

**UJI TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach. dan TOKSISITAS  
AKUT KOMPONEN BIOAKTIF *Pandanus conoideus* var. *conoideus* Lam.  
SEBAGAI KANDIDAT ANTIKANKER**

**Skripsi**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
Guna memperoleh gelar Sarjana Sains



Oleh:

Rizki Nisfi Ramdhini

NIM. M0406014

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA  
2010**

**HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING**

**UJI TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach. dan TOKSISITAS  
AKUT KOMPONEN BIOAKTIF *Pandanus conoideus* var. *conoideus* Lam.  
SEBAGAI KANDIDAT ANTIKANKER**

Oleh:

Rizki Nisfi Ramdhini  
M0406014

Telah Disetujui Oleh Tim Pembimbing

Tanda Tangan

Pembimbing 1 : Rita Rakhmawati, M.Si., Apt  
NIP. 198005102005012002

.....

Pembimbing II : Nestri Handayani, M.Si., Apt  
NIP. 197012112005012001

.....

Surakarta, Juli 2010

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi

Dra. Endang Anggarwulan, M.Si  
NIP. 195003201978032001

**PENGESAHAN**

SKRIPSI

**UJI TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach. dan TOKSISITAS  
AKUT KOMPONEN BIOAKTIF *Pandanus conoideus* var. *conoideus* Lam.  
SEBAGAI KANDIDAT ANTIKANKER**

Oleh:  
Rizki Nisfi Ramdhini  
M0400614

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 21 Juli 2010  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Surakarta, Juli 2010

Penguji I

Penguji II

Dra. Marti Harini, M.Si  
NIP. 195403231985032001

Dr. Edwi Mahajoeno, M.Si  
NIP. 196010251997021001

Penguji III

Penguji IV

Rita Rakhmawati, M.Si., Apt  
NIP. 198005102005012002

Nestri Handayani, M.Si., Apt  
NIP. 197012112005012001

Mengesahkan

Dekan FMIPA

Ketua Jurusan Biologi

Prof. Drs. Sutarno, M.Sc, Ph.D  
NIP. 196008091986121001

Dra. Endang Anggarwulan, M.Si  
NIP. 195003201978032001

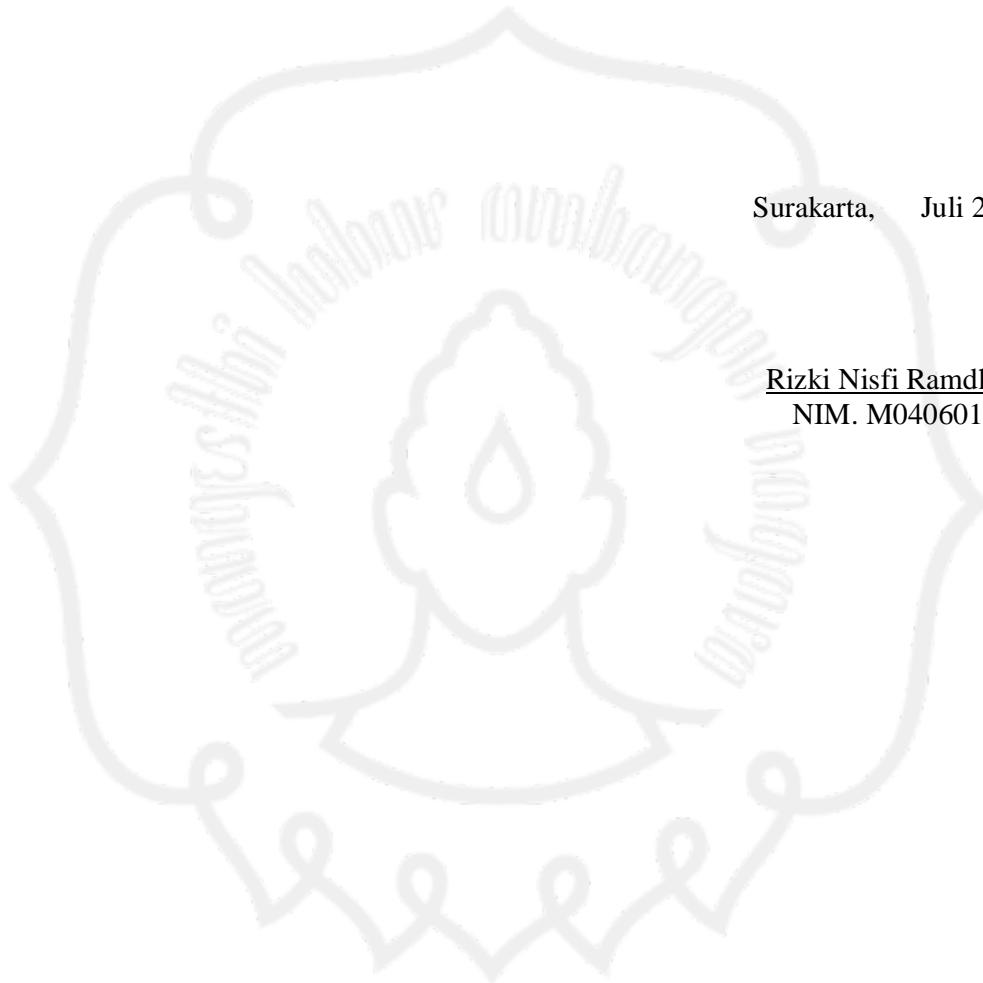
**PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari dapat ditemukan adanya unsur penjiplakan maka gelar kesarjanaan yang telah diperoleh dapat ditinjau dan atau dicabut.

Surakarta, Juli 2010

Rizki Nisfi Ramdhini  
NIM. M0406014



**UJI TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach. dan TOKSISITAS  
AKUT KOMPONEN BIOAKTIF *Pandanus conoideus* var. *conoideus* Lam.  
SEBAGAI KANDIDAT ANTIKANKER**

**Rizki Nisfi Ramdhini**

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

**ABSTRAK**

Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia. Berbagai macam senyawa telah dikembangkan untuk melawan kanker, akan tetapi tak satupun jenis senyawa-senyawa tersebut menghasilkan efek yang memuaskan dan tanpa efek samping yang merugikan. Buah merah merupakan salah satu sumber senyawa baru berasal dari Papua yang memiliki aktivitas farmakologis dan telah terbukti secara empiris memiliki aktivitas sebagai antikanker karena memiliki kandungan karoten, beta karoten dan  $\alpha$ - tokoferol yang cukup tinggi.

Pada penelitian ini dilakukan uji toksisitas hasil fraksinasi buah merah (*P. conoideus* Lam.) menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) untuk mengetahui potensinya sebagai obat antikanker dan dilakukan pengujian toksisitas akut untuk mengetahui potensi ketoksikan akut, menilai berbagai gejala klinis, dan kematian hewan uji akibat pemejanaan sediaan uji. Pengujian toksisitas akut komponen bioktif hasil partisi ekstrak etanolik buah merah pada hewan uji mencit. Sediaan uji diberikan secara oral dengan tingkat dosis yang berbeda yaitu 1,687, 2,687, 3,687, 4,687 dan 5,687g/kgBB. Efek toksik yang dievaluasi berdasarkan pengamatan terhadap perilaku hewan (profil farmakologi) setelah pemberian dosis tunggal bahan uji, perkembangan berat badan dan jumlah kematian hewan uji setiap hari selama 7-14 hari.

Nilai  $LC_{50}$  fraksi II (dua) terhadap *Artemia salina* Leach. sebesar 138,05  $\mu$ g/mL. Hasil pengujian BST yang diperoleh menunjukkan bahwa fraksi tersebut bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker. Hasil uji toksisitas akut menunjukkan bahwa hingga dosis tertinggi 5,687g/kgBB tidak menyebabkan efek toksik yang bermakna serta tidak ada kematian. Kemudian dilakukan pengujian dengan meningkatkan dosis menjadi 6,687 dan 7,687 g/kg BB secara akut. Hasil pengujian menunjukkan tidak adanya gejala toksik dan tidak adanya kematian. Dengan demikian  $LD_{50}$  semu dari partisi buah merah pada mencit lebih besar dari 7,687 g/kgBB.

Kata Kunci: *Pandanus conoideus* Lam., Kanker,  $LC_{50}$ , Toksisitas akut,  $LD_{50}$

**TOXICITY TEST TO *Artemia salina* Leach. AND ACUTE TOXICITY  
COMPOUNDS OF BIOACTIVE *Pandanus conoideus* var. *conoideus* Lam.  
AS CANDIDATE OF ANTICANCER**

**Rizki Nisfi Ramdhini**

Biology Department, Sciences and Mathematics Faculty,  
Sebelas Maret University, Surakarta

**ABSTRACT**

Cancer is a major problem and common cause of death around the world. Various therapeutic agents have been developed to against cancer, but none of these agents give satisfactory results and without debilitating side effects. Red fruit (*P. conoideus* Lam.) are known as rich sources of compounds which pronounced pharmacological activities and was one of plants that had empirical study became anticancer agent because it's contain of carotene,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol.

In this research the toxicity test from fractionation result of red fruit (*P. conoideus* Lam.) was conducted by using *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) method to know its potency as drug of anticancer and acute toxicity test for assess the potency of acute toxicity and death of animal test after administration of red fruit. The acute toxicity active compounds of partition of red fruit has been carried out on mice. The partition was administered by oral route in 4 different doses, i.e. 1,687, 2,687, 3,687, 4,687 and 5,687 g/kg BW. The toxic effect of the extract were evaluated by observation behavioral responses (pharmacological profile), the development of body weight and mortality each day for 7-14 days

LC<sub>50</sub> value fractionation of red fruit (fraction II) was 138,05  $\mu$ g/mL. The BST result showed that toxicity fractionation of red fruit were considered very toxic and potency as drug of anticancer. The results of acute toxicity showed that up to 5,687/kg BW, the test material did not cause any significant toxic effects and no one of death. Then continues test with dose 6,687 and 7,687 g/kg BW with acute toxicity test. The result showed the test did not cause toxic effects and no one of death. The LD<sub>50</sub> of the red fruit (*P. conoideus* Lam.) on mice was found to be more than 7,687g/kg BW

Key words: *Pandanus conoideus* Lam., cancer, LC<sub>50</sub>, acute toxicity, LD<sub>50</sub>

**MOTTO**

Sesungguhnya Kepunyaan Allah kerajaan langit dan bumi.  
Dia menghidupkan dan mematikan. Dan sekali-kali tidak ada  
pelindung dan penolong bagimu selain Allah  
(Q. S. At-Taubah : 116)

“Sukses bermula dari pikiran kita. Sukses adalah kondisi pikiran kita. Bila Anda menginginkan sukses, maka Anda harus mulai berpikir bahwa Anda sukses, dan mengisi penuh pikiran Anda dengan kesuksesan”  
(Dr. Joyce Brothers)

“The First and the most important step towards success is the feeling that we can succeed”  
(Nelson Boswell)

“Fokus pada satu keinginan memungkinkan pencapaian banyak keinginan”  
(Mario Teguh)

**PERSEMBAHAN**

**Skripsi ini kupersembahkan dengan segenap cinta untuk**

**Maha pemberi kemudahan just for: Allah SWT**

**“Bapak dan Ibu” tercinta yang memberikan do’a, cinta, dan dukungan serta perjuangannya untuk masa depanku....**

**Adiku tersayang “Dwi Aulia R” yang selalu memberikan motivasi dan nasihat yang bearti.**

**Kakakku sekaligus sahabatku “I rwan widi P” yang selalu memberikan warna dalam hidupku, selalu ada dalam suka dan duka.**

**Teman-teman Bi06-science terimakasih atas semangatnya**

**Almamater tercinta**

### **KATA PENGANTAR**

*Alhamdulillah robbil alamin*, segala puji bagi Allah SWT, yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya yang tak terhingga sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul: “Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach. dan Uji Toksisitas Akut Komponen Bioaktif *Pandanus conoideus var. conoideus* Lam. sebagai Kandidat Antikanker”.



Penyusunan skripsi ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata 1 (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Di dalam melakukan penelitian maupun penyusunan skripsi ini penulis telah mendapatkan banyak masukan, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak yang sangat berguna dan bermanfaat baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu pada kesempatan yang baik ini dengan besar hati penulis ingin mengucapkan terimakasih yang setulus-tulusnya dan sebesar-besarnya kepada:

Prof. Sutarno, M.Sc., Ph. D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan ijin penelitian untuk pelaksanaan skripsi.

HIBAH BERSAING XIII DIKTI atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan sehingga penelitian ini dapat berjalan hingga selesainya penyusunan skripsi.

Dra. Endang Aggarwulan, M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta sekaligus sebagai pembimbing akademik yang telah memberikan ijin, saran-saran dalam penelitian serta bimbingan kepada penulis.

Rita Rakhmawati, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan petunjuknya selama penyusunan proposal, penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi.

Nestri Handayani, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan selama penyusunan proposal, penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi.

Dra.Marti Harini, M.Si selaku dosen penelaah I yang telah memberikan bimbingan dan masukannya selama penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi.

Dr. Edwi Mahajoeno, M.Si selaku dosen penelaah II yang telah memberikan bimbingan dan masukannya selama penelitian sampai selesainya penyusunan skripsi.

Seluruh dosen, karyawan, staf-staf Laboratorium Jurusan Biologi yang telah dengan sabar dan tiada henti-hentinya memberikan dorongan baik spiritual maupun materil sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Kepala dan staf-staf Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang telah mengizinkan dan membantu penulis untuk melakukan penelitian di Laboratorium.

Teman-teman Bi06-science dan kakak-kakak serta adik-adik tingkat yang telah memberikan dukungan, semangat, dan hiburan serta warna dalam menjalani aktivitas perkuliahan.

Semua pihak yang membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Demikian semoga skripsi ini dapat berguna dan memberikan kontribusi dalam perkembangan Ilmu Pengetahuan terutama dalam perkembangan penelitian mengenai pengobatan penyakit kanker.

Surakarta, Juli 2010

Penyusun

## DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
ABSTRAK .....	v
ABSTRACK .....	vi
MOTTO HIDUP .....	vii
PERSEMBAHAN .....	viii
KATA PENGANTAR .....	ix
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
DAFTAR SINGKATAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	3
D. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II. LANDASAN TEORI</b> .....	<b>5</b>
<b>A. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
1. Buah Merah ( <i>P. conoideus</i> Lam.) .....	5
a. Klasifikasi .....	7
b. Deskripsi .....	7
c. Kandungan Senyawa Aktif .....	8
1) Tokoferol .....	9
2) Karotenoid dan $\beta$ -karoten .....	9
3) Asam-asam Lemak .....	10
2. Pemisahan Komponen Bioaktif .....	11
a. Ekstraksi .....	11
b. Partisi .....	12
c. VLC .....	12
d. Kromatografi Lapis Tipis .....	13
3. Uji Toksisitas <i>in vivo</i> .....	14
4. Uji Toksisitas Metode BST .....	16
5. <i>Artemia salina</i> Leach. ....	17
a. Klasifikasi .....	18
b. Deskripsi .....	19
c. Habitat .....	19
d. Perkembangan dan Siklus Hidup .....	20
e. Perilaku .....	22
<b>B. KERANGKA PEMIKIRAN</b> .....	<b>22</b>
<b>C. HIPOTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>26</b>

A. Waktu dan Tempat Penelitian .....	26
B. Alat Penelitian .....	26
1. Alat Pemisahan komponen bioaktif .....	26
2. Alat uji toksisitas dengan metode BST .....	26
3. Alat uji toksisitas <i>in vivo</i> .....	26
C. Bahan Penelitian .....	27
1. Bahan utama .....	27
2. Bahan ekstraksi, partisi dan fraksinasi .....	27
3. Bahan uji toksisitas dengan metode BST .....	27
4. Bahan uji toksisitas <i>in vivo</i> .....	27
D. Cara Kerja .....	27
1. Persiapan sampel uji .....	27
2. Pemisahan komponen bioaktif .....	28
a. Ekstraksi .....	28
b. Partisi .....	28
c. Fraksinasi .....	29
3. Uji toksisitas dengan metode BST .....	30
4. Uji Toksisitas akut .....	32
E. Analisa Data .....	36
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	36
A. Persiapan bahan uji .....	36
B. Pemisahan komponen bioaktif .....	36
1. Ekstraksi .....	37
2. Partisi .....	38
3. Fraksinasi .....	40
C. Pengujian toksisitas akut .....	48
BAB V. PENUTUP .....	63
1. Kesimpulan .....	63
2. Saran .....	63
DAFTAR PUSTAKA .....	64
LAMPIRAN .....	72
RIWAYAT HIDUP PENULIS .....	93

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap pemberian	Hal
---	-----

	ekstrak etanolik buah merah.....	37
Tabel 2.	Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap pemberian bagian larut dan tidak larut n-heksan ekstrak etanolik buah merah .....	39
Tabel 3.	Fraksinasi bagian larut n-heksan menggunakan berbagai fase gerak dengan metode VLC.....	41
Tabel 4.	Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap bagian larut n-heksan buah merah terhadap <i>A. salina</i> Leach .....	45
Tabel 5.	Perhitungan nilai $LC_{50-24}$ jam fraksi II hasil fraksinasi bagian larut n-heksan ekstrak etanolik buah merah .....	47
Tabel 6.	Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada 3 jam pertama setelah pemberian dosis tunggal secara oral .....	51
Tabel 7.	Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada hari ke-14 setelah pemberian dosis tunggal secara oral .....	52
Tabel 8.	Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada 3 jam pertama setelah pemberian dosis tunggal secara oral .....	53
Tabel 9.	Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada hari ke-14 setelah pemberian dosis tunggal secara oral.....	54
Tabel 10.	Distribusi rata-rata berat badan mencit (g) sebelum (i) dan sesudah penimbangan (ii).....	56
Tabel 11.	Distribusi rata-rata berat badan mencit (g) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan .....	57

## DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. <i>Pandanus conoideus</i> Lam.....	5
Gambar 2. Struktur kimia tokoferol.....	9
Gambar 3. Struktur kimia $\beta$ -karoten.....	10
Gambar 4. <i>A. salina</i> Leach. ....	18
Gambar 5. Siklus hidup <i>A. salina</i> Leach. ....	22
Gambar 6. Kerangka pemikiran.....	24
Gambar 7. Skema kerja penelitian.....	34
Gambar 8. Profil kromatogram masing-masing fraksi hasil fraksinasi dari bagian larut n-heksan ekstrak etanolik buah merah dengan deteksi (A) serum (IV) sulfat, (B) UV <sub>254</sub> dan (C) UV <sub>366</sub> .....	42
Gambar 9. Profil kromatogram penggabungan fraksi hasil fraksinasi dari bagian n-heksan ekstrak etanolik buah merah dengan deteksi (A) serum (IV) sulfat, (B) UV <sub>254</sub> dan (C) UV <sub>366</sub> .....	43
Gambar 10. Kurva regresi linier uji toksisitas fraksi II hasil fraksinasi dari bagian n-heksan ekstrak etanolik buah merah terhadap <i>A. salina</i> (replikasi I).....	46
Gambar 11. Kurva regresi linier uji toksisitas fraksi II hasil fraksinasi dari bagian n-heksan ekstrak etanolik buah merah terhadap <i>A. salina</i> (replikasi II).....	46
Gambar 12. Kurva regresi linier uji toksisitas fraksi II hasil fraksinasi dari bagianlarut n-heksan ekstrak etanolik buah merah terhadap <i>A. salina</i> (replikasi III).....	46
Gambar 13. Grafik perkembangan rata-rata berat badan (g) dua replikasi mencit yang diamati selama 0-8 hari setelah pemberian dosis tunggal (g/kgBB).....	55

## DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Hasil persiapan kolom dan persiapan sampel tahap VLC....	72
Lampiran 2. Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap pemberian ekstrak etanolik buah merah .....	73
Lampiran 3. Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap pemberian bagian larut n-heksan buah merah .....	74
Lampiran 4. Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap pemberian bagian tidak larut n-heksan buah merah. ....	75
Lampiran 5. Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap pemberian Fraksi I.....	76
Lampiran 6. Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap pemberian Fraksi II.....	77
Lampiran 7. Persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. terhadap pemberian Fraksi III.....	78
Lampiran 8. Fraksi teraktif adalah Fraksi II.....	79
Lampiran 9. Tabel probit berdasarkan persentase kematian.....	81
Lampiran 10. Perhitungan dosis toksisitas akut.....	82
Lampiran 11. Hasil pengamatan gejala toksik dan jumlah kematian hewan uji setelah pemberian dosis tunggal secara oral selama 14 hari.....	83
Lampiran 12. Berat badan mencit (g) hewan mencit setelah pemberian dosis tunggal secara oral selama 0-8 hari.....	84
Lampiran 13. Analisa <i>one way anova</i> perkembangan berat badan mencit (g) sebelum dan sesudah perlakuan.....	85
Lampiran 14. Analisa <i>one way anova</i> badan mencit (g) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan selama 8 hari.....	91
Lampiran 15. Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada 3 jam setelah pemberian dosis tunggal secara oral (replikasi I dan II) .....	93

#### DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Kepanjangan
-----------	-------------

---

Anava	Analisis varian
BST	<i>Brine Shrimp Test</i>
$^{\circ}\text{C}$	Derajat celsius
cm	Sentimeter
dpl	Di bawah permukaan laut
g	Gram
$\mu\text{g}$	Mikrogram
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
Lrt	Larutan
$\text{LC}_{50}$	<i>Lethal Concentration 50 %</i>
$\text{LD}_{50-24 \text{ jam}}$	<i>Lethal Dosis 50 %</i>
mL	Mililiter
mm	Milimeter
RF	<i>Retardation factor</i>
VLC	<i>Vacuum Liquid Chromatography</i>
UV	Ultraviolet

---

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**



Kanker merupakan suatu penyakit yang menempati peringkat tertinggi sebagai penyebab kematian di dunia, khususnya di negara-negara berkembang (Anderson *et al.*, 2001; Indrayani *et al.*, 2006). Penyakit ini ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak terkendali serta kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung pada jaringan yang bersebelahan (invasi) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (metastasis) di dalam tubuh (Meiyanto *et al.*, 2006). Pola hidup yang tidak seimbang dapat menyebabkan tingginya pertumbuhan penyakit tersebut (Ikawati *et al.*, 2000). Berbagai usaha telah dilakukan untuk menanggulangi berbagai penyakit kanker seperti pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi sitostatik. Pengobatan ini dilakukan untuk membunuh sel-sel kanker, namun tidak sedikit usaha tersebut justru menimbulkan efek samping (Sukardiman *et al.*, 2004; Moeljopawiro *et al.*, 2007). Terjadinya kerontokan pada rambut dan kulit menghitam merupakan efek yang dapat ditimbulkan dari upaya terapi tersebut (Jiang *et al.*, 2004). Kenyataan ini menuntut perlunya cara alternatif yang aman untuk pengobatan penyakit kanker dengan menggunakan bahan alami.

Salah satu sumber alam lokal yang berpotensi untuk pengobatan penyakit kanker adalah buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.). Buah ini merupakan buah tradisional asli Papua yang banyak mengandung senyawa-senyawa aktif antara lain tokoferol,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, protein, kalsium, besi, fosfor, vitamin C, asam palmitoleat, asam oleat, asam linoleat, dan asam  $\alpha$ -linolenat. Kandungan kimia terbesar dari buah tersebut adalah tokoferol (11000 ppm),  $\beta$ -karoten (700 ppm), dan karoten (12000 ppm), masing-masing senyawa tersebut mempunyai fungsi sebagai antioksidan sehingga mampu menangkal radikal bebas dan

meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Ketiga senyawa inilah yang membantu proses penyembuhan penyakit kanker dengan mencegah dan menekan pembiakan sel-sel kanker (Budi, 2005; Zaif, 2008).

Uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) merupakan uji pendahuluan yang dapat digunakan untuk memantau senyawa bioaktif dari bahan alami (Anderson *et al.*, 1991). Adanya korelasi positif antara metode BST dengan uji sitotoksik menggunakan kultur sel kanker maka metode ini sering dimanfaatkan untuk skrining senyawa antikanker (Carballo *et al.*, 2002). Metode tersebut memiliki beberapa keuntungan antara lain lebih cepat, murah, mudah, tidak memerlukan kondisi aseptis dan dapat dipercaya (Meyer *et al.*, 1982; Dachriyanus, 2005; Fajarningsih *et al.*, 2006).

Suatu ekstrak tumbuhan dapat dikatakan memiliki aktivitas antikanker dengan metode BST jika nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Pengujian toksisitas tersebut menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach. untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  (Meyer *et al.*, 1982).

Bahan alam yang akan dikembangkan menjadi fitofarmaka atau obat herbal terstandar pada fasilitas kesehatan harus memenuhi persyaratan aman dan adanya standar dosis yang lazim untuk digunakan (Wahyono, 2007). Oleh karena itu sangat diperlukan penelitian untuk mengetahui gambaran keamanan buah merah dengan mendeteksi efek toksik akut untuk mengetahui nilai  $LD_{50}$  dan berbagai gejala toksik, spektrum efek toksik dan kematian (Anonim, 2000; Akroum *et al.*, 2009).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas buah merah terhadap A.

*salina* Leach. dalam proses pencarian komponen bioaktif yang berpotensi sebagai kandidat antikanker serta kajian mengenai keamanan dosis untuk mengetahui ketoksikan dari komponen bioaktif tersebut yang dapat ditentukan dari nilai LD<sub>50</sub> yang diperoleh dari pengujian toksisitas akut.

### **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Berapakah nilai LC<sub>50</sub> dari pengujian toksisitas komponen teraktif buah merah (*P. conoideus* Lam.) terhadap *A. salina* Leach. ?
2. Bagaimanakah efek toksisitas akut terhadap perilaku hewan uji setelah pemberian dosis tunggal buah merah (*P. conoideus* Lam.) secara oral dan berapakah nilai LD<sub>50</sub> dari pengujian tersebut?

### **C. Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui nilai LC<sub>50</sub> dari pengujian toksisitas komponen teraktif buah merah (*P. conoideus* Lam.) terhadap *A. salina* Leach.
2. Mengetahui efek toksisitas akut terhadap perilaku hewan uji setelah pemberian dosis tunggal buah merah (*P. conoideus* Lam.) secara oral dan nilai LD<sub>50</sub> dari pengujian tersebut.

### **D. Manfaat Penelitian**

1. Secara umum diharapkan dapat menambah informasi ilmiah, pengetahuan serta gambaran kepada masyarakat luas terutama dalam eksplorasi dan penemuan senyawa aktif dari bahan alam sebagai pengobatan herbal.
2. Secara khusus dapat mengetahui nilai  $LC_{50}$  dari pengujian toksisitas bagian komponen teraktif buah merah (*P. conoideus* Lam.) terhadap *A. salina* Leach. sebagai kandidat obat herbal antikanker dan dapat mengetahui  $LD_{50}$  sebagai gambaran keamanan buah merah setelah pemberian dosis tunggal secara oral.



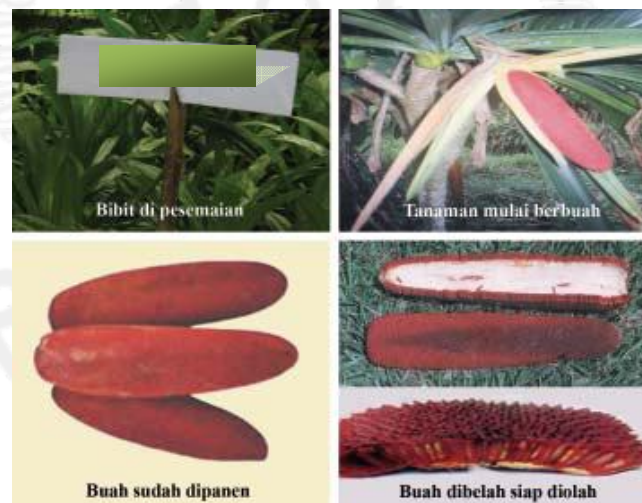
## BAB II

### LANDASAN TEORI

#### A. Tinjauan Pustaka

##### 1. Buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.)

Buah merah (*P. conoideus* Lam.) merupakan jenis tanaman yang termasuk ke dalam famili pandanaceae. Tanaman ini ditemukan secara endemik di wilayah Papua (Wamaer dan Malik, 2009). Terdapat beberapa daerah di Papua yang menjadi sentra buah merah, di antaranya Kelila, Bokondini, Karubaga, Kobakma, Kenyam, dan Pasema yang berada di sepanjang lereng pegunungan Jayawijaya. Buah tersebut oleh masyarakat sekitar lebih dikenal dengan nama *kuansu* (Zaif, 2008). Bentuk secara umum dari buah merah dapat dilihat pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. *P. conoideus* Lam. (Limbongan *et al.*, 2009)

Secara umum habitat tanaman ini adalah hutan sekunder dengan kondisi tanah yang lembab. Di wilayah Papua, buah merah ini ditemukan tumbuh di daerah dengan ketinggian antara 2-2300 meter di atas permukaan laut (dpl).

Hal ini berarti bahwa tanaman tersebut dapat tumbuh di dataran rendah hingga dataran tinggi wilayah Papua (Budi, 2000; Hadad *et al.*, 2006). Berdasarkan hasil analisis tanah dari lokasi pengembangan buah merah di Papua (Hadad *et al.*, 2006), umumnya tanaman buah merah dapat tumbuh pada tanah kurang subur, banyak mengandung pasir, dan bersifat agak asam (pH 4,3-5,3). Tanaman ini tumbuh secara mengelompok di sekitar aliran sungai. Menurut Yuhono dan Malik (2009), lebih dari 90% tanaman buah merah tumbuh secara liar atau dipelihara dengan teknologi pasca panen seadanya.

Terdapat lebih dari 30 jenis buah merah yang tumbuh di wilayah Papua, 4 diantaranya yang banyak dibudidayakan adalah (a) buah merah panjang yang memiliki bentuk silindris, ujung tumpul dan pangkal menjantung, (b) buah merah pendek memiliki bentuk silindris, ujung melancip dan pangkal menjantung, (c) buah merah cokelat memiliki bentuk silindris, ujung tumpul dan pangkal menjantung, (d) buah kuning memiliki warna kuning dan bentuk silindris, ujung tumpul dengan pangkal menjantung (Budi dan Paimin, 2005; Mangan, 2005). Pada penelitian ini akan menggunakan jenis buah merah panjang.

Lebang *et al.* (2004) telah menemukan tiga jenis buah merah unggul, antara lain buah merah Mbarugum, Maler, dan Magari. Beberapa kriteria buah merah tersebut antara lain jumlah buah 5-10 butir, empulur lunak, ukuran buah besar (diameter 10-15 cm) dan panjang 60-110 cm, hasil sari (minyak) tinggi rata-rata 120 mL/kg buah, jumlah anakan banyak (5-10 anakan), dan jumlah akar tunjang banyak (11-97 akar).

a. Klasifikasi

Klasifikasi buah merah (*P. conoideus* Lam.) menurut Backer and Brink (1965); Sadsoeitoboen (1999) adalah:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Angiospermae
Sub kelas	: Monocotyledoneae
Ordo	: Pandanales
Famili	: Pandanaceae
Genus	: <i>Pandanus</i>
Spesies	: <i>P. conoideus</i> var. <i>conoideus</i> Lam.

b. Deskripsi

*P. conoideus* Lam. termasuk ke dalam tumbuhan terna. Daun tunggal berbentuk lanset sungsang berwarna hijau tua dan letaknya berseling. Ujung daun runcing, pangkal daun memeluk batang. Permukaan daun licin, dengan tepi daun berduri atau tidak berduri, tergantung jenisnya. Batang bercabang banyak, tegak, bergetah, dan berwarna coklat berbercak putih. Tinggi tanaman mencapai 16 m dengan tinggi batang bebas cabang 5-8 m di atas permukaan tanah. Akar tanaman tergolong akar serabut dengan tipe perakaran diangkat. Akar cenderung masuk hingga kedalaman tanah  $\pm$  94 cm. Akar-akar tunjang muncul dari bagian batang dekat permukaan tanah. Tanaman ini berbuah saat berumur tiga tahun sejak ditanam. Buah tersusun dari ribuan biji yang tersusun bebas membentuk kulit buah. Biji berukuran

kecil memanjang 9-13 mm dengan bagian atas meruncing. Bagian pangkal biji menempel pada bagian jantung. Sedangkan ujungnya membentuk totol-totol dibagian kulit buah. Biji berwarna hitam kecoklatan dibungkus daging tipis berupa lemak. Daging buah dapat berwarna kuning, coklat, atau merah bata tergantung jenisnya (Budi dan Paimin, 2005).

Buah merah (*P. conoideus* Lam.) berbentuk silindris, ujung tumpul, dan pangkal menjantung. Panjang buah mencapai 96-102 cm dengan diameter 15-20 cm. Bobot buah mencapai 7-8 kg (Zaif, 2008; Limbongan, 2009).

c. Kandungan senyawa bioaktif

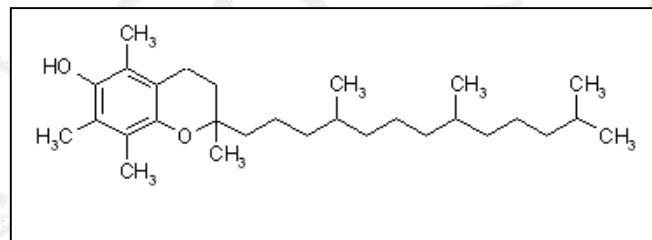
Buah merah (*P. conoideus* Lam.) mengandung beberapa senyawa aktif yang penting sebagai agen antikanker diantaranya tokoferol,  $\beta$ -karoten, dan karoten. Selain ketiga senyawa tersebut, buah merah juga mengandung banyak kalori penambah energi, kalsium, serat, protein, vitamin B1, vitamin C dan sedikit asam kaprat, asam laurat, asam miristat, asam linoleat, asam dekonoat, omega 3, omega 6 dan omega 9 (Budi, 2000; Hadad *et al.*, 2005). Oleh karena itu, buah merah potensial dikembangkan sebagai bahan baku obat penyakit-penyakit degeneratif, antara lain seperti gangguan jantung, lever, kanker, kolesterol, diabetes, asam urat, osteoporosis, serta sebagai antiinfeksi dan HIV.



## 1). Tokoferol

Tokoferol merupakan bentuk vitamin yang larut dalam lemak yang berperan penting dalam tubuh. Senyawa ini dikenal juga sebagai vitamin E yang berfungsi dalam pertahanan terhadap peroksidasi asam lemak dan sebagai antioksidan dengan memutuskan berbagai reaksi rantai radikal bebas (Pratiwi, 2009; Brock, 1993).

Di dalam sel dan jaringan tubuh, senyawa ini dapat menekan terjadinya oksidasi asam lemak tidak jenuh sehingga dapat membantu mempertahankan fungsi penting membran sel (Winarno, 2007). Struktur kimia tokoferol tersaji pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur kimia tokoferol (Brock, 1993).

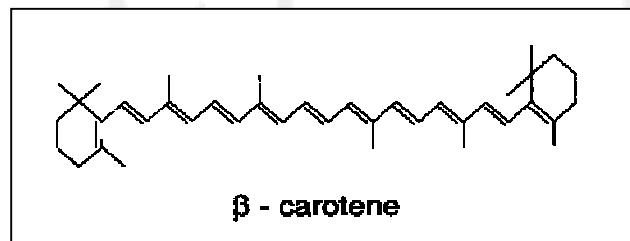
## 2). Karotenoid dan $\beta$ -karoten

Karoten secara kimia adalah terpen yang disintesis secara biokimia dari delapan satuan isoprena, dan terbagi dalam dua bentuk utama yaitu  $\alpha$ -karoten dan  $\beta$ -karoten (Mun'im *et al.*, 2006 ;Wolf, 2002).

Karotenoid merupakan pigmen alami yang terdapat di alam. Di dalam tanaman, karotenoid terdapat pada jaringan fotosintetik seperti batang, bunga, buah-buahan, biji-bijian dan sayur-sayuran

(Gaman & Sherrington, 1990). Senyawa ini sangat berperan penting bagi kesehatan dan kelangsungan hidup. Karotenoid diasosiasikan sebagai respon imun yang lebih baik, perlindungan terhadap kanker, dan juga berfungsi sebagai antioksidan. Secara umum, karotenoid,  $\beta$ -karoten dan  $\alpha$ -karoten dikenal untuk mengurangi radikal bebas. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan sel yang bersifat karsinogenik. Aktivitas antioksidan dari karotenoid adalah alasan dibalik efek antikanker dan peningkatan sistem kekebalan tubuh (Wyeth, 2008; Zaif, 2008; Winarto, 2007).

Struktur kimia  $\beta$ -karoten dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kimia  $\beta$ - karoten (Leffingwel, 2001).

### 3). Asam-asam Lemak

Selain dari ketiga senyawa tersebut, buah merah juga mengandung asam-asam lemak yang mempunyai peran penting bagi tubuh diantaranya asam oleat, asam palmitoleat dan asam  $\alpha$ -linolenat. Asam lemak yang terdapat pada buah merah merupakan asam lemak tak jenuh (Budi, 2000; Southwell and Harris, 2006). Senyawa ini memiliki satu atau lebih ikatan rangkap (Murray *et al.*, 2003)..

