

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BENALU
MANGGA (*Dendrophthoe pentandra*) DARI BERBAGAI
DAERAH DI INDONESIA TERHADAP SEL VERO**

SKRIPSI

Oleh:
OLDEN MAYAZZAKA AMALIA
NIM. 13670025



**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2017**

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BENALU
MANGGA (*Dendrophthoe pentandra*) DARI BERBAGAI
DAERAH DI INDONESIA TERHADAP SEL VERO**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)**

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2017**

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BENALU MANGGA
(*Dendrophthoe pentandra*) DARI BERBAGAI DAERAH DI INDONESIA
TERHADAP SEL VERO**

SKRIPSI

Oleh:
OLDEN MAYAZZAKA AMALIA
NIM. 13670025

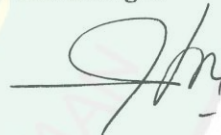
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 11 Juli 2017

Pembimbing I



Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt
NIP. 19800203 200912 2 001

Pembimbing II



Abdul Hakim, M.PL., Apt
NIP. 19761214 200912 1 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan Farmasi



Begum Fauziah, S.Si., M.Farm
NIP. 19830628 200912 2 004

**UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BENALU MANGGA
(*Dendrophthoe pentandra*) DARI BERBAGAI DAERAH DI INDONESIA
TERHADAP SEL VERO**

SKRIPSI

Oleh:
OLDEN MAYAZZAKA AMALIA
NIM. 13670025

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

Ketua Penguji : Burhan Ma'arif Z.A., M.Farm., Apt
NIDT. 19900221 201701011 124
Anggota Penguji
1. Weka Sidha B, M.Farm., Apt
NIDT. 19881124 20160801 1 085
2. Abdul Hakim, M.Pl., Apt
NIP. 19761214 200912 1 002
3. Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt
NIP. 19800203 200912 2 001

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

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Farmasi



Berum Farzilah, S.Si., M.Farm
NIP. 19830628 200912 2 004

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Olden Mayazzaka Amalia
NIM : 13670025
Jurusan : Farmasi
Fakultas : Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan
Judul Penelitian : Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 96% Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dari Berbagai Daerah di Indonesia terhadap Sel Vero

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

Malang, 16 Juni 2017

Yang Membuat Pernyataan,



Olden Mayazzaka Amalia
NIM. 13670025

KATA PENGANTAR



Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian yang berjudul **“Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 96% Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dari Berbagai Daerah di Indonesia Terhadap Sel Vero”** ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhai Allah SWT. Penelitian ini merupakan salah satu syarat menyelesaikan program S1 di Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Seiring terselesaikannya penyusunan penelitian ini, dengan penuh kesungguhan dan kerendahan hati, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Bapak Bambang Pardjianto, Sp. B., Sp.BP-RE (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, UIN Maliki Malang.
3. Ibu Begum Fauziah, S.SI., M.Farm, selaku Ketua Jurusan Farmasi, UIN Maliki Malang.
4. Ibu Roihatul Muti'ah, M.Kes, Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat serta bantuan materil maupun moril kepada penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.
5. Bapak Burhan Ma'arif Z.A, M.Farm, Apt selaku konsultan yang telah meluangkan waktu untuk membimbing saya demi terselesainya penelitian ini.
6. Bapak Abdul Hakim, M.PI, Apt selaku Pembimbing Agama yang telah memberikan masukan dan nasehat kepada saya.
7. Bapak Weka Sidha Bhagawan, M.Farm, Apt selaku Penguji Utama yang bersedia menguji dan memberikan arahan kepada saya.

8. Semua keluargaku yaitu Ayahku, Sumali dan Ibuku, Ainin yang senantiasa mendoakan dan memberi dukungan dalam segala bentuk yang tak mungkin terbalaskan. Adik-adikku, Muhammad Shofana Alwi Sofwan dan Fridinov Nazwa Zahrafillah yang telah memberi dukungan dan mengisi hidup dengan penuh kasih sayang dan canda.
9. Para Dosen Pengajar di Jurusan Farmasi yang telah memberikan bimbingan dan membagi ilmunya kepada penulis selama berada di UIN Maliki Malang.
10. Teman-teman Farmasi angkatan 2013 khususnya Tim Penelitian *D. Pentandra* dan Antikanker (Atina, Astri, Trian dan Faiq) yang telah berbagi kebersamaannya dalam senang maupun susah, sehingga tetap terjaga persaudaraan kita.
11. Sahabat serta teman-teman Farmasi angkatan 2013 (Golfy) yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas segala bantuannya kepada penulis.

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

Malang, 7 Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Daftar Gambar	iv
Daftar Tabel	v
Abstrak	vi
Abstract	vii
الملخص	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.5 Batasan Masalah	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL	28
3.1 Bagan Kerangka Konseptual	28
3.2 Uraian Kerangka Konseptual	29
3.3 Hipotesis Penelitian	30
BAB IV. METODE PENELITIAN	31
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	31
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	32
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	32
4.4 Alat dan Bahan Penelitian	34
4.5 Prosedur Penelitian	35
4.6 Analisis Data	41
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	42
BAB VI. PENUTUP	61
6.1 Kesimpulan	61
6.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Benalu mangga (<i>Dendrophthoe pentandra</i>)	13
Gambar 2.2 Struktur Senyawa Quersetin	15
Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual	29
Gambar 5.1 Daun dan bunga <i>D. pentandra</i> yang diidentifikasi	43
Gambar 5.2 Hasil preparasi sampel	45
Gambar 5.3 Ekstraksi.....	49
Gambar 5.4 96 well plate setelah ditambahkan MTT.....	53
Gambar 5.5 Grafik nilai % viabilitas sel hidup tiap konsentrasi larutan uji.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 karakteristik lokasi pengambilan sampel daun <i>D. pentandra</i>	24
Tabel 4.1 <i>Well-plate mapping</i> untuk uji toksisitas ekstrak etanol <i>D. pentandra</i>	40
Tabel 5.1 Kadar air tiap sampel dengan menggunakan moisture analyzer.....	47
Tabel 5.2 Hasil ekstraksi ultrasonik ekstrak etanol 96 % daun <i>D. pentandra</i>	48
Tabel 5.3 Hasil uji korelasi pearson antara rendemen dan nilai LC ₅₀	49
Tabel 5.4 % Rata-rata viabilitas sel hidup pada tiap konsentrasi larutan uji	54
Tabel 5.5 Rata-rata nilai CC50 ekstrak etanol <i>D. pentandra</i> terhadap sel vero	55
Tabel 5.6 Karakteristik lokasi pengambilan sampel	56
Tabel 5.7 Hasil uji one way ANOVA	58

ABSTRAK

Amalia, O. M. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 96% Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dari Berbagai Daerah di Indonesia terhadap Sel Vero.

Pembimbing : (I) Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes, Apt
(II) Abdul Hakim, M.PI, Apt

Berbagai jenis benalu dapat ditemukan di Indonesia, salah satu tanaman benalu yang memiliki potensi antikanker adalah benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan toksisitas ekstrak etanol 96% daun benalu mangga dari daerah Kediri, Jatim; Pekalongan, Jateng; Denpasar, Bali; Gunung Batin Baru, Lampung dan Selor Hilir, Kaltara terhadap *cell line* normal (vero). Pemilihan kelima daerah berdasarkan elevasi tempat tumbuh tanaman uji.

Ekstraksi ultrasonik dilakukan untuk memisahkan senyawa aktif daun benalu mangga. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi adalah etanol 96%. Masing-masing ekstrak diuji toksisitasnya terhadap sel vero dengan menggunakan metode MTT (*microculture tetrazolium salt*). Sel yang hidup akan membentuk kristal formazan berwarna ungu dan dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA reader untuk mengetahui presentase sel hidup.

Hasil dari penelitian ini adalah didapatkan nilai LC_{50} dari daerah Jawa Timur, Jawa Tengah, Sumatra dan Kalimantan secara berturut-turut 26.61; 1583.75; 4845.32 dan 798.28 $\mu\text{g/ml}$. Analysis data yang dilakukan dengan menggunakan one way ANOVA menunjukkan bahwa kadar toksisitas antar daerah memiliki perbedaan yang bermakna.

Kata Kunci: Benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*), uji toksisitas, sel vero, uji MTT

ABSTRACT

Amalia, O. M. 2017. Toxicity Test of Ehanol Extract 96% Malayan Mistletoe Leaf (*Dendrophthoe pentandra*) from Various Regions in Indonesia Against Vero Cells.

Advisors: (I) Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes, Apt
(II) Abdul Hakim, M.PI, Apt

Different types of benalu can be found in Indonesia, one of benalu that has anticancer potency is Malayan Mistletoe (*Dendrophthoe pentandra*). This study aims to determine the difference of toxicity of ethanol extract 96% Malayan mistletoe leaf from Kediri, East Java; Pekalongan, Central Java; Denpasar, Bali; Gunung Batin Baru, Lampung and Selor Hilir, Kaltara towards normal cell line (vero). Selection of the five regions based on the elevation where the plant grows.

Ultrasonic extraction is performed to separate the active compound of Malayan mistletoe leaf. The solvent used in the extraction is 96% ethanol. Each extract tested its toxicity using vero cell done by MTT method (microculture tetrazolium salt). The living cells form crystals of purple formazan and absorbance readings are performed using ELISA reader to determine the percentage of living cells.

The results obtained from this research are LC50 values from East Java, Central Java, Sumatra and Kalimantan respectively 26.61; 1583.75; 4845.32 and 798.28 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The data analysis conducted by using one-way ANOVA showed that toxicity levels between regions have a significant difference.

Keywords: Malayan Mistletoe (*Dendrophthoe pentandra*), toxicity test, vero cell, MTT test

الملخص

عملية، ألدن. م. 2017. التجربة السمية في 96% من استخراج الإيثانول لأوراق منغا الطفيلية من المناطق المختلفة بإندونيسيا عن خلية فيرو. المشرفان: (1) الدكتور رائحة المطيعة الماجستير (2) لودب اهاك يم. الماجستير

أنواع مختلفة من الطفيليات يمكن العثور عليها في اندونيسيا، واحدة من الطفيليات التي لديها فعالية المضادة للسرطان هي طفيلية مانغا (ديندروفثو بنتاندر). ويهدف هذا البحث لتحديد الأنواع السمية في 96% من استخراج الإيثانول لأوراق منغا الطفيلية من كيديري، جاوة الشرقية. بيكالونغان، جاوا الوسطى؛ دنباسار، بالي؛ جبل باتين الجديد، لامبونج وسيلور هيلير، شمال كاليمانتان نحو خط الخلية الطبيعية (فيرو). اختيار هذه المناطق الخمسة على أساس الارتفاع ديندروفثو بنتاندر. يتم تنفيذ الاستخراج بالموجات فوق الصوتية لفصل مركب نشط من أوراق الطفيليات المانجو. المذيب المستخدمة في استخراج هو 96% من الإيثانول. كل البحث عن سميتها باستخدام الخلية العادية (فيرو) التي قامت بها طريقة (الثقافية الصغرى التيترازوليومية). وتشكل الخلية الحية الأرجواني فورمازان وقابلية الامتصاص باستخدام "إيسا" لتحديد النسبة المئوية للخلايا الحية من خلية فيرو. يتم الحصول على نتيجة هذا البحث في قيمة LC50 من جاوة الشرقية وجاوة الوسطى وسومطرة وكاليمانتان على التوالي 26.61؛ 1583.75؛ 4845.32؛ و 798.28 ميكروغرام. وأظهر تحليل البيانات التي أجريت باستخدام طريقة واحدة "أنوفا" أن مستويات السمية بين المناطق لها فرق كبير

الكلمة الرئيسية: أوراق منغا الطفيلية، التجربة السمية، خلية فيرو، الثقافية الصغرى التيترازوليومية

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bangsa Indonesia telah lama mengenal dan menggunakan tumbuhan obat sebagai salah satu upaya dalam menanggulangi masalah kesehatan. Pengetahuan tentang tumbuhan obat berdasar pada pengalaman dan keterampilan yang secara turun temurun telah diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Penggunaan obat tradisional di Indonesia merupakan bagian dari budaya bangsa dan banyak dimanfaatkan oleh masyarakat, namun pada umumnya efektivitas dan keamanannya belum sepenuhnya didukung oleh penelitian. Padahal sumber daya alam berupa tumbuhan obat merupakan aset nasional yang perlu digali, diteliti, dikembangkan dan dioptimalkan pemanfaatannya (Depkes, 2007).

Firman Allah SWT dalam surah As-Syu'araa' (26) ayat 7 menjelaskan tentang penciptaan tumbuhan yang bermacam-macam:

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

Artinya : “ Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik.”

Maha Besar Allah SWT yang menciptakan alam beserta isinya seperti langit, bumi, manusia, hewan dan tumbuhan. Tidaklah sia-sia segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT, setiap hal yang diciptakanNya baik itu besar ataupun kecil, lapang maupun sempit mengandung hikmah-hikmah tertentu. Manusia adalah khalifah di muka bumi ini, jadi manusia memiliki hak untuk memanfaatkan

segala sesuatu yang ada di bumi baik hewan ataupun tumbuhan. Ilmu pengetahuan sangatlah penting, darinya manusia mampu untuk bersyukur, mengambil hikmah dan mengetahui kebesaran Allah SWT. Menurut Quthb, (2008) dalam tafsir Fi Zhilalil Qur'an tumbuh-tumbuhan itu mulia dengan segala kehidupan yang ada di dalamnya yang bersumber dari Allah SWT. Ungkapan ini mengisyaratkan kepada manusia untuk menerima dan merespon ciptaan Allah dengan sikap yang memuliakan, memperhatikan, dan memperhitungkannya.

Berbagai jenis tumbuhan yang tumbuh di bumi dapat dimanfaatkan sebagai obat, obat tersebut tidak akan diketahui oleh manusia jika tidak benar-benar memikirkannya. Berdasarkan hal tersebut manusia mulai berusaha mencari dan menemukan obat dari suatu penyakit. Bentuk usaha yang dilakukan oleh manusia dalam menemukan obat adalah dengan eksplorasi senyawa aktif dari tumbuhan ciptaan Allah SWT.

Meskipun obat tradisional (jamu) merupakan warisan leluhur yang telah turun temurun dan keampuhan khasiatnya telah teruji oleh waktu, tetap saja resep leluhur itu harus menggunakan takaran bahan yang tepat. Bila tidak, maka akan menimbulkan efek yang berbahaya. Jadi tidak ada jamu yang 100% aman. Melihat semakin maraknya peredaran jamu di masyarakat, maka pemerintah pun perlu melakukan penataan guna perlindungan konsumen. Menurut Govindaraghavan dan Sucher (2015) banyak negara yang telah menetapkan peraturan untuk mengatur berbagai macam proses pembuatan jamu.

Berbagai lembaga penelitian mulai tertarik untuk menyelidiki obat-obatan herbal, baik yang sering dikonsumsi masyarakat maupun yang sama sekali belum

pernah dikonsumsi. Penelitian dimulai dari identifikasi senyawa aktif dari berbagai bagian tumbuhan sampai uji aktifitas dan uji toksisitas atau keamanan dosis obat herbal. Sebagian besar penelitian dilakukan dengan menggunakan hewan coba (Thomas, 2011; Flower *et al.*, 2012).

Salah satu tumbuhan yang digunakan masyarakat sebagai obat tradisional adalah benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*). *Dendrophthoe pentandra* (*D. pentandra*) adalah salah satu spesies tumbuhan dari *family* Loranthaceae. Tumbuhan ini banyak didistribusikan di Cina, Kamboja, Indonesia, India, Laos, Myanmar, Filipina, Thailand dan Vietnam (Qiu dan Gilbert, 2003).

Benalu merupakan tumbuhan semiparasit yang tersebar pada daerah tropis yang tumbuh pada cabang pohon mangga yang sudah tua sebagai inangnya. *D. pentandra* umumnya hidup di hutan hujan dan perkebunan dataran rendah sampai ketinggian 500 m dari permukaan laut (Uji *et al.*, 2007). Benalu merupakan kelompok parasit yang awalnya dianggap tidak bermanfaat, hal ini berkaitan dengan sifat parasit benalu yang dapat merusak tumbuhan inang. Namun ternyata benalu memiliki banyak manfaat, diantaranya sebagai batuk, diabetes, hipertensi, kanker, diuretik, cacar, maag, infeksi kulit dan pengobatan setelah melahirkan (Artanti *et al.*, 2012). Masyarakat daerah Sulawesi menggunakan *D. pentandra* sebagai obat antikanker (Ishizu *et al.*, 2002).

Nilai guna *D. pentandra* adalah bubur daun untuk mengobati luka pedih, bernanah dan luka infeksi pada kulit. Air rebusan semua bagian tumbuhan bila diminum dapat mengobati hipertensi dan apabila dicampur dengan minuman teh dapat meredakan batuk (Valkenburg, 2003). Bisa juga untuk pengobatan

gangguan kelenjar prostat. Untuk mengobati gangguan kelenjar prostat, cara pengobatannya cukup mudah yaitu dengan merebus 9 lembar daun *D. pentandra* dengan 2 liter air sampai tersisa setengahnya saja dan yang terakhir saring ramuan tersebut. Pengobatan ini juga bermanfaat untuk buang air kecil tidak lancar dan nyeri pinggang (Eddy, 2010).

D.pentandra juga memiliki aktivitas antiplasmodium, didapatkan nilai IC_{50} *D.pentandra* adalah 45,4 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak air dan 169,7 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak etanol (Budi *et al.*, 2016). Suatu ekstrak dianggap berpotensi untuk dikembangkan sebagai terapi antimalaria jika memiliki IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$ (Syarif *et al.*, 2010). Etil asetat dan methanol ekstrak dari *D.pentandra* efektif terhadap sel kanker MCF-7 dengan nilai IC_{50} 14,42 dan 17,7 $\mu\text{g/mL}$ (Syazana *et al.*, 2015).

Kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak benalu adalah flavonoid, asam amino, karbohidrat, tannin, alkaloid dan saponin (Katrin, 2005). Menurut Syazana *et al.*, (2004) ekstrak metanol dari *D. pentandra* mengandung alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid dan saponin. Flavonoid utama yang terdapat pada benalu dan berfungsi sebagai antikanker adalah senyawa kuersetin. *D. pentandra* memiliki kadar kuersetin lebih tinggi yaitu sebesar 39,8 mg/g dibandingkan dengan kadar benalu teh yang hanya 9,6 mg/g (Endharti *et al.*, 2013).

Kuersetin merupakan senyawa turunan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi dan antikanker, dan yang merupakan inhibitor sitokrom P450 3A4 dan modulator dari ABCB1 (Alexander *et al.*, 2014). Dalam penelitian Srivastava *et al.*, (2016) isolat quercetin memiliki efek toksisitas terhadap *cell line* Nalm6, K562 dan CEM dengan IC_{50} sebesar 20, 40 dan 55

$\mu\text{g/mL}$. Dengan kuersetin sebagai senyawa marker aktif antikanker maka *D. pentandra* bisa dijadikan alternatif pengobatan bagi pasien penderita kanker.

Dalam penelitian Syazana *et al.*, (2004) dilakukan uji toksisitas terhadap *D. pentandra* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil uji menunjukkan nilai terendah LC_{50} 2.74 ± 1.23 ppm dalam ekstrak methanol *D. pentandra*. Sedangkan ekstrak metanol dan air memiliki nilai LC_{50} 4.50 ± 0.87 ppm dan 251.22 ± 1.93 ppm. Standar uji BSLT menetapkan bahwa nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm dianggap bioaktif dalam evaluasi toksisitas ekstrak tumbuhan.

Tumbuhan *D.pentandra* digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional atau dikenal sebagai jamu perlu ditinjau kembali. Sebab menurut BPOM, (2011) terdapat beberapa obat tradisional yang tidak dipergunakan lagi untuk pengobatan karena memberikan efek yang tidak diinginkan. Selain itu, obat bahan alam dapat mengandung khasiat senyawa yang toksik. Jamu yang baik mempunyai toksisitas selektif, dengan kata lain mampu menimbulkan efek terapi tanpa merusak sel jaringan normal.

Berdasarkan pernyataan ini, penulis akan melakukan uji toksisitas *D. pentandra* terhadap sel vero (sel normal) secara *in vitro*. Sel vero digunakan sebagai kontrol positif yang mewakili sel normal pada tubuh manusia (Philips, 2013). Sel vero sering dipakai dalam penelitian uji toksisitas karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan dalam replikasi yang tidak terbatas dan mudah diganti *frozen stok* jika terjadi kontaminasi (Nor *et al.*, 2010). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keamanan ekstrak *D.pentandra* terhadap

sel normal. Salah satu metode uji toksisitas adalah *microculture tetrazolium salt* (MTT) *assay* yang mana merupakan suatu metode pengujian untuk melihat kemampuan mitokondria dalam sel hidup untuk memetabolisme senyawa 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide menjadi kristal formazan yang berwarna ungu. Dari metode MTT *assay* akan didapatkan nilai LC₅₀, nilai ini menunjukkan konsentrasi yang dapat mengakibatkan kematian dari 50% sel percobaan.

D. pentandra yang digunakan diambil dari lima daerah yang berbeda, yaitu dari Lampung Tengah (Sumatra), Bulungan (Kalimantan), Denpasar (Bali), Kediri (Jawa Timur) dan Pekalongan (Jawa Tengah). Pemilihan kelima lokasi berdasarkan perbedaan elevasi tempat tumbuh *D. pentandra*. Lampung Tengah berelevasi 27 m dpl, Bulungan berelevasi 80 m dpl, Denpasar berelevasi 51 m dpl, Kediri berelevasi 222 m dpl, Pekalongan berelevasi 8 m dpl. Faktor lingkungan mempengaruhi kualitas *phytomedicine* seperti perbedaan lokasi tempat tumbuh, temperatur, lamanya terpapar sinar matahari, dan curah hujan (Kim *et al.*, 2011). Penelitian ini diharapkan dapat membuktikan bahwa ekstrak etanol dari *D. pentandra* tidak banyak merusak sel normal serta dapat diperoleh informasi tentang sampel dari daerah manakah yang paling aman untuk digunakan sebagai terapi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka masalah dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Apakah ada perbedaan toksisitas ekstrak etanol *D. pentandra* dari berbagai daerah terhadap sel vero?
2. Manakah tumbuhan yang memiliki toksisitas rendah di bandingkan yang lain jika dilihat dari nilai LC_{50} ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka dapat disimpulkan bahwa tujuan dari penelitian ini diantaranya adalah:

1. Untuk mengetahui perbedaan toksisitas ekstrak etanol *D. pentandra* dari berbagai daerah terhadap sel vero.
2. Untuk mengetahui tumbuhan mana yang memiliki toksisitas paling rendah di bandingkan yang lain jika dilihat dari nilai LC_{50} .

