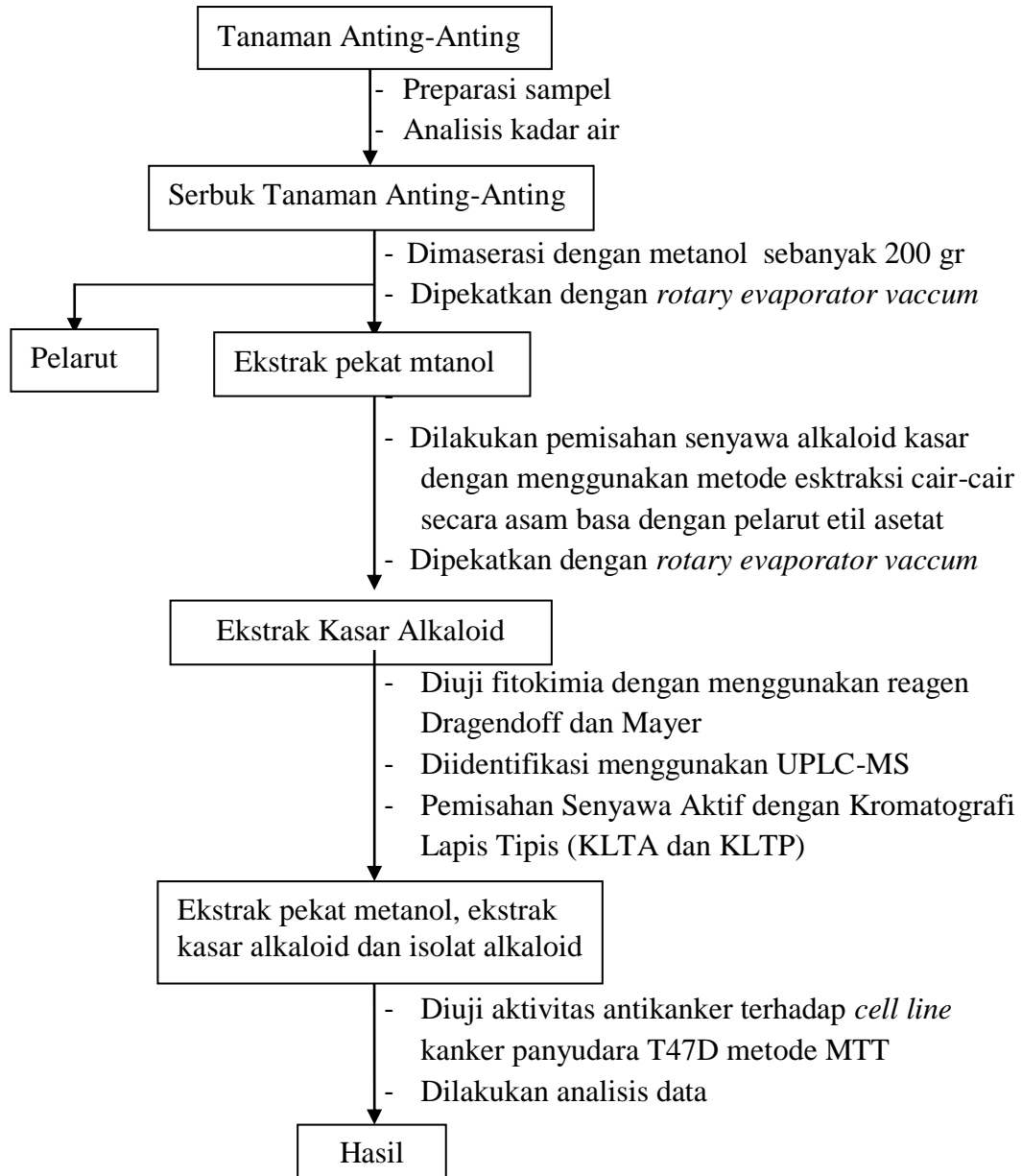
- Marliana, S.D., Suryanti, V., Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3 (1):26-31.
- Meiyanto, M., Kudo, G., Lee, Y., Yang, T.J., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J. 1999. Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 274. 23963-23968.
- Meloan, C.E. 1999. *Chemical Separations: Principles, Techniques and Experiments*. Jhon Willey and Sons, Inc. New York.
- Minarti, D.P., Kardono, L.B.S., Wahyudi, B., 2002. Penapisan Kimia Senyawa Alkaloid Dalam Ekstrak Daun Johar (*Cassia siamea* L.). Pusat Penelitian LIPI. Jakarta
- Muadifah, A. 2013. Efektivitas Antimalaria dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol 80 % Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) Pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Muhtadi, 2008. Pemisahan Fraksi dan Senyawa-senyawa yang Berkhasiat Antiplasmodium dari Ekstrak Metanol Kulit Kayu Mimba (*Azadirachta indica* Juss). Surakarta: Fakultas Farmasi: Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi Vol 9, No. 2 Hal. 117 – 136.
- Multiawati, N. 2013. Uji Antikanker Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Helixanthera sessiliflora* (Merr.) Denser) Terhadap Cell Line Kanker Payudara T47D. *Skripsi*. Yogyakarta: Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga.
- Mulyani, N., 2013. *Kanker Payudara dan PMS dalam Kehamilan*. Nuha Medica. Yogyakarta.
- Mulyono. 2009. *Kamus kimia*. Jakarta: Bumi Aksara
- Murti, H., Boediono, A., Setiawan, B., dan Sandra F. 2007. Regulasi Siklus Sel: Kunci Sukses *Somatic Cell Nuclear Transfer*. *Journal*. 34(6): 312-316.
- Muslimah, S. 2008. *Uji Sitotoksik Fraksi Protein daun dan bunga kucing-kucingan (Acalypha Indica L.) Terhadap sel Myeloma*. *Skripsi* Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Montgomery, R. 1993. *Biokimia Suatu Pendekatan Berorientasi Kasus*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Method*. Volume 16;65 (1-2), 55-63.
- Nariko, N. 2013. Potensi Daun The (*Camellia sinensis*) dan Daun Anting-anting (*Acalypha indica* L.) dalam Menghambat Pertumbuhan *Salmonella typhi*. *Jurnal Al-Azhar Indonesia*. 2(2). 104 – 110.
- National Cancer Institute. 2001. *Measuring Cancer Death*, Cited from <http://www.cancer.gov/csr> diakses pada Maret 2007. Dalam : Rahmawati, Emma, dkk. 2013. Aktivitas Antikanker Ekstrak n-Heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn) terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Media Farmasi* Vol. 10 No.2.
- Obie. 2011. Hubungan Struktur Aktivitas Obat Antikanker. <http://www.obie.blogspot.com>. Diakses tanggal 25 April 2014.
- Porth, C. M. & Matfin, G. 2005. *Pathofisiologi, Concepts of Altered Health States*. (8<sup>th</sup>.ed). Philadelphia : Lipincott Williams and Wilkins.
- Praveena, A., Suriyavathana, M., 2014. *In Vitro* Cytotoxcity of The Crude Alkaloids Of *Toddalia Asiatica*. L. Against The Human Liver Cancer Cell Lines (HEP G2) and Normal Liver Cell Lines (LO2). 3 (3): 1781-1788.
- Rahmah, Rochisotur. 2014. Isolasi dan Uji Efektivitas Antimalarial Isolat Senyawa Alkaloid Tanaman Anting-anting Secara *In Vivo* Pada Mencit Jantan. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahmawati, Emma, dkk. 2013. Aktivitas Antikanker Ekstrak n-Heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn) terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Media Farmasi* Vol. 10 No.2.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Sastrohamidjojo,Hardjono.2001. *Dasar-Dasar Spektroskopi*. Yogyakarta Universitas Gadjah Mada (UGM).
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol.7,8 dan 10. Jakarta: Penerbit Lentera Hati
- Sriwahyuni, Ika. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* Linn) Dengan Variasi Pelarut Dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach). *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Sukmarianti, Sri, W.N., Suaniti, M.N., Swantara, D.M.I. 2013. Identifikasi Dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Spons *Ianthella basta* Terhadap *Larva Artemia salina* L. 1(1): 14-19.
- Titis, Muhammad, B.M., Fachriyah, E., Kusriani, D. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Alkaloid Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steeniss). 1(1): 196-201.
- Tukiran., S., dan Hidayati, N. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Heksana, Kloroform dan Metanol Pada Tumbuhan Andong (*Cordyline fruticosa*), Anting-Anting (*Acalypha indica*), dan Alang-Alang (*Imperata cylindrical*). nomor: 097/ UN38/ HK/ LT/ 2004. 1-6.
- Voight, R.1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandi, Apt. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada press.
- Wang, Daowu., Liu, Zhiqiang., Guo, Mingquan., dan Liu, Shuying., 2004. Structural Elucidation and Identification of Alkaloid in Rhizoma Coptidis by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. 39: 1356 – 1365.
- Widodo, N. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid yang Terkandung dalam Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). Skripsi diterbitkan. Semarang. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang.
- Wijayakusuma, H. 2006. *Atasi asam urat dan rematik al hembring*. Jakarta: Niaga Swadaya.
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Wei-Feng, D., L. Zhong-Wen and S. Han-Dong. 1994. *A New Compound from Acalypha australis, Laboratory of Phytochemistry. Kunming Institute of Botany. Kunming 650204: Chiese Academy of Sciences.*
- World Health Organization. 2008. *Maintenance Manual for Laboratory Equipment* (2<sup>nd</sup> ed.). Geneva, Switzerland: WHO Press.
- Wonorahardjo, Surjani. 2013. *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia Permata

