



**EFEK SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN KENITU (*Chrysophyllum cainito* L.) DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST**

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat untuk menyelesaikan gelar Sarjana Kedokteran (S1)

Fakultas Kedokteran

Asal: Hadiah

Pembelian

Terima di: 03 MAR 2007

no. induk :

Oleh :

Pengkatalog :

Klass

616.994  
WAR  
2

Lusia Cahyanti Yohana K. W.

NIM. 012010101047

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2007**

## PERSEMBAHAN

Atas rahmat dan karunia Allah S. W. T. Karya Tulis Ilmiah ini aku peruntukkan kepada :

1. Ibunda Rumini dan Ayahanda Budi Prajitno tercinta, yang selalu memberikan curahan kasih sayang, bimbingan, didikan dan perjuangan serta do'anya demi keberhasilan ananda.
2. Kakakku tersayang drh. Analis Wisnu Wardhana terima kasih atas motivasi, perhatian dan nasehatnya.
3. Keluarga Om Syamsuel yang telah memberikan bantuan dan do'anya.
4. Dr.Ali Santosa, Bapak Amrun Hidayat dan dr.Cholis terima kasih telah meluangkan waktunya untuk kelancaran terselesaikannya karya tulis ini.
5. Bapak/Ibu guru yang telah mendidiku, jasamu takkan aku lupakan.
6. Agama dan Almamater yang aku banggakan.

**MOTTO**

“Jika Tuhan ingin memberi kita sebuah hadiah, Dia akan membungkusnya dalam sebuah masalah. Semakin besar masalah yang kita hadapi, semakin besar hadiahnya, baik dalam bentuk pelajaran-pelajaran yang berharga maupun dalam bentuk ide-ide dan wawasan-wawasan yang mungkin terdapat di dalam masalah tersebut”.

(Norman Vincent Peale)

“Dan bila aku sakit, maka (DIA) Allah yang menyembuhkanku”.

(QS. Asy Syu'ara ayat 80)

“Langkah awal yang sangat diperlukan untuk mendapatkan yang kita inginkan adalah : putuskan apa yang kita inginkan”.

(Ben Stein)

“Kewajiban yang menjadi keinginan, pada akhirnya akan menjadi kesenangan”.

(George Gritter)

“Janganlah menunda ‘kesempatan’ menolong sesama, tolonglah sesama pada kesempatan pertama yang ada”.

(Isnani A. S. Suryono)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Lusia C.Y.K. Wardhany

NIM : 012010101047

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “**Efek Sitotoksik Ekstrak Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test**” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 6 Februari 2007

Yang menyatakan,



Lusia C.Y.K. Wardhany

012010101047

**PENGESAHAN**

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada :

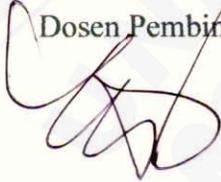
Hari : Selasa

Tanggal : 6 Februari 2007

Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji :

Dosen Pembimbing I



dr. Ali Santosa Sp.PD

NIP 140 189 028

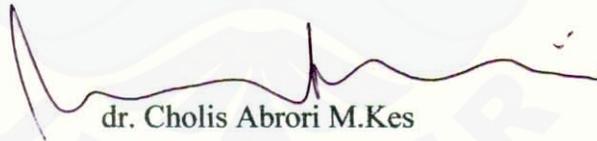
Dosen Pembimbing II



Moch. Amrun Hidayat S.Si.,Apt.

NIP 132 296 951

Dosen Penguji



dr. Cholis Abrori M.Kes

NIP 132 210 541

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas Jember



dr. Wasis Prajitno, Sp. OG

NIP 140 062 229

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, penulis panjatkan kehadiran Allah S. W. T, karena atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga dapat menyelesaikan penyusunan Karya Tulis Ilmiah (Skripsi) yang berjudul **Efek Sitotoksik Ekstrak Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test** ini dapat diselesaikan sesuai dengan waktu yang telah ditentukan.

Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk melengkapi syarat untuk menyelesaikan pendidikan dokter guna memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak Rektor Universitas Jember.
2. dr. Wasis Prajitno, Sp. OG, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian hingga selesainya penulisan ini.
3. dr. Ali Santosa Sp. PD, selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Amrun Hidayat S. Si. Apt, selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan pengarahan dan bimbingan sejak awal hingga selesainya penulisan Karya Tulis Ilmiah ini.
4. dr. Cholis Abrori M. Kes., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan bimbingan dan sumbangan pikiran yang sangat berharga dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
5. Ibunda Rumini dan Ayahanda Budi Prajitno yang selalu tulus berdo'a demi kesuksesanku.
6. Kakakku tersayang drh. Analis Wisnu Wardhana yang selalu memberi motivasi dan selalu mendengarkan keluh-kesahku.
7. Keluarga Om Syamsuel yang selama ini ikhlas memberikan bantuan.

8. Saudaraku yang berjuang di jalan Allah, terima kasih atas persaudaraannya selama ini dan semoga Allah memberikan keistiqomahan pada kita semua.
9. Adik-adikku sayang ( Jeni dan Fani ) di Jl. Nanas VIII No. 17 Jember, terima kasih atas do'anya dan canda tawanya.
10. Teman-teman FK angkatan 2001 yang senasib dan seperjuangan.
11. Guru-guruku yang telah mendidikku.
12. Petugas laboratorium Biologi-Kimia Program Studi Farmasi, terima kasih atas bantuannya selama ini.
13. Semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikannya penulisan Karya Tulis Ilmiah ini. Semoga Allah S. W. T membalasnya dengan limpahan rahmat dan hidayah-Nya, Amien.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat.

Jember, Februari 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERUNTUKKAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>RINGKASAN</b> .....	xiii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	4
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	4
1.3.1 Tujuan Umum .....	4
1.3.2 Tujuan Khusus .....	4
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
<b>2.1 Kanker</b> .....	6
2.1.1 Pendahuluan Kanker .....	6
2.1.2 Pertumbuhan dan Siklus Sel Kanker .....	6
2.1.3 Terapi .....	8

<b>2.2 Tinjauan Tentang Tumbuhan Kenitu</b> .....	11
2.2.1 Klasifikasi .....	11
2.2.2 Deskripsi .....	12
2.2.3 Nama Daerah .....	12
2.2.4 Penyebaran dan Iklim .....	13
2.2.5 Manfaat .....	13
2.2.6 Kandungan Kimia .....	14
2.2.7 Senyawa Alkaloid .....	14
2.2.8 Senyawa Tanin .....	15
<b>2.3 Tinjauan Tentang Metode 'Brine Shrimp Lethality Test'</b> .....	16
<b>2.4 <i>Artemia salina</i>, Leach</b> .....	18
2.4.1 Klasifikasi .....	18
2.4.2 Morfologi .....	18
2.4.3 Sifat Ekologi dan Reproduksi .....	19
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	20
<b>3.1 Kerangka Konseptual Penelitian</b> .....	20
<b>3.2 Hipotesis Penelitian</b> .....	20
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN</b> .....	21
<b>4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian</b> .....	21
<b>4.2 Variabel Penelitian</b> .....	22
4.2.1 Variabel Bebas .....	22
4.2.2 Variabel Tergantung .....	22
4.2.3 Variabel Kendali .....	23
<b>4.3 Definisi Operasional Variabel</b> .....	23
4.3.1 Ekstrak Daun Kenitu .....	23
4.3.2 Hewan Coba .....	23
4.3.3 Suhu, salinitas dan pH air .....	23
4.3.4 Waktu dan Lama Perlakuan .....	24
4.3.5 Waktu dan Lama Pemeliharaan .....	24