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan membawa manfaat antara lain :

1. Memberikan informasi tentang toksisitas dari tumbuhan *D. pentandra*.
2. Memberikan informasi ilmiah dengan membandingkan toksisitas ekstrak *D. pentandra* dari kondisi lingkungan tumbuh yang berbeda.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Sampel yang digunakan adalah daun *D. pentandra* yang diambil dari daerah Sumatra, Kalimantan, Jawa Timur, Jawa Tengah dan Bali.

2. Ekstraksi dengan metode ultrasonik menggunakan pelarut etanol 96%.
3. Uji toksisitas secara *in vitro* terhadap *cell line* normal yaitu sel vero dilakukan dengan menggunakan metode MTT.
4. Tingkat toksisitas ditunjukkan dengan nilai LC_{50} yang diukur menggunakan *Microsoft excel*.
5. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan toksisitas ekstrak *D. pentandra* yang diambil dari lima daerah yang berbeda dengan menggunakan *One-way ANOVA*.
6. Penelitian ini membahas tentang sampel dari daerah manakah yang memiliki toksisitas paling rendah.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*)

Benalu tergolong tumbuhan parasit (parasitisme) yang hidupnya bergantung pada tumbuhan induknya. Hasil interaksi benalu dengan inangnya sangat mempengaruhi kehidupan dan kandungan senyawa organik benalu. Oleh masyarakat, benalu dikenal dengan berbagai nama atau sebutan local, seperti pasilam, kemledeyan, api-api di sumatera, dedalu dan menendeuh di sunda. Benalu seringkali diberi nama tambahan sesuai dengan nama inangnya (Junaedi, 2003).

Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini tidak sia-sia. Setiap makhluk diciptakan dengan tujuan dan manfaat untuk kehidupan manusia. Tidak terkecuali pada tumbuhan benalu yang hidupnya merugikan tumbuhan inangnya. Semua ciptaan Allah SWT tersebut dapat dimanfaatkan oleh manusia jika manusia mau berfikir. Semua yang ada di alam semesta ini memberikan manfaat kepada manusia, seperti matahari, bulan, langit, lautan, gunung, hewan-hewan, tumbuh-tumbuhan dan lain sebagainya. Dalam Al-qur'an banyak disebutkan tentang tumbuh-tumbuhan untuk dimanfaatkan oleh manusia. Firman Allah dalam surah Thahaa (20):53

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

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

Menurut tafsir al-Maraghi (1992), Surah Thahaa ayat 53 menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air hujan dari langit, dengan air hujan itu Allah SWT mengeluarkan atau menumbuhkan berbagai macam jenis tumbuhan dengan berbagai macam manfaat, aroma, warna dan bentuk. Sebagiannya cocok untuk umat manusia dan sebagiannya cocok untuk hewan. Ini merupakan nikmat dari Allah SWT yang diberikan kepada setiap makhluk ciptaanNya. Maha Besar Allah yang mengatur alam semesta sedemikian rupa.

Kekuasaan Allah SWT dapat dilihat dari berbagai macam modifikasi tumbuh-tumbuhan sesuai dengan berbagai kondisi lingkungan. Semua tumbuhan yang tumbuh di bumi ini memiliki ciri khas masing-masing, dapat dilihat dari susunan dan bentuk luar yang berbeda antara satu tumbuhan dengan tumbuhan lainnya. Manfaat segala macam jenis tumbuhan yang diciptakan oleh Allah SWT merupakan bentuk kekuasaan dan kebesaran Allah SWT terhadap makhluknya dimana semuanya dapat dimanfaatkan oleh manusia jika manusia itu mau berfikir.

Saat ini banyak dilakukan penelitian untuk mendapatkan alternatif pengobatan dengan menggunakan bahan-bahan alami yaitu dengan memanfaatkan sesuatu yang sebelumnya tidak bermanfaat menjadi sesuatu yang bermanfaat yaitu benalu. Tumbuhan yang selama ini dianggap pengganggu dan selalu dibuang seperti *D.pentandra* ternyata memiliki manfaat sebagai agen antikanker, antioksidan, dan antidiabetes dari bahan alam (Artanti *et al.*, 2012).

Benalu merupakan kelompok tumbuhan parasit. Tumbuhan ini terdiri dari dua suku yaitu suku Loranthaceae dan Viscaceae. Kedua suku ini dapat dibedakan terutama berdasarkan perbedaan morfologi bunga dan buahnya. Loranthaceae mempunyai perhiasan bunga diklamid, buahnya dilapisi oleh lapisan lekat yang terletak diluar ikatan pembuluh. Sedangkan pada Viscaceae, perhiasan bunganya monoklamid dan buahnya dilapisi oleh lapisan lekat yang terletak didalam ikatan pembuluh (Uji and Samiran, 2005).

D.pentandra tumbuh tersebar di berbagai negara seperti Cina, Kamboja, India, Indonesia, Laos, Malaysia, Myanmar, Filipina, Thailand, dan Vietnam. Di Indonesia tumbuhan *D.pentandra* dimanfaatkan sebagai obat batuk, diabetes, hipertensi, kanker, diuretik, cacar, maag, infeksi kulit dan pereda nyeri setelah melahirkan (Uji *et al.*, 2007).

D.pentandra memiliki aktivitas antiplasmodium, didapatkan nilai IC_{50} *D.pentandra* adalah 45,4 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak air dan 169,7 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak etanol (Budi *et al.*, 2016). Suatu ekstrak dianggap berpotensi untuk dikembangkan sebagai terapi antimalaria jika memiliki IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$ (Syarif *et al.*, 2010). Etil asetat dan methanol ekstrak dari *D.pentandra* efektif terhadap sel kanker MCF-7 dengan nilai IC_{50} 14,42 dan 17,7 $\mu\text{g/mL}$ (Syazana *et al.*, 2015).

Pada penelitian sebelumnya dilakukan uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada tumbuhan *D. pentandra*. Data yang diperoleh berupa ekstrak methanol dan air daun *D. pentandra* memiliki $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *D.pentandra* aman dan layak untuk dikonsumsi. Oleh karena itu *D.pentandra* bisa dijadikan pengobatan alternatif pada penderita

kanker karena BSLT biasanya digunakan untuk skrining awal penentuan bioaktivitas agen antikanker (Artanti *et al.*, 2012).

2.1.1 Klasifikasi Tumbuhan

Salah satu spesies benalu adalah *Dendrophthoe pentandra* atau dikenal sebagai benalu mangga, klasifikasi benalu manga sebagai berikut:

Divisio: Spermatophyta

Subdivisio: Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Bangsa: Loranthales

Suku : Loranthaceae

Marga : Dendrophthoe

Jenis : Dendrophthoe pentandra (L) Mig

(Samiran, 2005)

2.1.2 Morfologi Tumbuhan

Nama ilmiah benalu mangga adalah *Dendrophthoe pentandra* yang termasuk dalam *family* Loranthaceae. Adapun karakteristik dari tumbuhan ini adalah batang agak tegar, gundul kecuali pada pucuk-pucuk muda. Daun tersebar atau sedikit berhadapan, menjorong, panjang 6-13 cm dan lebar 1,5-8 cm, pangkal menirus-membaji, ujung tumpul-runcing, panjang tangkai daun 5-20 mm. perbungaan pada ruas-ruas, tandan dengan 6-12 bunga. Mahkota bunga 5 meruas, menyudut atau bersayap dibagian bawah dan menyempit dibagian leher, dibagian ujung menggada dan tumpul, hijau atau kuning-orange, panjang tabung bunga 6-12 mm. kepala sari panjang 2-5 mm dan tumpul (Samiran, 2005).



Gambar 2.1 Benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) (Samiran, 2005)

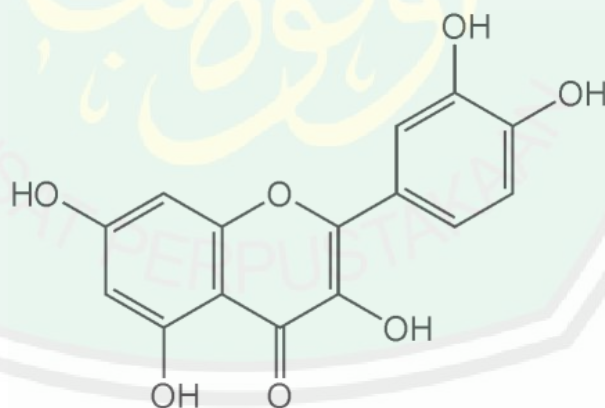
2.1.3 Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder

D. pentandra secara umum mengandung flavonoid, saponin, alkaloid, karbohidrat, tanin, asam amino (Ikawati *et al.*, 2008), Kuinolon, steroid dan triterpenoid (Fajriah *et al.*, 2007). Kuersetin merupakan suatu senyawa flavonol glikosida 5 yang menjadi marker aktif dari keluarga Loranthaceae (Ikawati *et al.*, 2008), senyawa 3,5,7,3',4'-pentahidroksi-flavon telah diisolasi dari ekstrak methanol dan 3,5,7,3',4'-pentahidroksi-6prenil flavonol dari ekstrak etil asetat benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) (Nurhasanah, 2001). Senyawa golongan steroid (β -sitosterol) diperoleh dari isolate fraksi n-heksan dan flavonoid kuersetin diperoleh dari hasil isolasi fraksi etanol (Katrina *et al.*, 2005).

Hasil isolasi dari fraksi heksan: etil asetat ekstrak etanol benalu *Dendrophthoe pentandra* (L) Mig. Menunjukkan bahwa terdapat kuersetin 3-O-rhamnosida yang merupakan senyawa flavonol mempunyai aktivitas penangkap radikal bebas dengan IC_{50} 5,19 μ g/mL. Aktivitas antiradikalnya lebih aktif dibandingkan dalam bentuk ekstrak (IC_{50} 29,89 μ g/mL)(Artanti *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa kuersetin beraktivitas sebagai antiradikal yang dapat meredam DPPH dengan IC_{50} 16,23 μ M (Gusdinar *et al.*, 2011).

Pada penelitian Hilda, (2015) menunjukkan bahwa fraksi kloroform dari *D. pentandra* memiliki nilai IC_{50} 88,5 terhadap *cell line* kanker T47D. Fraksi kloroform dari *D. pentandra* tergolong moderat aktif memiliki aktifitas antikanker. Menurut kriteria yang ditetapkan oleh NCI (*National Cancer Institut*) (NCI, 2001 dalam Rahmawati, 2013) bahwa suatu ekstrak dinyatakan aktif memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki nilai $IC_{50} < 30$ μ g/mL, moderate aktif apabila memiliki nilai $IC_{50} \geq 30$ μ g/mL dan $IC_{50} < 100$ μ g/mL, dan dikatakan tidak aktif apabila nilai $IC_{50} > 100$ μ g/mL. Hasil dari identifikasi golongan yang dilakukan menunjukkan bahwa fraksi kloroform dari *D. pentandra* mengandung saponin dan triterpenoid.



Gambar 2.2 Struktur Senyawa Quersetin (Fang, 2008)

2.2 Analisis Kadar Air

Menurut Dirjen POM, 2000 pengukuran kandungan air yang berada dalam bahan ataupun sediaan yang dilakukan dengan tujuan memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air, dimana nilai maksimal atau rentan yang diperoleh terkait dengan kemurnian kontaminasi. Berdasarkan keputusan menteri kesehatan RI no 661 tahun 1994, kadar air suatu simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

2.3 Metode Pemisahan Senyawa Aktif

Peristiwa pemindahan zat terlarut diantara dua pelarut yang tidak saling bercampur disebut ekstraksi. Secara sederhana ekstraksi merupakan istilah yang digunakan untuk setiap proses yang didalamnya komponen-komponen pembentuk suatu bahan berpindah dari bahan ke cairan (pelarut). Metode ekstraksi yang paling sederhana adalah dengan mencampurkan seluruh bahan dengan pelarut, lalu memisahkan larutan dengan padatan tidak terlarut (umar, 2008).

Pada umumnya ekstraksi akan bertambah baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan pelarut makin luas. Dengan demikian maka semakin halus serbuk simplisia, seharusnya semakin baik ekstraksinya (Ahmad, 2006). Teknik ekstraksi yang tepat berbeda untuk masing-masing bahan. Hal ini dipengaruhi oleh tekstur kandungan bahan dan jenis senyawa yang ingin didapatkan (Nuraini, 2007).

Beberapa penelitian banyak menggunakan metode ekstraksi maserasi. Ekstraksi ini memiliki kelemahan yaitu membutuhkan proses ekstraksi yang

cukup lama dan hasil ekstrak yang kurang maksimal. Dibutuhkan metode ekstraksi alternatif salah satunya menggunakan gelombang ultrasonik. Ekstraksi *ultrasonic bath* dengan menggunakan gelombang ultrasonik merupakan ekstraksi dengan perambatan energi melalui gelombang dengan menggunakan cairan sebagai media perambatan yang dapat meningkatkan intensitas perpindahan energi sehingga proses ekstraksi lebih maksimal dibandingkan metode ekstraksi konvensional. Penggunaan ultrasonik dapat menimbulkan efek kavitasi yang dapat memecah dinding sel bahan sehingga senyawa aktif keluar dengan mudah dan didapatkan hasil ekstrak yang maksimal dengan proses ekstraksi yang jauh lebih singkat (Kuldikole, 2002).

Getaran ultrasonik (< 20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (*Cavitation*) sebagai stress dinamis serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Depkes RI, 2000).

Cameron (2006) mengungkapkan bahwa pengembangan proses ekstraksi untuk mendapat hasil yang lebih baik dan waktu yang lebih singkat terus dilakukan. Hasil waktu uji rendemen pati jangung dengan menggunakan ekstraksi ultrasonik selama 2 menit adalah sekitar 55,2-67,8 % hampir sama dengan rendemen yang didapat dari pemanasan dengan air selama 1 jam yaitu 53,4%. Penggunaan ultrasonik pada proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut organik dapat lebih cepat, getaran ultrasonik dapat memecahkan dinding sel sehingga kandungan didalamnya dapat keluar dengan cepat.

Ekstraksi ultrasonik dapat menimbulkan gangguan fisik baik pada dinding maupun membran sel biologis serta penurunan ukuran partikel. Efek tersebut berdampak pada penetrasi pelarut yang lebih baik terhadap material sel yang pada akhirnya akan meningkatkan laju perpindahan masa pada jaringan serta memfasilitasi perpindahan senyawa aktif dari sel ke pelarut (Novak *et al.*, 2008).

Ultrasonik adalah salah satu bentuk dari energi yang dihasilkan dari gelombang suara dengan frekuensi diatas deteksi telinga manusia yaitu antara 20 kHz – 500 MHz. Manfaat ultrasonik dalam proses kimia berasal dari dua proses utama yaitu *acoustic streaming* dan *acoustic cavitation* (Maria, 2008). *Acoustic streaming* menyebabkan semakin tipisnya lapisan batas antara cairan dan partikel, sehingga dapat meningkatkan kemampuan penetrasi pelarut seiring meningkatnya difusibilitas dan solvensi senyawa aktif dalam sel. Pada akhirnya meningkatkan laju perpindahan panas, massa dan efisiensi ekstraksi (Li *et al.*, 2010). *Acoustic cavitation* dimulai dari kelarutan gas kedalam cairan sama seperti vaporasi parsial cairan, sehingga fase ini disebut fase pembentukan gelembung, kemudian fase pertumbuhan gelembung sampai pecahnya gelembung tersebut. Perubahan temperatur dan tekanan yang disebabkan oleh kavitasi (pecahnya gelembung gas) dapat merusak dinding maupun membran sel partikel (Usaquén-Castro *et al.*, 2006).

Penelitian sebelumnya melakukan percobaan tentang pengaruh rasio antara bahan dengan pelarut dan lama waktu ekstraksi terhadap jumlah ekstrak murbei yang dihasilkan dengan menggunakan metode ekstraksi *Ultrasonic bath*. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96%. Perlakuan terbaik pada

penelitian ini diperoleh dari perlakuan pada waktu ekstraksi dengan *ultrasonic bath* selama 30 menit dan rasio bahan : pelarut 1:7 (b/v) dengan kadar antosianin 3344.62 ppm, aktivitas antioksidan 219.27 ppm, nilai pH 3.21, rendemen 45.26% (Winata and Yuniarta, 2015).

Pemilihan pelarut organik yang akan digunakan dalam ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting untuk mencapai tujuan ekstraksi komponen, dikarenakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam bahan alam dapat larut dalam pelarut yang memiliki perbedaan sifat kepolarannya (Septyaningsih, 2010). Pemilihan pelarut untuk ekstraksi harus mempertimbangkan banyak faktor. Pelarut harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut: Sifat kelarutan zat didasarkan pada teori *like dissolve like*, zat yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan zat yang bersifat nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar (Khopkar, 2003).

Pelarut yang digunakan dalam mengekstraksi *D. pentandra* adalah etanol. Etanol merupakan senyawa alkohol yang mempunyai rumus kimia C_2H_5OH , zat cair jernih tidak berwarna, berbau khas, mudah terbakar dan mudah tercampur dengan air. Digunakan sebagai antiseptic (alkohol 70%), bahan minuman keras dan sebagai bahan mentah dalam beberapa industri kimia. Titik lebur $-117,3^{\circ}C$, titik didih $78,5^{\circ}C$ (Mulyono, 2008).

Penelitian sebelumnya (Syazana et al., 2015) dilakukan uji MTT ekstrak *D.pentandra* terhadap kultur sel MCF-7 atau sel kanker payudara. Dalam penelitian ini digunakan variasi ekstrak *D.pentandra*. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etil asetat, metanol, kloroform, dietil eter dan petroleum

eter. Ekstrak etil asetat dan methanol *D.pentandra* lebih efektif dengan IC_{50} masing-masing 14,42 $\mu\text{g/ml}$ dan 17,70 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan dengan ekstrak lainnya yang kurang signifikan terhadap sel MCF-7.

2.4 Sel Vero

Sel vero diambil dari ginjal normal monyet hijau dewasa dari Afrika. Sel-sel vero telah banyak digunakan untuk memproduksi vaksin virus (Nor et al., 2010). Selain itu, sel ini juga dimanfaatkan untuk replikasi virus yang nantinya digunakan sebagai bahan penelitian di laboratorium. Dalam penelitian Govorkova et al., (1996) sel vero cocok digunakan sebagai kultivasi virus influenza B.

Sel vero dikultur pada kondisi yang sama dengan *P. falciparum* secara *in vitro* kecuali 5% *human serum* digantikan dengan 5% *fetal bovine serum*. Sel vero dikultur menggunakan media M199 yang telah ditambahkan 10% FBS, 2% penisilin-streptomisin dan 0,5-1% fungison (Turalely et al., 2012). Sedangkan dalam penelitian Nugroho et al., (2013) sel vero tumbuh di media M199 yang mengandung 10% fetal bovine serum, 1% penisilin, 1% streptomycin dan 0,5% fungizon di dalam wadah dengan kelembapan atmosfer 5% CO_2 pada suhu 37°C .

2.5 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan untuk menilai apakah suatu senyawa aman atau bersifat toksik bagi tubuh. Uji toksisitas adalah uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memperoleh

informasi mengenai derajat bahaya zat tersebut bila terpapar pada manusia sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan (BPOM, 2014).

Toksisitas merupakan sifat relatif yang digunakan untuk menunjukkan suatu efek berbahaya atas jaringan biologi tertentu (Loomis, 1978). Metode uji toksisitas dibagi menjadi dua golongan. Golongan pertama yaitu uji toksisitas yang dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan efek umum suatu senyawa pada hewan eksperimental. Termasuk dalam uji ini adalah uji toksisitas akut, subkronis, dan kronis. Golongan kedua yaitu uji toksisitas yang dirancang untuk mengevaluasi dengan rinci tipe toksisitas spesifik. Uji toksisitas spesifik meliputi uji mutagenik, uji karsinogenik, uji teratogenik, uji reproduksi, uji potensi, dan uji perilaku (Loomis, 1978).

Uji toksisitas akut yaitu uji toksisitas dengan pemberian suatu senyawa kepada hewan uji sebanyak satu kali atau beberapa kali dalam jangka waktu 24 jam. Tujuan dilakukannya uji tersebut adalah menentukan tingkatan letalitasnya (Lu, 1995). Penggolongan toksisitas berdasarkan nilai LD50 hanya dibedakan menjadi:

- a. Toksik ($LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$)
- b. Tidak toksik ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$)

(Meyer *et al.*, 1982)

Mekanisme toksisitas berdasarkan fungsinya dapat dibedakan menjadi tiga jenis yaitu *basal cytotoxicity*, *organ specific toxicity*, dan *organizational toxicity*. Toksisitas basal berhubungan dengan efek toksik suatu senyawa yang dapat mempengaruhi struktur dan fungsi sel dasar yang biasanya diamati pada kultur sel

yang belum berdiferensiasi. Toksisitas organ spesifik dianalisis pada kultur sel primer yang terdiri dari sel-sel yang telah berdiferensiasi. Sedang toksisitas organisasi diamati secara tidak langsung pada kultur sel dengan jalan melakukan pengujian terhadap substrat ataupun produk metabolisme dari sel tersebut (Steinberg, 2013).

