

**SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annus L*) DENGAN METODE BSLT (*Brine Shrimp  
Lethality Test*) DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA  
AKTIFNYA**

**SKRIPSI**

Oleh:

**DEWI HAFIDLOH  
NIM. 10630018**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2014**

**SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN BUNGA MATAHARI (*Helianthus annuus*  
L) DENGAN METODE BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIFNYA**

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam negeri (UIN) Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)**

**Oleh:  
DEWI HAFIDLOH  
10630018**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2014**

**SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN BUNGA MATAHARI (*Helianthus annuus*  
L) DENGAN METODE BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIFNYA**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**Dewi Hafidloh  
NIM. 10630018**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal 19 Mei 2014**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

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

**Ach. Nasichuddin, M. Ag  
NIP. 19730705 200003 1 002**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang**

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

**SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN BUNGA MATAHARI (*Helianthus annuus*  
L) DENGAN METODE BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIFNYA**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**DEWI HAFIDLOH  
10630018**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)  
Tanggal 19 Mei 2014**

- 1. Penguji Utama : A. Ghanaim Fasya, M. Si ( ..... )  
NIP. 19820616 200604 1 002**
- 2. Ketua Penguji : Diana Candra Dewi, M. Si ( ..... )  
NIP. 19770720 200312 2 001**
- 3. Sekr. Penguji : Elok Kamilah Hayati, M. Si ( ..... )  
NIP. 19790620 200604 2002**
- 4. Anggota Penguji : Ach. Nasichuddin, M. Ag ( ..... )  
NIP. 19730705 200003 1 002**

**Mengetahui dan Mengesahkan  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang**

**Elok Kamilah Hayati, M. Si  
NIP. 19790620 200604 2002**

# Motto

وَمَا هَذِهِ الْحَيَاةُ الدُّنْيَا إِلَّا لَهُوٌّ وَلَعِبٌ وَإِنَّ الدَّارَ الْآخِرَةَ لَهِيَ الْحَيَوَانُ لَوْ  
كَانُوا يَعْلَمُونَ ﴿٦٤﴾

"Dan Tiadalah kehidupan dunia ini melainkan senda gurau dan main-main. dan Sesungguhnya akhirat Itulah yang sebenarnya kehidupan, kalau mereka mengetahui ". (Qs. Al Ankabut: 64)

**Ku Raih Impian untuk Masa Depanku,,,  
dengan Semangat sebagai Kunci Keberhasilanku,,,  
karena Aku Yakin Aku Bisa, Aku Mampu dan Aku  
Berjuang untuk itu,,,,,  
Sampai Akhirnya Ujian pertama Ku Lalui untuk  
Menyongsong Masa Depan dengan Lulusnya S1,,,,^\_^**

**dan Tak Lupa,,,  
Mensyukuri nikmat dari Allah SWT,,,**

فَبِأَيِّ آلَاءِ رَبِّكُمَا تُكَذِّبَانِ ﴿١٣﴾

"Maka nikmat Tuhan kamu yang manakah yang kamu dustakan?"  
(Qs. Ar Rahman: 13)

**"Semangat, Yakin, Berjuang dan  
Bersyukur"**

# Lembar Persembahan

**Alhamdulillahirobbil'amin,,**

Ucapan syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan segala kenikmatan berupa kesehatan bagi penulis hingga skripsi ini telah selesai,,

Kepada baginda Rosulullah Muhammad SAW yang telah memberikan inspirasi kepada penulis untuk selalu bersabar dalam berfikir dan menganalisis ciptaan Allah yang ada di bumi ini.

Untuk kedua orang tuaku ayahanda Ir. H. Fathur Rosadi, M. Pd dan ibunda Titik Asmiati yang dengan tulus setiap hari mendo'akan untuk kebaikan dan keberhasilanku. Kasih sayang, dukungan moral maupun materi yang ayah ibu berikan kepadaku selama ini semoga bermanfaat untuk masa depanku. Aamiin ya Robbal'amin,,

Untuk kakakku Dewi Rofiqoh, S.Si, adikku Dewi Mashitoh Effandiyah serta kakak iparku Syaifudin Bimo Taufiq Rizali, S. E yang aku sayangi, terima kasih atas do'a, motivasi, dan dukungan kepadaku selama ini.

Ucapan terima kasih saya kepada para Pembimbing dan Penguji, B. Elok Kamilah Hayati, M. Si, B. Roihatul Muti'ah, M. Kes, Apt, P. Nasichuddin, M.Ag, P. Ghanaim Fasya, M. Si, B. Diana Candra Dewi, M. Si, dan P. Tri Kustono Adi, M. Sc selaku dosen wali, serta para dosen kimia UIN Maliki Malang atas bimbingan, kritik, saran, motivasi dan ilmu bapak ibu selama ini. Tak lupa pada Laboran dan Admin kimia UIN Maliki Malang yang telah membantu kelancaran selama proses skripsi.

Teman-teman kimia angkatan '10 terima kasih atas kebersamaan kita selama ini, warna-warni kehidupan bangku kuliah tanpa kalian semua, hidup ini tak berwarna serta seseorang yang melengkapi hidup ini dengan segala bentuk bantuan materiil, do'a, dukungan dan semangat hingga aku bisa menyelesaikan karya ilmiah ini.

,,,Thanks For You All,,,

## SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dewi Hafidloh  
NIM : 10630018  
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia  
Judul Penelitian : Sitotoksik Ekstrak Daun Bunga Matahari (*Helianthus annusL*) Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 19 Mei 2014  
Yang Membuat Pernyataan,

Dewi Hafidloh  
NIM. 10630018

## KATA PENGANTAR



Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi Penelitian dengan judul **“Sitotoksik Ekstrak Daun Bunga Matahari (*Helianthus Annus L*) Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya”** dapat terselesaikan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si).

Sholawat serta salam senantiasa tetap tucurahkan kepada junjungan kita Nabi besar Muhammad SAW yang telah menjadi suri tauladan bagi umat manusia.

Tersusunnya skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada:

1. Ibu Elok Kamilah Hayati, M. Si, selaku Pembimbing
2. Ibu Roihatul Muti'ah, M. Kes. Apt, selaku Konsultan
3. Bapak Ach. Nasichuddin, M. Ag, selaku Pembimbing Agama
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M. Si, selaku Penguji Utama
5. Ibu Diana Candra Dewi, M. Si, selaku Ketua Penguji

Atas bimbingan, pengarahan, nasehat serta motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, penulis dengan penuh kesungguhan dan kerendahan hati menghaturkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maliki Malang.

3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia, UIN Maliki Malang yang telah memberikan arahan dan nasehat kepada penulis.
4. Para dosen pengajar di Jurusan Kimia yang telah memberikan bimbingan dan membagi ilmunya kepada penulis selama berada di UIN Maliki Malang.
5. Seluruh staf laboratorium dan staf administrasi Jurusan Kimia atas seluruh bantuan dan sumbangan pemikiran selama penyelesaian skripsi.
6. Seluruh keluarga besar, ayahanda Ir. H. Fathur Rosadi, M.Pd, ibunda Titik Asmiati, kakak Dewi Rofiqoh, S.Si dan adik Dewi Mashitoh Effandiyah serta kakak ipar Syaifudin Bimo Taufiq Rizali, S. Eyang memberikan motivasi serta memberikan segala kebutuhan kepada penulis baik secara materiil maupun spiritual.
7. Moh. Hasan Ashari, S. T yang selalu memberikan dukungan, motivasi serta segala bantuan baik secara materi maupun do'a.
8. Teman-teman kimia angkatan 2010 (khususnya Alfin Hilda, Selina Purwita, Lilik Hartini, Qonitah Nurul Ula, Selvi Angelia) yang telah memberikan kesan tersendiri dengan kebersamaan selama ini dalam senang maupun susah serta teman-teman angkatan 2010 semoga silahturahmi ini tetap terjaga selalu.
9. Kakak tingkat kimia angkatan 2009 terima kasih atas bimbingan dan informasi yang diberikan kepada penulis.
10. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas segala bantuannya kepada penulis.

Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam skripsi ini. oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, 19 Mei 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN ORISINALITAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR PERSAMAAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	8
1.3 Tujuan.....	8
1.4 Batasan Masalah .....	9
1.5 Manfaat.....	9
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>10</b>
2.1 Fenomena Flora dan Fauna dalam al-Qur'an .....	10
2.2 Daun Bunga Matahari dalam Perspektif Ilmu Pengetahuan.....	14
2.2.1 Morfologi Bunga Matahari ( <i>Helianthus annuus</i> L) .....	15
2.2.2 Kandungan Senyawa Aktif dalam Tanaman Famili <i>Asteraceae</i> .....	16
2.3 Teknik Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder Daun Bunga Matahari....	17
2.3.1 Ekstraksi .....	17
2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	21
2.4 Senyawa Aktif Metabolit Sekunder dalam Tanaman .....	24
2.4.1 Alkaloid .....	24
2.4.2 Flavonoid .....	26
2.4.3 Terpenoid .....	28
2.4.4 Steroid.....	31
2.4.5 Tanin.....	34
2.4.6 Saponin .....	35
2.5 Larva Udang ( <i>Artemia salina</i> L).....	36
2.5.1 Klasifikasi .....	36
2.5.2 Lingkungan Hidup.....	37
2.5.3 Perkembangan dan Siklus Hidup .....	38
2.6 Uji Sitotoksitas terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> L.....	39
<b>BAB III BAHAN DAN METODE.....</b>	<b>46</b>
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan .....	46
3.2 Alat dan Bahan.....	46
3.2.1 Alat .....	46

3.2.2 Bahan.....	46
3.3 Rancangan Penelitian.....	47
3.4 Tahapan Penelitian.....	48
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	48
3.5.1 Preparasi Sampel.....	48
3.5.2 Ekstraksi Maserasi.....	48
3.5.3 Uji Sitotoksitas dengan Larva Udang <i>Artemia salina</i> L.....	50
3.5.3.1 Penetasan Larva Udang.....	50
3.5.3.2 Uji Sitotoksitas.....	50
3.5.4 Uji Fitokimia dengan Uji Reagen.....	51
3.5.4.1 Uji Alkaloid.....	52
3.5.4.2 Uji Flavonoid.....	52
3.5.4.3 Uji Seskuiterpenuoid.....	52
3.5.4.4 Uji Triterpenoid dan Steroid.....	52
3.5.4.5 Uji Tanin dengan FeCl <sub>3</sub> .....	53
3.5.4.6 Uji Saponin.....	53
3.5.5 Uji Fitokimia dengan KLT.....	53
3.5.6 Analisis Data.....	57
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>58</b>
4.1 Preparasi Sampel.....	58
4.2 Ekstraksi Komponen Aktif Daun Bunga Matahari ( <i>Helianthus annuus</i> L).....	59
4.3 Uji Sitotoksik Terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	63
4.4 Uji Fitokimia dengan Uji Reagen.....	71
4.4.1 Seskuiterpenuoid.....	72
4.4.2 Triterpenoid dan Steroid.....	74
4.5 Kromatografi Lapis Tipis Analitik.....	77
4.5.1 Steroid.....	78
4.5.2 Seskuiterpenuoid.....	83
4.6 Pemanfaatan Daun Bunga Matahari dalam Perspektif Agama Islam.....	87
<b>BAB V PENUTUP.....</b>	<b>90</b>
5.1 Kesimpulan.....	90
5.2 Saran.....	90
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>92</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>105</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kategori toksisitas .....	42
Tabel 2.2	Aktivitas sitotoksitas .....	44
Tabel 4.1	Hasil maserasi ekstrak daun bunga Matahari.....	62
Tabel 4.2	Keterangan penyebaran konsentrasi pada kurva mortalitas Larva Udang <i>Artemia salina</i> L. terhadap ekstrak n-heksana daun bunga Matahari .....	66
Tabel 4.3	Keterangan penyebaran konsentrasi pada kurva mortalitas Larva Udang <i>Artemia salina</i> L. terhadap ekstrak diklorometana daun bunga Matahari.....	67
Tabel 4.4	Keterangan penyebaran konsentrasi pada kurva mortalitas Larva Udang <i>Artemia salina</i> L. terhadap ekstrak metanol daun bunga Matahari .....	68
Tabel 4.5	Nilai LC <sub>50</sub> masing-masing ekstrak daun bunga Matahari.....	69
Tabel 4.6	Hasil pengamatan uji fitokimia .....	71
Tabel 4.7	Hasil KLT golongan senyawa steroid dengan beberapa eluen .....	79
Tabel 4.8	Hasil KLT golongan senyawa steroid ekstrak n-heksana dengan Eluen n-heksana : etil asetat (4,5:0,5).....	80
Tabel 4.9	Hasil KLT golongan senyawa seskuiterpenoid dengan beberapa Eluen .....	83
Tabel 4.10	Hasil KLT golongan senyawa seskuiterpenoid ekstrak Diklorometan : etil asetat (4,8:0,2).....	85

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Bunga Matahari ( <i>Helianthus annus</i> L) .....	15
Gambar 2.2	Contoh struktur senyawa golongan Alkaloid.....	25
Gambar 2.3	Struktur inti senyawa Flavonoid .....	27
Gambar 2.4	Senyawa Triterpenoid.....	28
Gambar 2.5	Struktur Seskuiterpenoid lakton (Santonin).....	29
Gambar 2.6	Struktur inti senyawa Steroid.....	32
Gambar 2.7	Contoh struktur senyawa golongan Tanin .....	34
Gambar 2.8	Struktur inti senyawa Saponin .....	36
Gambar 2.9	Nauplius <i>Artemia salina</i> Leach.....	36
Gambar 4.1	Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna pada uji uji Seskuiterpenoid .....	73
Gambar 4.2	Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna pada uji Terpenoid .....	75
Gambar 4.3	Hasil KLT senyawa steroid n-heksana eluen n-heksana : etil asetat (4,5:0,5), (a) sebelum di semprot reagen Liebermann-Burchard dilihat pada lampu UV $\lambda$ 366 nm, b) ilustrasi, (c) setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard dilihat pada lampu UV $\lambda$ 366 nm, (d) ilustrasi.....	80
Gambar 4.4	Hasil KLT senyawa seskuiterpenoid n-heksana eluen diklorometana : etil asetat (4,8:0,2), (a) sebelum di semprot reagen vanilin-asam sulfat dilihat pada lampu UV $\lambda$ 366 nm, (b) ilustrasi, (c) setelah disemprot reagen vanilin-asam sulfatdilihat pada lampu UV $\lambda$ 366 nm, (d) ilustrasi .....	85

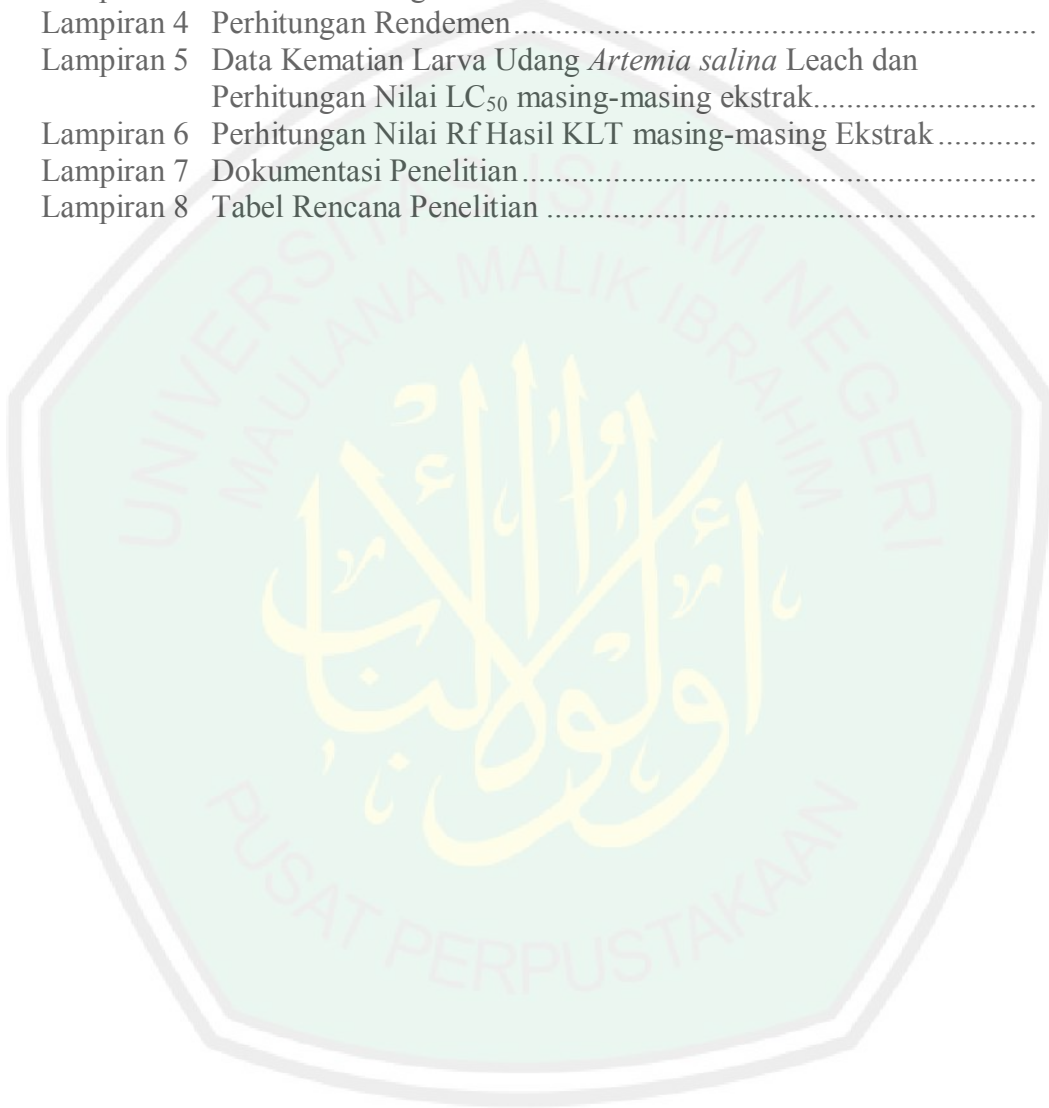
## DAFTAR PERSAMAAN

2.1 Harga Rf .....	24
2.2 Rumus % Kematian .....	44
2.3 Rumus Abbott Formula.....	45



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Diagram Alir Penelitian.....	105
Lampiran 2	Skema Kerja.....	106
Lampiran 3	Pembuatan Reagen dan Larutan.....	114
Lampiran 4	Perhitungan Rendemen.....	121
Lampiran 5	Data Kematian Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach dan Perhitungan Nilai LC <sub>50</sub> masing-masing ekstrak.....	123
Lampiran 6	Perhitungan Nilai Rf Hasil KLT masing-masing Ekstrak.....	130
Lampiran 7	Dokumentasi Penelitian.....	133
Lampiran 8	Tabel Rencana Penelitian.....	136



## ABSTRAK

Hafidloh, D. 2014. **Sitotoksik Ekstrak Daun Bunga Matahari (*Helianthus annus L*) dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing 1: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing Agama: Ach. Nasichuddin, M.Ag; Konsultan: Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt

---

**Kata Kunci:** Daun bunga Matahari (*Helianthus annus L*), sitotoksik, *Artemia salina* Leach, uji reagen, KLTA

Bunga Matahari (*Helianthus annus L*) merupakan salah satu tanaman yang dikenal sebagai obat herbal. Al Quran surat Ali Imron ayat 190-191 menjelaskan bahwa tiadalah Allah menciptakan alam beserta isinya dengan sia-sia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat sitotoksik ekstrak daun bunga Matahari terhadap *Artemia salina* Leach dan mengetahui golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak yang memiliki bioaktivitas tertinggi.

Metode pemisahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi maserasi dengan menggunakan variasi pelarut, yaitu n-heksana, diklorometana dan metanol. Ekstrak pekat yang diperoleh dari hasil maserasi selanjutnya digunakan untuk uji sitotoksik terhadap *Artemia salina* Leach kemudian dilakukan analisis probit menggunakan program MINITAB 16 untuk mengetahui nilai LC<sub>50</sub> masing-masing ekstrak. Identifikasi golongan senyawa aktif menggunakan uji reagen dan diperkuat dengan uji KLTA pada ekstrak yang memiliki bioaktivitas tertinggi dengan variasi eluen.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana memiliki bioaktivitas tertinggi terhadap *Artemia salina* Leach dibanding ekstrak diklorometana dan metanol. Nilai LC<sub>50</sub> ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol secara berturut-turut adalah 22,175; 952,625; dan 147,847 ppm. Identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak n-heksana dengan uji reagen adalah seskuiterpenoid dan steroid. Hasil ini diperkuat dengan uji KLTA menggunakan eluen terbaik pada golongan senyawa seskuiterpenoid dengan eluen diklorometana:etil asetat (4,8:0,2) menghasilkan 11 noda yang terpisah, terdapat 7 noda yang diduga senyawa seskuiterpenoid dengan nilai Rf 0,13; 0,25; 0,33; 0,4; 0,54; 0,86; dan 0,91. Sedangkan eluen terbaik pada golongan senyawa steroid adalah n-heksana:etil asetat (4,5:0,5) menghasilkan 8 noda yang terpisah dan terdapat 7 noda yang diduga senyawa steroid dengan nilai Rf 0,04; 0,22; 0,39; 0,51; 0,61; 0,67 dan 0,97.

## مستخلص البحث

حفيظة، د. ٢٠١٤. اختبار سيتوتوك سيك مستخلص ورق زهرة الشمس (هيلانطوس أنوس ل) بطريقة BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) وتحليل مجموعة من مركب النشط. بحث علمي. سبعة كيمياء كلية العلوم و التكنولوجيا جامع مولانا مالك ابراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف: ايلوك كاملة حياتي الماجستير. المشرف الديني: احمد نصح الدين الماجستير. المستشار: رائحة المطيعة.

الكلمات الرئيسية: ورق زهرة الشمس (هيلانطوس أنوس ل)، سيتوتوك سيك، الأرتيميا ساليناليش، اختبار ريجين، KLTA.

زهرة الشمس (هيلانطوس أنوس ل) هي نبات من نباتات التي يعرف بالدواء الطبيعي كما شرح القرآن الكريم في السورة ال عمران اية ١٩٠-١٩١ ما خلق الله العالم وما فيه باطلا. يهدف هذا البحث لمعرفة مستوى سيتوتوك سيك ورق زهرة الشمس على الأرتيميا سلينا ليش ومعرفة مركب النشطة في استخراج لديه الفعال الحيوية الأعلى.

وطريقة الفصل في هذا البحث هي استخراج النقاة باستخدام الاختلاف المذيبات وهي ن-هيكسانا، ديكلوروميثانا و ميتانول. استخراج المركز الذي يحصل من النقاة ثم تستخدمها لاختبار سيتوتوك سيك على الأرتيميا سلينا ليش تعملها بتحليل الاحتمالية باستخدام البرنامج MINITAB 16 لمعرفة القيمة LC<sub>50</sub> الاستخراج نفسه. تحليل مجموعة مركب النشطة باستخدام اختبار كاشف ويأكد باختبار KLTA على استخراج لديه الفعال الحيوية الأعلى باختلاف الشاطف.

أما نتائج هذا البحث هي أن استخراج ن-هيكسانا لديه الفعال الحيوية الأعلى على الأرتيميا سلينا ليش من الاستخراج ديكلوروميثانا و ميتانول. أما القيمة LC<sub>50</sub> استخراج ن-هيكسانا، ديكلوروميثانا و ميتانول بالترتيب هي ٢٢.١٧٥، ٩٥٢.٦٢٥ و ١٤٧.٨٤٧ فقم. تحليل المركب النشطة الأستخراج ن-هيكسانا باختبار كاشف هو سيسقويتيرفينويدئ و ستيرويد. تأكد هذه النتيجة باختبار KLTA باستخدام خير الشاطف على المركب النشطة سيسقويتيرفينويدئ بالشاطف الديكلوروميثانا: اتيل اسيتات (٤.٨:٠.٢) يحصل ١١ بقع المفصل، منها سبعة بقع يزعم الورداء سيسقويتيرفينويدئ بقيمة رف ٠.١٣، ٠.٢٥، ٠.٣٣، ٠.٤، ٠.٥٤، ٠.٨٦، ٠.٩١. وأما خير الشاطف في مجموعة الورداء ستيرويد هو ن-هيكسانا: اتيل اسيتات (٤.٥:٠.٥) يحصل ٨ بقع المفصل، و منها سبعة بقع يزعم الورداء ستيرويد بقيمة رف ٠.٠٤، ٠.٢٢، ٠.٣٩، ٠.٥١، ٠.٦١، ٠.٦٧، و ٠.٩٧.

## ABSTRACT

Hafidloh, D. 2014. **Cytotoxic Extract of Sun Flower Leaf (*Helianthus annus* L) Using BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) and Identification of The Active Compound**. Theses. Chemistry Department Faculty of Science and Technology The State of Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor 1: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor of Religion: Ach. Nasichuddin, M.Ag; Consultant: Roihatul Muti'ah, Kes.,Apt

---

**Keywords:** Sun flower leaf (*Helianthus annus* L), cytotoxic, *Artemia salina* Leach, reagent test, A-TLC

Sun flower (*Helianthus annus* L) has known as a herbal medicine. Al Quran surah Ali Imron verse 190-191 has explained that God did not create the universe and its contents in vain. This research was aimed to determine the level of cytotoxic extract of sun flower leaf againts *Artemia salina* and determined the active compounds in extract which has the highest bioactivity.

Separation is carried out by extraction maceration with variation of solvent is n-hexane, dichloromethane and methanol. Concentrated extract was used to cytotoxic againts *Artemia salina*. The cytotoxic level of each extract was determined by calculating the level of  $LC_{50}$  which was based on analyzing by probit analysis using MINITAB 16 program. The active compound in extract which has the highest bioactivity was identified by reagent test and A-TLC testwith variation of eluent.

The results of this research indicated that n-hexane extract has the highest bioactivity against *Artemia salina* Leach.  $LC_{50}$  value of n - hexane, dichloromethane and methanol extract respectively are 22.175; 952.625; and 147.847 ppm. Identification of active compounds in n-hexane extract with reagent test showed positive existence of seskuiterpenoid and steroids. These result were confirmed by A-TLC test. The best eluent for seskuiterpenoid is mixture of dichloromethane : ethyl acetate (4,8:0,2) that resulted 11 separate stains and conjecturable 7 of them are seskuiterpenoid compound with Rf value 0,13; 0,25; 0,33; 0,4; 0,54; 0,86, and 0,91. The best eluent of steroid compounds are n-hexane : ethyl acetate (4,5:0,5) that produced 8 separate stains and contained 7 stains that allegedly as steroid compounds with Rf value 0,04; 0,22; 0,39; 0,51; 0,61; 0,67 and 0,97.

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Tanaman merupakan benda hidup yang tumbuh dan terdapat di alam semesta. Tanaman dapat melangsungkan proses fotosintesis dengan bantuan dari sinar matahari. Tanaman memiliki banyak potensi di dunia kesehatan misalnya obat. Adanya potensi tanaman sebagai obat karena adanya senyawa-senyawa bioaktif dari tanaman tersebut. Untuk perkembangannya, tanaman tersebut juga membutuhkan air. Sebagaimana firman Allah dalam Qs. at Thaha ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَّكَ 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”.*

Menurut tafsir Ibnu Katsir surat at Thaha ayat 53 dijelaskan bahwa Allah telah menciptakan hamparan yang kalian tinggal, berdiri, dan tidur di atasnya, serta melakukan perjalanan di atas permukaannya dan Allah telah menurunkan air hujan dengan berbagai macam tumbuhan berupa tanam-tanaman dan buah-buahan, baik yang asam, manis, maupun pahit, dan berbagai macam lainnya (Ghoffar, dkk., 2004).

Allah menganjurkan kepada seluruh hambanya untuk selalu memahami kebesaran dan kekuasaan-Nya dengan melihat seluruh ciptaan-Nya, sehingga ayat

di atas diperkuat oleh ayat selanjutnya sebagaimana firman Allah dalam Qs. Ali Imron ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ  
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ  
 السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya:

*“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka.*

Ayat diatas mendiskripsikan suatu kehidupan seseorang yang selalu memikirkan dan menganalisis, bahwa tiadalah Allah menciptakan alam beserta isinya dengan sia-sia, yang menciptakan dengan benar dan merupakan kebenaran. Begitu pula Allah menciptakan tumbuh-tumbuhan agar manusia dapat mengambil manfaat darinya dan ciptaan Allah seperti tumbuh-tumbuhan telah tercipta dengan sempurna dan tidak sia-sia (Quthb, 2001). Hampir semua bagian dari tumbuhan dapat kita manfaatkan. Bagian tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah bagian daun, batang, akar, rimpang, bunga, buah dan bijinya.

Pengembangan tanaman obat untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan telah banyak dilakukan. Banyak penelitian untuk menemukan obat-obat baru yang berguna untuk mengobati berbagai macam penyakit yang sekarang sulit diobati. Menurut WHO, sebanyak 80 % penduduk dunia menggunakan obat herbal untuk

pengobatan. WHO merekomendasikan penggunaan obat tradisional termasuk herbal dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit, terutama untuk penyakit kronis, penyakit degeneratif dan kanker (Sari, 2006). Menurut sejarah, banyak obat-obatan medikal berasal dari tanaman, namun masih banyak dalam bentuk yang sederhana berasal dari bahan bakunya atau merupakan bahan aktif suatu ekstrak tanaman (Sukandar, 2006).

Di Indonesia banyak sekali tanaman yang berkhasiat sebagai obat salah satu tanaman obat yang digunakan oleh masyarakat adalah bunga Matahari (*Helianthus annuus* L). Tumbuhan ini merupakan tanaman perdu jenis kenikiran dan dikenal sebagai tanaman hias yang berasal dari daerah Amerika Utara, Meksiko, Chili, dan Peru. Bunga Matahari dikenal sebagai tanaman obat herbal (Simpson, 1986), karena hampir ke seluruhnya dari bunga Matahari ini dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengobatan. Bunga Matahari merupakan bunga yang mempunyai banyak keunggulan dibandingkan dengan bunga lainnya. Salah satunya pada bagian daun bunga Matahari yang dapat dimanfaatkan sebagai insektisida (Fifendy, 1997), pestisida (Nurusman, 2003), antimalaria (Muti'ah, dkk., 2012). Keseluruhan dari bunga Matahari diketahui mempunyai aktivitas antiradang, antitumor, antioksidan, antisematik, antimikroba (Saini, 2011) sehingga perlu dilakukan uji khasiat terhadap bahan aktifnya.