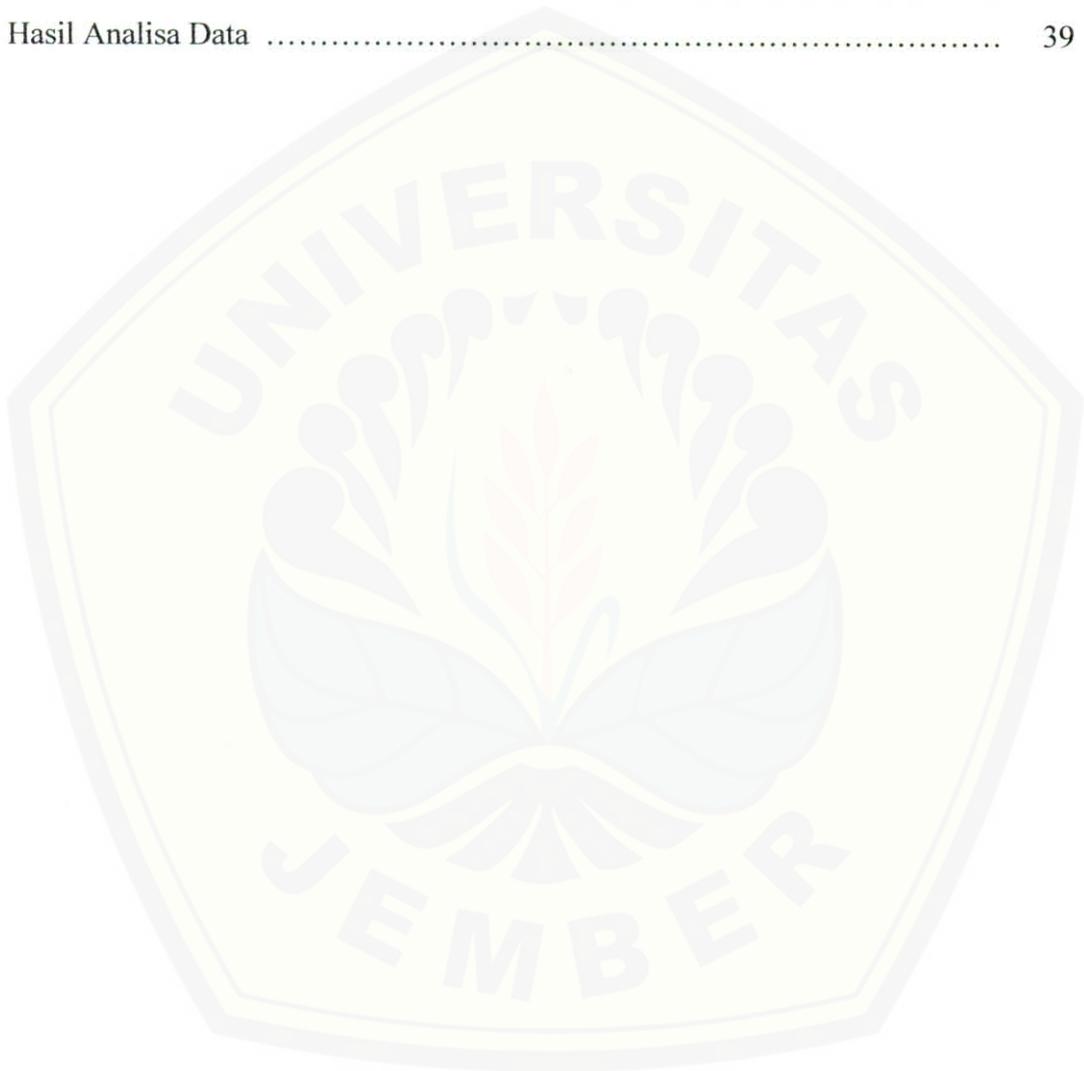
4.3.6 Pemeliharaan dan Perlakuan .....	24
4.3.7 Waktu Pengambilan Daun Kenitu .....	24
<b>4.4 Alat dan Bahan .....</b>	<b>24</b>
4.4.1 Alat .....	24
4.4.2 Bahan .....	25
<b>4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>25</b>
<b>4.6 Skema Kerja .....</b>	<b>26</b>
4.6.1 Skema Ekstraksi .....	26
4.6.1.1 Skema Ekstraksi Metanol .....	26
4.6.1.2 Skema Ekstraksi Heksana .....	26
4.6.1.3 Skema Ekstraksi Etil Asetat .....	27
4.6.2 Skema Pengujian .....	27
<b>4.7 Pembuatan Larutan Induk .....</b>	<b>27</b>
<b>4.8 Pembuatan Larutan Uji dan Larutan Kontrol .....</b>	<b>28</b>
<b>4.9 Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji dan Pengujian .....</b>	<b>28</b>
<b>4.10 Analisis Data .....</b>	<b>29</b>
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>30</b>
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>33</b>
6.1 Kesimpulan .....	33
6.2 Saran .....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>34</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>37</b>

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
2.1 Tanaman <i>Chrysophyllum cainito</i> L .....	11
4.1 Rancangan Skematis Penelitian .....	21
4.2 Skema Ekstraksi Metanol .....	26
4.3 Skema Ekstraksi Heksana .....	26
4.4 Skema Ekstraksi Etil Asetat .....	27
4.5 Skema Pengujian .....	27
5.1 Grafik Hubungan Logkonsentrasi dengan Probit Respon .....	30

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Data Hasil Penelitian .....	37
2. Hasil Analisa Data .....	39



## RINGKASAN

### **Efek Sitotoksik Ekstrak Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) Dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test,**

**Lusia Cahyanti Yohana K. W, 012010101047, 2007, 35 hlm.**

Kanker adalah penyebab utama kematian di Amerika Serikat menyebabkan lebih dari 500.000 kematian pertahun. Dengan metode pengobatan sekarang, sepertiga pasien dapat disembuhkan. Akhir-akhir ini kemoterapi menjadi salah satu terobosan dalam pengendalian kanker. Tanaman kenitu (*Chrysophyllum cainito* L., suku sapotaceae) merupakan tumbuhan dengan memiliki kandungan Tanin yang dipercaya oleh bangsa Amerika Latin bersifat karsinostatik, yang menghambat pertumbuhan kanker. Penelitian ini menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) yang merupakan metode yang berguna sebagai permulaan uji toksisitas dan juga untuk menskrining aktivitas farmakologi dalam ekstrak tumbuhan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji toksisitas ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* L. dan membandingkan toksisitas ekstrak metanol, ekstrak heksana dan ekstrak etil asetat.

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan tentang toksisitas ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) dan prospek daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) sebagai antikanker serta diharapkan dapat sebagai acuan penelitian lebih lanjut, yaitu pengujian aktivitas antikanker dengan menggunakan kultur sel kanker mamalia (uji sitotoksik).

Penelitian menggunakan ekstrak daun kenitu dengan pelarut metanol, heksana dan etil asetat (konsentrasi 1200, 1000, 800, 600 ppm) dengan hewan coba larva udang *Artemia salina* Leach. Jumlah sampel larva udang adalah 10 untuk masing-masing replikasi dengan tiap-tiap konsentrasi 3 replikasi. Data hasil penelitian berisi jumlah larva yang mati pada masing-masing replikasi. Data hasil penelitian kemudian



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Disamping sakit jantung, kanker adalah penyebab utama kematian di Amerika Serikat menyebabkan lebih dari 500.000 kematian pertahun (Katzung, 2001). Insiden kanker di setiap negara tidak sama, baik insiden keseluruhan maupun insiden spesifik. Insiden di Eropa Utara dan Amerika Utara umumnya tinggi (200-350 per 100.000 penduduk), di Eropa Selatan, Asia Barat dan Tengah, serta Amerika Tengah dan Selatan sedang (150-200 per 100.000 penduduk), dan di Asia Selatan, Timur serta Afrika agak rendah (75-150 per 100.000 penduduk). Insiden kanker di Indonesia diperkirakan 180 per 100.000 penduduk (Sjamsuhidajat, 1997).

Dengan metode pengobatan sekarang, sepertiga pasien dapat disembuhkan dengan tindakan lokal (terapi bedah atau radiasi). Tetapi pada kasus-kasus tumor sisa, mikrometastasis dini merupakan ciri-ciri khas gambaran dari neoplasma, mengindikasikan bahwa pengobatan sistemik dapat dicapai melalui kemoterapi (sering bersamaan dengan bedah atau radiasi) (Katzung, 2001).

Akhir-akhir ini kemoterapi menjadi salah satu terobosan dalam pengendalian kanker. Meskipun penemuan dan pemakaian kemoterapi menunjang hasil yang bagus tetapi toksisitas dan efek sampingnya sangat besar (Sjamsuhidajat, 1997). Bahan-bahan alam mempunyai prospek sebagai penghambat kanker. Distribusi aktivitas antikanker sangat luas dalam tumbuh-tumbuhan. Pendekatan yang sering dilakukan dalam mencari zat kandungan yang berkasiat sebagai antikanker dari tanaman ialah dengan taksonomi tanaman, yakni tanaman yang termasuk dalam takson tertentu dan mempunyai kemiripan tanda-tanda anatomi, histologi, morfologi dan kemiripan dalam zat kandungannya. Farnsworth melaporkan bahwa 400 spesies tanaman dalam

315 genus dan 97 famili mempunyai aktivitas sebagai penghambat tumor (Sjamsuhidajat, 1997).

Berbagai zat kandungan yang berkasiat sebagai antikanker dari beberapa tanaman telah berhasil diisolasi, dimana pencarian senyawa bioaktif tersebut dilakukan setelah dalam praskrining aktivitas terhadap ekstrak tanaman menunjukkan hasil positif atau aktif (Katzung, 2001). Dalam pencarian bahan bioaktif yang mempunyai aktivitas antikanker digunakan beberapa metode skrining aktivitas biologis sebagai berikut : (i) Uji Kematian Larva atau *Brine Shrimp Lethality Test*, (ii) uji Hambatan pada Lempeng Kentang atau *Potato Disc Crow Gall Tumor Inhibitor Assay*, (iii) Uji Proliferasi Kuncup Lemna atau *Lemna Frond Proliferation Assay*, (iv) Uji Sitotoksik in vitro dan in vivo (Anderson, 1991).