Salah satu metode uji toksisitas basal adalah MTT assay. MTT assay merupakan metode pengujian untuk melihat kemampuan mitokondria dalam sel hidup untuk memetabolisme senyawa 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) menjadi kristal formazon yang berwarna ungu. Studi morfologi dengan bantuan mikroskop menunjukkan adanya pembentukan kristal formazon proporsional dengan jumlah sel yang hidup. Formazon dapat juga dilepaskan dari sel hidup dengan jalan solubilisasi sel dan dideteksi dengan pengujian kolorimetri. Kemampuan sel untuk mereduksi MTT menjadi formazan menunjukkan integritas mitokondria dan aktifitasnya yang dapat diinterpretasikan sebagai pengukuran sel hidup (viabilitas) dan uji toksisitas (senthilraja, 2015).

2.6 Faktor Lingkungan

Setiap tumbuhan memiliki variasi kandungan senyawa. Variasi ini dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor internal (genetik, ontogenik, dan morfogenetik) dan faktor eksternal yang dapat dibedakan lagi menjadi dua faktor yaitu biotik (stress akibat bakteri, fungi, virus dan *parasite*) dan *abiotic* (perbedaan geografi, ketinggian tempat tumbuh, perubahan iklim, jenis dan

kondisi tanah, ketersediaan air, kandungan mineral, dan stress akibat temperatur, radiasi dan senyawa kimia) (Verma dan Shukla, 2015). Diperkirakan suatu tumbuhan memiliki 5000-10.000 metabolit dengan total dimungkinkan mencapai 200.000 struktur yang berbeda dalam kerajaan tumbuhan (Colquhoun, 2007).

Ketinggian tempat dapat menyebabkan perubahan suhu dan kondisi iklim. Penelitian profil metabolit terhadap *C. roseus* dari berbagai daerah dengan perbedaan ketinggian mengakibatkan perbedaan kandungan metabolit senyawa fenolik yang berakibat pada perbedaan aktivitas antioksidan. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi geografis berpengaruh terhadap metabolit (Verma dan Shukla, 2015).

Perbedaan iklim juga dapat mengakibatkan perbedaan kandungan metabolit dari suatu tumbuhan seperti penelitian pada *Papaver somniferum* yang dipanen dari lokasi dengan iklim yang berbeda mengakibatkan kandungan alkaloid morfin, kodein, tebain, narkotin, dan papaverin sebagai kandungan alkaloid mayor juga berbeda (Verma dan Shukla, 2015).

Fatchurrozak et al., (2013) melakukan penelitian tentang pengaruh ketinggian tempat terhadap aktifitas antioksidan pada buah *Carica pubescens* di Dataran Tinggi Dieng. Bagian yang diambil (sampel) berupa daging buah dan salut biji (sarkotesta). Pengambilan sampel dilakukan di Desa Kejajar (1400 meter dpl), Patak Banteng (1900 meter dpl), dan Sembungan (2400 meter dpl). Semakin tinggi elevasi tempat tumbuh suatu tumbuhan maka kandungan antioksidan yang didapatkan semakin tinggi pula. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan

antioksidan yang paling tinggi adalah yang berasal dari ketinggian 2400 m dpl (4,52 % per gram).

Penelitian Nurnasari dan Djumali, (2010) tentang perbedaan kadar nikotin pada tanaman tembakau temanggung yang diambil dari tiga daerah yang memiliki elevasi tempat tumbuh yang berbeda yakni Desa Tlilir berelevasi 1395 m dpl, Desa Wonotirto berelevasi 1245 m dpl, dan Desa Sunggingsari berelevasi 880 m dpl. Hasil yang didapatkan adalah kadar tertinggi nikotin berasal dari Desa Tlilir.

Elevasi tempat sangat dipengaruhi iklim, terutama curah hujan dan temperatur udara. Temperatur udara berkorelasi negatif dengan ketinggian, dimana semakin tinggi tempat maka semakin turun temperatur udaranya. kadar nikotin semakin berkurang seiring dengan kenaikan temperatur udara, hal ini karena pada elevasi tempat yang lebih tinggi temperatur udara semakin berkurang sehingga semakin panjang akumulasi karbohidrat dan semakin besar akumulasi nikotin dalam daun. Jadi semakin tinggi elevasi, semakin rendah temperatur udara menyebabkan semakin tinggi kadar nikotinnya. Kenaikan kelembapan akan mengakibatkan penurunan aktivitas transpirasi sehingga mengakibatkan penurunan penyerapan unsur hara. Tekanan lingkungan semacam ini akan memacu pembentukan metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan secara fisiologis (Nurnasari dan Djumali, 2010).

Tabel 2.1 Karakteristik Lokasi Pengambilan Sampel Daun *D. pentandra*

No	Lokasi	Ketinggian (mdpl)	Suhu Rata-rata (°C)	Curah Hujan (mm)	Tipe Iklim
1	Desa Sumbergayam kec.Kepung Kab.Kediri	222	25,8	1886	Aw

	Jawa Timur				
2	Kec.Pekalongan Timur Kab.Pekalongan Jawa Tengah	8	26,6	2620	Am
3	Desa Nangka Utara Kec.Tonja Kab.Badung Denpasar Bali	51	26,4	1833	Am
4	Kel.Gunung Batin Baru Kec.Terusan Nunyai Kab.Lampung Tengah Sumatra Selatan	27	26,8	2122	Af
5	Kel.Tanjung Selor Ilir Kec.Tanjung Seloe Kab.Bulungan Kalimantan Utara	80	26,8	2738	Af

Sumber: www.id-climate.data.org (9 Januari 2017, 15:21 WIB)

2.7 ELISA

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) merupakan suatu teknik biokimia untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Penggunaan ELISA melibatkan setidaknya satu antibodi dengan spesifitas untuk antigen tertentu. ELISA terdiri atas tiga macam yaitu *Direct ELISA*, *Indirect ELISA*, dan *Sandwich ELISA* (Baker et al., 2007).

Direct ELISA merupakan jenis ELISA yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi suatu antigen. Antigen yang akan dideteksi akan berikatan langsung (*direct*) dengan antibodi *detector* (antibodi yang telah dilabeli oleh enzim reporter). Antibodi yang digunakan pada teknik *direct ELISA* berjumlah satu buah. Kelebihan dari *direct ELISA* yaitu Cepat dan tidak terdapat Cross Reaksi dengan antibodi sekunder. Akan tetapi, *direct ELISA* memiliki kekurangan yaitu harga pelabelan antibodi primer yang mahal, tidak ada fleksibilitas pemilihan antibodi primer, dan sinyal amplifikasinya sedikit (Walker dan Rapley 2008).

Indirect ELISA merupakan jenis ELISA yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi antigen atau antibodi. Teknik tersebut memiliki karakteristik yaitu antigen tidak menempel langsung pada antibody *detector* (*Indirect*). Antigen akan berikatan dengan antibodi lain terlebih dahulu. Antibodi tersebut kemudian akan berikatan dengan antibodi yang telah dilabeli. Kelebihan *indirect ELISA* yaitu memiliki sensitivitas tinggi dan sinyal amplifikasi yang tinggi. Kekurangan *indirect ELISA* yaitu membutuhkan waktu yang lama dan terjadi cross reaksi (Walker dan Rapley, 2008).

Sandwich ELISA merupakan jenis ELISA yang dapat digunakan untuk mengukur antigen maupun antibodi,. Karakteristik khas dari *sandwich ELISA* adalah menggunakan antibodi penangkap atau primer antibodi. Antigen yang akan dideteksi dan diukur konsentrasinya berikatan terlebih dahulu dengan antibodi penangkap. Antigen akan berikatan kembali dengan antibodi sesuai

jenis *sandwich* ELISA yang digunakan. *Sandwich* ELISA dibagi menjadi dua jenis yaitu *sandwich direct* ELISA dan *sandwich indirect* ELISA (Crowther, 2003).

Sandwich direct ELISA menggunakan dua antibodi yaitu antibodi penangkap dan antibodi yang dilabeli enzim. Antigen yang telah berikatan dengan antibodi penangkap akan berikatan kembali dengan antibodi yang dilabeli enzim. *Sandwich indirect* ELISA menggunakan tiga antibodi yaitu antibodi penangkap, antibodi detektor, dan anti-antibodi yang dilabeli enzim. Antigen yang telah berikatan dengan antibodi penangkap akan berikatan dengan antibodi detektor dan anti-antibodi yang dilabeli enzim (Crowther, 2003). Antigen dalam *sandwich* ELISA tidak perlu dimurnikan sebelum digunakan. *Sandwich* ELISA sangat spesifik sehingga tidak semua antibodi dapat digunakan.

Immunoassays melibatkan tes menggunakan antibodi sebagai reagen. immunoassay enzim digunakan sebagai pelekut enzim pada salah satu dari reaktan dalam immunoassay untuk memungkinkan kuantifikasi melalui pengembangan warna setelah penambahan substrat yang cocok atau chromogen. Kemudian diukur menggunakan spektrofotometer khusus dan dibaca pada panjang gelombang tertentu untuk warna tertentu yang diperoleh dengan sistem enzim atau kromofor tertentu. Tes dapat dinilai dengan mata (Crowther, 2003).

Salah satu substrat kolorimetrik adalah tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD). Senyawa ini mudah teroksidasi membentuk senyawa berwarna yang

akan diukur absorbannya untuk mengetahui atau mengukur aktivitas COX-1 dan COX-2. TMPD mengalami oksidasi dengan melepaskan satu elektronnya melalui aktivitas peroksidase heme menghasilkan senyawa berwarna yang dapat mengabsorpsi sinar dengan panjang gelombang 611 nm. Sehingga, secara stoikiometri 2 molekul TMPD teroksidasi per mol hidroperoksid yang direduksi oleh peroksidase. Koefisien ekstingsi TMPD yang teroksidasi pada 611 nm adalah 12.200 (Manggau *et al.*, 2013).

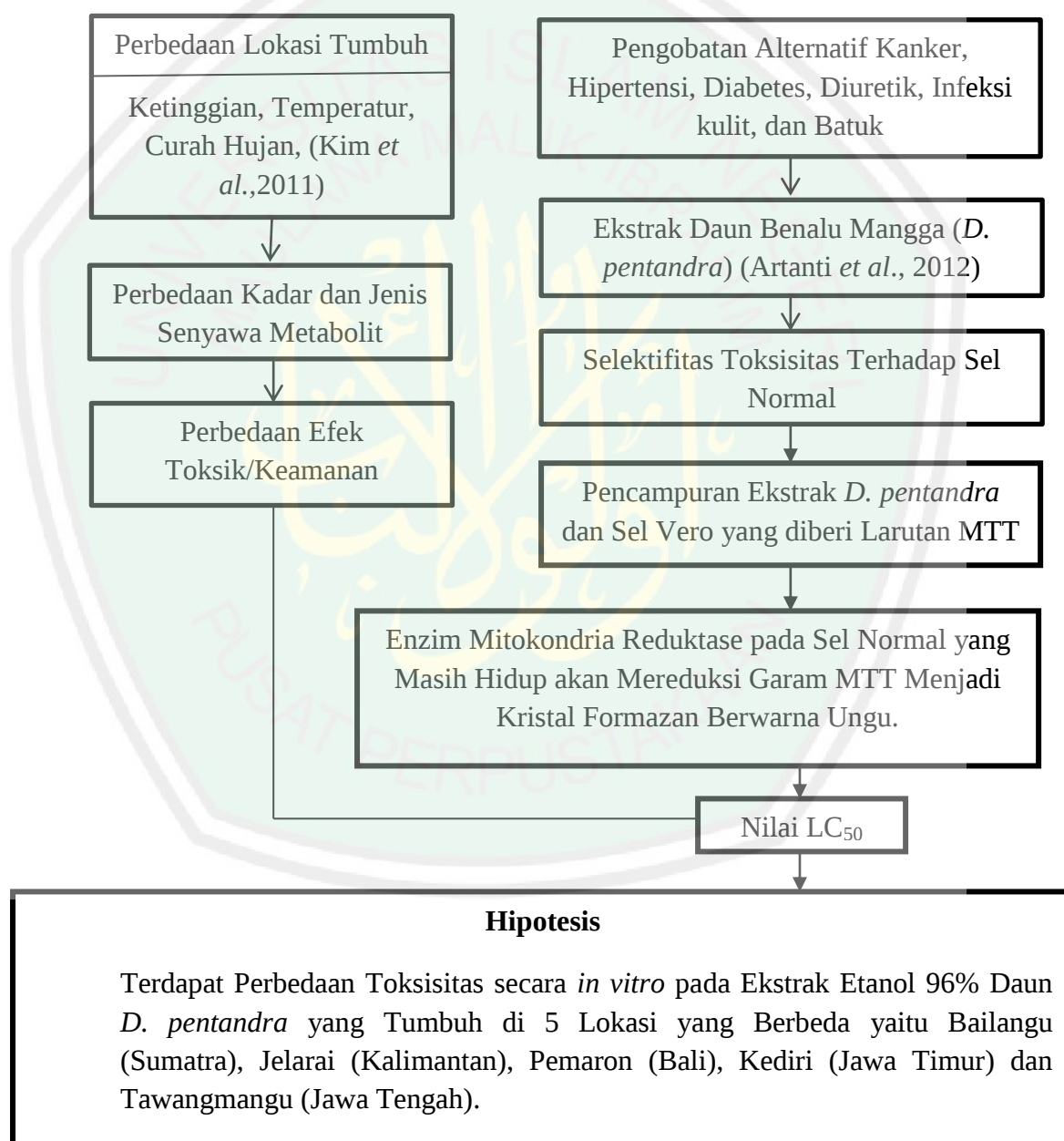


BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

3.1.1 Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

3.1.2 Uraian Kerangka Konseptual

Prefalensi penderita kanker pada penduduk semua umur di Indonesia sebesar 1,4%. Tingginya prefalensi kanker di Indonesia perlu dicermati dengan upaya pengobatan dan tindakan pencegahan. Upaya pengobatan yang selama ini dilakukan adalah dengan cara operasi, kemoterapi dan radiasi. Upaya pengobatan tersebut terlalu beresiko menimbulkan efek samping, karena selain dapat menghambat pertumbuhan sel kanker juga dapat merusak sel normal. Selain itu terapi ini juga membutuhkan biaya yang relatif mahal. Begitu pula dengan pengobatan penyakit hipertensi, diuretik, diabetes, infeksi kulit dan batuk menggunakan obat sintesis. Efek samping sering timbul pada masa terapi penyembuhan. Oleh karena itu dibutuhkan obat alternative dari bahan alam yang dapat mencapai efek terapi yang diinginkan, bersifat selektif, efektif, dan tidak menimbulkan efek samping.

Salah satu tumbuhan obat yang berfungsi sebagai obat antikanker, hipertensi, diuretik, diabetes, infeksi kulit dan batuk adalah *D. pentandra*. *D. pentandra* yang awalnya dianggap sebagai parasit ternyata dapat dijadikan sebagai alternatif pengobatan yang aman, murah dan mudah didapatkan.

Penggunaan *D. pentandra* sebagai salah satu alternatif pengobatan yang menjanjikan masih membutuhkan eksplorasi lebih lanjut, salah satunya adalah uji toksisitas atau keamanan terhadap sel normal. Tumbuhan ini memiliki potensi sebagai produk fitofarmaka.

Faktor lingkungan mempengaruhi kualitas fitofarmaka seperti perbedaan lokasi tempat tumbuh, temperatur, lamanya terpapar sinar matahari, curah hujan,

tipe dan jenis tanah. Pada penelitian kali ini penulis memakai lima sampel yang diambil dari daerah yang berbeda. Sampel berasal dari daerah Kediri, Pekalongan, Denpasar, Lampung Tengah dan Bulungan.

Sampel dari lima daerah yang berbeda diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode ultrasonik dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat. Masing-masing sampel diuji toksisitasnya dengan metode MTT *essay*. Prinsip kerja metode MTT *essay* adalah mengukur aktifitas seluler berdasarkan kemampuan enzim mitokondria reduktase dalam mereduksi garam MTT berwarna kuning menjadi Kristal formazan berwarna biru keunguan. Dihitung nilai LC_{50} dari absorbansi perlakuan sel dengan menggunakan ELISA *reader*. Dari nilai LC_{50} yang diperoleh akan diketahui perbedaan toksisitas ekstrak etanol 96% daun *D. pentandra* yang tumbuh di 5 lokasi yang berbeda.

3.2 Hipotesis Penelitian

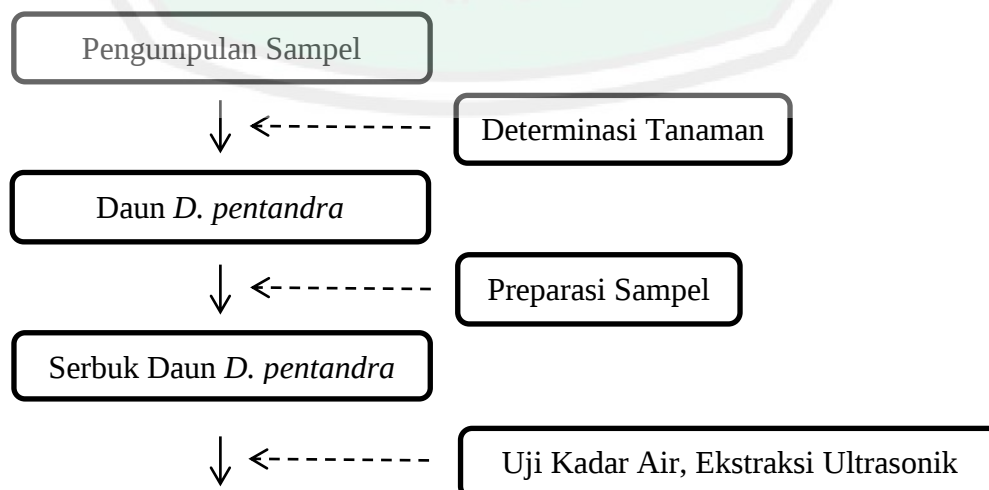
Terdapat perbedaan toksisitas secara in vitro pada ekstrak etanol 96% daun *D. pentandra* yang tumbuh di 5 lokasi yang berbeda yaitu Lampung Tengah (Sumatra), Bulungan (Kalimantan), Denpasar (Bali), Kediri (Jawa Timur) dan Pekalongan (Jawa Tengah).

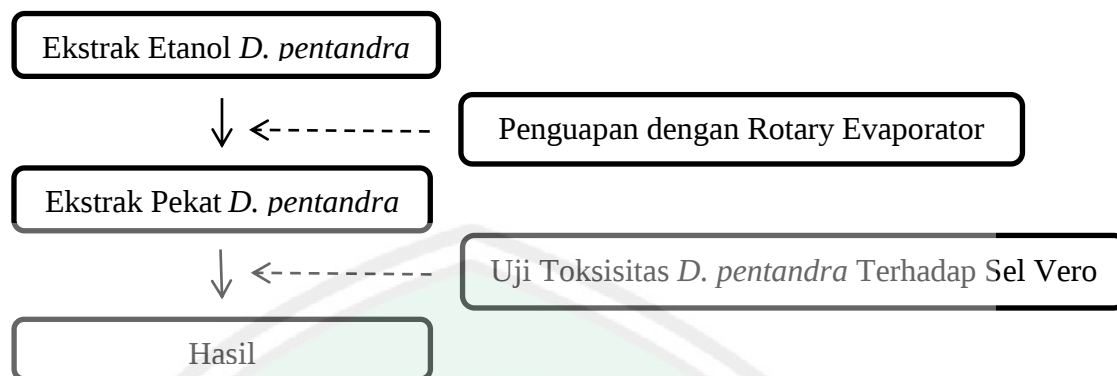
BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *True Experimental Design* yang digunakan untuk mengungkapkan sebab dan akibat dengan cara melibatkan kelompok control disamping kelompok eksperimen yang dipilih dengan menggunakan teknik acak. Perlakuan terhadap semua sampel dilakukan secara bersamaan dan dilanjutkan dengan pengamatan yang juga dilakukan secara bersama-sama dengan menggunakan jenis *Control Group Posttest Only Design* (Notoatmodjo, 2002). Desain penelitian ini subjek ditempatkan secara random kedalam kelompok-kelompok dan diberi post test. Nilai-nilai post test kemudian dibandingkan untuk menentukan keefektifan *treatment*. Populasi dalam penelitian ini adalah spesies benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra* (L) Mig), dengan sampel benalu mangga yang didapat dari Lampung Tengah (Sumatra), Bulungan (Kalimantan), Denpasar (Bali), Kediri (Jawa Timur) dan Pekalongan (Jawa Tengah). Adapun rencana penelitian sebagai berikut:





4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari tahun 2017 hingga selesai di Laboratorium BIOTEK, Kimia Organik dan Kimia Analitik Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Protho, Parasitologi Jurusan Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada (UGM).

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel Penelitian

Ada tiga macam variabel dalam penelitian ini yaitu:

1. Variabel bebas: Variasi tempat pengambilan sampel, dan variasi konsentrasi larutan sampel.
2. Variabel tergantung: LC_{50} masing-masing sampel.
3. Variabel terkontrol: Jenis pelarut ekstraksi, lama inkubasi, temperature, media kultur, sel vero dan metode ekstraksi ultrasonik.

4.3.2 Definisi Operasional

1. Variasi tempat pengambilan sampel merupakan perbedaan tempat pengambilan sampel yang dipilih berdasarkan elevasi tempat tumbuh *D. pentandra*.
2. Variasi konsentrasi larutan sampel adalah perbedaan kelarutan sampel pada pelarut DMSO yang dibuat, sebelum diberikan pada *cell line vero*. Variasi konsentrasi ini dibuat untuk mengetahui signifikan peningkatan dosis konsumsi dengan efek peningkatan apoptosis sel yang dihasilkan.
3. Nilai LC_{50} merupakan besar konsentrasi yang dapat menimbulkan 50% kematian sel. LC_{50} didapatkan dari hasil pembacaan absorbansi menggunakan ELISA reader.
4. Inkubasi merupakan suatu teknik perlakuan bagi mikroorganisme yang telah diinokulasikan pada media (padat atau cair), kemudian disimpan pada suhu tertentu selama jangka waktu tertentu untuk dapat melihat pertumbuhannya. Bila suhu inkubasi tidak sesuai dengan yang diperlukan, biasanya mikroorganisme tidak dapat tumbuh dengan baik.
5. Media kultur merupakan suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi berbentuk cair yang digunakan untuk mengembangbiakkan sel-sel di laboratorium.
6. Sel vero adalah sel normal yang didapatkan dari ginjal kera hijau yang berasal dari Afrika. Kultur sel vero diambil dari koleksi Universitas Gadjah Mada (UGM).