Beberapa penelitian menjelaskan bahwa tanaman bunga Matahari mengandung beberapa golongan senyawa. Menurut Haniah (2013), golongan senyawa yang terkandung dalam daun bunga Matahari dengan ekstrak pelarut metanol adalah alkaloid dan triterpenoid. Hasil penelitian Bayyinah (2013),

ekstrak pelarut diklorometana dalam daun bunga Matahari mengandung senyawa steroid dan seskuiterpen lakton. Khairunisak (2013), menyebutkan bahwa ekstrak etanol 80 % dalam daun bunga Matahari mengandung senyawa alkaloid, tanin, steroid dan seskuiterpenoid. Menurut Etika (2013), menyatakan bahwa sum-sum batang bunga Matahari dengan ekstrak kloroform mengandung senyawa golongan triterpenoid. Serta menurut Fahmi (2013) ekstrak n-heksana kulit batang bunga Matahari positif mengandung senyawa steroid. Setiap uji beberapa pelarut dan bagian dari tanaman akan menghasilkan senyawa yang berbeda pula.

Penelitian dengan menggunakan ekstrak daun bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) telah dilaporkan berpotensi sebagai antimalaria dan belum ada hasil penelitian yang menunjukkan tentang potensi senyawa metabolit sekunder untuk antikanker sehingga perlu dilakukan penelitian ini sebagai skrining awal bioaktivitas senyawa seperti sebagai antikanker.

Beberapa senyawa yang telah bermanfaat sebagai antikanker adalah alkaloid (Sukardiman, 2006), vinblastin, vinkristin (Rani, 2012), flavonoid, eristagallin A, steroid (Herlina, 2012), steroid tipe kardenolida (Wahyuningsih, 2008), terpenoid (Warsinasih, 2005 dalam Diastuti, 2009). Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa yang dihasilkan dari produk alam dan ada kemungkinan merupakan senyawa bioaktif yang dapat digunakan dalam dunia pengobatan, misalnya sebagai antikanker. Identifikasi senyawa dari bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker menjadi harapan baru dalam strategi pengembangan kemoterapi.

Senyawa yang diduga memiliki aktifitas antikanker, harus diujikan terlebih dahulu pada hewan coba. Penelitian ini menerapkan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* sebagai hewan uji. Hasil uji toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat (Meyer, dkk.,1982).

*Artemia salina* sering digunakan sebagai hewan uji toksisitas. Lebih dari itu larva udang ini juga digunakan untuk praskrining terhadap senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antitumor. Dengan kata lain, uji ini mempunyai korelasi positif dengan potensinya sebagai antikanker (Sukardiman, 2004). Sifat sitotoksik dapat diketahui berdasarkan jumlah kematian larva pada konsentrasi tertentu. Suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000  $\mu\text{g/ml}$  setelah waktu kontak 24 jam (Meyer, dkk., 1982).

Hasil penelitian Etika (2013), menunjukkan bahwa ekstrak sum-sum batang bunga Matahari dengan ekstrak kloroform menunjukkan toksisitas dengan nilai  $LC_{50}$  37,61 ppm serta  $R_f$  0,63 dengan eluen n-heksana : etil asetat (1:1). Menurut Fahmi (2013), menyebutkan bahwa ekstrak n-heksana pada kulit batang bunga Matahari memiliki nilai  $LC_{50}$  96,236 ppm serta nilai  $R_f$  0,32 dengan eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2). Hasil penelitian tersebut memiliki nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm sehingga diindikasikan bahwa tanaman bunga Matahari toksik dan memiliki potensi sebagai antikanker.

Pemisahan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan variasi pelarut. Metode maserasi digunakan

karena biaya yang dikeluarkan relatif murah dan tidak membutuhkan alat modern dan rumit serta bisa menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak panas yang terkandung dalam sampel (Meloan, 1999).

Ekstraksi dengan pelarut yang berbeda umumnya dapat mengekstrak jenis golongan yang berbeda pula. Pelarut dipilih berdasarkan tingkat kepolaran dengan tujuan diperoleh pelarut yang terbaik untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas tertinggi. Proses ekstraksi dengan pelarut organik yang berbeda tingkat kepolaran akan mempengaruhi jenis dan kadar senyawa bioaktif serta antioksidannya (Sousa, dkk., 2008). Pelarut yang dipilih dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan perbandingan pelarut n-heksana, diklorometana, metanol. Pelarut n-heksana adalah pelarut nonpolar, sedangkan diklorometana merupakan pelarut semipolar dan metanol merupakan pelarut polar. Pelarut tersebut memiliki titik didih yang cukup rendah sehingga pelarut dapat mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu yang tinggi, bersifat inert, dapat melarutkan senyawaan yang sesuai dengan cepat serta memiliki harga yang terjangkau (Sudarmadji, dkk., 2003).

Adanya variasi pelarut yang digunakan adalah untuk mengetahui tingkat sitotoksitas pada masing-masing ekstrak yang sesuai dengan kelarutannya sehingga dapat digunakan sebagai rujukan untuk mengetahui potensi bioaktivitas tertinggi suatu senyawa, karena dimungkinkan pada pelarut yang berbeda potensi bioaktivitas dan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya berbeda pula.

Tanaman bunga Matahari telah dibudidayakan di kota Batu khususnya di daerah Sidomulyo Batu. Tanaman tersebut belum dilakukan uji aktivitas

sitotoksisitas pada daun bunga Matahari, sehingga dalam penelitian ini akan dilakukan pengujian awal untuk mengetahui adanya potensi bioaktivitas tertinggi dan kandungan kimianya melalui uji senyawa aktif. Pada penelitian ini, dilakukan preparasi sampel terlebih dahulu. Pemisahan senyawa metabolit sekunder dalam tanaman daun bunga Matahari dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi bertingkat menggunakan pelarut yang memiliki perbedaan kepolaran yaitu n-heksana, diklorometana dan metanol. Untuk mengetahui potensi ekstrak yang bersifat aktif dilakukan dengan pengujian bioaktivitas dengan uji sitotoksik terhadap larva udang *Artemia salina* (metode *Brine Shrimp Lethality Test*). Kemudian dilakukan uji fitokimia dengan uji reagen dan hasil ekstrak yang mempunyai nilai positif akan diperkuat dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT) pada masing-masing ekstrak tersebut.

Hasil penelitian ini diharapkan akan diketahui ekstrak dengan golongan senyawa yang memiliki potensi bioaktivitas tertinggi pada ekstrak daun bunga Matahari (*Helianthus annuus* L) untuk dapat dilakukan pengujian lebih lanjut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang digunakan adalah:

1. Berapa nilai  $LC_{50}$  dari ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol daun bunga Matahari (*Helianthus annus* L) berdasarkan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)?
2. Golongan senyawa apa yang terdapat dalam ekstrak daun bunga Matahari (*Helianthus annus* L) yang memiliki potensi bioaktivitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan uji fitokimia dan kromatografi lapis tipis?

## 1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$  dari ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol dari daun bunga Matahari (*Helianthus annus* L) berdasarkan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*).
2. Untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak daun bunga Matahari (*Helianthus annus* L) yang memiliki potensi bioaktivitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach berdasarkan hasil identifikasi uji fitokimia dan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis).

#### 1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah tanaman daun bunga Matahari (*Helianthus annuus* L) dari daerah Sidomulyo Batu.
2. Hewan uji sitotoksik yang digunakan adalah larva udang *Artemia salina* Leach.
3. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan pelarut n-heksana, diklorometana dan metanol .
4. Metode uji yang digunakan adalah metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*).
5. Uji fitokimia golongan senyawa dilakukan dengan menggunakan uji reagen dan kromatografi lapis tipis (KLT).

#### 1.5 Manfaat

1. Merupakan penelitian awal dalam upaya pengembangan penelitian daun bunga Matahari sebagai uji senyawa sitotoksik
2. Menunjukkan bahwa daun bunga Matahari memiliki golongan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Fenomena Flora dalam Al Quran

Allah SWT sebagai Tuhan mempunyai tanda-tanda ketuhananNya berupa hasil-hasil ciptaanNya, berupa langit dan bumi beserta isinya. Sebagaimana firman Allah dalam al Quran surat ar Ra'd ayat 4:

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ وَصِنَوَانٌ وَعَيْرٌ  
 صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفِضَلُ بَعْضُهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ  
 لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿٤﴾

Artinya:

*"Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon kurma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebagian tanam-tanaman itu atas sebagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir".*

Menurut Al-Maragi (1987) ayat tersebut menjelaskan bahwa di muka bumi terdapat belahan tanah yang saling berdekatan, meskipun berbeda-beda dengan adanya kelebihan pada masing-masing. Maka mulai dari tanah yang bergaram, yang tidak dapat ditumbuhi oleh sesuatu pun hingga tanah subur yang yang berdekatan dengannya dan dapat ditumbuhi oleh buah-buahan yang terbaik dan berbagai tumbuh-tumbuhan, dari tanah yang cocok untuk menanam padi dan palawija, tidak untuk menanam pepohonan, sampai untuk ditanami pepohonan, hingga tanah lain yang berdekatan dengan kedua macam tanah tersebut yang cocok untuk ditanami semua itu.

Di bumi yang makmur dan subur terdapat kebun-kebun anggur yang siap dipetik, ladang-ladang dengan berbagai macam buah-buahan, dan pohon-pohon kurma dengan mayang yang bersusun-susun. Tanaman buah-buahan itu terhimpun di satu tempat dan di satu aliran sungai, serta minum dari satu sumber mata air. Kendati demikian, rasa, warna, dan ukuran buahnya berbeda-beda antara satu dengan yang lainnya. Ada yang manis, asam, putih, hitam, merah, hijau, dan lain sebagainya (Al-Qarni, 2007).

Berdasarkan tafsir Jalalain, maksud dari potongan ayat ar Ra'd adalah:

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ *"Dan di bumi terdapat bagian-bagian"* bermacam daerah مُتَّجِرَاتٌ yang berdampingan yang saling berdekatan, di antaranya ada yang subur dan ada yang tandus, di antaranya lagi ada yang kekurangan air dan ada yang banyak airnya. Hal ini merupakan bukti-bukti yang menunjukkan kepada kekuasaan-Nya مِنْ أَعْنَابٍ وَزَّرْعٍ dan وَجَبَّتْ dan kebun-kebun ladang-ladang anggur, tanam-tanaman dibaca rafa', yaitu zar'un, karena di'atafkan kepada lafaz jannatun. Kalau dibaca jar yaitu zar'in, di'atafkan kepada lafaz a'nabin, demikian pula firman-Nya: وَنَخِيلٌ صِيَوَانٌ dan pohon kurma yang bercabang lafaz sinwanun adalah bentuk jamak dari kata tunggal sinwan, artinya pohon kurma yang tidak banyak cabangnya يُسْقَى disirami kalau dibaca tusqa artinya kebun-kebun dan pohon-pohon yang ada padanya disirami. Dan kalau dibaca yusqa artinya hal tersebut disirami بِمَاءٍ وَاحِدٍ يُفَضَّلُ dengan air yang sama. Kami بَعْضَهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ dan yufaddilu



pancaran pemahamannya terhadapnya. Tanda-tanda kebesaran Allah ini tampak jelas bagi setiap orang sesuai dengan kadar ilmu, pemahaman, kecemerlangan pikiran, kejernihan otak, dan ketulusan arah pandangannya. Sedangkan para pakar astronomi, para ahli tumbuh-tumbuhan, dan para peneliti ilmu alam lainnya, mereka mengetahui aturan-aturannya yang membuat akal sangat takjub. Sedangkan manusia, pada umumnya, mereka cukup dengan pemandangan yang mempesona, benda-benda langit yang tinggi, dan alam menakjubkan beserta keindahan, pesona, dan kecemerlangan yang ada padanya (Al-Banna, 2010).

Hal ini merupakan dalil yang kuat dan ayat yang nyata tentang kekuasaan Zat Yang Maha Kuasa, hikmah Zat Yang Maha Lembut lagi Maha Mengetahui, dan keindahan ciptaan Zat Yang Maha Tinggi lagi Maha Besar bagi orang yang mempunyai kalbu yang bisa berfikir. Dengan demikian, ia pun mendapat petunjuk untuk menaati dan mengimani *Rabb*-nya (Al-Qarni, 2007).

Allah menumbuhkan dari bermacam-macam tumbuhan yang baik untuk makhluknya. Manfaat tumbuhan ini salah satunya digunakan sebagai tanaman obat, seperti halnya sabda Nabi Muhammad SAW dalam HR. Ibnu Majah berikut (Farooqi, 2005):

*“Allah tidak menciptakan suatu penyakit tanpa menciptakan pula obat untuknya. Barang siapa mengerti hal ini, ia mengetahuinya dan barang siapa tidak mengerti hal ini, ia tidak mengetahuinya kecuali kematian,” (HR. Ibnu Majah)*

Hadis diatas menunjukkan bahwa betapa adilnya Allah yang memberikan suatu penyakit beserta penawarnya (obat). Pengetahuan yang akan menuntun manusia untuk menemukan obat-obatan yang telah tersedia di alam, seperti obat

dari tanaman. Jika manusia tidak mengembangkan ilmu pengetahuan, maka tidak akan pernah tahu adanya obat yang berasal dari tanaman yang biasanya tidak dihiraukan. Tanaman bunga Matahari merupakan salah satu bukti tanaman obat yang ditumbuhkan di bumi ini. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian mendukung akan potensinya sebagai obat tersebut.

Semua tumbuhan memiliki susunan dan bentuk yang berbeda dengan tumbuhan lain. Setiap tanaman yang ditumbuhkan oleh Allah tentunya memiliki kegunaan yang berbeda-beda. Misalnya tanaman padi yang digunakan sebagai tanaman obat seperti pada penggunaan tanaman bunga Matahari (*Helianthus annus* L).

## 2.2 Daun Bunga Matahari dalam Perspektif Ilmu Pengetahuan

Bunga Matahari berasal dari Amerika Utara, bersifat perdu dan memiliki saluran-saluran getah atau kelenjar-kelenjar minyak. Tanaman ini termasuk salah satu tanaman industri penting penghasil minyak nabati di dunia. Tanaman bunga Matahari bersifat profandus yaitu benangsari masak terlebih dahulu sebelum putiknya. Perkembang-biakannya melalui penyilangan antar tanaman dengan bantuan serangga penyerbuk (Hirsinger, 1990).

Menurut Tjitrosoepomo (1999), klasifikasi tanaman bunga Matahari (*Helianthus annus* L) adalah sebagai berikut:

Division	: Plantae
Classis	: Dycotyledon
Ordo	: Dyallipetalae
Familia	: Asteraceae (composite)
Genus	: <i>Helianthus</i>
Spesies	: <i>Helianthus annus</i> L.



Gambar 2.1 Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L)

### 2.2.1 Morfologi Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L)

Bunga Matahari merupakan tanaman semusim dengan masa tumbuh 3,5-4,5 bulan. Tingginya dapat mencapai 1-6 m dan pertumbuhannya tidak dipengaruhi oleh fotoperiodisitas (Chapman dan Carter, 1975). Pertumbuhan terbaik pada temperatur diatas 10°C, meskipun demikian tanaman ini tahan pada suhu lebih rendah (Purseglove, 1981). Tanah bukan merupakan faktor yang mutlak bagi bunga Matahari sehingga dapat ditanam pada berbagai jenis tanah (Arnon, 1972; Chapman dan Carter, 1975; Purseglove, 1981). Meskipun demikian menurut Kipps (1970), hasil tertinggi pada tanaman ini diperoleh jika ditanam pada tanah yang kaya akan unsur hara.

Tanaman ini mempunyai daun tunggal, duduk daun berhadapan, jarang, dan tersebar. Rangkaian bunganya berbentuk cawan dengan dua macam bunga berdasarkan kelamin yaitu bunga steril terletak di tepi, biasanya berwarna kuning dan bunga hermaphrodit yang terletak di bagian tengah, biasa berwarna hitam kecoklatan dan bentuknya kecil. Benangsari berlekatan satu dengan lainnya berjumlah lima dan melekat pada korola. Bakal buah tenggelam, beruang satu dengan satu bakal biji. Tangkai putik satu dengan dua kepala putik. Buahnya

termasuk buah kurung, bijinya berlekatan dengan dinding buah tanpa endosperma, kuncup bunga terbungkus rapat dalam daun pembalut yang berwarna hijau (Tjitrosoepomo, 1999).

Bunga Matahari sebagai tanaman fitoremediasi memiliki keunggulan. Berdasarkan beberapa penelitian daun bunga Matahari dapat bermanfaat sebagai insektisida (Fifendy, 1997), pestisida (Nurusman, 2003), antimalaria (Muti'ah, dkk., 2012). Keseluruhan dari bunga Matahari diketahui mempunyai aktivitas antiradang, antitumor, antioksidan, antisemantik, antimikroba (Saini, 2011). Sebagian besar famili *Asteracea* telah diketahui mempunyai aktivitas

### **2.2.2 Kandungan Senyawa Aktif dalam Tanaman Famili *Asteraceae***

Senyawa yang terkandung pada tanaman bunga Matahari adalah pada daun terkandung sesquiterpen lakton dan monoterpen (Veerma dan Singh, 2008 dalam Saini, 2011), alkaloid (Javed, 2001 dalam Saini, 2011), terpenoid (Haniah, 2013), steroid dan seskuiterpenoid lakton (Bayyinah, 2013) pada bunga terkandung triterpen (Ukiya, dkk., 2007 dalam Saini, 2011) dan saponin (Chirva, dkk., 1968 dalam Saini, 2011), pada biji terkandung fenol (Giada, 2008 dalam Saini, 2011), asam lemak (Qasim, 2009 dalam Saini, 2011) dan seluruh bagian tanaman terkandung flavonoid (Gatora, dkk., 2007 dalam Saini, 2011), pada sumsum batang terkandung triterpenoid (Etika, 2013), pada kulit batang terkandung steroid (Fahmi, 2013).

## 2.3 Teknik Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder Daun Bunga Matahari

### 2.3.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Kristanti, dkk., 2006). Ekstraksi atau disebut dengan penyarian adalah proses pemisahan zat yang terdapat dalam sel, ditarik oleh cairan penyari (pelarut) sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah bila permukaan serbuk sampel yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Baraja, 2008).

Maserasi (*macerace* = mengairi, melunakkan) adalah cara ekstraksi yang paling sederhana (Ansel, 1989 dalam Baraja, 2008). Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari (pelarut). Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel.

Pada penyarian dengan maserasi, perlu dilakukan pengadukan. Pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan diluar butir serbuk simplisia, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel.

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut

tersebut. Secara umum pelarut-pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder (Lenny, 2006).

Ekstraksi beberapa senyawa metabolit sekunder dari tanaman daun bunga Matahari pada penelitian ini dilakukan dengan ekstraksi maserasi karena tekniknya yang sederhana. Secara umum ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari seluruh bagian tumbuhan seperti bunga, buah, daun, kulit batang dan akar menggunakan metode maserasi (Lenny, 2006). Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstraksi (Guenther, 1987).

Sifat kelarutan zat didasarkan pada teori *like dissolves like*, zat yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan zat yang bersifat nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar (Khopkar, 2003). Pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi adalah aseton, etil klorida, etanol, heksana, isopropil alkohol dan metanol. Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan secara berturut-turut mulai dari pelarut nonpolar, semi polar dan polar untuk mendapatkan kandungan kimia (golongan senyawa metabolit sekunder) yang dimiliki tanaman daun bunga Matahari berdasarkan tingkat kepolaran pelarut tersebut.

Pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu heksana, diklorometana dan metanol yang didasarkan pada pemilihan variasi pelarut yang sesuai. Pelarut-pelarut tersebut memiliki titik didih yang cukup rendah agar pelarut dapat mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu yang tinggi, bersifat inert, dapat melarutkan senyawaan yang sesuai dengan cukup cepat serta memiliki harga yang terjangkau

(Guenther, 2006). Kelarutan terhadap air dari pelarut-pelarut tersebut juga semakin tinggi dengan semakin tingginya tingkat kepolarannya. Titik didih masing-masing pelarut tersebut adalah n-heksana adalah 68,7 °C; diklorometana 40 °C dan metanol 65 °C (Sudarmadji, dkk., 2003). Menurut Ikpevan (2013), metanol dapat menarik senyawa saponin, tanin, flavonoid, dan glikosida.

Kepolaran suatu pelarut menunjukkan tingkat kelarutan pelarut air ataupun pelarut organik terhadap suatu bahan. Kepolaran ini timbul dari perbedaan dua kutub (*pole*) kelarutan. Kecenderungan suatu bahan yang lebih larut dalam air disebut memiliki sifat yang polar dan sebaliknya yang cenderung lebih larut dalam pelarut organik disebut nonpolar. Secara fisika, tingkat polaritas ini dapat ditunjukkan dengan lebih pasti melalui pengukuran konstanta dielektrik (D) suatu pelarut. Semakin besar konstanta dielektrikum suatu pelarut tersebut semakin polar seperti konstanta dielektrikum pada pelarut n-heksana 1,89; diklorometana 9,1 dan metanol 33 (Sudarmadji, dkk., 2003).

Menurut Widianti (2012), proses ekstraksi harus dilakukan dengan menggunakan pelarut yang sesuai pelarut polar digunakan untuk mengekstrak komponen polar pula, dan sebaliknya. Selain itu, rasio pelarut dan sampel yang hendak diekstrak, suhu yang digunakan selama proses ekstraksi juga turut menentukan hasil yang didapatkan selama proses ekstraksi.

Metode maserasi digunakan untuk mengekstraksi contoh yang relatif mudah rusak oleh panas. Metode ini dilakukan dengan merendam contoh dalam suatu pelarut baik tunggal maupun campuran dengan waktu tertentu yang umumnya 1-2 hari perendaman tanpa diberikan pemanasan. Kelebihan metode ini

di antaranya relatif sederhana, yaitu tidak memerlukan alat-alat yang rumit, relatif mudah, murah, dapat menghindari kerusakan dan hilangnya senyawa-senyawa aktif yang bersifat volatil. Kelemahan metode ini membutuhkan waktu relatif lama dan penggunaan pelarut yang tidak efektif dan efisien (Meloan, 1999).

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian Rohimah (2008) adalah maserasi. Adapun mekanisme dari metode maserasi, yakni adanya proses difusi pelarut ke dalam dinding sel tumbuhan untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang ada dalam tumbuhan tersebut dan biasanya digunakan untuk sampel yang belum diketahui sifat dan pencirian senyawanya.

Pada penelitian ini menggunakan metode maserasi bertingkat. Metode tersebut merupakan metode ekstraksi bertahap dengan menggunakan pelarut yang berbeda. Metode maserasi bertingkat lebih banyak digunakan dalam mengekstraksi senyawa antimikroba disebabkan lebih efisien karena dalam prosesnya akan didapatkan lebih dari satu jenis senyawa antimikroba tergantung jenis pelarut yang digunakan (Mawaddah, 2008).

### **2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi adalah suatu nama yang diberikan untuk teknik pemisahan tertentu. Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Pemisahan-pemisahan ini bergantung pada gerakan relative dari dua fase ini (Sastrohamidjojo, 2007). Salah satu cara pemisahan adalah Kromatografi Lapis Tipis. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu kromatografi yang berdasarkan proses adsorpsi. Lapisan yang dipisahkan terdiri

atas fase diam dan fase gerak. Fase diam yang dapat digunakan adalah silika atau alumina yang dilapiskan pada lempeng kaca atau alumunium. Jika fase diam berupa silika gel maka bersifat asam, jika fase alumina maka bersifat basa. Fase gerak atau larutan pengembang biasanya digunakan pelarut organik atau bisa juga campuran pelarut organik-anorganik (Gritter, 1991).

Kromotografi lapis tipis digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisa senyawa organik dalam jumlah kecil dan menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan KLT preparatif. KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya. Senyawa yang terpisah kemudian dikeruk dan dikumpulkan tiap-tiap lapisan untuk analisa dengan spektrofotometer UV-Visible, IR atau kolorimeter dengan reagen kromogenik (Khopkar, 2003).

Lapisan tipis seperti pada plat silika gel F<sub>254</sub> yang digunakan dalam suatu penelitian mengandung indikator flourosensi yang ditambahkan untuk membantu penampakan bercak warna pada lapisan yang telah dikembangkan. Indikator fluorosensi adalah senyawa yang memancarkan sinar, seperti dengan lampu UV. Jadi, lapisan yang mengandung indikator fluorosensi akan bersinar jika disinari pada panjang gelombang yang tepat. Jika senyawa pada bercak yang akan ditampakkan mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik berbagai jenis, sinar UV akan mengeksitasi tidak dapat mencapai indikator fluorosensi dan tidak ada cahaya yang dipancarkan. Hasilnya ialah bercak gelap dengan latar belakang yang bersinar. Cara ini sangat peka dan tidak merusak senyawa yang ditampakkan. Indikator fluorosensi yang paling berguna ialah

sulfide anorganik yang memancarkan cahaya jika disinari pada 254 nm. Indikator fluoresensi terdapat dalam penyerap niaga dan lapisan siap pakai sekitar 1 % dan tampaknya tidak berperan dalam proses kromatografi. Ada juga indikator fluoresensi organik yang memancarkan cahaya jika disinari pada 360 nm, tetapi kurang begitu disenangi karena indikator ini senyawa organik dan kadang-kadang bergerak dalam sistem kromatografi. Beberapa senyawa organik bersinar atau berfluoresensi sendiri pada 254 nm atau 360 nm dan dapat tampak dengan mudah (Gritter, 1991).

Hasil yang diperoleh diidentifikasi di bawah lampu UV (254 dan 366 nm) ditandai dengan ada atau tidaknya fluoresensi. Jika tidak tampak dengan cara di atas, maka dilakukan secara kimia yaitu penyemprotan dengan pereaksi yang sesuai (Auterhoff, 1987).

Sudjadi (1988) pada UV 254 nm, lempeng akan berfluoresensi sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 254 nm adalah karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian ke keadaan semula sambil melepaskan energi.

Jika senyawa pada bercak yang akan ditampakkan mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik jenis apa saja, sinar UV yang mengeksitasi tidak dapat mencapai indikator fluoresensi, dan tidak ada cahaya

yang dipancarkan. Hasilnya ialah bercak gelap dengan latar belakang yang bersinar (Gritter, 1991).

Pada UV 366 nm noda akan berfluorosensi dan lempeng akan berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 366 nm adalah karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksidokrom yang ada pada noda tersebut. Fluorosensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula sambil melepaskan energi. Sehingga noda yang tampak pada lampu UV 366 nm terlihat terang karena silika gel yang digunakan tidak berfluorosensi pada sinar UV 366 nm (Sudjadi, 1988).

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuan dapat dilakukan secara kimia, fisika maupun biologi. Cara kimia yang biasa dilakukan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Untuk penyemprotan lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang lempeng dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak. Sebagai contoh digunakan pereaksi Dragendorff dan Wagner untuk golongan alkaloid. Liebermann-Burchard untuk golongan triterpenoid/steroid,  $\text{FeCl}_3$  untuk golongan tanin dan lain sebagainya (Gandjar, 2007).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapisan tipis menggunakan harga Rf. Harga Rf didefinisikan sebagai berikut:

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

KLT juga merupakan suatu cara yang umum dilakukan menggunakan kromatografi kolom. Jadi secara ringkas KLT terutama berguna untuk tujuan (Kristanti dkk., 2006) :

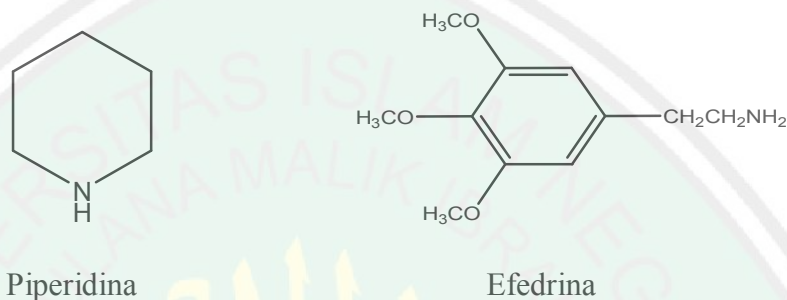
- a. Mencari pelarut yang sesuai untuk kromatografi kolom
- b. Analisis fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom
- c. Memonitor jalannya suatu reaksi kimia
- d. Identifikasi senyawa (uji kemurnian)

## 2.4 Senyawa Aktif Metabolit Sekunder dalam Tanaman

### 2.4.1 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa organik siklik yang mengandung nitrogen dengan bilangan oksidatif negatif yang penyebarannya terbatas pada makhluk hidup (Pelletier, 1983). Sedangkan menurut Suradikusumah (1989) alkaloid umumnya dinyatakan sebagai senyawa basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen yang merupakan bagian dari system siklik. Atom nitrogennya hampir selalu dalam bentuk gugus amina atau amida dan tidak pernah dalam bentuk nitro atau diazo. Substituen oksigen umumnya dalam bentuk gugus fenol, metoksil atau metilendioksil. Dalam bentuk basa, alkaloid dapat larut dalam pelarut organik, sedangkan dalam bentuk garam dapat larut dalam air (Tyler, 1981)

Alkaloid merupakan golongan zat hasil metabolisme sekunder terbesar pada tumbuhan. Telah diketahui ada sekitar 5500 senyawaan alkaloid yang tersebar pada berbagai famili (Harbone, 1987).



Gambar 2.2 Contoh struktur senyawa golongan Alkaloid (Robinson, 1995)

Alkaloid hanya ditemukan pada tumbuhan dan tidak pada bakteri. Kandungan alkaloid pada tumbuhan angiospermae lebih besar dibandingkan pada tumbuhan gymnospermae (Robinson, 1995). Beberapa famili tertentu dari tumbuhan monokotiledon dan dikotiledon memiliki alkaloid yang cukup beragam.

