

**PENGARUH PELARUT YANG BERBEDA DAN VARIASI DOSIS TERHADAP  
AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK DAUN LINDUR (*Bruguiera  
gymnorrhiza*) PADA VIABILITAS SEL HELA**

**SKRIPSI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh:  
**ISTIQOMAH**  
NIM. 125080300111145



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

**PENGARUH PELARUT YANG BERBEDA DAN VARIASI DOSIS TERHADAP  
AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK DAUN LINDUR (*Bruguiera  
gymnorrhiza*) PADA VIABILITAS SEL HELA**

**SKRIPSI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

Oleh:  
**ISTIQOMAH**  
125080300111145



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PELARUT YANG BERBEDA DAN VARIASI DOSIS TERHADAP  
AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK DAUN LINDUR (*Bruguiera  
gymnorrhiza*) PADA VIABILITAS SEL HELA

Oleh:  
ISTIQOMAH  
125080300111145

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal \_\_\_\_\_  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji 1



Yunita Eka Puspitasari, S.Pi, MP  
NIP. 19840607 201012 2 003  
Tanggal: 12 OCT 2016

menyetujui,

Dosen Pembimbing 1



Dr. Ir. Bambang Budi S., MS  
NIP. 19570119 198601 1 001  
Tanggal: 12 OCT 2016

Dosen Penguji 2



Eko Waluyo, S.Pi, M.Sc  
NIP. 19800424 2005001 1 001  
Tanggal: 12 OCT 2016

Dosen Pembimbing 2



Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP  
NIP. 19581231 198601 2 002  
Tanggal: 12 OCT 2016



Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP  
Dr. Ir. Arning Wilulung Ekawati, MS  
NIP. 19620805 1986603 2 001  
Tanggal 12 OCT 2016

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, Juli 2016  
Mahasiswa

Istiqomah  
NIM. 125080300111145

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyadari bahwa banyak sekali pihak yang telah turut memberikan dukungan serta bantuan dalam penyelesaian laporan skripsi ini. Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah YHE yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-nya kepada penulis yang begitu luar biasa
2. Bapak Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS selaku dosen pembimbing I dan ibu Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing dan mendidik penulis dalam menyempurnakan dan pembelajaran selama menyelesaikan penelitian dan laporan skripsi ini.
3. Ibu Yunita Eka Puspitasari, S.Pi, MP selaku dosen penguji I dan bapak Eko Waluyo, S.Pi, M.Sc selaku dosen penguji II yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun demi kebaikan penulis.
4. Mbak Bunga selaku laboran Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu dalam melaksanakan penelitian ini.
5. Terimakasih dan sujud syukur yang terdalam saya persembahkan penelitian dan laporan skripsi ini kepada ibu tercinta Siti Nurhayati dan ayah tercinta Tukri yang tak pernah lupa memberikan doa dan semangat dalam pendidikan yang saya tempuh.
6. Terimakasih kepada team penelitian skripsi yenny, tiara, alfian, indra, deny, nanda, dias, rete, diana, ida dan semua teman satu bimbingan yang selalu berjuang menyelesaikan penelitian hingga penulisan laporan.

7. Sahabat terbaik etika, isti, yatul, iis, astrid, nita, sayidatul serta seluruh warga THP 2012 yang selalu membantu, memberi dukungan semangat dan bersama-sama berjuang mendapatkan gelar sarjana.
8. Keluarga besarku di malang ruli, titik, iyem, arum, ainur, mbak lote, umek, serta seluruh penghuni kos Gajayana 107 yang selalu memberi semangat dan dorongan hingga selesainya laporan penelitian ini.
9. Dan kepada pihak-pihak lain yang telah begitu banyak membantu namun tidak dapat disebutkan satu persatu.

Terimakasih penulis sampaikan kepada pihak yang telah memberikan bantuan, dukungan serta semangat sehingga laporan skripsi ini dapat selesai tepat pada waktunya. Semoga Allah YME selalu melimpahkan rizki yang berkah dan rahmat bagi kita semua dan menjadi amal ibadah yang baik. AMIN.

Malang, September 2016

Istiqomah

## RINGKASAN

**ISTIQOMAH.** Skripsi. Pengaruh Pelarut Yang Berbeda dan Variasi Dosis Terhadap Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) Pada Viabilitas Sel Hela. (Dibawah Bimbingan Dr. Ir. Bambang Budi Sasmita, MS dan Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP).

---

---

Kanker merupakan pembentukan jaringan baru yang abnormal dan bersifat ganas. Kanker yang banyak diderita oleh wanita di dunia yaitu kanker sel leher rahim (kanker serviks). Kanker serviks adalah salah satu kanker yang terjadi akibat infeksi Human Papilomavirus (HPV 18) sehingga menyebabkan perbedaan sifat dengan sel leher rahim normal. Salah satu turunan dari sel kanker leher rahim yaitu sel Hela. Sel Hela merupakan sel kanker yang diperbanyak dengan kultur. Banyak pengobatan alternatif yang telah dilakukan termasuk dengan menggunakan tanaman herbal. Daun mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* diketahui memiliki senyawa bioaktif yang dapat dijadikan sebagai agen antikanker seperti triterpenoid, steroid dan polifenol. Penelitian ini menggunakan pelarut yang berbeda pada saat ekstraksi dengan tujuan untuk memisahkan ekstrak sesuai dengan kepolarannya agar senyawa-senyawa nonpolar sampai polar terekstraksi semua.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut yang digunakan, pengaruh variasi dosis yang digunakan dan kombinasi jenis pelarut dan variasi dosis yang digunakan terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hidrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Reproduksi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Pusat Penelitian Kimia - LIPI, Serpong pada bulan Februari-Juni 2016.

Penelitian ini menggunakan penelitian pendahuluan untuk menentukan bagian daun, kulit batang atau buah *Bruguiera gymnorrhiza* yang akan digunakan pada penelitian utama. Setelah diperoleh hasil yaitu bagian daun *Bruguiera gymnorrhiza*, kemudian dilanjutkan pada penelitian utama. Prosedur penelitian pada penelitian utama yaitu dilakukan ekstraksi daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan metode ekstraksi maserasi bertingkat menggunakan 3 pelarut yaitu n-heksan, etil asetat dan metanol. Setelah didapatkan ekstrak kental dari setiap pelarut, kemudian dilakukan serangkaian uji sebagai data pendukung pada penelitian utama. Uji-uji tersebut meliputi uji kadar air, uji fitokimia, uji total fenol dan uji toksisitas. Setelah dilakukan serangkaian uji pendukung, kemudian dilanjutkan dengan uji viabilitas sel Hela sebagai uji utama pada penelitian ini. Setelah didapatkan ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan pelarut yang memiliki viabilitas sel Hela paling rendah, kemudian ekstrak tersebut dilakukan uji LCMS untuk mengetahui senyawa dugaan yang bersifat sebagai antikanker pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza*.

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen dengan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 3 perlakuan yaitu pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol dengan variasi dosis 31,25 ppm, 62,5

ppm, 125 ppm, 250 ppm dan 500 ppm. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan *Analisis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Uji Duncan.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan jenis pelarut berbeda memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel Hela. Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan pelarut n-heksan memiliki persen viabilitas terendah yaitu 14,845%. Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan variasi dosis memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel Hela. Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan dosis 500 ppm diketahui efektif dalam mematikan sel Hela. Kombinasi antara jenis pelarut dan variasi dosis ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel Hela. Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pelarut n-heksan pada dosis 500 ppm diketahui efektif dalam mematikan sel Hela.

Saran untuk penelitian ini ialah perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan sampel ekstrak yang dimurnikan misalnya dengan cara dipartisi dan fraksinasi, serta dilakukan uji induksi apoptosis untuk mengetahui morfologi sel Hela setelah diberikan perlakuan pemberian ekstrak.