7. Ekstraksi ultrasonik dengan menggunakan gelombang ultrasonik merupakan ekstraksi dengan perambatan energi melalui gelombang dengan menggunakan cairan sebagai media perambatan yang dapat meningkatkan intensitas perpindahan energi sehingga proses ekstraksi lebih maksimal dibandingkan metode ekstraksi konvensional. Penggunaan ultrasonik dapat menimbulkan efek kavitasi yang dapat memecah dinding sel bahan sehingga senyawa aktif keluar dengan mudah dan didapatkan hasil ekstrak yang maksimal dengan proses ekstraksi yang jauh lebih singkat (Kuldikole, 2002).

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

4.4.1.1 Preparasi Sampel

Alat-alat yang digunakan proses preparasi sampel diantaranya blender, gunting, dan ayakan 60 mesh.

4.4.1.2 Analisis Kadar Air Ekstrak *D. pentandra*

Alat-alat yang digunakan untuk analisis kadar air adalah *Moisture Analyzer*, neraca analitik, cawan porselen, spatula.

4.4.1.3 Ekstraksi Ultrasonik *D. pentandra*

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi *D. pentandra* diantaranya adalah neraca analitik, kaca arloji, spatula, pengaduk, erlenmeyer 500 mL, *aluminium foil*, *beaker glass* 100 mL, kertas saring whatman, penyaring *buchner*, *rotary evaporator*, gelas vial, corong gelas, dan corong pisah.

4.4.1.4 Uji Toksisitas dengan Metode MTT

Alat-alat yang digunakan yaitu mikropipet 200, 1000 μ L, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, 96-well plate, Conical Tube, Yellow tip dan Blue tip, hemacytometer, incubator, LAF Hood, microscop inverted, dan ELISA reader.

4.4.2 Bahan

4.4.2.1 Ekstraksi Ultrasonik *D. pentandra*

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah *D.pentandra* yang diambil dari Sumatera, Kalimantan, Bali, Jawa Timur, Jawa Tengah. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi ultrasonik adalah etanol 96 %.

4.4.2.2 Uji Toksisitas dengan Metode MTT

Bahan yang digunakan dalam uji aktivitas antikanker dengan metode MTT adalah sel vero, media kultur M199, Dimetil Sulfoksida (DMSO), MTT 5 mg/mL phosphate buffer saline (PBS) (50 mg MTT dan 10 mL PBS), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10 % dalam 0,1 N HCl, tissue makan, dan aluminium foil.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman akan dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

4.5.2 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun dari *Dendrophthoe pentandra*. *D. pentandra* yang digunakan sebanyak 1 kg. Sampel tumbuhan *D. pentandra* dicuci dengan air, kemudian dikering anginkan, dioven pada suhu 50°C dan dihaluskan

menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan 60 mesh. Serbuk merupakan sampel penelitian yang kemudian diekstraksi kandungan bioaktifnya.

4.5.3 Analisis Kadar Air Serbuk Daun *Dendrophthoe pentandra*

Analisis kadar air dalam serbuk simplisia dilakukan untuk memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan. Menurut Menteri Kesehatan RI, (1994) kadar air serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Serbuk simplisia diukur kadar airnya menggunakan *Moisture Analyzer*. Setelah alat *Moisture Analyzer* dinyalakan dan layar menunjukkan tampilan 0,000 g, penutup alat dibuka dan *sample pan* kosong dimasukkan ke dalam *sample pan handler*. Penutup alat diturunkan dan secara otomatis alat akan menara atau menunjukkan tampilan 0,000 pada layar. Kemudian sejumlah $\pm 0,500$ gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam *sample pan* dan penutup alat diturunkan. Secara otomatis, alat akan memulai pengukuran hingga terbaca hasil pengukuran %MC pada layar. Proses analisis kadar air dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

4.5.4 Ekstraksi Ultrasonik *Dendrophthoe pentandra*

Ekstraksi golongan senyawa aktif dari *D. pentandra* dilakukan dengan cara ekstraksi ultrasonik dengan lama ekstraksi 20 menit (Handayani *et al.*, 2016). Diulangi perlakuan pada ampas yang diperoleh sampai diperoleh filtrat yang bening. Filtrat ekstrak kemudian digabungkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat.

4.5.5 Uji Toksisitas dengan Metode MTT

Metode ini didasarkan pada reaksi reduksi reagen 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yang dikatalis oleh enzim suksinat dehidrogenase yang dikandung oleh sel hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (LCRC, 2009).

4.5.5.1 Penyiapan Sel

Sel Vero diambil dari koleksi Laboratorium Protho, Parasitologi Jurusan Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada (UGM). Sel dikeluarkan dari freezer (-80°C), dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 2 – 3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan ke dalam *conical tube* yang telah berisi 10 ml media M199, diinkubasi selama 3 – 4 jam pada suhu 37°C / 5% CO_2 , kemudian disentrifugasi untuk memisahkan sel vero (pelet) dengan media M199. Pelet yang terbentuk diamati dibawah mikroskop untuk melihat apakah sel melekat di dasar *culture dish* dan bila jumlah sel di dalam *culture dish* mencapai 70 – 85 % (konfluen), dilakukan panen sel yakni, dicuci sel 2 kali dengan PBS, ditambahkan trispsin-EDTA secara merata dan diinkubasi selama 3 menit, ditambahkan media M199 5 mL untuk menginaktifkan

trypsin serta dilakukan resuspensi, diamati dibawah mikroskop *inverted*, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂.

4.5.5.2 Perhitungan Sel

Panen sel diambil 10 µL dan dipipetkan ke *hemacytometer*, diamati dan dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel *vero* dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

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

4.5.5.3 Peletakan Sel pada Plate

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

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

Sel diletakkan dan media M199 ditambahkan sesuai perhitungan kedalam *plate* 96-well dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C/ 5% CO₂, akan tetapi 6 sumuran bagian bawah disisakan untuk kontrol sel dan kontrol media.

4.5.5.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada

Plate

Sampel ekstrak pekat etanol dari masing-masing daerah ditimbang sebanyak 10 mg dalam wadah yang berbeda, dilarutkan masing- masing ekstrak pekat dalam 100 µL DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dan diaduk dengan vortex agar lebih cepat dalam melarutkan sampel. Langkah selanjutnya sel diambil dari inkubator, kemudian media sel dibuang dengan cara dibalikkan *plate* 180° diatas tempat buangan dan ditekan secara perlahan diatas tissue untuk meniriskan sisa

cairan, PBS 100 μ L dimasukkan kedalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu dimasukkan larutan sampel sebanyak 100 μ L dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; dan 62,5 ppm dan diulang sebanyak 3 x (triplo) dan diinkubasi kembali selama 24 jam.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000 ppm			1000 ppm			1000 ppm			1000 ppm		
B	500 ppm			500 ppm			500 ppm			500 ppm		
C	250 ppm			250 ppm			250 ppm			250 ppm		
D	125 ppm			125 ppm			125 ppm			125 ppm		
E	62,5 ppm			62,5 ppm			62,5 ppm			62,5 ppm		
F	1000	500	250	125	62,5	kontrol		kontrol				
G	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	sel		media				
H												

Tabel 4.1 Well-plate mapping untuk uji toksisitas ekstrak etanol *D. pentandra*

Keterangan:

 = Sampel dari Jawa Timur

 = Sampel dari Jawa Tengah

 = Sampel dari Bali

 = Sampel dari Sumatra

 = Sampel dari Kalimantan

4.5.5.5 Pemberian Larutan MTT

Media sel dibuang dengan cara dibalik *plate* dan dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*), larutan MTT (reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) berwarna kuning sebanyak 100 µL ditambahkan kesetiap sumuran. Inkubasi kembali selama 3 – 4 jam didalam inkubator pada suhu 37 °C/ 5% CO₂ (sampai terbentuk kristal formazan atau perubahan warna menjadi biru). Apabila kristal formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*, selanjutnya *stopper* SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% ditambahkan dalam 0,1 N HCl, *plate* dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.

Langkah selanjutnya yakni pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA *reader* untuk mengetahui nilai LC₅₀ setiap ekstrak. Tahapan awalnya ini dihidupkan ELISA *reader* dan ditunggu hingga *proccessing* selesai, pembungkus *plate* dibuka kemudian dimasukkan ke ELISA *reader*, absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan panjang gelombang 550 – 600 nm (595 nm), dimatikan kembali ELISA *reader*. Dihitung prosentase sel hidup dengan persamaan sebagai berikut:

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

Keterangan :

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

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi control negatif (sel + media kultur)

Data dari prosentase sel hidup kemudian dianalisis untuk mengetahui nilai LC₅₀ dengan *Microsoft Excel*.

4.6 Analisis Data

Potensi ekstrak *D. pentandra* dalam merusak sel vero (sel normal) dapat diketahui dengan melakukan uji LC₅₀, menggunakan analisa *Microsoft Excel* untuk masing-masing konsentrasi, 1000; 500; 250; 125; dan 62,5µg/mL. Penggunaan data absorbansi yang diperoleh dari pengukuran, dapat ditentukan persentase sel yang hidup dengan menggunakan rumus: *Persentase sel hidup* =

$$\frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \%$$

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan data yang terinput merupakan data hubungan antara konsentrasi dengan persentase sel hidup serta nilai maksimum sebesar 100. Selanjutnya, dilakukan analisa ANOVA *one way multivariate* untuk menentukan perbedaan nilai LC₅₀±SD pada tiap-tiap sampel.

BAB V

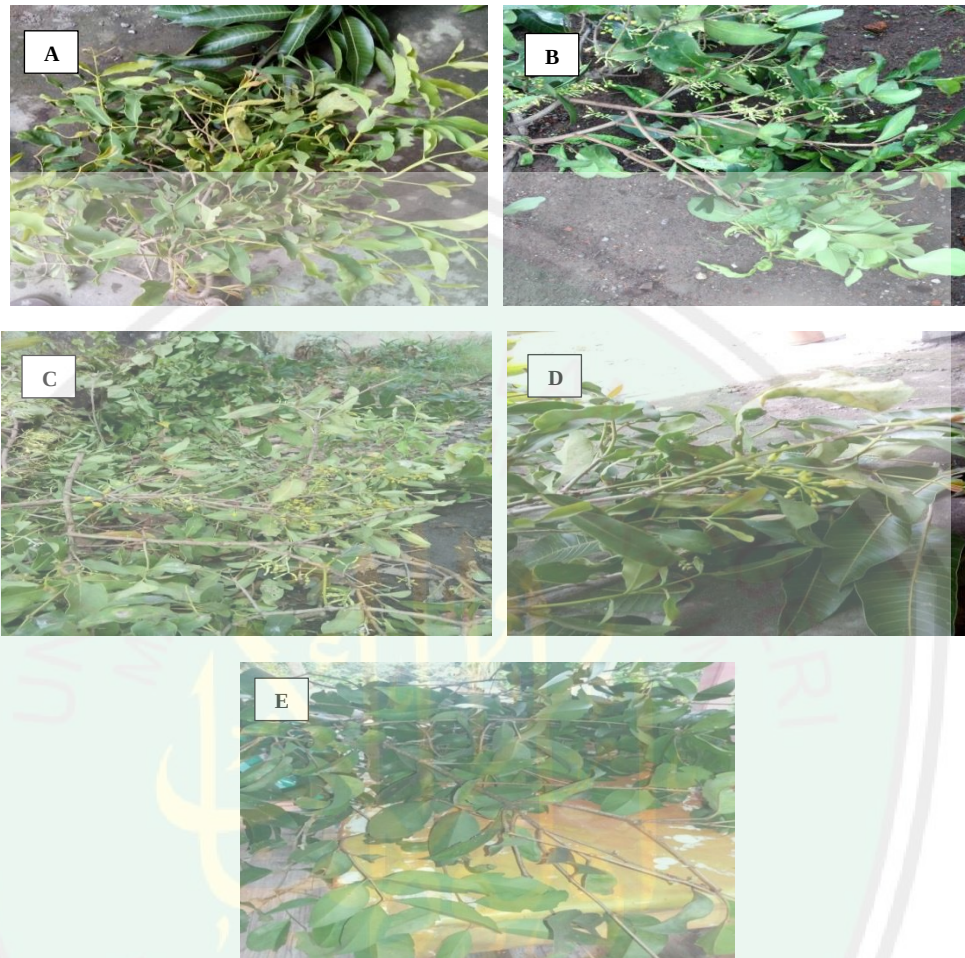
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan sebagai pembuktian bahwa ekstrak benalu mangga (*D. pentandra*) tidak memiliki efek toksik terhadap sel normal. Sampel yang digunakan adalah daun *D. pentandra* yang diambil dari lima daerah yang berbeda dengan ketentuan ketinggian tempat yang berbeda. Hal ini dilakukan agar peneliti dapat mengetahui apakah perbedaan ketinggian tempat dapat mempengaruhi tingkat efek toksik tanaman pada sel normal. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah identifikasi tanaman, preparasi sampel, uji kadar air pada ekstrak *D. pentandra*, ekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi ultrasonik dan uji toksisitas dengan metode MTT.

5.1 Identifikasi Tanaman

Mengenal nama jenis tumbuhan sangat penting untuk dilakukan untuk menghindari resiko pemalsuan sebelum dilakukannya penelitian. Melakukan identifikasi tumbuhan berarti menetapkan identitas suatu tumbuhan, yang mana dalam hal ini tidak lain dari pada menentukan namanya yang benar dan tempatnya yang tepat dalam sistem klasifikasi.

Morfologi dari *D. pentandra* yang didapatkan adalah batang berkayu. Daun tersebar dan sedikit berhadapan, pangkal daun menirus, ujung daun berbentuk runcing-tumpul. Bunga berwarna kuning-orange dan buah berwarna kuning.



Gambar 5.1 Daun dan bunga *D. pentandra* yang diidentifikasi; A). *D. pentandra* dari Kediri, B). *D. pentandra* dari Pekalongan, C). *D. pentandra* dari Bali, D). *D. pentandra* dari Sumatra, E). *D. pentandra* dari Kalimantan.

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi tumbuhan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*) UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi.

5.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan tahapan awal dalam analisis bahan alam. Tahapan ini terdiri dari proses pengambilan sampel, pencucian, pengeringan dan

penyerbukan. Daun *D. pentandra* diambil dari pohon mangga pada tiap-tiap lokasi yang sudah ditentukan. Sampel diambil dari lima lokasi yang berbeda, lokasi pertama adalah desa Sumbergayam Kec. Kepung Kab. Kediri Jawa Timur, lokasi kedua adalah Kec. Pekalongan Timur Kab. Pekalongan Jawa Tengah, lokasi ketiga adalah desa Nangka Utara Kec. Tonja Kab. Badung Denpasar Bali, lokasi keempat adalah kelurahan Gunung Batin Baru Kec. Terusan Nunyai Kab. Lampung Tengah Kalimantan Selatan, lokasi terakhir adalah kelurahan Tanjung Selor Hilir Kec. Tanjung Seloe Kab. Bulungan Kalimantan Utara. Waktu panen sangat erat hubungannya dengan pembentukan senyawa aktif di dalam bagian tumbuhan yang akan dipanen. Panen daun dilakukan pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal yaitu ditandai saat tumbuhan mulai berbunga (Gunawan dan Mulyani, 2010). Pemanenan daun *D. pentandra* dari kelima daerah dilakukan pada saat kondisi tumbuhan mulai berbunga. Karakteristik daun yang diambil adalah daun dengan warna hijau muda dan hijau tua (bukan daun kuning). Daun dipetik satu persatu secara manual. Proses ini dilakukan dengan dasar bahwa kandungan bahan berkhasiat yang ada dalam tumbuhan dalam keadaan maksimal.

Setelah proses pengumpulan telah dilakukan maka tahap selanjutnya adalah pencucian. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran yang berupa debu, tanah ataupun kotoran hewan yang menempel pada daun *D. pentandra* dan memisahkannya dengan bagian tumbuhan yang tidak diinginkan. Daun *D. pentandra* yang basah sangat rentan terhadap pertumbuhan mikroba maka untuk mencegahnya diperlukan tahap selanjutnya yaitu proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan. Kemudian daun *D.*

pentandra dioven pada suhu 50°C selama kurang lebih tiga hari. Pengeringan ini dilakukan agar diperoleh rendemen ekstrak yang lebih banyak karena tidak ada air yang mempengaruhi hasil ekstraksi. Selain itu kandungan air yang sedikit dalam sampel kering akan meminimalkan pertumbuhan jamur dan menghentikan reaksi enzimatik sehingga dapat disimpan lebih lama dan tidak mudah rusak serta komposisi kimianya tidak mengalami perubahan (Harborne, 1987).

Daun *D. pentandra* yang telah kering berwarna hijau kecoklatan dihaluskan menggunakan penggilingan agar serbuk sampel menjadi halus dan berukuran kecil. Dilakukan penghalusan sampel dengan tujuan untuk memperluas permukaan sampel sehingga pada saat diekstraksi kontak antara sampel dengan pelarut lebih maksimal. Selain itu juga dimungkinkan pecahnya sel-sel dalam daun yang mempermudah dalam pengambilan senyawa aktif oleh pelarut. Sampel yang sudah berbentuk serbuk diayak menggunakan ayakan 60 mesh untuk memperkecil dan menyeragamkan ukuran partikel dengan begitu senyawa metabolit lebih mudah dikeluarkan dari sel pada waktu proses ekstraksi.



Gambar 5.2 Hasil preparasi sampel; A). Preparasi daun *D. pentandra*, B). Pengeringan daun *D. pentandra*, C). Serbuk daun *D. pentandra*.

5.3 Uji Kadar Air Ekstrak *D. pentandra*

Ketika melakukan sebuah penelitian bahan alam, tahap pengukuran kadar air dalam suatu sampel sangat dibutuhkan. Jika kadar air terlalu tinggi maka sampel akan mudah terkontaminasi oleh jamur dan mengganggu masuknya pelarut kedalam sampel karena apabila pelarut tidak bercampur dengan air maka pelarut tidak akan bisa masuk kedalam dinding sel. Sampel yang memiliki kadar air tinggi mengakibatkan tumbuhnya jamur-jamur penghasil mikotoksin (racun) yang dapat menyebabkan data yang tidak akurat pada uji toksisitas sebab kematian sel normal bukan dikarenakan ekstrak melainkan karena jamur yang tumbuh.

Moisture analyser mettler toledo hc103 adalah alat yang dipakai peneliti dalam mengukur kadar air pada sampel. Alat ini dipilih karena cara penggunaannya yang mudah, selain itu alat ini bekerja secara otomatis dan menghasilkan data yang akurat. Pada alat ini terdapat besi pemanas yang terletak pada tutup alat *moisture analyzer* yang bekerja selama proses penyerapan. Besi ini terikat pada serangkaian kawat yang dapat menghantarkan panas sehingga proses penyerapan air dapat berjalan dengan baik (Ginting, 2008).

Adapun hasil pengukuran kadar air dengan menggunakan *moisture analyzer* di tunjukkan pada tabel dibawah ini.

Tabel 5.1 Kadar air tiap sampel dengan menggunakan moisture analyzer

No	Lokasi Pengambilan Sampel	Ulangan 1 (%)	Ulangan 2 (%)	Ulangan 3 (%)	Rata-rata $\pm$ SD
1	Jawa Timur	7,72	7,92	8,37	8,00 $\pm$ 0,33
2	Jawa Tengah	8,97	8,89	8,53	8,79 $\pm$ 0,23
3	Bali	6,69	6,27	6,51	6,49 $\pm$ 0,21
4	Sumatra Selatan	7,50	8,09	7,19	7,59 $\pm$ 0,45
5	Kalimantan Utara	7,07	7,11	6,94	7,04 $\pm$ 0,08

Berdasarkan hasil pengukuran kadar air serbuk simplisia *D. pentandra* dari lima daerah diketahui bahwa sampel yang dianalisis mempunyai kadar air cukup baik untuk dilakukan proses ekstraksi. Menurut Permenkes RI no 661 tahun 1994 kadar air suatu simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

5.4 Ekstraksi Ultrasonik

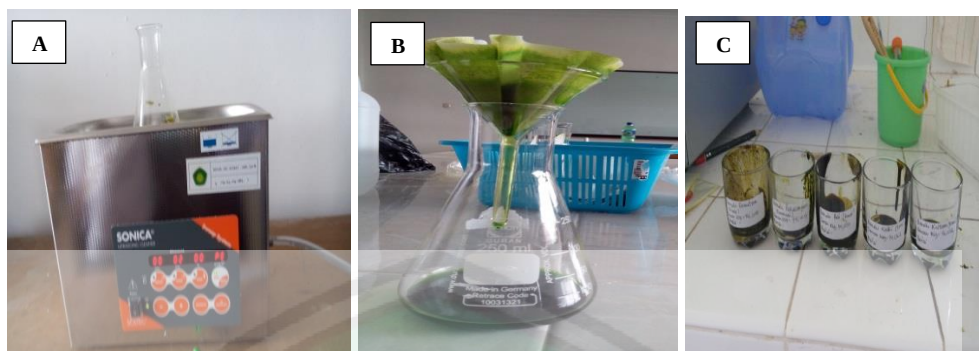
Ekstraksi yang dilakukan oleh peneliti pada tahap ini bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada simplisia daun *D. pentandra*. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode ultrasonik. Salah satu keunggulan metode ini adalah untuk mempercepat proses ekstraksi dibanding dengan ekstraksi konvensional. Metode ultrasonik ini lebih aman, lebih singkat dan meningkatkan jumlah rendemen kasar. Ultrasonik juga dapat menurunkan suhu operasi pada ekstrak yang tidak tahan panas, sehingga cocok untuk diterapkan pada ekstraksi senyawa bioaktif tidak tahan panas (Zou, 2014).