Selama beberapa tahun metode skrining aktivitas antikanker mengarah pada uji sitotoksik in vivo menggunakan sel 3PS (P-388, Leukemia mencit yang terinduksi metal folantren) dan uji in vitro menggunakan sel 9KB (kanker nasofaring manusia). Akan tetapi, beberapa senyawa yang diketahui sitotoksik tidak selalu aktif secara in vivo pada manusia. Reprodusibilitas hasil uji sitotoksik tersebut rendah. Seringkali terjadi hasil yang berbeda pada replikasi pengujian untuk senyawa yang sama sehingga tidak bisa dibuat perbandingan aktivitas relatif beberapa senyawa atau ekstrak. Uji sitotoksik membutuhkan biaya yang tidak murah dimana dibutuhkan personalia dengan keahlian khusus, teknik aseptis serta serum hewan sebagai media kultur sel. Selain itu dibutuhkan waktu yang relatif lama, prosedur rumit, serta membutuhkan ekstrak dalam jumlah relatif besar. Untuk itu dibutuhkan metode praskrining aktivitas antikanker yang sederhana, cepat, terpercaya dan tidak mahal (Anderson, 1991).

*Brine Shrimp Lethality Test* (BST) merupakan suatu uji hayati umum yang digunakan untuk mendeteksi suatu rentang lebar aktivitas biologi (Meyer *et al*, 1982). BST juga metode yang berguna sebagai permulaan uji toksisitas dan juga untuk menskrining aktivitas farmakologi dalam ekstrak tumbuhan (Carballo *et al*, 2002). Uji ini merupakan uji hayati pendahuluan yang sederhana, cepat, murah dan cukup

dilakukan di dalam ruangan untuk skrining hasil ekstraksi dan fraksinasi ekstrak aktif serta untuk mendeteksi senyawa bioaktif hasil isolasi (Meyer *et al*, 1982). Meskipun BST bukan merupakan suatu uji praskrining aktivitas biologis yang spesifik untuk bahan antikanker, namun senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas antikanker pada uji BST aktif juga pada uji toksisitas kanker 9KB, 3PS, kanker paru, kanker payudara dan menunjukkan bahwa BST merupakan uji hayati yang dapat digunakan sebagai petunjuk adanya senyawa bioaktif antikanker (Mc Laughlin *et al*, 1991).

Tanaman kenitu (*Chrysophyllum cainito* L., suku Sapotaceae) banyak terdapat di pulau Jawa bagian hilir dan daerah rendah. Tanaman ini pernah dibiakkan sebagai pohon buah-buahan atau pohon hias. Dalam "Buletin No.37 Kolonial Museum" Kwast mengatakan bahwa buah kenitu lembut, berair, menyegarkan dan enak rasanya. Akan tetapi, buah tersebut tidak laku dijual di sini bahkan juga di tempat asalnya di Amerika Tropik (Heyne, 1987). Walaupun demikian, di tempat lain ternyata tanaman kenitu bermanfaat dalam bidang pengobatan. Di Filipina tanaman ini digunakan sebagai obat cacing untuk domba (Fernandez, 1997). Buah yang sudah masak digunakan untuk mengurangi inflamasi pada penyakit laringitis dan pneumonia, serta pengobatan diabetes melitus. Di Venezuela, buah yang belum masak digunakan untuk mengatasi gangguan pencernaan. Rebusan buah dikumur untuk mengobati angina. Serbuk biji yang pahit digunakan sebagai tonik, diuretik dan penurun demam (Verheij, 1992). Rebusan batang digunakan sebagai tonik, stimulan, mengobatai diare, disentri, hemoragi dan gonorrhoe. Di Brazil, getah pohon digunakan untuk mengobati abses. Serbuk kering getah tersebut digunakan sebagai obat cacing yang poten, obat disentri, juga sebagai diuretik dan penurun demam. Warga Kuba yang berdomisili di Miami menggunakan rebusan daunnya untuk pengobatan kanker. Tumbuhan dengan kandungan tanin yang tinggi dipercaya oleh bangsa Amerika Latin bersifat karsinostatik, yang menghambat pertumbuhan kanker (Morton, 1987).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu diteliti aktivitas antikanker daun kenitu dengan menggunakan metode BST. Pada penelitian ini akan diuji aktivitas antikanker ekstrak daun kenitu dengan menggunakan pelarut metanol, heksana dan etil asetat.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang di atas maka dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut :

- a. Apakah ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) toksik terhadap larva udang laut (*Artemia salina* Leach) sebagai praskrining aktivitas antikanker ?
- b. Ekstrak manakah yang paling aktif/toksik terhadap *Artemia salina* Leach tersebut?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Menguji toksisitas ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* L.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Membandingkan toksisitas ekstrak metanol, ekstrak heksana dan ekstrak etil asetat daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.).

## 1.4 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan :

1. Dapat memberikan informasi tambahan tentang toksisitas ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L) dan prospek daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L) sebagai antikanker.

2. Sebagai acuan penelitian lebih lanjut, yaitu pengujian aktivitas antikanker dengan menggunakan kultur sel kanker mamalia (uji sitotoksik).





## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kanker

#### 2.1.1 Pendahuluan Kanker

Dalam artian umum, tumor adalah benjolan atau pembengkakan abnormal dalam tubuh, tetapi dalam artian khusus tumor adalah benjolan yang disebabkan oleh neoplasma (Sjamsuhidajat, 1997). Neoplasma, secara harafiah berarti “pertumbuhan baru”, adalah masa abnormal dari sel-sel yang mengalami proliferasi. Sel-sel neoplasma berasal dari sel-sel yang sebelumnya adalah sel-sel normal, selama mengalami perubahan neoplastik mereka memperoleh derajat otonomi tertentu. Sel neoplastik adalah otonom dalam arti tumbuh dengan kecepatan yang tidak terkoordinasi dengan kebutuhan hospes dan fungsi yang sangat tidak bergantung pada pengawasan homeostasis sebagian besar sel tubuh lainnya (Wijaya, 1994).

#### 2.1.2 Pertumbuhan dan Siklus Sel Kanker

Bertambahnya gambaran mitosis dan adanya mitosis abnormal dalam tumor adalah ciri penting yang membedakan tumor ganas dari tumor jinak. Organisme memiliki sistem pengatur yang rumit yang mengatur reproduksi sel, merangsang atau menghambat mitosis (Komala, 1997).

Sedikit yang kita ketahui tentang mekanisme yang mempertahankan jumlah yang tetap berbagai jenis sel dalam tubuh. Tetapi penelitian percobaan menggambarkan bahwa zat-zat pengawas yang disebut “*chalone*” disekresi oleh berbagai sel yang menyebabkan efek umpan balik untuk menghentikan atau memperlambat pertumbuhannya dan mitosis bila terlalu banyak sel yang dibentuk (Guyton, 1990).

Kanker merupakan suatu penyakit yang menyerang proses dasar kehidupan sel, yang hampir semuanya mengubah genom sel (komplemen genetik total sel), serta mengakibatkan pertumbuhan liar dan penyebaran sel kanker. Penyebab perubahan genom ini adalah mutasi (perubahan) salah satu gen atau lebih, atau mutasi sebagian besar segmen utas DNA yang mengandung banyak gen ; atau pada beberapa keadaan penambahan atau pengurangan sebagian besar segmen kromosom (Guyton, 1990).

Walaupun induk tidak mengalami mutasi dan perubahan gen DNA anak sebagai hasil replikasi dapat mengalami mutasi. Suatu spesies akan dapat bertahan jika mempunyai mekanisme untuk memperbaiki DNA yang rusak, baik karena kesalahan pada saat replikasi maupun karena pengaruh dari lingkungannya. Ada 2 mekanisme kontrol untuk melakukan replikasi DNA secara lengkap dan sempurna yaitu memonitor setiap penggabungan nukleotida ke dalam rantai DNA yang baru dan mekanisme pembuangan basa N yang tidak cocok melalui reaksi yang membutuhkan tenaga. Dasar dari semua proses perbaikan DNA yang rusak adalah pengenalan daerah yang mengalami kerusakan, yang dilanjutkan dengan perbaikan atau pemberian tanda untuk selanjutnya dilakukan proses perbaikan. Jika terjadi kegagalan dalam proses perbaikan maka akan terjadi mutasi (Safitri, 2002).