## 2. Pemisahan Komponen Bioaktif

Penelitian bahan alam yang bertujuan untuk memperoleh informasi mengenai keberadaan komponen-komponen bioaktif yang terkandung di dalamnya dapat dilakukan dengan beberapa tahap pemisahan yang meliputi ekstraksi, partisi, fraksinasi kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas bioaktif, baik dari senyawa murni ataupun ekstrak kasar (Indika, 2008).

### a. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan peristiwa pemindahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh pelarut tertentu sehingga terjadi larutan zat aktif dalam larutan tersebut (Lenny, 2006).

Metode yang dapat digunakan dalam proses ekstraksi antara lain maserasi, perkolasi dan sokhletasi. Pemilihan ketiga metode tersebut disesuaikan dengan kepentingan dalam memperoleh sari yang baik (Harborne, 1987). Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi tersebut harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan kandungan zat aktif yang semaksimal mungkin dari unsur-unsur yang tidak diinginkan (Ansel, 1989).

### b. Partisi

Partisi merupakan proses sorpsi yang analog dengan ekstraksi pelarut (Rohman, 2007). Distribusi atau partisi dapat dirumuskan bila suatu zat terlarut terdistribusi antara dua pelarut yang tidak dapat campur, maka pada suatu temperatur yang konstan untuk setiap spesi molekul terdapat angka banding distribusi yang konstan antara kedua pelarut itu, dan angka banding distribusi ini tidak tergantung pada spesi

molekul lain apapun yang mungkin ada (Svehla, 1990). Hasil dari proses partisi yang diperoleh masing-masing dapat diuji aktivitas biologisnya untuk mengidentifikasi keaktifan komponen bioaktif yang terkandung (Sie, 2006).

c. *Vacuum Liquid Chromatography (VLC)*

*Vacuum Liquid Chromatography (VLC)* atau kromatografi cair vakum merupakan pengembangan dari kromatografi kolom. Pada VLC, elusi diaktivasi dengan menggunakan vakum. Elusi dilakukan dengan menggunakan fase gerak dengan gradien polaritas dari polaritas paling rendah sampai polaritas yang paling tinggi. Pemisahan senyawa pada VLC didasarkan pada kelarutan senyawa yang dipisahkan dalam fase gerak yang digunakan. Fase gerak dengan gradien polaritas diharapkan dapat memisahkan senyawa-senyawa yang memiliki polaritas berbeda (Padmawinata, 1995).

Fraksinasi adalah proses untuk memisahkan golongan kandungan senyawa yang satu dengan golongan yang lainnya dari suatu ekstrak. Prosedur pemisahan dengan fraksinasi ini didasarkan pada perbedaan kepolaran kandungan senyawanya (Harborne, 1987). Pemisahan campuran senyawa ke dalam fraksi-fraksi dapat dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan fase gerak dan fase diam disesuaikan dengan karakterisari yang akan dipisahkan. Modifikasi kromatografi cair dengan menggunakan vakum dapat diaplikasikan untuk memperoleh fraksi-fraksi dalam waktu yang relatif cepat dan tidak

menggunakan fase diam atau fase gerak yang terlalu banyak (Pelletier *et al.*, 1986; Coll and Bowden, 1986; Pieters and Vlietinck, 1989).

d. Kromatografi lapis tipis (KLT) hasil fraksinasi

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan fisiokimiawi senyawa yang didasarkan pada pembagian campuran dua senyawa dalam dua fase dimana fase gerak bergerak terhadap fase diamnya. Fase diam berupa serbuk yang dilapiskan tipis merata pada lempeng kromatografi (plat, gelas, logam atau lempeng yang cocok). Fase diam berfungsi sebagai penyerap. Pada sistem ini dikenal istilah kecepatan rambat suatu senyawa yang diberi simbol  $R_f$  (*Retardation factor*). Harga  $R_f$  ditentukan oleh jarak rambat senyawa dari titik awal dan jarak rambat fase gerak dari titik awal. Harga  $R_f$  ini dapat digunakan untuk identifikasi senyawa yang dianalisa. Penentuan harga  $R_f$  adalah sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak perambatan bercak dari titik awal}}{\text{Jarak perambatan fase gerak dari titik awal}}$$

(Stahl, 1985).

Fraksi-fraksi yang diperoleh dari metode VLC diuapkan hingga kering yang kemudian dilakukan pengujian aktivitas bioaktif yang terkandung berdasarkan *Bioassay guided*. Profil kandungan kimia masing-masing fraksi dipantau dengan kromatografi lapis tipis. Berdasarkan hasil KLT tersebut, fraksi-fraksi dengan profil kromatogram yang hampir sama dijadikan satu

fraksi. Fraksi hasil penggabungan selanjutnya diuji dengan metode BST untuk mengetahui fraksi yang paling aktif.

### 3. Uji toksisitas metode *in vivo*

Toksitas merupakan kemampuan suatu molekul atau senyawa kimia yang dapat menimbulkan kerusakan pada bagian yang peka didalam maupun dibagian luar tubuh mahluk hidup (Durham,1975). Suatu senyawa kimia dapat dikatakan sebagai racun jika senyawa tersebut dapat menimbulkan efek yang merusak. Efek yang ditimbulkan sangat tergantung dengan kadar racun (toksin) yang diberikan dengan dilakukan pengukuran besarnya kadar atau konsentrasi bahan yang dapat menimbulkan pengaruh pada organisme uji (Loomis, 1978; Ambara, 2007).

Setiap zat kimia baru harus terlebih dahulu dilakukan penelitian mengenai sifat-sifat ketoksikannya sebelum diperbolehkan digunakan secara luas. Oleh karena itu dalam proses pemanfaatan dan pengembangan obat tradisional bersumber hayati, harus dilakukan beberapa langkah pengujian sebelum digunakan dalam pelayanan kesehatan. Setelah diketahui obat alam tersebut berkhasiat secara empirik maka dilakukan uji praklinik untuk menentukan keamanannya melalui uji toksisitas dan menentukan khasiat melalui uji farmakodinamik serta uji klinik pada orang sakit atau orang sehat. Setelah terbukti manfaat dan keamanannya, maka obat tradisional tersebut dapat digunakan dalam pelayanan kesehatan (Sukardiman *et al.*, 2004; Oktora, 2006).

Uji toksisitas secara kuantitatif dapat ditinjau dari lamanya waktu, yang dapat diklasifikasikan menjadi toksisitas akut, sub akut, dan kronis. Toksisitas

akut adalah efek total yang didapat pada dosis tunggal dalam 24 jam setelah pemaparan. Toksisitas akut bersifat mendadak, waktu singkat, biasanya reversibel. Uji toksisitas atas dasar dosis dan waktu spesifik toksisitas akut. Dosis merupakan jumlah racun yang masuk ke dalam tubuh. Besar kecilnya dosis menentukan efek secara biologi (BPOM, 2000; Verma, 2008).

Penentuan nilai LD<sub>50</sub> pada pengujian toksisitas akut merupakan tahap awal untuk mengetahui keamanan suatu bahan obat yang akan digunakan manusia berdasarkan besarnya dosis yang dapat menyebabkan kematian 50% pada hewan uji dengan satuan berat badan setelah pemberian dosis secara tunggal (Angelina, 2008; Hegde *et al.*, 2009). Pengujian ini dilakukan untuk mendeteksi tingkat toksisitas suatu zat, menentukan organ sasaran dan kepekaannya, serta memperoleh data kematiannya setelah pemberian suatu zat secara akut. Informasi yang diperoleh tersebut dapat digunakan dalam penetapan kisaran dosis yang diperlukan untuk uji toksisitas selanjutnya. Pengujian tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan hewan uji seperti mencit, tikus, kelinci, monyet dan anjing. Data kematian hewan uji yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan nilai LD<sub>50</sub> (Ariens, 1986; Wattimena, 1986). Nilai LD<sub>50</sub> suatu bahan obat mutlak harus ditentukan, karena nilai tersebut digunakan dalam penilaian rasio manfaat (khasiat) dan daya racun yang dinyatakan sebagai indeks terapi obat sehingga semakin besar indeks terapi maka semakin aman obat tersebut digunakan (Wahyono, 2007).

Perilaku hewan uji yang diamati setelah pemberian dosis tunggal oral sediaan uji secara akut meliputi aktivitas motorik (aktif bergelantungan), rasa

ingin tahu (mengendus-endus sekeliling), pengaruh terhadap sistem saraf pusat dan otonom serta defekasi, hingga kematian (Thompson, 1985).

#### 4. Uji toksisitas metode BST

*Brine Shrimp Test* (BST) merupakan salah satu metode skrining untuk mengetahui ketoksikan suatu ekstrak ataupun senyawa bahan alam (Sukardiman, 2004). Uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian larva *A. salina* Leach. karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam pada konsentrasi yang diberikan (McLaughlin *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2007). Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya nilai  $LC_{50}$  selama 24 jam. Data tersebut dianalisis menggunakan probit analisis untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$ . Jika nilai  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak atau senyawa yang diuji kurang dari 1000  $\mu\text{g/mL}$  maka dianggap menunjukkan adanya aktivitas biologik, sehingga pengujian ini dapat digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa bioaktif yang diduga berkhasiat sebagai antikanker (Sunarni *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 1991; Sukardiman, 2004).

Pengujian BST sering digunakan dalam proses pencarian senyawa bioaktif hayati karena adanya korelasi positif antara sitotoksik dengan uji BST tersebut. Metode ini banyak digunakan dalam tahap praskrining misalnya pada enam jenis kultur sel line tumor pada manusia di *Laboratorium Purdue Cancer Center*. Obat antikanker tersebut telah diuji dengan menggunakan metode BST, diantaranya Podofilotoksin dan Adriamisin. Podofilotoksin memberikan nilai  $LC_{50}$  2,4  $\mu\text{g/mL}$  (Meyer *et al.*, 1982; Cutler and Cutler, 2000; Carballo *et al.*, 2002). Sedangkan nilai  $LC_{50}$  Adriamisin sebesar 0,08  $\mu\text{g/ml}$  (Gu *et al.*, 1995). Korelasi yang positif pun dapat ditunjukkan pada penelitian senyawa bioaktif



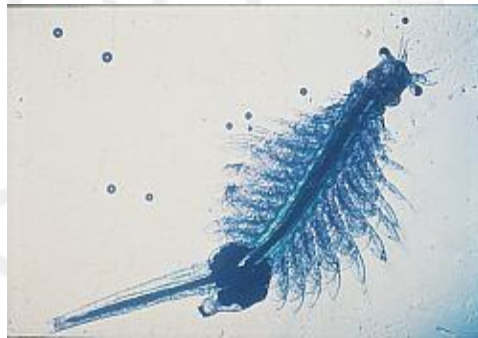
spoon *Petrosia sp.* dengan metode BST dan uji sitotoksitasnya terhadap sel kanker. Pada penelitian tersebut dapat diketahui bahwa senyawa yang toksik terhadap larva *A. salina* Leach. juga toksik terhadap sel kanker (Astuti *et al.*, 2005). Oleh karena itu pengujian ini merupakan tahap awal untuk mengetahui apakah senyawa tersebut berpotensi atau tidak sebagai antikanker yang selanjutnya dapat dilakukan uji sitotoksik menggunakan biakan sel kanker. Metode BST memiliki keuntungan, antara lain cepat, murah, sederhana (tidak memerlukan teknik aseptik), untuk melakukannya tidak memerlukan peralatan khusus dan membutuhkan sampel yang relatif sedikit dalam pengujian.

Nilai  $LC_{50}$  merupakan nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% kematian jumlah hewan uji setelah perlakuan 24 jam. Melalui metode tersebut, pelaksanaan skrining awal suatu senyawa aktif akan berlangsung relatif cepat dengan biaya yang relatif murah. Hal ini dikarenakan hanya ekstrak atau senyawa yang memiliki aktivitas antikanker berdasarkan metode BST tersebut yang selanjutnya dapat diyakinkan efek antikankernya terhadap biakan sel kanker (Dwiatmaka, 2001; Mukhtar, 2007).

#### 5. *Artemia salina* Leach.

*A. salina* Leach. atau sering disebut brine shrimp adalah sejenis udang-udangan primitif yang sudah dikenal cukup lama dan oleh Linnaeus pada tahun 1778 yang diberi nama *Cancer salinus*, kemudian oleh Leach diubah menjadi *A. salina* pada tahun 1819. *A. salina* Leach. Hewan ini hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 15-300 per mil). Suhu yang berkisar antara 25-30<sup>0</sup>C, oksigen terlarut sekitar 3 mg/L, dan pH antara 7,3–

8,4. Sebagai plankton, *A. salina* Leach. tidak dapat mempertahankan diri terhadap musuh-musuhnya, karena tidak mempunyai cara maupun alat untuk mempertahankan diri. Satu-satunya kondisi yang menguntungkan dari alam adalah lingkungan hidup yang berkadar garam tinggi, karena pada kondisi tersebut pemangsanya pada umumnya sudah tidak dapat hidup lagi (Mudjiman, 1995). *A. salina* Leach. merupakan salah satu komponen penyusun ekosistem laut yang keberadaan sangat penting untuk perputaran energi dalam rantai makanan, selain itu *A. salina* Leach. juga dapat digunakan dalam uji laboratorium untuk mendeteksi toksisitas suatu senyawa dari ekstrak tumbuhan (Kanwar, 2007). Bentuk *A. salina* Leach. secara morfologi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. *A. salina* Leach. (Abatzopoulos *et al.*, 1996 )

a. Klasifikasi

Kingdom : Animalia

Phylum : Arthropoda

Class : Crustacea

Subclass : Branchiopoda

Ordo : Anostraca  
Family : Artemiidae  
Genus : *Artemia*  
Spesies : *A. salina* Leach.

(Emslie, 2003; Mudjiman, 1995; Sambali, 1990).

b. Deskripsi

*A. salina* Leach. dewasa memiliki panjang tubuh umumnya sekitar 8-10 mm bahkan mencapai 15 mm tergantung lingkungan. Tubuhnya memanjang terdiri sedikitnya 20 segmen dan dilengkapi kira-kira 10 pasang *phyllopodia* pipih, yaitu bagian tubuh yang menyerupai daun yang bergerak dengan ritme teratur. *A. salina* Leach. dewasa berwarna putih pucat, merah muda, hijau, atau transparan dan biasanya hanya hidup beberapa bulan. Memiliki mulut dan sepasang mata pada antenanya (Emslie, 2003). Telur *A. salina* Leach. berbentuk bulat berlekuk dalam keadaan kering dan bulat penuh dalam keadaan basah. Warnanya coklat dan diselubungi oleh cangkang yang tebal dan kuat. Cangkang ini berfungsi untuk melindungi embrio terhadap pengaruh kekeringan, benturan keras, sinar ultraviolet dan mempermudah pengapungan (Opinion, 2008).

c. Habitat *A. salina* Leach.

*A. salina* Leach. memiliki resistensi luar biasa pada perubahan dan mampu hidup pada variasi salinitas air yang luas dari *seawater* (2.9-3.5%) sampai *the great salt lake* (25-35%), dan masih dapat bertoleransi pada kadar garam 50% (jenuh). Beberapa ditemukan di

rawa asin hanya pada pedalaman bukit pasir pantai, dan tidak pernah ditemui di lautan itu sendiri karena di lautan terlalu banyak predator. *A. salina* Leach. juga mendiami kolom-kolom evaporasi buatan manusia yang biasa digunakan untuk mendapatkan garam dari lautan. Insang membantunya agar cocok dengan kadar garam tinggi dengan absorpsi dan ekskresi ion-ion yang dibutuhkan dan menghasilkan urin pekat dari glandula *maxillaris*. Hidup pada variasi temperatur air yang tinggi pula, dari 6-37°C dengan temperatur optimal untuk reproduksi pada 25°C (suhu kamar). Keuntungan hidup pada lokasi berkadar garam tinggi adalah sedikitnya predator namun sumber makanannya sedikit (Emslie, 2003; Artemia Reference Center, 2007).

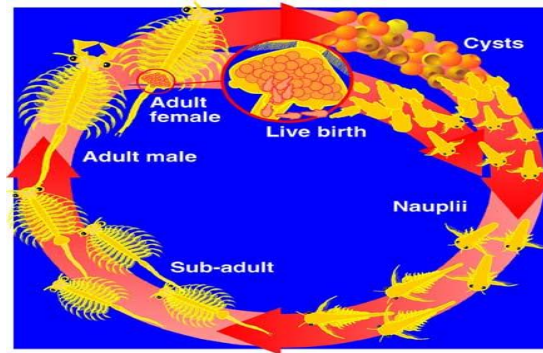
#### d. Perkembangan dan Siklus Hidup

*A. salina* Leach. dibedakan menjadi dua golongan berdasarkan cara berkembangbiaknya, antara lain berkembangbiakan secara biseksual dan partenogenetik. Keduanya dapat terjadi secara ovipar maupun ovovivipar. Pada jenis *A. salina* Leach. ovovivipar, anakan yang keluar dari induknya sudah berupa arak atau burayak yang dinamakan nauplis, sehingga sudah langsung dapat hidup sebagai *A. salina* Leach. muda. Sedangkan pada cara ovipar, yang keluar dari induknya berupa telur bercangkang tebal yang dinamakan siste. Proses untuk menjadi nauplis masih harus melalui proses penetasan terlebih dahulu. Kondisi ovovivipar biasanya terjadi bila keadaan lingkungan cukup baik, dengan kadar garam kurang dari 150 per ml dan kandungan oksigennya cukup. Oviparitas terjadi apabila keadaan lingkungan memburuk,

dengan kadar garam lebih dari 150 per mil dan kandungan oksigennya kurang. Telur ini memang dipersiapkan untuk menghadapi keadaan lingkungan yang buruk, bahkan kering. Bila keadaan lingkungan baik kembali, telur akan menetas dalam waktu 24-36 jam (Mudjiman, 1995; Kanwar, 2007).

*A. salina* Leach. yang sudah dewasa dapat hidup sampai enam bulan. Sementara induk-induk betinanya akan beranak atau bertelur setiap 4-5 hari sekali, dihasilkan 50-300 telur atau nauplius. Nauplis akan dewasa setelah berumur 14 hari, dan siap untuk berkembang biak (Mudjiman, 1995).

*A. salina* Leach. dapat diperjualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista. Kista ini berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna kecoklatan dengan diameter berkisar 200-300 mikron. Kista yang berkualitas baik akan menetas sekitar 18-24 jam apabila diinkubasi air yang bersalinitas 5-70 permil. Ada beberapa tahapan pada proses penetasan *A. salina* Leach. ini yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan disusul tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum nauplius keluar dari cangkang (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Siklus hidup *A. salina* Leach. dapat dilihat pada Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Siklus hidup *A. salina* Leach. (Abatzopoulos *et al.*, 1996).

e. Perilaku *A. salina* Leach.