Daun *D. pentandra* diekstraksi dengan pelarut etanol 96% karena pelarut ini dapat melarutkan zat yang bersifat polar, semipolar dan nonpolar. Ditimbang

masing-masing sampel dari berbagai daerah sebanyak 50 gram dengan timbangan analitik dan dimasukkan ke dalam erlenmayer. Etanol 96% sebanyak 500 ml dimasukkan kedalam masing-masing erlenmayer dan diekstraksi dalam *ultrasonik bath* selama 18 menit. Dilakukan penyaringan untuk mendapatkan filtrat yang diinginkan, penyaringan dilakukan dengan menggunakan kertas saring supaya filtrat dapat dipisahkan dari residunya. Prinsip penyaringan adalah berdasarkan ukuran molekul, molekul yang berukuran besar akan tertahan pada kertas saring. Filtrat yang diperoleh, dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 60 °C. Alat ini menggunakan prinsip vakum destilasi, sehingga tekanan akan menurun dan pelarut akan menguap dibawah titik didihnya. *Rotary evaporator* sering digunakan untuk pemekatan ekstrak dibandingkan dengan alat lain yang memiliki fungsi sama karena alat ini mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih sehingga zat yang terkandung di dalam pelarut tidak rusak oleh suhu tinggi (Pangestu, 2011). Hasil ekstrak pekat ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel 5.2 Hasil ekstraksi ultrasonik ekstrak etanol 96 % daun *D. pentandra*.

No	Lokasi Pengambilan Sampel	Berat Ekstrak	Berat Ekstrak pekat	Rendemen (%) (b/b)
1	Jawa Timur	50,7329 g	5,2402 g	10,32%
2	Jawa Tengah	50,7206 g	1,4861 g	2,93%
3	Bali	50,7926 g	4,0458 g	7,95%
4	Sumatra Selatan	50,7187 g	4,8469 g	9,54%
5	Kalimantan Utara	50,7177 g	3,0810 g	6,07%



Gambar 5.3 Ekstraksi; A). Ultrasonik bath, B). Penyaringan, C). Ekstrak kental *D. pentandra*.

Ekstrak pekat yang diperoleh berwarna hijau tua. Rendemen ekstrak dihitung berdasarkan perbandingan berat akhir (berat ekstrak yang dihasilkan) dengan berat awal dikalikan 100%. Nilai rendemen dikorelasikan dengan nilai LC_{50} yang didapatkan dari uji toksisitas menggunakan uji korelasi pearson. Uji korelasi pearson merupakan salah satu ukuran korelasi yang digunakan untuk mengukur kekuatan dan arah hubungan linier dari dua variabel.

Tabel 5.3 Hasil uji korelasi pearson antara rendemen dan nilai LC_{50}

Correlations		Rendemen	LC_{50}
Rendemen	Pearson Correlation	1	.105
	Sig. (2-tailed)		.933
	N	4	3
LC_{50}	Pearson Correlation	.105	1
	Sig. (2-tailed)	.933	
	N	3	3

Dari tabel 5.3 didapatkan nilai pearson sebesar 0.105 dengan sig. (2-tailed) sebesar 0.933 sehingga diputuskan antara nilai rendemen dan nilai LC_{50} memiliki korelasi tidak signifikan karena nilai Pearson Correlation tidak sama dengan nol. Jika sig diatas 0.05 maka H_0 diterima dan jika sig dibawah 0.05 maka H_0 ditolak.

5.5 Uji Toksisitas dengan Metode MTT

Ekstrak dari masing-masing daerah diuji toksisitasnya dengan menggunakan metode MTT. Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan sel normal (vero). Sel vero sering digunakan dalam penelitian uji toksisitas karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan dalam replikasi yang tidak terbatas dan mudah diganti dengan *frozen stok*. Pada tahap penyiapan sel, sel vero dikeluarkan dari *freezer* suhu -80°C . sel dihangatkan dalam penangas air (37°C) selama 2-3 menit. Setelah cair dipindahkan kedalam *conical tube* yang berisi 10 ml media M199. Media M199 mengandung garam earle, 2,200mg/L sodium bikarbonat, L-glutamine dan 25 mM HEPES buffer (Price and Staines, 2004). Garam earle merupakan larutan garam isotonis yang berfungsi mempertahankan tekanan larutan pada media sel, L-glutamine merupakan jenis asam amino yang berfungsi untuk mengatur pertumbuhan dan fungsi sel, sodium bikarbonat dan HEPES buffer digunakan untuk mempertahankan pH larutan. Komposisi media *cell line* yang digunakan adalah FBS 10%, penicillin 2%, fungizone 0,5% dan ad media M199. Kebanyakan media yang digunakan mengandung serum (garam isotonis, asam amino, vitamin dan glukosa. Selain mengandung serum media juga diperkaya dengan antibiotik untuk mencegah kontaminasi bakteri. FBS berfungsi sebagai faktor pertumbuhan, penicillin sebagai antibiotik dan fungizon sebagai antifungi. Umumnya pertumbuhan sel yang baik terjadi pada pH 7-7,6. Media tumbuh juga membutuhkan penyangga karena terjadinya dua kondisi yaitu penggunaan flask terbuka menyebabkan masuknya O_2 dan meningkatkan pH dan konsentrasi sel yang tinggi menyebabkan diproduksi CO_2 dan asam laktat, hal

ini menyebabkan turunnya pH. Kedua kondisi ini dihadapi dengan memberikan buffer kedalam media dan kedalam incubator dialirkan CO₂ dari luar (Muti'ah, 2014). Proses selanjutnya sel vero dalam media M199 diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37°C dengan konsentrasi CO₂ 5% dan O₂ 95%. Kemudian sel vero disentrifugasi supaya terpisah dari supernatannya dan dipindahkan kedalam *culture disk* yang berisi 10 ml M199.

Kondisi dan jumlah sel diamati dengan menggunakan *mikroskop inverted*. Digunakannya *mikroskop inverted* bertujuan untuk melihat sampel dari posisi terbalik yang membantu peneliti melihat gambar tegak sampel. Biasanya kultur sel berkumpul di dasar wadah saat diamati dan satu-satunya cara untuk mengamati yaitu dengan mengamatinya melalui bagian bawah wadah. Apabila sel sudah konfluen (70-85%) maka dapat dilakukan pemanenan sel. Jika media kultur berubah menjadi keruh (ditandai dengan perubahan warna) maka dilakukan pergantian media. Media dibuang dengan mikropipet, sel dicuci dengan PBS 2 kali dan ditambahkan tripsin EDTA agar sel terlepas dari flask, lalu diinkubasi selama tiga menit dalam incubator. Setelah inkubasi ditambahkan 5 ml M199 untuk menginaktifkan tripsin. Sel diresuspensi dengan menggunakan mikropipet sampai sel terlepas satu-satu dan tidak menggerombol, kondisi ini diamati dengan menggunakan *mikroskop inverted*. Jika sudah dipastikan sel tidak menggerombol, sel diinkubasi selama 24 jam.

Selanjutnya dilakukan perhitungan sel vero, diambil 10 µL panen sel dengan pipet mikro dan dipindahkan ke *homocytometer*. Sel dihitung dibawah *mikroskop inverted* dengan *counter*. Dihitung sel pada 4 kamar *homocytometer*,

sebelum diletakkan pada *homocytometer* diberi tripan biru agar terlihat sel yang mati dan hidup. Sel yang berwarna biru merupakan sel yang mati dan sel yang berada di batas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung. Dari hasil perhitungan dengan menggunakan *counter* didapatkan jumlah sel sebanyak $146,75 \times 10^4$. Pada uji toksisitas ini digunakan 96 *well plate* yang masing-masing semuran berisi 10^4 sel. Dilakukan perhitungan sel yang dibutuhkan dengan cara mengalikan 10^4 sel yang dibutuhkan tiap semuran dengan 100 (hasil penggenapan dari jumlah semuran) dibagi dengan sel yang terhitung. Dari hasil perhitungan diketahui bahwa diperlukan pengambilan 0,7 ml dari panen sel dan ditambah 9,3 ml M199. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator.

Preparasi sampel dilakukan pada hari selanjutnya, diambil ekstrak kental *D. pentandra* sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 100 μL Dimetil Sulfoksida (DMSO) dan divortex. Selanjutnya ditambahkan media M199 sampai volume 1000 μL . DMSO berfungsi sebagai *buffer* dan *cosolvent* agar ekstrak dapat larut dengan baik. Kadar DMSO yang digunakan pada penelitian ini 1% v/v. DMSO dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar dan tidak memiliki efek samping terhadap sel normal. Larutan tersebut digunakan sebagai larutan stok. Selanjutnya ekstrak dibuat seri konsentrasi yaitu dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5. Diambil sel dari incubator, dibuang media dengan membalik plate. Treatment dilakukan dengan memasukkan seri konsentrasi sampel yang sudah dibuat dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 x (triplo). Hal ini bertujuan untuk mengetahui signifikan peningkatan dosis konsumsi dengan efek peningkatan

proliferasi sel yang dihasilkan. Selanjutnya ditambahkan kontrol sel dan kontrol media. Diinkubasi sel yang sudah ditreatment selama 24 jam dalam inkubator.

Pemberian larutan MTT dilakukan setelah sel selesai diinkubasi dengan cara membuang media yang mengandung sampel dengan membalikkan plate. Ditambahkan 100 μ L larutan MTT pada tiap semuran dengan menggunakan mikropipet. Diinkubasi selama 3-4 jam sampai terbentuk kristal formazan kemudian ditambah larutan *stopper* (SDS). SDS berfungsi sebagai detergen yang dapat melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein (Maulana, dkk, 2010). Warna ungu yang tampak pada 96 *well plate* sebanding dengan jumlah sel *vero* yang masih hidup. Semakin berkurang warna ungu yang terbentuk menandakan bahwa semakin banyak sel *vero* yang mati. 96 *well plate* yang sudah ditambah larutan *stopper* diletakkan dalam ruangan gelap semalaman. Keesokan harinya dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Berikut ini adalah hasil dari pembacaan absorbansi.



Gambar 5.4 96 *well plate* setelah pemberian larutan MTT

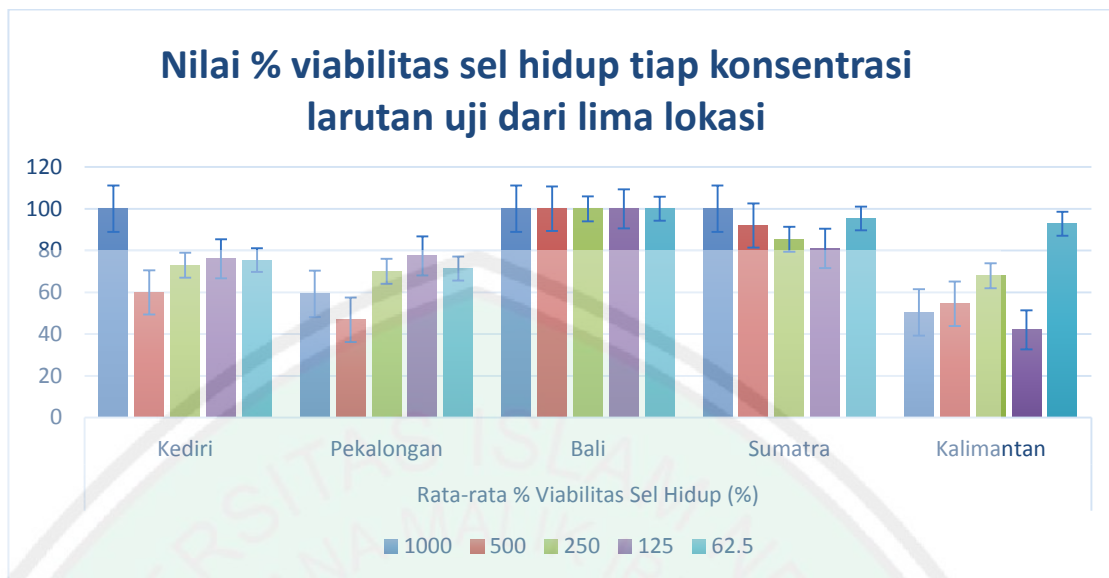
Dari gambar diatas diketahui bahwa sel vero membentuk kristal formazan berwarna ungu yang menandakan banyaknya sel yang masih hidup. Semakin banyak *cell line* yang hidup semakin besar absorbansinya dan semakin banyak pula warna ungu yang terbentuk. Begitu pula sebaliknya semakin banyak *cell line* yang mati maka semakin kecil absorbansi dan semakin berkurang warna ungu yang terbentuk. Dapat diambil kesimpulan semakin toksik zat terhadap *cell line* vero maka absorbansi yang didapat semakin rendah. Hasil % viabilitas sel hidup ditunjukkan pada Tabel dibawah ini.

Tabel 5.4 % Rata-rata viabilitas sel hidup pada tiap konsentrasi larutan uji

Konsentrasi	Rata-rata viabilitas sel hidup (%) $\pm$ SD*				
	Kediri	Pekalongan	Bali	Sumatra	Kalimantan
1000	100 $\pm$ 0	59.26 $\pm$ 0.62	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	50.40 $\pm$ 5.19
500	59.98 $\pm$ 3.23	46.88 $\pm$ 6.12	100 $\pm$ 0	91.98 $\pm$ 0.27	54.47 $\pm$ 4.48
250	72.98 $\pm$ 15.67	70.10 $\pm$ 17.01	100 $\pm$ 0	85.34 $\pm$ 2.77	67.93 $\pm$ 19.24
125	76.06 $\pm$ 7.59	77.41 $\pm$ 19.71	100 $\pm$ 0	81.03 $\pm$ 15.48	42.09 $\pm$ 4.77
62.5	57.45 $\pm$ 0.46	71.36 $\pm$ 4.40	100 $\pm$ 0	95.39 $\pm$ 7.97	92.86 $\pm$ 3.69

*Rata-rata viabilitas $\pm$ simpangan deviasi, replikasi 3 kali

Untuk mempermudah pembacaan dari tabel 5.4 dapat dibuat grafik % viabilitas sel hidup pada tiap konsentrasi larutan uji terhadap sel uji.



Gambar 5.5 Grafik nilai % viabilitas sel hidup tiap konsentrasi larutan uji

Data % viabilitas sel hidup masing-masing larutan uji yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *Microsoft excel* sehingga didapatkan nilai LC_{50} dari masing-masing larutan uji. Nilai LC_{50} didapatkan dari persamaan yang didapatkan dari kelima daerah dengan tiga kali pengulangan, dimasukkan pada y nilai 50% dan cari antilog dari hasil yang didapatkan. Hasil LC_{50} masing-masing larutan uji terhadap sel vero ditunjukkan pada Tabel 5.5

Tabel 5.5 Rata-rata nilai LC_{50} ekstrak etanol *D. pentandra* terhadap sel vero

Nama Daerah	Rata-rata $LC_{50} \pm SD^*$
Kediri	26.61 ± 16.20
Pekalongan	1583.75 ± 561.09
Bali	-
Sumatra	4845.32 ± 92.13
Kalimantan	798.28 ± 171.59

*Rata-rata $LC_{50} \pm$ Simpangan Deviasi, Replikasi 3 kali

Nilai LC_{50} yang didapatkan menggambarkan toksisitas ekstrak terhadap *cell line*. Sampel dikatakan toksik jika memiliki nilai LC_{50} kurang dari 1000 (Meyer *et al.*, 1982). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel dari Kediri dan Kalimantan memiliki efek toksik terhadap sel normal sedangkan sampel dari Pekalongan dan Sumatra tidak memiliki efek toksik terhadap sel normal. Sampel dari Bali memiliki perbedaan dengan keempat sampel uji, % viabilitas dari tiap konsentrasi yang didapatkan adalah 100. Oleh karena itu tidak didapatkan data persamaan garis yang dilakukan melalui analisis data menggunakan excel. Hal ini terjadi kemungkinan karena sampel *D. pentandra* dari Bali tidak menimbulkan efek sama sekali terhadap sel vero, sehingga sel vero yang ada dalam 96 *well plate* tidak ada yang mati. Dari tabel 5.4 diketahui bahwa sampel dari Kediri mempunyai efek toksik yang paling tinggi sedangkan sampel dari Sumatra mempunyai efek toksik yang paling rendah.

Tabel 5.6 Karakteristik Lokasi Pengambilan Sampel

No	Lokasi	Ketinggian (mdpl)	Suhu Rata- rata (°C)	Curah Hujan (mm)	Tipe Iklim
1	Desa Sumbergayam kec.Kepung Kab.Kediri Jawa Timur	222	25,8	1886	Aw
2	Kec.Pekalongan Timur Kab.Pekalongan Jawa Tengah	8	26,6	2620	Am
3	Desa Nangka Utara Kec.Tonja Kab.Badung Denpasar Bali	51	26,4	1833	Am
4	Kel.Gunung Batin Baru Kec.Terusan Nunyai Kab.Lampung Tengah Sumatra Selatan	27	26,8	2122	Af
5	Kel.Tanjung Selor Ilir Kec.Tanjung Seloe Kab.Bulungan Kalimantan Utara	80	26,8	2738	Af

Dari tabel 5.6 diketahui bahwa Kediri merupakan daerah yang memiliki ketinggian paling tinggi yaitu 222 mdpl. Pada tabel sebelumnya diketahui bahwa sampel dari Kediri memiliki efek toksisitas paling tinggi. Urutan tingkat toksisitas dari yang paling tinggi adalah Kediri, Kalimantan, Pekalongan dan Sumatra. Dari data yang diperoleh dapat ditarik kesimpulan bahwa ketinggian tempat mempengaruhi tingkat toksisitas ekstrak *D. pentandra*. Semakin tinggi elevasi suatu tempat maka semakin toksik efek yang ditimbulkan.

5.6 Analisis Data

Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan batas kepercayaan 95%. Data dianalisis menggunakan SPSS 16 for Windows. Uji statistik data menggunakan One-way ANOVA karena dalam penelitian ini data yang digunakan memiliki variable dengan kelompok yang berbeda. Uji normalitas berdasarkan Shapiro-Wilk didapatkan nilai p lebih dari 0,05 menandakan bahwa data normal. Berdasarkan uji tukey HSD nilai p yang diperoleh lebih dari 0,05 berarti H_0 diterima dengan demikian dinyatakan bahwa data homogen. Data ini dapat dilihat pada tabel yang ada di lampiran 6. Selanjutnya dilakukan analisis dengan one way ANOVA dapat dilihat dari tabel 5.7

Tabel 5.7 Hasil Uji One Way ANOVA

No.	Lokasi (I) – Lokasi (J)	Signifikasi	Keterangan
1.	Jawa Timur – Jawa Tengah	0.000	Bermakna
2.	Jawa Timur – Sumatra	0.000	Bermakna
3.	Jawa Timur – Kalimantan	0.013	Bermakna
4.	Jawa Tengah – Sumatra	0.000	Bermakna
5.	Jawa Tengah – Kalimantan	0.012	Bermakna
6.	Sumatra – Kalimantan	0.000	Bermakna

Dari tabel diatas diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna antar daerah Jawa Timur – Jawa Tengah, Jawa Timur – Sumatra, Jawa Timur – Kalimantan, Jawa Tengah – Sumatra, Jawa Tengah – Kalimantan dan Sumatra – Kalimantan. Diketahui bahwa antar daerah memiliki perbedaan bermakna jika nilai p kurang dari 0.05.

5.7 Korelasi Hasil Penelitian dengan Ayat Al-Qur'an

Penelitian dengan judul “Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 96% Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dari Berbagai Daerah di Indonesia Terhadap Sel Vero” telah dilakukan dan hasil yang diperoleh adalah efek toksik yang dihasilkan oleh tumbuhan *D. pentandra* dari kelima daerah sebagian besar menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini dipengaruhi oleh elevasi tempat tumbuh tanaman dan beberapa faktor lainnya seperti tanah, curah hujan, suhu dan lain sebagainya.

Allah SWT Maha Kuasa atas segala sesuatu, Dialah pencipta langit dan bumi. Maha Besar Allah SWT yang telah menciptakan air, udara, tanah, tumbuh-tumbuhan dan hewan untuk menopang kehidupan manusia di bumi. Dialah yang mengatur, yang memutuskan, yang memerintahkan dan yang menundukkannya. Tanah merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas dari tumbuhan yang tumbuh di atasnya. Tanah merupakan lapisan permukaan bumi yang berfungsi sebagai tempat tumbuh berkembangnya tumbuhan, selain itu tanah juga berperan sebagai penyuplai hara atau nutrisi untuk tumbuh-tumbuhan. Setiap tanah memiliki komposisi dan karakteristik yang berbeda maka tumbuhan yang tumbuh di atasnya pun juga memiliki perbedaan yang serupa. Allah berfirman dalam surah Al-A'raaf ayat ke 58

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ ۚ وَالَّذِي خَبُثَ لَا تَخْرُجُ إِلَّا نَكِدًا ۚ كَذَٰلِكَ نُصَرِّفُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ ﴿٥٨﴾

Artinya: “Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulangi tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur”. (QS.7:58)

Berdasarkan tafsir jalalain karangan Muhammad dan Abdirrahman “Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah” yakni tanah yang subur, tanaman-tanamannya tumbuh dengan baik dengan izin Allah SWT. Ini adalah perumpamaan bagi orang mukmin yang mau mendengar nasihat kemudian mengambil manfaat darinya. Sedangkan “dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana” yakni tanah yang tandus, tanaman-

tanamannya sulit untuk tumbuh dan bertahan hidup. Ini adalah perumpamaan bagi orang kafir yang dengan susah payah mengambil manfaat dari orang lain. Demikianlah cara Allah menjelaskan ayat-ayat itu (Al-A'raaf ayat 58) bagi orang-orang yang bersyukur (Muhammad dan Abdirrahman, 2010).