Konsentrasi alkaloid di dalam tumbuhan memiliki kisaran yang lebar yaitu dari hanya beberapa ppm (seperti pada alkaloid antikanker) sampai lebih dari 15% (seperti pada akar *Cinchona ledgeriana*) dan bervariasi dari bagian ke bagian, bahkan beberapa bagian mungkin tidak mengandung alkaloid sama sekali (Bruneton, 1993). Hanya saja jarang terjadi satu tumbuhan hanya mengandung satu jenis alkaloid karena kebanyakan dari tumbuhan menghasilkan suatu campuran alkaloid yang kompleks.

Pada tumbuhan, alkaloid terdapat sebagai garam yang dapat larut atau membentuk kombinasi dengan tanin. Senyawa ini umumnya terdapat pada akar, batang, kulit kayu, dan daun (Bruneton, 1993).

Pelarut atau pereaksi alkaloid biasanya menggunakan kloroform, aseton, amoniak dan metilena klorida. Pereaksi Meyer (kalium tetraiodomerkurat) paling banyak untuk mendeteksi alkaloid karena pereaksi ini mengendapkan hampir semua alkaloid. Pereaksi lain yang sering digunakan seperti pereaksi Wagner (iodium dalam kalium iodide), asam silikotungstat 5%, asam tanat 5%, pereaksi Dragendorff (kalium tetraiodobismutat), iodoplatinat dan larutan asam pikrat jenuh. Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu cara cepat untuk pemisahan alkaloid dengan silica gel sebagai penyerapnya. Pereaksi yang paling umum digunakan untuk menyemprot kromatogram adalah pereaksi Dragendorff (Robinson, 1995).

#### 2.4.2 Flavonoid

Flavonoid adalah kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam terutama pada jaringan tumbuhan tinggi. Senyawa ini merupakan produk metabolit sekunder yang terjadi dari sel dan terakumulasi dari tubuh tumbuhan sebagai zat racun (Robinson, 1991). Banyaknya senyawa flavonoid ini bukan karena banyaknya variasi struktur, akan tetapi lebih disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi atau glikosilasi pada struktur tersebut. Flavonoid di alam juga sering dijumpai dalam bentuk glikosidanya (Kristanti, dkk., 2006).

Senyawa flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6 - C_3 - C_6$ . Susunan tersebut dapat

menghasilkan tiga struktur yaitu: 1,3-diarilpropana (flavonoid), 1,2-diarilpropana (isoflavonoid), 2,2-diarilpropana (neoflavonoid) (Manitto, 1981).



Gambar 2.3 Struktur inti senyawa Flavonoid (Robinson, 1995)

Menurut Markham (1982), flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai gugus hidroksil yang tak tersulih, atau suatu gula, sehingga flavonoid cukup larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol dan air.

Flavonoid umumnya terikat pada gula sebagai glukosida dan aglikon flavonoid. Uji warna yang penting dalam larutan alkohol ialah direduksi dengan serbuk Mg dan HCl pekat. Diantara flavonoid hanya flavalon yang menghasilkan warna merah ceri kuat (Harborne, 1984).

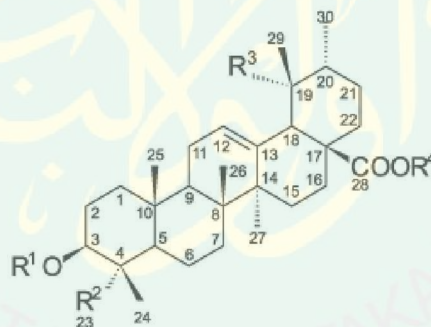
Flavonoid diketahui memiliki aktivitas antimikroba yang bersifat lipofilik sehingga mampu merusak membran mikroba, mereduksi infektivitas serta memperlihatkan efek inhibitor terhadap berbagai virus (Naim, 2004). Flavonoid juga bersifat sebagai zat insektisidal dan fungisidal (Robinson, 1991 *dalam* Rahman, 2003).

Beberapa senyawa (flavonol, kalkon) akan berfluorosensi di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 365 nm sedangkan senyawa yang lain (glikosida flavonol, antosianin, flavon) menyerap sinar dan tampak sebagai bercak gelap dengan latar belakang berfluorosensi. Glikosida flavon dan flavonol berfluorosensi kuning, flavonol kelihatan kuning pucat, katekin biru pucat. Selanjutnya di bawah cahaya biasa sambil diuapi uap amoniak flavon kelihatan

kuning, antosianin kelabu-biru, kalkon dan aouron merah jingga (Robinson, 1995).

### 2.4.3 Terpenoid

Semua terpenoid berasal dari molekul isoprena,  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$  dan kerangka karbonya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan  $\text{C}_5$  ini. Walaupun demikian, secara biosintesis senyawa yang berperan adalah isopentil pirofosfat,  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2\text{OPP}$ , yang terbentuk dari asetat melalui asam mevalonat,  $\text{CH}_2\text{OHCH}_2\text{C}(\text{OH},\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ . Isopentil piropospat terdapat dalam sel hidup dan berkesinambungan dengan isomernya, dimetilalil piropospat,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{OPP}$ .



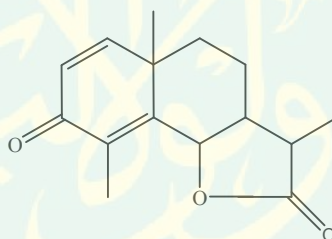
Gambar 2.4 Struktur inti Triterpenoid (Harbone, 1987)

Berdasarkan kenyataan ini, terpenoid dikelompokkan dalam 5 bagian:

- Monoterpen terdiri dari dua unit  $\text{C}_5$  atau 10 atom karbon.
- Siskuisterpen terdiri dari tiga unit  $\text{C}_5$  atau 15 atom karbon
- Diterpen terdiri dari empat unit  $\text{C}_5$  atau 20 atom karbon
- Triterpen terdiri dari enam unit  $\text{C}_5$  atau 30 atom karbon
- Tetraterpen terdiri dari delapan unit  $\text{C}_5$  atau 40 atom karbon

Secara kimia, terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat didalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya diekstraksi memakai petrolium eter, eter atau kloroform dan dapat dipisahkan secara kromatografi pada silika gel dengan pelarut ini (Harborne,1987).

Seskuiterpenoid merupakan senyawa terpenoid yang dihasilkan oleh tiga unit isopren yang terdiri dari kerangka asiklik dan bisiklik dengan kerangka dasar naftalen. Anggota seskuiterpenoid yang penting adalah farnesol, alkohol yang tersebar luas. Senyawa ini mempunyai bioaktivitas yang cukup besar diantaranya adalah sebagai antifedant, antimikroba, antibioatik, toksin, serta regulator pertumbuhan tanaman dan pemanis (Robinson, 1995).



Gambar 2.5 Struktur Seskuiterpen lakton (Santonin) (Sirait, 2007)

Triterpenoid biasanya terdapat dalam daun dan buah, seperti apel dan per, yang berfungsi sebagai pelindung untuk menolak serangga dan serangan mikroba. Triterpenoid juga terdapat dalam damar, kulit batang dan getah (Euphorbia, Hevea dan lain-lain). Triterpenoid tertentu dikenal karena rasanya, terutama kepahitannya. Listiani, dkk., (2005) menyatakan bahwa eluen n-heksana: etil asetat (2:8) dapat memisahkan ekstrak daun Kucai (*Allium schoenoprasum* L. Liliaceae) yang isolatnya positif mengandung triterpenoid. Pereaksi Lieberman-Burchard secara umum digunakan untuk mendeteksi triterpenoid menghasilkan

warna violet (Harborne, 1987). Bawa (2009), menyebutkan bahwa isolat golongan senyawa triterpenoid dengan pereaksi Lieberman-Burchard yaitu akan terjadi perubahan warna yang spesifik dari warna hijau tua (warna isolat) menjadi warna ungu tua.

Semua jenis triterpenoid dipisahkan dengan cara yang serupa, terutama didasarkan kepada KLT dan KCG. KLT praktis selalu dilakukan pada lapisan silika gel. KLT silika gel  $\text{AgNO}_3$  (bubur silika gel untuk membuat pelat disiapkan dengan menggunakan larutan  $\text{AgNO}_3$ ) digunakan untuk memisahkan triterpenoid tak jenuh berdasarkan jumlah ikatan rangkap terisolasi yang ada dalam molekul. Dari 50 pereaksi tersebut, yang mungkin paling populer kloroform. Pada pemanasan, selama 10 menit pada  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , plat yang sudah disemprot menghasilkan berbagai warna yang terlihat dengan sinar biasa dan sinar UV. Pereaksi Liberman-Buchard telah disesuaikan untuk KLT dan juga populer. Plat disemprot dengan campuran  $\text{H}_2\text{SO}_4$  saja atau diencerkan dengan air dan alkohol. Pelarut yang paling sederhana yaitu air, dapat dipakai sebagai penyemprot untuk mendeteksi steroid pada plat KLT (Gritter, 1991).

Pemisahan yang dilakukan Maulidatul (2010), dengan menggunakan eluen n-heksana : kloroform (1 : 1) pereaksi Lieberman-Buchard dengan dan dilakukan penyinaran di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm. Nilai Rf yang didapat 0,14-0,89 dengan menghasilkan bercak noda berwarna ungu muda, merah keunguan dan coklat kekuningan.

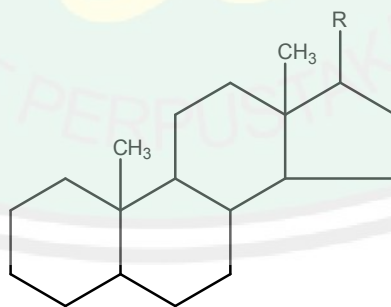
Reveny (2011) menyebutkan bahwa pada fraksi etil asetat tanaman daun sirih merah mengandung senyawa triterpenoid dengan menggunakan eluen

pengembang n-heksana :etil asetat (2 : 8) diperoleh 2 bercak noda dengan nilai Rf 0,41 dan 0,29 dan diperoleh warna noda ungu merah. N-heksana : etil asetat (6:4), diperoleh 2 bercak noda dengan nilai Rf 0,84 dan 0,76 dan diperoleh warna noda ungu merah (Reveny, 2011).

Rita (2010) menyebutkan bahwa pemisahan 1,02 g ekstrak kental kloroform Rimpang Temu putih dengan kromatografi kolom menggunakan campuran eluen n-heksana : etil asetat (1:1) dan fase diam silika gel 60 dengan pereaksi Lieberman-Burchad menghasilkan warna coklat.

#### 2.4.4 Steroid

Steroid adalah terpenoid yang kerangka dasarnya terbentuk dari sistem cincin siklopentana prehidrofenantrena. Steroid merupakan golongan senyawa metabolit sekunder yang banyak dimanfaatkan sebagai obat. Hormon steroid pada umumnya diperoleh dari senyawa-senyawa steroid alam terutama dalam tumbuhan (Djamal, 1988).



Gambar 2.6 Struktur inti senyawa Steroid (Poedjiadi, 1994)

Sterol merupakan nama khusus yang dipakai untuk steroid yang memiliki gugus hidroksi, tetapi karena praktis semua steroid tumbuhan berupa alkohol dengan gugus hidroksi pada posisi C-3, maka semuanya disebut sterol. Selain

dalam bentuk bebasnya, sterol juga sering dijumpai sebagai glikosida atau sebagai ester dengan asam lemak. Glikosida sterol sering disebut sterolin (Kristanti, dkk., 2006).

Harbone (1973) mengatakan bahwa di alam senyawa steroid terdapat pada hewan, tanaman tingkat tinggi, bahkan terdapat pula pada beberapa tanaman tingkat rendah seperti jamur (fungi). Pada hewan dapat dijumpai antara lain sebagai hormone korteks adrenal (contohnya corticosteron), asam empedu (contohnya asam kolat), dan hormon kelamin (contonya androgen dan estrogen).

Identifikasi steroid dilakukan dengan uji Liebermann Burchard yaitu penambahan beberapa tetes asam asetat anhidrat dan 0,5 ml kloroform pada sedikit ekstrak lintah laut, lalu diaduk. Selanjutnya ditambahkan satu tetes asam sulfat pekat. Timbulnya warna hijau menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung steroid (Cook, 1985 dalam Riris, 1994).

Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna steroid adalah dengan reaksi Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi warna yang lain pada steroid dilakukan Brieskorn dan Briner (asam klorosulfonat dan Sesolvan NK) menghasilkan warna coklat (Robinson, 1995).

Hasil pemonitoran dengan metode KLT pada isolat spon laut memperlihatkan pemisahan noda yang sangat baik menggunakan fase gerak n-heksana: etil asetat (7:3) dengan lampu UV<sub>254</sub>. Isolate diduga termasuk golongan steroid karena hasil uji dengan pereaksi metanol/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% berwarna merah muda dan pereaksi Liebermann-Burchard berwarna hijau, sedangkan dengan vanillin asam sulfat berwarna hijau kebiruan (Handayani, dkk., 2008).

Penelitian Handayani, dkk., (2008) menunjukkan KLT golongan senyawa steroid dengan pereaksi Lieberman-Burchad menunjukkan terbentuknya bercak noda berwarna hijau. Biru ungu sampai coklat setelah dideteksi di bawah lampu UV 366 nm.

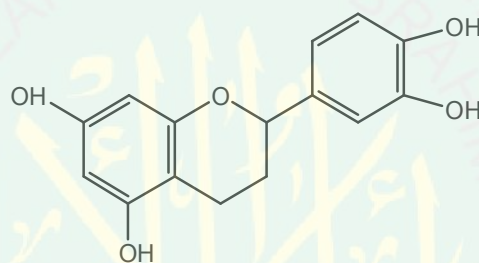
Penelitian Bayyinah (2013) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4:1) dengan reagen Lieberman Burchad pada identifikasi ekstrak diklorometan daun bunga Matahari. Halimah (2010), menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3) menghasilkan warna hijau terang, hijau kekuningan dan hijau kecoklatan dengan nilai Rf 0,57 ; 0,76 ; 0,94 ; 0,96. ( Reveny, 2011), menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (8:2) diperoleh 2 spot dengan Rf 0,41 dan 0,29 (ungu merah), dengan perbandingan (6:4) diperoleh 2 spot dengan Rf 0,84 dan 0,76 (ungu merah) setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard. Gunawan, dkk, (2008) menggunakan campuran eluen kloroform:metanol (3:7) pada ekstrak herba meniran dengan menghasilkan 1 noda berwarna ungu muda dengan nilai Rf 0,58.

#### 2.4.5 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan flavonoid, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Secara kimia tanin dibagi menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi atau tanin katekol dan tanin terhidrolisis atau tanin galat (Harborne,1987).

Tanin terkondensasi merupakan oligomer atau polimer flavonoid (flavan-3-ol atau flavan-3,4-diol) dimana ikatan C-C tidak mudah untuk dihidrolisis, biasanya disebut juga dengan nama *proantosianidin*. Tanin terkondensasi terdapat

dalam paku-pakuan, *gymnospermae* dan *angiospermae*, terutama pada jenis tumbuh-tumbuhan berkayu. Tanin terhidrolisis merupakan molekul dengan poliol (umumnya D-glukosa) sebagai pusatnya. Gugus –OH pada karbohidrat sebagian atau seluruhnya teresterifikasi dengan gugus karboksil pada asam galat atau asam elagat. Penyebaran tanin terhidrolisis terbatas pada tumbuhan berkeping dua (Giner-Chavez, 2001 dalam Nuraini, 2002). Salah satu fungsi tanin dalam tumbuhan adalah sebagai penolak hewan pemakan tumbuhan (Harborne, 1987).



Gambar 2.7 Contoh struktur senyawa golongan Tanin (Robinson, 1995)

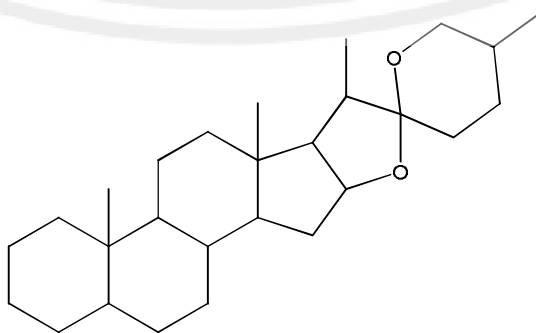
Beberapa tanin terbukti memiliki ankifitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti "reverse" transkriptase dan DNA topoisomerase (Robinson, 1995).

Ekstraksi dilakukan dengan aseton : air untuk mencegah hidrolisis ikatan ester dalam tanin. Komponen ester dari ekstrak kasar dapat dipantau dengan kromatografi kertas dua arah dengan memakai pengembang yang sama seperti pada tanin-terkondensasi. Tanin-terhidrolisiskan dapat dibedakan dari tanin-terkondensasi karena kelincahan geraknya berbeda dan kemudian dideteksi dengan sembarang penyemprot fenol umum (Harborne, 1987).

#### 2.4.6 Saponin

Saponin berasal dari bahasa latin *sapo* yang berarti sabun, karena sifatnya menyerupai sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dengan air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Saponin dalam larutan yang sangat encer dapat sebagai racun ikan, selain itu saponin juga berpotensi sebagai antimikroba, dapat digunakan sebagai bahan baku sintesis hormon steroid. Dua jenis saponin yang dikenal yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid. Aglikonnya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam asam atau menggunakan enzim (Robinson, 1995).

Pembentukan busa sewaktu mengekstrak tumbuhan atau waktu memekatkan ekstrak tumbuhan merupakan bukti terpercaya akan adanya saponin. Memang betul, bila dalam tumbuhan terdapat banyak saponin, sukar untuk memekatkan ekstrak alkohol-air dengan baik, walaupun digunakan penguap putar. Karena itu, uji saponin yang sederhana ialah mengocok ekstrak alkohol-air dari tumbuhan dalam tabung reaksi dan diperlihatkan apakah ada terbentuk busa tahan lama pada permukaan cairan (Harbone, 1987).



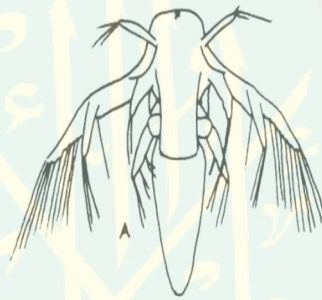
Gambar 2.8 Struktur inti senyawa Saponin (Robinson, 1995)

## 2.5 Larva Udang (*Artemia salina* Leach)

### 2.5.1 Klasifikasi

Larva udang memiliki klasifikasi sebagai berikut (Mudjiman, 1989):

Kerajaan	: Animalia
Divisi	: Arthropoda
Subdivisi	: Crustacea
Kelas	: Branchiopoda
Bangsa	: Anostraca
Suku	: Artemiidae
Marga	: <i>Artemia</i> L.
Jenis	: <i>Artemia salina</i> Leach



Gambar 2.9 Nauplius *Artemia salina* Leach (Panggabean, 1984)

### 2.5.2 Lingkungan Hidup

*Artemia* merupakan kelompok udang-udangan dari phylum Arthropoda. Mereka berkerabat dengan dengan zooplankton lain seperti copepode dan daphnia (kutu air). *Artemia* hidup di danau-danau garam (berair asin) yang ada di seluruh dunia. *Artemia* hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 15-300 per mil). Suhu yang dikehendaki berkisar antara 25-30 °C, oksigen terlarut sekitar 3 mg/L, dan pH antara 7,3-8,4. Secara alamiah salinitas danau dimana mereka hidup sangat bervariasi, tergantung pada jumlah hujan dan penguapan yang terjadi. Apabila kadar garam kurang dari 6% telur *Artemia* akan tenggelam sehingga telur tidak bisa menetas, hal ini biasanya terjadi apabila air tawar banyak

masuk ke dalam danau di musim penghujan. Apabila kadar garam lebih dari 25% telur akan tetap berada dalam kondisi tersuspensi, sehingga dapat menetas dengan normal (Mudjiman, 1995).

*Artemia salina* sering disebut *brine shrimp* adalah sejenis udang-udangan primitive yang sudah dikenal cukup lama dan Linnaeus pada tahun 1778 diberi nama *Cancer salinus*, kemudian oleh Leach diubah menjadi *Artemia salina* pada tahun 1891. *Artemia* merupakan salah satu komponen penyusunan ekosistem laut yang keberadaan sangat penting untuk perputaran energi dalam rantai makanan, selain itu *Artemia* juga dapat digunakan dalam uji laboratorium untuk mendeteksi toksisitas suatu senyawa dari ekstrak tumbuhan (Kanwar, 2007).

Secara alami, makanan *Artemia* berupa sisa-sisa jasad hidup yang hancur, ganggang-ganggang renik, bakteri dan cendawan (ragi laut). Selama pemeliharaan makanan yang diberikan adalah katul, padi, tepung beras, tepung terigu, tepung kedelai atau ragi (Mudjiman, 1995).

### 2.5.3 Perkembangan dan Siklus Hidup

*Artemia* dewasa rata-rata berukuran sekitar 8 mm, meskipun demikian pada kondisi yang tepat mereka dapat mencapai ukuran sampai dengan 20 mm. pada kondisi demikian biomasnya akan mencapai 500 kali dibandingkan biomassa pada fase nauplii (Mudjiman, 1995).

Dalam tingkat salinitas rendah dan pakan yang optimal, betina *Artemia* bisa menghasilkan naupli sebanyak 75 ekor perhari. Selama masa hidupnya (sekitar 50 hari) mereka bisa memproduksi nauplii rata-rata sebanyak 10-11 kali. Dalam kondisi super ideal, *Artemia* dewasa bisa hidup selama 3 bulan dan

memproduksi nauplii atau kista sebanyak 300 ekor (butir) per 4 hari. Kista akan terbentuk apabila lingkungannya berubah menjadi sangat salin dan bahkan pakannya sangat kurang dengan fluktuasi oksigen sangat tinggi antara siang dan malam hari (Isnansetyo, 1995)

*Artemia* dewasa toleran terhadap selang suhu 18 hingga 40 °C. Temperatur optimal untuk penetasan kista dan pertumbuhan adalah 25-30 °C. Meskipun demikian hal ini akan ditentukan oleh strain masing-masing. *Artemia* menghendaki kadar salinitas antara 30-35 ppt, dan mereka dapat hidup dalam air tawar selama 5 jam sebelum akhirnya mati. Variable lain yang penting adalah pH, cahaya, dan oksigen. pH dengan selang 8-9 merupakan selang yang paling baik, sedangkan pH di bawah 5 atau lebih tinggi dari 10 dapat membunuh *Artemia*. Cahaya minimal diperlukan dalam proses penetasan dan akan sangat menguntungkan bagi pertumbuhan mereka. Lampu standar *grow-lite* sudah cukup untuk keperluan hidup *Artemia*. Kadar oksigen harus dijaga dengan baik untuk pertumbuhan *Artemia*, dengan suplai oksigen yang baik, *Artemia* akan berwarna kuning atau merah jambu. Warna ini bisa berubah menjadi kehijauan apabila mereka banyak mengonsumsi mikro alga (Mudjiman, 1995).

*Artemia* diperjualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista. Kista ini berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna kecoklatan dengan diameter berkisar 200-300 mikron. Kista yang berkualitas baik akan menetas sekitar 18-24 jam apabila di inkubasi air yang bersalinitas 5-70 permil. Ada beberapa tahapan pada proses penetasan *Artemia* ini yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi

penyerapan air sehingga kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan disusul tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum nauplii keluar dari cangkang (Isnansetyo, 1995).

## 2.6 Uji Sitotoksitas Terhadap Larva Udag *Artemia salina* Leach

Sitotoksitas merupakan kematian sel oleh komponen-komponen kimia atau mediator sel (sel T sitotoksik). Sitotoksitas biasa digunakan sebagai pedoman di dalam laboratorium untuk mendeteksi kematian sel, tanpa melihat mekanismenya. Aktivitas sitotoksik merupakan proses penting dalam membunuh sel-sel kanker (Wyllie, 2010). Sitotoksitas merupakan sifat toksik suatu agen kimia terhadap sel kanker yang diuji secara *in vitro*. Sifat toksik ini jika diujikan terhadap sel kanker secara *in vivo* maka agen kimia tersebut dikatakan memiliki aktivitas antitumor. Sementara itu, istilah antikanker digunakan untuk material yang memiliki sifat toksik terhadap sel kanker yang diuji secara klinis terhadap manusia (Itharat, 2007)

Toksisitas menurut ilmu kimia adalah kerusakan yang ditimbulkan oleh suatu bentuk aksi kimia yang mempunyai bentuk dan variasi yang luas. Asam-asam kuat atau alkalis, yang mengalami kontak langsung dengan organ mata, kulit dan atau saluran pencernaan, dapat mengakibatkan kerusakan pada jaringan dan bahkan kematian pada sel-sel (Palar, 1994). Toksisitas (*toxicity*) merupakan ukuran relatif derajat racun antara satu bahan kimia terhadap bahan kimia lain pada organisme yang sama kemampuan racun (molekul) untuk menimbulkan

kerusakan apabila masuk ke dalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya (Soemirat, 2005). Cahyono, (2004) menyatakan bahwa toksisitas adalah kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan pada organisme hidup. Kadar racun suatu zat kimia salah satunya dinyatakan dengan istilah LC<sub>50</sub> (*Lethal Concentration-50*). LC<sub>50</sub> adalah kadar atau konsentrasi suatu zat, yang dinyatakan dalam miligram bahan kimia per-meter kubik media uji (*part permillion* atau ppm), yang dapat menyebabkan 50% kematian pada binatang percobaan dari suatu kelompok spesies setelah binatang percobaan tersebut terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004).

Uji sitotoksik larva udang *Artemia salina* telah digunakan sejak 1956 untuk berbagai pengamatan bioaktivitas senyawa bahan alam. Uji toksisitas larva udang memang tidak spesifik untuk antitumor, tetapi kemampuannya untuk mendeteksi 14 dari 24 *Ettpphorbiaceae* yang aktif terhadap uji leukemia *in vivo* mencit dan mendeteksi 2 dari 6 ekstrak *Euphorbiaceae* yang aktif terhadap uji karsinoma nasofaring. Hal ini memungkinkan uji toksisitas larva udang dapat digunakan sebagai uji penapisan senyawa bioaktif tahap awal dari rangkaian uji toksisitas untuk mendapatkan dosis yang aman bagi manusia.

Meyer dan Ferrigini (1982) memanfaatkan *Artemia salina* L. untuk menguji aktivitas biologis secara umum dan digunakan pertama kali oleh Institut Kanker di Amerika Serikat. Penelitian-penelitian terhadap senyawa-senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker memerlukan biaya yang cukup besar, oleh karena itu pengujian dengan *Artemia salina* L. ini dipakai sebagai uji pendahuluan. Apabila dalam pengujian menggunakan *Artemia salina* ini

memperlihatkan hasil yang cukup baik, maka dapat pengujian lebih lanjut (Kristianti, dkk., 2011).

Di samping mudah diperoleh, *Artemia salina* L. memiliki beberapa keunggulan seperti perkembangannya cepat, harganya murah, metode percobaannya mudah, untuk uji ini hanya memerlukan sampel sedikit (sangat sesuai untuk uji aktivitas suatu senyawa hasil isolasi), tidak memerlukan laboratorium khusus dan hasilnya dapat dipercaya (Kristianti, dkk., 2011).

Senyawa bioaktif hampir selalu toksik pada dosis tinggi. Daya bunuh *in vivo* dari senyawa terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas dan untuk memonitorfraksi bioaktif selama fraksinasi dan pemurnian. Salah satu organisme yang sangat sesuai untuk hewan uji tersebut adalah *Brine Shrimp Test* (Lenny, 2006).

*Brine Shrimp Letality Test* (BSLT) adalah suatu metode pengujian dengan menggunakan hewan uji yaitu *Artemia salina* Leach, yang dapat digunakan sebagai bioassay yang sederhana untuk meneliti sitotoksisitas akut suatu senyawa, dengan cara menentukan nilai  $LC_{50}$  yang dinyatakan dari komponen aktif suatu simplisia maupun bentuk sediaan ekstrak dari suatu tanaman (Frank, 1995). Metode BSLT memiliki beberapa kelebihan, antara lain biaya relatif murah, sederhana, waktu pelaksanaan cepat, praktis, dan tidak memerlukan teknik perawatan khusus. Jumlah sampel yang digunakan relatif sedikit dan tidak memerlukan peralatan khusus untuk melakukan uji ini. Metode ini telah banyak digunakan untuk uji sitotoksisitas dalam analisis pestisida, anestetik, dan zat pencemar air. Menurut Anderson, dkk. (1998) selain metode BSLT ada beberapa

metode lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa bioaktif suatu tanaman, antara lain *inhibition of crown gall tumor in discs of potato tubers* dengan menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (bioassay untuk antitumor), *inhibition of frond proliferation in duckweed* (bioassay untuk herbisida dan stimulasi pertumbuhan tanaman), dan *yellow fever mosquito larvae lethality test* (bioassay untuk pestisida).

Tingkat toksisitas suatu bahan dapat dilihat pada Tabel 2.1 (Meyer, dkk., 1982).

Tabel 2.1 Kategori toksisitas (Meyer, dkk., 1982)

Kategori	LC <sub>50</sub> (µg/ml)
Sangat toksik	< 30
Toksik	30-1000
Tidak toksik	>1000

Uji sitotoksik pada hewan uji dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil terhadap manusia untuk mencari dosis yang aman. Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah efek toksikan (respon) terhadap hewan uji yang dapat dilihat hanya berupa immobilisasi ke dalam tiap tabung berisi konsentrasi toksikan yang berbeda dimasukkan 10 ekor hewan uji, disertai dengan tabung kontrol. Immobilisasi ini sudah dianggap sebagai kematian untuk hewan uji seperti *Artemia salina*. LC<sub>50</sub> diperoleh dengan ekstrapolasi kurva (Soemirat, 2005).

Menurut Widianti (2012), mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa alkaloid, triterpenoid, saponin dan flavonoid dalam buah Pare yang dapat menghambat daya makan larva (antifedant). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, kemudian alat

pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan.

Menurut Susanti dkk, (2011) uji aktivitas sitotoksik dilakukan terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan menggunakan metode (BSLT). Pemilihan metode ini sebagai penapisan awal dalam upaya pencarian senyawa antikanker karena biaya percobaan yang murah, proses pengerjaan yang cepat, sederhana, dan tidak diperlukan kondisi yang aseptis. Selain itu, larva *Artemia salina* Leach memiliki beberapa keunggulan diantaranya mudah didapat, mudah dibiakkan dan dapat hidup pada rentangan salinitas yang tinggi. Larva *Artemia salina* Leach diperoleh dengan menetas telur selama 48 jam. Larva yang telah menetas akan berenang ketempat yang terang. Hal ini akan dapat memudahkan untuk pemisahan dan pengambilan hewan ini yang telah berkembang menjadi larva.