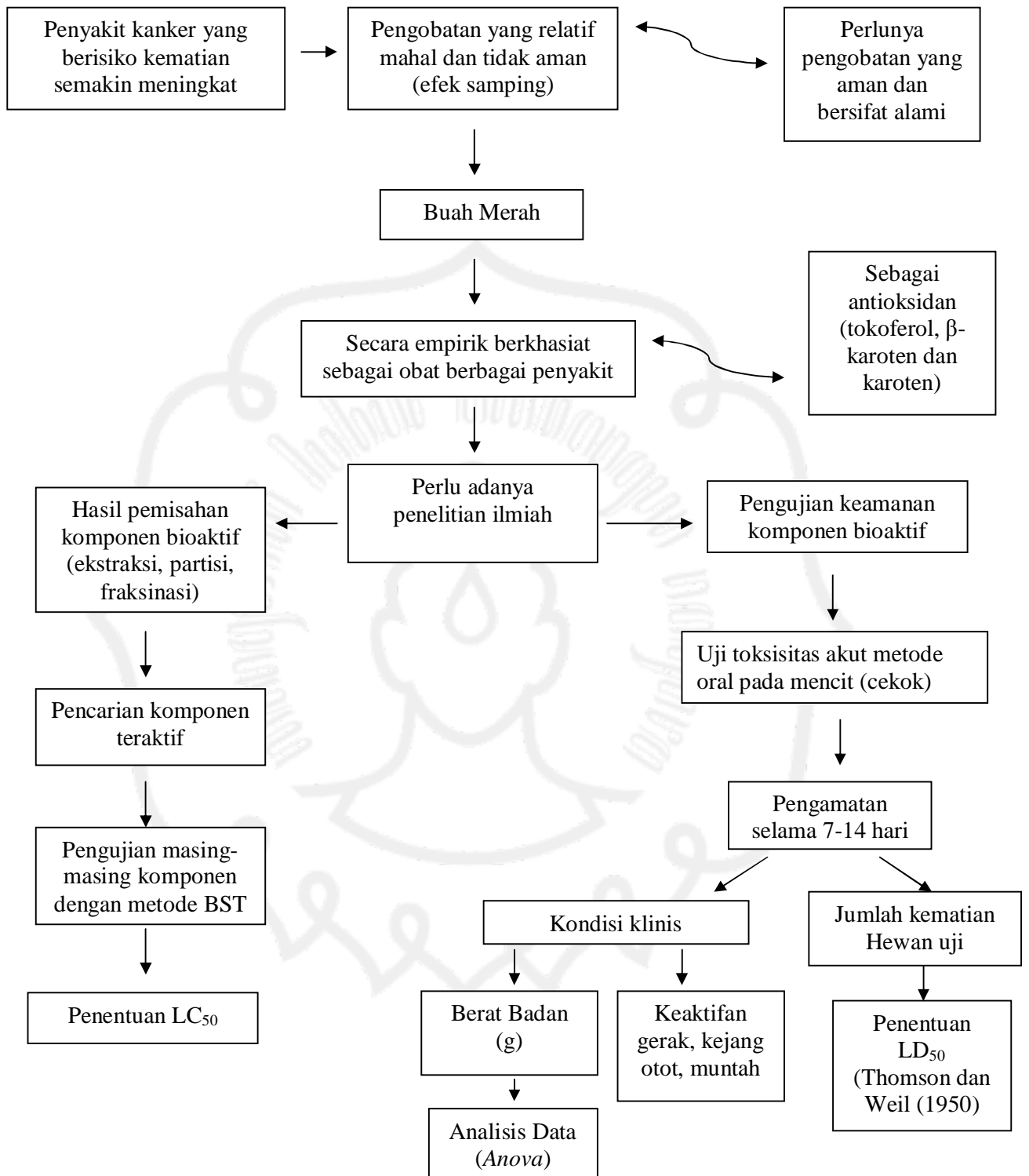
*A. salina* Leach. bersifat fototaksis positif yang berarti menyukai cahaya, di alam hal tersebut dibuktikan dengan adanya gerakan tubuh menuju ke permukaan karena sinar matahari sebagai sumber cahaya secara alami, dimana akan selalu di permukaan saat siang hari dan tenggelam pada malam hari. Intensitas cahaya yang terlalu tinggi dapat pula mengakibatkan respon fototaksis negatif sehingga ia akan menjauhi cahaya. *A. salina* Leach. yang baru menetas mempunyai perilaku geotaksis positif, hal ini terjadi ketika nauplius tenggelam ke bawah setelah menetas akibat efek gravitasi. Gerakan *phyllopodia* mendorong makanan bergerak ke anterior (lokomosi). Gerakan anggota tubuhnya untuk mendorongnya menuju arah sumber makanan (Emslie, 2003).

## B. Kerangka Pemikiran

Buah merah (*P. conoideus* Lam.) merupakan jenis tanaman endemik berasal dari Papua. Secara empirik, buah tersebut mempunyai khasiat yang

sangat besar sebagai obat alternatif untuk menyembuhkan berbagai penyakit, khususnya penyakit kanker. Penyakit ini menjadi masalah besar di dunia karena tidak sedikit dapat menyebabkan kematian yang jumlahnya semakin meningkat disetiap tahunnya. Hal ini dikarenakan belum adanya pengobatan yang dapat memberikan hasil secara memuaskan. Peran buah merah (*P. conoideus* Lam.) dalam membantu proses penyembuhan kanker dikarenakan adanya kandungan senyawa tokoferol dan  $\beta$ -karotennya yang relatif tinggi. Kedua senyawa kimia tersebut bekerja sebagai antioksidan dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh sehingga dapat mencegah dan menekan pembiakan sel-sel kanker.

Buah merah berpotensi sebagai kandidat obat antikanker, oleh karena itu agar dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas komponen bioaktif buah merah (*P. conoideus* Lam.) berdasarkan aktivitas biologinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$  komponen teraktif buah merah menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dan pengujian toksisitas akut untuk menentukan nilai  $LD_{50}$  yang akan digunakan untuk mengetahui gambaran keamanan obat tersebut berdasarkan dosis yang digunakan. Kedua hal ini sangat penting dilakukan karena merupakan tahap awal pencarian senyawa bioaktif bahan alam yang akan dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai obat herbal terstandar atau fitofarmaka. Skema alur kerangka pemikiran penelitian dapat dilihat pada Gambar 6.

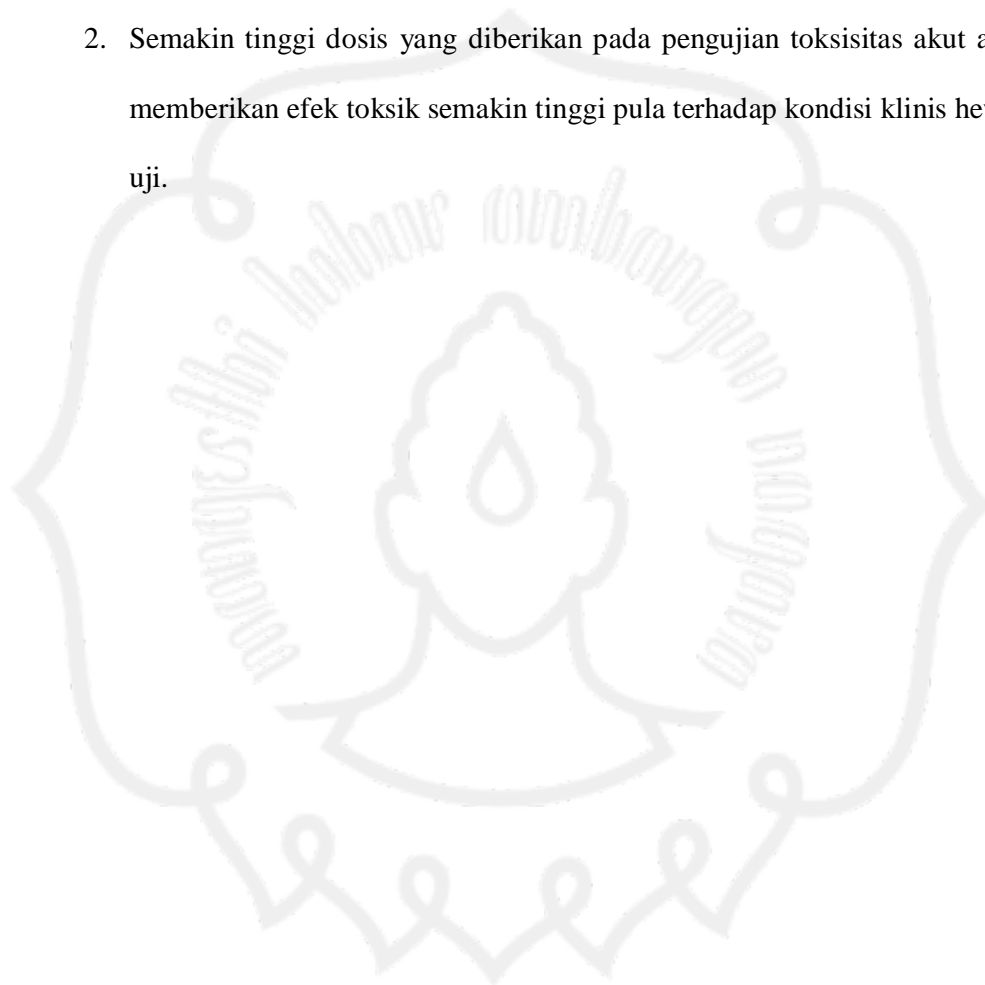


Gambar 6. Kerangka pemikiran



### C. Hipotesis

1. Bagian komponen teraktif buah merah (*P. conoideus* Lam.) diduga mempunyai nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000  $\mu\text{g/mL}$  sehingga berpotensi sebagai kandidat antikanker
2. Semakin tinggi dosis yang diberikan pada pengujian toksisitas akut akan memberikan efek toksik semakin tinggi pula terhadap kondisi klinis hewan uji.



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November-Februari 2009 di Laboratorium Jurusan Biologi, Laboratorium Kimia Dasar Fakultas MIPA Sebelas Maret Surakarta dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

#### B. Alat Penelitian

##### 1. Alat pemisahan komponen bioaktif (ekstraksi, partisi dan fraksinasi)

Bejana tertutup, pengaduk, corong kaca, gelas beker, kertas saring, rotaevaporator, corong *buchner*, statif, *Vacuum Liquid Chromatography* (gelas sinter dan vakum), kromatografi lapis tipis (bejana pengembang, pipa kapiler, gelas arloji, oven, penyemprot bercak, lampu UV) dan alat-alat gelas lain.

##### 2. Alat uji toksisitas dengan metode BST

Flakon, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, wadah penetas telur *A. salina* Leach. dengan 2 tipe ruang (terang dan gelap), aerator, lampu pijar (40 watt), pipet tetes, gelas ukur 50 ml, spatula (pengaduk), vortek, keranjang peralatan gelas, neraca analitik, dan kipas angin.

##### 3. Alat untuk uji toksisitas *in vivo*

Timbangan mencit, seperangkat kandang mencit, pipet tetes, spatula (pengaduk), alat-alat gelas, hot plate, neraca analitik, spuit dan jarum oral (kanul).

## C. Bahan Penelitian

### 1. Bahan utama

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah merah (*P. conoideus* Lam.) varietas buah merah yang diperoleh dari Papua.

### 2. Bahan ekstraksi, partisi dan fraksinasi

Etanol 96%, n-heksan, etil asetat, silika gel 60 GF<sub>254</sub> (E. Merck) untuk kromatografi kolom (VLC), kromatografi lapis tipis (fase diam digunakan plat silika gel 60 GF<sub>254</sub> (E. Merck) dan fase gerak yang digunakan yaitu n-heksan dan etil asetat, pereaksi semprot serum (IV) sulfat).

### 3. Bahan uji toksisitas dengan metode BST

Telur *A. salina* Leach., suspensi ragi (Fermipan®) dengan konsentrasi 3 mg/10 mL air laut, kontrol pelarut, dan air laut.

### 4. Bahan uji toksisitas *in vivo*

Mencit (*Mus musculus*) galur balb/C jantan (berat 20-30 gram), pakan hewan uji (*pellet*), *aquadest*, dan suspensi CMC-Na 0,5%.

## D Cara Kerja

### 1. Persiapan sampel (bahan uji)

Bahan uji yang digunakan adalah buah merah (*P. conoideus* Lam.) yang akan dipreparasi lebih lanjut.

## 2. Pemisahan komponen bioaktif

Pada penelitian ini proses pemisahan komponen bioaktif dilakukan dengan cara ekstraksi dan partisi. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan partisi (cair-cair) dengan pelarut n-heksan.

### a. Ekstraksi

- 1) Buah merah dimaserasi menggunakan etanol 96 % selama 24 jam dengan sesekali pengadukan. Maserasi dilakukan hingga 3 kali. Setelah 24 jam, rendaman disaring dengan kertas saring dan corong *buchner*, ampas dipisahkan dari maserat, kemudian maserat tersebut diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etanolik buah merah yang kemudian dapat dikeringkan dengan bantuan kipas angin.
- 2) Ampas hasil ekstraksi dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 96 % seperti cara diatas sehingga dapat diperoleh maserat ke-II dan ke-III kemudian masing-masing diuapkan menggunakan *rotary evaporator*, ekstrak kental yang diperoleh kemudian digabung dengan ekstrak kental etanolik sebelumnya.
- 3) Keaktifan komponen bioaktif yang terkandung di dalam ekstrak kental etanolik buah merah diuji secara *bioassay* menggunakan metode BST sebagai tahap awal dalam proses pencarian senyawa antikanker pada buah merah.

### b. Partisi

- 1) Ekstrak kental etanolik buah merah yang telah diuji dengan BST sebagai bagian yang paling aktif selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksan menggunakan corong pisah sehingga akan dihasilkan dua bagian yang

terpisah yaitu bagian yang larut dan bagian yang tidak larut n-heksan kemudian masing-masing bagian tersebut diuapkan menggunakan *rotary evaporator*.

- 2) Kedua bagian tersebut selanjutnya diuji aktivitas bioaktifnya dengan metode BST.

c. Fraksinasi

- 1) Komponen senyawa hasil partisi yang memiliki keaktifan lebih besar dari pengujian BST dapat dinyatakan sebagai bagian teraktif untuk dilakukan tahap pemisahan lebih lanjut melalui tahap fraksinasi metode *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC).
- 2) Persiapan kolom fraksinasi dilakukan dengan memasukkan 100 g serbuk silika gel 60 GF<sub>254</sub> ke dalam *sinter glass* berdiameter 6 cm selanjutnya divakum dan ditekan-tekan serta diratakan hingga tinggi silika tersebut kurang lebih setengah dari *sinter glass*.
- 3) Persiapan sampel untuk fraksinasi dilakukan dengan menambahkan 5 g bahan uji teraktif dengan n-heksan kemudian ditambahkan lagi dengan 10 g silika gel 60 GF<sub>254</sub> dicampur dan diaduk hingga rata selanjutnya dilakukan pemanasan dengan *water bath* serta diangin-anginkan hingga terbentuk serbuk yang halus, kering dan berwarna merah pucat.
- 4) Serbuk sampel yang diperoleh kemudian dilakukan pemisahan komponen bioaktif secara bertahap menggunakan berbagai komposisi eluen dengan metode VLC.
- 5) Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian dimonitoring dengan metode KLT, jika terdapat fraksi-fraksi yang memiliki profil kandungan senyawa kimia

yang hampir sama maka fraksi-fraksi tersebut dapat digabungkan, kemudian masing-masing fraksi yang telah terbentuk dapat dilakukan pengujian BST guna memperoleh komponen bioaktif yang memiliki aktivitas terbesar sebagai kandidat senyawa antikanker.

### 3. Uji toksisitas dengan metode BST

- a. Membuat larutan stok dari masing-masing bahan uji dengan cara melarutkan 50 mg sampel dalam 5 mL masing-masing pelarut yang sesuai sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 10 mg/mL. Pelarut yang digunakan disesuaikan dengan sifat kelarutan sampel. Seri konsentrasi sampel uji dibuat dengan pengambilan volume tertentu dari larutan stok menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam flakon. Pembuatan kontrol uji dilakukan dengan memasukkan pelarut tanpa sampel ke dalam flakon. Kontrol tersebut diperlukan untuk mengevaluasi kemungkinan timbulnya efek karena pelarut yang belum menguap sempurna dan pengaruh lain selain pelarut terhadap uji yang dilakukan. Flakon yang telah diisi sampel dan kontrol diangin-anginkan hingga kering dan tidak berbau pelarut lagi.
- b. Penetasan telur *A. salina* Leach. dilakukan dalam wadah penetas telur dengan dua bagian ruang bersekat, satu bagian ruang gelap dan yang satu terang. Sekat dibuat berlubang dengan diameter 2 mm. Air laut dimasukkan ke dalam wadah, serta diaerasi menggunakan aerator. Sejumlah telur *A. salina* Leach. dimasukkan ke dalam satu ruang, kemudian ruang tersebut ditutup. Sisi yang lain dibiarkan terbuka dan diberi lampu untuk menarik *A. salina* Leach. yang telah menetas melalui lubang sekat. Telur akan menetas kira-kira

setelah 24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas (McLaughlin, 1991).

- c. Pengujian sampel dilakukan dengan cara memasukkan masing-masing sampel ke dalam flakon yang kemudian diuapkan dengan diangin-anginkan hingga pelarutnya hilang. Selanjutnya flakon diisi air laut 1 mL, kemudian divortex kurang lebih selama 1 menit untuk menghomogenkan sampel. Sepuluh ekor *A. salina* Leach. umur 48 jam yang sehat (bergerak aktif) dipilih secara acak, dimasukkan ke dalam flakon yang berisi sampel yang bebas pelarut menggunakan pipet tetes kemudian ditambahkan air laut sampai 5 mL. Satu tetes suspensi ragi *Saccharomyces cerevicease* (3 mg/10 ml air laut) ditambahkan ke dalamnya sebagai makanan *A. salina* Leach. Flakon diletakkan di bawah lampu penerangan selama 24 jam dan dihitung jumlah larva *A. salina* Leach. yang mati (tidak bergerak lagi).