**Kata Kunci : Kanker serviks (sel Hela), Daun *Bruguiera gymnorrhiza*, Perbedaan Pelarut, Viabilitas**



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas segala rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang judul “Pengaruh Pelarut Yang Berbeda dan Variasi Dosis Terhadap Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) Pada Viabilitas Sel Hela”. Laporan skripsi ini berisi tentang Pendahuluan, Tinjauan Pustaka, Metode Penelitian, Hasil dan Pembahasan serta Kesimpulan dan saran. Pada penyusunannya, penulis banyak mengambil literatur - literatur yang bersumber dari buku teks, artikel, jurnal untuk dijadikan tinjauan pustaka yang dapat mendukung pembuatan laporan tersebut.

Penulis menyadari dalam laporan skripsi ini tentunya ada kekurangan, maka diharapkan kritik dan saran sehingga dapat menjadi lebih sempurna. Semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis pada khususnya, dan bagi pembaca pada umumnya terutama untuk mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Malang, 2016

penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>i</b>
<b>UCAPAN TERIMAKASIH</b> .....	<b>ii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Kegunaan.....	4
1.6 Jadwal Pelaksanaan.....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Mangrove.....	5
2.1.1. Klasifikasi dan Morfologi <i>Bruguiera gymnorhiza</i> .....	5
2.2 Senyawa Bioaktif <i>Bruguiera gymnorhiza</i> .....	6
2.2.1. Flavonoid.....	7
2.2.2. Alkaloid.....	7
2.2.3. Steroid.....	8
2.2.4. Terpenoid.....	8
2.2.5. Saponin.....	9
2.2.6. Tanin.....	9
2.3 Ekstraksi.....	10
2.3.1. N-heksan.....	11
2.3.2. Etil Asetat.....	12
2.3.3. Metanol.....	12
2.4 Fitokimia.....	13
2.5 Total Fenol.....	13
2.6 Toksisitas <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> .....	14
2.7 Kanker Serviks.....	15
2.8 Sel Hela.....	16
2.9 <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)</i> .....	17
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>18</b>
3.1. Bahan Dan Alat Penelitian.....	18
3.1.1. Bahan Penelitian.....	18
3.1.2. Alat Penelitian.....	18

3.2.	Metode Penelitian .....	19
3.3.	Penelitian Pendahuluan .....	19
3.4.	Prosedur Penelitian Utama .....	20
3.4.1.	Proses Ekstraksi .....	20
3.4.2.	Uji Kadar Air .....	23
3.4.3.	Uji Fitokimia .....	24
3.4.4.	Uji Total Fenol .....	25
3.4.5.	Uji Toksisitas .....	26
3.4.6.	Uji Viabilitas Sel Hela .....	27
3.4.7.	Uji <i>Liquid Chromatograph Mass Spectrometry</i> (LCMS) .....	31
3.5.	Rancangan Percobaan .....	32
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>34</b>
4.1.	Ekstrak Daun <i>Bruguiera gymnorhiza</i> .....	34
4.2.	Hasil Uji Kadar Air .....	35
4.3.	Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun <i>Bruguiera gymnorhiza</i> .....	35
4.4.	Hasil Uji Total Fenol Ekstrak Daun <i>Bruguiera gymnorhiza</i> .....	37
4.5.	Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Daun <i>Bruguiera gymnorhiza</i> .....	38
4.6.	Hasil Uji Sitoksisitas Ekstrak Daun <i>Bruguiera gymnorhiza</i> .....	39
4.6.1.	Pengaruh Perbedaan Pelarut Dan Variasi Dosis Terhadap Viabilitas Sel Hela .....	40
4.6.2.	Pengaruh Perbedaan Pelarut Dan Variasi Dosis Terhadap Mortalitas Sel Hela .....	42
4.7.	Hasil <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LCMS) .....	44
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>48</b>
5.1	Kesimpulan .....	48
5.2	Saran .....	48
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>55</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> .....	6
Gambar 2. Proses Ekstraksi .....	22
Gambar 3. Proses Uji Kadar Air.....	23
Gambar 4. Proses <i>thawing freezing</i> sel Hela .....	28
Gambar 5. Uji Sitotoksitas Metode MTT Assay .....	30
Gambar 6. Sel Hela paparan ekstrak n-heksan dosis 250 ppm.....	39
Gambar 7. Grafik Persen Viabilitas Sel Hela.....	41
Gambar 8. Grafik Persen Mortalitas Sel Hela .....	43
Gambar 9. a) Hasil kromatografi LC. b) Spektrum massa waktu retensi ke-1 (Rt. 2.42). c) Spektrum massa waktu retensi ke-2 (Rt. 3.24) .....	45
Gambar 10. Struktur Kimia Senyawa Kumarin.....	46
Gambar 11. Struktur Kimia Senyawa Bergapten.....	47



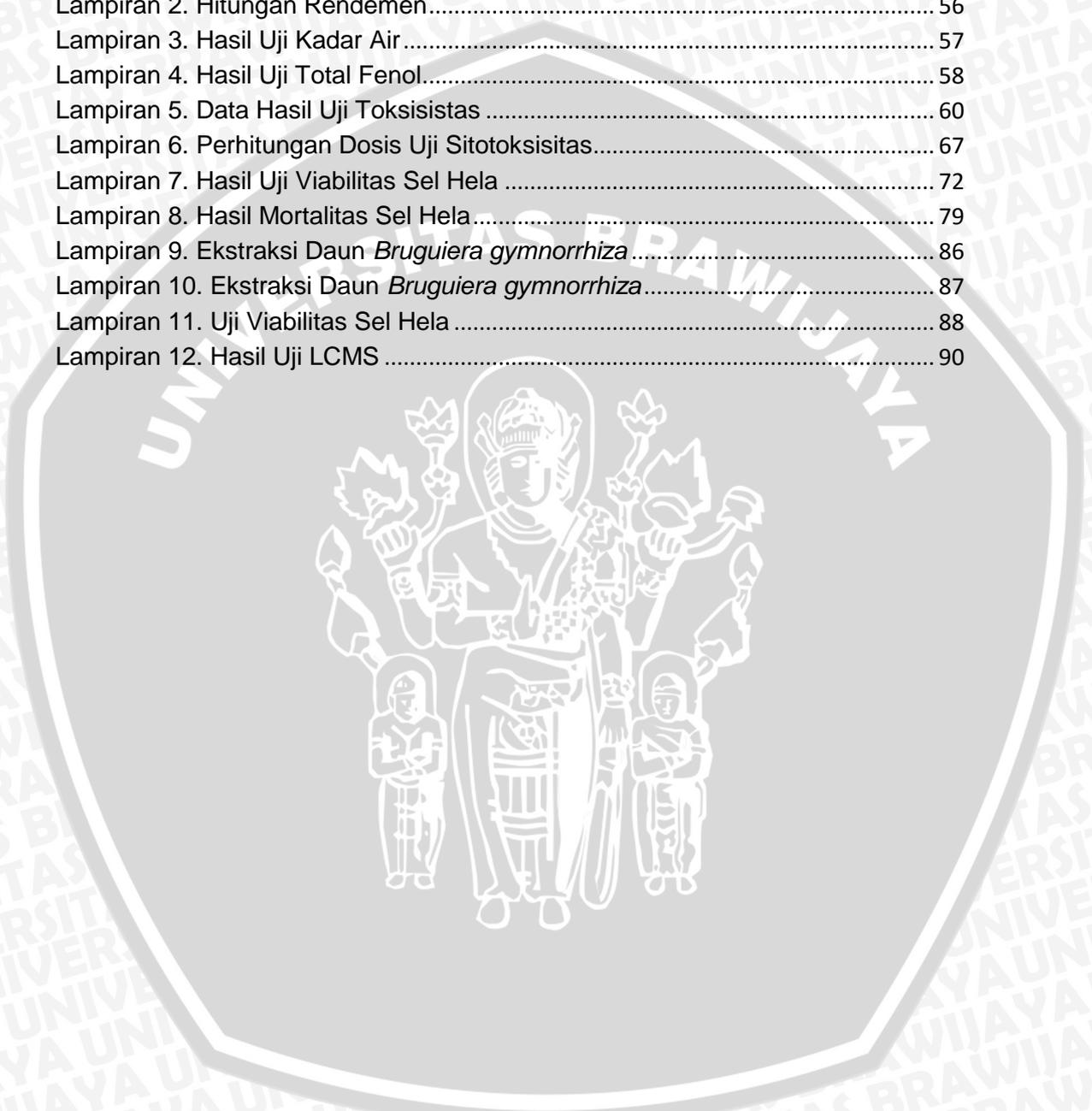
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Sifat-sifat N-heksan .....	11
Tabel 2. Sifat-sifat Etil Asetat .....	12
Tabel 3. Sifat-sifat Metanol .....	13
Tabel 4. Rancangan Percobaan .....	32
Tabel 5. Data rendemen ekstrak daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> .....	34
Tabel 6. Data kadar air ekstrak daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> .....	35
Tabel 7. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> .....	36
Tabel 8. Kandungan total fenol ekstrak daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> .....	37
Tabel 9. Hasil Uji Toksisitas .....	38