Tabel 2.1 Aktivitas sitotoksitas (Zuhud, 2011)

Klasifikasi	LC <sub>50</sub> µg/ml
Aktivitas tinggi	< 10
Aktif	>10< 50
Aktif sedang	> 50 < 100
Tidak aktif	> 100

Menurut Kristanti, dkk., (2006) uji tosisitas dengan *Artemia salina* L. dilakukan dengan memasukan telur *Artemia salina* L. sebanyak 100 mg ke dalam bejana yang berisi air laut. Setelah 24-48 jam, telur akan menetas dan cangkang telur dibersihkan. Kemudian disiapkan beberapa wadah, masing-masing di masukkan 30 ekor *Artemia salina* L. dan 15 mL air laut. Wadah pertama sebagai

kontrol sedangkan wadah-wadah yang lainnya ditambahkan larutan uji (dibuat dari zat yang akan diuji toksisitasnya). Larutan uji yang digunakan mempunyai kadar yang bervariasi (variasi kadar larutan uji dapat ditentukan menurut kebutuhan). Sedangkan untuk prosedur dilakukan dengan menggunakan replikasi (3-5 kali). Apabila senyawa tidak larut dalam air, maka senyawa dilarutkan dalam pelarut organik polar yang larut dalam air. Untuk pengamatan dilakukan setelah *Artemia salina* Leach kontak dengan larutan uji selama 6 sampai 24 jam. Selanjutnya, data yang digunakan adalah jumlah kematian *Artemia salina* Leach yang dihitung menurut rumus:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{A-B}{C} \times 100 \% \dots\dots\dots (2.2)$$

Keterangan :

A = jumlah *Artemia salina* L. yang mati pada larutan uji

B = jumlah *Artemia salina* L. yang mati pada kontrol

C = jumlah *Artemia salina* L. mula-mula

Apabila pada kontrol terjadi kematian lebih dari 5 % tetapi kurang dari 10 %, maka dilakukan koreksi Abbott Formula dengan rumus:

$$\text{Angka Kematian} = \frac{\% \text{ kematian hewan uji} - \% \text{ kematian hewan kontrol}}{100 - \% \text{ kematian hewan uji}} \dots\dots (2.3)$$

Jika kematian pada kontrol lebih dari 10 %, maka uji dibatalkan dan dilakukan pengujian ulang.

Penelitian Carballo, dkk. (2002), menunjukkan adanya hubungan yang konsisten antara sitotoksitas dan letalitas larva udang pada ekstrak tanaman,

sehingga metode BSLT dapat dipercaya untuk menguji aktivitas farmakologis dari bahan-bahan alami. Apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut harga  $LC_{50}$  dengan metode BSLT, maka tanaman tersebut dapat berpotensi sebagai obat. Namun, bila tidak bersifat toksik maka tanaman tersebut dapat diteliti kembali untuk mengetahui khasiat lainnya dengan menggunakan hewan coba lain yang lebih besar dari larva *Artemia salina* Leach seperti mencit dan tikus secara *in vivo*.



## BAB III

### BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2013 sampai dengan bulan Maret 2014 di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah beaker glass 50 mL, 100 mL gelas ukur 100 mL, 250 mL pipet tetes, *rotary evaporator*, pengaduk kaca, erlenmeyer 500 mL dan 1000 mL, oven, blender, gunting, *aluminium foil*, neraca analitik, kertas saring *whatman*, plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub>, lampu UV  $\lambda$  366 nm, pipa kapiler, penyaring *buchner*, *shaker*, labu ukur 10 mL, aerator, botol vial, korek api, tabung reaksi, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipet ukur 25 mL, pinset, cawan penguap, kaca arloji, corong gelas dan mikropipet.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L) yang diambil dari daerah Sidomulyo Batu. Hewan uji yang digunakan adalah larva udang *Artemia salina* Leach.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut n-heksan p.a, diklorometana p.a dan metanol p.a. Bahan lain yang digunakan adalah, larva udang (*Artemia salina* L), aquades, reagen Lieberman-Burchard, plat KLT

silika gel F<sub>254</sub>, pereaksi Dragendrof, pereaksi Meyer, HCl pekat, HCl 1 N, metanol 50 %, asam asetat glasial, air laut, HCl 2 %, CH<sub>3</sub>COOH anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, logam Mg, DMSO, besi (III) klorida heksahidrat, aseton, kloroform, petroleum eter, vanillin, etil asetat, benzene, dan padatan iodin.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel diambil dari seluruh bagian tanaman daun bunga Matahari kemudian sampel tersebut dikeringkan dan diserbukkan. Serbuk sampel diekstrak dengan 3 pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yaitu n-heksana p.a, diklorometana p.a dan metanol p.a untuk mengetahui ekstrak yang memiliki potensi bioaktivitas tertinggi terhadap *Artemia salina* Leach dan golongan senyawa pada masing-masing ekstrak. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat pada masing-masing fraksi, yang akan diuji sitotoksiknya untuk mengetahui tingkat toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach melalui nilai LC<sub>50</sub> serta diuji kandungan senyawanya melalui uji fitokimia.

Pengujian fitokimia dilakukan menggunakan uji reagen untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang terkandung dalam masing-masing ekstrak pekat tanaman yang memiliki bioaktivitas tertinggi. Uji fitokimia lain dilakukan dengan KLT berdasarkan kandungan golongan senyawa yang positif dari hasil uji reagen, untuk mendukung hasil identifikasi adanya kandungan golongan senyawanya.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Ekstraksi komponen aktif
3. Uji sitotoksik dengan larva udang *Artemia salina* Leach
4. Uji fitokimia dengan uji reagen
5. Uji fitokimia dengan KLT
6. Analisis Data

### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Preparasi Sampel

Daun bunga Matahari (*Helianthus annuus* L) diambil dari desa Sidomulyo Batu. Seluruh bagian dari daun bunga Matahari segar ditimbang kemudian dicuci dengan air bersih, dipotong kecil-kecil, sampel dipanaskan dengan terik matahari secara tidak langsung dengan cara ditutupi dengan kain hitam selama 2 jam. Kemudian dilanjutkan dengan dikering anginkan (di udara terbuka terlindung dari panas matahari) selama 7 hari. Setelah itu, diblender sampai terbentuk serbuk dan di ayak menggunakan ukuran ayakan 60 mesh (Ngibad, 2013).

#### 3.5.2 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi/perendaman dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yaitu n-heksana, diklorometan dan metanol. Ekstraksi diulangi sebanyak 3 kali pada

masing-masing pelarut yang dimungkinkan bahwa kandungan senyawa pada tanaman sudah cukup banyak yang terekstrak pada masing-masing tahapnya. Serbuk tanaman daun bunga Matahari ditimbang sebanyak 60 g. Ekstraksi untuk pelarut pertama, menggunakan n-heksana sebanyak 300 mL. Perendaman dilakukan selama 24 jam, pengadukkan dibantu dengan *shaker* selama 3 jam/hari, kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama. Selanjutnya, filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu.

Ekstraksi untuk pelarut kedua, menggunakan diklorometana sebanyak 300 mL. Perendaman dilakukan selama 24 jam, pengadukkan dibantu dengan *shaker* selama 3 jam/hari, kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama. Selanjutnya, filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu.

Ekstraksi untuk pelarut ketiga, menggunakan metanol p.a sebanyak 300 mL. Perendaman dilakukan selama 24 jam, pengadukkan dibantu dengan *shaker* selama 3 jam/hari, kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama. Selanjutnya, filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu.

Ketiga ekstrak yang diperoleh dari masing-masing pelarut dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 40 °C sampai diperoleh ekstrak pekat n-heksana, diklorometan dan metanol. Ketiga ekstrak pekat yang diperoleh diuji sitotoksitasnya dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach dan diuji fitokimia dengan uji reagen dan diperkuat dengan uji KLT (Kromatografi Lapis

Tipis) terhadap ekstrak yang memiliki potensi bioktivitas tertinggi terhadap larva udang.

### 3.5.3 Uji Sitotoksik dengan Larva Udang *Artemia salina* L

#### 3.5.3.1 Penetasan Larva Udang

Disiapkan bejana bersekat dua untuk penetasan telur *Artemia salina* Leach disatu ruang dengan disinari diletakkan lampu untuk menghangatkansedangkan ruang sebelahnya diberi air laut. Dimasukkan air laut 250 mL kemudian dimasukkan 2,5 mg telur udang untuk ditetaskan. Pada bagian telur ditutup dengan aluminium foil, dan lampu dinyalakan selama  $\pm$  48 jam untuk menetasakan telur. Telur akan menetas setelah 18-24 jam dan larvanya disebut naupli. Naupli siap untuk diuji BSLT setelah larva ini berumur 48 jam (Subyakto, 2003 dalam Nurhayati 2006).

#### 3.5.3.2 Uji Sitotoksik

Perlakuan uji sitotoksisitas dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan pada masing-masing ekstrak sampel. Botol disiapkan untuk pengujian, masing-masing ekstrak membutuhkan 21 botol dan 3 botol sebagai kontrol. Ekstrak kental n-heksana, diklorometana dan metanol ditimbang sebanyak 100mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya masing-masing sebanyak 10 mL. Larutan yang diperoleh selanjutnya dipipet masing-masing sebanyak 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, 80  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering. Ekstrak dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL, ditambahkan dengan 100  $\mu$ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2

mL air laut, kemudian diaduk sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Setelah itu, larutan dipindahkan dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan dengan air laut sampai volume 10 mL dan dikocok sampai homogen, sehingga konsentrasinya masing-masing larutan menjadi 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Kemudian larutan dipindahkan ke dalam gelas vial dan dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach.

Kontrol yang digunakan dalam penelitian ini ada 3 yakni kontrol negatif atau media (DMSO tanpa ekstrak), kontrol pelarut masing-masing ekstrak dan kontrol air laut. Tujuannya adalah untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penggunaan ketiga kontrol tersebut dalam pengujian terhadap larva udang *Artemia salina* L.

Kontrol negatif dibuat dengan dimasukkan 100  $\mu$ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut ke dalam *beaker glass* 100 mL, kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 10 mL, dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, kemudian larutan dipindahkan ke dalam botol vial dan dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva udang. Analisis data dilakukan untuk mencari nilai  $LC_{50}$  dengan analisa probit (Rita, dkk., 2008).

#### **3.5.4 Uji Fitokimia dengan Uji Reagen**

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dari ekstrak pekat n-heksana, diklorometan dan metanol dari tanaman daun bunga Matahari

dilarutkan dengan sedikit masing-masing pelarutnya. Kemudian dilakukan uji alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid/ steroid, tanin dan saponin (Kristanti, dkk., 2006).

#### **3.5.4.1 Uji Alkaloid**

Ekstrak tanaman daun bunga Matahari dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen Meyer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan, menunjukkan adanya alkaloid.

#### **3.5.4.2 Uji Flavonoid**

Ekstrak tanaman daun bunga Matahari dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol. Setelah itu ditambah 3-4 pita logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah, orange, hijau menunjukkan adanya flavonoid dan tergantung struktur flavonoid yang terkandung dalam ekstrak tersebut.

#### **3.5.4.3 Uji Seskuiterpenoid (Sulistyaningsih, 2009)**

Sampel dilarutkan dengan petroleum eter, kemudian ditempatkan dalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Hasil pengeringan ditambahkan larutan vanillin 10 % dalam asam sulfat pekat. Terjadinya perubahan warna-warna menunjukkan positif mengandung seskuiterpenoid.

#### **3.5.4.4 Uji Triterpenoid dan Steroid (Indrayani, 2006)**

Ekstrak tanaman daun bunga Matahari dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL anhidrat asetat.

Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

#### **3.5.4.5 Uji Tanin dengan FeCl<sub>3</sub>**

Masing-masing 10 tetes ekstrak daun bunga Matahari ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tinta, maka sampel tersebut mengandung tanin.

#### **3.5.4.6 Uji Saponin**

Masing-masing 10 tetes ekstrak daun bunga Matahari dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N, busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka ekstrak positif mengandung saponin.

#### **3.5.5 Uji Fitokimia dengan KLT**

Uji fitokimia dengan KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji fitokimia dengan uji reagen. Identifikasi dengan KLT digunakan plat silika gel F<sub>254</sub> yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 60-70 °C selama 10 menit. Untuk eluen yang digunakan dapat dijenuhkan terlebih dahulu dalam bejana pengembang selama 1 jam di lemari asam. Masing-masing plat yang digunakan dapat diukur dengan ukuran 1x10 cm<sup>2</sup>. Ekstrak tanaman daun bunga matahari ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi

bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas ( $\pm 1$  cm dari tepi atas plat), maka elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm (Sa'adah, 2010), kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya. Pengembang dan reagen penguji masing-masing golongan senyawa adalah sebagai berikut:

- 1) Golongan senyawa alkaloid: digunakan pengembang campuran metanol-kloroform (0,5:9,5) dan pereaksi Dragendorff) untuk mendeteksi yang menunjukkan bercak coklat jingga (Lutfillah, 2008). Menurut Murtadlo (2013) fase gerak yang digunakan adalah campuran eluen n-heksana: etil asetat: etanol (30:2:1), Etil asetat : kloroform (1 : 1) dengan pereaksi Dragendorf dan warna yang tampak kuning (Rohimah, 2008). Etil asetat : metanol : air (100 : 16,5 : 13,5) dengan pereaksi Dragendorf menunjukkan bercak coklat (Marliana, 2005). Kloroform : etanol (9 : 1) (Ekasari, dkk., 2005).
- 2) Golongan senyawa flavonoid: digunakan pengembang butanol-asam asetat-air (4:1:5) dan diuapi uap amoniak dalam akan menghasilkan warna biru kehiujauan, hijau kekuningan, lembayung dan kuning kecoklatan (Purwaningsih, 2003). Menurut Rumondang (2013) analisis flavonoid menggunakan KLT dengan eluen kloroform: n-heksana (2:1), Butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1) (Marliana, 2005), etil asetat : metanol (9 : 1) (Morina, 2007) disemprot dengan amoniak akan menghasilkan warna kuning muda pada pengamatan pada sinar UV 254 nm dan 366 nm (Marliana, 2005)

florosensi biru, kuning-hijau, ungu dan biru-ungu (Morina, 2007). Etil asetat : n heksana (1 : 9) menggunakan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1% menghasilkan warna kuning kecoklatan (Zulhipri, 2010).

- 3) Golongan senyawa seskuiterpenoid: Panambunan (2013) dengan eluen n-heksan-diklorometan (4,8 : 0,2) dan eluen benzena-metanol (9 : 1) dengan pendeteksi vanilin-asam sulfat. Campuran pengembang  $\text{CHCl}_3$ -eter (4 : 1), pendeteksi dengan uap iodine jika terdapat warna coklat maka terdapat gugus lakton (Khasanah, 1999). Triastutik (2013) menggunakan eluen aseton-n-heksana (3 : 10) pendeteksi uap iodine, DCM-etil asetat (4,8 : 0,2) dan n-heksana-etil asetat pendeteksi vanillin-asam sulfat.
- 4) Golongan senyawa triterpenoid: digunakan pengembang n-heksana-etil asetat (2:8) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan warna merah ungu (violet) (Listiani dkk., 2005), n-heksana - kloroform (1 : 1) (Maulidatul, 2010), n-heksana : etil asetat (1 : 1) (Rita, 2010), dengan pereaksi Lieberman-Buchard menghasilkan warna coklat (Susannah, 2010) berwarna coklat (Rita, dkk., 2008), ungu tua (Bawa, 2009), hijauau-biru dan merah (Sulistijowati dan Gunawan, 2001).
- 5) Golongan senyawa steroid: digunakan pengembang n-heksana-etil asetat (7:3) dengan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan warna hijau (Handayani, dkk., 2008). Panambunan (2013) dengan eluen n-heksana-etil asetat (3,5 : 1,5) dan n-heksana-etil asetat ( 4,5 : 0,5). Menurut Bayyinah (2013) golongan senyawa steroid lebih mudah dipisahkan dengan eluan yang bersifat nonpolar yaitu eluen n-heksana: etil asetat (4:1). Reveny (2011) eluen n-heksana-etil

asetat (6 :4) dengan pereaksi Lieberman Burchard, menunjukkan warna hijau kebiruan, jingga dan orange (Husna, 2008), hijau (Handayani, dkk., 2008), hijau terang, hijau kekuningan dan hijau kecoklatan (Halimah, 2006), ungu merah (Reveny, 2011) dan ungu muda (Gunawan, dkk., 2008).

- 6) Golongan senyawa tanin: digunakan eluen butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 2) menghasilkan ungu muda kehitaman sedangkan Rf pada noda tersebut adalah 0,76 (Husna, 2011), n-butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 2), dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1 % menghasilkan warna ungu muda kehitaman (Harborne, 1987), etanol : etil asetat (9 : 1) akan menunjukkan bercak berwarna coklat ungu (Mangunwardoyo dkk, 2008), kloroform : metanol (7 : 3) diidentifikasi dengan  $\text{FeCl}_3$  akan menunjukkan bercak berwarna hijau biru dan biru hitam (Reveny, 2011), n-heksana : etil asetat (6 : 4) diidentifikasi dengan  $\text{FeCl}_3$  menghasilkan 11 noda, golongan tanin adalah noda ke- 6 yang berwarna hijau (Mangunwardoyo, 2009), eluen pengembang n-butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 5) menghasilkan warna lembayung dengan Rf 0,611 (Sa'adah, dkk., 2010).
- 7) Golongan senyawa saponin: digunakan campurankloroform : metanol : air (13:7:2) (Harborne, 1986), kloroform : metanol : air (20:60:10) (Kristianingsih, 2005), heksana : aseton (4:1) dengan disemprot  $\text{SbCl}_3$  (Marliana, 2005), kloroform : metanol : air (3 : 1 : 0,1) dan penampak noda asam sulfat 10 % (Bogoriani, dkk., 2007), kloroform : etil asetat (1:1) (Harborne, 1986).

### 3.5.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dideskripsikan hasilnya. Tingkat sitotoksik larva udang *Artemia salina* Leach dapat diketahui dengan melakukan uji  $LC_{50}$  menggunakan analisis probit pada program MINITAB 16 dengan tingkat kepercayaan 95 %.

Penggolongan senyawa aktif dapat dilakukan dengan identifikasi hasil uji warna dengan kepekatan warna yang dihasilkan pada masing-masing ekstrak dengan tanda berikut:

1. +++ : kandungan senyawa lebih banyak/ warna sangat pekat
2. ++ : kandungan senyawa cukup/ warna cukup pekat
3. + : kandungan senyawa sedikit/ warna muda
4. - : tidak terkandung senyawa/ tidak terbentuk warna

Identifikasi kemurnian senyawa aktif dapat diketahui dengan melakukan analisa hasil uji KLT dari pengukuran jarak migrasi dan bentuk bercak noda senyawa pada dua fasa yang berbeda menggunakan parameter harga  $R_f$ .

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bunga Matahari yang berumur sekitar  $\pm 3$  bulan. Sampel sebanyak  $\pm 500$  gram dibersihkan dengan cara dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan pengotor-pengotornya seperti debu yang menempel pada daun bunga Matahari karena dapat mengganggu proses ekstraksi. Selanjutnya sampel dikering-anginkan dibawah terik matahari secara tidak langsung dengan ditutup kain hitam selama 2 jam untuk mengurangi kadar air, sehingga dapat menghentikan reaksi enzimatik dan mencegah tumbuhnya mikroorganisme pada sampel ketika proses penyimpanan. Selanjutnya sampel dipotong kecil-kecil untuk memperbesar luas permukaan, sehingga mempermudah proses penggilingan sampel menjadi serbuk kemudian dikering-anginkan di dalam ruangan untuk memaksimalkan proses pengeringan selama 7 hari.

Sampel yang telah kering dihaluskan menggunakan blender sampai terbentuk serbuk dan diayak menggunakan ukuran ayakan 60 mesh untuk memperbesar luas permukaan sehingga dapat mempermudah dan mempercepat proses ekstraksi. Menurut Kumala (2007), menyatakan bahwa pada ukuran tersebut dinding sel mulai terbuka sehingga memaksimalkan kontak antara pelarut dan sampel pada saat maserasi, menyebabkan senyawa yang terekstrak maksimal. Kemudian sampel disimpan dalam wadah tertutup dengan diberikan silika gel di dalamnya dengan tujuan untuk mengurangi kelembaban yang dapat menyebabkan

tumbuhnya mikroorganisme. Hasil serbuk yang diperoleh sebanyak 86 gram berwarna hijau tua dan digunakan untuk proses maserasi.

#### 4.2 Ekstraksi Komponen Aktif Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L)

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Kristanti, dkk., 2006). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi bertingkat dengan variasi pelarut n-heksana, diklorometana, dan metanol. Prinsip utama dalam maserasi adalah mengekstrak senyawa aktif yang dapat larut dalam pelarut berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing pelarutnya, atau disebut juga dengan *like dissolves like* (Khopkar, 2003). Metode ini didasarkan pada perendaman sampel dengan pelarutnya pada suhu ruang, selanjutnya sampel akan mengalami pemecahan dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut pada pelarut (Voight, 1995).

Metode maserasi dipilih karena metode ini lebih aman digunakan daripada metode lain yang membutuhkan suhu tinggi karena dikhawatirkan senyawa aktif yang terkandung dalam daun bunga Matahari tidak tahan panas. Metode ini dilakukan dengan merendam sampel dalam suatu pelarut dengan waktu tertentu yang umumnya 1-2 hari perendaman tanpa dipanaskan. Kelebihan metode ini adalah relatif sederhana, tidak memerlukan alat-alat yang rumit, relatif mudah, dapat menghindari kerusakan dan hilangnya senyawa-senyawa aktif yang bersifat

volatil. Kelemahan metode ini membutuhkan waktu relatif lama dan penggunaan pelarut yang tidak efektif dan efisien (Meloan, 1999).

Serbuk sampel daun bunga Matahari ditimbang sebanyak 60 gram. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk sampel dengan 300 mL pelarut n-heksana selama 24 jam. Proses pengadukannya dilakukan dengan bantuan *shaker* selama  $\pm 3$  jam dengan kecepatan 125 rpm (*revolution per minute*) agar diperoleh ekstrak yang lebih homogen. Langkah selanjutnya filtrat dan residunya dipisahkan dengan cara disaring menggunakan corong *Buchner* dan kertas saring. Prinsip penyaringan dengan corong *Buchner* adalah penyaringan secara mekanis berdasarkan ukuran molekul, sehingga molekul yang berukuran lebih besar akan tertahan pada kertas saring (Svehla, 1985). Ampas yang diperoleh kemudian direndam lagi dengan pelarut n-heksana sebanyak 300 mL sampai 4 kali pengulangan.

Ampas yang diperoleh dari hasil penyaringan, dikering-anginkan kemudian dimaserasi kembali dengan pelarut diklorometana dengan diulangi sebanyak 3 kali, begitu juga untuk pelarut metanol dilakukan perlakuan yang sama seperti pada proses maserasi menggunakan pelarut diklorometana. Ketiga filtrat yang diperoleh dari hasil maserasi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vacum*. Prinsip utama *rotary evaporator* adalah adanya penurunan tekanan dan dipercepatnya putaran labu alas bulat sehingga pelarut akan menguap 5 – 10 °C pada suhu dibawah titik didih pelarut. Labu *evaporator* dipanaskan pada temperatur tertentu di atas *waterbath* dan diputar selama evaporasi, sehingga terjadi pencampuran yang sempurna, mencegah terjadinya bumping, dan juga

akan memiliki permukaan yang relatif lebih kuat. Adanya tekanan yang diberikan oleh pompa vakum pada rangkaian *rotary evaporator vacuum* menyebabkan pelarut menguap dari campuran kemudian terkondensasi dan jatuh pada labu penampung (Svehla, 1985). Proses ini dihentikan ketika pelarut sudah tidak menetes lagi pada alas bulat.

Ekstrak yang diperoleh di letakkan dalam gelas vial, ditutup aluminium foil dan dilubangi kecil-kecil agar pelarut yang masih ada pada ekstrak bisa menguap. Ekstrak tersebut diletakkan dalam lemari asam agar tidak mencemari lingkungan sekitar. Penguapan pelarut dalam ekstrak membutuhkan waktu 3 hari untuk ekstrak n-heksana, 1 hari untuk ekstrak diklorometana dan 1 minggu untuk ekstrak metanol sampai konstan ketika ditimbang menggunakan neraca analitik. Ekstrak dikatakan bebas dari pelarut ketika ditimbang nilainya konstan dengan perbedaan berat penimbangan sebelumnya yaitu seberat 0,002 gram. Perbedaan waktu dalam proses penguapan dikarenakan perbedaan titik didih dan struktur molekulnya. n-Heksana memiliki titik didih 68,7 °C yang lebih tinggi dibanding metanol tetapi tidak memiliki gugus -OH sehingga proses penguapan pelarut n-heksana lebih cepat daripada pelarut metanol. Pelarut diklorometana memiliki titik didih paling rendah yaitu 40 °C daripada pelarut n-heksana dan metanol sehingga proses penguapannya lebih cepat. Pelarut metanol membutuhkan waktu lama untuk menguapkan pelarut yang ada dalam ekstrak dikarenakan metanol memiliki titik didih tinggi yaitu 65 °C. Ekstrak metanol dioven pada suhu 50 °C untuk membantu proses penguapan pelarut dalam ekstrak. Hasil ekstraksi ditunjukkan pada Tabel 4.1 dengan perhitungan rendemen pada Lampiran 4.

Tabel 4.1 Hasil maserasi ekstrak daun bunga Matahari

<b>Ekstrak</b>	<b>Jumlah sampel</b>	<b>Volume pelarut</b>	<b>Warna filtrat</b>	<b>Warna ekstrak pekat</b>	<b>Rendemen (%) (b/b)</b>
n-Heksana	60 gram	1200 mL p.a	Hijau kekuningan	Kuning kehijauan	4,082
Diklorometana	60 gram	900 mL p.a	Hijau pekat	Hijau pekat	2,273
Metanol	60 gram	900 mL p.a	Hijau	Cokelat	7,855

Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui bahwa rendemen ekstrak daun bunga Matahari yang paling besar adalah pada ekstrak metanol. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa dalam daun bunga Matahari cenderung larut pada pelarut metanol yang lebih polar. Perbedaan nilai rendemen tersebut diduga disebabkan oleh sifat pelarut dalam melarutkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda.

Metanol merupakan pelarut berbobot molekul rendah yang dapat membentuk ikatan hidrogen sehingga dapat larut dan bercampur dengan air hingga kelarutan yang tak terhingga (Hart, 1987). n-Heksana merupakan senyawa hidrokarbon dengan rantai lurus yang tidak dapat larut dalam air (Fessenden, 1997). Senyawa metabolit sekunder nonpolar yang terikat pada gugus glikosida (bersifat polar) dapat menyebabkan senyawa bersifat polar sehingga dapat terekstrak dalam pelarut metanol. Hal ini yang menyebabkan ekstrak metanol memiliki nilai rendemen tinggi dibandingkan rendemen pada ekstrak n-heksana maupun diklorometana.

Hasil ekstrak pekat yang diperoleh pada masing-masing pelarut digunakan untuk uji selanjutnya yaitu uji sitotoksik menggunakan metode BSLT (*Brine*

*Shrimp Lethality Test*) dan uji fitokimia dengan menggunakan reagen serta diperkuat dengan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis) untuk senyawa yang memiliki nilai  $LC_{50}$  rendah.

#### 4.3 Uji Sitotoksik Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Sitotoksik merupakan kematian sel oleh komponen-komponen kimia atau mediator sel (Wyllie, 2010). Uji sitotoksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach atau *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan uji pendahuluan dalam upaya pencarian senyawa antikanker dengan penentuan nilai  $LC_{50}$  setelah pemaparan larutan ekstrak selama 24 jam (Meyer, dkk., 1982).  $LC_{50}$  adalah kadar atau konsentrasi suatu zat, yang dinyatakan dalam miligram bahan kimia per meter kubik media uji (*part permillion* atau ppm), yang dapat menyebabkan 50 % kematian pada binatang percobaan dari suatu kelompok spesies setelah binatang percobaan tersebut terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004).

Beberapa penelitian terhadap senyawa-senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker memerlukan biaya yang cukup besar, oleh karena itu pengujian dengan *Artemia salina* Leach ini dipakai sebagai uji pendahuluan. Apabila dalam pengujian menggunakan *Artemia salina* ini memperlihatkan hasil yang cukup baik, maka dapat dilakukan pengujian lebih lanjut (Kristanti, 2008). Metode ini dilakukan karena biaya percobaan yang murah, proses pengerjaan yang cepat, sederhana, dan tidak diperlukan kondisi yang aseptis (Susanti, dkk., 2011).

Penelitian uji sitotoksik ekstrak daun bunga Matahari menggunakan *Artemia* pada tahap perkembangan nauplii instar II dan III (berumur 48 jam). Hal ini dikarenakan pada fase tersebut *Artemia* berada pada fase paling aktif membelah secara mitosis yang identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis (Ropiqa, 2009). Struktur anatomi tubuh *Artemia salina* pada tahap nauplii instar II dan III masih sangat sederhana, yaitu terdiri dari lapisan kulit, mulut, antena, saluran pencernaan atau digesti yang masih sederhana, dan calon thoracopoda (Raineri, 1981).

Uji sitotoksik dilakukan terhadap ketiga ekstrak yang telah dipisahkan dengan *rotary evaporator vacum* yaitu ekstrak n-heksana, diklorometana, dan metanol. Ketiga ekstrak tersebut dibuat larutan uji dengan beberapa konsentrasi dari larutan induk/stok 10.000 ppm dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm. Selanjutnya botol vial yang berisi larutan uji dikeringkan pada suhu kamar sampai semua pelarutnya menguap selama 24 jam sedangkan pada ekstrak metanol membutuhkan waktu 3 hari untuk menguapkan pelarutnya, dikarenakan ekstrak metanol lebih lama menguap pelarutnya dibandingkan ekstrak n-heksana dan diklorometana. Hal ini bertujuan agar kematian larva tidak dipengaruhi oleh pelarutnya. Adapun kontrol dibuat 3 yaitu kontrol media (DMSO tanpa ekstrak), kontrol pelarut (pelarut masing-masing ekstrak) dan kontrol air laut. Hal ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penggunaan DMSO, pelarut maupun air laut pada uji sitotoksik ekstrak daun bunga Matahari.