## LAMPIRAN 1

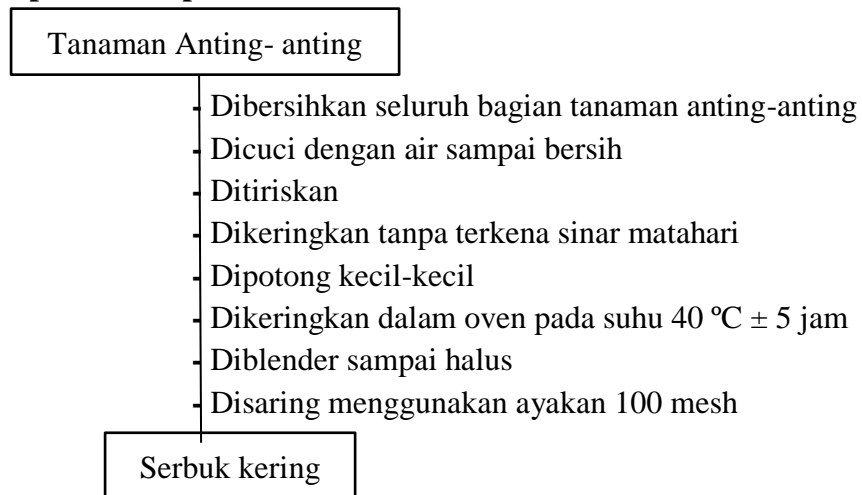
### L.1.1. Skema Kerja Penelitian



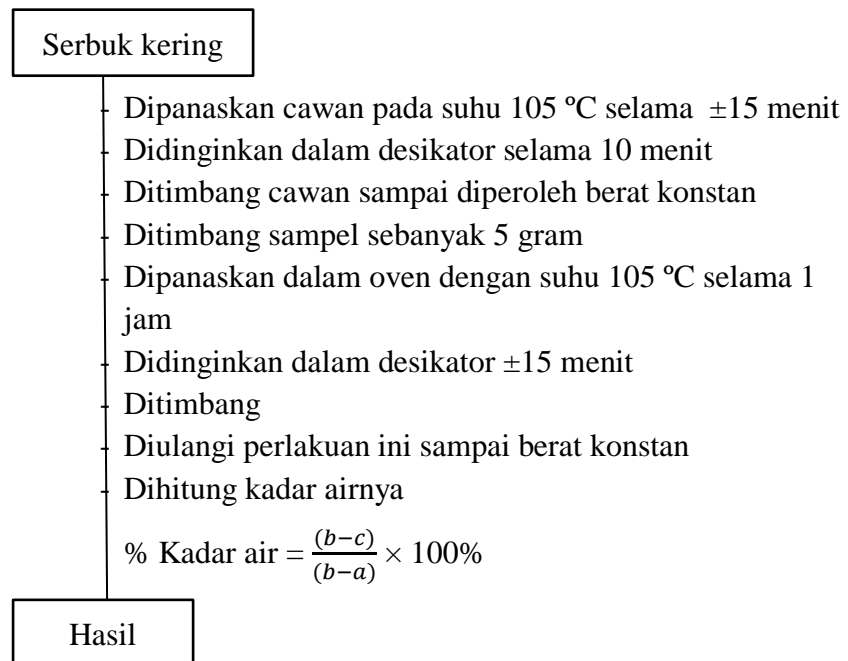
## LAMPIRAN 2

### Diagram Alir

#### L.2.1 Preparasi Sampel

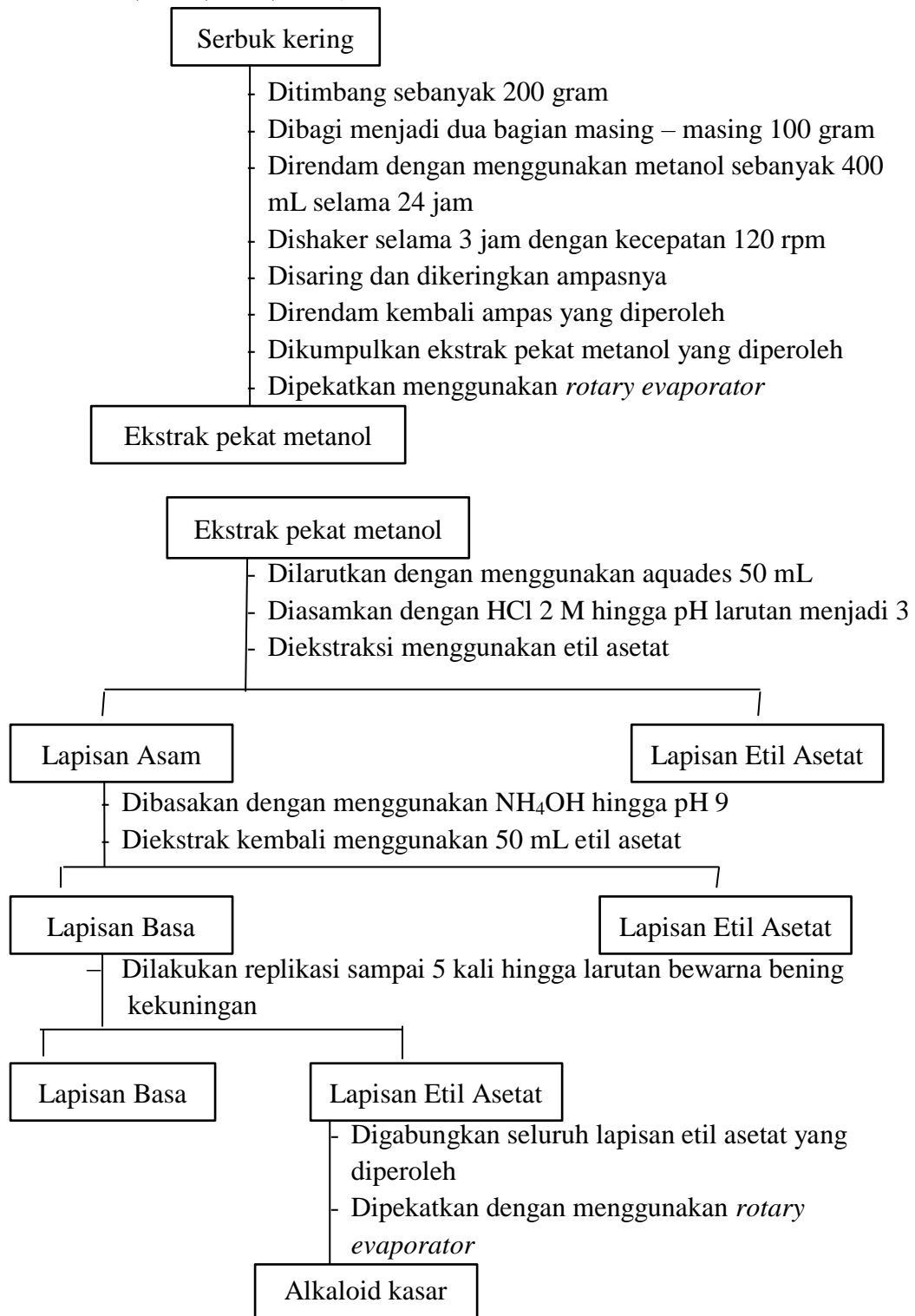


#### L.2.2 Analisis Kadar Air

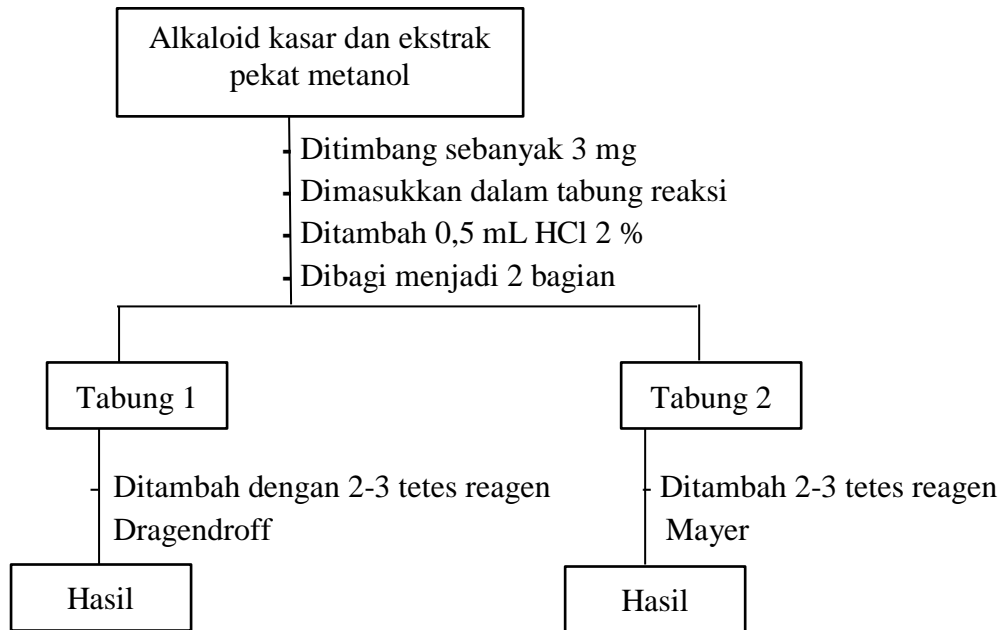




**L.2.3 Ekstraksi Secara Maserasi dan Penarikan Senyawa Alkaloid (Rohmah, 2014; Titis, dkk., 2013)**

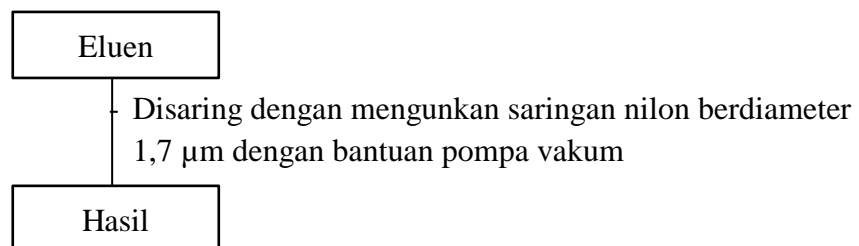


#### L.2.4 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid (Hayati dan Halimah, 2010)

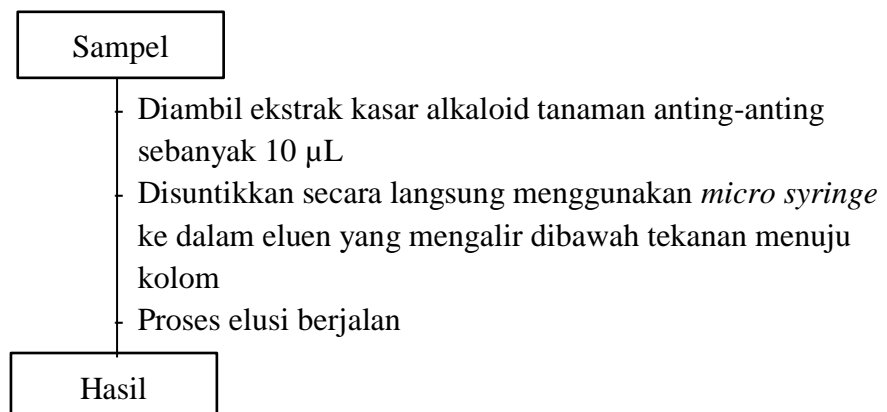


#### L.2.5 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Menggunakan UPLC-MS

##### a. Preparasi Eluen



##### b. Penyuntikan Sampel pada UPLC/DAD



**Parameter analisis yang digunakan dalam