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Penelitian Pendahuluan .....	55
Lampiran 2. Hitungan Rendemen.....	56
Lampiran 3. Hasil Uji Kadar Air .....	57
Lampiran 4. Hasil Uji Total Fenol.....	58
Lampiran 5. Data Hasil Uji Toksisitas .....	60
Lampiran 6. Perhitungan Dosis Uji Sitotoksisitas.....	67
Lampiran 7. Hasil Uji Viabilitas Sel Hela .....	72
Lampiran 8. Hasil Mortalitas Sel Hela.....	79
Lampiran 9. Ekstraksi Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> .....	86
Lampiran 10. Ekstraksi Daun <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> .....	87
Lampiran 11. Uji Viabilitas Sel Hela .....	88
Lampiran 12. Hasil Uji LCMS .....	90



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker atau karsinoma adalah pembentukan jaringan baru yang abnormal dan bersifat ganas (*maligne*). Suatu kelompok sel yang tiba-tiba menjadi liar dan memperbanyak diri secara pesat dan terus menerus (*proliferasi*). Kanker terbentuk karena adanya mutasi pada biosintesis sel, yaitu kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi atau ada pengaturan kembali. Kemampuan sel-sel tersebut dapat menyerang jaringan biologis lainnya, baik ditempat yang jauh (*metastasis*). Macam-macam kanker yang dapat menyerang manusia salah satunya adalah kanker serviks (Huspa, 2009).

Salah satu sel kanker turunan dari sel epitel rahim (*cervix*) manusia yaitu adalah Sel Hela (Djajanegara dan wahyudi, 2009). Menurut Puji *et al.* (2011), sel kanker leher rahim (sel Hela) terjadi akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Kedua onkogen tersebut merupakan protein yang dapat menghambat ekspresi gen p53 sebagai gen penekan kanker. Pada peristiwa ini onkogen lebih tinggi dibandingkan p53 sehingga proliferasi sel kanker menjadi tidak terkendali.

Indonesia memiliki kurang lebih 30.000 spesies tumbuhan dan 940 spesies merupakan tumbuhan berkasiat obat yang dapat dijadikan sumber isolat jamur endofit. Dimana salah satu tumbuhan tersebut adalah mangrove (Phoanda *et al.*, 2014). Spesies mangrove sejati tumbuh subur di Indonesia antara lain *Avecenia alba*, *Rhizophora apiculata*, *Xylocarpus ganatum*, *Bruguiera parviflora* dan *Bruguiera gymnorrhiza* (Subekti, 2012). *Bruguiera gymnorrhiza* merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai sumber senyawa

bioaktif. Daun tanaman ini mengandung flavonoid, steroid, triterpenoid, tanin dan senyawa fenol yang hingga kini masih masih diteliti ragam kegunaannya sebagai antioksidan, antikanker, antibakteri dan anti inflamasi (Dia *et al.*, 2015).

Warsinah *et al.* (2007), menyatakan *Bruguiera gymnorrhiza* merupakan salah satu tanaman yang mempunyai potensi antitumor. Pada hasil penelitiannya ekstrak etanol kulit batang tanaman mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* secara *in vitro* mampu menghambat pertumbuhan sel kanker Hela dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 301,78  $\mu\text{g/mL}$  dan sel Myeloma dengan  $LC_{50}$  sebesar 582,00  $\mu\text{g/mL}$  dan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit batang *Bruguiera gymnorrhiza* adalah terpenoid.

Berdasarkan dari penjelasan sebelumnya, tidak menutup kemungkinan daun *Bruguiera gymnorrhiza* memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker. Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi bertingkat dengan pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-Heksan (non polar), etil asetat (semi polar) dan metanol (polar). Perbedaan pelarut dimaksudkan untuk melebarkan jangkauan kepolaran agar senyawa-senyawa non polar sampai polar terekstraksi semua (Harborne, 1987).

Sakul *et al.* (2012), menyatakan pelarut n-heksan mempunyai sifat non polar, sehingga pada ekstraksi hanya dapat menarik senyawa non polar yang mengandung minyak dan lemak seperti triterpenoid dan steroid. Menurut Putri *et al.* (2014), etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karena dapat dengan mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah. Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon. Pane (2013), menyatakan pelarut metanol merupakan pelarut yang banyak digunakan untuk ekstraksi senyawa-senyawa organik, karena metanol dapat mengikat senyawa yang bersifat polar.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut dan variasi dosis terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel hela. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan dalam rangka pengembangan pengobatan tradisional dari tanaman.

## 1.2 Perumusan Masalah

Adapun perumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Apakah jenis pelarut berpengaruh terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela?
2. Apakah variasi dosis berpengaruh terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela?
3. Apakah kombinasi jenis pelarut dan variasi dosis memberikan pengaruh terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela?

## 1.3 Tujuan

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh jenis pelarut terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela
2. Mengetahui pengaruh variasi dosis terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela
3. Mengetahui kombinasi pengaruh jenis pelarut dan variasi dosis terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela

#### 1.4 Hipotesis

- H1:
- jenis pelarut yang berbeda memberikan pengaruh terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela
  - variasi dosis memberikan pengaruh terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela
  - kombinasi pelarut dan variasi dosis memberikan pengaruh terhadap aktivitas antikanker ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pada viabilitas sel Hela

#### 1.5 Kegunaan

Kegunaan dari penelitian ini yaitu untuk meningkatkan kegunaan dari daun mangrove lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) yang dapat digunakan sebagai bahan pengobatan tradisional terkait kandungan senyawa bioaktif didalamnya sebagai senyawa antikanker.

#### 1.6 Jadwal Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Hidrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Reproduksi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Pusat Penelitian Kimia - LIPI, Serpong. Waktu pelaksanaan penelitian pada bulan Februari-Juni 2016.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mangrove

Mangrove merupakan vegetasi hutan yang tumbuh diantara pasang surut, tetapi juga dapat hidup pada pantai karang, pada dataran koral mati yang di atasnya ditimbuni selaput tipis pasir atau ditimbuni lumpur atau pantai berlumpur. Komunitas mangrove Indonesia memiliki keanekaragaman hayati tertinggi di dunia. Sekitar 89 jenis spesies mangrove yang tumbuh didunia, sekitar 51% spesies hidup di Indonesia (Subekti, 2012). Jenis mangrove yang banyak ditemukan di Indonesia antara lain adalah jenis api-api (*Avicennia* sp.), bakau (*Rhizophora* sp.), tanjang/ lindur (*Bruguiera* sp.), dan bogem atau pedada (*Sonneratia* sp.) yang merupakan tumbuhan mangrove utama. Daun tanaman ini mengandung saponin, alkaloid, flavonoid, senyawa polifenol yang hingga kini masi diteliti aktifitasnya sebagai antikanker (Warsinah *et al.*, 2007).