- d. Menghitung persen kematian larva uji setelah 24 jam perlakuan menggunakan rumus :  $\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$

Jika terjadi kematian pada kontrol uji dapat dikoreksi dengan rumus *Aboot*, yaitu :  $\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina (mati-kontrol)}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$

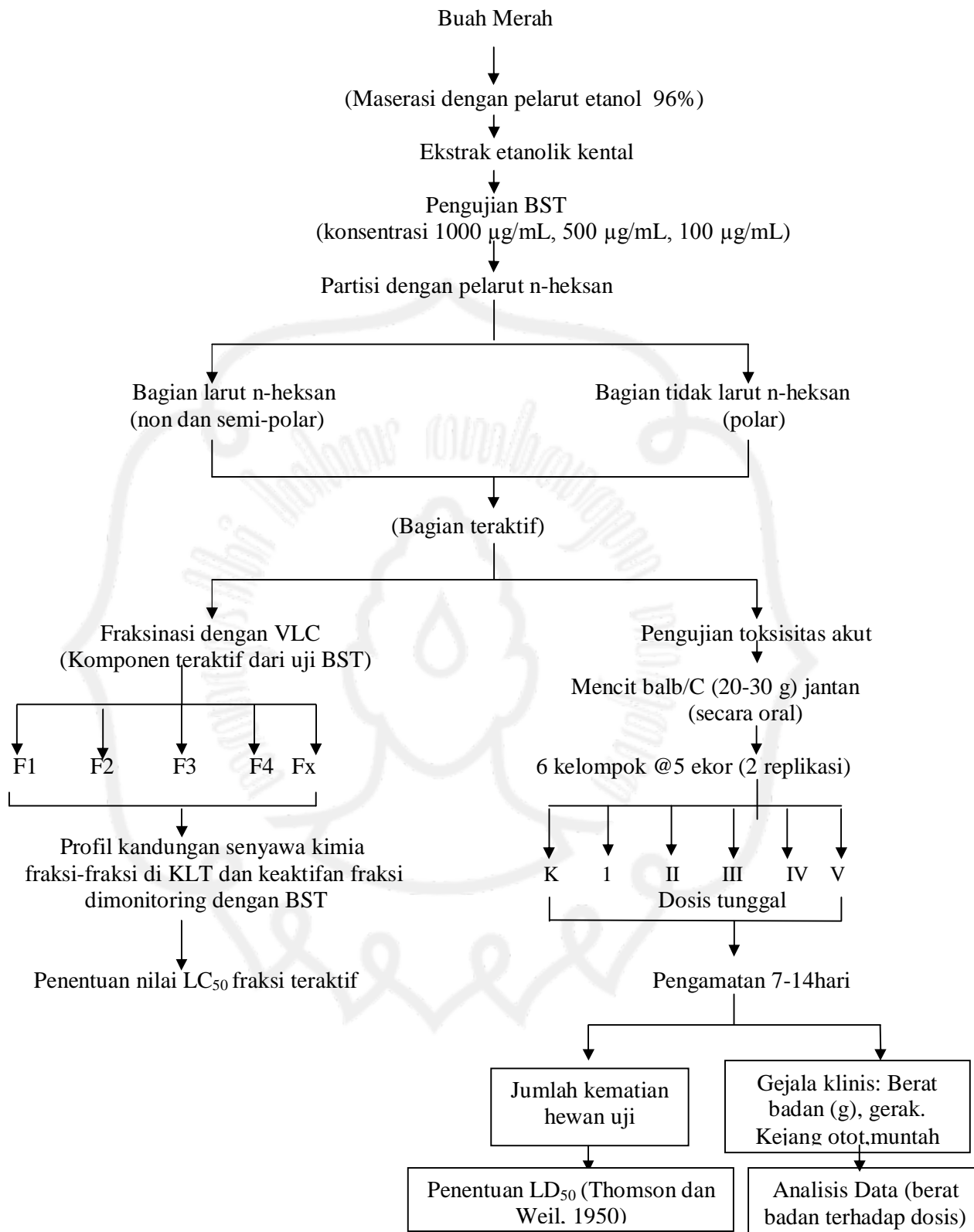
#### 4. Uji toksisitas akut

- a. Menyiapkan hewan uji mencit galur balb/C jantan dengan kisaran berat badan 20-30 gram yang sudah diaklimasi selama satu minggu kemudian dipuasakan selama 18 jam sebelum diberikan perlakuan. Kemudian mencit dikelompokkan ke dalam lima kelompok dosis dan satu kelompok kontrol negatif. Masing-masing kelompok terdiri dari lima mencit.

- b. Setiap mencit diberikan label dengan asam pikrat berwarna kuning pada bagian kepala, ekor, badan, kaki depan sebelah kanan dan kaki belakang sebelah kanan.
- c. Sampel yang diujikan merupakan hasil dari partisi yang memiliki komponen senyawa yang paling aktif dari pengujian *bioassay* metode BST. Kemudian dilakukan pembuatan stok larutan dosis sampel berdasarkan kelompok dosis yang disesuaikan dengan berat badan hewan uji . Sampel tersebut dilarutkan ke dalam suspensi CMC-Na 0,5 % dengan bantuan pemanasan di atas hot plate. Kelompok dosis yang digunakan dalam penelitian ini antara lain 5,687, 4,687, 3,687, 2,687, 1,687 g/kgBB dan kontrol (suspensi CMC-Na 0,5%). Variasi dosis tersebut ditentukan berdasarkan penelitian Yandiana (2008) dalam majalah Trubus (2008) yang telah menguji efek farmakologi buah merah terhadap mencit jantan dengan hasil uji toksisitas menunjukkan LD<sub>50</sub> sebesar 2,687 g/kgBB. Kemudian, pada penelitian ini dosis tersebut dijadikan kisaran dosis dengan selisih antar kelompok dosis sebesar 1 g/kgBB. Pengujian tersebut dilakukan secara oral (pencekakan) dengan jarum kanul ukuran 1 mL.
- d. Pengamatan dilakukan pada 3 jam pertama setelah pencekakan kemudian dilanjutkan pengamatan selama 7-14 hari secara kontinyu. Pengamatan tersebut meliputi gejala klinis, berat badan dan jumlah kematian hewan. Gejala klinis yang diamati antara lain keaktifan gerak (aktif bergelantungan pada atap kandang dan sering mengendus-endus sekeliling/rasa ingin tau yang tinggi), kejang otot, dan muntah.



- e. Selama 7-14 hari berturut-turut berat badan (g) ditimbang dari sebelum diberi perlakuan dan setelah diberikan perlakuan.
- f. Jumlah kematian masing-masing kelompok yang diperoleh digunakan untuk menentukan nilai  $LD_{50}$  menggunakan metode *Thomson and Weil* (1950), dengan rumus perhitungan:  $\text{Log } LD_{50} = \log D + d (f+1)$ , dimana: D = dosis terkecil yang digunakan, d = logaritma kelipatan dosis, f = faktor (dalam tabel r). Jika selama pengamatan pada waktu yang telah ditentukan tidak ditemukan adanya kematian pada setiap kelompok hewan uji maka  $LD_{50}$  *Thomson and Weil* (1950) tidak dapat dihitung, sehingga nilai  $LD_{50}$  pada pengujian tersebut dapat dinyatakan sebagai  $LD_{50}$  semu yaitu lebih besar dari konsentrasi tertinggi yang digunakan dalam pengujian (Wattimena, 1986). Penelitian secara keseluruhan dapat ditunjukkan dengan skema kerja pada Gambar 7 berikut.



Gambar 7. Skema kerja penelitian secara keseluruhan

### E. Analisis Data

- a. Efek toksisitas terhadap *A. salina* Leach. ditentukan berdasarkan analisis probit melalui tabel probit dan dibuat persamaan regresi linier.

$$y = bx + a$$

dimana :  $y$  = angka probit, dan  $x$  = log konsentrasi

persamaan tersebut dapat digunakan untuk mengetahui nilai  $LC_{50-24}$  jam komponen buah merah (*P. conoideus* Lam.) dengan memasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian.

- b. Data pengamatan berat badan yang diperoleh selama 7-14 hari dibuat grafik perubahan rata-rata berat badan (g) untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis dari masing-masing kelompok hewan uji terhadap perkembangan berat badan dengan menggunakan analisis statistik *one way anova*.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Persiapan bahan uji (sampel)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah merah (*P. conoideus* Lam.) yang diperoleh dari Papua pada tahun 2009. Buah merah dibersihkan dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran dan debu yang mungkin masih melekat pada buah. Pemisahan komponen bioaktif buah merah dilakukan secara bertahap yang meliputi ekstraksi, partisi dan fraksinasi. Masing-masing hasil pemisahan tersebut dilakukan pengujian *Bioassay* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) sebagai proses pencarian komponen bioaktif buah merah yang secara empiris terbukti memiliki aktivitas antikanker.

#### B. Pemisahan komponen bioaktif

Pada penelitian ini proses pemisahan komponen bioaktif buah merah (*P. conoideus* Lam.) dilakukan secara bertahap menggunakan metode ekstraksi dan partisi kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan metode *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC) untuk memperoleh komponen senyawa yang lebih spesifik. Masing-masing hasil pemisahan yang terbentuk dipantau keaktifannya sebagai komponen senyawa antikanker menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).

## 1. Ekstraksi

Pada penelitian ini, metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Metode tersebut dipilih karena merupakan metode yang paling sederhana dengan peralatan yang relatif mudah untuk didapatkan. Selain itu maserasi dilakukan tanpa adanya tahap pemanasan sehingga dapat menghindari terjadinya kerusakan komponen senyawa-senyawa pada buah merah yang tidak tahan panas.

Maserasi dilakukan dengan merendam sampel buah merah (600 g) ke dalam pelarut etanol 96% (1200 mL), kemudian didapatkan ekstrak kental etanolik sebanyak 450 mL. Maserasi tersebut dilakukan dengan sesekali pengadukan yang bertujuan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar butir sampel, sehingga dengan perlakuan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam dengan di luar sel. Kemudian ekstrak kental tersebut dilakukan pengujian BST untuk mengetahui ketoksikan ekstrak sebagai komponen aktif antikanker. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam pengujian antara lain 100, 500 dan 1000  $\mu\text{g/mL}$  sebagai uji pendahuluan. Hasil persentase kematian *A. salina* Leach. yang diperoleh dari pengujian BST dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase kematian *A. salina* Leach. terhadap pemberian ekstrak etanolik buah merah

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. (%)			
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	Rata-rata replikasi
Ekstrak	1000	62	56	60	59,34
etanolik	500	42	44	44	43,34
	100	24	20	22	22,00

Berdasarkan hasil pengujian toksisitas ekstrak etanolik buah merah dapat diketahui bahwa pada konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  memberikan persentase kematian sebesar 59,34% . Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa kandungan komponen bioaktif ekstrak etanolik buah merah berpotensi sebagai kandidat antikanker. Hal ini berdasarkan Meyer *et al.* (1982) dinyatakan bahwa jika  $\text{LC}_{50-24\text{jam}}$  lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  maka komponen senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki sifat toksik, sehingga sangat perlu dilakukan pengujian lanjut untuk mendapatkan komponen bioaktif yang lebih spesifik yaitu dengan melakukan proses pemisahan komponen bioaktif tersebut dengan metode partisi cair-cair.

## 2. Partisi

Ekstrak etanolik buah merah yang sebelumnya telah diuji keaktifannya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST), selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksan yang bersifat non-polar dengan perbandingan 1:1 (v/v), yaitu ekstrak etanolik kental : n-heksan (50 mL : 50 mL) sebanyak 5 kali partisi, sehingga dapat dihasilkan dua bagian yang terpisah yaitu bagian yang larut dan tidak larut n-heksan. Partisi ini dimaksudkan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang bersifat polar agar masuk ke dalam bagian tidak larut n-heksan (dihasilkan 170 mL) sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat semi dan non-polar akan masuk dalam bagian larut n-heksan (dihasilkan 666 mL), selanjutnya keduanya diuapkan menggunakan *rotary evaporator*.

Bagian larut (16 mL) dan tidak larut n-heksan (50 mL) yang sudah diuapkan masing-masing dapat dilakukan pengujian *Bioassay* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) untuk memperoleh informasi lebih lanjut mengenai tingkat ketoksikan kedua bagian tersebut sebagai komponen yang lebih aktif

memiliki aktivitas antikanker. Hasil persentase kematian *A. salina* Leach. terhadap pemberian bagian larut dan tidak larut n-heksan ekstrak etanolik buah merah dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase kematian *A. salina* Leach. terhadap pemberian bagian larut dan tidak larut n-heksan ekstrak etanolik buah merah

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata persentase kematian <i>A. salina</i> . (%)			
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	Rata-rata replikasi
Bagian larut	400	50	54	58	54,00
n-heksan	200	28	36	30	31,34
	100	20	26	26	24,00
Bagian tidak	400	52	48	42	47,34
larut n-	200	24	22	24	23,34
heksan	100	16	18	12	15,34

Berdasarkan hasil pengujian toksisitas diatas dapat diketahui bahwa rata-rata persentase kematian pada bagian larut n-heksan lebih besar dibandingkan dengan bagian tidak larut n-heksan terhadap *A. salina* Leach. Hasil ini dapat memberikan informasi bahwa komponen senyawa bioaktif buah merah yang menyebabkan 50% kematian terhadap *A. salina* Leach. terdapat pada bagian larut n-heksan. Oleh karena itu dapat diketahui bahwa komponen bioaktif buah merah yang berpotensi sebagai senyawa antikanker tergolong ke dalam komponen bioaktif semi dan non-polar. Bagian larut n-heksan dari ekstrak etanolik buah merah tersebut kemudian dapat dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan fraksinasi.

### 3. Fraksinasi

Bagian larut n-heksan yang menunjukkan aktivitas antikanker pada metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) selanjutnya dilakukan fraksinasi. Tahap

fraksinasi tersebut dilakukan bertujuan untuk mengeliminir senyawa-senyawa yang tidak dikehendaki sehingga dapat diperoleh konsentrasi komponen senyawa bioaktif yang lebih tinggi. Metode ini mempunyai beberapa keuntungan antara lain lebih cepat, sederhana dan dapat digunakan secara luas.

Fraksinasi pada penelitian ini menggunakan kromatografi kolom metode *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC) untuk memisahkan kandungan senyawa-senyawa pada sampel buah merah berdasarkan tingkat polaritasnya. Bagian larut n-heksan dielusi dengan berbagai komposisi pelarut berdasarkan gradien polaritas, dimulai dari pelarut non-polar yang selanjutnya tingkat kepolaran dinaikkan secara perlahan-lahan. Sebelum dilakukan pemisahan, terlebih dahulu dilakukan persiapan kolom (VLC) dan persiapan sampel. Hasil persiapan kolom dan persiapan sampel dapat dilihat pada Lampiran 1.

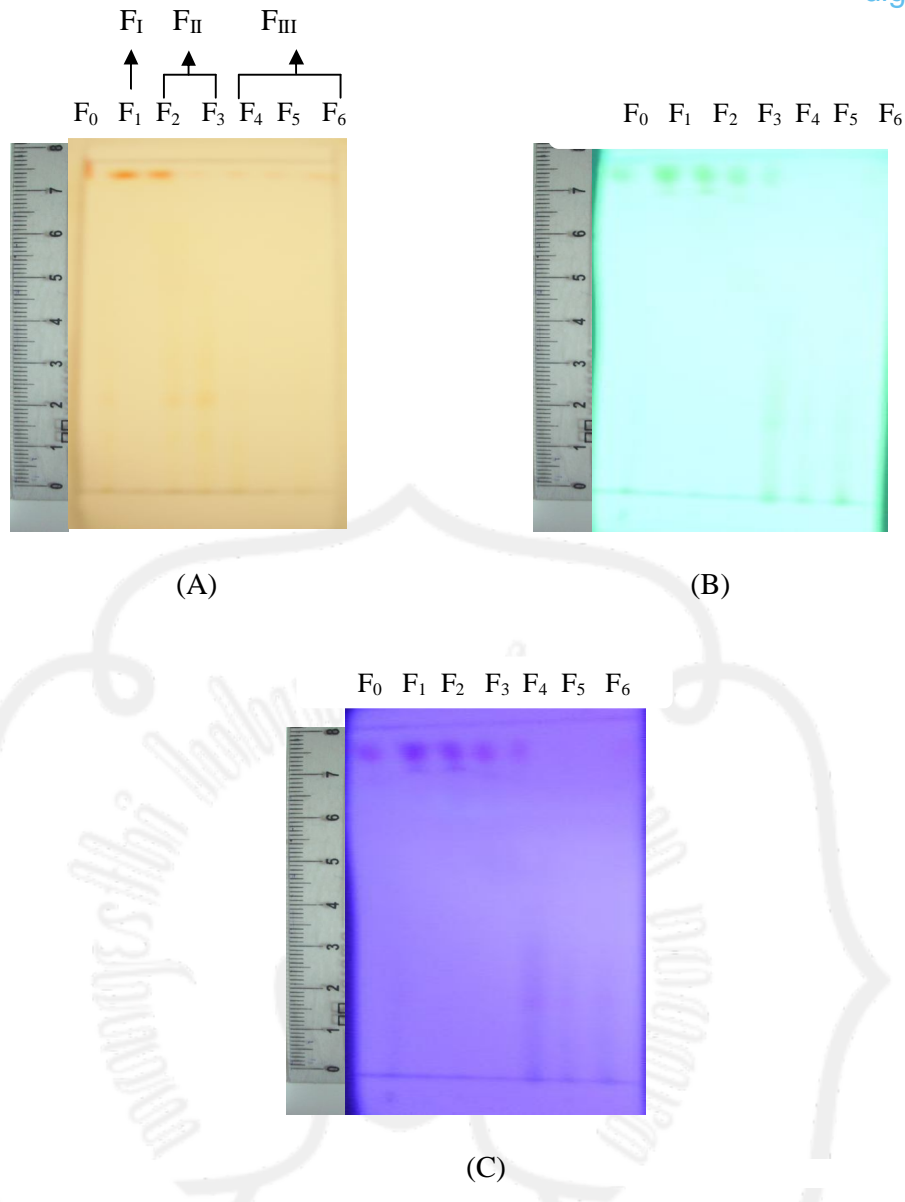
Serbuk sampel yang diperoleh kemudian dilakukan pemisahan bioaktif secara bertahap menggunakan berbagai komposisi eluen dengan metode kromatografi kolom (VLC). Serbuk sampel tersebut diletakkan diatas silika gel 60 GF<sub>254</sub> yang sudah terbentuk rata pada *sinter glass*. Kemudian permukaan atas sampel diratakan kembali dan diberikan kertas saring. Selanjutnya dilakukan elusi dengan eluen n-heksan : etil asetat dengan masing-masing komposisi eluen 80% : 20%, 10% : 90% dan 100% etil asetat. Proses pemisahan tersebut menghasilkan enam fraksi yang dapat dilihat pada Tabel 3.