analisa adalah sebagai berikut:**

Alat : UPLC-QToF-MS/MS System (Waters) Pengolahan data menggunakan software MassLynk versi 4.1  
Column : Acquity UPLC BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1x50 mm  
Flow rate : 0,3 ml/min, injection 5 microliter (0,005 ml)  
Eluent : A. H<sub>2</sub>O+ 1 % formic acid; B. Acetonitrile + 0,1 % formic acid  
UPLC method : Gradient method

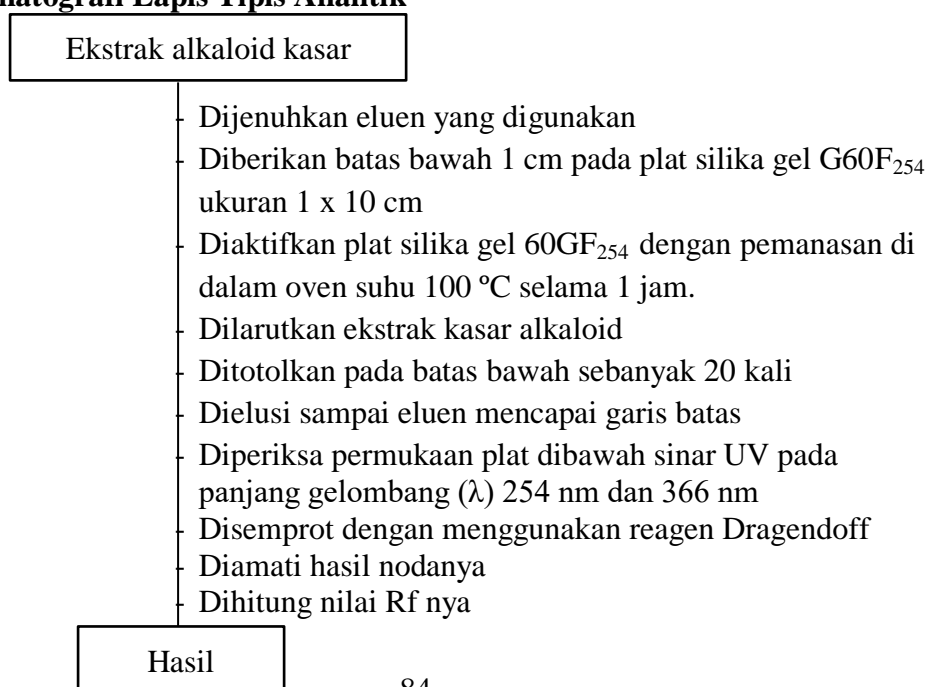
Time (min)	% A	% B
0	95	5
1	95	5
6	0	100
7	0	100
7,5	95	5
9	95	5

**Kondisi alat Spektroskopi Massa adalah sebagai berikut:**

Alat : XEVO – G2QTOF (Waters) ESI positive (resolution mode)  
Capillary voltage : 3 kV  
Sample cone voltage : 38 kV  
Cone gas : 16 L/h  
Desolvation temperature : 300 °C  
Source temperature : 110 °C  
Desolvation gas flow : 500 L/hour.