Al-Qur'an adalah sumber bimbingan dan argumen bagi seluruh makhluk, tetapi manfaatnya hanya dapat dirasakan oleh orang-orang soleh dan mereka yang bersyukur yang dapat menikmati kandungannya. Allah SWT telah menurunkan Al-Qur'an sebagai petunjuk bagi umat manusia. Dengan Al-Qur'an Allah SWT membukakan hati yang tertutup, mata yang buta, dan telinga yang tuli bagi orang-orang yang dikehendakiNya.

BAB VI

PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Terdapat perbedaan bermakna dari hasil uji toksisitas ekstrak etanol 96% *D. pentandra* daerah Kediri – Pekalongan, Kediri – Sumatra, Kediri – Kalimantan, Pekalongan – Sumatra, Pekalongan – Kalimantan, dan Sumatra – Kalimantan berdasarkan nilai LC_{50} .
2. *D. pentandra* dari daerah Sumatra memiliki toksisitas paling rendah dengan nilai LC_{50} 4845.32 $\mu\text{g/ml}$. Nilai LC_{50} yang diperoleh dari daerah Kediri, Pekalongan dan Kalimantan adalah 26.61, 1583.75 dan 798.28 $\mu\text{g/ml}$.

6.2 Saran

1. Ekstrak *D. pentandra* dari daerah Pekalongan dan Sumatra dapat direkomendasikan sebagai bahan baku untuk produk Fitofarmaka dengan melalui uji praklinik dan uji klinik terlebih dahulu.
2. Perlu diadakan penelitian uji toksisitas *D. pentandra* terhadap sel fibroblast NIH-3T3 dan dilanjutkan dengan uji toksisitas secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, M.M. 2006. *Anti Inflammatory Activities of Nigella sativa Linn* (Kalongi, black seed), (online), (<http://lailanurhayati.multiply.com/journal>, diakses 30 November 2016).
- Al-Maraghi, Ahmad, M. 1992. *Terjemah Tafsir Al-Maraghi Jilid 14*. Semarang: CV. Toha Putra.
- Alexander, A.; Qureshi, A.; Kumari, L.; Vaishnav, P.; Sharma, M.; Saraf, S.; Saraf, S. Role of herbal bioactives as a potential bioavailability enhancer for Active Pharmaceutical Ingredients. *Fitoterapia* 2014, 97, 1–14.
- Artanti N, Ma`arifa Y and Hanafi M., 2006. Isolation and identification of active antioxidant compound from star fruit (*Averrhoa carambola*) mistletoe (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) ethanol extract. *J App Sci*; 6: 1659–1663.
- Artanti, N., Firmansyah, T and Darmawan, A., 2012. Bioactivities Evaluation of Indonesian Mistletoes (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) Leaves Extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (01); 24-27.
- Astuti, E., Pranowo, D and Puspitasari, S.D., 2006. Cytotoxicity of *Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Fruit Meat and Seed Ethanol Extract to Mononuclear Perifer Normal Cell of Human Body. *Indo. J. Chem.*, 6 (2), 212 – 218.
- Baker, G.B, S. Dunn & A. Latja. 2007. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Practical neurochemistry methods*, vol. 6. New York: Springer Science.
- Badan POM RI. 2011. *Mari minum obat bahan alam dan jamu dengan baik dan benar*. Info POM.
- Basmal, J., Amini, S., Sugiyono, Murniyati, 2009, Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta.
- BPOM RI, 2014. *Pedoman Uji Toksisitas Non Klinik Secara in Vitro*. Jakarta: BPOM.
- Cameron, D.K and Wang, Ya-Jane. 2006. Application of Protease and High-Intensity Ultrasound in Corn Starch Isolation from Degermed Corn Flour. *Journal Food Science University Of Arkansas* Volume 83, Number 5. Page 505-509.

- CCRC. 2009. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, UGM.
- Colquhoun, I.J., 2007. Use of NMR for Metabolic Profiling in Plant Systems. *J. Pestic Sci* 32(3): 200-212.
- Crowther., J.R. 2003. *The ELISA guide book, Methodes in molecular biology*. Vol 149, by Huma press.
- Depkes RI. (2006). *Kebijakan Obat Tradisional Nasional*. Jakarta: Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Diktorat Jendral POM-Depkes RI.
- Eddy. 2010. *Manfaat Benalu Mangga*. <http://transferfactorformula.com/manfaat-benalu-mangga/>. Online. Diakses tanggal 2 January 2017.
- Endharti, A.T., Wulandari, A., Listyana, A., Norahmawati, E., Permana, S., 2016. Dendrophthoe Pentandra (L.) Miq Extract Effectively Inhibits Inflammation, Proliferation and Induces P53 Expression on Colitis-Associated Colon Cancer. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.
- Fajriah, S, Darmawan, A, Sundowo, A, Artanti, N. 2007. Isolasi Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Etilasetat Daun Benalu Dendrophthoe pentandra L. Miq yang Tumbuh pada Inang Lobi-lobi. *Jurnal Kimia Indonesia* vol. 2 no. 1 hal. 17-20.
- Fang, X.K., Gao, J., Zhu, D.N. 2008. Kaempferol and quercetin isolated from Euonymus alatus improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sci*; 82: 615–22.
- Fatchurrozak., Suranto dan Sugiyarto. 2013. Pengaruh Ketinggian Tempat Terhadap Kandungan Vitamin C Dan Zat Antioksidan Pada Buah Carica Pubescens Di Dataran Tinggi Dieng. *Jurnal El-Vivo* Vol.1, No.1, hal 15 – 22.
- Flower, A., Witt, C., Liu, J.P., Ulrich, M.G., Yu, H., Lewith, G., 2012. Guidelines for Randomised Controlled Trials Investigating Chinese Herbal Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*; 140:550-554.
- Ginting, P.M. 2008. Penentuan Kadar Air Inti Sawit pada Kernel Silo Menggunakan Alat Moisture Analyzer di PT. PN III Rambutan Tebing Tinggi. *Karya Ilmiah. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatra Utara. Medan*.

- Govindaraghavan, S., Sucher N.J., 2015. Quality Assessment of Medicinal Herb and Their Extracts: Criteria and Prerequisites for Consistent Safety and Efficacy of Herbal Medicines. *Epilepsy & Behavior*; 52, Part B:363-371.
- Govorkova, E.A., Murti, G., Meignier, B., Taisne, C.D., Webster, R.G. 1996. African Green Monkey Kidney (Vero) Cells Provide an Alternative Host Cell System for Influenza A and B Viruses. *Journal of Virology* Vol.70 No. 8. American Society for Microbiology.
- Gunawan, D dan Mulyani, S., 2010. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*jilid 2. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Gusdinar T, Herowati R, Kartasmita RE and Adnyana. Anti-inflammatory and antioxidant activity of quercetin-3,3',4'-triacetate, *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2011; 6 (2): 182–188.
- Handayani, Hana., Sriherfyna, Feronika H., dan Yunianta. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode *Ultrasonic Bath* (Kajian Rasio Bahan : Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Volume 4, Nomor 1: 262-272.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penj. Padmawinata, K. dan Soediro, I. Bandung: Penerbit ITB.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E, M. 2009. *Farmakognosi dan Fitoterapi*. Jakarta: EGC.
- Hilda, D. 2015. Uji Antikanker dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) Terhadap *Cell Line* Kanker Payudara T47d. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Ikawati, M., Wibowo, A. E., Octa, N.S., Adelina, S., 2008. *Pemanfaatan Benalu Sebagai Agen Antikanker*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada, Fakultas Farmasi.
- Ishizu T, Winarno H, Tsujino E, Morita T, Shibuya H. 2002. Indonesian Medicinal Plants. XXIV Stereochemical Structure of Perseitol K1 Complex Isolated from the Leaves of *Scurrula fusca* (Loranthaceae). *Chemical Pharmacology*; 50(4): 489-492.
- Junaedi, Iin Indrayani. 2003. Kandungan Selenium Produk Fermentasi Daun Benalu Teh *Scurrula atropurpurea* (BI) Danser oleh Simbiosis *Saccharomyces-Acetobacter*. *Skripsi*. Jurusan Kimia. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

- Katrina., Sha E., Debbie A., 2008. Systematic Review of the Association Between Circulating Interleukin-6 (IL-6) and Cancer. *European Journal of Cancer*; 44, 937-945.
- Katrin, Soemardji AA, Soeganda AG, Soediro I. 2005. Toksisitas Akut Isolat Fraksi n-Hexana dan Etanol Daun *Dendrophthoe Pentandra* (L) Mig yang Mempunyai Aktivitas Imunostimulan. *Majalah Farmasi Indonesia* 8(4): 227-231.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Terjemahan A. Saptorahardjo. Jakarta: UI Press.
- Kim, E.J., Kwon, J., Park, S.H., Park, C., Seo, Y.B., Shin, H.Y., Kim, H.K., Lee, K.S., Choi, S.Y., Ryu, D.H., Hwang, G.S., 2011. Metabolite Profiling of *Angelica gigas* from Different Geographical Origins Using ¹H-NMR and UPLC-MS Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(16):8806-8815.
- Kuldikole, J. 2002. Effect of Ultrasound, Temperature and Pressure Treatments on Enzyme Activity and Quality Indicators of Fruit and Vegetables Juices. Berlin: *Dissertation der Technischen Universität Berlin*.
- Li, H., L. Pordesimo, and J. Weiss. "High Intensity Ultrasound-assisted Extraction of Oil from Soybeans." *Food Research International* 37 (2004): 731–738.
- Lu, F.C. 1995. *Toksikologi Dasar (Azas, Organ Sasaran dan Penilaian Resiko)* Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia.
- Loomis, T.A. 1978. *Toksikologi Dasar*. Edisi ketiga. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Manggau, M., Alam, G., Mufidah., Bahar, A., Wahyudin, E. 2013. Selektivitas Penghambatan Cox1-2 dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba cepukan (*Physalis angulata* Linn.). *Jurnal. Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin*.
- Maria van Iersel, M. Sensible Sonochemistry. *Doctor of Philosophy Dissertation*, Eindhoven: Eindhoven University of Technology, 2008.
- Maulana, R., dkk. 2010. *Isolasi Tanaman dan Elektroforesis DNA*. Jakarta: Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.
- Meyer et al. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34.

Muhammad, A.J dan Abdirrahman, A.J., 2010. *Tafsir Jalalain*. Pustaka ELBA: Surabaya.

Mulyono. 2008. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara.

Muti'ah, R. 2004. *Pengembangan Fitofarmaka Antikanker*. Malang: LP2M dan UIN MALIKI PRESS.

Nor, Y.A., Sulong, N.H., Mel, M., Salleh, H.M., Sopyan, I. 2010. The Growth Study of Vero Cells in Different Type of Microcarrier. *Scientific Research. Materials Sciences and Applications*, 1, 261-266.

Notoatmodjo, S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.

Novak, I., P. Janeiro, M. Seruga, dan A.M. Oliveira-Brett. —Ultrasound Extracted Flavonoids from Four Varieties of Portuguese Red Grape Skins Determined by Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytica Chimica Acta* 630 (2008): 107–115.

Nuraini, Annisa Dian. 2007. Ekstraksi Komponen Antibakteri dan Antioksidan dari Biji Teratai (*Nymphaea pubescens* Willd). *Skripsi*. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

Nurhasanah,S. 2001. *Efek Mematikan Biji Sirsak (Annoma muricata) Terhadap Larva Aedes Sp*. Surakarta: FK Universitas Sebelas Maret.

Nurnasari, E dan Djumali. 2010. Pengaruh Kondisi Ketinggian Tempat Terhadap Produksi dan Mutu Tembakau Temanggung. *Jurnal. Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri* 2(2) :45-59.

Nugroho, A.E., Hermawan, A., Putri, D.D.P., Novika, A., Meiyanto, E. 2013. Combinational Effects of Hexane Insoluble Fraction of *Ficus septica* Burm.F. and Doxorubicin Chemotherapy on T47D Breast Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.

Pangestu. 2011. *Teknologi Pengolahan Hasil Pertanian*. Surabaya: Bina Ilmu.

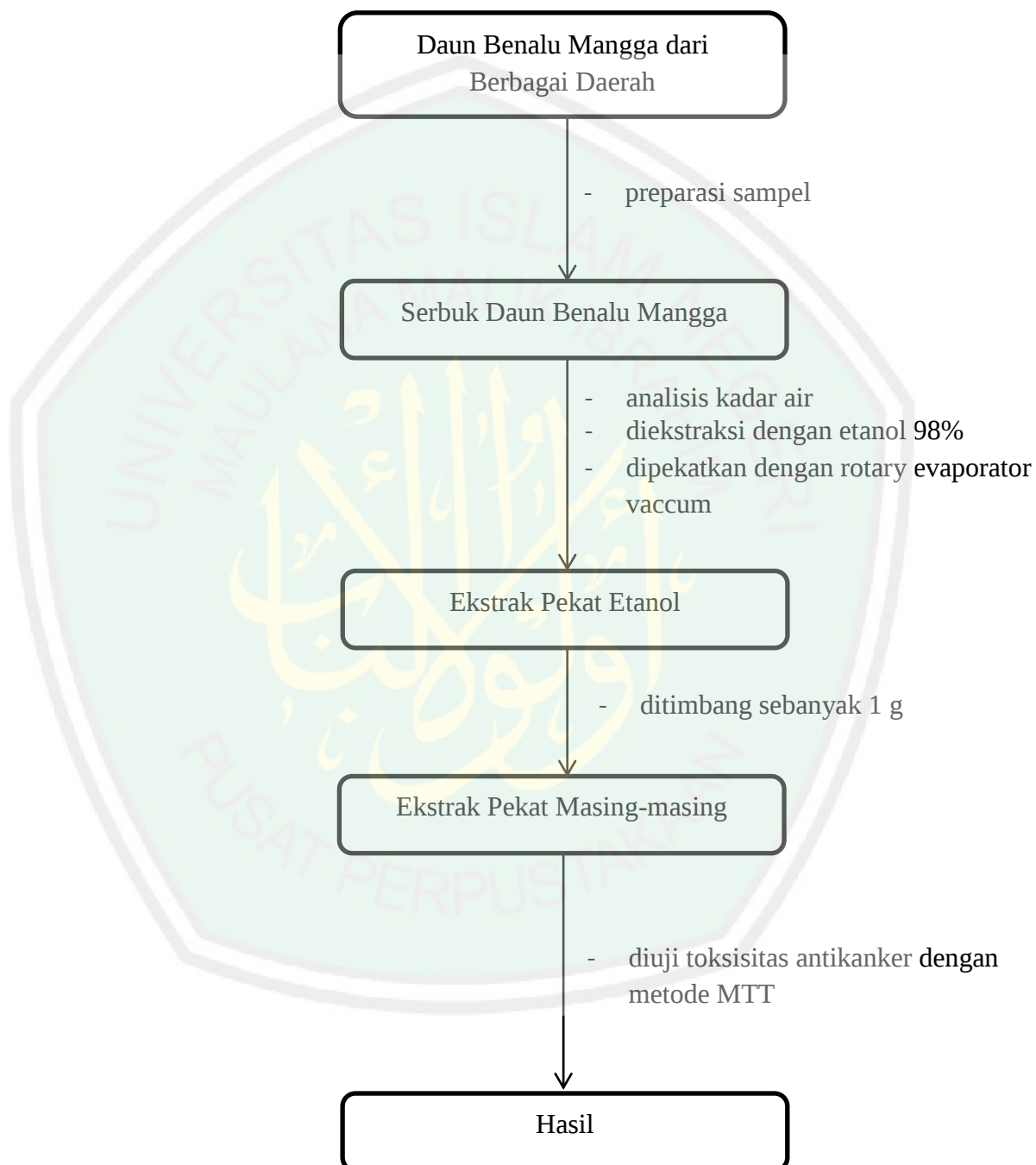
Péres, V.L., J. Saffia, M.I.S. Melecchi, F.C. Abadc, R.A. Jacques, M.M. Martinez, E.C. Oliveira, and E.B. Caramao. "Comparison of Soxhlet, Ultrasound-assisted and Pressurized Liquid Extraction of Terpenes, Fatty Acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth." *Journal of Chromatography A* 1105 (2006): 115–118.

- Pranowo, dodyk., Noor, Erliza., Maddu, akhiruddin. 2015. Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L.) sebagai Bahan Sediaan Obat. *Prosiding seminar agroindustry dan locakarya FKPT-TPI*, program study TIP-UTM.
- Price, P., Staines, D. 2004. Advanced Media: Reduced Sera Solution. *Quest* 3, 25-30.
- Qiu, H and Gilbert, M.G., 2003. *Loranthaceae*. In: Wu, Z.Y., Raven, P.H., Hong, D.Y., *Flora of China*. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press: 220-239.
- Quthb, Sayyid. 2008. *Tafsir Fi Zhilalil Qur'an jilid 8*. Cetakan ketiga. Depok: Gema Insani.
- Samiran. 2005. Keanekaragaman Jenis Benalu dan Tumbuhan Inangnya di Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur. *Laporan Teknik*. Pasuruan: Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
- Senthilraja, P., Kathiresan, K., 2015. In Vitro Cytotoxicity MTT Assay in Vero, HepG2 and MCF-7 Cell Lines Study of Marine Yeast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(3):080-084.
- Septyaningsih, D. 2010. *Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk)*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret Press.
- Srivastava, S., Ranganatha, R., Somasagara., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S.K., Srivastava, M., Choudhary, B., Raghavan, S.C. 2016. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Journal. Scientific Reports*.
- Steinberg, I.W. 2013. *High Throughput Screening Methods in Toxicity Testing*. New Jersey: John Willey & Sons, Inc.
- Subahar T. 2004. *Khasiat dan Manfaat Pare: Si Pahit Pembasmi Penyakit*. Cetakan Pertama. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Syazana, A., Zainuddin, N dan Sul'ain, M.D. 2004. Phytochemical Analysis, Toxicity And Cytotoxicity Evaluation Of Dendrophoe Pentandra Leaves Extracts. *International Journal of Applied Biological and Pharmaceutical Technology*.
- Syazana, A., Zainuddin., Dasuki, M. 2015. Antiproliferative Effect of Dendraphthoe pentandra Ekstracts Towards Human Breast

- Adenocarcinoma Cells (MCF-7). *Jurnal Teknologi Universitas Sains Malaysia*.
- Thomas. 2011. Do Modern Day Medical Herbalists Have Anything to Learn from Anglo-Saxon Medical Writings. *Journal of Herbal Medicine*; 1:42-52.
- Turalely, R., Hadanu, R., Mahulete, F. 2012. *Uji Aktivitas Sitotoksik dan Analisis Fitokimia Ekstrak Daun Kapur (Harmsiopanax Aculeatus Hamrs)*. Program Study Pendidikan Kimia. FKIP Universitas Pattimura.
- Uji, T., Sunaryo, S. and Rachman, E. 2007. Keanekaragaman Jenis Benalu Parasit Pada Tanaman Koleksi di Kebun Raya Eka Karya, Bali. Berk. *Penel Hayati*. 13: 1-5.
- Umar, Farah. 2008. *Optimasi Ekstraksi Flavonoid Total Daun Jati Belanda*. Bogor: Departement Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Usaquén-Castro, X., M. Martínez-Rubio, H. Aya-Baquero, and G. González-Martínez. "Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Red-grape (*Vitis vinifera*) Residues." *IUFoST* (2006): 1315–1324.
- Valkenburg J.L.C.H., and Bunyapraphatsara N. 2003. *Plant Resources of South-East Asia No. 12 (2) Medicinal and Poisonous Plants 2*. Bogor: PROSEA Bogor Indonesia.
- Walker, J.M. & R. Rapley. 2008. *Molecular biomethods handbook*. New York: Springer Science.
- Winata, E.W & Yunianta. 2015. Ekstraksi Antosianin Buah Murbei (*Morus Alba L.*) Metode Ultrasonic Bath (Kajian Waktu Dan Rasio Bahan : Pelarut). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 3 No 2 p.773-783.
- Zou TB, En-Qin Xia, Tai-Ping He, Ming-Yuan Huang, Qing Jia, and Hua-Wen Li. 2014. Ultrasound-Assisted Extraction of Mangeferin from Mango Leaves Using Response Surface Methodology. *Molecules* 19, 1411-1421

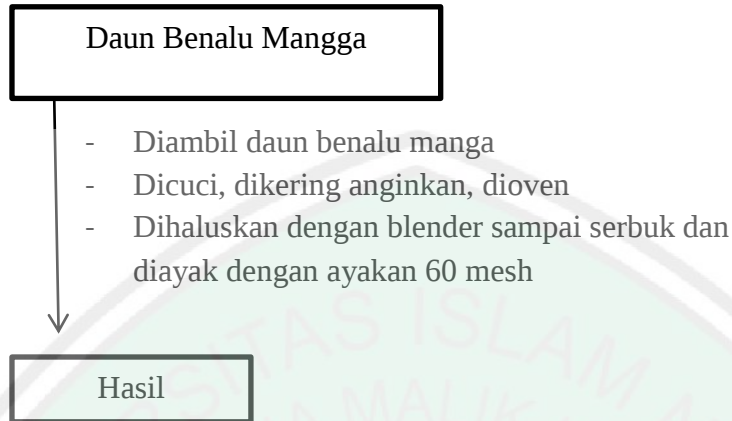
LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian

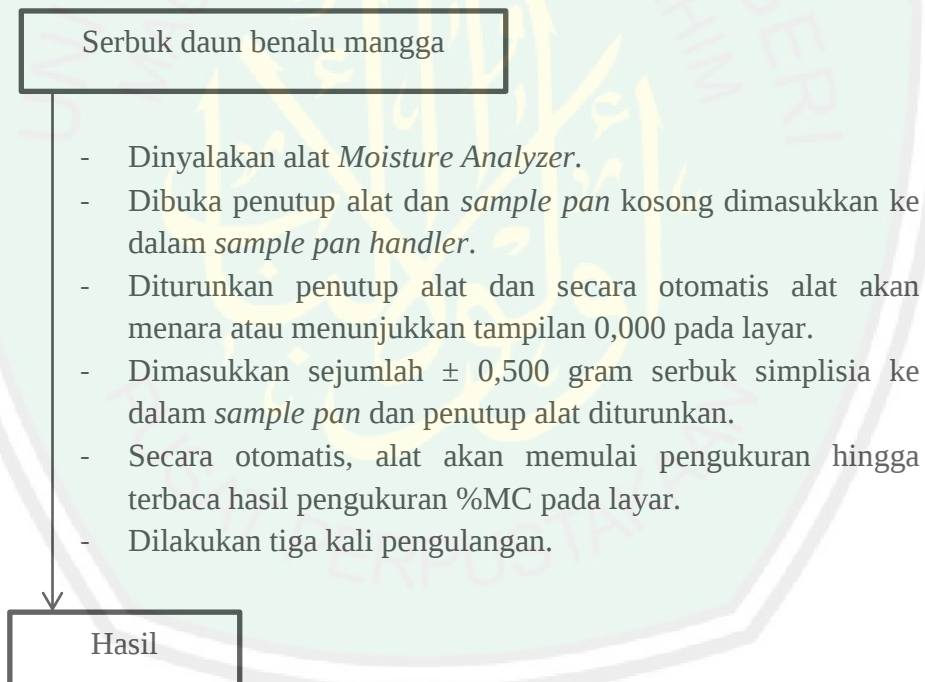


Lampiran 2. Skema kerja

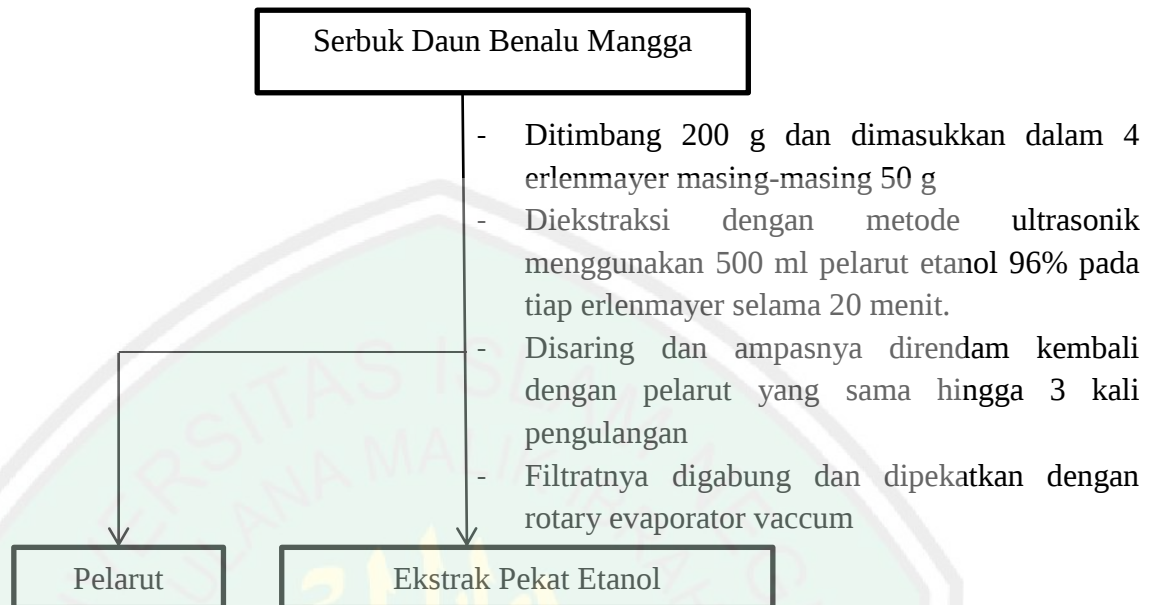
2.1 Preparasi Sampel



2.2 Analisis Kadar Air

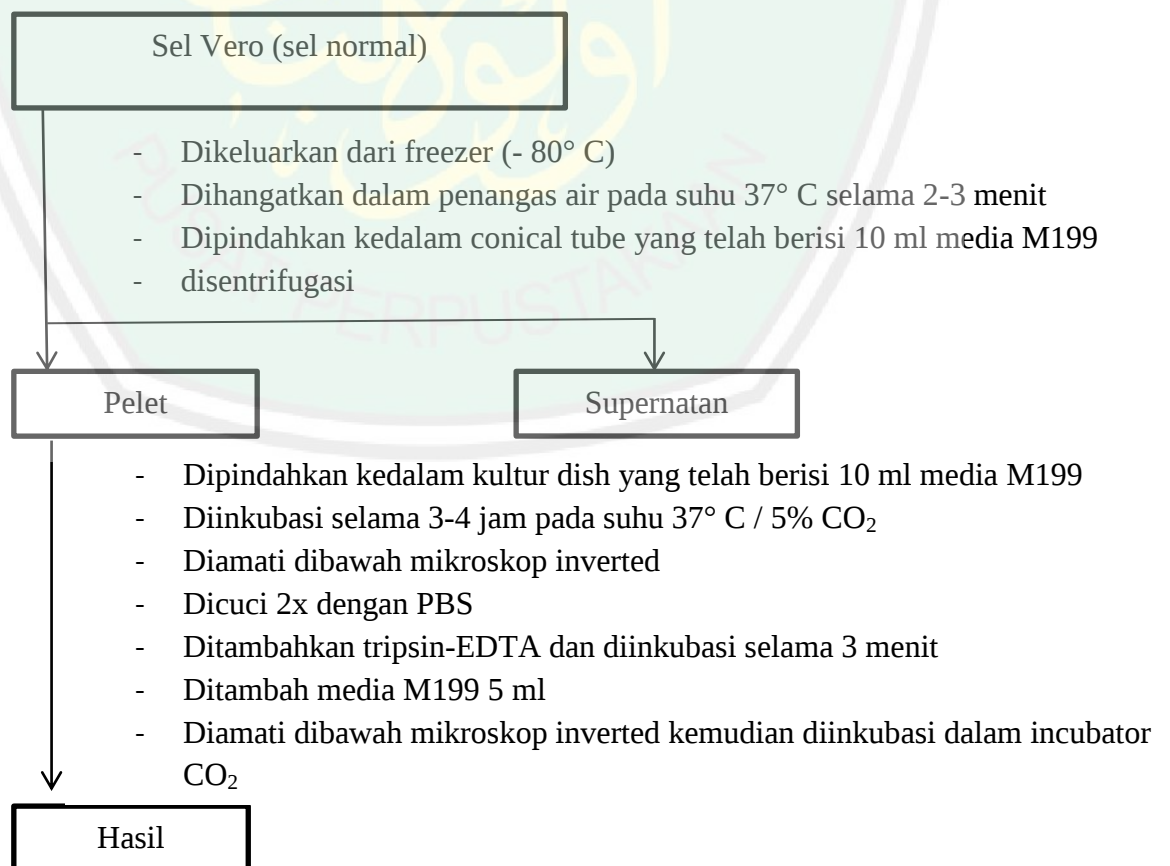


2.3 Ekstraksi Komponen Aktif



2.4 Uji toksisitas dengan Metode MTT

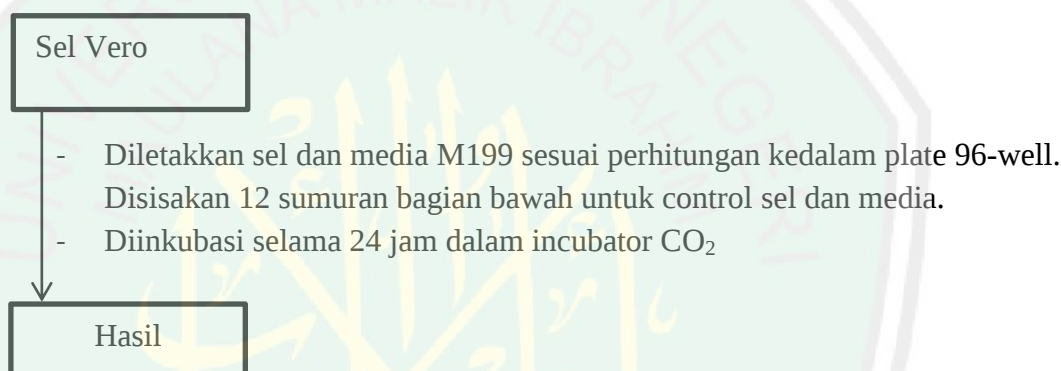
2.4.1 Penyiapan Sel



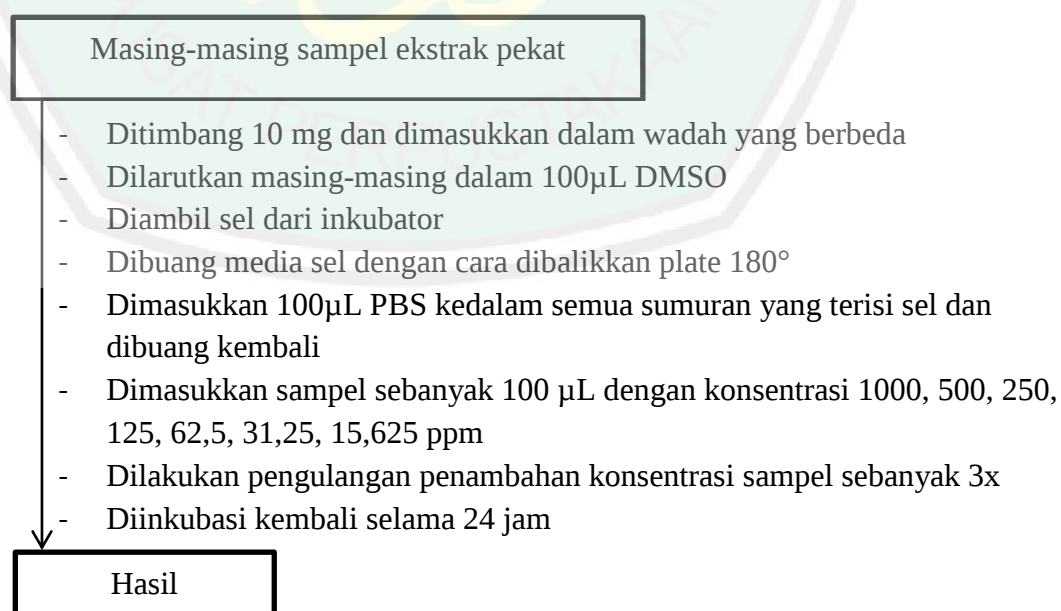
2.4.2 Perhitungan Sel Kanker



2.4.3 Peletakan Sel pada Plate



2.4.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada Plate



2.4.5 Pemberian Larutan MTT

Sel Kanker Vero

- Dibuang media sel dan dicuci dengan PBS
- Ditambahkan larutan MTT 100 μ L ke setiap sumuran kecuali control sel
- Diinkubasi selama 3-4 jam didalam incubator
- Apabila formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop inverted
- Ditambahkan stopper SDS 10% Dalam 0,1 N HCl
- Dibungkus plate dengan aluminium foil
- Diinkubasi kembali ditempat gelap (suhu ruangan) semalam
- Dibaca nilai absorbs dengan ELISA reader

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan

3.1 Pembuatan Etanol 96 %

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

$$100 \% \times V_1 = 96 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 9,6 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan etanol 100% sebanyak 9,6 mL di dalam lemari asam menggunakan pipet volume. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang telah berisi $\pm 0,4$ mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

3.2 Pembuatan Larutan SDS 10 %

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

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

3.3 Pembuatan Larutan Stok MTT (5 mg/mL)

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

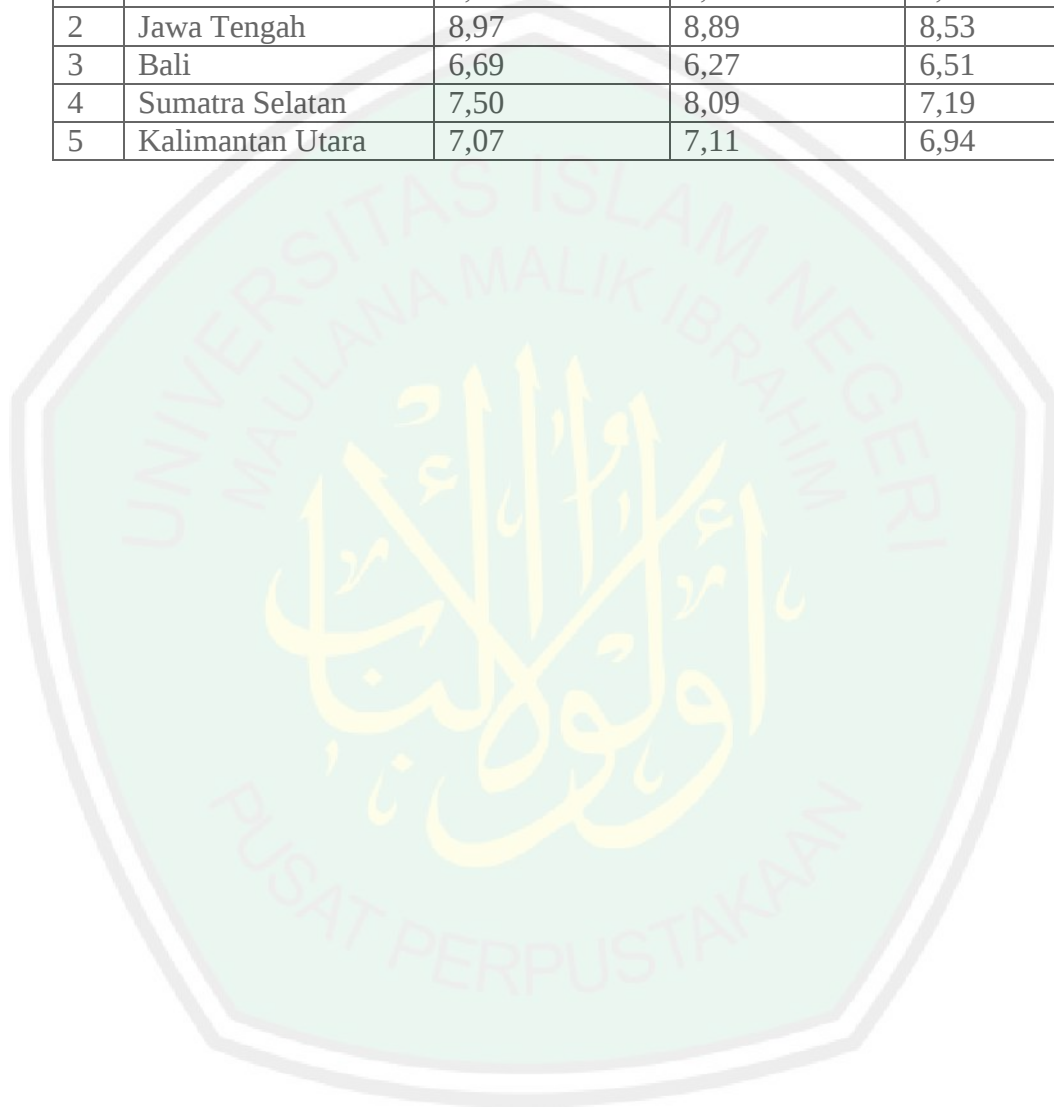
3.4 Pembuatan Larutan Stok 1000 ppm Ekstrak Daun *D. pentandra*

$$\begin{aligned} \text{Berat ekstrak} &= 10 \text{ mg} \\ \text{Volume pelarut} &= 100 \mu\text{L (DMSO)} \\ M &= \frac{10 \text{ mg}}{100 \mu\text{L}} = \frac{10000 \mu\text{g}}{100 \mu\text{L}} = 100000 \mu\text{g/mL} \\ M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 1 \text{ mL} \times 1000 \mu\text{g/mL} &= 100000 \mu\text{g/mL} \times V_2 \\ V_2 &= 0,01 \text{ mL} = 10 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Jadi, larutan stok 1000 ppm dibuat dengan mengambil 10 μL ekstrak yang telah dilarutkan dengan 100 μL DMSO menggunakan mikropipet, kemudian ditambahkan 990 μL media kultur RMPI dan diresuspensi hingga homogen.

Lampiran 4. Data Analisis Kadar Air dengan Moisture Analyzer

No	Lokasi Pengambilan Sampel	Ulangan 1 (%)	Ulangan 2 (%)	Ulangan 3 (%)
1	Jawa Timur	7,72	7,92	8,37
2	Jawa Tengah	8,97	8,89	8,53
3	Bali	6,69	6,27	6,51
4	Sumatra Selatan	7,50	8,09	7,19
5	Kalimantan Utara	7,07	7,11	6,94



Lampiran 5. Perhitungan Rendemen Hasil Ekstraksi Ultrasonik

No	Lokasi Pengambilan Sampel	Berat Sampel	Berat Ekstrak Pekat
1	Jawa Timur	50,7329 g	5,2402 g
2	Jawa Tengah	50,7206 g	1,4861 g
3	Bali	50,7926 g	4,0458 g
4	Sumatra Selatan	50,7187 g	4,8469 g
5	Kalimantan Utara	50,7177 g	3,0810 g

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% = \frac{5,2402 \text{ g}}{50,7329 \text{ g}} \times 100 \% = 10,32 \%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% = \frac{1,4861 \text{ g}}{50,7206 \text{ g}} \times 100 \% = 2,93\%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% = \frac{4,0458 \text{ g}}{50,7926 \text{ g}} \times 100 \% = 7,95 \%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% = \frac{4,8469 \text{ g}}{50,7187 \text{ g}} \times 100 \% = 9,54 \%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% = \frac{3,0810 \text{ g}}{50,7177 \text{ g}} \times 100 \% = 6,07 \%$$

Hasil perhitungan rendemen ekstraksi ultrasonik ekstrak etanol 96 % daun *D. pentandra*.

No	Lokasi Pengambilan Sampel	Berat Ekstrak	Berat Ekstrak pekat	Rendemen (%) (b/b)
1	Jawa Timur	50,7329 g	5,2402 g	10,32%
2	Jawa Tengah	50,7206 g	1,4861 g	2,93%
3	Bali	50,7926 g	4,0458 g	7,95%
4	Sumatra Selatan	50,7187 g	4,8469 g	9,54%
5	Kalimantan Utara	50,7177 g	3,0810 g	6,07%

Lampiran 6. Perhitungan Data dan Hasil Uji Toksisitas Antikanker Ekstrak Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*)

6.1 Perhitungan konsentrasi sel

Kamar A = 114

Kamar B = 147

Kamar C = 146

Kamar D = 180

➤ Jumlah sel yang di hitung (mL^{-1})

$$\begin{aligned}\Sigma \text{ sel yang dihitung} &= \frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4 \\ &= \frac{114+147+146+180}{4} \times 10^4 \\ &= 146.75 \times 10^4 / \text{mL}\end{aligned}$$

➤ Jumlah mL panen sel yang ditransfer (konsentrasi sel)

$$\begin{aligned}\Sigma \text{ panen mL panen sel yang ditransfer} &= \frac{\Sigma \text{ total sel yang diperlukan}}{\Sigma \text{ sel terhitung} / \text{mL}} \\ &= \frac{100 \times 10^4}{147 \times 10^4 / \text{mL}} \\ &= 0,6802 \text{ mL (diambil 0,7 mL)} \\ &= 700 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 700 μL , ditambahkan hingga 10 mL media kultur M199 (MK) karena setiap sumuran akan diisi 100 μL MK berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk memanen sel = 100 μL x 100 sumuran = 10000 μL atau 10 mL

6.2 Perhitungan nilai CC_{50} menggunakan Microsoft Excel

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

Kontrol Sel

Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
0.464	0.435	0.473	0.457

Kontrol Media

Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
0.088	0.086	0.089	0.088

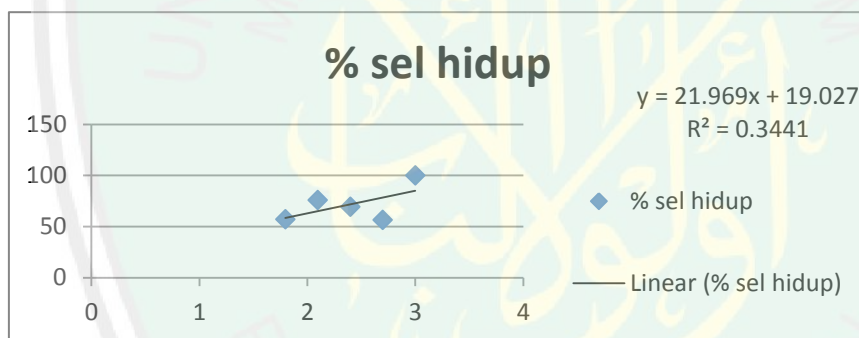
1. Ekstrak Etanol pekat 96% dari Jawa Timur

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
1000	0.490	0.522	0.589
500	0.296	0.319	0.313
250	0.343	0.308	0.421
125	0.368	0.341	0.397
62,5	0.299	0.302	0.299

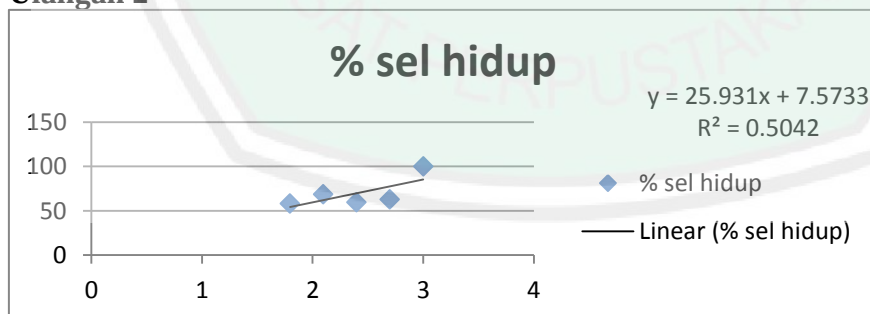
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilitas			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
1000	100	100	100	300	100	0
500	56.37	62.60	60.97	179.94	59.98	3.23
250	69.10	59.62	90.24	218.96	72.9867	15.67
125	75.88	68.56	83.74	228.18	76.06	7.59
62,5	57.18	57.99	57.18	172.35	57.45	0.46