Mangrove mempunyai banyak sekali manfaat yang bersinggungan langsung dengan kehidupan manusia di daratan, mulai dari manfaat ekologi sampai dengan sumber pangan dan obat. Ekstrak dan bahan mentah dari mangrove telah banyak digunakan masyarakat pesisir untuk keperluan obat-obatan alamiah. Mangrove kaya akan senyawa steroid, saponin, flavonoid, dan tanin (Purnobasuki, 2004).

#### 2.1.1. Klasifikasi dan Morfologi *Bruguiera gymnorhiza*

*Bruguiera gymnorhiza* merupakan jenis mangrove yang dominan pada hutan mangrove. Tumbuh di salinitas rendah dan kering, serta tanah yang memiliki aerasi yang baik. Pohonnya selalu hijau dengan ketinggian kadang-kadang mencapai 30 m. Akar seperti papan melebar ke samping di bagian pangkal pohon, juga memiliki sebagian akar lutut. Daun berkulit, berwarna hijau

pada lapisan atas dan hijau kekuningan pada bagian bawahnya dengan bercak hitam (ada juga yang tidak). Bentuk elips sampai elips-lanset ujung meruncing. Bunga bergelantung di ketiak daun (Noor *et al.*, 2012).

Menurut Zulaidah dan Subekti (2015), klasifikasi mangrove *Bruguiera gymnorhiza* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Magnoliophyta  
Kelas : Magnoliopsida  
Ordo : Myrtales  
Famili : Rhizophoraceae  
Genus : *Bruguiera*  
Spesies : *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lamk.



Gambar 1. Daun *Bruguiera gymnorhiza*  
Sumber: (Noor *et al.*, 2012)

## 2.2 Senyawa Bioaktif *Brueguira gymnorhiza*

Senyawa bioaktif yang terkandung dalam *Bruguiera gymnorhiza* antara lain flavonoid, alkaloid, steroid, terpenoid, saponin dan tanin. Dia *et al.*, (2015) menyatakan, dari hasil penelitiannya ekstrak daun *Bruguiera gymnorhiza* dengan pelarut yang berbeda terdeteksi komponen bioaktif flavonoid, tanin, fenol, terpenoid, steroid dan saponin.

### 2.2.1. Flavonoid

Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu dan biru dan sebagai zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuhan. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzen ( $C_6$ ) terikat pada suatu rantai propana ( $C_3$ ) sehingga membentuk suatu susunan  $C_6-C_3-C_6$  (Lenny, 2006).

Flavonoid memiliki gugus hidroksi berkedudukan orto jika bereaksi dengan asam borat akan berfluoresensi kuning intensif dibawah sinar ultra violet dengan panjang gelombang 366 nm. Flavonoid mempunyai tipe yang beragam dan terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) maupun terikat sebagai glikosida. Flavonoid umumnya memiliki ikatan dengan gugus gula yang menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air atau pelarut polar (Artini *et al.*, 2013)

### 2.2.2. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat basa dan mengandung unsur nitrogen heterosiklik. Alkaloid juga memiliki struktur molekul yang kompleks serta mempunyai aktivitas farmakologi (Huspa, 2009). Pada umumnya senyawa ini mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam struktur gabungan atom nitrogen sebagai bagian dari sistem siklik (Harborne, 1984).

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuhan-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosilik (Lenny, 2006). Menurut Astarina *et al.* (2013), alkaloid dapat ditemukan dalam

berbagai bagian tanaman, tetapi sering kali kadar alkaloid dalam jaringan tumbuhan kurang dari 1%. Hal ini yang dapat menyebabkan uji alkaloid memberikan hasil yang negatif.

### 2.2.3. Steroid

Steroid adalah molekul kompleks yang larut dalam lemak dengan 4 cincin yang saling bergabung. Steroid yang paling banyak adalah sterol yang merupakan steroid alkohol. Kolesterol merupakan sterol utama pada jaringan hewan. Kolesterol dan senyawa turunan esternya, dengan lemaknya yang berantai panjang adalah komponen penting dari plasma lipoprotein dan dari membran sel sebelah luar. Membran sel tumbuhan mengandung jenis sterol lain terutama stigmasterol yang berbeda dari kolesterol hanya dalam ikatan ganda diantara karbon 22 dan 23 (Putranti, 2013).

Senyawa steroid memiliki bioaktivitas yang penting, misalnya dalam pembentukan struktur membran, pembentukan hormon dan vitamin D, sebagai penolak dan penarik serangga dan sebagai antimikroba. Senyawa steroid di alam terdapat pada hewan dan tumbuhan. Steroid merupakan salah satu senyawa penting dalam bidang medis (Susilawati *et al.*, 2013).

### 2.2.4. Terpenoid

Terpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C<sub>30</sub> asiklik, yaitu skualena. Terpenoid merupakan senyawa tanpa warna, berbentuk kristal, sering kali mempunyai titik leleh tinggi dan aktif optik yang umumnya sukar dicirikan karena tak ada kereaktifan kimianya (Harborne, 1987).

Sebagian besar terpenoid mempunyai kerangka karbon yang dibangun oleh dua atau lebih unit C-5 yang disebut unit isopren unit C-5 ini dinamakan

demikian karena kerangka karbonnya sama seperti senyawa isopren (Lenny, 2006). Triterpenoid memiliki struktur siklik yang relatif kompleks dan kebanyakan merupakan alkohol, aldehid atau asam karboksilat. Komponen triterpenoid dan turunannya terdapat pada lapisan lilin daun tanaman (Sirait, 2007).

#### 2.2.5. Saponin

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol yang telah terdeteksi dalam lebih dari 90 genus pada tumbuhan. Banyak saponin yang mempunyai satuan gula sampai 5 dan komponen yang umum ialah asam glukuronat. Adanya saponin dalam tumbuhan ditunjukkan dengan pembentukan busa yang mantap sewaktu mengekstraksi tumbuhan atau memekatkan ekstrak (Harbone, 1987).

Saponin merupakan bentuk glikosida dari sapogenin sehingga akan bersifat polar. Saponin adalah senyawa yang bersifat aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dalam air. Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Senyawa saponin tersebut akan cenderung tertarik oleh pelarut yang bersifat semi polar seperti metanol (Astarina *et al.*, 2013).

#### 2.2.6. Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa polifenol yang sifatnya polar, dapat larut dalam gliserol, alkohol dan hidroalkoholik, air dan aseton, tetapi tidak larut dalam kloroform, protelium eter dan benzene. Struktur senyawa tanin tersusun atas atom-atom yang berbeda dan tanin memiliki momen dipol tidak sama dengan nol ( $\mu \neq 0$ ) yang menyebabkan tanin bersifat polar, sehingga harus dilarutkan dengan pelarut yang bersifat polar (Lestari *et al.*, 2014).

Tanin secara ilmiah didefinisikan sebagai senyawa polifenol yang mempunyai berat molekul tinggi dan mempunyai gugus hidroksil dan gugus lainnya (seperti alkohol) sehingga dapat membentuk kompleks dengan protein dan makromolekul lainnya dibawah kondisi lingkungan tertentu. Tanin digunakan sebagai zat pewarna, bahan pengawet minuman dan bahan baku pembuatan obat-obatan (Danarto *et al.*, 2011).

Warsinah *et al.* (2007) mengatakan, daun *Bruguiera gymnorrhiza* merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker. Daun tanaman ini mengandung saponin, alkaloid, flavonoid dan senyawa polifenol. Secara sinergis senyawa tersebut mampu menghambat *cell cycle progression* dari sel Hela.