**L.2.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis**

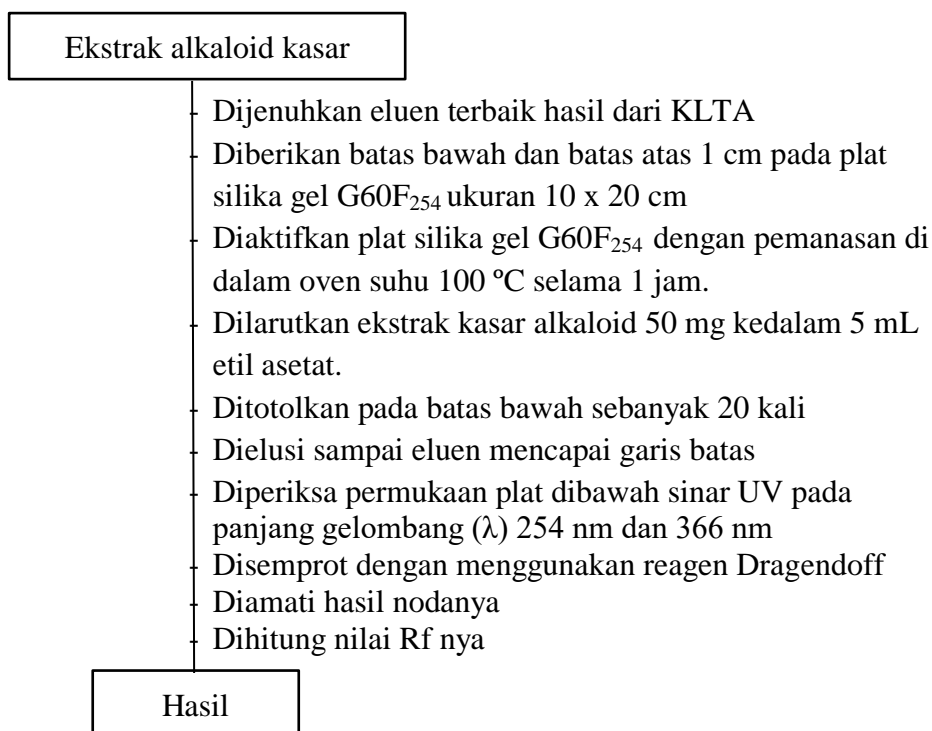
**a. Kromatografi Lapis Tipis Analitik**



Jenis-jenis fasa gerak yang digunakan.

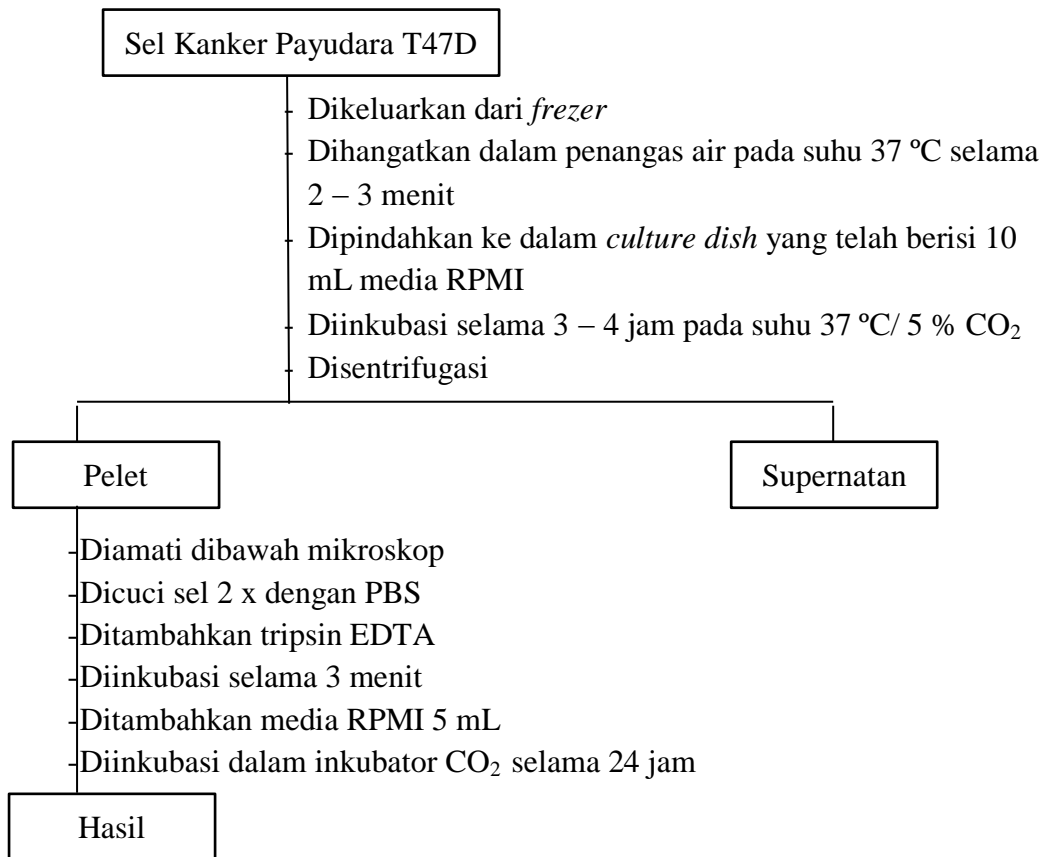
Golongan Senyawa	Fasa Gerak	Pendeteksi
Alkaloid	2. kloroform-metanol (9:1) 3. kloroform-metanol (9,5:0,5) 4. n-heksana: etil asetat (8:2)	Pereaksi Dragendorff