Tabel 3. Fraksinasi bagian larut n-heksan menggunakan berbagai fase gerak dengan metode VLC

Fase gerak	Volume hasil evaporasi (mL)	Fraksi
n-heksan : etil asetat (80:20) (v/v)	30	1
n-heksan : etil asetat (80:20) (v/v)	37	2
n-heksan : etil asetat (10:90) (v/v)	22	3
n-heksan : etil asetat (10:90) (v/v)	25	4
etil asetat 100 (v/v)	37	5
etil asetat 100 (v/v)	30	6

Hasil fraksinasi tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Hal ini dilakukan dengan tujuan pengelompokan lebih lanjut terhadap fraksi-fraksi yang diperoleh berdasarkan kesamaan profil kandungan kimia dari bercak KLT yang terbentuk. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat (80% : 20%) dalam 3 mL (2,4 mL : 0,6 mL). Perbandingan tersebut digunakan karena sudah terbukti dapat memberikan pemisahan yang cukup baik terhadap fraksi larut n-heksan. Profil kandungan kimia dideteksi menggunakan sinar  $UV_{254}$ , sinar  $UV_{366}$  dan pereaksi semprot serum (IV) sulfat. Profil KLT masing-masing fraksi hasil fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Profil kromatogram masing-masing fraksi hasil fraksinasi dari fraksi larut n-heksan ekstrak etanolik buah merah dengan deteksi (A) serum (IV) sulfat, (B) UV<sub>254</sub>, (C) UV<sub>366</sub>, Fase diam (silika gel 60 GF<sub>254</sub>), Fase gerak (n-heksana : etil asetat (80% : 20%) (v/v))

Keterangan :

F<sub>0</sub> = fraksi larut n-heksan

F<sub>1</sub> = fraksi n-heksan:etil asetat (80:20) (v/v)

F<sub>2</sub> = fraksi n-heksan:etil asetat (80:20) (v/v)

F<sub>3</sub> = fraksi n-heksan:etil asetat (10:90) (v/v)

F<sub>4</sub> = fraksi n-heksan:etil asetat (10:90) (v/v)

F<sub>5</sub> = fraksi etil asetat 100 (v/v)

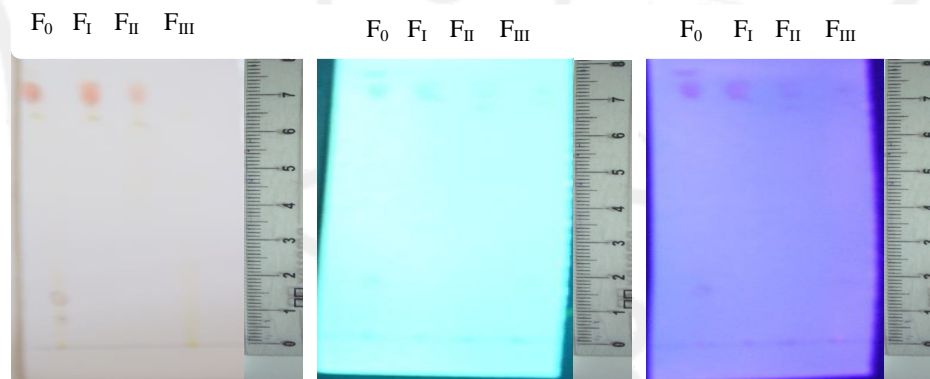
F<sub>6</sub> = fraksi etil asetat 100 (v/v)

F<sub>I</sub> = fraksi 1

F<sub>II</sub> = gabungan F<sub>2</sub> dan F<sub>3</sub>

F<sub>III</sub> = gabungan F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> dan F<sub>6</sub>

Hasil dari bercak pada KLT tersebut terlihat adanya distribusi pemisahan bercak ekstrak etanolik buah merah ke dalam fraksi-fraksi yang terbentuk. Berdasarkan pengamatan profil kandungan kimia, fraksi-fraksi yang memiliki kesamaan profil dapat digabungkan menjadi satu dengan pertimbangan bahwa fraksi-fraksi tersebut memiliki kandungan senyawa yang hampir sama, antara lain fraksi 2 dan 3 dapat digabungkan dan menjadi fraksi II, hal ini dikarenakan terdapat bercak yang muncul dikedua fraksi dengan posisi hampir sama yang tidak terdapat pada fraksi lain, kemudian fraksi 4, 5 dan 6 dapat digabungkan menjadi fraksi III, karena ketiga fraksi tersebut juga terbentuk bercak yang sama sedangkan fraksi 1 secara tunggal menjadi fraksi I karena tidak memiliki kesamaan profil KLT dengan fraksi-fraksi yang lainnya. Profil KLT hasil penggabungan fraksi-fraksi dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Profil kromatogram penggabungan fraksi hasil fraksinasi dari partisi larut n-heksan ekstrak etanolik buah merah dengan deteksi (A) serum (IV) sulfat, (B) UV<sub>254</sub>, (C) UV<sub>366</sub>. Fase diam (silika gel 60 GF<sub>254</sub>), Fase gerak (n-heksan : etil asetat (80% : 20%) (v/v)).

Profil kromatogram tersebut dideteksi dengan menggunakan sinar UV<sub>254</sub>, sinar UV<sub>366</sub> dan pereaksi semprot serum (IV) sulfat. Pendeteksian dengan sinar UV<sub>254</sub> memperlihatkan terjadinya peredaman yang ditandai dengan adanya

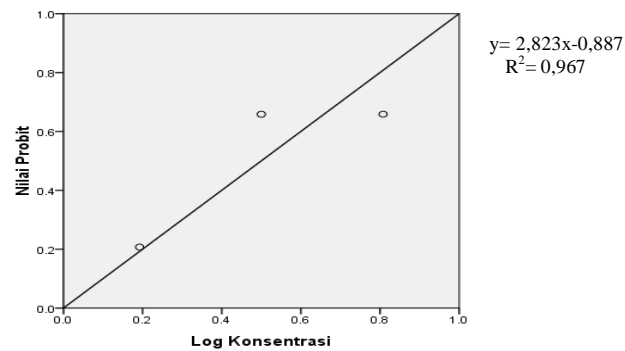
beberapa zona gelap berlatar belakang fosforesensi hijau. Peredaman yang terjadi pada UV<sub>254</sub> ini menunjukkan adanya keberadaan suatu senyawa. Deteksi dengan sinar UV<sub>366</sub> memperlihatkan beberapa bercak yang berpendar dan berwarna. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang panjang sehingga dapat berpendar pada penyinaran dengan UV gelombang panjang. Penyemprotan menggunakan serium (IV) sulfat digunakan untuk mendeteksi secara umum keberadaan senyawa organik. Terbentuknya bercak warna *orange* pada kromatogram menunjukkan bahwa pada bercak tersebut terdapat senyawa-senyawa organik.

Ketiga fraksi yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan pengujian tingkat ketoksikan terhadap *A. salina* Leach. untuk mengetahui efek yang paling toksik sebagai kandidat antikanker. Hasil persentase kematian *A. salina* Leach. terhadap masing-masing fraksi dan perhitungan nilai LC<sub>50-24jam</sub> dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 5.

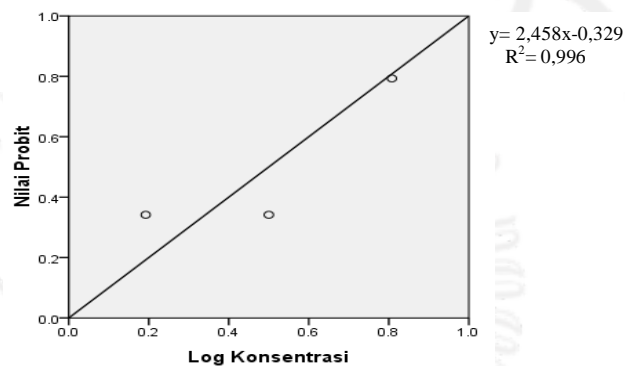
Tabel 4. Persentase kematian *A. salina* Leach. terhadap pemberian bagian larut n-heksan buah merah.

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata persentase kematian <i>A. salina</i> Leach. (%)			
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	Rata-rata replikasi
Fraksi I	200	54	56	60	56,67
	100	24	28	26	26,00
	50	6	10	8	8,00
Fraksi II	200	76	62	62	66,70
	100	34	36	38	36,00
	50	16	12	10	12,70
Fraksi III	200	30	32	34	32,00
	100	14	14	16	14,70
	50	8	6	8	7,30

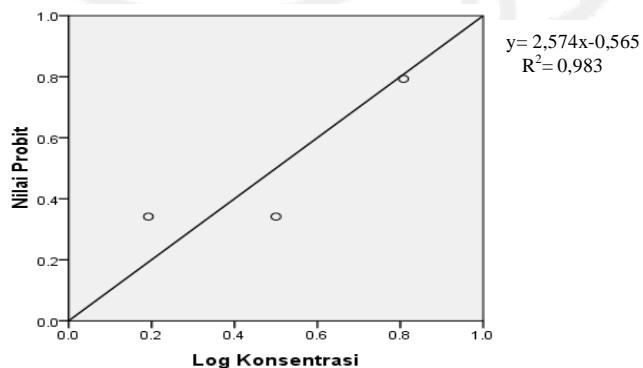
Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa fraksi yang memberikan efek paling toksik dapat ditunjukkan pada fraksi II dengan nilai rata-rata persentase kematian terbesar (66,70 %) dibandingkan dengan kedua fraksi lainnya. Nilai rata-rata persentase kematian fraksi II yang diperoleh selanjutnya dianalisis menjadi nilai probit dengan menggunakan tabel probit kemudian dibentuk kurva hubungan antara log konsentrasi (x) dan nilai probit (y) sehingga diperoleh persamaan garis lurus yang dapat dilihat pada kurva berikut.



Gambar 10. Kurva regresi linier uji toksisitas fraksi II hasil fraksinasi dari hasil partisi n-heksan ekstrak etanolik buah merah terhadap *A. salina* Leach. (replikasi I)



Gambar 11. Kurva regresi linier uji toksisitas fraksi II hasil fraksinasi dari hasil partisi n-heksan ekstrak etanolik buah merah terhadap *A. salina* Leach. (replikasi II)



Gambar 12. Kurva regresi linier uji toksisitas fraksi II hasil fraksinasi dari hasil partisi n-heksan ekstrak etanolik buah merah terhadap *A. salina* Leach. (replikasi III)

Berdasarkan persamaan garis lurus dari masing-masing replikasi diatas, selanjutnya dapat ditentukan nilai  $LC_{50-24jam}$  sampel buah merah (fraksi II) terhadap *A. salina* Leach. dengan cara memasukkan nilai  $y = 5$  ke dalam persamaan garis lurus dari kurva yang terbentuk, sehingga diperoleh log konsentrasi yang dapat menyebabkan 50% kematian.

Tabel 5. Perhitungan nilai  $LC_{50-24 jam}$  fraksi II hasil fraksinasi bagian larut n-heksan buah merah

Replikasi	Persamaan regresi linier	$LC_{50-24jam}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
I	$y = 2,823 * x - 0,887$ $R^2 = 0,967$	121,72
II	$y = 2,458 * x - 0,329$ $R^2 = 0,996$	147,23
III	$y = 2,574 * x - 0,565$ $R^2 = 0,983$	145,2 1
	$LC_{50-24jam}$ rata-rata	138,05

$LC_{50}$  merupakan indikasi ketoksikan suatu bahan atau senyawa yang dapat menyebabkan kematian 50% pada hewan uji. Semakin besar nilai  $LC_{50}$  berarti menunjukkan toksisitasnya semakin kecil dan sebaliknya semakin kecil nilai  $LC_{50}$  semakin besar toksisitasnya.

Menurut Meyer *et al.* (1982) suatu senyawa uji dikatakan bersifat toksik dan berpotensi sebagai kandidat antikanker pada pengujian *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) jika memiliki nilai  $LC_{50-24jam}$  lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil perhitungan pada penelitian ini diperoleh nilai  $LC_{50-24 jam}$  rata-rata dari ketiga replikasi sebesar 138,05  $\mu\text{g/mL}$ . Hal ini menunjukkan bahwa fraksi II bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

### C. Pengujian toksisitas akut

Uji toksisitas merupakan bagian dari bidang toksikologi yaitu ilmu mengenai aksi berbahaya suatu zat kimia, atau mekanisme biologi tertentu. Setiap zat kimia pada kondisi tertentu mampu menimbulkan suatu tipe efek atas jaringan biologi, oleh karena itu uji toksikologi merupakan uji yang menentukan kondisi-kondisi yang dapat menimbulkan efek biologi. Bahan yang dapat menyebabkan kerusakan atau kematian pada sistem biologi disebut sebagai racun. Bahan-bahan tersebut dapat berasal dari sumber alam maupun sintesis (Loomis, 1978). Oleh karena itu dalam penelitian ini selain dilakukan pencarian komponen bioaktif yang berpotensi sebagai antikanker menggunakan metode BST juga dilakukan penelitian mengenai efek toksisitas komponen bioaktif hasil partisi larut n-heksan buah merah yang bertujuan untuk mengetahui gambaran keamanan bahan obat tersebut apabila akan dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai bahan obat herbal yang terstandar atau fitofarmaka, khususnya sebagai obat antikanker. Melalui pengujian toksisitas akut tersebut dapat diketahui nilai  $LD_{50}$  yang selanjutnya dapat digunakan sebagai parameter tingkat ketoksikan dari komponen bioaktif yang diperoleh.

Pengujian toksisitas akut suatu bahan obat merupakan salah satu mata rantai uji toksikologi dalam kaitannya dengan penilaian keamanan bahan obat tersebut apabila digunakan oleh manusia. Secara kualitatif, analisis dan evaluasi hasil berupa data gejala-gejala klinis yang tampak pada fungsi vital digunakan untuk mengevaluasi mekanisme penyebab kematian dan data jumlah hewan yang mati



pada masing-masing kelompok, sedangkan secara kuantitatif data tersebut digunakan untuk menghitung nilai LD<sub>50</sub>.

Penentuan nilai LD<sub>50</sub> pada pengujian toksisitas akut merupakan tahap awal untuk mengetahui keamanan suatu bahan obat yang akan digunakan oleh manusia berdasarkan besarnya dosis yang dapat menyebabkan kematian 50% pada hewan uji dengan satuan berat badan setelah pemberian dosis tunggal. Toksisitas akut terjadi dalam waktu singkat setelah pemberian dalam dosis tunggal, bersifat mendadak dan biasanya reversibel.

Pada penghitungan LD<sub>50</sub> sangat diperlukan ketepatan atau jika dilihat dari taraf kepercayaan tertentu, nilai tersebut hanya sedikit sekali bergeser dari nilai yang sebenarnya, atau berada pada interval yang sempit, oleh karena itu pada penelitian ini menggunakan tabel metode *Thomson and Weil* (1950). Metode tersebut banyak digunakan pada pengujian toksisitas akut diantaranya terhadap hewan uji mencit dengan perlakuan dosis tunggal kemudian dilakukan evaluasi selama 3-14 hari. Menurutnya pengujian toksisitas akut tersebut paling tidak menggunakan 4 peringkat dosis yang masing-masing dosis menggunakan paling sedikit 4 hewan uji.

Pada penelitian ini hewan uji mencit yang digunakan harus dalam keadaan sehat dan berasal dari satu galur yang jelas serta secara visual menunjukkan perilaku yang normal. Hal ini bertujuan agar tidak menyebabkan perbedaan antar kelompok hewan uji sehingga akan mempengaruhi hasil pengujian yang disebabkan faktor lain.

Sebanyak tiga puluh mencit jantan dikelompokkan ke dalam enam dosis perlakuan secara acak dengan masing-masing kelompok dosis terdiri lima ekor.

Setiap kelompok perlakuan diuji dengan tingkat dosis yang berbeda antara lain kelompok kontrol negatif diberikan suspensi CMC-Na 0,5% secara peroral, kelompok I diberikan sediaan uji 1,687 g/kgBB secara peroral, kelompok II diberikan sediaan uji dosis 2,687 g/kgBB secara peroral, kelompok III diberikan sediaan uji 3,687 g/kgBB secara peroral, kelompok VI diberikan sediaan uji dosis 4,687 g/kgBB secara peroral, dan kelompok V diberikan sediaan uji dosis 5,687 g/kgBB secara peroral. Selama penelitian, hewan uji mencit diberikan makanan berupa pelet dan air secukupnya. Masing-masing perlakuan tersebut selanjutnya dapat disebut dengan kelompok kontrol, I, II, III, IV dan V, dengan masing-masing dilakukan 2 replikasi.

Pengamatan dilakukan pada 3 jam pertama setelah dilakukan pencekohan sediaan uji, kemudian dilanjutkan dengan pengamatan setiap hari selama 7-14 hari. Pengamatan yang dilakukan meliputi gejala-gejala klinis, pengukuran berat badan (g) dan jumlah kematian hewan uji. Gejala klinis yang diamati meliputi keaktifan gerak (aktif bergelantungan pada atap kandang dan sering mengendus-endus sekeliling kandang/memiliki rasa ingin tau yang tinggi), kejang otot, dan muntah. Pengamatan berat badan (g) hewan uji pada setiap kelompok dosis dilakukan dengan menimbang berat badan mencit selama 8 hari berturut-turut. Jumlah kematian hewan uji pada setiap kelompok dosis akan digunakan sebagai data dalam menentukan nilai LD<sub>50</sub>.

Berdasarkan hasil pengamatan gejala klinis pada 3 jam pertama tidak ditemukan adanya gejala-gejala toksik yang terjadi dan tidak pula ditemukan adanya kematian pada semua kelompok dosis hewan uji. Adanya perubahan tingkah laku mencit setelah pencekohan hanya menunjukkan suatu proses adaptasi

terhadap stres setelah mengalami perlakuan tersebut. Hal itu akan kembali normal dalam waktu yang singkat. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 6 berikut.

Tabel 6. Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada 3 jam pertama setelah pemberian dosis tunggal secara oral

Kelompok	Perlakuan	Jumlah hewan uji	Gejala toksik dan kematian
Kontrol	Larutan CMC-Na 0,5 %	5	-
I	1,687 g/kgBB	5	-
II	2,687 g/kgBB	5	-
III	3,687 g/kgBB	5	-
IV	4,687 g/kgBB	5	-
V	5,687 g/kgBB	5	-

(-): tidak terdapat gejala toksik; (+): terdapat gejala toksik (*kejang otot, muntah gerak tidak aktif dan kematian*).

Setelah pengamatan pada 3 jam pertama kemudian dilanjutkan pengamatan selama 14 hari berturut-turut. Pengamatan secara klinis hingga hari ke-14 dapat diketahui bahwa pemberian dosis dari tingkat dosis terendah hingga tingkat dosis tertinggi tidak ditemukan adanya gejala-gejala toksik dan tidak pula ditemukan adanya kematian hewan uji dari semua kelompok dosis. Hal ini dapat ditunjukkan bahwa semua kelompok hewan uji tidak ada yang mengalami kejang otot, muntah dan gerak tidak aktif. Hasil pengamatan pada hari ke-14 dapat dilihat pada Tabel 7 berikut.