### 2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu metode yang digunakan bertujuan untuk suatu komponen atau suatu senyawa dari campurannya dengan menggunakan suatu bahan pelarut (solven) yang mampu memisahkan senyawa yang diinginkan. Proses pemisahan dengan cara ekstraksi terdiri dari tiga langkah yaitu proses pencampuran bahan dengan pelarut, proses pembentukan fase seimbang, dan ketiga proses pemisahan kedua fase seimbang. Pelarut yang digunakan harus sesuai dengan sifat senyawa yang akan diekstraksi agar proses ekstraksi lebih maksimal (Maulida dan Zulkarnaen, 2010).

Prinsip dari ekstraksi adalah memisahkan komponen yang terdapat pada bahan yang akan diekstraksi dengan menggunakan pelarut tertentu. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut dilakukan dengan mencampurkan bahan yang akan diekstraksi dengan pelarut yang digunakan selama waktu tertentu. Kemudian dilanjutkan dengan penyaringan bertujuan untuk memisahkan filtrat dengan residu bahan yang diekstrak (Septiana dan Asnani, 2012).

Ekstraksi menggunakan metode maserasi merupakan metode ekstraksi yang mudah dan sederhana dengan hasil yang baik (Sari *et al.*, 2012). Proses maserasi dengan perendaman pelarut dalam suhu ruang dapat mengekstraksi senyawa alami bahan akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel yang menyebabkan dinding sel serta membran sel terpecah. Setelah dinding sel dan membran sel pecah kemudian senyawa metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan ikut terlarut dalam pelarut organik yang digunakan (Hijaz, 2009). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi bertingkat dengan pelarut N-heksan, etil asetat dan metanol. Penggunaan pelarut yang berbeda dimaksudkan untuk mendapatkan atau memisahkan ekstrak tumbuhan berdasarkan sifat kepolarannya (Diastuti dan Suwandri, 2009).

### 2.3.1. N-heksan

Heksana merupakan senyawa hidrokarbon alkana, rumus kimia dari senyawa ini adalah  $C_6H_{14}$  isomer utama n-heksana memiliki rumus  $CH_3(CH_2)_4CH_3$ . Penamaan senyawa ini diawali dengan *heks-* mengacu pada struktur yang mengandung enam karbon atom pada heksana. Akhiran *-ana* berasal dari *alkana* yang mengacu pada ikatan tunggal penghubung antara atom-atom karbon tersebut. Sifat dari n-heksan adalah non polar (Maulida dan Zulkarnaen, 2010).

Tabel 1. Sifat-sifat N-heksan

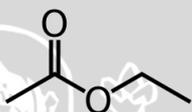
Karakteristik	Keterangan
Nama	Heksana
Rumus molekul	$C_6H_{14}$
Struktur molekul	
Berat molekul	86, 2 g/mol
Bentuk warna	Tak berwarna
Densitas	0,6603 g/ml
Titik lebur	-95°C (-139°F)
Titik leleh	69°C (156°F)

Sumber: (Munawaroh dan Handayani, 2010)

### 2.3.2. Etil Asetat

Etil asetat merupakan pelarut bersifat semipolar, apabila pelarut ini digunakan pada saat ekstraksi senyawa yang bersifat polar menengah akan larut. Pelarut ini merupakan senyawa organik yang mempunyai rumus kimia  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ . Etil asetat yaitu senyawa yang tergolong ester dari etanol dan asam asetat. Pelarut ini bersifat polar menengah maka mudah menguap, tidak beracun dan tidak higroskopis (Kumala, 2013).

Tabel 2. Sifat-sifat Etil Asetat

Karakteristik	Keterangan
Nama	Etil asetat
Rumus molekul	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$
Struktur molekul	
Berat molekul	88,11 g/mol
Bentuk fisik	Cairan tidak berwarna
Titik didih	77,1°C
Titik lebur	-84°C
Densitas	0,9003 <sup>20</sup> g/cm <sup>3</sup>
kelarutan	Larut dalam air, miisibel dalam etanol, dan dietil eter, larut dalam aseton dan benzene

Sumber: BPOM (2011)

### 2.3.3. Metanol

Metanol atau metil alkohol merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Metanol digunakan sebagai bahan pendingin anti beku, pelarut, bahan bakar dan sebagai bahan additif bagi etanol industri. Metanol diproduksi secara alami oleh metabolisme anaerobik oleh bakteri. Hasil proses tersebut adalah uap metanol (dalam jumlah kecil) diudara (Hikmah dan Zuliyana, 2010). Pane (2013), menyatakan pelarut metanol merupakan pelarut yang banyak digunakan untuk ekstraksi senyawa-senyawa organik, karena metanol dapat mengikat senyawa yang bersifat polar.

Tabel 3. Sifat-sifat Metanol

Karakteristik	Keterangan
Nama	Metanol
Sinonim	Metil alkohol ( <i>Methyl alcohol</i> )
Rumus molekul	CH <sub>4</sub> ; CH <sub>3</sub> OH
Struktur molekul	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$
Massa molekul	32,04 g/mol
Wujud cairan	tidak berwarna
Specific gravity	0,7918
Titik leleh	-97°C, -142,9°F (176 K)
Titik didih	64,7°C, 148,4°F (337,8 K)
Kelarutan dalam air	Sangat larut
Keasaman (pKa)	-15,5

Sumber: (Perry dan Green, 1984)

## 2.4 Fitokimia

Fitokimia merupakan senyawa kimia yang terdapat dalam suatu simplisia tumbuhan. Uji fitokimia dapat digunakan untuk membuktikan ada tidaknya senyawa kimia tertentu dalam tumbuhan untuk dapat dikaitkan dengan aktivitas biologinya sehingga dapat membantu langkah-langkah fitofarmakologi (Artini *et al.*, 2013).

Uji fitokimia dilakukan juga untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dari suatu organisme. Para peneliti yang telah melakukan uji fitokimia mengungkapkan bahwa terdapat tingginya keragaman dari metabolit sekunder yang berasal dari tanaman. Keragaman yang ditemukan terdiri dari 21.000 alkaloid, 700 asam amino, 200 glukosida cyanogenic dan glucosinolates, 20.000 terpenoid, 10.000 polifenol, 1.500 polyacetyletes dan asam lemak (Wink, 2013).

## 2.5 Total Fenol

Fenol adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mengandung cincin aromatik dengan satu atau 2 gugus hidroksil. Fenol cenderung mudah larut dalam air karena berikatan dengan gula sebagai glikosida atau terdapat

dalam vakuola sel (Harborne, 1987). Fenolik adalah bagian dari metabolit sekunder yang melimpah di jaringan tumbuhan. Polifenol mempunyai sifat antioksidan yang kuat dan dapat mencegah stress oksidatif yang berhubungan dengan penyakit kanker yang disebabkan oleh radikal bebas yang merusak sel, kondisi patologis dan kematian sel. Polifenol sebagai antioksidan memiliki beberapa tindakan biologis tertentu dalam mencegah atau mengobati penyakit (Dai, 2010).

Pengujian total fenol bertujuan untuk menentukan total senyawa fenolik yang terkandung didalam sampel, sehingga diduga bila kandungan senyawa fenolik didalam sampel tinggi maka aktivitas antioksidannya akan tinggi. Analisis ini menggunakan kurva standar yang dipersiapkan dengan menggunakan asam galat (Djapiala *et al.*, 2013).

## 2.6 Toksisitas *Brine Shrimp Lethality Test*

Uji toksisitas dimaksudkan untuk memaparkan adanya efek toksik dan menilai batas keamanan suatu senyawa. Pengukuran toksisitas dapat ditentukan secara kuantitatif yang menyatakan tingkat keamanan dan tingkat berbahaya zat tersebut (Baraja, 2008).

*Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode uji praskrining atau pendahuluan untuk mendapatkan aktivitas biologis yang sederhana untuk menentukan tingkat toksisitas akut suatu senyawa atau ekstrak dengan menggunakan *Artemia salina* sebagai hewan uji. *Artemia salina* yang digunakan berada pada tahap nauplii atau tahap larva. Hal ini dikarenakan *Artemia salina* pada tahap nauplii sangat mirip dengan sel manusia (Meyer, 1982). Metode BSLT sering digunakan dalam memandu pencarian senyawa antikanker yang berasal dari tumbuhan. Metode ini merupakan metode biossay yang cepat, murah, dapat dipercaya dan hasil yang diperoleh sering

dihubungkan dengan aktivitas sitotoksik yang merupakan syarat utama obat-obat antitumor (Prasetyorini *et al.*, 2011).

## 2.7 Kanker Serviks

Kanker atau karsinoma adalah pembentukan jaringan baru yang abnormal dan bersifat ganas (*maligne*). Suatu kelompok sel yang tiba-tiba menjadi liar dan memperbanyak diri secara pesat dan terus menerus (*proliferasi*). Kanker terbentuk karena adanya mutasi pada biosintesis sel, yaitu kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi atau ada pengaturan kembali. Adanya adisi dan integrasi bahan genetik virus ke dalam gen serta adanya perubahan ekspresi genetik. Sel-sel kanker ini dapat menginfiltrasi jaringan sekitarnya dan memusnahkannya. Kanker primer sering kali menyebarkan sel-selnya melalui saluran darah dan limfe ke tempat lain di tubuh (*metastase*), untuk selanjutnya berkembang menjadi kanker sekunder (Huspa, 2009).

Menurut Muaja *et al.* (2013), kanker merupakan penyakit yang tidak diketahui penyebabnya secara pasti, tetapi dipengaruhi oleh banyak faktor seperti merokok atau terkena paparan asap rokok, mengkonsumsi alkohol, obesitas dan diet tidak sehat, kurang aktivitas fisik dan infeksi yang berhubungan dengan kanker. Kanker dapat dicegah dengan mengurangi faktor risiko terjadinya kanker tersebut. Salah satu kanker yang banyak di derita oleh wanita di dunia yaitu kanker serviks.

Sel kanker leher rahim (serviks) merupakan kanker yang menempati posisi pertama diantara sepuluh kanker primer yang melanda wanita Indonesia. Sel Kanker leher rahim terjadi akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Kedua onkogen tersebut merupakan protein yang dapat

menghambat ekspresi gen p53 sebagai gen penekan kanker. Pada peristiwa ini onkogen lebih tinggi dibandingkan p53 sehingga proliferasi sel kanker menjadi tidak terkendali (Puji *et al.*, 2011).

## 2.8 Sel Hela

Sel Hela merupakan *cell line* yang tumbuh sebagai sel yang semi melekat. Sel Hela diturunkan dari sel epitel kanker serviks manusia. Sel ini pertama kali diisolasi pada tahun 1951 dari seorang wanita bernama Henricka Lacks. Pada saat isolasi, sel kanker mencerminkan terjadinya kekacauan siklus sel. Sel kanker melakukan kekacauan pada sembarang titik dalam siklus. Sel ini juga dapat membelah secara tidak terbatas pada saat sel diberi pasokan nutrisi secara terus menerus, sel ini akan menjadi abadi (Campbell *et al.*, 2002).

Sel kanker leher rahim (sel Hela) terjadi akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Kedua onkogen tersebut merupakan protein yang dapat menghambat ekspresi gen p53 sebagai gen penekan kanker. Pada peristiwa ini onkogen lebih tinggi dibandingkan p53 sehingga proliferasi sel kanker menjadi tidak terkendali (puji *et al.*, 2011)

Sel Hela dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan sel, meliputi asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Pada media ditambahkan serum yang mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel, dan mineral yang berfungsi kofaktor enzim (Freshney, 1987).

## 2.9 **Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)**

*Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)* adalah suatu teknik analisis kimia yang mempunyai kemampuan pemisahan yang sangat bagus karena mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi karena teknik ini menggunakan kombinasi tandem kromatografi cair dan spektroskopi massa. LCMS sangat umum digunakan dalam studi farmakokinetika terutama dalam hal pengembangan obat. Selain itu, LCMS juga dapat digunakan untuk dereplikasi bahan alam, skrining bioafinitas, skrining *in vivo*, stabilitas metabolit, identifikasi degradant, kualitas kontrol dan kuantitatif bioanalisis suatu obat (Khairan *et al.*, 2009).

Uji LCMS dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung pada tanaman. Analisis LCMS menggunakan ion positif dengan sistem ESI-MS. Senyawa yang terkandung pada sampel akan ditampilkan dalam bentuk puncak dengan waktu retensi yang berbeda-beda. Luas area puncak yang terukur dapat menggambarkan senyawa yang terkandung dalam sampel disertai dengan berat molekul (Lisdawati *et al.*, 2007).

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Bahan Dan Alat Penelitian

##### 3.1.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* didapatkan dari pantai cengkong, Trenggalek. Daun yang digunakan berwarna hijau segar. Pelarut yang digunakan adalah pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Pada pengujian fitokimia bahan yang digunakan asam sulfat 2N, asam sulfat pekat, reagen meyer, serbuk Mg, kloroform, asam asetat anhidrat, Fe<sub>3</sub> klorida dan etanol. Pada pengujian toksisitas menggunakan bahan artemia, air laut, n-heksan, etil asetat, metanol dan hasil dari ekstrak masing-masing pelarut. Pada pengujian viabilitas sel Hela bahan yang digunakan adalah sel Hela yang dikultur didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, media *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPIM) sebagai media kultur sel Hela, DMSO dan pada tahap pewarnaan sel Hela menggunakan MTT.

##### 3.1.2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah oven, Rotary evaporator, labu evaporator, timbangan digital, gelas ukur, corong, loyang, botol kaca dan spatula. Pada pengujian fitokimia menggunakan alat tabung reaksi, rak tabung reaksi, beaker glass 500 ml, spatula, timbangan digital, pipet tetes dan pipet volume. Pada pengujian toksisitas menggunakan alat beaker glass 1000 ml, toples kaca, aerator, selang aerator, micropipet, pipet tetes, cover glass dan botol vial. Proses uji sitoksisitas sel Hela menggunakan alat tabung cryo, Laminar air-flow, waterbath dan tabung gas CO<sub>2</sub>, mikroskop Inverted, filter 0,2 µm, spet, sumuran, spiritus, sentrifius, micropipet dan Elisa reader.

### 3.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan metode yang cukup kuat untuk mengungkapkan hubungan antara sebab dan akibat (Budiarto dan Dewi, 2003). Menurut Darmono *et al* (2012), menyatakan kajian eksperimen adalah kajian empiris dan menggunakan analisis dengan bantuan statistik untuk menguji hipotesis. Penelitian yang menggunakan pendekatan empiris sebenarnya cukup ringkas dan jelas. Pada penelitian tersebut bisa menggunakan lebih dari 1 hipotesis kemudian mengumpulkan data, menggunakan tes statistik untuk menguji hipotesis, menulis hasil, menyimpulkan dan menyarankan pada penelitian lain untuk memperluas hasil penelitian.

### 3.3. Penelitian Pendahuluan

Tujuan dari penelitian pendahuluan yaitu untuk mendapatkan ekstrak kasar dari masing-masing bagian mangrove yaitu daun, kulit batang dan buah lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) yang kemudian diuji fitokimia untuk mengetahui kandungan fitokimia yang terbaik secara kualitatif.

Hasil penelitian pendahuluan didapatkan hasil uji fitokimia sebagai berikut: daun lindur positif mengandung alkaloid, steroid, terpenoid dan negetif saponin dan flavonoid. Kulit batang lindur positif mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, flavonoid, steroid, dan terpenoid. Sedangkan buah lindur positif mengandung alkaloid, saponin, steroid, terpenoid dan negatif flavonoid.

Kesimpulan dari penelitian pendahuluan diketahui daun, kulit batang dan buah mengandung senyawa yang diduga sebagai agen antikanker yaitu steroid, terpenoid dan alkaloid. Daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) dipilih sebagai sampel pada penelitian utama karena keberadaannya yang melimpah sehingga mudah didapatkan. Buah lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*) tidak dipilih karena

keberadaannya yang musiman akan lebih sulit untuk mendapatkannya. Hasil penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Lampiran 1.