#### b. Kromatografi Lapis Tipis Preperatif (KLTP)

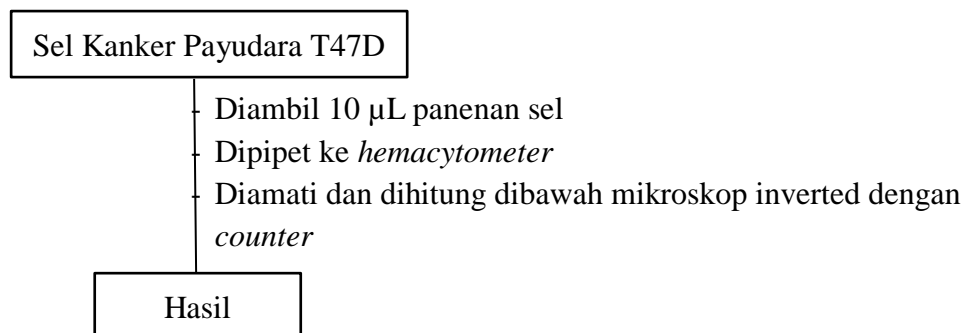


**L.2.7 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT (CCRC, 2009; Ilhamy, dkk. 2013)**

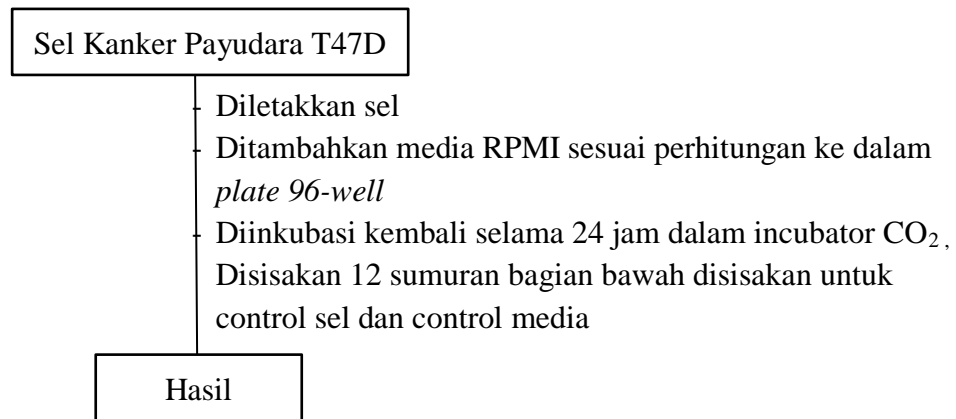
**a. Penyiapan Sel**



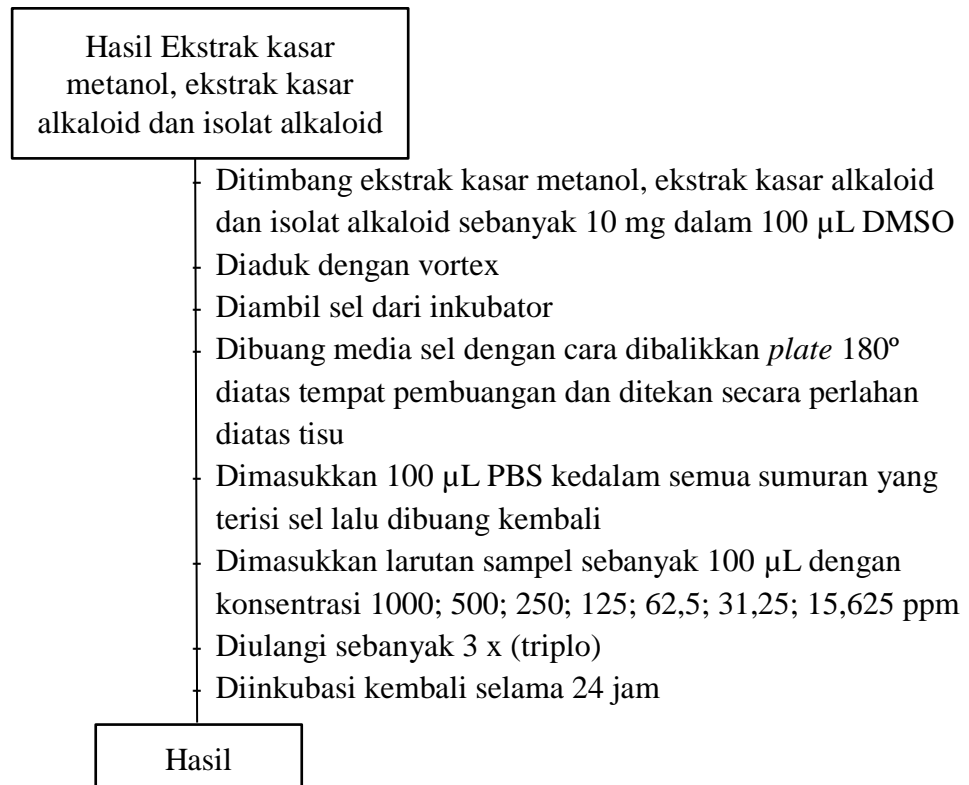
**b. Perhitungan Sel Kanker**



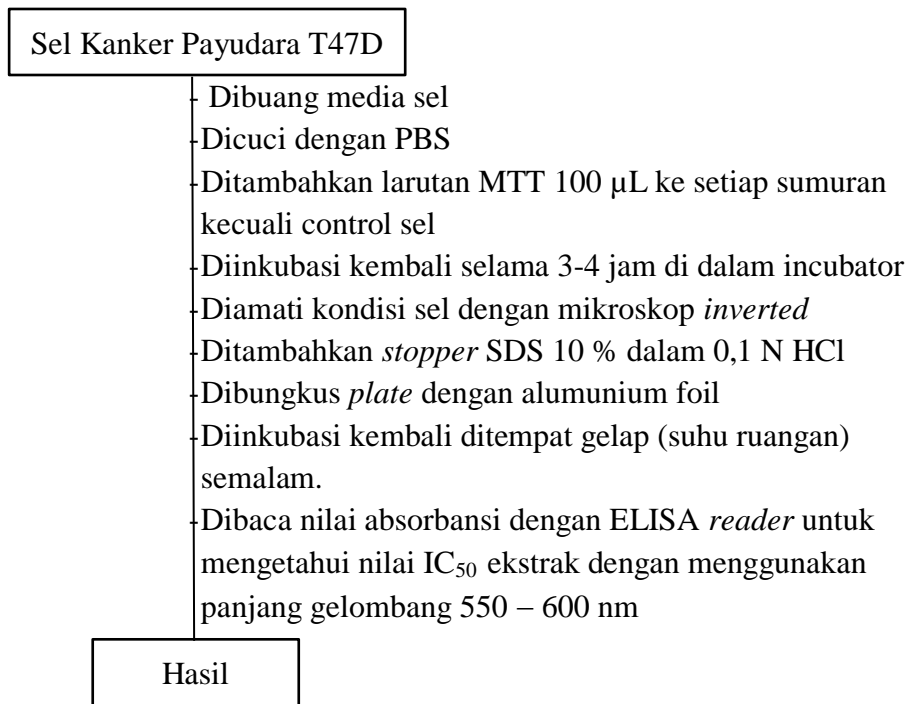
**c. Peletakan Sel pada *Plate***



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



**e. Pemberian Larutan MTT**



## LAMPIRAN 3

### Perhitungan Pembuatan Larutan

#### L.3.1. Pembuatan Larutan HCl 2 M

$$\begin{aligned} \text{BJ HCl pekat} &= 1,19 \text{ g/mL} \\ \text{Konsentrasi} &= 37 \% \\ \text{BM HCl} &= 36,59 \text{ g/mol} \\ \text{Molaritas HCl} &= \frac{10 \times \% \times \text{BJ HCl}}{\text{BM HCl pekat}} \\ &= \frac{10 \times 37 \% \times 1,19 \text{ g/mL}}{36,59 \text{ g/mol}} = 12,03 \text{ M} \end{aligned}$$

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

$$12,03 \text{ M} \times V_1 = 2 \text{ M} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 16,6 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37 % sebanyak 16,6 mL menggunakan pipet ukur 25 mL dan pengambilannya dilakukan di dalam lemari asap, kemudian larutan tersebut dimasukkan dalam labu ukur 100 mL yang telah berisi  $\pm 15$  mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

#### 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 asap, 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.3.3. Pembuatan Reagen Dragendorff

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

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

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan menimbang 0,6 g  $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dengan neraca analitik, kemudian serbuk tersebut dimasukkan dalam *beaker glass* 50 mL. Selanjutnya diambil larutan HCl pekat sebanyak 2 mL menggunakan pipet ukur 5 mL di dalam lemari asap. Kemudian dimasukkan 10 mL aquades dan larutan HCl pekat 2 mL ke dalam *beaker glass* untuk melarutkan serbuk dengan dibantu pengadukan. Larutan II dibuat dengan menimbang 6 g KI dengan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 mL. Kemudian ditambahkan 10 mL aquades ke dalam *beaker glass* untuk melarutkan serbuk dengan bantuan pengadukan. Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (Wagner, dkk., 2001).

### L.3.4. Pembuatan Reagen Mayer

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

Larutan II. KI 5 g dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan menimbang  $\text{HgCl}_2$  1,358 g dengan neraca analitik dan dimasukkan dalam *beaker glass* 50 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades 60 mL untuk melarutkan serbuk dengan bantuan pengadukan. Larutan II dibuat dengan menimbang KI 5 g dengan neraca analitik dan dimasukkan dalam *beaker glass* 50 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades 10 mL untuk melarutkan serbuk dengan bantuan pengadukan. Kemudian larutan II dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan larutan I dituangkan ke dalam larutan II. Selanjutnya diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL (Manan, 2006).

### L.3.5. Pembuatan Larutan SDS 10 %

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

Cara pembuatannya yakni ditimbang 10 gram SDS (*Sodium Deodecyl Sulphate*) dan dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL, lalu dilarutkan dalam 100 mL aquades.

### L.3.6 Pembuatan Larutan Stok MTT (5 mg/mL) (CCRC, 2009)

Ditimbang 50 mg serbuk MTT, dilarutkan dalam 10  $\mu\text{L}$  mL PBS dan diaduk dengan *vortex*.

### L.3.7 Pembuatan larutan stok 1000 ppm ekstrak anting-anting

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

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

$$M = \frac{10 \text{ mg}}{100 \mu\text{L}} = \frac{10000 \mu\text{g}}{100 \mu\text{L}} = 100000 \mu\text{g/mL}$$

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

$$1 \text{ ml} \times 1000 \mu\text{g/mL} = 100000 \mu\text{g/mL} \times V_2$$

$$V_2 = 0,01 \text{ mL} = 10 \mu\text{L}$$

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan mengambil 10  $\mu\text{L}$  ekstrak yang telah dilarutkan dengan 100  $\mu\text{L}$  DMSO menggunakan mikropipet, kemudian ditambahkan 990  $\mu\text{L}$  media kultur RMPI dan diresuspensi hingga homogen.