Setelah pelarut menguap dan kering pada ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol kemudian ditambahkan 100  $\mu$ L DMSO (*dimetil sulfoksida*), sedikit air laut dan setetes larutan ragi roti selanjutnya diencerkan dengan air laut sampai volume 10 mL. Pelarutan ekstrak dengan air laut sering menimbulkan masalah karena adanya perbedaan tingkat kepolaran, ekstrak sukar larut dengan air laut sehingga digunakan DMSO untuk membantu melarutkannya. DMSO digunakan sebagai surfaktan yang memiliki ujung hidrofilik (larut dalam pelarut polar) dan hidrofobik (larut dalam pelarut non polar).

Ekstrak yang telah larut dengan air laut dalam botol vial 10 mL, ditambahkan dengan 10 ekor larva *Artemia salina*. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian *Artemia salina* (Kristanti, dkk., 2006). Hasil pengamatan selama penelitian didapati nauplius *Artemia salina* melakukan respon perilaku menunjukkan gejala eksitasi ditandai dengan kehilangan keseimbangan dengan posisi renang yang tidak menentu yaitu bergetar-getar, miring, mendatar dan terbalik. Menurut Tarumingkeng (1992) gejala serangga terkena racun saraf adalah menunjukkan gejala eksitasi yang ditandai dengan gerakan makin cepat.

Hasil uji sitotoksik dari ketiga ekstrak tersebut kemudian dianalisis probit menggunakan program MINITAB 16 dan disajikan dalam bentuk mortalitas. Hasil pengujian ekstrak daun bunga Matahari dengan metode BSLT ditunjukkan pada lampiran 5 dan keterangan penyebaran konsentrasi pada kurva mortalitas masing-masing ekstrak ditunjukkan pada Tabel 4.2, 4.3, dan 4.4

Tabel 4.2 Keterangan penyebaran konsentrasi pada kurva mortalitas Larva Udang *Artemia salina* L. terhadap ekstrak n-heksana daun bunga Matahari

Konsentrasi (ppm)	Posisi pada kurva	Konsentrasi yang seharusnya pada kurva (ppm)	Batas bawah (ppm)	Batas atas (ppm)	Keterangan
1	di bawah garis <i>lower</i>	8,508	3,957	11,857	Konsentrasi terlalu rendah untuk menyebabkan kematian 10 %
10	di atas garis <i>percentile</i>	8,508	3,957	11,857	Konsentrasi terlalu tinggi untuk menyebabkan kematian 10 %
20	di garis <i>upper</i>	16,583	13,349	19,894	Konsentrasi terlalu tinggi untuk menyebabkan kematian 20 %
40; 80; 100; 1000	-	-	-	-	Tidak dapat terlihat karena nilainya terlalu besar

Konsentrasi 40, 80, 100, dan 1000 ppm tidak dapat terlihat pada kurva di Lampiran 5. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi tersebut terlalu tinggi untuk menyebabkan kematian 50 %, sehingga menyebabkan kematian 100 % pada *Artemia salina*. Ekstrak n-heksana bersifat sangat sitotoksik terhadap *Artemia salina* karena memiliki nilai  $LC_{50} < 30$  ppm berdasarkan perhitungan MINITAB 16 pada Lampiran 5.

Tabel 4.3 Keterangan penyebaran konsentrasi pada kurva mortalitas Larva Udang *Artemia salina* L. terhadap ekstrak diklorometana daun bunga Matahari

Konsentrasi (ppm)	Posisi pada kurva	Konsentrasi yang seharusnya pada kurva (ppm)	Batas bawah (ppm)	Batas atas (ppm)	Keterangan
1; 10; 20	di garis <i>upper</i>	-130,802	-468,866	46,412	Konsentrasi terlalu tinggi untuk menyebabkan kematian 10 %
40; 80	di bawah garis <i>lower</i>	241,116	67,472	427,292	Konsentrasi terlalu rendah untuk menyebabkan kematian 20 %
100	di bawah garis <i>lower</i>	509,296	338,941	817,201	Konsentrasi terlalu rendah untuk menyebabkan kematian 30 %
1000	di garis <i>percentile</i>	952,625	690,148	1159,33	Konsentrasi terlalu tinggi untuk menyebabkan kematian 50 %

Konsentrasi 1000 ppm merupakan konsentrasi tertinggi untuk menyebabkan kematian 50 % *Artemia salina*. Hal ini dimungkinkan karena senyawa yang terekstrak dalam pelarut diklorometana tidak terlalu sitotoksik terhadap *Artemia salina*. Ekstrak diklorometana memiliki nilai  $LC_{50}$  paling tinggi diantara ekstrak n-heksana dan ekstrak metanol berdasarkan perhitungan MINITAB 16 pada Lampiran 5.

Tabel 4.4 Keterangan penyebaran konsentrasi pada kurva mortalitas Larva Ugang *Artemia salina* L. terhadap ekstrak metanol daun bunga Matahari

Konsentrasi (ppm)	Posisi pada kurva	Konsentrasi yang seharusnya pada kurva (ppm)	Batas bawah (ppm)	Batas atas (ppm)	Keterangan
1	di antara garis <i>percentile</i> dan <i>upper</i>	-33,722	-233,567	5,672	Konsentrasi terlalu tinggi untuk menyebabkan kematian 10 %
10	di antara garis <i>lower</i> dan <i>percentile</i>	33,289	-21,541	64,217	Konsentrasi terlalu rendah untuk menyebabkan kematian 20 %
20; 40	sedikit di bawah garis <i>lower</i>	77,830	49,859	172,656	Konsentrasi terlalu rendah untuk menyebabkan kematian 30 %
80; 100	di garis <i>percentile</i>	77,830	49,859	172,656	Konsentrasi terlalu tinggi untuk menyebabkan kematian 30 %
1000	-	-	-	-	Tidak dapat terlihat karena nilainya terlalu besar

Berdasarkan kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* L. di atas ditunjukkan pada Lampiran 5. Adapun nilai  $LC_{50}$  dari ekstrak n-heksana, diklorometana dan ekstrak metanol daun bunga Matahari disajikan pada Tabel 4.5

Tabel 4.5 Nilai LC<sub>50</sub> masing-masing ekstrak daun bunga Matahari

Ekstrak pelarut	Nilai LC <sub>50</sub> (ppm)
n-Heksana	22,175 ppm
Diklorometana	952,625 ppm
Metanol	147,847 ppm

Ketiga ekstrak tersebut dapat diketahui bahwa semua ekstrak bersifat sitotoksik terhadap *Artemia salina* karena memiliki nilai LC<sub>50</sub> < 1000 ppm yang dapat menyebabkan kematian 50 % hewan uji (Meyer, dkk., 1982). Ekstrak yang memiliki nilai LC<sub>50</sub> rendah menunjukkan bahwa golongan senyawa yang terkandung di dalamnya bersifat toksik terhadap *Artemia salina* L. Ekstrak n-heksana memiliki nilai LC<sub>50</sub> paling rendah dibanding ekstrak diklorometana dan metanol. Hal ini mungkin disebabkan adanya kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam daun bunga Matahari pada ekstrak n-heksana. Kandungan senyawa aktif yang sitotoksik terhadap *Artemia* dimungkinkan bersifat nonpolar. Menurut Farida (2009) ekstrak Keladi Tikus dengan ekstrak n-heksana memiliki golongan senyawa yang toksik terhadap *Artemia* dengan metode BSLT yaitu steroid dan triterpenoid. Golongan senyawa tersebut memiliki korelasi positif dengan uji sitotoksik menggunakan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Technique*) terhadap sel kanker.

Hasil penelitian Lenny (2006) mengenai isolasi bioaktivitas kandungan kimia utama pada puding merah menyatakan bahwa senyawa bioaktif hampir selalu toksik pada dosis tinggi. Daya bunuh *in vivo* dari senyawa terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas dan untuk memonitor fraksi bioaktif selama fraksinasi

dan pemurnian. Salah satu organisme yang sangat sesuai untuk hewan uji tersebut adalah *Brine Shrimp* (larva udang).

Menurut hasil penelitian Ruwaida (2010) menyatakan bahwa jalur pemaparan senyawa toksik rumput mutiara pada hewan uji *Artemia salina* di mulai melalui oral dan bagian dermal. Pada bagian mulut senyawa toksik ini di absorpsi masuk ke dalam saluran pencernaan, sedangkan pada bagian dermal, terjadi proses absorpsi melalui membran sel. Setelah proses absorpsi dilanjutkan dengan proses distribusi senyawa toksik ke dalam tubuh *Artemia salina* dan terjadi proses reaksi metabolisme.

Senyawa toksik yang masuk ke dalam tubuh *Artemia salina* menyebabkan perubahan gradien konsentrasi di dalam dan di luar. Setelah senyawa toksik ini masuk secara oral dan dermal, kemudian terabsorpsi masuk ke dalam jaringan tubuh, dan pada akhirnya menyerang ke dalam sel, terjadi kerusakan fungsional dan metabolisme sel *Artemia salina*. Efek yang ditimbulkan terjadi secara cepat dalam waktu 24 jam, hingga menyebabkan 50 % kematian *Artemia salina*. Menurut (Castritsi, 1984 dalam Ruwaida, 2010), hasil pengamatan menggunakan mikroskop elektron menunjukkan terjadi kerusakan pada mikrovili *Artemia salina*. Kerusakan ini terjadi akibat pemaparan senyawa toksik potasium dichromat ke dalam tubuh *Artemia salina* pada nauplii instar II dan III melalui oral dan masuk ke dalam saluran pencernaan *Artemia salina*. Hal ini menyebabkan uji BSLT ini sering digunakan sebagai penelitian pendahuluan dari aktivitas antikanker.

#### 4.4 Uji Fitokimia dengan Uji Reagen

Senyawa metabolit sekunder dapat diketahui dengan melakukan uji fitokimia. Uji fitokimia merupakan uji kualitatif kandungan golongan senyawa aktif pada ekstrak tanaman, sehingga dapat diketahui senyawa yang terdapat di dalamnya. Biasanya uji golongan senyawa aktif dilakukan dalam tabung reaksi dengan jumlah sampel yang relatif sedikit sekitar  $\pm 1$  mg tiap uji golongan. Uji fitokimia dalam penelitian ini dilakukan dengan uji reagen yang kemudian diperkuat dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT) terhadap golongan senyawa yang positif dari uji reagen.

Golongan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol ditunjukkan pada Tabel 4.6

Tabel 4.6 Hasil pengamatan uji fitokimia

Golongan Senyawa	Ekstrak			Warna yang Dihasilkan/Endapan
	n-Heksana	Diklorometana	Metanol	
Alkaloid	-	-	-	-
Flavonoid	-	-	-	-
Seskuiterpenoid	++	++	-	Ungu dan hijau kebiruan
Triterpenoid	-	+	++	Cincin kecoklatan
Steroid	+++	+++	+++	Hijau pekat
Tanin	-	-	-	-
Saponin	-	-	-	-

Keterangan:

- +++ : Kandungan senyawa lebih banyak (warna sangat pekat)
- ++ : Kandungan senyawa (warna cukup pekat)
- +
- : Tidak terkandung senyawa/ tidak berubah warna

Berdasarkan hasil uji fitokimia, diketahui bahwa pada ekstrak n-heksana mengandung senyawa seskuiterpenoid dan steroid, ekstrak diklorometana mengandung senyawa seskuiterpenoid, triterpenoid dan steroid sedangkan ekstrak

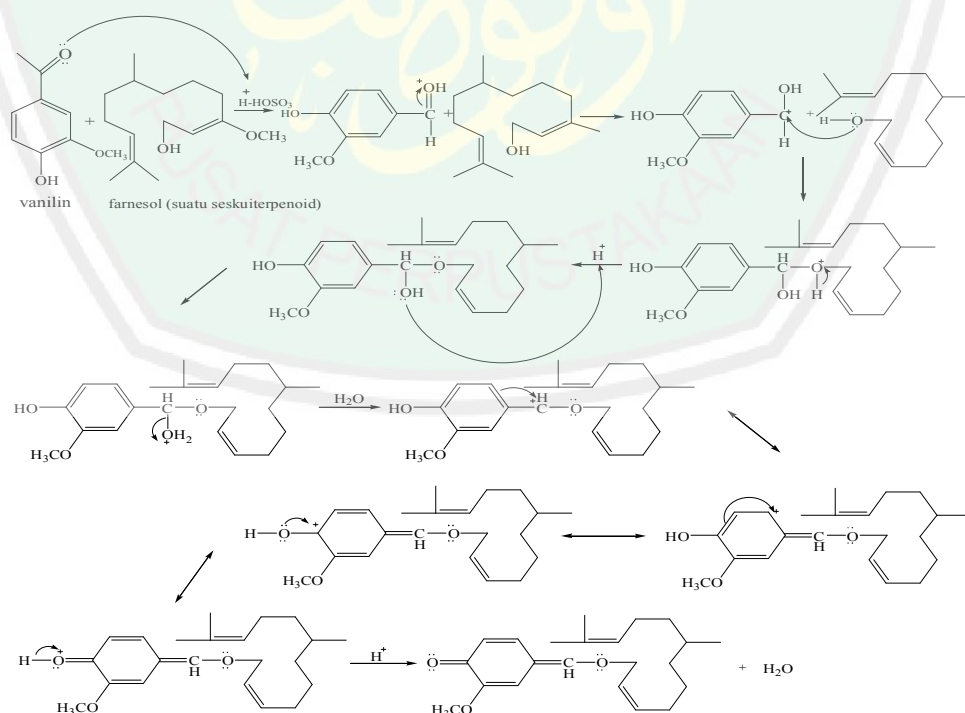
metanol mengandung senyawa triterpenoid dan steroid. Hasil golongan senyawa seskuiterpenoid ditunjukkan dengan warna biru dan ungu. Hal ini sama dengan hasil penelitian sebelumnya yang telah dilakukan bahwa warna yang dihasilkan pada uji seskuiterpenoid adalah warna biru (Faramayuda, 2010) dan biru-violet (Wagner, 1995). Hasil golongan senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin kecoklatan (Indrayani, 2006), sedangkan golongan senyawa steroid berwarna hijau (Cook, 1985 dalam Riris, 1994).

#### 4.4.1 Seskuiterpenoid

Uji fitokimia golongan senyawa seskuiterpenoid dilakukan dengan diambil sedikit ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol kemudian dilarutkan dalam petroleum eter 1 mL dan ditambahkan reagen vanillin-asam sulfat sebanyak 1-2 mL hingga diperoleh perubahan warna (Sulistyaningsih, 2009). Hasil yang diperoleh pada setiap ekstrak berbeda yaitu ekstrak n-heksana berwarna hijau kebiruan, diklorometana berwarna ungu dan ekstrak metanol negatif karena hasil menunjukkan warna cokelat. Hal ini sesuai pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa warna yang ditimbulkan berupa warna biru (Faramayuda, 2010), ungu (Panambunan, 2013) dan biru-violet (Wagner, 1995).

Prinsip reaksi dalam mekanisme uji seskuiterpenoid adalah reaksi adisi dengan pelepasan H<sub>2</sub>O. Reaksi ini diawali dengan nukleofil oksigen pada vanilin diprotonasi oleh katalis asam yang menyebabkan oksigen bermuatan positif. Kemudian ikatan rangkap yang berada pada gugus karbonil memutuskan ikatannya untuk menstabilkan oksigen dan dihasilkan karbokation. Nukleofil oksigen yang dimiliki oleh senyawa farnesol menyerang karbokation dan oksigen

menjadi kekurangan elektron. Agar oksigen menjadi stabil maka ikatan dengan H terputus dan oksigen pada gugus alkohol menyerang hidrogen pada katalis yang menyebabkan oksigen bermuatan positif. Pelepasan H<sub>2</sub>O mengakibatkan terbentuk karbokation sehingga senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan munculnya warna ungu maupun biru pada ekstrak. Hal ini diperkuat hasil penelitian Rastuti (2012) menjelaskan prinsip uji vanilin-HCl yaitu vanilin terprotonasi dalam larutan asam dan menghasilkan karbokation. Karbokation ini bereaksi dengan senyawa metabolit sekunder (seskuiterpenoid). Senyawa antara yang dihasilkan mengalami dehidrasi dan menghasilkan senyawa berwarna ungu atau merah. Dugaan mekanisme reaksi terbentuknya warna ungu maupun biru pada uji seskuiterpenoid dengan reagen vanilin-asam sulfat ditunjukkan pada Gambar 4.1



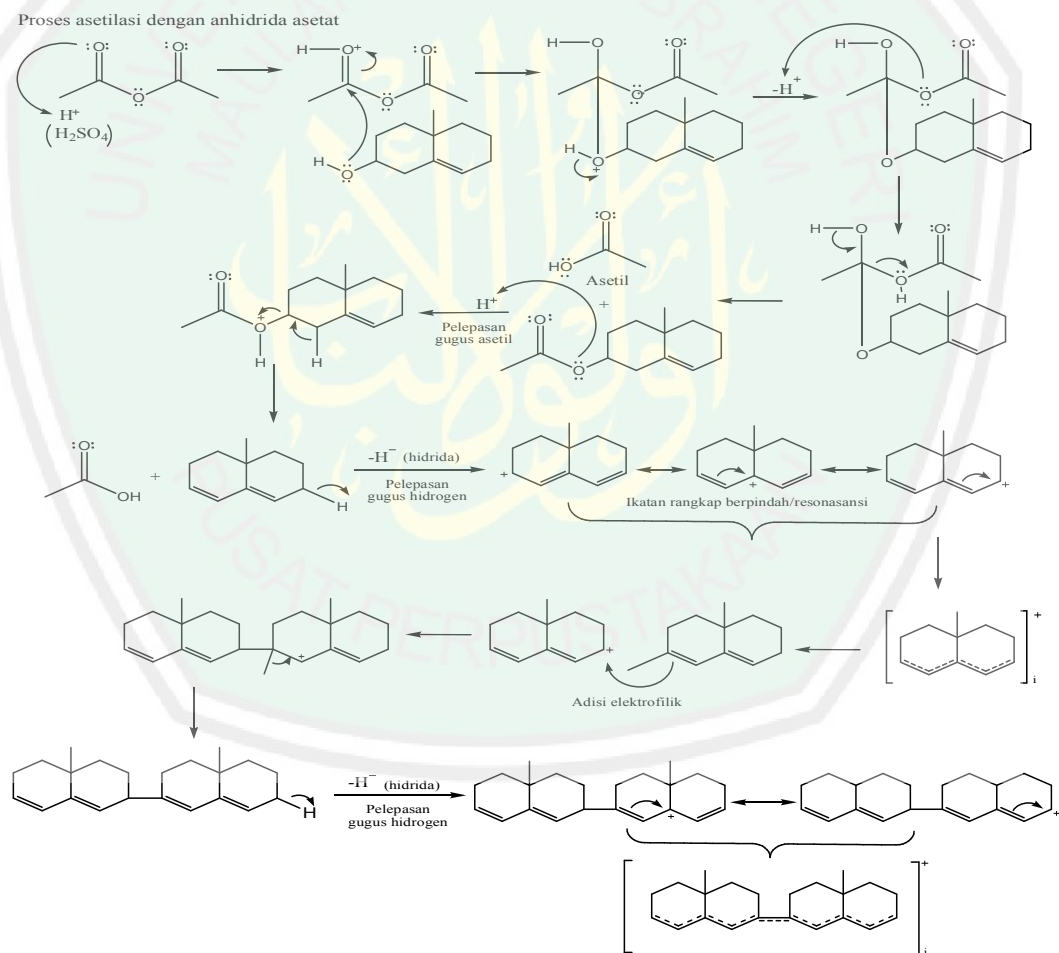
Gambar 4.1 Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna pada uji Seskuiterpenoid

#### 4.4.2 Triterpenoid dan Steroid

Hasil ekstrak diklorometana dan metanol menunjukkan positif mengandung golongan senyawa triterpenoid dan steroid. Langkah yang dilakukan adalah diambil sedikit ekstrak pekat diklorometana dan metanol daun bunga Matahari dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform kemudian ditambah anhidrida asetat 1 mL lalu ditetesi  $H_2SO_4$  pekat sebanyak 1-2 mL melalui dinding tabung tersebut. Hasil yang diperoleh cincin kecokelatan pada perbatasan dua pelarut yang menunjukkan positif adanya golongan senyawa triterpenoid dan terbentuknya warna hijau pada golongan senyawa steroid. Terbentuknya warna dikarenakan kemampuan asam sulfat sebagai reagen yang dapat merubah gugus kromofor pada senyawa seskuiterpenoid sehingga senyawa membentuk ikatan terkonjugasi. Hal tersebut menyebabkan panjang gelombang akan bergeser ke arah yang lebih panjang (batokromik) sehingga senyawa berwarna hijau dan tampak oleh mata. Menurut Panambunan (2013), penambahan kloroform ini dilakukan untuk melarutkan senyawaan ini karena dapat larut baik dalam kloroform dan tidak mengandung molekul air. Anhidrida asetat dapat digunakan untuk membentuk turunan asetil setelah di dalam kloroform.

Terbentuknya warna hijau dan cincin kecokelatan terjadi karena adanya reaksi antara anhidrida asetat, asam sulfat dan senyawa terpenoid. Reaksi diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan anhidrida asetat. Gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas, sehingga terbentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang

bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan munculnya warna pada ekstrak (Siadi, 2012). Dugaan mekanisme reaksi terbentuknya warna pada uji terpenoid dengan reagen Liebermann Buchard ditunjukkan pada Gambar 4.2



Ikatan rangkap berpindah/resonansi menyebabkan terjadinya perpanjangan konjugasi. Adanya perpanjangan konjugasi menyebabkan terbentuknya warna pada ekstrak.

Gambar 4.2 Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna pada uji Terpenoid (Burke, 1974)

Penelitian ini membuktikan bahwa golongan senyawa seskuiterpenoid, triterpenoid dan steroid dalam daun bunga Matahari memiliki bioaktivitas sebagai senyawa antikanker. Sebagaimana penelitian Diastuti (2009) yang menyatakan bahwa salah satu golongan senyawa kimia yang memiliki aktivitas antikanker ekstrak etanol daun *Rhizophora mucronata* adalah golongan senyawa terpenoid.

Pada ekstrak diklorometana dan metanol positif mengandung triterpenoid. Hal ini dikarenakan senyawa aktif berupa triterpenoid terikat dengan gugus gula dalam bentuk glikosidanya (bersifat polar). Menurut Kartikasari (2010) adanya gugus gula yang banyak mengandung  $-OH$  dan terikat dengan metabolit sekunder akan bersifat racun terhadap *Artemia*. Gugus  $-OH$  ini dapat menembus dan merusak permeabilitas membran sel sedangkan senyawa triterpenoid yang memiliki struktur lipofilik (larut dalam lemak) dan bersifat non polar juga akan mudah menembus membran sel dengan membentuk misel pada sisi hidrofobik. Terbentuknya ikatan antara senyawa nonpolar dari triterpenoid dengan bagian nonpolar dari membran sel menyebabkan permeabilitas sel dan proses biokimiawi *Artemia* terganggu. Akibat membran sel *Artemia* yang tidak selektif lagi, segala sesuatu yang ada disekelilingnya akan dianggap makanan masuk ke dalam saluran pencernaan dan akhirnya merusak sel *Artemia salina*.

Penelitian di atas didukung oleh Widianti (2012), mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa alkaloid, triterpenoid, saponin dan flavonoid dalam buah Pare yang dapat menghambat daya makan larva (antifedant). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam

tubuh larva, kemudian alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan. Hasil nilai  $LC_{50}$  yang rendah selanjutnya diidentifikasi golongan senyawa pada daun bunga Matahari dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA).

#### 4.5 Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu kromatografi yang berdasarkan proses adsorpsi. Kromatografi lapis tipis digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisis senyawa organik dalam jumlah kecil dan menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahannya (Khopkar, 2003). Lapisan yang dipisahkan terdiri atas fase diam dan fase gerak. Fase diam yang dapat digunakan adalah silika atau alumina yang dilapiskan pada lempeng kaca atau alumunium. Jika fase diam berupa silika gel maka bersifat asam, jika fase alumina maka bersifat basa. Fase gerak atau larutan pengembang biasanya digunakan pelarut organik atau bisa juga campuran pelarut organik-anorganik (Gritter, 1991).

Identifikasi golongan senyawa dalam ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol telah dilakukan dengan uji fitokimia menggunakan uji reagen. Pembuktian kandungan golongan senyawa tersebut diperkuat dengan adanya identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang memiliki nilai  $LC_{50}$  rendah dengan tingkat ketoksikan tinggi.

Pemisahan senyawa dari ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol dilakukan dengan menggunakan eluen terbaik untuk memisahkan senyawa yang ada pada ekstrak berdasarkan penelitian sebelumnya. Eluen yang baik adalah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak, ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak noda yang satu dengan yang lainnya jelas (Harbone, 1987).

Noda yang dihasilkan diidentifikasi di bawah lampu UV 366 nm ditandai dengan ada tidaknya fluoresensi. Jika tidak tampak dengan cara di atas, maka dilakukan secara kimia yaitu penyemprotan dengan pereaksi yang sesuai (Auterhoff, 1987). Pada UV 366 nm noda akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 366 nm adalah karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang ada pada noda tersebut. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula sambil melepaskan energi. Sehingga noda yang tampak pada lampu UV 366 nm terlihat terang karena silika gel yang digunakan tidak berfluoresensi pada sinar UV 366 nm (Sudjadi, 1988).

#### **4.5.1 Steroid**

Identifikasi golongan senyawa aktif steroid menggunakan beberapa eluen steroid dapat ditunjukkan pada Tabel 4.

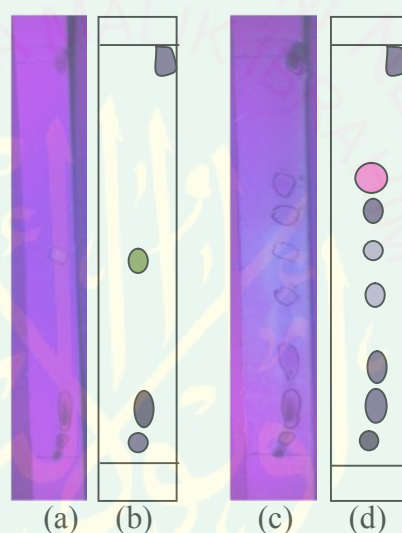
Tabel 4.7 Hasil KLT golongan senyawa steroid dengan beberapa eluen

No.	Fase Gerak	Pendeteksi	Jumlah Noda	Keterangan
1.	n-heksana : etil asetat (4:1)	Lieberman Buchard	8 noda	Terpisah
2.	n-heksana : etil asetat (7:3)	Lieberman Buchard	4 noda	Terpisah
3.	n-heksana : etil asetat (6:4)	Lieberman Buchard	2 noda	Terpisah
4.	n-heksana : etil asetat (3,5:1,5)	Lieberman Buchard	5 noda	Terpisah
5.	n-heksana : etil asetat (4,5:0,5)	Lieberman Buchard	8 noda	Terpisah baik

Hasil pemisahan KLT analitik golongan senyawa steroid dari beberapa eluen menunjukkan bahwa eluen n-heksana : etil asetat (4:1) dan n-heksana : etil asetat (4,5:0,5) menghasilkan 8 noda yang terpisah, tetapi masih lebih baik eluen n-heksana : etil asetat (4,5:0,5) karena eluen tersebut mampu memisahkan golongan senyawa steroid dengan baik. Eluen n-heksana : etil asetat (7:3) menghasilkan 4 noda yang terpisah, tetapi masih lebih baik dengan eluen n-heksana : etil asetat (3,5:1,5) yang menghasilkan 5 noda yang terpisah. Sedangkan eluen n-heksana : etil asetat (6:4) menghasilkan 2 noda yang terpisah, karena dimungkinkan eluen tersebut kurang mampu untuk mengelusi golongan senyawa steroid dengan baik sehingga golongan senyawa yang akan dipisahkan masih tertinggal sebagian.

Eluen n-heksana : etil asetat (4,5:0,5) mampu memberikan pemisahan terbaik, hal ini dapat dilihat dengan adanya noda yang terpisah dengan baik dan memiliki jumlah noda paling banyak yaitu 8 noda. Eluen yang digunakan pada pemisahan golongan senyawa steroid bersifat nonpolar semua, namun komposisi

eluen yang digunakan berbeda. Hal ini yang menyebabkan hasil pemisahan yang berbeda dan eluen n-heksana : etil asetat dengan komposisi (4,5:0,5) yang memiliki pemisahan terbaik diantara 4 eluen yang sama dengan komposisi berbeda. Adapun gambar plat hasil KLT analitik eluen terbaik n-heksana : etil asetat (4,5:0,5) ditunjukkan pada Gambar 4.3 dan Tabel 4.8



Gambar 4.3 Hasil KLT senyawa steroid n-heksana eluen n-heksana : etil asetat (4,5:0,5), (a) sebelum di semprot reagen Liebermann-Burchard dilihat pada lampu UV  $\lambda$  366 nm, (b) ilustrasi, (c) setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard dilihat pada lampu UV  $\lambda$  366 nm, (d) ilustrasi

Tabel 4.8 Hasil KLT golongan senyawa steroid ekstrak n-heksana dengan eluen n-heksana : etil asetat (4,5:0,5) (Panambunan, 2013)

No.	Harga Rf	Warna sebelum di LB	Warna setelah di LB	Dugaan Senyawa
1.	0,04	Ungu	Ungu tua	Steroid
2.	0,09	Ungu tua	Ungu	Steroid
3.	0,22	Tak berwarna	Ungu	Steroid
4.	0,39	Tak berwarna	Ungu muda	Steroid
5.	0,51	Hijau	Ungu muda	Steroid
6.	0,61	Tak berwarna	Ungu	Steroid
7.	0,67	Tak berwarna	Merah muda	-
8.	0,97	Ungu	Ungu	Steroid

Tabel 4.8 menunjukkan bahwa golongan senyawa steroid menghasilkan 8 noda pada eluen n-heksana : etil asetat (4,5:0,5) dengan nilai Rf 0,04 – 0,97. Nilai Rf berbeda-beda terkait dengan sifat eluen yang digunakan bersifat nonpolar dan semipolar. Hasil KLT golongan senyawa steroid ekstrak n-heksana yang diduga positif golongan steroid hanya 7 noda, yaitu pada noda 0,04; 0,22; 0,39; 0,51; 0,61; 0,67; 0,97. Noda yang memiliki nilai Rf lebih rendah cenderung memiliki tingkat kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai Rf yang lebih tinggi. Seperti pada Rf 0,04; 0,22 dan 0,39 memiliki sifat yang lebih polar dibandingkan dengan Rf 0,51; 0,61; 0,67 dan 0,97. Hal ini dikarenakan Rf rendah merupakan senyawa steroid yang dimungkinkan memiliki gugus –OH. Adanya gugus –OH menyebabkan senyawa lebih terdistribusi pada fase diamnya yang bersifat polar sehingga memiliki nilai distribusi:  $C_{stationary} > C_{mobile}$ . Sedangkan pada nilai Rf tinggi dimungkinkan memiliki atom C yang panjang yang menyebabkan senyawa lebih terdistribusi pada fase geraknya yang bersifat nonpolar, sehingga memiliki nilai distribusi:  $C_{stationary} < C_{mobile}$ . Munculnya beberapa noda disebabkan golongan senyawa steroid memiliki banyak jenis senyawa steroid karena ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak kasar dan memiliki nilai distribusi yang berbeda-beda berdasarkan jenis senyawa tersebut.