Menurut Guyton (1990) alasan mengapa secara harafiah dalam tubuh manusia terbentuk berjuta-juta mutan sel kanker adalah bahwa mungkin utas kromosom DNA mengadakan replikasi dengan tepat sebelum berlangsung mitosis. Tentu saja walaupun sudah terbentuk utas baru, ketelitian proses replikasi “dikoreksi” beberapa kali. Bila ada suatu kesalahan, utas yang baru dipotong dan diperbaiki sebelum proses mitosis berlangsung. Walaupun terdapat semua pencegahan seperti ini, mungkin salah satu dari beratus-ratus ribu sampai berjuta-juta sel yang baru dibentuk tetap mempunyai sifat mutasi yang bermakna, kita tahu hal ini karena dapat dipastikan bahwa setiap gen pada keturunan manusia mempunyai kemungkinan 1 dalam 100.000 merupakan suatu mutan bila dibandingkan dengan gen orang tuanya.

Menurut Guyton (1990) hanya dibutuhkan kesempatan agar mutasi dapat berlangsung. Akan tetapi, fakta-fakta lain yang menambah kemungkinan mutasi adalah :

1. Radiasi ionisasi.
2. Zat kimia tertentu yang dinamakan karsinogen dan zat pengoksidasi.
3. Beberapa virus.
4. Iritasi fisik
5. Predisposisi hereditas.

Sel dalam tubuh manusia secara konstan terekspos oleh berbagai macam agen pengoksidasi. Agen pengoksidasi ini salah satu sumbernya adalah dari hasil metabolisme dalam sel. Produksi yang berlebihan dari agen pengoksidasi ini dapat mengakibatkan ketidak seimbangan sehingga meningkatkan stres oksidatif pada sel yang terkena. Stres oksidatif ini dapat menyebabkan kerusakan pada biomolekul besar yang meliputi lipid, protein dan DNA yang meningkatkan resiko kanker (Liu, 2004).

### 2.1.3 Terapi

Dengan metode pengobatan sekarang, sepertiga pasien dapat disembuhkan dengan tindakan lokal (terapi bedah atau radiasi), yang cukup efektif jika tumor belum bermetastase pada waktu pengobatan. Akan tetapi, pada kasus-kasus tumor sisa, mikrometastasis dini merupakan ciri khas gambaran dari neoplasma, mengindikasikan bahwa pengobatan sistemik dicapai melalui kemoterapi (sering bersamaan dengan bedah atau radiasi) (Sjamsuhidajat, 1997).

Ada puluhan sediaan kemoterapi. Yang terpenting adalah tiga kelompok, yaitu sediaan yang menghalangi sintesis DNA (*alkilating agent*), antimetabolit yang mengganggu sintesis asam nukleat dan antibiotik antitumor yang juga mengganggu sintesis DNA dan merusak inti sewaktu mitosis (Sjamsuhidajat, 1997).

Berdasarkan mekanisme molekuler, dapat dikelompokkan dengan cara berikut :

1. Obat yang mengganggu replikasi DNA

a. Zat Sitostatik Peselip

Obat peselip terikat kuat pada DNA kromatin dalam intisel dengan menyelip diantara dua pasangan basa pada spiral ganda dan membentuk senyawa kompleks alih-muatan dengan nukleotida. Antaraksi ini tidak berlangsung secara acak, dan telah diduga bahwa beberapa senyawa menyelip dari lekukan besar, sedangkan yang lainnya menyisip hanya dari lekukan kecil pada spiral. Pasangan basa spiral menjadi terpilin sebesar  $10^0$  dan terpisah sejarak 0,67 nm, serta terbuka sebesar  $-26$  pada tempat penyelip. Karena hal ini merusak spiral ganda, maka replikasi dan transkripsi gen pun terganggu (Nogrady, 1992).

b. Zat Pengalkil

Zat antitumor golongan ini merupakan senyawa yang membentuk ion karbonium atau gugus elektrofit lain yang reaktif. Semuanya sebagai zat penanda afinitas. Senyawa seperti ini akan terikat secara kovalen pada DNA, dan dapat membentuk hubungan-lintas pada kedua untaian spiral, atau dapat juga mengganggu replikasi atau transkripsi, karena proses ini lebih lazim terjadi pada sel ganas yang membelah dengan cepat dibandingkan dengan dalam jaringan normal, maka zat pengalkil dapat mengendalikan tumor dan dalam beberapa hal bahkan menghilangkannya (Nogrady, 1992).

c. Anti Metabolit

Anti metabolit penghambat sintesis DNA bekerja melalui penghambatan bersaing atau alosterik terhadap berbagai enzim yang terlibat pada biosintesis purin atau pirimidin (Nogrady, 1992).

#### d. Penghambat DNA Topoisomerase

DNA adalah suatu molekul yang topologinya terbatas karena semua ujung spiral gandanya yang bundar terpancang dalam ruang. Hal ini memungkinkan pembentukan struktur yang sangat teratur yang disebut supercoil. Selama replikasi, pilinan spiral ganda harus membuka dan pembukaan ini menambah adipilin positif. Topoisomerase I menghilangkan adipilin ini dengan memecahkan dan melekatkan kembali untai untuk membentuk DNA yang kendur, karena termodinamika reaksi ini menguntungkan, tidak diperlukan ATP. Topoisomerase II membantu kuatnya kedua untai DNA melalui tempat-tempat yang pecah, jadi menghasilkan adipilin negatif yang memicu pemisahan untai asal garpu replikasi berputar kira-kira 100 putaran perdetik, gangguan terhadap enzim ini dengan cepat menghentikan replikasi. Nampaknya banyak zat antitumor peselip dan juga beberapa zat yang tidak menyelip, menstabilkan kompleks enzim-DNA. Dengan demikian, perpecahan akibat enzim menjadi kekal, sehingga DNA putus. Dengan cara ini, enzim topoisomerase II diubah menjadi faktor yang mematikan (Nogardy, 1992).

#### 2. Obat yang Mengganggu Transkripsi dan Translasi

Obat ini mempengaruhi pengaturan sintesis protein sekalipun pada saat genom (struktur DNA) utuh. Aktivitas seperti ini dapat merupakan akibat gangguan translasi RNA pemberita atau gangguan translasi mRNA ke protein. Diantara sekian banyak efek biokimiawi, nampaknya zat sitostatik menyebabkan DNA virus, bakteri, dan binatang terputus dan terpecah. Nampaknya zat tersebut juga menghambat DNA ligase, suatu enzim replikasi dan pemasangan-ulang (repair) DNA yang penting, jadi zat ini mengganggu transkripsi dan juga replikasi asam nukleat (Nogardy, 1992).

#### 3. Zat Sitostatik Pengganggu Mitosis

Zat antitumor ini menghentikan pembelahan sel pada tahap metafase, pada saat kromosom anak biasanya mulai berpindah menuju kutub sel. Kromosom tersebut tertarik ke arah kutub oleh mikrotubul, yang salah satu ujungnya bersatu, sedangkan

### 2.2.2 Deskripsi

Pohon kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) besar dengan memiliki ketinggian 8-30 m, ranting banyak dan mengandung getah putih. Memiliki daun yang berbentuk elips dengan panjang 5-15 cm, permukaan atas berwarna hijau dan permukaan bawah berwarna coklat keemasan bila sudah tua (Nogrady, 1992).

Bunga dari pohon kenitu ini tidak tampak, biasanya menggerombol di ketiak daun berwarna hijau kekuningan, kuning samapai putih keungunan dengan 5 mahkota daun. Buah kenitu berbentuk bulat atau berdiameter 5-10 cm, dan biasanya berwarna hijau samapai kecoklatan bila sudah tua dengan rasa yang lembut manis dan berair (Nogrady, 1992).



Gambar 2.1 Tanaman *Chrysophyllum cainito* L.

### 2.2.3 Nama Daerah

Menurut Morton dan Heyne (1987) *Chrysophyllum cainito* Leach yang merupakan salah satu bagian dari famili sapotaceae memiliki beberapa nama daerah :

- a. Suriname : Sterepple, Apra, Gouabladboom
- b. Spanyol : Caimito, Estrella
- c. Portugis : Cainito, ajara
- d. Prancis : Cainite, Cainiter

- e. Haiti : Piedd cainite, cainiter a feui;;es
- f. Virginia : Cainit
- g. Colombia : Caimo, caimo morado, cainito maduraverde
- h. Bolivia : Caimitero, mumcuja
- i. Argentina : aguay, olivoa
- j. Indonesia : Sawo duren
- k. Sunda : Sawo kudu, sawo siyem
- l. Madura : Kanitu

#### 2.2.4 Penyebaran dan Iklim

Tanaman kenitu sebenarnya berasal dari Amerika dan juga tersebar di daerah lain, misalnya India, Panama, Mexico, Guatemala, Argentina, Peru, Haiti, dan daerah tropis lain (Morton, 1987). Di Indonesia tanaman kenitu banyak terdapat di pulau Jawa bagian hilir dan daerah pegunungan rendah. Tanaman ini biasanya hidup dengan baik di daerah tropis. Pohon yang sudah tua tidak dapat tumbuh dengan baik di daerah dengan suhu  $-2,22^{\circ}\text{C}$ , sedangkan pohon yang masih muda dapat mati pada daerah dengan suhu  $-0,56^{\circ}\text{C}$  (Morton, 1987).