## Lampiran 4

### Data dan Perhitungan Hasil Penelitian

#### L.4.1 Perhitungan Kadar Air

- **Data Pengukuran Kadar Air Sampel Kering Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.)**

Ulangan perlakuan	Berat cawan kosong (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
<b>P1</b>	28,4261	30,4947	29,1355
<b>P2</b>	28,4261	30,4947	29,1355
<b>P3</b>	28,4261	30,4947	29,1355
<b>Rata-Rata Berat Konstan</b>	28,4261	30,4947	29,1355

Berat cawan + sampel sebelum dioven:

- Cawan 1 = 33, 4265 g
- Cawan 2 = 35, 4948 g
- Cawan 3 = 34, 1358 g

Ulangan perlakuan	Berat cawan + Sampel (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
<b>P1</b>	33, 1638	35, 1216	33, 8091
<b>P2</b>	33, 1640	35, 1218	33, 8095
<b>P3</b>	23, 1633	35, 1214	33, 8090
<b>Rata-rata berat konstan</b>	33, 1637	35, 1216	33, 8092

- **Perhitungan kadar air sampel kering anting-anting**

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

➤ **Ulangan ke 1**

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{(33,4265 - 33,1637)}{(33,4265 - 28,4261)} \times 100 \% \\ &= \frac{0,2628}{5,0004} \times 100 \% \\ &= 5,255 \%\end{aligned}$$

➤ **Ulangan ke 2**

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{(35,4948 - 35,1216)}{(35,4948 - 30,4947)} \times 100 \% \\ &= \frac{0,3732}{5,0001} \times 100 \% \\ &= 7,463 \%\end{aligned}$$

➤ **Ulangan ke 3**

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{(34,1358 - 33,8092)}{(34,1358 - 29,1355)} \times 100 \% \\ &= \frac{0,3266}{5,0003} \times 100 \% \\ &= 6,5316 \%\end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata kadar air} &= \frac{5,255 \% + 7,463 \% + 6,5316 \%}{3} \\ &= 6,4165 \%\end{aligned}$$

Kadar air yang terkandung pada sampel kering tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) pada setiap pengulangannya adalah:

Sampel	Kadar air yang terkandung dalam sampel			
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-Rata
Anting-anting	5,255 %	7,463 %	6,5316 %	6,4165 %

#### L.4.2 Perhitungan Rendemen

##### 1. Ekstrak Peekat Metanol

$$\begin{aligned}\text{Berat sampel} &= 300 \text{ g} \\ \text{Berat ekstrak pekat} &= 37,3202 \text{ g} \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ \% \text{ Rendemen} &= \frac{37,3202 \text{ g}}{300 \text{ g}} \times 100 \% = 12,44 \%\end{aligned}$$

## 2. Ekstrak Kasar Alkaloid

Berat sampel = 30 g

Berat ekstrak pekat = 0,3408 g

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

% Rendemen =  $\frac{0,3408 \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100 \% = 1,136 \%$

### 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	Kuadran B
Kuadran C	Kuadran D

➤ Jumlah sel yang dihitung ( $\text{mL}^{-1}$ )

$$\begin{aligned} &= \frac{\sum \text{sel kuadran A} + \sum \text{sel kuadran B} + \sum \text{sel kuadran C} + \sum \text{sel kuadran D}}{4} \times 10^4 \\ &= \frac{246 + 218 + 148 + 154}{4} \times 10^4 \\ &= 191,5 \times 10^4 / \text{mL} \end{aligned}$$

➤ Jumlah mL panen sel yang ditransfer (konsentrasi sel)

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung}} \\ &= \frac{100 \times 10^4}{191,5 \times 10^4 / \text{mL}} \\ &= 0,522 \text{ mL} = 0,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 0,6 mL, ditambahkan hingga 9,4 mL media kultur RPMI (MK) karena setiap sumuran akan diisi 100  $\mu\text{L}$  MK

berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100  $\mu$ L x

100 sumuran = 10000  $\mu$ L atau 10 mL.

## B. Perhitungan Prosentase Sel Hidup

### ➤ Data Uji aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

No.	Absorbansi kontrol sel	Absorbansi kontrol media
1.	0,805	0,102
2.	0,777	0,082
3.	0,738	0,083
<b>Rata –Rata:</b>	0,773	0,089

No.	Absorbansi kontrol sel	Absorbansi kontrol media
1.	0,729	0,116
2.	0,754	0,115
3.	0,783	0,118
<b>Rata –Rata:</b>	0,755	0,116

### 1. Ekstrak Kasar

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
1000 ppm	0.367	0.366	0.355	0.362	39,912
500 ppm	0.633	0.612	0.591	0.612	76,461
250 ppm	0.691	0.671	0,713	0.691	88,011
125 ppm	0.672	0.743	0,731	0.715	91,520
62,5 ppm	0.767	0.777	0,785	0.776	100,438
31,25 ppm	0.772	0.775	0,749	0.765	98,83
15,625 ppm	0.76	0.774	0,806	0.78	101,023

### ➤ 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)

- Konsentrasi 1000 → % *Hidup* =  $\frac{0.362-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \% = 39,912 \%$
- Konsentrasi 500 → % *Hidup* =  $\frac{0.612-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \% = 76,461 \%$
- Konsentrasi 250 → % *Hidup* =  $\frac{0.691-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \% = 88,011 \%$
- Konsentrasi 125 → % *Hidup* =  $\frac{0.715-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \% = 91,520 \%$
- Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* =  $\frac{0.776-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \% = 100,438 \%$
- Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* =  $\frac{0.765-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \% = 98,83 \%$
- Konsentrasi 15,625 → % *Hidup* =  $\frac{0.78-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \% = 101,023 \%$

**Confidence Limits**

	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> 0.01	17891.199	5214.214	402302.906	4.253	3.717	5.605
0.02	12637.181	4078.432	216662.804	4.102	3.610	5.336
0.03	10135.668	3488.082	146376.261	4.006	3.543	5.165
0.04	8585.931	3100.068	109014.023	3.934	3.491	5.037
0.05	7501.845	2815.880	85796.787	3.875	3.450	4.933
0.06	6687.655	2594.146	69987.258	3.825	3.414	4.845
0.07	6046.811	2413.776	58550.376	3.782	3.383	4.768
0.08	5525.299	2262.644	49911.994	3.742	3.355	4.698
0.09	5090.162	2133.173	43172.643	3.707	3.329	4.635
0.1	4719.973	2020.332	37780.523	3.674	3.305	4.577
0.15	3452.801	1611.101	21774.798	3.538	3.207	4.338
0.2	2693.193	1343.227	14080.006	3.430	3.128	4.149
0.25	2176.183	1147.035	9704.584	3.338	3.060	3.987
0.3	1797.061	993.418	6961.388	3.255	2.997	3.843
0.35	1504.971	867.566	5128.180	3.178	2.938	3.710

0.4	1271.832	760.934	3847.203	3.104	2.881	3.585
0.45	1080.702	668.123	2922.586	3.034	2.825	3.466
<b>0.5</b>	<b>920.670</b>	585.461	2238.960	2.964	2.767	3.350
0.55	784.335	510.277	1724.481	2.895	2.708	3.237
0.6	666.466	440.510	1332.417	2.824	2.644	3.125
0.65	563.222	374.504	1031.255	2.751	2.573	3.013
0.7	471.677	310.968	798.995	2.674	2.493	2.903
0.75	389.504	249.157	619.528	2.591	2.396	2.792
0.8	314.731	189.257	480.047	2.498	2.277	2.681
0.85	245.491	132.654	369.225	2.390	2.123	2.567
0.9	179.584	81.520	276.143	2.254	1.911	2.441
0.91	166.524	72.136	258.644	2.221	1.858	2.413
0.92	153.409	63.063	241.263	2.186	1.800	2.382
0.93	140.178	54.312	223.856	2.147	1.735	2.350
0.94	126.746	45.888	206.243	2.103	1.662	2.314
0.95	112.990	37.794	188.183	2.053	1.577	2.275
0.96	98.723	30.028	169.319	1.994	1.478	2.229
0.97	83.629	22.578	149.054	1.922	1.354	2.173
0.98	67.074	15.407	126.213	1.827	1.188	2.101
0.99	47.377	8.392	97.603	1.676	.924	1.989