Menurut Gandjar (2010) menjelaskan bahwa semakin besar nilai distribusi (D) maka migrasi solut (zat terlarut) semakin lambat dan sebaliknya semakin kecil nilai D maka migrasi solut semakin cepat. Hal ini dikarenakan solut akan terelusi menurut perbandingan distribusinya. Jika perbedaan perbandingan distribusi solut cukup besar maka campuran-campuran solut akan mudah dan cepat dipisahkan.

Beberapa hasil penelitian tidak ada yang menyebutkan golongan steroid berwarna merah muda ketika di uji KLT. Rf 0,67 menunjukkan warna merah muda sehingga noda pada Rf tersebut negatif golongan senyawa steroid. Rf 0,97 mengandung golongan senyawa steroid karena noda berwarna ungu. Hal ini terjadi karena golongan steroid pada Rf tersebut dimungkinkan memiliki atom C yang panjang sehingga bersifat lebih nonpolar dan memiliki nilai distribusi:  $C_{stationary} < C_{mobile}$ .

Penelitian sebelumnya menggunakan eluen dan sampel yang sama menghasilkan 8 noda dengan Rf 0,05 – 0,976 dengan hasil noda berwarna hijau, biru muda dan ungu (Panambunan, 2013). Berdasarkan penelitian Reveny (2011) melaporkan hasil KLT golongan senyawa steroid dengan pereaksi Liebermann-Burchad menunjukkan 2 bercak noda dengan warna ungu. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa noda-noda tersebut adalah golongan senyawa steroid dan ekstrak n-heksana ini positif mengandung golongan senyawa steroid.

Penampakan noda yang diduga positif golongan senyawa steroid digunakan reagen Liebermann-Burchad. Reagen Liebermann-Burchad digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa triterpenoid dan steroid (Wagner, 1995). Noda yang dihasilkan pada penelitian ini berwarna ungu setelah disemprot dengan reagen Liebermann-Burchad dibawah lampu UV  $\lambda$  366 nm.

Dugaan struktur steroid yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi mampu menyerap secara kuat di daerah 200-800 nm pada radiasi elektromagnetik. Senyawa-senyawa yang mempunyai ikatan terkonjugasi merupakan senyawa yang

mampu berfluorosensi dengan ditunjukkan noda yang berwarna di bawah sinar UV  $\lambda$  366 nm. Ketika disinari dengan lampu UV  $\lambda$  366 nm terjadi interaksi antara sinar UV dan gugus kromofor yang terikat pada gugus auksokrom. Interaksi tersebut menyebabkan terjadi pergeseran panjang gelombang batokromik (pergeseran serapan maksimum ke panjang gelombang yang lebih besar) sehingga noda berwarna dan tampak oleh mata. Senyawa yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi memungkinkan terjadinya jenis transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Dalam orbital molekul, elektron-elektron  $\pi$  mengalami delokalisasi lanjut dengan adanya ikatan terkonjugasi. Adanya efek delokalisasi ini akan menyebabkan penurunan tingkat energi dan panjang gelombang akan mengalami pergeseran batokromik (Gandjar, 2010).

#### 4.5.2 Seskuiterpenoid

Hasil identifikasi menggunakan KLT golongan senyawa seskuiterpenoid pada daun bunga Matahari dengan menggunakan beberapa eluen seskuiterpenoid ditunjukkan pada Tabel 4.9

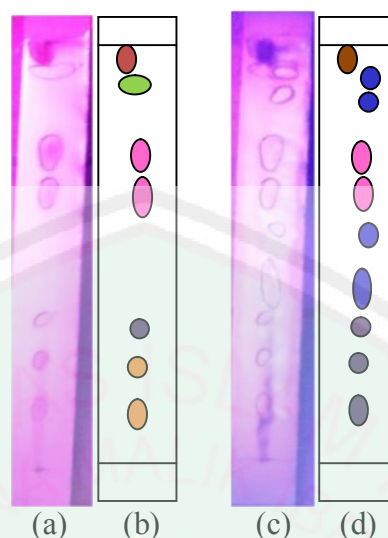
Tabel 4.9 Hasil KLT golongan senyawa seskuiterpenoid dengan beberapa eluen

No	Fase Gerak	Pendeteksi	Jumlah Noda	Keterangan
1.	n-Heksana : etil asetat (4:1)	Vanilin-sulfat	7 noda	Terpisah
2.	n-Heksana : diklorometana (4,8:0,2)	Vanilin-sulfat	12 noda	Tidak terpisah
3.	Diklorometana : etil asetat (4,8:0,2)	Vanilin-sulfat	11 noda	Terpisah baik
4.	Benzena : metanol (9:1)	Uap iodin	8 noda	Tidak Terpisah
5.	Aseton : n-heksana (3:10)	Uap iodin	8 noda	Tidak terpisah

Hasil pemisahan KLT analitik golongan senyawa steroid dari beberapa eluen menunjukkan bahwa eluen n-heksana : etil asetat (4:1) dapat memisahkan 7 noda yang terpisah, tetapi masih lebih baik eluen diklorometana : etil asetat (4,8:0,2) yang dapat memisahkan 11 noda karena eluen tersebut mampu memisahkan golongan senyawa steroid dengan baik. Eluen n-heksana : diklorometana (4,8:0,2) menghasilkan 11 noda tetapi tidak terpisah dengan baik. Hal ini sama dengan eluen benzena : metanol (9:1) dan eluen aseton : n-heksana (3:10) menghasilkan 8 noda tetapi tidak terpisah dengan baik yang menyebabkan ada sebagian golongan senyawa yang tidak terpisah.

Identifikasi KLT untuk gugus lakton menggunakan eluen benzena : metanol (9:1) dan eluen aseton : n-heksana (3:10). Gugus lakton yang teridentifikasi ditunjukkan dengan adanya perubahan warna coklat setelah dideteksi menggunakan uap iodin. Penelitian sebelumnya untuk mendeteksi gugus lakton digunakan uap iodin yang ditunjukkan adanya warna coklat pada KLT setelah disinari lampu UV (Khasanah. 1999).

Adapun gambar plat hasil KLT analitik eluen terbaik diklorometana : etil asetat (4,8:0,2) ditunjukkan pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.10



Gambar 4.4 Hasil KLT senyawa seskuiterpenoid n-heksana eluen diklorometana : etil asetat (4,8:0,2), (a) sebelum di semprot reagen vanilin-asam sulfat dilihat pada lampu UV  $\lambda$  366 nm, (b) ilustrasi, (c) setelah disemprot reagen vanilin-asam sulfat dilihat pada lampu UV  $\lambda$  366 nm, (d) ilustrasi

Tabel 4.10 Hasil KLT golongan senyawa Seskuiterpenoid ekstrak n-heksana dengan eluen diklorometana : etil asetat (4,8:0,2) (Panambunan, 2013)

No.	Harga Rf	Warna noda dengan sinar UV 366*	Warna noda dengan sinar UV 366**	Dugaan Senyawa
1.	0,13	Orange	Ungu	Seskuiterpenoid
2.	0,25	Orange	Ungu	Seskuiterpenoid
3.	0,33	Ungu	Ungu	Seskuiterpenoid
4.	0,40	Tak berwarna	Ungu kebiruan	Seskuiterpenoid
5.	0,54	Tak berwarna	Ungu kebiruan	Seskuiterpenoid
6.	0,63	Merah muda	Merah muda	-
7.	0,72	Merah muda	Merah muda	-
8.	0,86	Tak berwarna	Ungu kebiruan	Seskuiterpenoid
9.	0,89	Hijau	Tak berwarna	-
10.	0,91	Tak berwarna	Ungu kebiruan	Seskuiterpenoid
11.	0,95	Merah	Cokelat	-

\* : identifikasi tanpa reagen vanilin-asam sulfat

\*\* : identifikasi dengan reagen vanilin-asam sulfat

Tabel 4.10 menunjukkan bahwa golongan senyawa seskuiterpenoid menghasilkan 11 noda pada eluen diklorometana : etil asetat (4,8:0,2) dengan nilai

Rf 0,13 – 0,95. Hasil KLT tersebut yang diduga positif golongan seskuiterpenoid hanya 7 noda, yaitu pada noda 0,13; 0,25; 0,33; 0,40; 0,54; 0,86 dan 0,91. Pada Rf 0,13; 0,25; 0,33; 0,40 dan 0,54 memiliki sifat yang lebih polar dibandingkan pada Rf 0,86 dan 0,91. Hal ini dikarenakan Rf dengan nilai rendah dimungkinkan memiliki gugus –OH sehingga lebih terdistribusi pada fase diamnya yang bersifat polar dan memiliki distribusi:  $C_{stationary} > C_{mobile}$ . Sebaliknya pada Rf tinggi dimungkinkan memiliki atom C yang panjang sehingga lebih terdistribusi pada fase geraknya yang bersifat nonpolar dan memiliki nilai distribusi:  $C_{stationary} < C_{mobile}$ . Munculnya beberapa noda disebabkan golongan senyawa seskuiterpenoid memiliki banyak jenis senyawa seskuiterpenoid karena ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak kasar dan memiliki nilai distribusi yang berbeda-beda tergantung senyawa tersebut.

Rf 0,63; 0,72; 0,89 dan 0,95 negatif seskuiterpenoid, hal ini dikarenakan beberapa penelitian sebelumnya tidak ada yang menyebutkan bahwa golongan senyawa seskuiterpenoid berwarna merah muda ketika di uji KLT. Apabila noda berwarna coklat dapat dikatakan golongan senyawa seskuiterpenoid lakton ketika diuapkan dengan iodin. Rf 0,95 noda berwarna coklat tetapi dikatakan negatif golongan seskuiterpenoid karena penampak noda yang digunakan adalah vanilin-asam sulfat.

Penampak noda yang diduga positif golongan senyawa seskuiterpenoid digunakan pereaksi vanilin-asam sulfat. Pereaksi vanilin-asam sulfat merupakan reagen yang digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa yang mengandung

minyak esensial seperti terpenoid dan fenilpropanoid dengan ditandai adanya warna ungu-biru (Wagner, 1995).

Noda yang tampak berwarna ungu-biru disebabkan senyawa seskuiterpenoid memiliki ikatan terkonjugasi setelah direaksikan dengan vanilin-asam sulfat. Senyawa yang memiliki ikatan terkonjugasi ketika disinari dengan lampu UV  $\lambda$  366 mengalami pergeseran panjang gelombang batokromik yang menyebabkan noda tampak berwarna. Hal itu terjadi karena adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat pada gugus auksokrom yang ada pada noda tersebut.

Penelitian sebelumnya Panambunan (2013) melaporkan hasil KLT golongan senyawa seskuiterpenoid dengan sampel dan eluen sama dengan reagen vanilin-asam sulfat menunjukkan 9 noda dengan warna ungu pada Rf 0,412; 0,618 dibawah lampu UV  $\lambda$  366 nm. Hasil penelitian ini noda KLT pada ekstrak n-heksana menunjukkan warna ungu pada noda 0,04; 0,22; 0,39; 0,51; 0,61; 0,67 dan 0,97 dibawah lampu UV  $\lambda$  366 nm, sehingga dapat diasumsikan bahwa noda-noda yang berwarna ungu adalah golongan senyawa seskuiterpenoid, dan ekstrak n-heksana ini positif mengandung golongan senyawa seskuiterpenoid.

#### **4.6 Pemanfaatan Daun Bunga Matahari dalam Perspektif Agama Islam**

Makhluk hidup yang ada di bumi ini memang berbagai macam jenisnya, mulai dari manusia, hewan bahkan tumbuhan. Di dalam sebuah ayat al Quran dijelaskan mengenai kekuasaan Allah yang ada di alam semesta ini salah satunya berupa tanaman yang berbagai macam jenisnya, yang mana tercantum di dalam

surat ar Ra'd ayat 4 yang menjelaskan bahwa sesungguhnya pada penyebutan penghamparan bumi beserta ciptaan-ciptaan yang berhubungan dengannya, seperti gunung-gunung dan sungai-sungai serta berbagai pesona tumbuh-tumbuhan dan bintang-bintang, benar-benar merupakan bukti yang jelas atas kekuasaan Pencipta Yang Maha Kuasa bagi orang yang ingin menggunakan pikirannya dan mengarahkan pancaran pemahamannya terhadapnya. Tanda-tanda kebesaran Allah ini tampak jelas bagi setiap orang sesuai dengan kadar ilmu, pemahaman, kecemerlangan pikiran, kejernihan otak, dan ketulusan arah pandangannya. Sedangkan para pakar astronomi, para ahli tumbuh-tumbuhan, dan para peneliti ilmu alam lainnya, mereka mengetahui aturan-aturannya yang membuat akal sangat takjub (Al-Banna, 2010).

Salah satu tanaman yang diciptakan oleh Allah di bumi ini adalah bunga Matahari. Tanaman ini merupakan tanaman perdu jenis kenikiran dan dikenal sebagai tanaman hias bagi masyarakat. Namun beberapa masyarakat mengetahui bahwa tanaman ini memiliki potensi sebagai obat salah satunya pada bagian daun. Daun bunga Matahari telah banyak diketahui manfaatnya sebagai tanaman obat diantaranya berpotensi sebagai insektisida (Fifendy, 1997), pestisida (Nurusman, 2003), antimalaria (Muti'ah, dkk., 2012). Selain itu dari hasil penelitian uji sitotoksisitas ekstrak daun bunga Matahari dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan identifikasi golongan senyawa aktifnya, menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana memiliki nilai  $LC_{50}$  paling rendah dibandingkan dengan ekstrak diklorometana dan metanol yaitu 22,175 ppm. Ekstak n-heksana pada daun bunga Matahari memiliki potensi bioaktivitas yang digunakan sebagai tanaman obat

dalam bidang farmakologi khususnya mengarah pada obat antikanker. Sebagaimana Rasulullah telah menggunakan tanaman herbal sebagai obat. Dalam sebuah hadist, bahwa Rasulullah bersabda:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عِلْمُهُ مَنْ عِلْمَهُ وَجَهْلُهُ مَنْ جَهْلُهُ

*“Sesungguhnya Allah tidaklah menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya. Obat itu diketahui oleh orang yang bisa mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak bisa mengetahuinya.”* (HR. Ahmad, Ibnu Majah, dan Al-Hakim).

Berdasarkan hadist tersebut menambah keyakinan bagi kita sebagai manusia bahwasannya suatu penyakit pasti ada obatnya tinggal kita sebagai manusia untuk selalu berfikir dan menganalisis segala ciptaan Allah yang ada di alam semesta ini untuk dimanfaatkan sebagai obat. Sesungguhnya Allah tidaklah menciptakan suatu penyakit kepada hambanya tanpa ada obatnya. Hal ini sesuai dengan hadist nabi Rasulullah SAW bersabda yang artinya:

*“Mereka bertanya, “Ya Rasulullah, apakah kami berobat?” Beliau menjawab, “Ya, wahai hamba-hamba Allah. Sesungguhnya Allah meletakkan penyakit dan diletakkan pula penyembuhannya, kecuali satu penyakit yaitu penyakit ketuaan (pikun)”. (HR. Ashabussunnah)*

Oleh karena itu, manusia dianjurkan untuk selalu berfikir untuk menganalisis segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah di bumi ini khususnya pada daun bunga Matahari. Menurut tafsir al-Karim ar-Rahman surat ali Imron ayat 191 menunjukkan bahwa berfikir adalah ibadah yang merupakan salah satu sifat di antara sifat-sifat para wali Allah yang berilmu. Apabila mereka memikirkannya, niscaya mereka akan mengetahui bahwa Allah tidaklah menciptakan mereka dengan sia-sia (Abdurrahman. 2006).

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

1. Adapun nilai  $LC_{50}$  dari ekstrak daun bunga Matahari (*Helianthus annus* L) pada ekstrak n-heksana, diklorometana dan metanol berdasarkan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) secara berturut-turut adalah 22,175 ppm, 952,625 ppm dan 147,847 ppm.
2. Ekstrak n-heksana memiliki potensi bioaktivitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dibandingkan dengan ekstrak diklorometana dan metanol. Sehingga golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak n-heksana daun bunga Matahari (*Helianthus annus* L) adalah steroid dan seskuiterpenoid. Golongan senyawa tersebut telah di uji fitokimia dengan uji reagen dan diperkuat dengan uji kromatografi lapis tipis.

#### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan lebih lanjut terhadap ekstrak kasar n-heksana daun bunga Matahari khususnya pada golongan senyawa steroid seperti di kromatografi kolom dan KLTP kemudian hasil isolat yang diperoleh diidentifikasi menggunakan instrument seperti UV-Vis, FTIR, dan LC-MS untuk mengetahui spesifikasi senyawa aktifnya.
2. Ekstrak n-heksana dan metanol pada daun bunga Matahari memiliki nilai  $LC_{50}$  rendah sehingga perlu dilakukan uji lanjutan secara *in vivo* seperti dengan

metode *Micronucleus assay* pada hewan coba (mencit) dan uji *in vitro* seperti dengan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Technique*) pada sel kanker.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahman, S. 2006. *Tafsir al-Karim ar-Rahman fi Tafsir Kalam al-Mannan*. Jakarta: darul Haq.
- Ahmad, M. M. 2006. *Anti Inflammatory Activities of Nigella sativa Linn (Kalongi, black seed)*. <http://lailanurhayati.multiply.com/journal>. Diakses tanggal 1 Juni 2013.
- Al-Banna, A. S. I. H. 2010. *Tafsis Hasan Al-Banna*. Jakarta: Suara Agung.
- Al-Mahalli, I. J dan Imam, J. A. 2008. *Terjemahan Tafsir Jalalain Berikut Asbabun Nuzul Jilid 1*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Al-Maragi, A. M. 1987. *Tafsir Al-Maragi*. Semarang: CV. Toha Putra.
- Al-Qarni, A. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Qurthubi dan Syaikh, I. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Anderson, J. E., J. L. McLaughlin, and L.L. Rogers. 1998. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal* 32: 513-524.
- Arnon I. 1972. *Crop Production in Dry Regions*. Volume ke-2. London: Leonard Hill. 638p.
- Ashour M. A. *et al.* 2007. Indole alkaloid from the Red Sea sponge *Hyrtios erectus*. *ARKIVOC* 25: 225-231.
- Auterhoff dan Kovar. 1987. *Identifikasi Obat*, Edisi IV, 30. Bandung: Penerbit ITB Press.
- Ayinde, B. A and U. Agbakwuru. Cytotoxic and growth inhibitory effects of the methanol extract *Struchium sparganophora* Ktze (*Asteraceae*) leaves. *Journal Pharmacognosy Magazine*. 6(24): 293-297
- Baraja, M. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus elastica* Nois ex Blume terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi* Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Bawa, I. G. A. G. 2009. Isolasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Toksik dari Daging Buah Pare (*Momordica charantia* L.). Bukit Jimbaran: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. *Jurnak Kimia* 3(2). ISSN 1907-9850: 1117-124.

- Bayyinah, I. 2013. Identifikasi Ekstrak Diklorometan Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus*) Dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Dan FTIR. *Jurnal Skripsi*. Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Bogoriani, N. W, Santi, S. R. dan Astiti, A. 2007. Isolasi Senyawa Sitotoksik Dari Daun Andong (*Cordyline terminalis* Kunth). *Jurnal Kimia*. Volume 1, Nomor 1: 1-6.
- Bruneton, J. 1993. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier Publishing, Paris.
- Burke, R. W. 1974. Mechanisms Of The Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions For Cholestrol. *Journal of Chemistry*. Washington. Clinical Chemistry
- Cahyono, A. B. 2004. *Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri*. Yogyakarta: UGM Pres.
- Carballo, J. L., Zaira L. H., Pilar P., and Maria D. G. G. 2002. A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect In Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Products. *Journal BMC Biotechnology*. 2:7
- Champman S. R., Carter L. P. 1975. *Crop Production*. San francisco: W.H. Freeman dan co. 556p.
- Colegate, S. M., dan Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press
- Corina, C., Gabriela, N., Ravis, A., Hadaruga, D., Lupea, A. dan Parvu, D. 2008. Antioxidant Activity Evaluation of Some *Matriacaria Chamomila* L. Extracts. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologis*. 14(2), 417-432.
- Deny, 2007. Pemanfaatan Tanin Sebagai Perekat. *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB Bogor.
- Diastuti, H., Warsinah., dan Purwati. 2009. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun *Rhizopora mucronata* Terhadap larva Udang *Artemia salina* Dan Sel Ragi. *Molekul*. Vol.4 No.1, 12-20.
- Djamal, R. 1988. *Tumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Pusat Penelitian. Universitas Negeri Andalas.
- Effendy, 2007. *Teori VSEPR, Kepolaran dan Gaya Antarmolekul*. Malang: Bayumedia Publishing.

- Ekasari, W., Aty. W., dan Achmad .F. H. 2005. Uji Antimalaria Hasil Fraksinasi Ekstrak Kloroform Daun Siamea pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Laporan Penelitian Tidak Diterbitkan*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Ennas, K., dan Munira. 2011. Curing of Mice Skin Infection Using Ethanol Flower Extract of Chamomile. *Baghdad Science Journal*. Vol.8 (1).
- Etika, S. 2013. Identifikasi Dan Uji Toksisitas Ekstrak Sum-Sum Batang Bunga Matahari (*Helianthus Annuus L.*) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan: Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fahmi, D. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Sum-Sum Batang Bunga Matahari (*Helianthus Annuus L.*) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach Dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Dan Identifikasi Senyawa Aktifnya. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan: Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Faramayuda, F., Alatas, F., dan Desmiaty, Y. 2010. Formulasi Sediaan Losion Antioksidan Ekstrak Air Daun The Hijau (*Camelia sinensis L.*) *Majalah Obat Tradisional*. 15. 3: 105-111.
- Farida, Y., Titiek, M., dan Bernard, E. 2009. Uji Aktivitas Biologi Secara BSLT dan Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT dari Ekstrak n-Heksana dan Ekstrak Metanol Daun Keladi Tikus (*Typhonium divaricatum (L) Decne*). *Jurnal Kimia*.
- Farooqi, M. I. H. 2005. *Terapi Herbal Cara Islam: Manfaat Tumbuhan Menurut Al-Qur'an dan Sunnah Nabi*. Diterjemahkan oleh Ahmad Y. Samantho. Jakarta: Penerbit Hikmah (PT Mizan Publika).
- Fessenden, R. J., dan Fessenden, S. 1986. *Kimia Organik Jilid 2 Edisi Ketiga*. Diterjemahkan Oleh Aloysius Hadyana Pudjatmaka, Ph.D. Jakarta: Erlangga.
- Fifendy, M. 1997. Pengaruh Ekstrak Daun Bunga Matahari terhadap *Ae. Aegepti* L. *Tesis : Program Pasca Sarjana (Parasitologi)*.
- Frank, C.L. 1995. *Toksikologi Dasar*. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: *Basic of Toxicology*.
- Gandjar, I.B., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Ghoffar, M. A., Abdurrahim, M., dan Abu, I. A. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 2*. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Gritter, R. J. 1991. *Pengantar Kromatografi edisi kedua*. Bandung: Penerbit ITB.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri Jilid 1*. Penerjemah: Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta.
- Gunawan, I.W.G., Bawa, I. G. G., dan Sutrisnayanti, N.L. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang aktif Antibakteri pada Herba Meniran (Phyllanthus niruri Linn.) Jurnal Kimia*. Vol. 2 No. 1, hal: 31-39
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang : Jurusan Kimia Universitas Negeri Malang Maulana Malik Ibrahim.
- Handayani D. N., Sayuti., dan Dachriyanus. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epidioksi Sterol dari Spon Laut *Petrosia nigrans*, Asal Sumatera Barat. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II 2008*. Lampung: Universitas Lampung
- Haniah. 2013. Identifikasi dan Uji Aktivitas Ekstrak Metanol Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L) Sebagai Antimalaria Secara In Vivo Pada Mencit. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: ITB
- Harbone, J. B. 1973. *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall.
- Hart, H., Craine, L. E., dan Hart, J. 2003. *Kimia Organik : Suatu Kuliah Singkat Ed 11*. Jakarta: Erlangga
- Herlina, T., Syafroddin., Zalarin, U. 2012. Senyawa Aktif Antikanker Dan Antimalaria Dari Tumbuhan Dadap Ayam (*Erythrina variegata*) Secara In Vitro. *Jurnal Manusia Dan Lingkungan*, XIX (1)
- Hoa, C. H. L., Cacacea, J. E., dan Mazza, G. 2007. Extraction of Ligands, Proteins and Carbohydrates from Flaxseed Meal with Pressurized Low Polarity Water. *LWT*. 46 hlm 1637-1647.
- Hukmah, S. 2008. Aktivitas Antioksidan Katekin dari Teh Hijau (*Camellia Sinensis O.K. Var. Assamica (masti)*) Hasil Ekstraksi Dengan Variasi

Pelarut dan Suhu. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, UIN.

- Husna, A. N. 2011. Identifikasi Senyawa Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* Linn.) dan Uji Aktivitas Antimalaria In Vivo Pada Hewan Uji. *Skripsi Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ikpefan., Fajana, A., dan Olowojoba, J. I. 2013. Cytotoxic and Growth Inhibitory Effects of the Methanol Extract of *Tridax procumbens* Linn (*Asteraceae*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Vol. 2 No. 1
- Inayah, N., Rachmawati, N., Tri, K. A. 2012. Uji Toksisitas Dan Identifikasi Awal Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Dan N-Heksana Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) Kering Pantai Kenjeran Surabaya. *Jurnal Alchemy* Vol. 2 No. 1: 92-100
- Indrayani, L., Soetjipto, H., dan Sihasale, L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Berk. Penel. Hayati*. Vol.1
- Isnansetyo, A., dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton*. Yogyakarta: Kanisius.
- Itharat, A., dan Ooraikul B. 2007. Research on Thai Medicinal Plants for Cancer treatment. Di dalam: Acharya SN, Thomas JE, editor. *Advances in Medicinal Plants Research*. Ed ke-2. Kerala: Research Singpost. Hal 287-314.
- Kanwar, A. 2007. Brine Shrimp (*Artemia salina*) Marine Animal for Sample and Rapid Biological Assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2(4): 236-240.
- Kartikasari, F. G. 2010. Uji Toksisitas Fraksi dari Spons Laut (*Xesto spongia*) dengan Metode *Brine Shrimp Test* (BST). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Surabaya: Jurusan Biologi FMIPA ITS.
- Khairunnisak. 2013. Efektivitas Antimalaria Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol 80 % Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus*) Pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Kipps, M. S. 1970. *Production of Field Crops*. Sixth ed. New York: Tata McGraw Hill Pilb. Co.ltd. 788p.

- Kristanti, A. N., Nanik S. A., Mulyadi T., dan Bambang K. 2006. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Kristianingsih. 2005. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid dari Akar Tanaman Kedondong Laut (*Polyscias fruitcosa*). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Kumala, L. D. 2007. Kajian Ekstrak Umbi Gadung (*Dioscorea hispida*), Rerak (*Sapindus rarak*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai Bahan Pengawet Alami Kayu. *Skripsi*. Bandung: Departemen Hasil Hutan Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor.
- Kumar, S. dkk. 2008. Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential of *Citrullus calocynthis* L Schrad Methanolic Fruit Extract. *Acta Pharmacology*. 58 hal 215-220.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenilflavonoida dan Alkaloida. *Karya Ilmiah*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Lisboa, B. P. 1969. Methods in Enzymology (Thin-Layer Chromatography of Steroids, Sterols, and Related Compounds). Vol. 15. Pages 3: 158.
- Lisdawati, V., Sumali, W., dan Broto, S., dan Kardono. 2009. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Jurnal Penelitian Bul. Penel. Kesehatan*, Vol. 34. No.3. Hal: 11-118.
- Listiani, L., I. Fidrianny dan Sukrasno. 2005. Telaah Kandungan Kimia Daun Kucai (*Allium schoenoprasum* L., *Liliaceae*). Bandung: *Journal sekolah Farmasi ITB*. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>. Diakses tanggal 25 Oktober 2009.
- Lutfillah, M. 2008. Karakteristik Senyawa Alkaloid Hasil Isolasi dari Kulit Batang Angsret (*Spathoda campanulata* Beauv) Serta Uji Aktivitasnya Sebagai Antibakteri Secara In Vitro. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Manitto, P. 1981. *Biosintesis Produk Alami*. Terjemahan: Koensoenmardiyah. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Mangunwardoyo, W., Ismaini, L., dan Herawati, S. 2008. Analisis Senyawa Bioaktif Dari Ekstrak Biji Pucung (*Pangiumedule Reinw.*) Segar. *Berita Biologi* Vol 9, No 3. Hal: 1-6.