#### 2.2.5 Manfaat

Tanaman ini pernah dibiakkan sebagai pohon buah-buahan atau pohon hias. Di Filipina tanaman ini digunakan sebagai obat cacing untuk domba (Fernandez, 1997). Buah yang sudah masak digunakan untuk mengurangi inflamasi pada laringitis dan pneumonia, serta diabetes melitus. Di Venezuela buah yang belum masak digunakan untuk mengatasi gangguan pencernaan. Rebusan buah dikumur untuk menghilangkan angina. Rebusan daun digunakan sebagai pektoral. Warga Kuba yang berdomisili di Miami menggunakan rebusan daun untuk pengobatan kanker. Infus daun digunakan untuk diabetes dan rematik persendian. Rebusan batang digunakan

sebagai tonik dan stimulan untuk mengatasi diare, disentri, hemoragi dan antitusif (Morton, 1987).

#### 2.2.6 Kandungan Kimia

Buah kenitu mengandung senyawa-senyawa karoten, vitamin (B1, B2, C), polifenol (epikatekin, katekin, galokatekin, epigalokatekin, queraetin, quersetrin, isoquersetrin, mirisitrin dan asam galat), mineral (Ca, P, Fe), asam amino (triptofan, metionin, lisin), air, lemak, karbohidrat dan protein. Daun kenitu mengandung senyawa alkaloid, resin, asam resinat, dan tanin serta zat pahit lain (Luo, 1991).

#### 2.2.7 Senyawa Alkaloid

Alkaloid, sekitar 5500 telah diketahui, merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar. Tidak ada satupun istilah 'alkaloid' yang memuaskan, tetapi pada umumnya alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid sering kali beracun bagi manusia dan banyak yang mempunyai kegiatan fisiologi yang menonjol; jadi digunakan secara luas dalam bidang pengobatan (Harborne, 1984).

Alkaloid banyak ditemukan dalam tumbuhan angiospermae. Pada umumnya alkaloid tidak ditemukan atau sering terdapat dalam gymnospermae, paku-pakuan, lumut, dan tumbuhan rendah. Uji sederhana, tetapi yang sama sekali tidak sempurna, untuk alkaloid dalam daun atau buah segar adalah rasa pahitnya di lidah. Ada cara khas yang digunakan oleh Hultin dan Torssell (1965) untuk menjaring 200 suku tumbuhan Swedia. Mereka melakukan ekstraksi pendahuluan 4 g jaringan kering setiap cuplikan dengan metanol (Harborne, 1984).

### 2.2.8 Senyawa Tanin

Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Secara kimia terdapat dua jenis utama tanin yang tersebar tidak merata dalam dunia tumbuhan. Tanin-terkondensasi hampir terdapat semesta di dalam paku-pakuan dan gimnospermae, serta tersebar luas dalam angiospermae, terutama pada jenis tumbuhan berkayu. Sebaliknya, tanin yang terhidrolisiskan penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkeping dua ; di Inggris hanya terdapat dalam suku yang nisbi sedikit. Tetapi kedua jenis tanin itu dijumpai bersamaan dalam tumbuhan yang sama seperti yang terjadi pada kulit dan daun ek, *Quercus*.(Harborne, 1984).

Pada penelitian ini menggunakan tumbuhan kenitu yang termasuk subkelas angiospermae, tanin yang terdapat dalam kenitu ini diduga adalah tanin-terkondensasi. Tanin-terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal (atau galokatekin) yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Nama lain untuk tanin –terkondensasi ialah proantosianidin karena bila direaksikan dengan asam panas, beberapa ikatan karbon-karbon penghubung satuan terputus dan dibebaskanlah monomer antosianidin. Kebanyakan proantosianidin adalah prosianidin, ini berarti bila direaksikan dengan asam akan menghasilkan sianidin.(Harborne, 1984).

Proantosianidin adalah polimer flavon (termasuk golongan flavonoid) yang dapat dikenal berdasarkan kenyataan bahwa bila senyawa tersebut dipanaskan dengan asam, daun yang mengandung senyawa itu menjadi merah. Untuk analisis, jaringan yang telah dikeringkan dengan hati-hati harus diserbuk halus dahulu dan sejumlah serbuk yang telah ditimbang diekstraksi dengan metanol.(Harborne, 1984).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanin dapat menghambat tumor payudara pada tikus dan memiliki efek kemopreventif secara langsung dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Secara in vitro tanin dapat menghambat

proliferasi berbagai sel kanker dan menginduksi apoptosis sel kanker (Xin Chen *et al*, 2003). Menurut Hengstler (2002) senyawa golongan flavonoid bekerja sebagai antikanker melalui penghambatannya terhadap aktivitas enzim topoisomerase II dan DNA polymerase serta sebagai antivirus.

### 2.3 Tinjauan tentang Metode “*Brine Shrimp Lethality Test*”

*Brine Shrimp Lethality Test* (BST) pada awalnya dikemukakan oleh Michael dkk, dan selanjutnya dikembangkan oleh Vanhaecke dkk, serta Sleet dan Brended. Bioassay ini merupakan sebuah metode dasar yang berguna untuk mengetahui toksisitas dan dapat digunakan untuk mendeteksi toksin jamur, toksisitas ekstrak tumbuhan, logam berat, toksin sianobakteria, pestisida (Carballo, 2002).

*Brine Shrimp Lethality Test* (BST) merupakan metode yang berguna sebagai permulaan uji toksisitas dan juga untuk menskrining aktivitas farmakologi dalam ekstrak tumbuhan. Dan merupakan uji hayati pendahuluan yang sederhana, cepat, biaya relatif murah, tidak memerlukan teknik aseptis, tidak memerlukan peralatan khusus, menggunakan sampel yang relatif sedikit dan cukup dilakukan di dalam ruangan sebagai alat untuk menapis dan memantau hasil ekstrak dan fraksinasi ekstrak aktif fisiologi serta untuk mendeteksi senyawa aktif biologis hasil isolasi (Meyer, 1982).

Senyawa bioaktif selalu toksik pada dosis tinggi. Hal ini memungkinkan penggunaan uji hayati umum yang dapat menapis senyawa-senyawa toksik pada hewan. Farmakologi adalah toksikologi sederhana pada dosis rendah, dan toksikologi adalah farmakologi sederhana pada dosis tinggi. Berdasarkan hal ini, kematian *in vivo* organisme sederhana (zooplankton) dapat digunakan untuk memonitor skrining dan fraksinasi zat bioaktif produk alam (Anderson, 1991).

*Artemia salina* Leach adalah sejenis udang laut dari suku Crustacea. Telur udang laut, *Artemia salina* Leach mudah didapat dan murah harganya. Jika ditempatkan pada air laut, udang laut ini akan menetas dalam jangka waktu 48 jam menjadi larva (nauplii). Larva nauplii inilah yang nantinya kita gunakan untuk percobaan. Selama 30 tahun *Artemia salina* telah digunakan untuk mendeteksi toksisitas sistemik dalam ekotoksikologi. Dalam segi farmakologi juga didapatkan hasil positif dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* dalam mendeteksi aktivitas ekstrak tumbuhan (Carballo, 2002).

Nauplii udang laut sebelumnya telah digunakan dalam sejumlah sistem uji aktivitas. Kematian hewan sederhana ini dapat digunakan sebagai suatu alat monitor untuk proses praskrining dan fraksinasi dalam penelitian produk bioaktif dari sumber alam. Para peneliti telah mengembangkan metode ini untuk menguji ekstrak tumbuhan, fraksi atau komponen murni dengan konsentrasi awal 10, 100, 1000 ppm (atau mcg/mL). Masing-masing konsentrasi disiapkan dalam 3 botol. Setelah dalam 24 jam jumlah nauplii yang masih hidup dihitung dan prosentase kematian dari masing-masing dosis dicatat. Selanjutnya data ini dianalisa dengan analisa probit program SPSS 10 untuk mengetahui harga  $LC_{50}$  (Lethality Concentration 50% yaitu dosis yang menyebabkan kematian sebesar 50% dari hewan coba) dengan derajat kepercayaan (interval confidence) 95% (Anderson, 1991).

Dari hasil penelitian didapatkan adanya korelasi yang baik antara uji toksisitas terhadap larva udang atau "*Brine Shrimp Lethality Test*" dan uji 9-KB (Karsinoma nasofaring) telah diperoleh hasil bahwa nilai  $ED_{50}$  (effective dose 50% yaitu dosis yang memperlihatkan kesembuhan sebesar 50% hewan percobaan) untuk sitotoksik secara umum kurang lebih sepersepuluh dari harga  $LC_{50}$  dari uji kematian larva udang laut (Anderson, 1991).