Tabel 7. Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada hari ke-14 setelah pemberian dosis tunggal secara oral

Kelompok	Perlakuan	Jumlah hewan uji	Gejala toksik dan kematian	Nilai LD <sub>50</sub> semu
Kontrol	Lrt CMC-Na 0,5 %	5	-	
I	1,687 g/kgBB	5	-	
II	2,687 g/kgBB	5	-	> dosis tertinggi
III	3,687 g/kgBB	5	-	5,687 g/kgBB
IV	4,687 g/kgBB	5	-	
V	5,687 g/kgBB	5	-	

(-): tidak terdapat gejala toksik; (+): terdapat gejala toksik (*kejang otot, muntah, gerak tidak aktif dan kematian*).

Berdasarkan hasil pengamatan yang diperoleh, pemberian sediaan uji secara peroral pada mencit hingga dosis tertinggi (5,687g/kgBB) ternyata tidak menimbulkan kematian pada semua kelompok dosis, dengan demikian potensi ketoksikan akut hasil partisi n-heksan dari ekstrak etanol buah merah tidak dapat ditentukan. Hal tersebut dikarenakan untuk menentukan LD<sub>50</sub> suatu bahan obat menurut Wattimena *et al.* (1986) harus terdapat hewan uji yang mengalami kematian. Oleh karena itu nilai LD<sub>50</sub> pada penelitian ini hanya dapat ditunjukkan dengan nilai LD<sub>50</sub> semu dimana dosis yang dilihat adalah dosis tertinggi yang secara teknis masih dapat dipejankan atau diterima oleh hewan uji dalam penelitian. Jadi nilai LD<sub>50</sub> sediaan bahan uji hasil partisi n-heksan ekstrak etanol buah merah secara oral dosis tunggal lebih besar dari 5,687 g/kgBB. Karena nilai LD<sub>50</sub> belum dapat ditentukan pada penelitian ini maka dilakukan pengujian lanjut dengan meningkatkan dosis menjadi 6,687 dan 7,687 g/kgBB terhadap hewan uji mencit yang memiliki berat badan 25 g, sebagai pengujian tambahan untuk

mengetahui dosis tertinggi yang mungkin dapat menyebabkan kematian pada hewan uji secara akut. Dosis tersebut merupakan dosis yang masih dapat dipejankan atau diterima oleh hewan uji. Secara teknis pengujian diberikan perlakuan yang sama dengan pengujian sebelumnya. Selanjutnya dapat dilakukan pengamatan pada 3 jam pertama setelah pemberian dosis tunggal secara oral kemudian dilanjutkan dengan pengamatan selama 7-14 hari. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada 3 jam pertama setelah pemberian dosis tunggal secara oral

Kelompok	Perlakuan	Jumlah hewan uji	Gejala toksik dan kematian
Kontrol	Larutan CMC-Na 0,5 %	2	-
I	6,687 g/kgBB	2	-
II	7,687 g/kgBB	2	Agak lemas

(-): tidak terdapat gejala toksik; (+): terdapat gejala toksik (*kejang otot, muntah, gerak tidak aktif dan kematian*).

Pada pengamatan 3 jam pertama dapat dilihat bahwa pemberian dosis 7,687 g/kgBB dapat memberikan gejala toksik agak lemas (gerak tidak aktif) namun tidak menimbulkan kematian. Karena gejala toksik tersebut berangsur-angsur hilang setelah 6 jam berikutnya dan kembali normal pada pengamatan selama 7-14 hari. Hasil pengamatan pada hari ke-14 dapat dilihat pada Tabel 9 berikut.

Tabel 9. Hasil pengamatan gejala toksik dan kematian hewan uji pada hari ke-14 setelah pemberian dosis tunggal secara oral

Kelompok	Perlakuan	Jumlah hewan uji	Gejala toksik dan kematian	Nilai LD <sub>50</sub> semu
Kontrol	Lrt CMC-Na 0,5 %	2	-	
I	6,687 g/kgBB	2	-	> dosis tertinggi 7,687 g/kgBB
II	7,687 g/kgBB	2	-	

(-): tidak terdapat gejala toksik; (+): terdapat gejala toksik (*kejang otot, muntah, gerak tidak aktif dan kematian*).

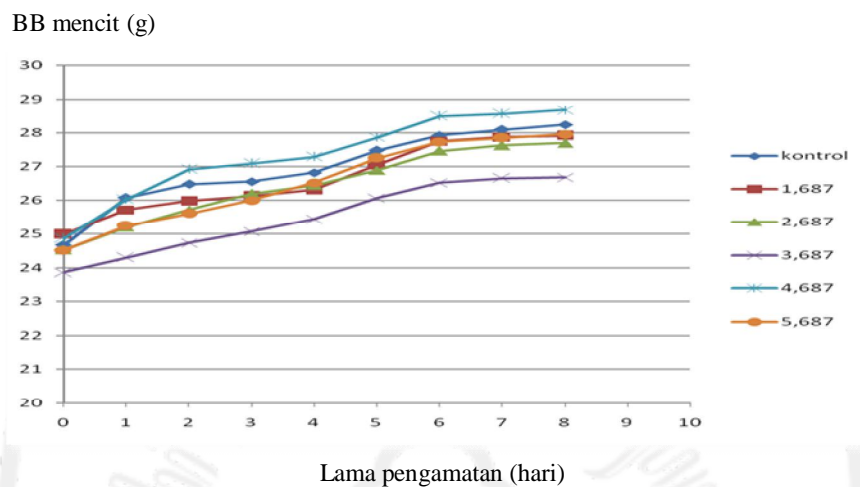
Selain dilakukan pengamatan mengenai gejala-gejala toksik dan jumlah kematian hewan uji, juga dilakukan pengamatan terhadap perkembangan berat badan hewan uji setelah dilakukan pencekukan. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh dari tingkat pemberian dosis terhadap perkembangan berat badan hewan uji.

Hasil pengamatan secara klinis terhadap berat badan semua kelompok dosis hewan uji dilakukan secara berturut-turut selama 8 hari. Perkembangan berat badan mencit tersebut dapat dilihat pada Lampiran 13 yang merupakan rata-rata dari dua replikasi perlakuan.

#### **a. Rata-rata berat badan mencit (g) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan selama 8 hari**

Pengamatan berat badan hewan uji mencit merupakan data penunjang yang dapat menggambarkan kesehatan mencit selama penelitian dari sebelum perlakuan hingga setelah perlakuan. Berdasarkan Gambar 13, secara umum dapat diketahui bahwa terdapat kenaikan berat badan mencit baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa bahan pakan mencit baik *pellet* maupun pemberian sediaan uji pada berbagai

konsentrasi mempunyai pengaruh yang sama terhadap kenaikan berat badan (g) mencit. Hasil pengamatan perkembangan berat badan (g) mencit selama pengamatan dapat dilihat pada grafik Gambar 13 berikut.



Gambar 13. Grafik perkembangan rata-rata berat badan (g) dua replikasi mencit yang diamati selama 0-8 hari setelah pemberian dosis tunggal (g/kgBB).

**b. Distribusi rata-rata berat badan (g) mencit berdasarkan penimbangan sebelum (i) dan sesudah (ii) diberi sediaan uji buah merah.**

Hasil uji statistik pada kelompok kontrol diperoleh nilai  $p < 0,05$  (pada tabel 10), hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara nyata berat badan (g) pada penimbangan sebelum (i) dan sesudah perlakuan (ii) pada hewan uji. Demikian pula pada kelompok perlakuan yang lain baik pada dosis 1,687, 2,687, 3,687, 4,687 dan 5,687 g/kgBB juga terdapat perbedaan secara nyata berat badan (g) mencit sebelum dan sesudah diberikan perlakuan. Hal ini berarti pemberian sediaan uji buah merah mempunyai pengaruh yang positif terhadap kenaikan berat badan (g) mencit. Distribusi rata-rata berat badan tersebut dapat dilihat pada Tabel 10 berikut.

Tabel 10. Distribusi rata-rata berat badan mencit (g) berdasarkan penimbangan berat badan sebelum (i) dan sesudah (ii) pemberian sediaan uji

Penimbangan berat badan per kelompok	Rata-rata berat badan (g) ± standar deviasi	Standar eror	Nilai P
Kelompok kontrol			
a. Penimbangan i	24.67 ± 1,242	0,414	0,00
b. Penimbangan ii	28.24 ± 2,701	0,814	
Kelompok dosis I			
a. Penimbangan i	24.98 ± 0,294	0,292	0,00
b. Penimbangan ii	27.91 ± 1,764	0,557	
Perlakuan dosis II			
a. Penimbangan i	24.53 ± 1,486	0,470	0,00
b. Penimbangan ii	27.69 ± 2,488	0,787	
Perlakuan dosis III			
a. Penimbangan i	23.87 ± 1,380	0,436	0,00
b. Penimbangan ii	26.68 ± 2,672	0,845	
Perlakuan dosis IV			
a. Penimbangan i	24.86 ± 0,777	0,245	0,00
b. Penimbangan ii	28.68 ± 1,957	0,619	
Perlakuan dosis V			
a. Penimbangan i	24.52 ± 1,205	0,381	0,00
b. Penimbangan ii	27.96 ± 2,094	0,662	

Keterangan: Penimbangan berat badan (i): sebelum diberikan sediaan uji, penimbangan berat badan (ii) : hari ke-8 (hari terakhir pengamatan)

### c. Distribusi rata-rata berat badan mencit (g) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Berdasarkan hasil uji analisis varian, rata-rata berat badan (g) mencit pada hari ke-0 hingga hari ke-8 dapat diperoleh nilai  $p > 0,05$  (Lampiran 14). Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan secara nyata dari rata-rata berat badan (g) selama 8 hari pengamatan terhadap pemberian dosis diantara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.



Tabel 11. Distribusi rata-rata berat badan mencit (g) kelompok kontrol dan kelompok perlakuan selama 8 hari.

Perlakuan (hari ke-0 s/d hari ke-8)	Berat badan (g) ± standar deviasi	Standar eror
Kontrol	28,038 ± 2,190	0,516
I	27,782 ± 1,813	0,427
II	27,574 ± 1,695	0,399
III	26,653 ± 1,700	0,400
IV	28,702 ± 2,044	0,481
V	27,823 ± 1,951	0,459

Pada dasarnya masing-masing tingkat dosis yang diberikan pada hewan uji mencit dapat memberikan pengaruh yang positif terhadap kenaikan berat badan (g) selama penelitian. Namun, pemberian dosis yang bervariasi tersebut tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap berat badan (g) mencit. Hal tersebut dapat ditunjukkan pada grafik Gambar 13 yang dapat diketahui bahwa pemberian sediaan uji buah merah dengan tingkat dosis 3,687 g/kgBB memberikan pengaruh paling kecil terhadap kenaikan berat badan, sedangkan perlakuan dengan dosis 4,687 g/kgBB memberikan pengaruh paling besar terhadap kenaikan berat badan mencit. Hal ini menunjukkan bahwa kenaikan perlakuan dosis sediaan uji yang diberikan tidak mempengaruhi kenaikan berat badan mencit.

#### **d. Keamanan buah merah berdasarkan pengujian toksisitas akut**

Berdasarkan hasil pengujian toksisitas akut pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian dosis hingga 7,687 g/kgBB tidak menimbulkan gejala toksik dan tidak ditemukan adanya kematian pada hewan uji, sehingga dapat dinyatakan bahwa buah merah cukup aman untuk dikonsumsi. Hal tersebut terkait dengan adanya kandungan senyawa aktif buah merah yang dapat juga menjadi nutrisi penting bagi tubuh. Kandungan nutrisi pada buah merah telah dianalisis di Laboratorium Jepang yang hasilnya menunjukkan bahwa setiap 100 g ekstrak minyak buah merah mengandung 94,20 mg lipida dan 5,10 g karbohidrat. Kedua zat tersebut merupakan asupan yang sangat dibutuhkan dalam proses metabolisme tubuh. Selain itu ekstrak minyak buah merah juga tidak mengandung logam berat dan mikroorganisme berbahaya, sehingga relatif aman untuk digunakan dalam pengobatan (Surono *et al.*, 2006).

Pengaruh yang positif dari pemberian sediaan uji buah merah tersebut terhadap kenaikan berat badan (g) mencit menunjukkan bahwa selama penelitian keseluruhan hewan uji dalam keadaan sehat dan tidak menunjukkan gejala-gejala toksik penyebab kematian setelah diberikan perlakuan dengan pemberian berbagai dosis. Dari hasil pengamatan tersebut diketahui bahwa buah merah dapat digunakan sebagai sumber pakan berkualitas yang berperan untuk menunjang pertumbuhan dan perkembangan tubuh hewan uji. Hal ini sesuai dengan penelitian Usman (2007) yang menyatakan bahwa pemberian pasta buah merah sebanyak 3% dalam kombinasi pakan dapat meningkatkan berat badan pada ayam buras periode *grower* dari 111,80 g menjadi 137,90 g ekor/minggu. Demikian pula mortalitas anak ayam tersebut menurun dari 12,50% menjadi 0%.

Tidak adanya kematian pada hewan uji selama pengamatan menunjukkan bahwa buah merah memberikan pengaruh yang positif terhadap ketahanan tubuh hewan uji. Hal tersebut terkait dengan kandungan kimia dari buah merah, yaitu berupa zat gizi yang sangat penting untuk ketahanan tubuh seperti  $\beta$ -karoten, tokoferol (vitamin E), asam linolenat, asam oleat, asam stearat dan asam palmitat (Budi dan Paimin, 2005). Kandungan  $\beta$ -karoten dan tokoferol tersebut dikenal sebagai senyawa antioksidan yang dapat menghambat perkembangan radikal bebas di dalam tubuh, sehingga mencit yang mendapat asupan dosis buah merah dapat terhindar dari berbagai penyakit penyebab kematian.

Antioksidan tersebut berperan sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif yang relatif stabil. Antioksidan dapat melawan radikal bebas dengan cara memberikan satu elektron untuk menutupi satu elektron yang dibutuhkan radikal bebas, sehingga dengan adanya antioksidan tersebut tubuh akan terhindar dari kerusakan sel dan jaringan yang dapat memicu terbentuknya sel-sel kanker (Arnelia, 2002; Winarto, 2007).

Tokoferol,  $\alpha$ -tokoferol, dan  $\beta$ -karoten yang terkandung dalam buah merah dapat membantu proses penyembuhan penyakit kanker. Senyawa tersebut bekerja dengan cara menekan dan membunuh sel-sel kanker yang berbahaya. Kehadiran tokoferol pada buah merah sangat berperan dalam memperbaiki sistem kekebalan tubuh. Tokoferol juga mengurangi morbiditas dan mortalitas sel-sel jaringan. Interaksi betakaroten dan tokoferol dengan protein meningkatkan produksi antibodi, hingga meningkatkan jumlah sel pembunuh alami dan memperbanyak aktifitas T *helpers* dan limfosit, sehingga akan menangkal dan mematikan

serangan radikal bebas. Selain itu, buah merah juga mengandung omega-9 dan omega-3 sebagai asam lemak tak jenuh yang dapat memperlancar proses metabolisme karena mudah diserap oleh tubuh (Budi dan Paimin, 2005; Winarto, 2007; Pratiwi, 2009). Asam lemak tersebut berperan sebagai inhibitor pertumbuhan dan perkembangan tumor. Asam lemak yang memiliki lebih dari delapan atom karbon memiliki aktivitas sitolitik yang menyebabkan disrupsi dan disintegrasi sel. Saat asam lemak dimasukkan ke dalam membran inti, asam lemak tersebut akan memicu pemecahan sel. Apabila asam lemak diberikan pada sel tumor dalam konsentrasi tinggi akan menyebabkan lisis sel tumor tersebut, hanya dengan sedikit atau sama sekali tidak terjadi kerusakan pada sel normal (Nursid *et al.*, 2006). Pada penelitian Munim *et al.*, (2006) menunjukkan persentase hewan uji tikus yang mengalami gejala tumor dapat menurun setelah diberikan minyak buah merah.

Berdasarkan hasil pemisahan komponen bioaktif buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) pada penelitian ini menunjukkan bahwa komponen buah merah yang memiliki senyawa paling aktif dengan metode BST terdapat pada fraksi II. Komponen tersebut merupakan senyawa semi-polar yang mengandung  $\beta$ -karoten, tokoferol (vitamin E), asam linolenat, asam oleat, asam stearat dan asam palmitat. Kandungan tersebut merupakan senyawa-senyawa organik yang terdapat pada buah merah, hal ini juga dapat ditunjukkan pada hasil kromatogram dengan deteksi semprot serum (IV) sulfat tampak adanya bercak berwarna *orange* yang menunjukkan bahwa bercak tersebut adanya senyawa organik. Berdasarkan penelitian Budi dan Made (2005) senyawa karoten pada buah merah termasuk ke dalam golongan terpenoid. Senyawa tersebut merupakan senyawa yang

mengandung pigmen warna merah yang bersifat larut dalam lipid serta merupakan salah satu komponen minyak atsiri. Karoten selain berperan dalam proses fotosintesis tumbuhan juga merupakan senyawa yang memberi warna pada bunga maupun buah. Oleh karena itulah bagian teraktif *P. conoideus* Lam. dinyatakan mengandung karoten karena menunjukkan warna merah dan masuk ke dalam golongan senyawa terpenoid, sedangkan tokoferol serta asam-asam lemak merupakan bagian dari golongan steroid (Harborne, 1987).

Selain pada buah merah, terdapat pula jenis lain dari *P. conoideus* Lam. yang saat ini telah banyak dilakukan penelitian baik secara fitokimia maupun farmakologinya, diantaranya adalah buah kuning. Berdasarkan penelitian Budi dan Made (2005) menyatakan bahwa kandungan kimia pada buah merah dan buah kuning tersebut memiliki kesamaan antara jenis senyawa dan manfaatnya, hanya saja pada buah kuning memiliki kandungan senyawa tokoferol yang lebih tinggi dibandingkan dengan buah merah maupun coklat, yaitu sebesar 10400 ppm, sedangkan buah merah hanya mengandung senyawa tokoferol sebesar 9500 ppm dan buah coklat 4500 ppm. Selain itu, buah kuning juga memiliki kandungan rendemen minyak paling tinggi dibandingkan dengan buah merah yaitu sebesar 13,16 %, kadar air sebesar 2,43 %, sedangkan kadar asam lemak bebas sebesar 7,00 % dengan menggunakan proses kering (blender–kukus–pres) (Pohan *et al.*, 2006). Berdasarkan manfaatnya, berbagai jenis buah merah tersebut dapat digunakan sebagai antikanker. Hal ini terkait dengan kandungan senyawa-senyawa antioksidan yang tinggi (tokoferol,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten dan asam-asam lemak tak jenuh). Sebagaimana berdasarkan penelitian buah kuning oleh Pratiwi (2009), menyatakan bahwa hasil pengujian sitotoksitas sari buah kuning

terhadap sel kanker payudara T47D secara *in vitro* menunjukkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 0,25  $\mu\text{L/mL}$ , sehingga berpotensi sebagai antikanker. Pada konsentrasi 0,125  $\mu\text{L/mL}$  telah terbukti efektif dalam penghambatan proliferasi, dengan waktu penggandaan sel T47D lebih lama 1,9 kali. Begitu pula berdasarkan penelitian Hidayati (2010) yang menyatakan bahwa efek sitotoksik buah kuning terhadap sel HeLa, menunjukkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 0,15625  $\mu\text{L/mL}$  dan mampu menghambat laju pertumbuhan sel HeLa menjadi 1,42 kali dibandingkan kontrol dengan waktu penggandaan sel sebesar 32,97 jam pada konsentrasi 0,078125  $\mu\text{L/mL}$ . Oleh karena itu, kemungkinan besar buah merah juga mempunyai pengaruh yang sama secara sitotoksik terhadap sel kanker, hal ini dapat ditunjang dengan hasil skrining menggunakan metode BST pada penelitian ini menunjukkan bahwa nilai  $LC_{50-24\text{jam}}$  lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/mL}$  (138,05  $\mu\text{g/mL}$ ), sehingga berdasarkan Meyer *et al* (1982), hasil tersebut dapat menyatakan bahwa buah merah mempunyai aktivitas antikanker. Oleh karena itu sangat perlu dilakukan peninjauan lebih lanjut efek buah merah terhadap sel kanker. Hal ini terkait dengan kesamaan kandungan senyawa kimia pada buah merah yang sebagian besar bersifat sebagai antioksidan.