- Marliana, S. D., Venty, S., Suyono. 2005. Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule Jacq.* Swartz) Dalam Esktrak Etanol. *Jurnal Biofarmasi*. 3 (1): 26-31
- Markham, K.R. 1982. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Alih Bahasa: Kosasih Padmawinta. ITB: Bandung
- Martins, M. A. P. *et al.* 2001. *Molecular structure of heterocycles: 6 solvent effects on the 170 NMR chemical shifts of 5-trichloromethylisoxazoles*. *Journal Brazil Chemical Society*. 12(6) hal 804 <http://kompas.com/kompas-cetak/0409/15/sorotan/1265264.htm>. Diakses tanggal Juni 2013.-808.
- Maulidatul, I. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.). *Skripsi* Tidak Terpublikasikan. Malang: KimiaUIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mawaddah, R. 2008. Kajian Hasil Riset potensi Antimikroba Alami Dan Aplikasinya Dalam Bahan Pangan di Pusat Informasi Teknologi Pertanian. Fateta Ipb. [http://repositorypb.ac.id/bitstream/handle/123456789/13778/F08\\_sma.pdf?sequence=2](http://repositorypb.ac.id/bitstream/handle/123456789/13778/F08_sma.pdf?sequence=2) [07 Oktober 2013].
- Meloan, Cf. 2009. *Chemical Separation Principles, Techniques and Experiments*. New York: John Wiley and Sons inc.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putman, J. E., Jacobsen, L., B. Nichols., and McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta media*. 45:31-34.
- Miroslav, V. 1971. *Detection and Identification of Organic Vompound*. New York: Planum Publishing Corporation and SNTC Publishers of Technical Literature.
- Morina, A. 2007. Isolasi Senyawa Aktif Berkhasiat Sitotoksik Dari Daun Kemuning (*Murraya Panicullata* L. Jack). *Jurnal Gradien*. Volume 3, Nomor 2: 262-266.
- Mudjiman. 1989. *Udang Renik Air Asin (Artemia salina)*. Jakarta : Bhatara.
- Mulyono. 2006. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Murtadlo, Y., Dewi, K., Enny, F. 2013. Isolasi, Identifikasi Senyawa Alkaloid Total Daun Tempuyung (*Sonchus aevenis* Linn) Dan Uji Sitotoksik Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). 1: 379-385

- Muti'ah, R., Elok, K. H., dan Ijro'atul. 2012. Potensi Antimalaria Ekstrak Diklorometana Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) Secara in vivo terhadap Mencit. *Journal Saintis*, Vol.2 No. 2
- Naim, R. 2004. Senyawa Antimikroba dari Tanaman. *Kompas Edisi 15*.
- Nasliyana, S. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Biji Sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ngibad, K. 2013. Efektivitas Kombinasi Ekstrak Etanol 80 % Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus*) Dan Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Unn) Sebagai Antimalaria Serta Uji Kadar Sisa Etanol Abu Total. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nuraini, F. 2002. Isolasi dan Identifikasi Tanin dan Gamal (*Gliricida sepium*). *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Brawijaya
- Nurhayati, A. P. D., Nurlita. A dan Rachmat Febrianto. Uji Toksisitas ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimindo*. Vol.2 No.1: 41-46.
- Nurusman, L. S. 2003. Potensi *Helianthus Annuus* dan *Ipomoe Batatas* dalam menghambat Pertumbuhan *Pennisetum Polystachyon*. *Tesis S2*. Universitas Indonesia.
- Palar, H. 1994. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Jakarta: Rineka Cipta
- Panggabean, M. G. L. 1984. Teknik Penetasan Dan Pemanenan *Artemia salina*. *Oseana*. Vol.1X No.2:57-65.
- Panambunan, R. F. 2013. Penentuan Dosis Letal (LD<sub>50</sub>) Ekstrak Metanol Dan Dosis Efektif (ED<sub>50</sub>) Ekstrak Diklorometana Daun Bunga Matahari (*Helianthus anuss* L.) Pada Hewan Coba. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Pelletier, S. W. 1983. The Nature and Definition of an Alkaloid. In: Pelletier, S. W. (Ed). 1983. *Alkaloids, Chemical and Biological Perspectives*. John Wiley and Sons, New York.
- Poedjiadi, A. dan F. M. T. Supriyanti. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.

- Purseglove, J. W. 1981. *Tropical Crop Dicotyledons*. Volume ke-1 dan 2. Singapore: English Language Book. Soc. & Longman.
- Purwaningsih, Y. 2003. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavoid dari Biji Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Quthb, S. 2001. *Tafsir Fi Zhilalil Qu'an*. Jakarta: Gema Insani Press. Hal 244-246
- Rahim, A., Gemini, A., Rina, A., dan Muh, R. 2012. Skrining toksisitas Ekstrak Herba Bandoan (*Ageratum conyzoides* L) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. Vol. 16., No. 2: 99-196.
- Rahman. 2003. Kajian Potensi Anti Fungi dari Ekstrak Seduh Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L.), Daun Sirih (*Piper betle* L), Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L) dan Daun Sambiloto (*Andrographis peniculatala*) terhadap Pertumbuhan Cendawan Akuatik *Aphanomyces sp* secara in vitro. *Skripsi*. Bogor: Departemen Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Raineri, M. 1981. Histochemical Localization of Chitin in Larvae of *Artemia salina* Leach (Phyllopoda). *Italian Journal of Zoology*. 48 (2): 139-141.
- Rani, P., Sushama, K., dan Praveen, K. 2012. Medicinal Plants of Asian Origin having Anticancer Potential: Short Review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science*. Vol. 2 No. 10.
- Rastuti, U., dan Purwati. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kalba (*Albizia falcataria*) Dengan Metode DPPH (*1,1-Difenil-2-pikrihidrazil*) Dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekundernya. *Jurnal Molekul*. Vol. 7. No. 1: 33-42.
- Reveny, J. 2011. Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* Linn.). *Jurnal Ilmu Dasar*, Vol. 12 No. 1: 6-12.
- Riris, I. D. 1994. *Steroid dalam Kerang Hijau*. Tesis. Bogor: IPB
- Rita, W. S., I. W. Suirta dan Ahmad, S. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa yang Berpotensi sebagai Antitumor pada Daging Buah Pare (*Momordica carantia* L). Bukit Jimbaran: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. *Jurnal Kimia 2 (1)*. ISSN 1907-9859:1-6.

- Rita, W. S. 2010. Isolasi, Identifikasi, Dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid Pada Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe). *Jurnal Kimia*, Vol 20-26.
- Robinson, T. 1991. *The Organic Constituen of Higher Plants*. 6<sup>th</sup> Edition. Department of Biochemistry. University of Massachusetts.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Kimia Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB, Bandung.
- Rohimah, A. 2008. Isolasi dan identifikasi Senyawa Golongan Alkaloid dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa yang Menginhibisi  $\alpha$ -Glukosidase. *Skripsi*.
- Rohyami Y, Shabur. 2007. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Laporan Penelitian PDM DIKTI*.
- Ropiqa, M. 2009. Uji Ketoksikan (LC<sub>50</sub>) Ekstrak Etanol Daun Ekor Kucing (*Acalypha hispida* Burm.f) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Jurnal*. Pontianak: Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Tanjungpura.
- Rumondang , M., Dewi. K., Enny. F. 2013. Isolasi, Identifikasi Dan Uji Antibakteri Senyawa Triterpenoid Dari Ekstrak n-Heksana Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L). *Chem Info*. Vol 1 No 1: 156-164
- Ruwaida, D. G. 2010. Uji Toksisitas Senyawa Hasil Isolasi Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* L. Lamk ) Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). *Skripsi*. Surakarta: Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Sa'adah, L., Hayati, Elok Kamilah dan Fasyah, G. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin Pada Daun Blimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurnal Kimia*. Vol. 4, No. 2: 193-200.
- Saini, S. dan Sharma S. 2011. *Helianthus Annuus (Asteraceae) : A Review*. *Internatoinal Journal of Pharma*. Volume 2.
- Sari, L. O. R. K. 2006. Pemanfaatan Obat Tradisional Dengan Pertimbangan Manfaat Dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kesehatan*, Vol. III, No.1:01-07
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty

- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopeptisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal*. Semarang: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. 35 (1) ISSN 0215-9945.
- Simpson, B. B & Ogarzaly M.C. 1986. Economic Botany. Plants in Our World International Edition. *Mc Grow Hill Company*. P. 309-311.
- Sirait, M. 2007. *Penentuan Fitokimia Dalam Farmasi*. Bandung: ITB Press.
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: UGM Press.
- Souse, A. *et al.* 2008. Effect of solvent and eztraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *LWT*. 41 hal 739-745.
- Sriwahyuni, Ika. 2010. Uji Fitokimia Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan *Brine Shrimp* (*Artemia salina* Leach). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sudarmadji., S. B. Haryono., dan Suhardi. 2007. *Prosedur Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sukandar, E. Y. Tren dan Paradigma Dunia Farmasi, Industri-Klinik-Teknologi Kesehatan, *disampaikan dalam orasi ilmiah Dies Natalis ITB*, [http://itb.ac.id/focus/focus\\_file/orasi-ilmiah-dies-45.pdf](http://itb.ac.id/focus/focus_file/orasi-ilmiah-dies-45.pdf). Diakses Oktober 2013.
- Sukardiman., Abdul. R., dan Nadia. F. P. 2004. Uji Prasktining Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph. Dengan Metode Uji Kematian Larva Ugang dan Profil Densitometri Ekstrak Aktif. *Majalah Farmasi Airlangga*. Vol. 4 No. 03
- Sukardiman., Wiwied, E., dan Pharmasinta, P.H. 2006. Aktivitas Antikanker Dan Induksi Apoptosis Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya* L) Terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma. *Media Kedokteran Hewan*. Vol.2 No.2: 104-111.
- Sulistijowati, S., dan D. Gunawan. 2001. Efek Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray) Terhadap *Candida albicans* Serta Profil Kromatografinya. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. *Cermin Dunia KEdokteran*.

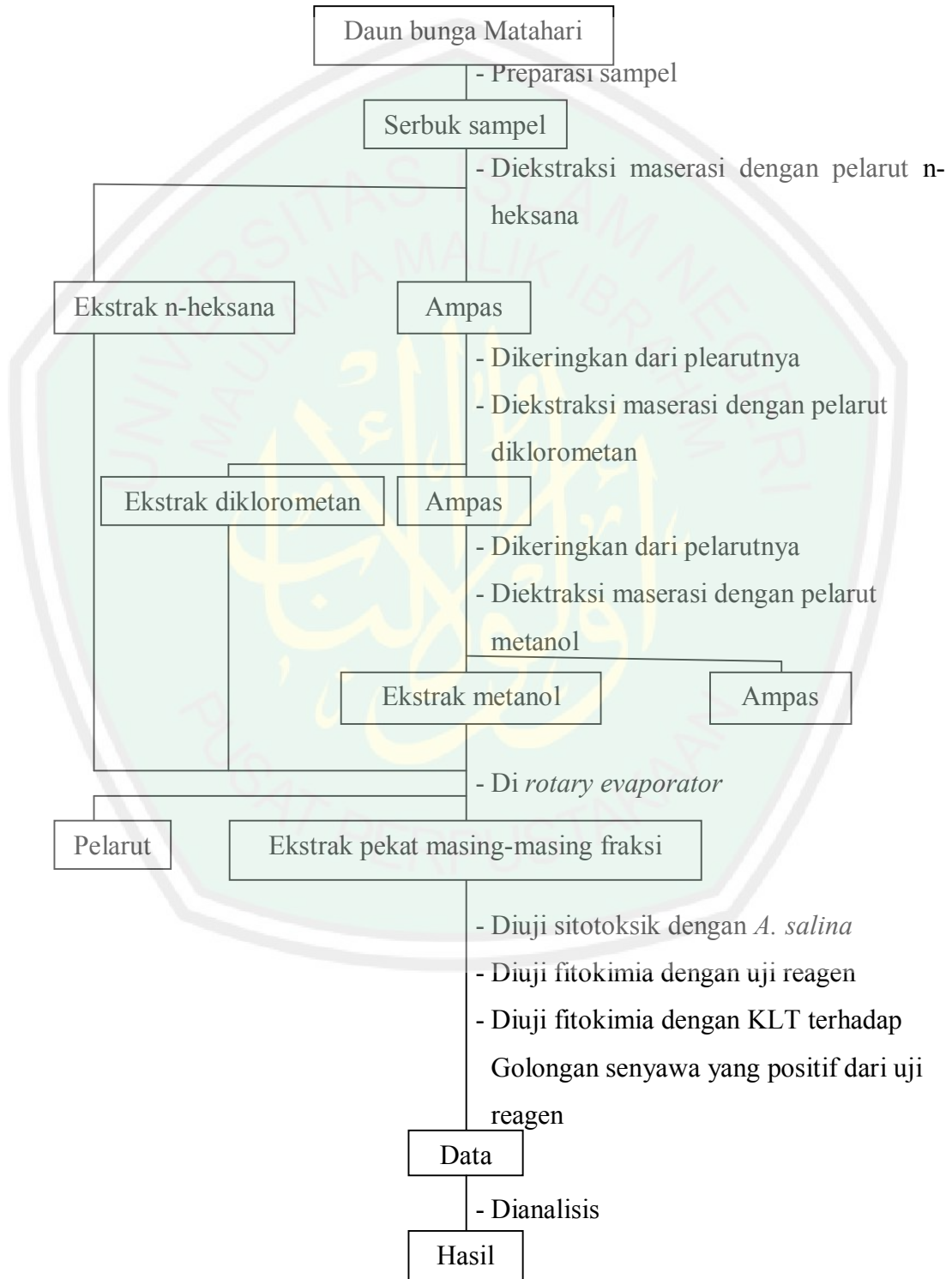
<http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/12EfekEkstrakDaunKembangBulanTerhadapCandidaabcans130.html>. Diakses tanggal 16 Juni 2013.

- Sulistiyaningsih. 2009. Potensi Daun Beluntas (*Pluchea Indica* Less.) Sebagai Inhibitor Terhadap *Pseudomonas Aeruginosa Multi Resistant* Dan *Methicillin Resistant Stapylococcus Aureus*. Laporan Penelitian Mandiri. Diterbitkan.
- Suradikusumah, E. 1989. *Kimia Tumbuhan*. Bogor: IPB.
- Suryanti, V., Soerya. D. M., dan Dwik. K. 2005. Komponen Kimia Buah Pare Belut (*Trichosanthes anguina L.*). *Jurnal Alchemy*, 4 (2): 28-34.
- Susanti, E., Kamalrullah., dan Alfian. 2011. Uji Senyawa Sitotoksisitas Dari Tumbuhan Akar PKI (*Mikania micrantha* H. B. K). *e-Publikasi Ilmiah* Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.
- Svehla, G. 1985. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro Dan Semimikro*. Jakarta: PT. Kalman Media Pustaka.
- Taofik, M. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Air Daun Paitan (*Thitonia diversifolia*) Sebagai Bahan Ensektisida Botani Untuk Pengendalian Hama Tungau *Eriophyidae*. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Tarumingkeng, R. C. 1992. *Insektisida, Sifat, Mekanisme Kerja dan Dampak Penggunaannya*. Jakarta: Ukrida
- Tjitrosoepomo G. 1999. *Taksonomi Tumbuh-Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: UGM Press. Hlm 479.
- Triastustutik, Y. 2013. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Kasar Seskuitrpen Dari Daun BungaMatahari (*Helianthus annus L.*) Terhadap Mencit Jantan (*Musmusculus*). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Tyler, R., dan Varro. 1981. *Pharmacologi*. Eight Edition Philadelphia, Lea and Febiger.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandhi, Apt. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press.
- Wagner, H. and Bladr, S. 2001. *Plant drug Analysis; a Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin: Springer.

- Wahyuningsih, M. S. H., Sofia, M., Mark, T. H., Ibnu, G. G., dan Subagus, W. 2008. Identifikasi Struktur Senyawa Berpotensi Antikanker Ginjal Yang selektif Dari Daun *Nerium indicum* Mill. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19 (2), 57-64.
- Widianti, W. 2012. Potensi Antioksidan Dan Sitotoksitas Ekstrak Buah Ceremai (*Phyllanthus acidus* L). *Jurnal Skripsi*. FMIPA IPB Bogor.
- Wyllie, A. H. 2010. *Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation 3<sup>rd</sup>*. Roche Applied Science.
- Yoon, J. 2010. Anti Inflammatory Effect of Taraxacum officinale Leaves on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells. *Journal of Medical Food*. Volume, 840-847.
- Yuliani. 2008. Kadar Tanin Dan Quercetin Tiga Tipe Daun Jambu Biji (*Psidium Guajava*). Balai Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat. <http://www.balitra.go.id>.
- Zulhipri., Irma. R. K., Imam. S. 2010. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Biji Rambutan dengan Berbagai Pelarut. *Jurnal Ebers Papyrus* Vol 13 No 3

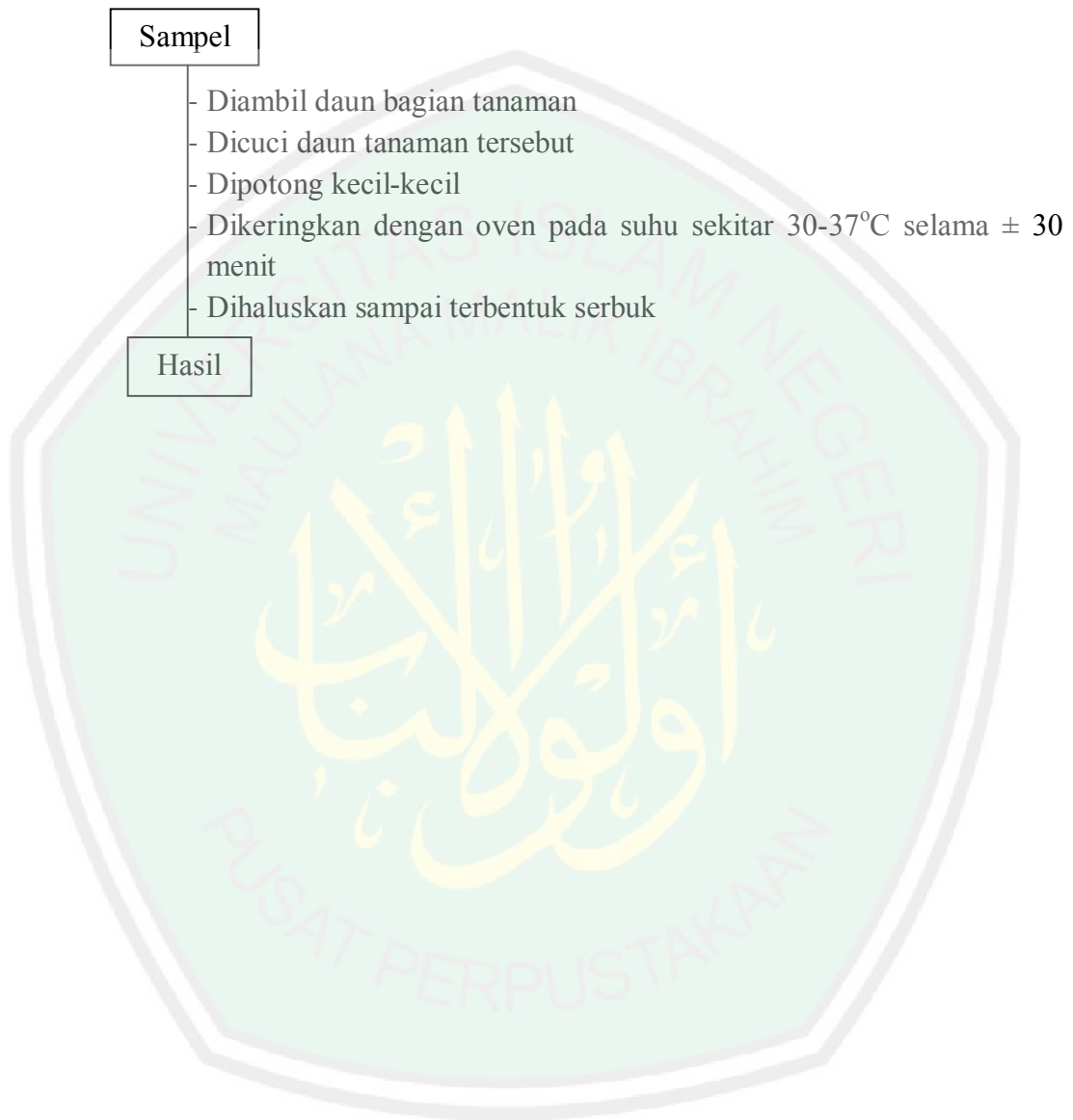
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

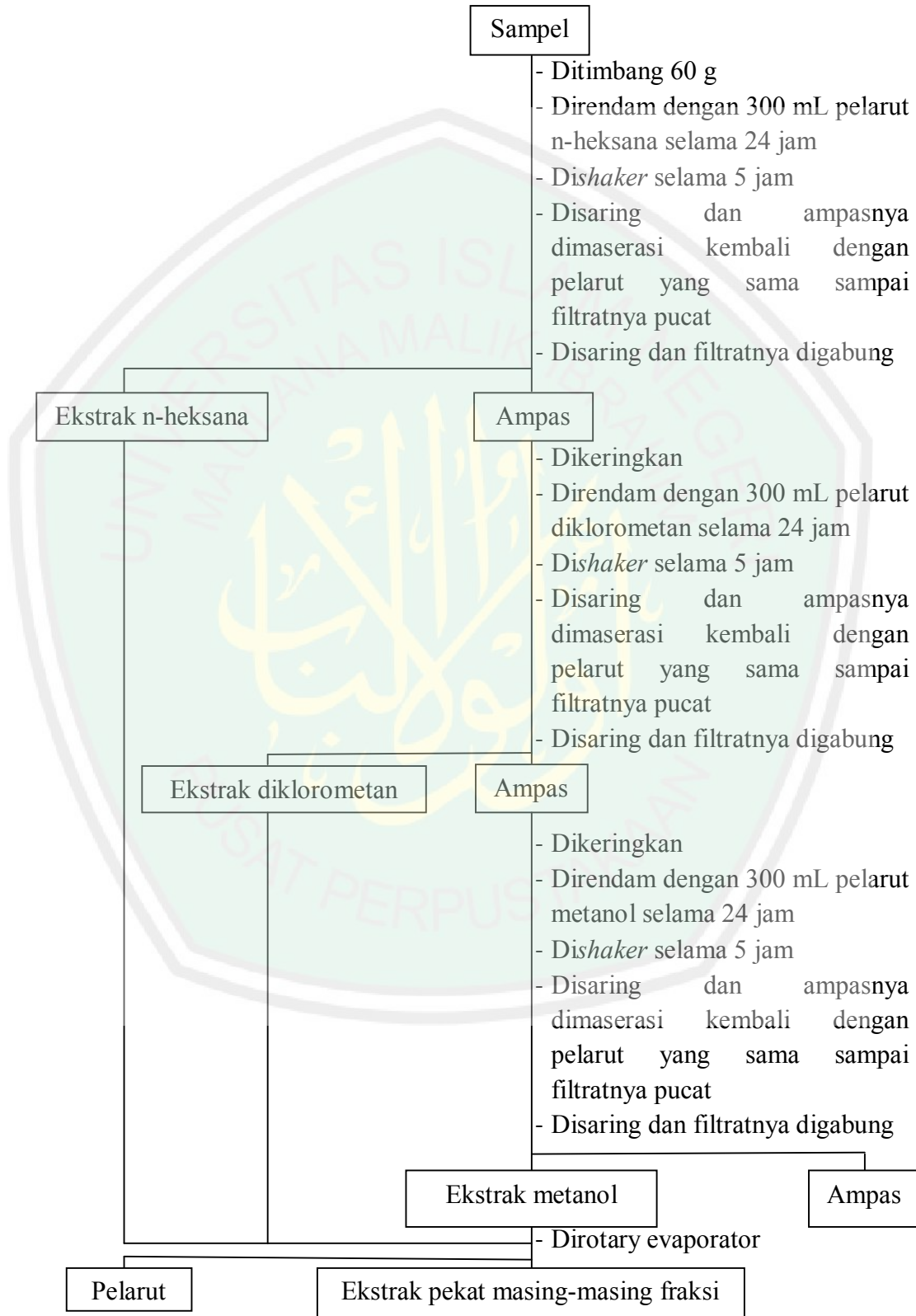


## Lampiran 2. Skema Kerja

### L.2.1 Preparasi Sampel



### L.2.2 Ekstraksi Komponen Aktif



### L.2.3 Uji Sitotoksitas dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach

#### L.2.3.1 Penetasan Telur

Air laut 250 mL

- Ditempatkan pada botol penetasan
- Dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach
- Diaerasi selama  $\pm$  48 jam

Lava udang dalam air laut

#### L.2.3.2 Uji Sitotoksitas

100 mg ekstrak pekat n-heksana, diklorometan dan metanol

- Dilarutkan dengan menggunakan 10 mL masing-masing pelarut
- Diperoleh dipipet masing-masing larutan sebanyak 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, 80  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L, sehingga terbentuk larutan ekstrak dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 1000 ppm dan larutan kontrol
- Dimasukkan ke dalam botol vial
- Diuapkan pelarutnya sampai kering
- Dimasukkan 100  $\mu$ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut
- Dikocok hingga ekstraknya larut
- Dimasukkan 10 ekor larva udangnya
- Ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL
- Diamati kematian larva udang setelah 24 jam
- Perlakuan dilakukan pengulangan masing-masing sebanyak 3 kali
- Dianalisis datanya untuk mencari LC<sub>50</sub>

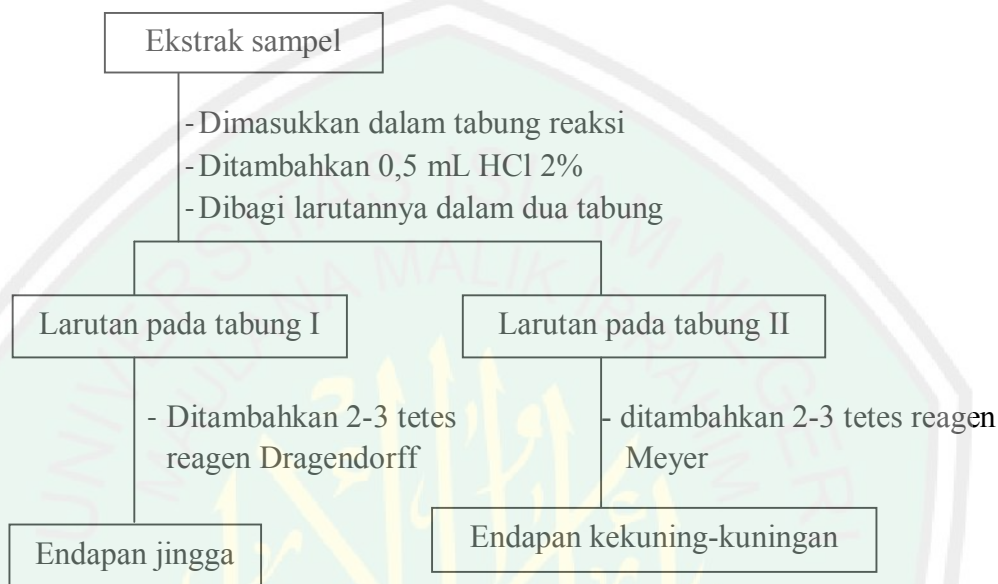
Hasil

#### L.2.4 Uji Fitokimia dengan Reagen

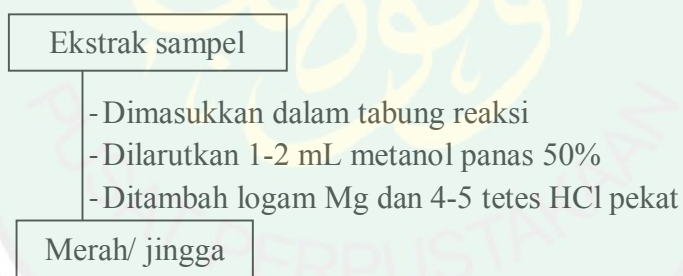
Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dari ekstrak pekat n-heksana, diklorometan, metanol dari daun bunga Matahari dilarutkan

dengan sedikit masing-masing pelarutnya, kemudian dilakukan untuk uji alkaloid, flavonoid, seskuiterpenoid, triterpenoid/ steroid, tanin dan saponin.

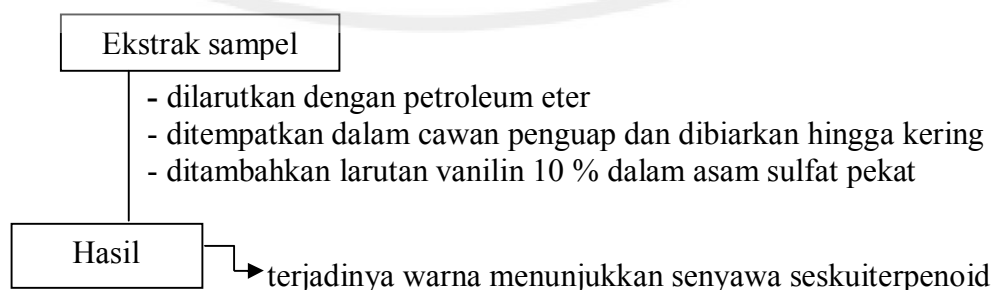
#### L.2.4.1 Uji Alkaloid



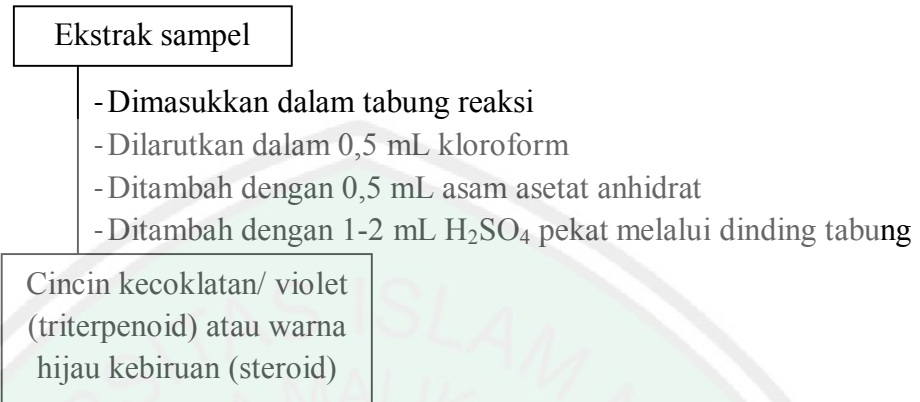
#### L.2.4.2 Uji Flavonoid



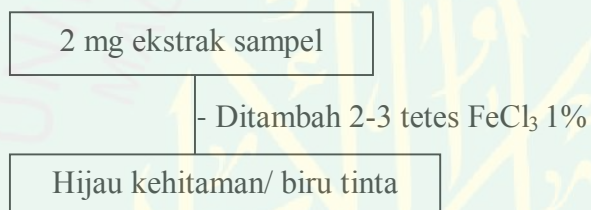
#### L.2.4.3 Uji Seskuiterpenoid



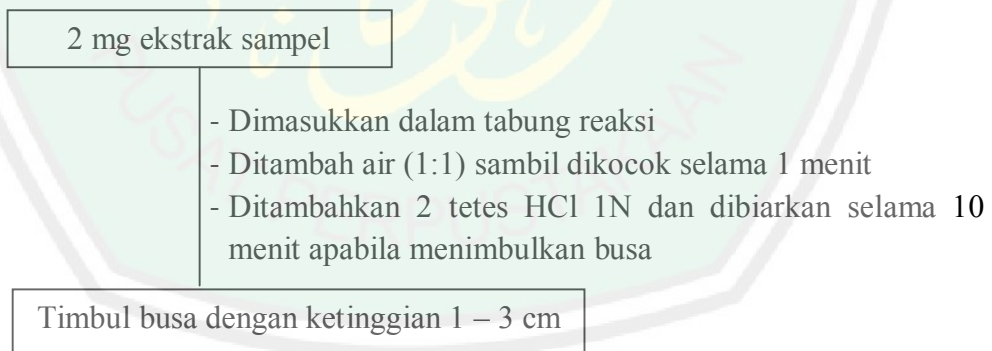
#### L.2.4.4 Uji Triterpenoid/ Steroid



#### L.2.4.5 Uji Tanin Uji dengan FeCl<sub>3</sub>



#### L.2.4.6 Uji Saponin



### L.2.5 Uji Fitokimia dengan KLT

Uji fitokimia dengan KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji fitokimia dengan uji reagen.