Sebagian besar tumbuhan yang mempunyai aktivitas antineoplastik pada uji BST mempunyai aktivitas juga pada sitotoksik dan 3-PS (Leukemia invivo). Hal ini memungkinkan pemakaian metode kematian larva udang sebagai alat monitor yang baik pada proses fraksinasi (Anderson, 1991)

## 2.4 *Artemia salina*, Leach

### 2.4.1 Klasifikasi

*Artemia* merupakan bangsa udang-udangan yang diklasifikasikan sebagai berikut :

Phylum	: Arthropoda
Kelas	: Crustacea
Sub Kelas	: Branchiopoda
Ordo	: Anostraca
Familia	: Artemidae
Genus	: <i>Artemia</i>
Spesies	: <i>Artemia salina</i> , Leach

Dari genus *Artemia* dikenal beberapa spesies antara lain *Artemia salina* Leach, *Artemia partherogenetica*, *Artemia pranciscana kellog*, *Artemia urmania Gunther*, *Artemia tunisiana Bower*, *Artemia persimilis Prosclocimi* dan *peccinelli*, *Artemia Monica Verril*, *Artemia odessensier* (Ismansetyo, 1995).

### 2.4.2 Morfologi

*Artemia* dijual belikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut dengan kista. Kista ini bulat, berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter 200-350 mikron. Kista yang berkualitas baik akan menetas sekitar 18-24 jam apabila diinkubasikan dalam air laut. *Artemia* ini memiliki beberapa tahap dalam proses pertumbuhannya yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang dan tahap payung atau tahap pengeluaran nauplii

(Artemia yang baru menetas) dengan bentuk bulat lonjong, panjang 400 mikron, lebar 170 mikron, dan berat 0,002 mg (Ismansetyo, 1995). Larva nauplii inilah yang nantinya kita gunakan untuk percobaan (Anderson, 1991).

#### 2.4.3 Sifat Ekologi dan Reproduksi

Menurut Heyne (1987) beberapa sifat ekologi dan reproduksi Artemia adalah :

- a. Tumbuh dengan baik pada kisaran suhu 25-30<sup>0</sup> C, tetapi kista Artemia kering sangat tahan pada suhu ekstrim dari -273-100<sup>0</sup> C.
- b. Memerlukan kadar garam tinggi, untuk pertumbuhan Artemia 30-50 ppt dan untuk dapat menghasilkan kista memerlukan kadar garam diatas 100 permil.
- c. Pada kandungan oksigen 1 mg/L dan sampai mencapai kejenuhan 150% masih dapat bertahan. Tetapi kandungan oksigen yang baik untuk pertumbuhan adalah diatas 3 mg/L.
- d. Memerlukan pH air 7,5-8,5 untuk dapat tumbuh dengan baik.
- e. Kandungan amonia media sebaiknya kurang dari 80 mg/L, tetapi masih dapat ditoleransi hingga 90 mg/L.
- f. Cara reproduksinya dapat bersifat biseksual maupun partenogenetik, baik secara ovovivipar maupun ovipar.

## BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Uji kematian larva udang laut atau “*Brine Shrimp Lethality Test*” berprinsip pada hubungan antara toksikologi dan farmakologi. Toksikologi adalah ilmu yang mempelajari tentang aksi berbahaya zat kimia atas jaringan hidup. Sedangkan farmakologi adalah ilmu yang mempelajari pengaruh zat kimia terhadap fungsi jaringan hidup. Toksikologi adalah farmakologi sederhana pada dosis lebih tinggi atau sebaliknya, farmakologi adalah toksikologi sederhana pada dosis lebih rendah (Anderson, 1991).

Beberapa studi menunjukkan bahwa zat ekstrak tumbuhan yang mengandung tanin jika diujikan toksisitasnya dengan *Artemia nauplii* (sebagai hewan coba) dengan menggunakan konsentrasi berbeda-beda (1000, 100, dan 10 ppm) dan dengan dihasilkan prosentase kematian sejumlah 50% populasi hewan coba dengan kepercayaan 95% dari  $LC_{50} < 1000$  ppm, maka ekstrak tumbuhan memiliki prospektif sebagai antikanker (Jerry, 1998).

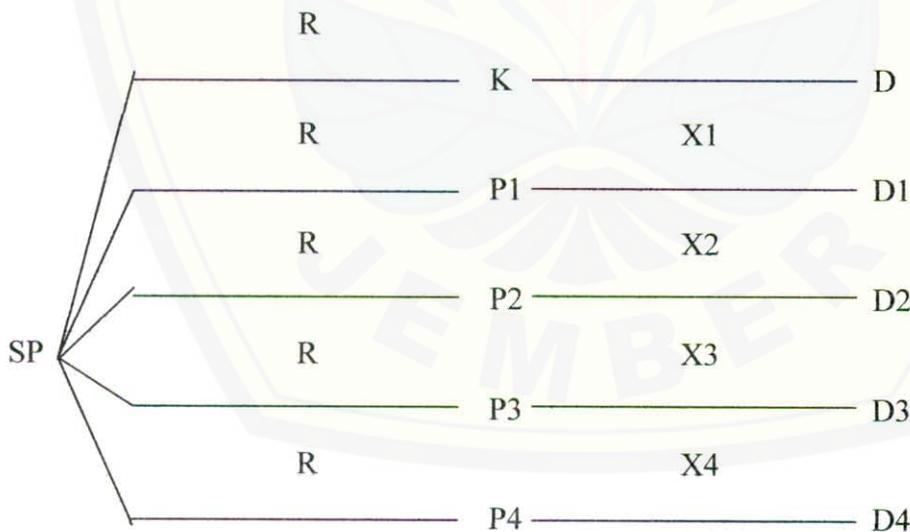
### 3.2 Hipotesis Penelitian

Melalui berbagai teori dan fakta empirik yang kemudian dituangkan dalam kerangka konseptual penelitian ini maka disusun hipotesis sebagai berikut :  
Ekstrak daun kenitu (*Chrysiphyllum cainito* L.) yang mengandung tanin dan alkaloid toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach.

## BAB 4. METODE PENELITIAN

### 4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design* atau disebut juga rancangan eksperimental sederhana. Dalam rancangan eksperimental sederhana ini subyek dibagi dalam 5 kelompok secara random, perlakuan diberikan pada 1 kelompok pertama dengan tidak diberikan perlakuan (sebagai kelompok kontrol) dan 4 kelompok terakhir diberi perlakuan dengan tingkat konsentrasi ekstrak daun kenitu yang berbeda-beda (1200, 1000, 800, 600 ppm). Setelah waktu yang ditentukan, kemudian diobservasi (diukur) variabel tergantung pada 5 kelompok tersebut (Meyer, 1982).



Gambar 4.1 :Rancangan Skematis Penelitian



Keterangan :

- SP : Sampel
- R : Randomisasi
- K : Kelompok kontrol
- P1 : Kelompok perlakuan ekstrak daun kenitu dengan konsentrasi 1200 ppm
- P2 : Kelompok perlakuan ekstrak daun kenitu dengan konsentrasi 1000 ppm
- P3 : Kelompok perlakuan ekstrak daun kenitu dengan konsentrasi 800 ppm
- P4 : Kelompok perlakuan ekstrak daun kenitu dengan konsentrasi 600 ppm
- X1 : Pemberian ekstrak daun kenitu dengan konsentrasi 1200 ppm
- X2 : Pemberian ekstrak daun kenitu dengan konsentrasi 1000 ppm
- X3 : Pemberian ekstrak daun kenitu dengan konsentrasi 800 ppm
- X4 : Pemberian ekstrak daun kenitu dengan konsentrasi 600 ppm
- D1 : Data kelompok P1 sesudah diberi perlakuan ekstrak 1200 ppm
- D2 : Data kelompok P2 sesudah diberi perlakuan ekstrak 1000 ppm
- D3 : Data kelompok P3 sesudah diberi perlakuan ekstrak 800 ppm
- D4 : Data kelompok P4 sesudah diberi perlakuan ekstrak 600 ppm

## 4.2 Variabel Penelitian

### 4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah pemberian ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) diberikan dalam konsentrasi yang berbeda. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan. Kelompok pertama sampai dengan keempat masing-masing diberikan konsentrasi 1200, 1000, 800, 600 ppm.

### 4.2.2 Variabel Tergantung

Varisbel tergantung adalah jumlah nauplii *Artemia salina* Leach yang mati.

#### 4.2.3 Variabel Kendali

- a. Jenis dan spesies hewan coba
- b. Fase pertumbuhan hewan coba (tahap nauplii)
- c. Suhu dan salinitas air
- d. Cara ekstraksi
- e. Waktu dan lama perlakuan serta pemeliharaan
- f. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba
- g. Waktu pengambilan daun kenitu

### 4.3 Definisi Operasional Variabel

#### 4.3.1 Ekstrak Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.)

Daun kenitu yang digunakan adalah spesies *Chrysophyllum cainito* L. yang diekstrak dengan larutan metanol, heksana dan etil asetat. Ekstrak diberikan dalam sepuluh konsentrasi yang berbeda yaitu 1200, 1000, 800, 600 ppm.