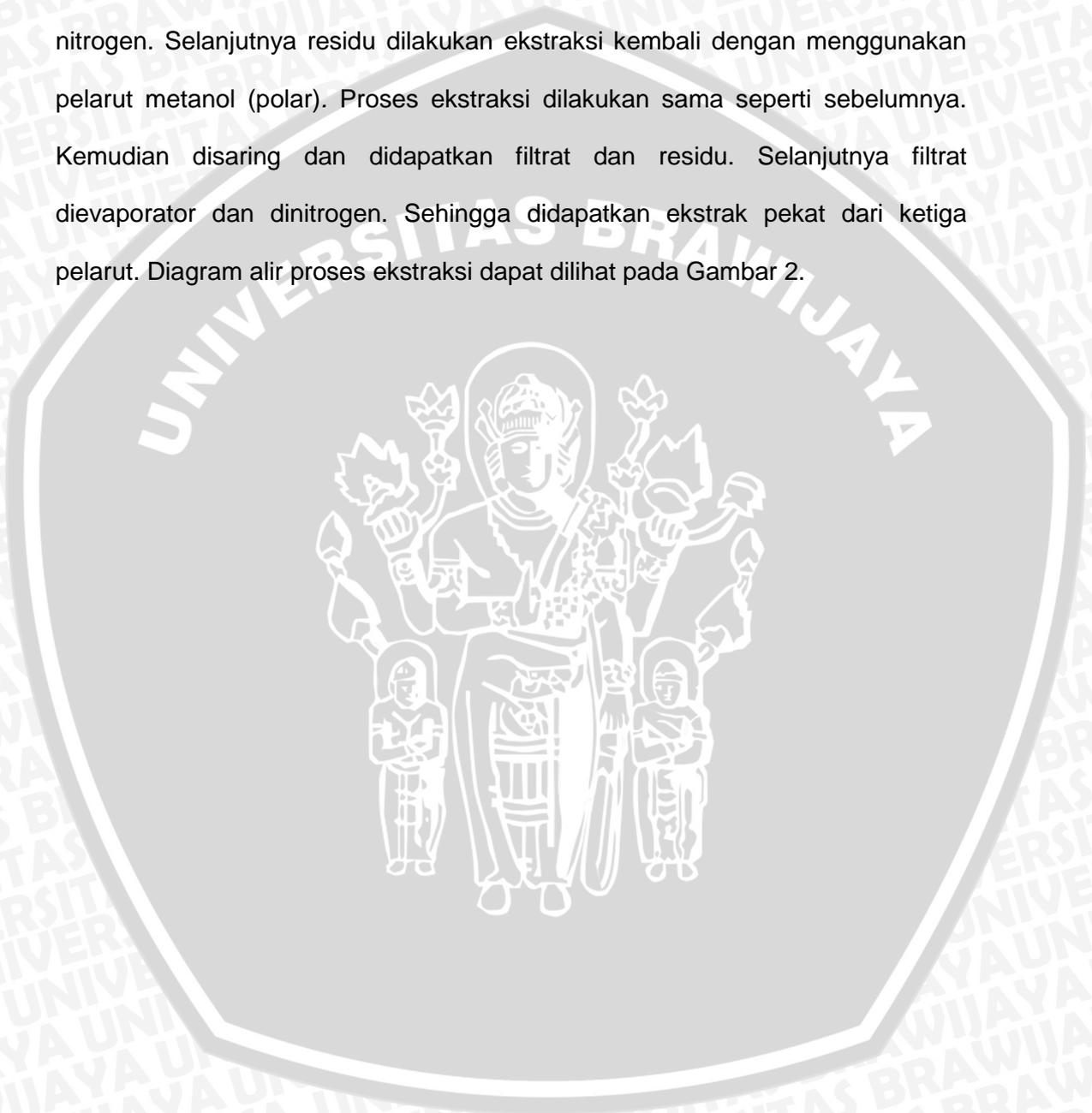
### 3.4. Prosedur Penelitian Utama

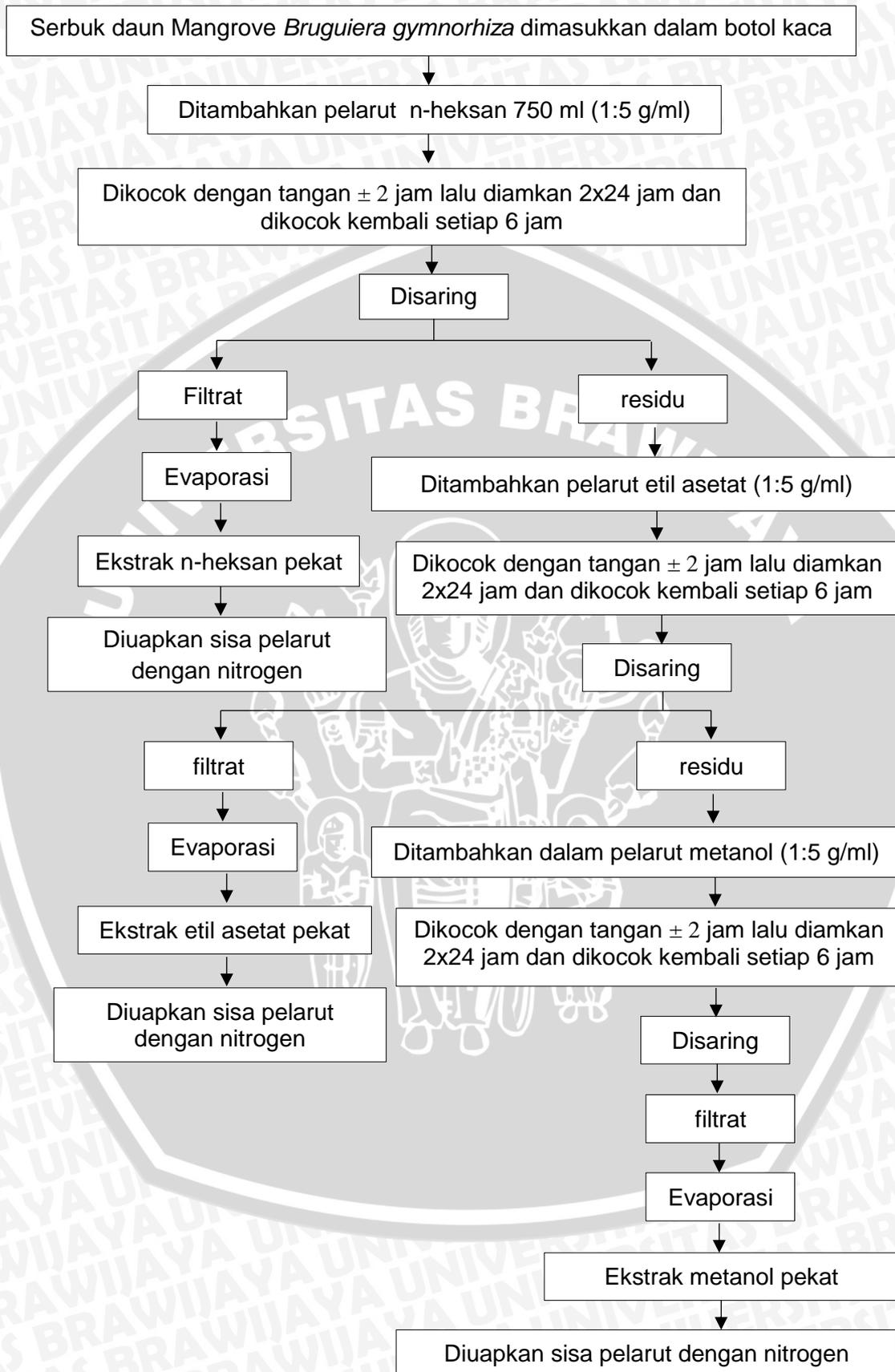
#### 3.4.1. Proses Ekstraksi

Hal pertama yang dilakukan yaitu daun *Bruguiera gymnorhiza* dicuci dengan air mengalir agar bersih dari kotoran. Daun *Bruguiera gymnorhiza* yang telah dicuci kemudian disobek atau diperkecil ukurannya agar lebih mudah saat pengovenan. Setelah itu daun dimasukkan kedalam loyang untuk dioven. Proses pengovenan daun *Bruguiera gymnorhiza* menggunakan suhu 40°C selama 2 hari agar kadar air dalam bahan berkurang. Hasil serbuk daun *Bruguiera gymnorhiza* didapatkan dari bahan yang telah kering dan diblender.