Perhitungan CC50 Menggunakan Microsoft Excel

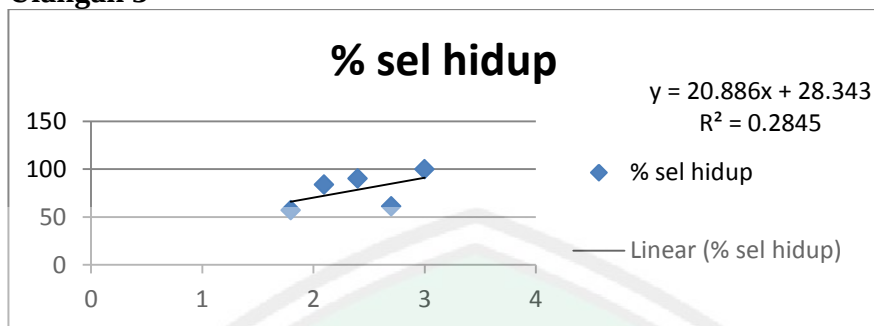
Ulangan 1



Ulangan 2



Ulangan 3

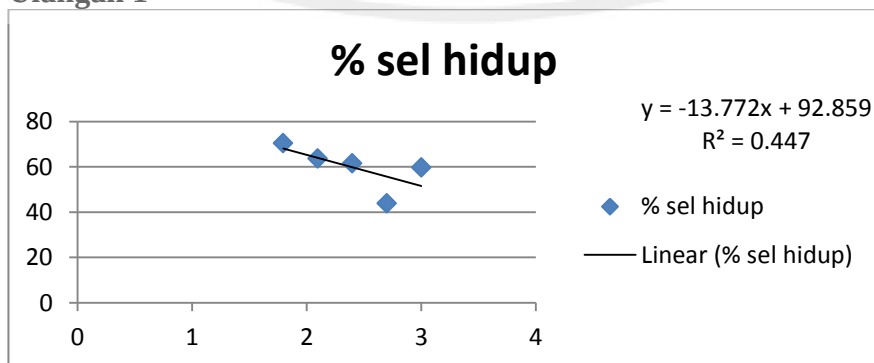


2. Ekstrak Etanol pekat 96% dari Jawa Tengah

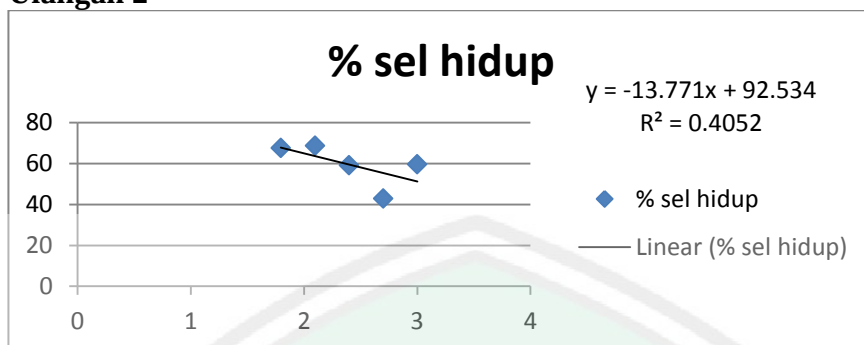
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
1000	0.395	0.308	0.304
500	0.250	0.246	0.287
250	0.315	0.306	0.419
125	0.323	0.341	0.457
62.5	0.348	0.337	0.369

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilitas			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
1000	59.62	59.62	58.54	177.78	59.26	0.62
500	43.90	42.82	53.93	140.65	46.88	6.12
250	61.52	59.08	89.70	210.30	70.10	17.01
125	63.68	68.56	100	232.24	77.41	19.71
62.5	70.46	67.48	76.15	214.09	71.36	4.40

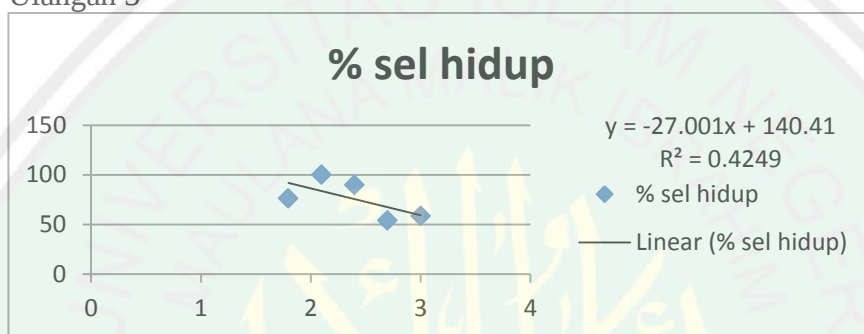
Perhitungan CC50 Menggunakan Microsoft Excel Ulangan 1



Ulangan 2



Ulangan 3



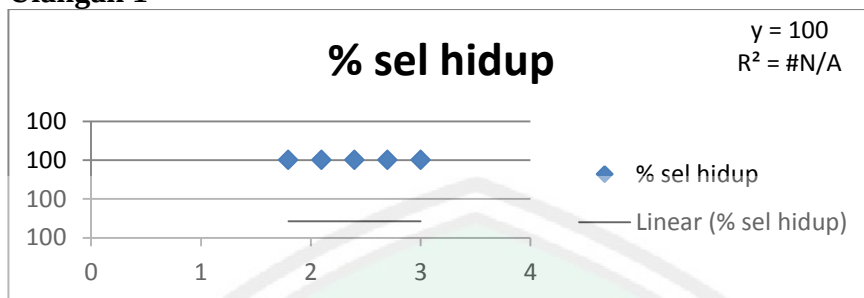
3. Ekstrak Etanol pekat 96% dari Bali

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
1000	0.652	0.635	0.596
500	0.511	0.458	0.502
250	0.500	0.473	0.481
125	0.511	0.521	0.498
62.5	0.563	0.510	0.495

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilitas			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
1000	100	100	100	300	100	0
500	100	100	100	300	100	0
250	100	100	100	300	100	0
125	100	100	100	300	100	0
62.5	100	100	100	300	100	0

Perhitungan CC50 Menggunakan Microsoft Excel

Ulangan 1



Ulangan 2



Ulangan 3

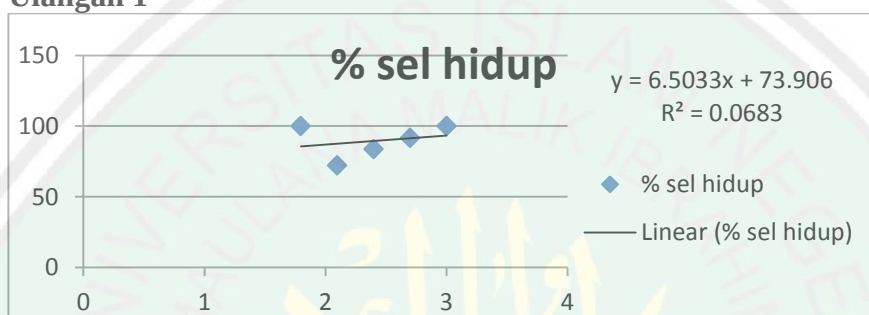


4. Ekstrak Etanol pekat 96% dari Sumatra

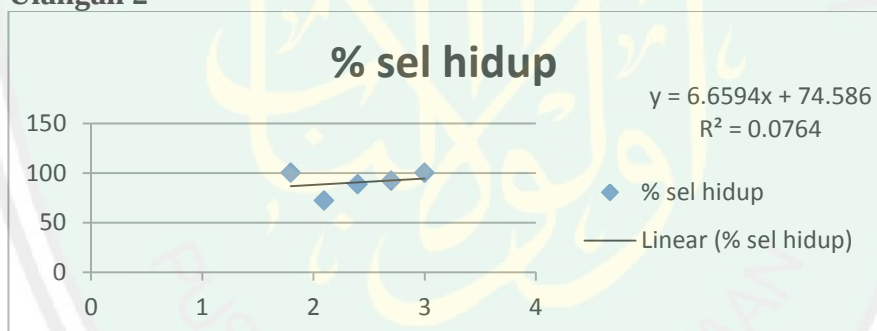
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
1000	0.735	0.666	0.709
500	0.428	0.455	0.465
250	0.397	0.459	0.427
125	0.354	0.453	0.417
62.5	0.480	0.406	0.475

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilitas			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
1000	100	100	100	300	100	0
500	91.67	92.14	92.14	275.95	91.98	0.27
250	83.74	88.54	83.74	256.02	85.34	2.77
125	72.09	72.09	98.91	243.09	81.03	15.48
62.5	100	100	86.18	286.18	95.39	7.97

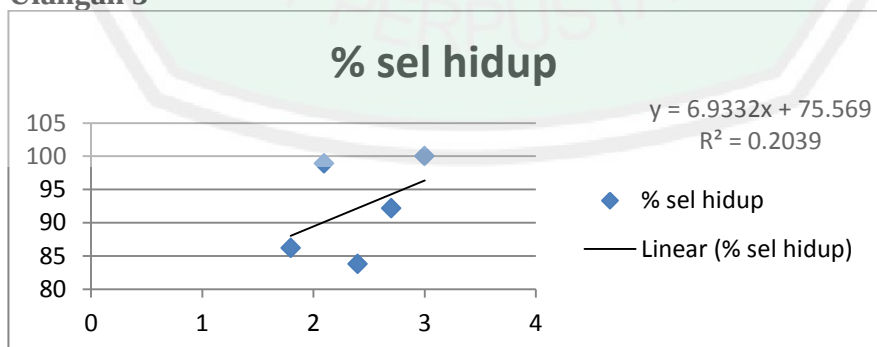
Perhitungan CC50 Menggunakan Microsoft Excel Ulangan 1



Ulangan 2



Ulangan 3



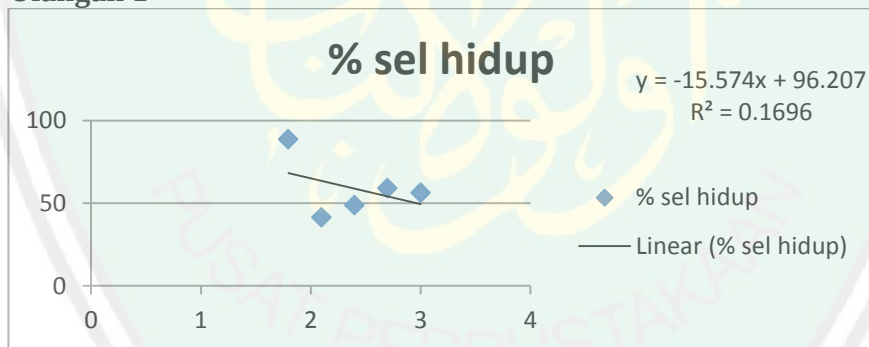
5. Ekstrak Etanol pekat 96% dari Balungan Kaltara

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
1000	0.296	0.265	0.261
500	0.306	0.273	0.288
250	0.268	0.338	0.410
125	0.241	0.262	0.227
62.5	0.415	0.440	0.438

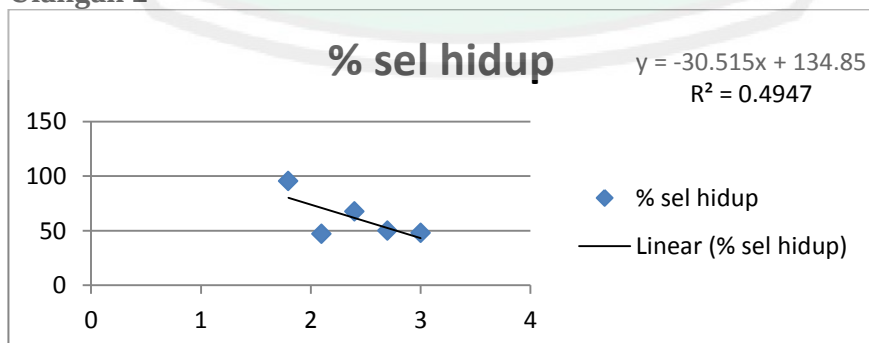
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilitas			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
1000	56.37	47.97	46.88	151.22	50.40	5.19
500	59.08	50.13	54.20	163.41	54.47	4.48
250	48.78	67.75	87.26	203.79	67.93	19.24
125	41.46	47.15	37.67	126.28	42.09	4.77
62.5	88.62	95.39	94.58	278.59	92.86	3.69

Perhitungan CC50 Menggunakan Microsoft Excel

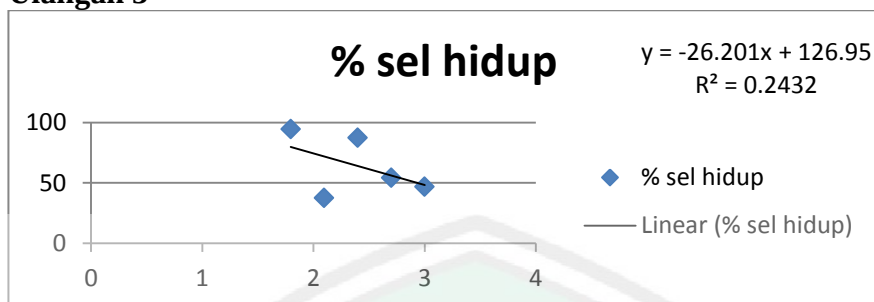
Ulangan 1



Ulangan 2



Ulangan 3



Nb: untuk menghitung CC50 dari persamaan yang didapatkan dari kelima daerah dengan tiga kali pengulangan, dimasukkan pada y nilai 50% dan cari antilog dari hasil yang didapatkan.

Nama	CC50 Ulangan 1	CC50 Ulangan 2	CC50 Ulangan 3	Jumlah	IC50 rata- rata
Jawa Timur	25.69	43.26	10.88	79.83	26.61
Jawa Tengah	1294.31	1226.49	2230.46	4751.26	1583.75
Bali	-	-	-	-	-
Sumatra	4742.20	4919.53	4874.24	14535.97	4845.32
Kalimantan	926.68	603.39	864.79	2394.86	798.28

Nama	IC50 Ulangan 1	IC50 Ulangan 2	IC50 Ulangan 3	IC50 rata- rata	SD
Jawa Timur	25.69	43.26	10.88	26.61	16.20
Jawa Tengah	1294.31	1226.49	2230.46	1583.75	561.09
Bali	-	-	-	-	-
Sumatra	4742.20	4919.53	4874.24	4845.32	92.13
Kalimantan	926.68	603.39	864.79	798.28	171.59

6.3 Uji Normalitas

Tests of Normality

Lokasi		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CC50	JAWA-TIMUR	.189	3	.	.998	3	.906
	JAWA-TENGAH	.364	3	.	.800	3	.115
	SUMATRA	.290	3	.	.926	3	.474
	KALIMANTAN	.317	3	.	.887	3	.346

a. Lilliefors Significance Correction

6.4 Uji Homogenitas

CC50

Tukey HSD

Lokasi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
JAWA-TIMUR	3	26.6157		
KALIMANTAN	3	7.9829E2		
JAWA-TENGAH	3		1.5838E3	
SUMATRA	3			4.8453E3
Sig.		.052	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

6.5 Uji Anova One Way

Multiple Comparisons

CC50
LSD

(I) Lokasi	(J) Lokasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
JAWA-TIMUR	JAWA-TENGAH	-1557.13833'	2.4256E2	.000	-2116.4885	-997.7881
	SUMATRA	-4818.71200'	2.4256E2	.000	-5378.0622	-4259.3618
	KALIMANTAN	-771.67300'	2.4256E2	.013	-1331.0232	-212.3228
JAWA-TENGAH	JAWA-TIMUR	1557.13833'	2.4256E2	.000	997.7881	2116.4885
	SUMATRA	-3261.57367'	2.4256E2	.000	-3820.9239	-2702.2235
	KALIMANTAN	785.46533'	2.4256E2	.012	226.1151	1344.8155
SUMATRA	JAWA-TIMUR	4818.71200'	2.4256E2	.000	4259.3618	5378.0622
	JAWA-TENGAH	3261.57367'	2.4256E2	.000	2702.2235	3820.9239
	KALIMANTAN	4047.03900'	2.4256E2	.000	3487.6888	4606.3892
KALIMANTAN	JAWA-TIMUR	771.67300'	2.4256E2	.013	212.3228	1331.0232
	JAWA-TENGAH	-785.46533'	2.4256E2	.012	-1344.8155	-226.1151
	SUMATRA	-4047.03900'	2.4256E2	.000	-4606.3892	-3487.6888

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian

7.1 Preparasi Sampel



7.2 Analisis kadar Air

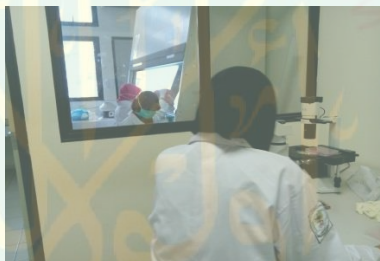


7.3 Ekstraksi Ultrasonik



7.4 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

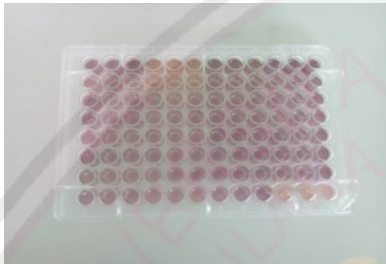
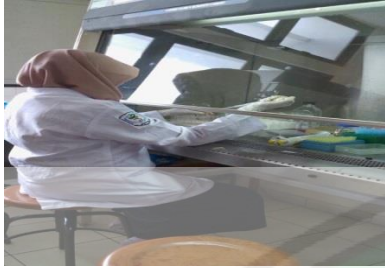
Perhitungan sel



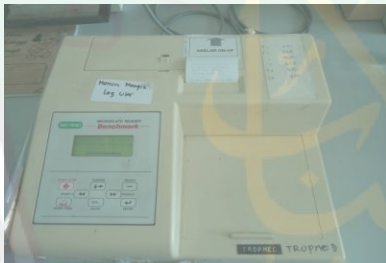
Preparasi larutan sampel



Treatment sel



Instrument





**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI**

**Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 4266046
website : <http://www.krppurwodadi.lipi.go.id>**



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0191 /IPH.6/HM/II/2017

Kepala UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :

Olden Mayazzaka Amalia, NIM : 13670025

Mahasiswa Farmasi UIN Malang, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 31 Januari 2017, berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan R.C. Bakhuizen van den Brink jr., volume I, tahun 1963, halaman 339 nama ilmiahnya adalah :

Genus : *Dendrophoe*
Species : *Dendrophoe pentandra* (L.) Miq.

Adapun menurut buku An Integrated System of Classification of Flowering plants, karangan Arthur Cronquist tahun 1981, halaman XVI klasifikasinya adalah sebagai berikut :

Divisio : *Magnoliophyta*
Class : *Magnoliopsida*
Subclass : *Rosidae*
Ordo : *Santalales*
Family : *Loranthaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 9 Pebruari 2017

An. Kepala

Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan



Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

SERTIFIKAT

Diberikan kepada

Olden Mayazzaka

Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

sebagai

Peserta

Kursus Singkat Kultur Jaringan yang diselenggarakan pada tanggal 29 Agustus 2016
sampai dengan 1 September 2016 di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

Yogyakarta, 1 September 2016

Penyelenggara

Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada



Prof. dr. Suparigiyono, DTM&H., SU., Ph.D., SpParK.
NIP. 195309111978031001



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

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

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 76A / EC / KEPK – S1 / 02 / 2017

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

JUDUL : Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dari Berbagai Daerah di Indonesia terhadap Sel Vero.

PENELITI : Olden Mayazzaka Amalia

UNIT / LEMBAGA : S1 Farmasi - Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan – Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang,

28 FEB 2017



An. Ketua
Koordinator Divisi I

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

Catatan :

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



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

SURAT KETERANGAN
No. UGM/KU/Prst/197/TL/04/03

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Kepala Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta,
menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

Nama : OLDEN MAYAZZAKA AMALIA
Instansi : Jurusan Farmasi
Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
NIM. : 13670025

Telah melakukan penelitian di Departemen Parasitologi FK. UGM dengan judul :

“UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL DAUN BENALU MANGGA (*DENDROPTHOE PENTANDRA*) DARI BERBAGAI DAERAH DI INDONESIA TERHADAP SEL VERO“

Dibawah supervisi laboratorium: Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK.
Waktu Penelitian: 10 April 2017 sampai dengan 13 April 2017

Urusan administrasi telah diselesaikan oleh yang bersangkutan dan fasilitas laboratorium yang dipakai telah dikembalikan, dengan demikian dinyatakan **bebas laboratorium**.

Surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 13 April 2017

Kepala,



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

Hasil

DEPARTEMEN PARASITOLOGI

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

Jl. Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.
(0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitfkugm@yahoo.com

Nomor : UGM/KU/Prst/193/M/05/07
Hal : Ijin Penelitian.

11 April 2017

Kepada Yth. : OLDEN MAYAZZAKA AMALIA
Jurusan Farmasi
Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

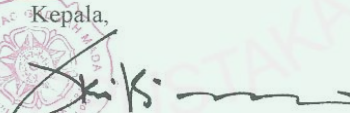
Dengan hormat,
Menanggapi surat saudara tertanggal 20 Maret 2017 tentang ijin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi yang berjudul:

“UJI AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL DAUN BENALU MANGGA (*DENDROPHOE PENTANDRA*) DARI BEBERAPA LOKASI DI INDONESIA TERHADAP *CELL LINE* KANKER PAYUDARA T47D”

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

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

Atas perhatian dalam hal ini kami ucapkan terima kasih.

Kepala,


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

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