#### 4.3.2 Hewan Coba

Hewan coba yang dipakai adalah telur spesies *Artemia salina* Leach yang telah menetas menjadi nauplii.

#### 4.3.3 Suhu, salinitas dan pH air

Suhu dan salinitas air untuk pemeliharaan hewan coba disesuaikan dengan suhu dan salinitas dimana *Artemia* dapat tumbuh dengan baik, yaitu pada kisaran suhu 25-30<sup>o</sup>C dan dengan salinitas air 30-50 ppt untuk pertumbuhan *Artemia* serta 100 permil untuk dapat menghasilkan kista. Derajat keasaman juga disesuaikan dengan pH dimana *Artemia* dapat tumbuh dengan baik, yaitu 7,5-8,5. Untuk mempermudah prosedur, pada penelitian ini langsung digunakan air laut.

#### 4.3.4 Waktu dan Lama Perlakuan

Perlakuan dilakukan pada saat *Artemia salina* Leach dalam tahap nauplii. Lama perlakuan adalah 24-48 jam.

#### 4.3.5 Waktu dan Lama Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan sampai telur *Artemia salina* Leach menetas dan menjadi tahap nauplii.

#### 4.3.6 Pemeliharaan dan perlakuan

Pemeliharaan dan perawatan hewan coba disebuah aquarium kecil dengan diberikan gelembung udara yang memiliki kecepatan tertentu. Untuk mendapatkan media yang sesuai untuk pertumbuhan hewan coba, maka digunakan air laut sebagai media. Untuk memisahkan hewan coba yang telah menetas dari cangkangnya maka digunakan bola lampu.

#### 4.3.7 Waktu Pengambilan Daun Kenitu

Waktu pengambilan daun kenitu dilakukan pada saat yang sama dan diambil pada satu pohon yang sama untuk mengontrol zat yang terkandung dalam daun kenitu. Daun diambil di jalan Mohammad Seruji Patrang Jember.

### 4.4 Alat dan Bahan

#### 4.4.1 Alat

- a. Toples
- b. Pengaduk kaca
- c. Pipet tetes dan pipet volume 10 mL
- d. Kaca pembesar
- e. Bola lampu 10 watt

- f. Rotavapor
- g. Lemari asam
- h. Vial volume 10 mL
- i. Ultrasonik
- j. Pipet mikro 5  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$ , dan 500  $\mu\text{L}$  (Socorex, Swiss)
- k. Timbangan
- l. Blender
- m. Petri disc

#### 4.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Serbuk daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) kering.
- b. Telur *Artemia salina* Leach
- c. Air laut dan aquades
- d. Metanol p.a. dan teknis
- e. Heksana p.a. dan teknis
- f. Etil asetat p.a. dan teknis

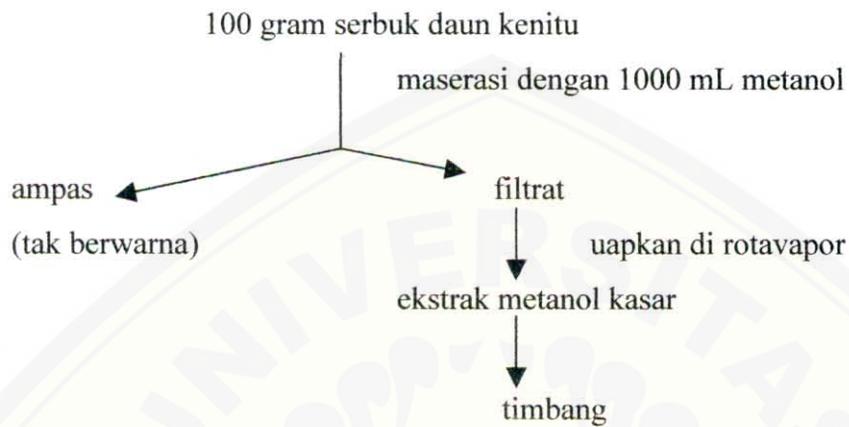
#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Kimia dan Biologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Jember pada bulan Juni-Juli 2005.

## 4.6 Skema Kerja

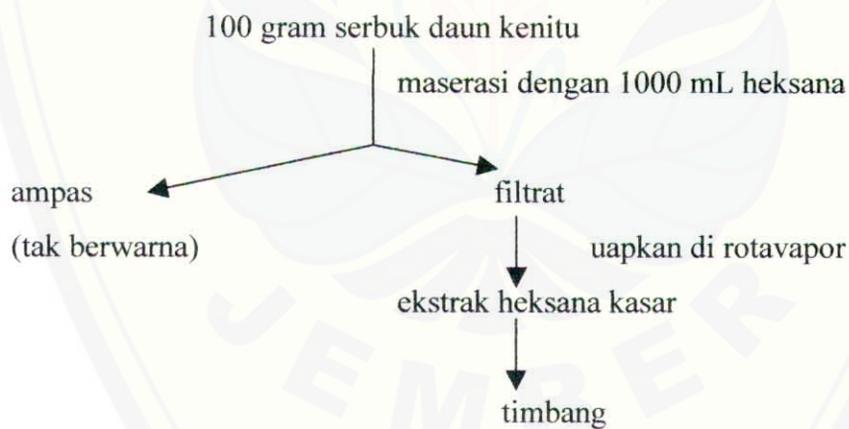
### 4.6.1 Skema Ekstraksi

#### 4.6.1.1 Skema Ekstraksi Metanol



Gambar 4.2 Skema Ekstraksi Metanol

#### 4.6.1.2 Skema Ekstraksi Heksana



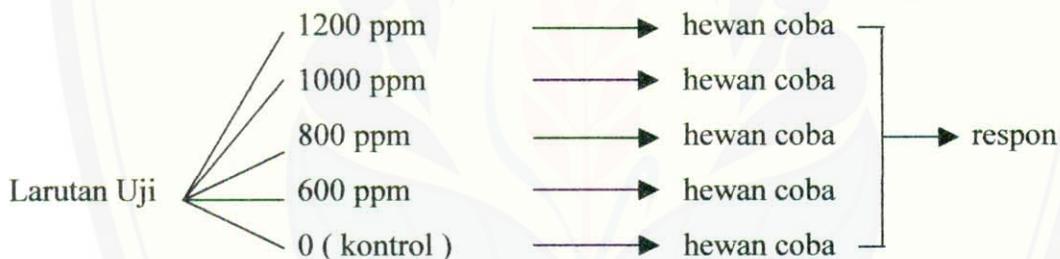
Gambar 4.3 Skema Ekstraksi Heksana

#### 4.6.1.2 Skema Ekstraksi Etil Asetat



Gambar 4.4 Skema Ekstraksi Etil Asetat

#### 4.6.2 Skema Pengujian



Gambar 4.5 Skema Pengujian

#### 4.7 Pembuatan Larutan Induk

Ditimbang 100 mg dari masing-masing ekstrak kasar. Kemudian ditambahkan pada masing-masing ekstrak dengan pelarut yang sesuai (heksana p.a., metanol p.a., dan etil asetat p.a.) sebesar 10 mL. Ekstrak kasar dan pelarut ini dicampur secara homogen. Perhitungan konsentrasi larutan induk :

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

10 mL

#### 4.8 Pembuatan Larutan Uji dan Larutan Kontrol

Larutan induk sebanyak 600, 500, 400, 300  $\mu\text{L}$  larutan induk dimasukkan dalam vial volume 10 mL, kemudian diuapkan sampai kering dengan menggunakan lemari asam. Masing-masing konsentrasi disiapkan dalam 3 botol. Setiap ekstrak diberikan perlakuan yang sama. Sedangkan untuk larutan kontrol dibuat tanpa penambahan ekstrak sama sekali.

#### 4.9 Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji dan Pengujian

Masing-masing vial yang telah terisi ekstrak yang dikeringkan dalam lemari asam ditambahkan air laut sampai dengan 3 mL, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan ultrasonik. Setelah homogen, kemudian ditambahkan 10 ekor larva udang (30 ekor larva udang tiap-tiap konsentrasi) dan air laut sampai dengan 5 mL. Setelah 24 jam, jumlah larva udang yang mati untuk tiap-tiap konsentrasi dihitung dan dicatat. Bila di dalam larutan kontrol terdapat larva udang yang mati pada tiap-tiap konsentrasi dikurangi jumlah larva udang yang mati dalam larutan kontrol.