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

## 2. Ekstrak Kasar Alkaloid

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	0.109	0.117	0,114		
1000 ppm	0.109	0.117	0,114	0.113	3,508
500 ppm	0.688	0.679	0,697	0.688	87,573
250 ppm	0.778	0.806	0,702	0.762	98,391
125 ppm	0.695	0.732	0,741	0.722	92,543
62,5 ppm	0.741	0.745	0,75	0.745	95,906
31,25 ppm	0.746	0.801	0,773	0.773	100
15,625 ppm	0.842	0.763	0,807	0.804	104,532



➤ **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)

- Konsentrasi 1000 → % *Hidup* =  $\frac{0.113-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \%$  = 3,508 %
- Konsentrasi 500 → % *Hidup* =  $\frac{0.688-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \%$  = 87,573 %
- Konsentrasi 250 → % *Hidup* =  $\frac{0.762-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \%$  = 98,391 %
- Konsentrasi 125 → % *Hidup* =  $\frac{0.722-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \%$  = 92,543 %
- Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* =  $\frac{0.745-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \%$  = 95,906 %
- Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* =  $\frac{0.773-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \%$  = 100 %
- Konsentrasi 15,625 → % *Hidup* =  $\frac{0.804-0.089}{0.773-0.089} \times 100 \%$  = 104,532 %

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> 0.01	4381.126	.	.	3.642	.	.
0.02	3478.507	.	.	3.541	.	.
0.03	3004.857	.	.	3.478	.	.
0.04	2691.554	.	.	3.430	.	.
0.05	2460.961	.	.	3.391	.	.
0.06	2280.322	.	.	3.358	.	.
0.07	2132.880	.	.	3.329	.	.
0.08	2008.971	.	.	3.303	.	.
0.09	1902.543	.	.	3.279	.	.

0.1	1809.566	.	.	3.258	.	.
0.15	1470.557	.	.	3.167	.	.
0.2	1247.037	.	.	3.096	.	.
0.25	1082.557	.	.	3.034	.	.
0.3	953.424	.	.	2.979	.	.
0.35	847.554	.	.	2.928	.	.
0.4	757.986	.	.	2.880	.	.
0.45	680.347	.	.	2.833	.	.
<b>0.5</b>	<b>611.708</b>	.	.	2.787	.	.
0.55	549.994	.	.	2.740	.	.
0.6	493.659	.	.	2.693	.	.
0.65	441.490	.	.	2.645	.	.
0.7	392.467	.	.	2.594	.	.
0.75	345.651	.	.	2.539	.	.
0.8	300.061	.	.	2.477	.	.
0.85	254.452	.	.	2.406	.	.
0.9	206.783	.	.	2.316	.	.
0.91	196.677	.	.	2.294	.	.
0.92	186.258	.	.	2.270	.	.
0.93	175.437	.	.	2.244	.	.
0.94	164.094	.	.	2.215	.	.
0.95	152.049	.	.	2.182	.	.
0.96	139.023	.	.	2.143	.	.
0.97	124.527	.	.	2.095	.	.
0.98	107.571	.	.	2.032	.	.
0.99	85.409	.	.	1.932	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

### 3. Isolat Alkaloid

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
1000 ppm	0.134	0.129	0,128	0.13	2, 19
500 ppm	0.119	0.132	0,127	0.126	1,512
250 ppm	0.762	0.728	0,697	0.729	95,879
125 ppm	0.773	0.806	0,795	0.791	105,633
62,5 ppm	0.707	0.723	0,753	0.727	95, 67
31,25 ppm	0.686	0.776	0,687	0.716	93,896
15,625 ppm	0.592	0.757	0,778	0.709	92, 749

#### ➤ 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)

– Konsentrasi 1000 ➔ % Hidup =  $\frac{0.13-0.116}{0.755-0.116} \times 100 \%$  = 2,19 %

– Konsentrasi 500 ➔ % Hidup =  $\frac{0.126-0.116}{0.775-0.116} \times 100 \%$  = 1,564 %

– Konsentrasi 250 ➔ % Hidup =  $\frac{0.729-0.116}{0.775-0.116} \times 100 \%$  = 95,931 %

– Konsentrasi 125 ➔ % Hidup =  $\frac{0.791-0.116}{0.775-0.116} \times 100 \%$  = 105,633 %

– Konsentrasi 62,5 ➔ % Hidup =  $\frac{0.727-0.116}{0.775-0.116} \times 100 \%$  = 95,618 %

– Konsentrasi 31,25 ➔ % Hidup =  $\frac{0.716-0.116}{0.775-0.116} \times 100 \%$  = 93,896 %

– Konsentrasi 15,625 ➔ % Hidup =  $\frac{0.709-0.116}{0.775-0.116} \times 100 \%$  = 92,801 %

**Confidence Limits**

	Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
		PROBIT <sup>a</sup>	0.01	1802.192	.	.	3.256
	0.02	1462.422	.	.	3.165	.	.
	0.03	1280.880	.	.	3.108	.	.
	0.04	1159.325	.	.	3.064	.	.
	0.05	1069.009	.	.	3.029	.	.
	0.06	997.701	.	.	2.999	.	.
	0.07	939.102	.	.	2.973	.	.
	0.08	889.560	.	.	2.949	.	.
	0.09	846.777	.	.	2.928	.	.
	0.1	809.216	.	.	2.908	.	.
	0.15	670.629	.	.	2.826	.	.
	0.2	577.622	.	.	2.762	.	.
	0.25	508.180	.	.	2.706	.	.
	0.3	452.964	.	.	2.656	.	.
	0.35	407.169	.	.	2.610	.	.
	0.4	368.002	.	.	2.566	.	.
	0.45	333.697	.	.	2.523	.	.
	<b>0.5</b>	<b>303.061</b>	.	.	2.482	.	.
	0.55	275.236	.	.	2.440	.	.
	0.6	249.579	.	.	2.397	.	.
	0.65	225.572	.	.	2.353	.	.
	0.7	202.766	.	.	2.307	.	.
	0.75	180.734	.	.	2.257	.	.
	0.8	159.007	.	.	2.201	.	.
	0.85	136.954	.	.	2.137	.	.

0.9	113.500	.	.	2.055	.	.
0.91	108.465	.	.	2.035	.	.
0.92	103.248	.	.	2.014	.	.
0.93	97.802	.	.	1.990	.	.
0.94	92.057	.	.	1.964	.	.
0.95	85.917	.	.	1.934	.	.
0.96	79.223	.	.	1.899	.	.
0.97	71.705	.	.	1.856	.	.
0.98	62.804	.	.	1.798	.	.
0.99	50.963	.	.	1.707	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

## LAMPIRAN 5

### L.5.1 Perhitungan Persen Luas Area

$$\% \text{ Luas Area} = \frac{\text{Area Puncak 1}}{\sum \text{Area Puncak}} \times 100 \%$$