## BAB V

### PENUTUP

#### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil uji toksisitas fraksi II dari fraksinasi fraksi larut n-heksan ekstrak etanol buah merah menunjukkan toksisitas paling tinggi terhadap *A. salina* Leach. dengan nilai  $LC_{50-24 \text{ jam}} = 138,05 \mu\text{g/mL}$  sehingga berpotensi untuk diteliti lebih lanjut sebagai kandidat antikanker.
2. Hasil uji toksisitas akut terhadap mencit tidak menunjukkan adanya gejala toksik dan kematian pada semua kelompok perlakuan, sehingga nilai  $LD_{50}$  hanya dapat dinyatakan sebagai  $LD_{50}$  semu yaitu lebih besar dari 7,687 g/kgBB untuk mencit dengan berat badan 25 g yang secara teknis masih bisa dipejankan.

#### B. Saran

1. Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut terhadap fraksi II dari fraksinasi fraksi larut n-heksan ekstrak etanol buah merah untuk mendapatkan senyawa paling toksik terhadap *A. salina* Leach. dan uji sitotoksitasnya.
2. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut toksisitas secara sub kronis dan kronis sediaan uji buah merah terhadap hewan uji mencit galur balb/C jantan untuk mengetahui efek jangka panjang.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abatzopoulos, Th. J., Beardmore, J. A., Clegg, J.S., dan Sorgeloos, P. 1996. *Biology of Aquatic Organism: Artemia-Basic and Applied Biology*. <http://www.captain.at/artemia/> [25 Agustus 2009].
- Ambara. 2007. *Toksisitas Senyawa Kimia*. [http://id.wordpress.com/Toksisitas\\_Senyawa\\_Kimia\\_Biologi.htm](http://id.wordpress.com/Toksisitas_Senyawa_Kimia_Biologi.htm) [26 Juni 2008].
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L., and Suffness, M. 1991. A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochem Analysis* (2): 107-111.
- Angelina, M., Hartati, S., Dewijanti, I.D., Banjarnahor, S.D.S., dan Meilawati, L. 2008. Penentuan LD<sub>50</sub> Daun Cinco (*Cyclea barbata* Miers.) pada Mencit. *Makara Sains*. Vol 12(1): 23-26.
- Anonim. 2007. *Wanita Indonesia Rentan Kena Kanker Rahim*. <http://www.rmexpose.com> [26 Juni 2008].
- Ansel, H.C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi IV, 605-607. Diterjemahkan oleh: Farida Ibrahim. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D dan Lalaoui, K. 2009. Antibacterial Activity Toxicity Effect of Flavonoids Extracted from *Mentha longifolia*. *Journal of Scientific Research*. Vol 4(2): 93-96.
- Ariens, E.J. 1986. *Toksikologi Umum Pengantar*. Diterjemahkan oleh: Wattimena, J.R. Gadjah Mada Univ. Press, Yogyakarta.
- Arnelia. 2002. Fitokimia Komponen Ajaib Cegah PJK, DM dan Kanker. Buletin Pusat Standardisasi dan Akreditasi INFO MUTU. *Berita Standardisasi Mutu dan Keamanan Pangan*. Edisi September 2004.
- Artemia Reference Center. 2007. *Artemia salina - Brine Shrimp - Ses Monkeys*. <http://www.aquaculture.ugent.be/coursmat/artbiol/arc.htm> [26 April 2010].
- Astuti, P., S.Utami, T. Pratiwi, T. Hertiani, G. Alam, A.Tahir dan S.Wahyono. 2005. Antimicrobial Activity Screening of Marine Sponges Extracts Collected from Barang Lomposea. *Journal of Traditional Medicine* (10): 32.
- Backer, C.A. dan B.C. Backhulzen Van Der Brink. 1965. *Flora of Java (Spermatophyta only)*. Vol II. Groningen, NVP Noordhoff. Hal : 285.



- BPOM, 2000. *Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, BPOM, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta.
- Budi, I.M. 2000. Kajian Kandungan Zat Gizi dan Sifat Fisika Kimia Berbagai Jenis Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Hasil Ekstraksi secara Tradisional di Kabupaten Jayawijaya Propinsi Irian Jaya. *Tesis Program Pasca Sarjana*. IPB-Bogor.
- Budi, I.M. dan F.R. Paimin. 2005. *Buah Merah*. Seri Agrisehat. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Brock, D.H.J. 1993. *Molecular for The Clinician*. University Press, Chambridge.
- Carballo, J.L., Inda, Z.L.H, Perez, P, dan Gravalos, M.D.G. 2002. A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect In Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Products. *BMC Biotechnology* 2 (17) : 1-5
- Cutler, S.J. dan Cutler, H.G. 2000. *Biologically Active Natural Product: Pharmaceutical*. CRC Press.
- Coll, J.C. dan B.F. Bowden. 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to The Separation of Terpene Mixtures. *Journal Natural Product*. Vol 49 (5). Hal: 934-936.
- Dachrinus., Oktima.W, dan Stanias J. 2005. 1,7- dihidroksixanton, Senyawa Sitotoksik dari Kulit Batang *Garcinia griffitii*. *Journal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam* 14(1). Hal: 17-21.
- Durham, W.F. 1975. Toxicity in N.I. Sax (ed): *Dangerous Properties of Industrial Materials*. Van Nostrand Reinhold Co. New York.
- Dwiatmaka, Y. 2001. *Identifikasi Simplek dan Toksisitas Akut Secara BST Ekstrak Kulit Batang Pule (Alstonia scholaris)*. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Emslie, S. 2003. *Artemia salina* Leach.-Brine Shrimp-Ses Monkeys. [http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artemia\\_salina.html](http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artemia_salina.html) [21 April 2009].
- Fajarningsih, N.D., Januar, H.I, Nursid, M dan Wikanta, T. 2006. Potensi Antitumor Ekstrak Spons *Crella papilata* Asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol 1 (1): 35-41.
- Gaman, P. M dan K.B. Sherrington. 1990. *The Science of Food: An Introduction to Food Science, Nutrition and Microbiology*. 3 edition. Pergamon Press.

Member of Maxwell Macmillan Pergamon Publishing Corp. Oxford New York Beijing Frankfurt Sao Paulo Sydney Tokyo Toronto.

- Gu, Z.M., Zeng, L., J.T. Schwedler, K.V. Wood dan J.L. McLaughlin. 1995. New Bioactive Adjacent bis-THF Annonaceous Acetogenins from *Annona Bullata*. *Phytochemistry* :40.
- Hadad, M., Atekan, A. Malik, dan D. Wamaer. 2006. Karakteristik dan Potensi Tanaman Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) di Papua. Hal. 243-255. *Prosiding Seminar Nasional BPTP Papua, Jayapura* 24-25 Juli 2006. Bogor: Balai Pengkajian dan pengembangan Teknologi Pertanian.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia* edisi II. ITB Press: Bandung.
- Hegde, K., Thakker. P.S., Joshi. A.B., Shastry. C.S., and Chandrashekhar. K.S. 2009. Anticonvulsant Activity of *Carissa carandas* Linn. Root Extract in Experimental Mice. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*: 8 (2): 117-125
- Hidayati, M.N. 2010. Uji Sitotoksitas Bagian *Pandanus conoideus* Lam. Varietas Buah Kuning Terhadap Pertumbuhan Sel HeLa Secara In Vitro dan Profil Kandungan Kimia Bagian teraktif. *Skripsi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta*.
- Ikawati, M., W.A. Eko, O.N. Sri dan A. Rosa. 2008. Pemanfaatan Benalu sebagai Agen Antikanker. *Journal Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*. Hal:1-8
- Indrayani, L., S. Hartati, dan S. Lydia. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Berkas Penelitian Hayati* (12): 57-61.
- Isnansetyo, A., dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton: Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut*. Cetakan I. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Jiang, Q., J. Wong, H. Fryst, J.D. Saba, dan B.N. Ames. 2004.  $\gamma$ - Tocopherol or Combination of Vitamin E Form Induce Cell Death in Human Prostate Cancer Cell by Interrupting Sphingolipid Synthesis. *PNAS* 101 (51):17825-17830
- Kanwar, A.S. 2007. Brine Shrimp (*Artemia salina*) a Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *Chinese Clinical Medicine* 2 (4): 35-42.
- Lebang, A., Amiruddin, J. Limbongan, G.I. Kore, S. Pambunan, dan Budi.I.M. 2004. *Laporan Usulan Pelepasan Varietas Buah Merah Mbarugum*. Kerja

Sama Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Provinsi Papua dengan Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Provinsi Papua

- Leffingwel, J.C. 2001. *Carotenoid as Flavor and Fragrance Precursors*. <http://www.Leffingwell.com/caroten.html> [3 Agustus 2009].
- Leny, S. 2006. *Isolasi dan Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Pudding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp*. USU Repository. Medan
- Limbongan, J dan Malik, A. 2009. Peluang Pengembangan Buah Merah (*P. Conoideus* Lam.) di Provinsi Papua. *Jurnal Litbang Pertanian*. Vol 28 (4): 134-341
- Loomis, T.A. 1978. *Toksikologi Dasar*. Diterjemahkan oleh : Donatus, I.A., Edisi III. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Mangan, Y. 2005. *Cara Bijak Menaklukkan Kanker*. PT. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- McLaughlin, J.L. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination. *Methods in Plants Biochemistry* 6 (1): 1-30.
- Meiyanto, E., Supardjan, Da'i, M, dan Agustina, D. 2006. Efek Antiproliferatif Pentagamavunon-0 terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. 14 (1) : 011-015
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R, Putnam, J.E, Jacobsen, L.B, Nichols, D.E, dan McLaughlin, J.L, 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica* 45: 31-34.
- Moeljepawiro, S., M. R. Anggelia. D, Ayuningtyas. B, Widaryanti. Y, Sari, dan I. M, Budi. 2007. Pengaruh Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Terhadap Pertumbuhan Sel Kanker Payudara dan Sel kanker Usus Besar. *Berkala Ilmiah Biologi*. Vol 6(2): 121-130.
- Mudjiman, A. 1995. *Makanan Ikan*. Jakarta: PT. Penerbit Swadaya.
- Mukhtar, M.H., A.Z, Adnan dan M.W, Pitra. 2007. Uji Toksisitas Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dengan Metode Uji Brine Shrimp Lethality Bioassay. *Jurnal Sains Teknologi Farmasi*. Vol 12(1): 1-4.
- Mun'im, A., A. Retnosari dan S. Heni. 2006. Uji Hambatan Tumorigenesis Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) terhadap Tikus Putih Betina yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz (a) Antrasen (DMBA). *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 3(3): 153 – 161.

- Murray, R.K., Rand. M.L, dan Harfenist, E.J. 2003. *Biokimia Harper*. Diterjemahkan oleh: dr. Andry Hartono. Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta.
- Nursid, M., W. Thamrin, F.N. Dewi dan M. Endar. 2006. Aktivitas Sitotoksik, Induksi Apoptosis dan Ekspresi Gen p53 Fraksi Metanol Spons *Petrosia cf.nigricans* terhadap Sel Tumor HeLa. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* I (2).
- Okora, L.R.K.S. 2006. Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanan. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol 3(1): 1-7.
- Opinion. 15 Januari 2008. *Artemia, Pakan Alami Berkualitas untuk Ikan dan Udang*. <http://www.opinion.com/MembangunIndonesia.htm> [27 April 2009]
- Padmawinata, K. 1995. *Cara Kromatografi Preparatif*. Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Pelletier, S. W., H. P. Chokshi dan H. K. Desao. 1986. Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures using Vacuum Liquid Chromatography. *J. Nat. Prod.* 49 (5). Hal: 892-900.
- Pieters, L. A. C., dan A. J. Vlietinck. 1989. Vacuum Liquid Chromatography and Quantitative <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy of Tumor Promoting Diterpene Ester. *J. Nat. Prod.* 52 (1). Hal: 186-190.
- Pohan, H. G., N. I., Arie, A. H., Suherman dan Kosasih. 2006. 'Teknologi Ekstraksi dan Karakterisasi Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.)'. Ringkasan Hasil Penelitian dan Pengembangan BBIA
- Pratiwi, A.P. 2009. Uji Sitotoksitas Campuran Ekstrak *Pandanus conoideus* Lam. Varietas Buah Kuning dan Asam Laurat dari VCO terhadap Sel Kanker Payudara T47D secara In Vitro. *Skripsi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta*
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Jakarta: Pustaka Pelajar
- Sadsoeitoboen dan M. Justina. 1999. Pandanaceae: Aspek Botani dan Etnobotani dalam Kehidupan Suku Arfak Irian Jaya. *Tesis*. IPB-Bogor.
- Sambali, H. 1990. *Pengaruh Pemberian Pakan Ragi Roti, Dedak Padi dan Thetraselmis chui Dalam Dosis yang Berbeda Terhadap Prosentase Hidup Artemia*. Fakultas Perikanan Unsrat, Manado.
- Sie, W., G. Yosua, T. Rong, K. Milosh, Y. Raymond dan Y. Yulong . 2006. Bioassay Guided Purification and Identification of Antimicrobial Component in Chinese Green Tea Extract. *Journal of Chromatography* 1125 (2) : 204-210.

- Silva, T.M., Nascimento, R.J., Batista, M.B., Agra, M.F., dan Camara, C.A. 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *solanum* from northeastern brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* (17) Hal: 35-38
- Southwell, K., dan Harris, R. 2006. Chemical Characteristics of *Pandanus conoideus* Lam. Fruit Lipid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58(4): 593-594.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi Dan Mikroskopi*, Diterjemahkan Oleh: Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Sukardiman., R. Abdul dan P.N. Fatma. 2004. Uji Praskrining Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia planiloba* Steph. Dengan Metode Uji Kematian Larva Udang dan Profil Densitometri Ekstrak Aktif. *Majalah Farmasi Airlangga* 4 (3): 97 –100.
- Sunarni., Iskanto dan Suhartinah. 2003. Uji Toksisitas dan Anti Infeksi Ekstrak Etanol Buah *Brucea sumatrana* Roxb. Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. dan *Staphylococcus aureus*. *Biosmart* 5 (4): 65-67.
- Surono, I.S., T. Nishigaki, A. Endaryanto, dan P. Waspodo. 2006. Indonesian Biodiversities from Microbes to Herbal Plants as Potential Functional Food. *J. Fac. Agric* 44(1-2): 23-27.
- Svehla, G. 1985. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Mikro dan Semimikro*. PT. Kalman Media Pustaka, Jakarta
- Thompson ,E.B dan Weil. C.S. 1950. *Drug Bio Screening Fundamental of Drug Evaluation Techniques in Pharmacology*. Graceway Publ. Co., Inc., New York, 87-112.
- Trubus. 2008. *Bukti Ilmiah Buah Merah*. <http://www.trubus.com/bukti-ilmiah-buah-merah.html> [23 April 2009].
- Usman. 2007. Pemanfaatan Pasta Buah Merah sebagai Pakan Alternatif Ayam Buras Periode *Grower*. *Prosiding Seminar Nasional BPTP Papua*, Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian, Bogor. hlm. 238-243
- Verma, R.J., Dave, M, dan Mathuria, N. 2008. A Study on Toxicity of Gasoline and GM-10 on Liver of Mice and it's Amelioration By Black Tea Extract. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. Vol. 65(5): 601-605
- Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Edisi V. Diterjemahkan oleh: Soendani dan Soewardji. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.



- Wahyono, Hakim, L., Nurlaila., Sulistio, M., dan Ilyas, R. 2007. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanolik Terstandar dari Kulit Akar Senggugu (*Clerodendru serratum* L. Moon). *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol 18(1): 1-7.
- Wamaer, D. 2005. *Buah Merah Perlu Diinventarisasi dan Diproteksi*. Tabloid Sinar Tani.
- Wamaer, D dan A. Malik. 2009. Analisis Finansial Pascapanen Buah Merah (*P. conoideus* Lam.). *Jurnal Tambue* . Universitas Moh. Yamin Solok VIII (I): 96-100.
- Wattimena, J.R., dan Siregar. C.J.P. 1986. *Beberapa Aspek Pokok Pengujian Mutu Perbekalan Farmasi*, Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Ditjen POM DepKes RI. –Jica, Jakarta, 63-92.
- Weil, CS. 1975. Tables for Convenient Calculation of Median Effective Dose and Instructions in their use. *Biometric*.
- Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Winarto. 2007. Pengaruh Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) terhadap Gambaran Sel  $\beta$ -Pankreas dan Efek Hipoglikemik Glibenklamid pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar Diabetik. *Tesis Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis Minat Utama Histologi dan Biologi Sel*. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Wolf, G. 2002. The effect of  $\beta$ -carotene on Lung and Skin Carcinogenesis. *Journal Carcinogenesis* 23: 1263-1265.
- Wyeth. 2008. *Antioksidan*. <http://wyethindonesia.com/Antioksidan.html> [11 agustus 2009].
- Yuhono, Y.T. dan A. Malik. 2006. Keragaman Komoditas Buah Merah Panjang (*P. conoideus* Lam.): Teknologi Pendukung Solusi Arah Kebijakannya sebagai Sumber Pendapatan Daerah Papua. Hal: 273-281. *Prosiding Seminar Nasional BPTP Papua 24-25 Juli 2006*. Balai Besar Pengkajian dan pengembangan Teknologi Pertanian, Bogor.
- Zaif. 2008. *Buah Merah (Pandanus conoideus Lam.) Buah Alternatif Penyembuh Penyakit Kanker Rahim*. <http://zaifbio.wordpress.com> [21 April 2009].