Perhitungan konsentrasi larutan untuk uji :

$$\frac{0,6 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 10.000 \mu\text{g/mL} = 1.200 \mu\text{g/mL}$$

5 mL

$$\frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 10.000 \mu\text{g/mL} = 1.000 \mu\text{g/mL}$$

5 mL

$$\frac{0,4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 10.000 \mu\text{g/mL} = 800 \mu\text{g/mL}$$

5 mL

$$\frac{0,3 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 10.000 \mu\text{g/mL} = 600 \mu\text{g/mL}$$

5 mL

#### 4.10 Analisis Data

Data-data yang diperoleh diolah dengan analisis probit program SPSS 10. Sehingga untuk harga  $LC_{50}$  dari bahan yang diteliti dapat ditentukan.



## BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian diperoleh harga  $LC_{50}$  sebesar 891,01952  $\mu\text{g/mL}$  dari ekstrak metanol daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST), sedangkan pada ekstrak heksana dan etil asetat tidak didapatkan larva udang yang mati. Berdasarkan hasil ini maka disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun kenitu lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak heksana dan etil asetat serta ekstrak metanol daun kenitu prospektif sebagai zat sitotoksik atau antikanker.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap senyawa murni (isolat) yang terkandung dalam ekstrak metanol daun kenitu yang memiliki efek sitotoksik dengan menggunakan metode BST serta meneliti lebih lanjut aktivitas sitotoksiknya dengan menggunakan metode kultur jaringan kanker atau cell line.



DAFTAR PUSTAKA

- Anderson JE., Goetz CM, Mc Laughlin JL *et al.* 1991. *Blind Comparison of Simple Berch Top Bioassay and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumours Prescreen, Phytochemical Analysis.* <http://www.sna.org/research>.
- Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P *et al.* 2002. *A Comparison between two Brine Shrimp Assay to Detect in vitro Cytotoxicity in Marine Natural Products.* <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender>.
- Chen Xin, John AB, Thomas GM *et al.* 2003. *Tannic acid is an Inhibitor of CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) / CXCR4 with Antiangiogenic Activity.* <http://Clineancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract>
- Fernandez, TJ. 1997. *Anthelmintic Value of Tinospora rumphii in Ethnoveterinary Medicine Alternatives for Live Stock Development.* <http://www.vetnetwork.org.uk/pune20.htm-259k>.
- Guyton, AC. 1990. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit.* Jakarta: EGC.
- Harborne, JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.* Bandung: ITB.
- Hengstler, J.G. 2002. *Dietary Topoisomerase II-Poisons : Contribution of Soy Products to Infant Leukemia?.* <http://www.giftinfo.uni-mainz.de/EXCLI/volumes/vol1/Hengstleretal02-02.pdf>.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid III.* Yayasan Sarana Wana Jaya: Jakarta.
- Ismansetyo, Alim dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton Kedokteran dan Kesehatan.* Yogyakarta: Kanisius.
- Jerry, L. 1998. *The Use of Biological Assay to Evaluate Botanicals.* New York: Department of Medical Chemistry and Molecular Pharmacology. <http://www.pawpawresearch.com/brineshrimp1.pdf>.
- Katzung, BG. 2001. *Farmakologi Dasar dan Klinik.* Jakarta: EGC.

- Komala, S. 1997. *Histologi Dasar*. Jakarta: EGC.
- Liu, RH. 2004. *Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action*. Ithaca: Department of Food Science Cornell University. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd>
- Luo XD, Margaret JB, Edward JK *et al.* 1991. *Polyphenolic Antioksidants from Chrysophyllum cainito L (Star Apple)*. <http://Pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi>
- Mc Laughlin, JL. 1991. *Crown Gall Tumours in Potato Disc and Brine Shrimp Lethality : Two simple bioassay for higher plant screening and fractionation*. <http://www.pawpawresearch.com/brineshrimp1.pdf>
- Meyer, Hartmann M, Krause HJ *et al.* 1982. *Planta Medica*. <http://www.sciello.br/scielo.php?>
- Morton. 1987. *Star Apple*. [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/star\\_apple.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/star_apple.html)
- Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD *et al.* 1996. *Herbal Medicines*. [http://www.pharm.usyd.edu.au/unit\\_outlines/herbmed.shtml](http://www.pharm.usyd.edu.au/unit_outlines/herbmed.shtml)
- Nogrady, Thomas. 1992. *Kimia Medisinal*. Bandung: ITB.
- Pratiknya, AW. 2003. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Safitri, Indri. 2002. *Metabolisme Asam Nukleat dan Ekspresi Gen*. Surabaya: Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran UNAIR.
- Sjamsuhidajat, R de jong, 1997. *Buku Ajar Ilmu Bedah Edisi Revisi*. Jakarta: EGC.
- Sukardiman. 1998. *Uji Toksisitas Senyawa Andrografolid dari Herba Andrographis Paniculata Ness Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)*. Surabaya : Fakultas Farmasi UNAIR.
- UrRahman, Atta. 1998. *Studies in Natural Products Chemistry Vol. 20: Structure and Chemistry*. New York: El Sevier Science. <http://www.jacn.org/cgi/content/fully19/3>
- Verheij EWM, Coronel RE *et al.* 1992. *Plant Resources of Shout-East Asia 2 Edibel Fruits and Nuts*. Bogor: PROSEA. <http://www.sciello.br/scielo>

Wijaya, Cariline. 1994. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit edisi 4*. Jakarta: EGC.



### Lampiran 1. Data Hasil Penelitian

#### 1.1 Jumlah larva udang yang mati akibat perlakuan dengan ekstrak metanol

Konsentrasi ekstrak metanol ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( X )	Jumlah larva udang yang diuji ( P )	Jumlah larva udang yang mati setelah perlakuan ( D )		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1200	10	8	8	7
1000	10	6	5	6
800	10	3	5	4
600	10	2	3	1
0 ( kontrol )	10	0	0	0

#### 1.2 Jumlah larva udang yang mati akibat perlakuan dengan ekstrak heksana

Konsentrasi ekstrak heksana ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( X )	Jumlah larva udang yang diuji ( P )	Jumlah larva udang yang mati setelah perlakuan ( D )		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1200	10	0	0	0
1000	10	0	0	0
800	10	0	0	0
600	10	0	0	0
0 ( kontrol )	10	0	0	0

## Lampiran 1 (lanjutan)

## 1.3 Jumlah larva udang yang mati akibat perlakuan dengan ekstrak etil asetat

Konsentrasi ekstrak etil asetat ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( X )	Jumlah larva udang yang diuji ( P )	Jumlah larva udang yang mati setelah perlakuan ( D )		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1200	10	0	0	0
1000	10	0	0	0
800	10	0	0	0
600	10	0	0	0
0 ( kontrol )	10	0	0	0

**Lampiran 2. Hasil Analisa Data**

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*  
 DATA Information

4 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 0 cases are in the control group.  
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*  
 Parameter estimates converged after 7 iterations.  
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
CONCENTR	5,11929	1,95978	2,61217
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-15,10132	5,77507	-2,61492

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = ,079 DF = 2 P = ,961

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*  
 Observed and Expected Frequencies

CONCENTR	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
3,08	10,0	7,7	7,460	,240	,74598
3,00	10,0	5,7	6,012	-,312	,60123
2,90	10,0	4,0	4,053	-,053	,40533
2,78	10,0	2,0	1,897	,103	,18966

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*  
 Confidence Limits for Effective CONCENTR

Prob	CONCENTR	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	312,93853	13,65766	498,46885
,02	353,75978	22,25333	536,19614
,03	382,37853	30,31980	561,84286
,04	405,42327	38,25179	582,11125
,05	425,18893	46,20054	599,27373
,06	442,76997	54,24418	614,39969
,07	458,78223	62,43039	628,08541
,08	473,61006	70,79180	640,70077
,09	487,51108	79,35268	652,49289
,10	500,66736	88,13235	663,63633
,15	559,02418	135,81928	713,24786
,20	610,21819	190,86414	757,94946
,25	657,85862	254,45313	801,99723
,30	703,80276	327,46623	848,77857
,35	749,23632	410,05215	902,52623
,40	795,05736	500,61222	970,02313
,45	842,05521	594,29325	1062,75758
,50	891,01952	682,94492	1197,81839
,55	942,83104	759,77131	1394,55423
,60	998,56416	824,30013	1671,80032
,65	1059,63335	880,45698	2053,74366
,70	1128,03734	932,68696	2581,40697
,75	1206,81825	984,79330	3329,87211
,80	1301,03592	1040,45810	4445,94533
,85	1420,18147	1104,53973	6254,17544
,90	1585,71510	1186,24258	9645,26849
,91	1628,50821	1206,35229	10713,75635
,92	1676,30687	1228,41009	12010,79420
,93	1730,48503	1252,94097	13620,96629
,94	1793,06602	1280,70946	15678,28579
,95	1867,20710	1312,89420	18409,89457
,96	1958,23935	1351,45855	22237,85230
,97	2076,25621	1400,06106	28058,54496
,98	2244,22289	1466,86006	38233,67384
,99	2536,97038	1577,67325	62304,86982



Probit Transformed Responses