#### Ekstraksi sampel

- Ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat silika gel F<sub>254</sub> yang telah diaktivasi 1 x 10 cm<sup>2</sup> dengan pipa kapiler
- Dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawa pada tabel berikut
- Diperiksa noda pada permukaan plat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm
- Diamati masing-masing hasil nodanya dengan masing-masing reagen pada tabel berikut

#### Hasil

## Jenis-jenis fase gerak dan pendeteksi uji KLT untuk metabolit sekunder

<b>Golongan Senyawa</b>	<b>Fase Gerak</b>	<b>Pendeteksi</b>	<b>Hasil Warna Noda</b>
Alkaloid	Metanol-kloroform (0,5:9,5); n-heksana: etil asetat: etanol (30:2:1); Etil asetat : kloroform (1 : 1); Etil asetat : metanol : air (100 : 16,5 : 13,5); Kloroform : etanol (9 : 1)	Pereaksi Dragendorff	Coklat jingga, kuning, coklat
Flavonoid	Butanol-asam asetat-air (4:1:5); kloroform: n-heksana (2:1); Butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1); etil asetat : metanol (9 : 1)	Diuapi uap amoniak, pereaksi FeCl <sub>3</sub>	Biru kehijauan, hijau kekuningan, lembayung dan kuning kecoklatan
Seskuiterpenoid	Aseton:n-heksana (3:10); benzena:metanol (9:1); DCM:etil asetat (4,8:0,2); n-heksana:DCM (4,8:0,2); n-heksana:etil asetat (4:1)	Vanilin-asam sulfat dan uap iodine	Biru-ungu
Triterpenoid	n-heksana-etil asetat (2:8), n-heksan - kloroform (1 : 1), n-heksana : etil asetat (1 : 1), n-heksan-etil asetat (2:8);	Pereaksi Lieberman-Burchad	Merah ungu (violet), coklat, ungu tua, hijau-biru dan merah
Steroid	n-heksana-etil asetat (7:3), n-heksana: etil asetat (4:1), n-	Pereaksi Lieberman-Burchad	Hijau, hijau kebiruan, jingga, orange hijau terang, hijau kekuningan,

	heksana : etil asetat (6:4), n-heksana : etil asetat (3,5:1,5), n-heksana : etil asetat (4,5:0,5)		hijau kecoklatan, ungu merah, ungu muda
Tanin	n-butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 5), n-butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 2), etanol : etil asetat (9 : 1), kloroform : metanol (7 : 3), n-heksana : etil asetat (6 : 4), etil asetat : metanol : asam asetat : air (6 : 14 : 1)	Pereaksi FeCl <sub>3</sub> 1%, Alumunium klorida 5%	ungu/lembayung, ungu muda kehitaman, coklat ungu, hijau biru dan biru hitam, hijau
Saponin	kloroform-metanol-air (20:60:10), n-heksana-aseton (4:1), kloroform-metanol-air (13:7:2), heksana : aseton (4:1), kloroform : metanol : air (3 : 1 : 0,1), kloroform : etil asetat (1:1)	Disemprot dengan pereaksi SbCl <sub>3</sub> dalam asam asetat, dan dengan pereaksi Lieberman Burchard	Ungu – ungu gelap, kuning, hijau – biru,

### Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan

#### L.3.1 Pembuatan larutan HCl 1N

$$\begin{aligned}
 \text{BJ HCl pekat} &= 1,19 \text{ g/ml} = 1190 \text{ g/L} \\
 \text{Konsentrasi} &= 37\% \\
 \text{BM HCl} &= 36,42 \text{ g/mol} \\
 \text{N} &= 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+) \\
 \text{Normalitas} &= n \times \text{Molaritas HCl} \\
 &= 1 \times \frac{37\% \times \text{BJ HCl}}{\text{BM HCl pekat}} \\
 &= \frac{37\% \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}} = 12,09 \text{ N} \\
 N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\
 12,09 \text{ N} \times V_1 &= 1 \text{ N} \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 0,827 \text{ mL} = 0,83 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 8,3 mL di dalam lemari asam menggunakan pipet ukur 10 mL, kemudian larutan 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 %

$$\begin{aligned}
 M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\
 37\% \times V_1 &= 2\% \times 10 \text{ mL} \\
 V_1 &= 0,5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Cara pembuatannya adalah dipipet larutan HCl pekat 37 % sebanyak 0,5 mL menggunakan pipet volume 0,5 mL dan pengambilannya di dalam lemari asam, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi ± 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.3.3 Pembuatan Reagen Vanilin-Asam Sulfat (Wagner, 1995)

1 % vanillin dalam etanol p.a (pelarut I)

10 % asam sulfat dalam etanol p.a (pelarut II)

Cara pembuatannya adalah ditimbang vanillin sebanyak 1 g kemudian diencerkan dengan etanol p.a 10 mL sampai tanda batas (pelarut I). Diambil 1 mL asam sulfat pekat kemudian diencerkan dengan etanol p.a 10 mL sampai tanda batas (pelarut II).

### L.3.4 Pembuatan Reagen Lieberman-Burchad (Wagner, 1995)

Asam sulfat pekat : 5 mL

Anhidrida asetat : 5 mL

Etanol absolute : 50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat diambil sebanyak 5 mL dengan pipet volume 5 mL dan pengambilannya dilakukan di dalam lemari asam. Setelah itu larutan asam sulfat tersebut dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL. Kemudian diambil larutan anhidrida asetat sebanyak 5 mL di dalam lemari asam dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi asam sulfat.

Selanjutnya diambil larutan etanol absolut 50 mL di dalam lemari asam dan dicampurkan ke dalam asam sulfat dan anhidrida. Kemudian ketiga campuran larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol kaca dan didinginkan di dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, dkk., 2001).

### L.3.5 Pembuatan Metanol 50 %

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 99,8 \% \times V_1 &= 50 \% \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8% sebanyak 5 mL di dalam lemari asam menggunakan pipet volume 5 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi  $\pm$  5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.3.6 Pembuatan $\text{FeCl}_3$ 1 %

$$\begin{aligned} \% \text{ konsentrasi} &= \frac{\text{g terlarut}}{\text{g terlarut} + \text{g pelarut}} \times 100 \% \\ \text{g terlarut} + \text{g pelarut} &= \frac{\text{g terlarut}}{\% \text{ konsentrasi}} \times 100 \% \\ 1 \text{ g} + \text{g pelarut} &= \frac{1 \text{ g}}{1 \%} \times 100 \% \\ \text{g pelarut} &= 100 \text{ g} - 1 \text{ g} = 99 \text{ g} \\ \text{volume pelarut} &= \frac{\text{g pelarut}}{\text{BJ pelarut}} = \frac{99 \text{ g}}{1 \text{ g/ml}} = 99 \text{ mL} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 1 g menggunakan neraca analitik dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL. Kemudian ditambahkan aquades sebanyak 99 mL untuk melarutkan serbuk tersebut dengan bantuan pengadukan.

### L.3.7 Pembuatan Larutan Ragi Roti

Cara pembuatannya adalah ditimbang ragi roti 2,5 mg dalam *beaker glass* kemudian diencerkan 5 mL air laut menggunakan pipet ukur 10 mL.

### L.3.8 Perhitungan Konsentrasi Larutan Ekstrak Untuk Uji Sitotoksisitas

#### a. Pembuatan Larutan Stok 10000 ppm Ekstrak Daun Bunga Matahari

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

$$\text{mg} = \text{ppm} \cdot \text{L} \text{ (jika dibuat larutan stok } 10 \text{ mL} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L)}$$

$$= 10000 \text{ ppm} \cdot 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 100 \text{ mg}$$

Jadi, larutan stok 10000 ppm pada masing-masing ekstrak dibuat dengan melarutkan 100 mg sampel ke dalam 10 mL masing-masing pelarutnya.

#### b. Pembuatan Larutan Ekstrak 1000 ppm

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

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 1000 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 1000 ppm dibuat dengan mengambil 1000  $\mu\text{L}$  larutan stok dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian dilarutkan dalam 10 mL air laut.

**c. Pembuatan Larutan Ekstrak 100 ppm**

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} &= 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 100 \text{ ppm} \\ V_1 &= 10 \cdot 10^{-1} \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm} \\ V_1 &= 10 \cdot 10^{-5} \text{ L} = 100 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Jadi, larutan ekstrak 100 ppm dibuat dengan mengambil 100  $\mu\text{L}$  larutan stok dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian dilarutkan dalam 10 mL air laut.

**d. Pembuatan Larutan Ekstrak 80 ppm**

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} &= 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 80 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,8 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,8 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 80 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Jadi, larutan ekstrak 80 ppm dibuat dengan mengambil 80  $\mu\text{L}$  larutan stok dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian dilarutkan dalam 10 mL air laut.

**e. Pembuatan Larutan Ekstrak 40 ppm**

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

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 40 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,4 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,4 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 40 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 40 ppm dibuat dengan mengambil 40  $\mu\text{L}$  larutan stok dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian dilarutkan dalam 10 mL air laut.

**f. Pembuatan Larutan Ekstrak 20 ppm**

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

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 20 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,2 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 20 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 20 ppm dibuat dengan mengambil 20  $\mu\text{L}$  larutan stok dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian dilarutkan dalam 10 mL air laut.

**g. Pembuatan Larutan Ekstrak 10 ppm**

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

$$V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,1 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 10 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 10 ppm dibuat dengan mengambil 10  $\mu\text{L}$  larutan stok dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian dilarutkan dalam 10 mL air laut.

#### h. Pembuatan Larutan Ekstrak 1 ppm

$$\begin{aligned}V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\V_1 \cdot 10000 \text{ ppm} &= 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 1 \text{ ppm} \\V_1 &= 0,01 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^4 \text{ ppm} \\V_1 &= 0,01 \cdot 10^{-4} \text{ L} = 1 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Jadi, larutan ekstrak 1 ppm dibuat dengan mengambil 1  $\mu\text{L}$  larutan stok dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian dilarutkan dalam 10 mL air laut.

#### Lampiran 4. Perhitungan Rendemen

##### 1. Ekstrak n-heksana

$$\begin{aligned}
 \text{Berat botol kosong} &= 89,01 \text{ g} \\
 \text{Berat botol kosong + ekstrak pekat} &= 91,459 \text{ g} \\
 \text{Berat ekstrak pekat} &= (\text{berat botol kosong + ekstrak}) - \text{berat} \\
 &\quad \text{botol kosong} \\
 &= 91,459 \text{ g} - 89,01 \text{ g} = 2,449 \text{ g} \\
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel awal}} \times 100 \% \\
 &= \frac{2,449 \text{ g}}{60 \text{ g}} \times 100 \% = 4,082 \%
 \end{aligned}$$

##### 2. Ekstrak diklorometan

$$\begin{aligned}
 \text{Berat botol kosong} &= 88,383 \text{ g} \\
 \text{Berat botol kosong + ekstrak pekat} &= 89,747 \text{ g} \\
 \text{Berat ekstrak pekat} &= (\text{berat botol kosong + ekstrak}) - \text{berat} \\
 &\quad \text{botol kosong} \\
 &= 89,747 \text{ g} - 88,383 \text{ g} = 1,364 \text{ g} \\
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel awal}} \times 100 \% \\
 &= \frac{1,364 \text{ g}}{60 \text{ g}} \times 100 \% = 2,273 \%
 \end{aligned}$$

##### 3. Ekstrak metanol

$$\begin{aligned}
 \text{Berat botol kosong} &= 90,188 \text{ g} \\
 \text{Berat botol kosong + ekstrak pekat} &= 94,901 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Berat ekstrak pekat} &= (\text{berat botol kosong} + \text{ekstrak}) - \text{berat} \\ &\quad \text{botol kosong} \\ &= 94,901 \text{ g} - 90,188 \text{ g} = 4,713 \text{ g}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel awal}} \times 100 \% \\ &= \frac{4,713 \text{ g}}{60 \text{ g}} \times 100 \% = 7,855 \%\end{aligned}$$



**Lampiran 5. Data Kematian Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Perhitungan Nilai LC<sub>50</sub> masing-masing ekstrak**

1. Ekstrak n-heksana

Konsentrasi	Jumlah <i>Artemia salina</i> yang mati				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	1	10
10	1	0	1	1	10
20	3	2	3	3	30
40	10	8	10	10	100
80	10	10	10	10	100
100	10	10	10	10	100
1000	10	10	10	10	100

Mortalitas	Jumlah hewan uji	Konsentrasi (ppm)
0	30	0
3	30	1
3	30	10
9	30	20
30	30	40
30	30	80
30	30	100
30	30	1000

**Probit Analysis: Mortalitas, Jumlah hewan versus Konsentrasi**

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	135
	Non-event	105
Jumlah hewan	Total	240

Estimation Method: Maximum Likelihood

\* NOTE \* 8 cases were used  
\* NOTE \* 1 cases contained missing values

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.07929	0.257235	-8.08	0.000

Konsentrasi 0.0937664 0.0129656 7.23 0.000  
 Natural  
 Response 0

Log-Likelihood = -43.005

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	11.6386	6	0.071
Deviance	10.3481	6	0.111

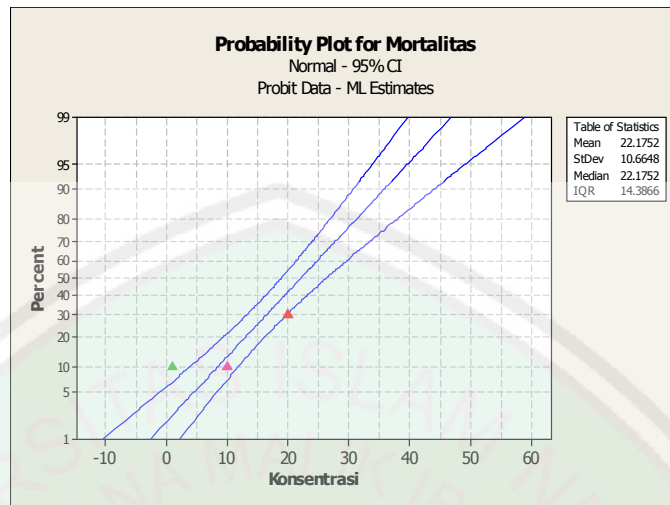
#### Tolerance Distribution

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	22.1752	1.81314	18.6215	25.7289
StDev	10.6648	1.47468	8.13304	13.9847

#### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-2.63481	3.04623	-10.4965	2.25886
2	0.272407	2.71291	-6.64554	4.68323
3	2.11694	2.51187	-4.22349	6.24269
4	3.50451	2.36751	-2.41557	7.42990
5	4.63320	2.25531	-0.955757	8.40639
6	5.59388	2.16410	0.277878	9.24644
7	6.43621	2.08781	1.35186	9.99067
8	7.19042	2.02275	2.30668	10.6638
9	7.87635	1.96651	3.16887	11.2823
10	8.50774	1.91744	3.95683	11.8572
20	13.1995	1.65464	9.59382	16.3476
30	16.5826	1.60725	13.3491	19.8948
40	19.4733	1.67270	16.3254	23.1583
50	22.1752	1.81314	18.9347	26.3812
60	24.8771	2.01400	21.4144	29.7337
70	27.7679	2.27767	23.9646	33.4232
80	31.1510	2.63019	26.8581	37.8322
90	35.8427	3.16886	30.7692	44.0486
91	36.4741	3.24443	31.2893	44.8913
92	37.1601	3.32717	31.8530	45.8082
93	37.9143	3.41888	32.4714	46.8179
94	38.7566	3.52213	33.1603	47.9471
95	39.7173	3.64087	33.9441	49.2370
96	40.8460	3.78156	34.8626	50.7548
97	42.2335	3.95611	35.9886	52.6240
98	44.0781	4.19049	37.4807	55.1134
99	46.9853	4.56440	39.8235	59.0460



## 2. Ekstrak Diklorometana

Konsentrasi	Jumlah Artemia salina yang mati				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	1	0
10	1	1	0	1	10
20	1	1	1	1	10
40	2	2	2	2	20
80	2	2	1	2	20
100	3	3	3	3	30
1000	5	5	6	5	50

Mortalitas	Jumlah hewan uji	Konsentrasi (ppm)
0	30	0
3	30	1
3	30	10
3	30	20
6	30	40
6	30	80
9	30	100
15	30	1000

## Probit Analysis: Mortalitas, Jumlah hewan versus Konsentrasi

Distribution: Normal

### Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	45
	Non-event	195
Jumlah hewan	Total	240

Estimation Method: Maximum Likelihood

### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.12683	0.112514	-10.01	0.000
Konsentrasi	0.0011829	0.0002624	4.51	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -105.653

### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	11.4929	6	0.074
Deviance	14.5027	6	0.024

### Tolerance Distribution

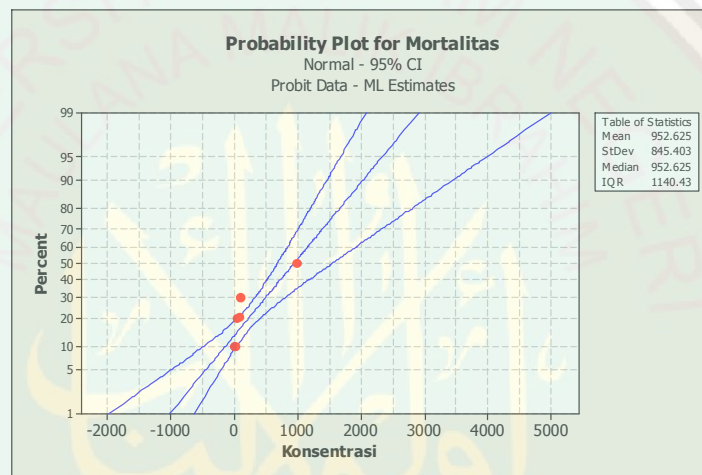
### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	952.625	183.353	593.260	1311.99
StDev	845.403	187.534	547.322	1305.82

### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-1014.08	284.660	-1982.88	-617.883
2	-783.619	236.191	-1580.43	-451.985
3	-637.403	206.104	-1326.44	-345.378
4	-527.409	183.998	-1136.46	-264.100
5	-437.938	166.490	-982.903	-197.004
6	-361.784	152.041	-853.157	-138.941
7	-295.012	139.823	-740.360	-87.0665
8	-235.226	129.345	-640.364	-39.6186
9	-180.853	120.293	-550.478	4.58989
10	-130.802	112.461	-468.866	46.4121
20	241.116	82.6127	67.4717	427.292
30	509.296	105.230	338.941	817.201
40	738.445	142.518	527.253	1194.01
50	952.625	183.353	690.148	1559.33

60	1166.81	226.803	847.580	1930.10
70	1395.95	274.783	1012.97	2329.83
80	1664.13	332.015	1204.36	2799.82
90	2036.05	412.444	1467.67	3453.73
91	2086.10	423.329	1502.98	3541.85
92	2140.48	435.166	1541.32	3637.61
93	2200.26	448.196	1583.45	3742.92
94	2267.03	462.763	1630.47	3860.58
95	2343.19	479.396	1684.06	3994.80
96	2432.66	498.959	1746.97	4152.53
97	2542.65	523.039	1824.26	4346.50
98	2688.87	555.093	1926.92	4604.44
99	2919.33	605.695	2088.57	5011.14



### 3. Ekstrak Metanol

Konsentrasi	Jumlah Artemia salina yang mati				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	10
10	2	2	2	2	20
20	3	3	3	3	30
40	3	3	3	3	30
80	3	3	3	3	30
100	3	3	3	3	30
1000	10	9	10	10	100

Mortalitas	Jumlah hewan uji	Konsentrasi (ppm)
0	30	0
3	30	1
6	30	10
9	30	20
9	30	40
9	30	80
9	30	100
30	30	1000

### Probit Analysis: Mortalitas, Jumlah hewan versus Konsentrasi

Distribution: Logistic

#### Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Success	75
	Failure	165
Jumlah hewan	Total	240

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.78915	0.261472	-6.84	0.000
Konsentrasi	0.0121013	0.0043862	2.76	0.006
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -105.393

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	10.8991	6	0.092
Deviance	14.6501	6	0.023

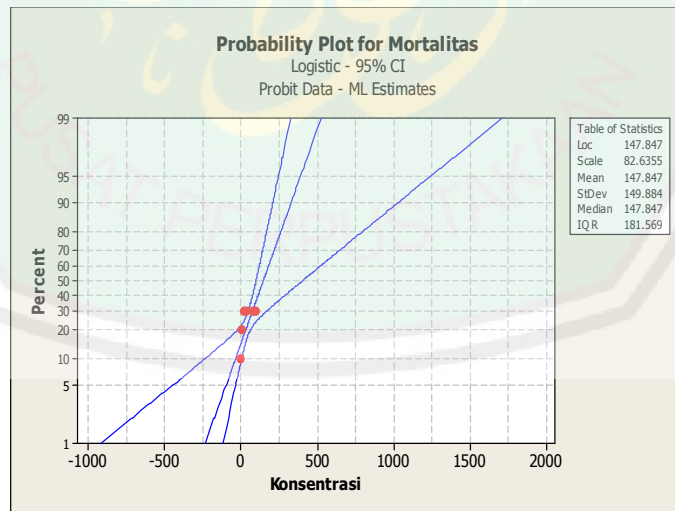
#### Tolerance Distribution

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	147.847	39.8702	69.7029	225.991
Scale	82.6355	29.9516	40.6111	168.147

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-231.873	101.356	-913.053	-114.914
2	-173.755	80.5513	-712.887	-80.4197
3	-139.402	68.3288	-594.719	-59.8794
4	-114.773	59.6244	-510.119	-45.0351
5	-95.4681	52.8537	-443.914	-33.2935
6	-79.5274	47.3125	-389.349	-23.4951
7	-65.9053	42.6271	-342.825	-15.0171
8	-53.9775	38.5762	-302.198	-7.48329
9	-43.3413	35.0189	-266.091	-0.645384
10	-33.7217	31.8613	-233.567	5.67233
20	33.2899	14.7871	-21.5407	64.2173
30	77.8302	18.4933	49.8598	172.656
40	114.341	28.8423	78.0119	291.924
50	147.847	39.8702	99.9559	405.266
60	181.353	51.4038	120.790	519.717
70	217.864	64.2288	142.957	644.970
80	262.404	80.0545	169.631	798.136
90	329.416	104.049	209.392	1028.95
91	339.035	107.504	215.078	1062.10
92	349.672	111.327	221.361	1098.76
93	361.599	115.616	228.401	1139.88
94	375.221	120.518	236.436	1186.85
95	391.162	126.258	245.831	1241.82
96	410.467	133.213	257.200	1308.40
97	435.096	142.092	271.693	1393.35
98	469.450	154.487	291.890	1511.86
99	527.567	175.474	326.023	1712.39



**Lampiran 6. Perhitungan Nilai Rf Hasil KLT masing-masing Ekstrak**

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak senyawa yang digerakkan dari titik asal}}{\text{Jarak pelarut yang digerakkan dari titik asal}}$$

6.1 Hasil KLT golongan senyawa steroid ekstrak n-heksana

a. Eluen n-heksana : etil asetat (4:1)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{1,25 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,17$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{4,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,57$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{1,65 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,21$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{5,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,65$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{2,2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,27$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{5,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,72$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,49$$

$$\text{Rf noda 8} = \frac{7,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,92$$

b. Eluen n-heksana : etil asetat (7:3)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{3,35 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,42$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{7,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,91$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,62$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{7,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,96$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{6,2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,77$$

c. Eluen n-heksana : etil asetat (6:4)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{6,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,85$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{7,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,92$$

d. Eluen n-heksana : etil asetat (3,5:1,5)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{4,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,57$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{6,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,82$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{7,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,94$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{7,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,99$$

e. Eluen n-heksana : etil asetat (4,5:0,5)

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{0,35 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,04$$

$$Rf \text{ noda } 5 = \frac{4,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,51$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{0,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,09$$

$$Rf \text{ noda } 6 = \frac{4,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,60$$

$$Rf \text{ noda } 3 = \frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,22$$

$$Rf \text{ noda } 7 = \frac{5,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,67$$

$$Rf \text{ noda } 4 = \frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,39$$

$$Rf \text{ noda } 8 = \frac{7,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,97$$

6.2 Hasil KLT golongan senyawa seskuiterpenoid ekstrak n-heksana

a. Eluen n-heksana : etil asetat (4:1)

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{1,5 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,18$$

$$Rf \text{ noda } 5 = \frac{6,9 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,81$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{2 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,23$$

$$Rf \text{ noda } 6 = \frac{7,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,89$$

$$Rf \text{ noda } 3 = \frac{3,9 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,46$$

$$Rf \text{ noda } 7 = \frac{8,2 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,96$$

$$Rf \text{ noda } 4 = \frac{5,7 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,67$$

b. Eluen n-heksana : diklorometan (4,8:0,2)

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{0,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,05$$

$$Rf \text{ noda } 4 = \frac{3,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,39$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{0,8 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,09$$

$$Rf \text{ noda } 5 = \frac{5,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,66$$

$$Rf \text{ noda } 3 = \frac{1,2 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,14$$

c. Eluen diklorometan : etil asetat (4,8:0,2)

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{1,1 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,13$$

$$Rf \text{ noda } 7 = \frac{6,1 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,72$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{2,1 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,25$$

$$Rf \text{ noda } 8 = \frac{7,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,86$$

$$Rf \text{ noda } 3 = \frac{2,8 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,33$$

$$Rf \text{ noda } 9 = \frac{7,7 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,91$$

$$Rf \text{ noda } 4 = \frac{3,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,40$$

$$Rf \text{ noda } 10 = \frac{7,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,89$$

$$Rf \text{ noda } 5 = \frac{4,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,54$$

$$Rf \text{ noda } 11 = \frac{8,1 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,95$$

$$Rf \text{ noda } 6 = \frac{5,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,63$$

d. Eluen benzena : methanol (9:1)

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{2,8 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,32$$

$$Rf \text{ noda } 4 = \frac{6,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,74$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{3,5 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,41$$

$$Rf \text{ noda } 5 = \frac{7,7 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,90$$

$$Rf \text{ noda } 3 = \frac{4,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,51$$

e. Eluen aseton : n-heksana (3:1)

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{1,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,19$$

$$Rf \text{ noda } 5 = \frac{5,3 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,62$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{2,1 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,25$$

$$Rf \text{ noda } 6 = \frac{6,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,78$$

$$Rf \text{ noda } 3 = \frac{2,5 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,32$$

$$Rf \text{ noda } 7 = \frac{7,4 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,87$$

$$Rf \text{ noda } 4 = \frac{3,8 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,45$$

$$Rf \text{ noda } 8 = \frac{7,7 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,91$$

## Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

### L.7.1 Preparasi Sampel



Proses pengeringan dengan dikering-anginkan

### L.7.2 Ekstraksi Maserasi



a. Proses perendaman sampel



b. Proses pengadukan menggunakan shaker



c. Hasil filtrat sampel

### L.7.3 Pemekatan Ekstrak



a. Maserat dalam labu alas bulat



b. Proses pemekatan dengan *rotary evaporator vakum*



c. ekstrak pekat n-heksan

### L.7.4 Uji Sitotoksik



a. Proses penetasan larva udang



b. Proses penguapan pelarut



c. Larva udang dalam botol pengujian

### L.7.5 Uji Fitokimia

#### L.7.5.1 Seskuiterpenoid



(+) ekstrak diklorometan



(+) ekstrak n-heksana

#### L.7.5.2 Triterpenoid

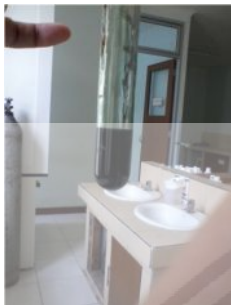


(+) ekstrak diklorometan



(+) ekstrak metanol

### L.7.5.3 Steroid



(+) Ekstrak n-heksana



(+) Ekstrak diklorometan



(+) ekstrak methanol

### L.7.6 Uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis)



Lampiran 8. Tabel Rencana Penelitian

No.	Rencana Penelitian	Bulan																							
		Oktober				November				Desember				Januari				Februari				Maret			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Proposal			■	■	■	■																		
2	Persiapan sampel							■	■																
3	Preparasi sampel									■															
4	Ekstraksi sampel									■	■	■	■												
5	Uji sitotoksik													■	■	■	■	■							
6	Uji Fitokimia dan KLT																	■	■	■	■	■	■		
7	Analisis Data																					■	■		
8	Pembuatan Laporan																	■	■	■	■	■	■	■	■