1. Puncak 1 =  $\frac{144}{7901} \times 100 \% = 1,822 \%$

2. Puncak 2 =  $\frac{42}{7901} \times 100 \% = 0,53 \%$

3. Puncak 3 =  $\frac{243}{7901} \times 100 \% = 3,075 \%$

4. Puncak 4 =  $\frac{91}{7901} \times 100 \% = 1,15 \%$

5. Puncak 5 =  $\frac{1421}{7901} \times 100 \% = 17,98 \%$

6. Puncak 6 =  $\frac{243}{7901} \times 100 \% = 3,07 \%$

7. Puncak 7 =  $\frac{512}{7901} \times 100 \% = 6,48 \%$

8. Puncak 8 =  $\frac{340}{7901} \times 100 \% = 4,3 \%$

9. Puncak 9 =  $\frac{284}{7901} \times 100 \% = 3,59 \%$

10. Puncak 10 =  $\frac{1777}{7901} \times 100 \% = 22,49 \%$

11. Puncak 11 =  $\frac{2495}{7901} \times 100 \% = 31,57 \%$

12. Puncak 12 =  $\frac{309}{7901} \times 100 \% = 3,91 \%$

## LAMPIRAN 6.

### L.6.1 Perhitungan Nilai Rf

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

- Hasil Nilai Rf

$$\text{Noda 1} = \frac{0,8}{18} = 0,04$$

$$\text{Noda 9} = \frac{12,9}{18} = 0,71$$

$$\text{Noda 2} = \frac{1,8}{18} = 0,1$$

$$\text{Noda 10} = \frac{13,3}{18} = 0,73$$

$$\text{Noda 3} = \frac{3,8}{18} = 0,21$$

$$\text{Noda 11} = \frac{14,8}{18} = 0,82$$

$$\text{Noda 4} = \frac{5,5}{18} = 0,3$$

$$\text{Noda 12} = \frac{15,7}{18} = 0,87$$

$$\text{Noda 5} = \frac{6,3}{18} = 0,35$$

$$\text{Noda 13} = \frac{16,3}{18} = 0,9$$

$$\text{Noda 6} = \frac{7,6}{18} = 0,42$$

$$\text{Noda 14} = \frac{16,6}{18} = 0,92$$

$$\text{Noda 7} = \frac{8,7}{18} = 0,48$$

$$\text{Noda 15} = \frac{17,2}{18} = 0,95$$

$$\text{Noda 8} = \frac{12}{18} = 0,6$$

## Lampiran 7 Dokumentasi



Proses Maserasi



Proses Partisi



Hasil Partisi



Filtrat Hasil Maserasi



Proses penyaringan



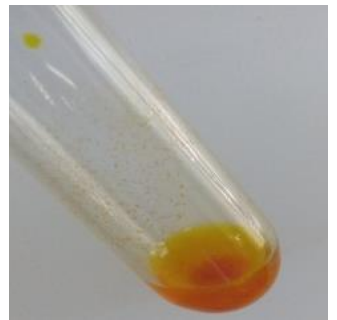
Proses pemekatan



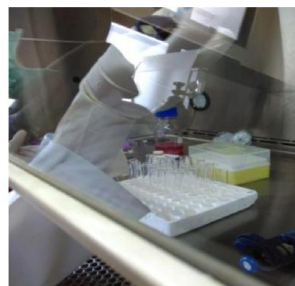
Proses KLTA



Uji fitokimia reagen Mayer dan Dragendorf



Larutan stok sampel



Pengenceran sampel

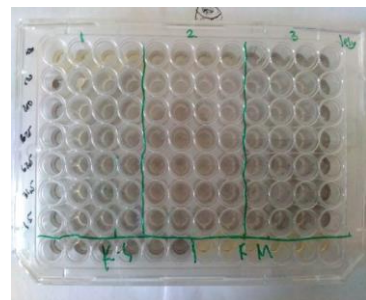
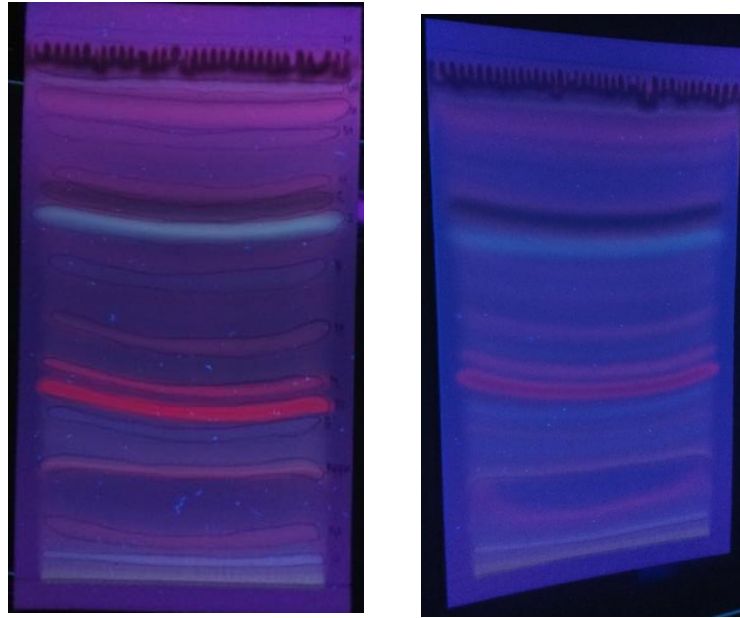


Plate berisi sampel dan sel





Isolasi senyawa alkaloid dengan KLTP

## MOTTO

### Morning Light

وَالضُّحَىٰ

وَاللَّيْلِ إِذَا سَجَىٰ

مَا وَدَّعَكَ رَبُّكَ وَمَا قَلَىٰ

Demi waktu matahari sepenggalahan naik,  
Dan demi malam apabila telah sunyi (gelap),  
Tuhanmu tiada meninggalkan kamu dan tiada (pula) benci kepadamu  
(Q.S Adh-Duha: 1-3)

## **LEMBAR PERSEMBAHAN**

Dengan mengucapkan syukur, Alhamdulillah.. terima kasih untuk:

1. Kedua orang tua (Ayah Slamet Santoso dan Ibu Masulah) serta Adek Levi yang sudah memberikan dukungan, semangat dan do'a selama proses mengerjakan karya ini,
2. Teman-teman seperjuangan (Kimia Angkatan 2012) yang saling memotivasi dan menyemangati,
3. Semua pihak yang terlibat dalam proses pencapaian tugas akhir ini dari masa kuliah, kuvet retak, tim farmakologi, tim anting-anting (Elis, Dj, MbK Ilmi, MbK Dilla dan Alif), KKN 163 (Pakis Aji), Tim Hore, Kos Kasur (Diah dan Onyow) dan PKLI (Perum Jasa Tirta I), dll., sampai dengan penyelesaian skripsi
4. Orang yang selalu saya repotkan terima kasih motivasinya.



**DEPARTEMEN PARASITOLOGI**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA**  
Gedung Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.  
Telp. (0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitfkugm@yahoo.com

Nomor : UGM/KU/Prst/291/M/05/07 21 Juli 2016  
Hal : Ijin Penelitian.

Kepada Yth. : NUR LAILY MASFUFAH  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim  
Malang

Dengan hormat,  
Menanggapi surat saudara tertanggal 4 Juni 2016 tentang ijin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi yang berjudul:

“ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS SENYAWA ALKALOID DARI TANAMAN ANTING-ANTING (*Acalypha indica* L.) PADA SEL KANKER PAYUDARA T47D”

Kami dapat mengijinkan penelitian tersebut dilakukan di Departemen Parasitologi FK. UGM., dengan catatan :

1. Mentaati peraturan yang berlaku di FK. UGM. dan Departemen Parasitologi FK. UGM.
2. Sebagai supervisor dalam pelaksanaan penelitian ini adalah Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK., dengan Teknisi: Rumbiwati.
3. Menulis semua kegiatan dan hasil penelitian yang dilakukan di laboratorium dalam buku Log Penelitian; buku Log ditinggal di Laboratorium.
4. Menerapkan prinsip **Good Clinical Laboratory Practice** pada saat bekerja di laboratorium.
5. Setelah selesai melaporkan hasilnya kepada Kepala Departemen.

Atas perhatian dalam hal ini kami ucapkan terima kasih.

Kepala,

dr. Tri Baskoro T. Satoto, MSc., PhD.  
NIP. 19580412 198601 1 001.

Tembusan Yth. : 1. Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK.  
2. Rumbiwati  
3. Arsip



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

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

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 227 / EC / KEPK - S1 / 05 / 2016

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

**JUDUL** : Uji Aktivitas Antikanker Tanaman Rumput Bambu (*Lophatherum gracile B.*), Anting - anting (*Acalypha indica L.*) dan Biji Koro Benguk (*Mucuna pruriens (L.) DC. f pruriens*) terhadap Sel T47D

**PENELITI** : Nur Laily Masfufah  
Habibah  
Intan Asyqotul Firdaus

**UNIT / LEMBAGA** : Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

**TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Protho Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

DINYATAKAN LAIK ETIK.



30 MAY 2016

Malang,  
An. Ketua,  
Koordinator Divisi I

Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpPark  
NIP. 19520410 198002 1 001

**Catatan :**

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