Setelah didapatkan sampel serbuk kemudian dilakukan ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan penelitian Apriyanto *et al.*, (2012). ekstraksi pertama dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksan (non polar). Perbandingan antara serbuk daun *Bruguiera gymnorhiza* dengan pelarut n-heksan adalah 1:5 (150 g sampel : 750 ml pelarut). Selanjutnya sampel dan pelarut dimasukkan ke dalam botol kaca. kemudian dilakukan pengocokan sampel dengan menggunakan tangan selama  $\pm$  2 jam. Tujuan pengocokan agar senyawa bioaktif dapat terserap maksimal oleh pelarut. Kemudian sampel didiamkan selama 2x24 jam agar senyawa bioaktif yang bersifat non polar dapat terserap dengan baik dan dikocok kembali setiap 6 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring sehingga didapatkan filtrat dan residu. Filtrat yang dihasilkan kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut sehingga didapatkan ekstrak mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. Setelah didapatkan ekstrak dilanjutkan dengan memberi gas nitrogen agar pelarut pada hasil ekstrak benar benar hilang atau menguap.

Residu hasil dari penyaringan dilakukan ekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu etil asetat (semi polar). Proses ekstraksi dilakukan sama seperti saat mengekstraksi dengan pelarut n-heksan. kemudian disaring dan didapatkan filtrat dan residu. Filtrat dievaporator dan nitrogen. Selanjutnya residu dilakukan ekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut metanol (polar). Proses ekstraksi dilakukan sama seperti sebelumnya. Kemudian disaring dan didapatkan filtrat dan residu. Selanjutnya filtrat dievaporator dan dinitrogen. Sehingga didapatkan ekstrak pekat dari ketiga pelarut. Diagram alir proses ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 2.



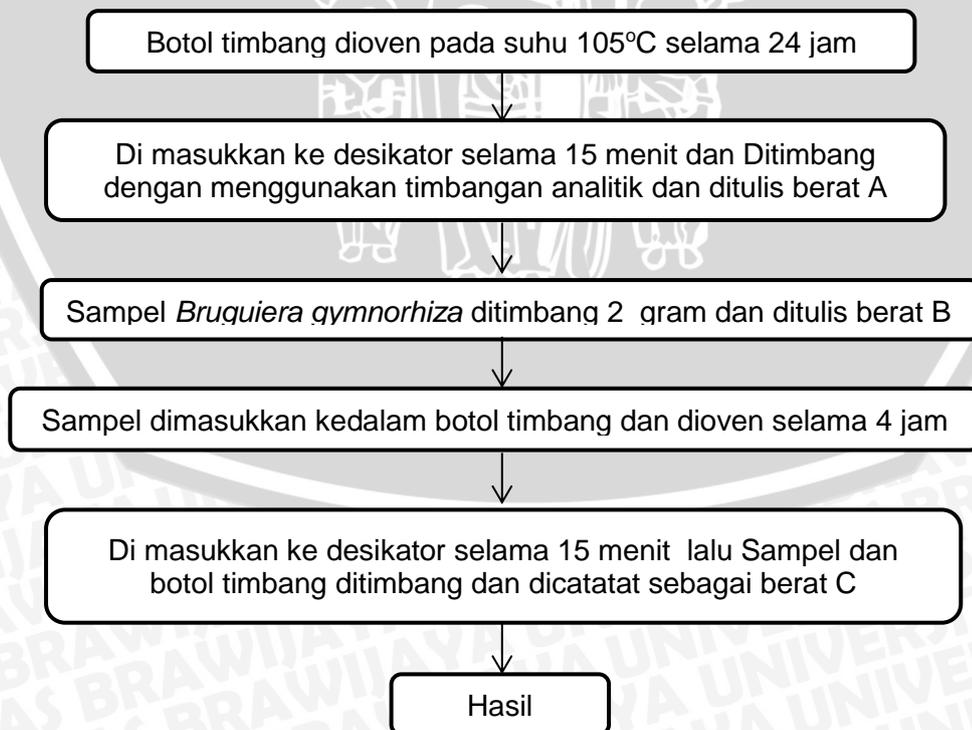


Gambar 2. Proses Ekstraksi

### 3.4.2. Uji Kadar Air

Kadar air diuji dengan prinsip pengeringan bahan dengan menggunakan oven bersuhu hingga  $100^{\circ}$  - $105^{\circ}\text{C}$ . Efisiensi dari metode ini tergantung dari penggunaan tekanan pada oven serendah mungkin dan pemindahan uap air dari oven secepat mungkin (Sudarmadji *et al.*, 1984).

Uji kadar air diawali dengan botol timbang dan tutupnya dioven pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam kemudian dimasukkan kedalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang (berat A). Selanjutnya sampel ditimbang sebanyak 2 gram (berat B) dan dimasukkkn kedalam botol timbang yang sudah dioven. Lalu dioven selama 4 jam dengan keadaan tutup setengah terbuka. Kemudian dinginkan didalam desikator selama 15 menit dan ditimbang (berat C). Panaskan lagi didalam oven selama 30 menit. Kemudian dinginkan didalam desikator selama 15 menit dan ditimbang. Perlakuan ini dilakukan hingga tercapai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg). Proses uji kadar air dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Proses Uji Kadar Air

### 3.4.3. Uji Fitokimia

Parameter pengujian fitokimia antara lain uji flavonoid, alkaloid, steroid, terpenoid, saponin dan tanin.

#### a. Flavonoid

Pengujian flavonoid dilakukan berdasarkan penelitian Harborne, (1987). Ekstrak dari *Bruguiera gymnorrhiza* diambil sebanyak  $\pm 1$  ml dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg, Hcl pekat 5 tetes dan etanol sebanyak 2 ml. Kemudian dikocok, apabila terbentuk warna jingga sampai merah pada sampel menunjukkan adanya flavonoid.

#### b. Alkaloid

Pengujian alkaloid dilakukan berdasarkan penelitian Jacob *et al.* (2013). Ekstrak dari *Bruguiera gymnorrhiza* dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak  $\pm 1$  ml dan ditambahkan 5 ml HCl dan reagen mayer 3 tetes. Kemudian dikocok dan didiamkan. Apabila terbentuk endapan putih sampai kuning menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

#### c. Steroid/terpenoid

Pengujian steroid/terpenoid dilakukan berdasarkan penelitian Jacob *et al.* (2013). Ekstrak dari *Bruguiera gymnorrhiza* dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak  $\pm 1$  ml. Lalu ditambahkan kloroform sebanyak 0,5 ml, kemudian ditambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat dan 2 ml asam sulfat pekat, kemudian dikocok. Apabila terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid dan apabila terbentuk cincin kecoklatan menunjukkan adanya senyawa terpenoid.

#### d. Saponin

Pengujian saponin dilakukan berdasarkan penelitian harborne, (2012). Ekstrak dari *Bruguiera gymnorrhiza* dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak  $\pm 1$  ml. Kemudian ditambahkan aquades 1 ml, lalu dikocok. Apabila

terbentuk busa stabil kurang dari 10 menit. Maka sampel mengandung senyawa saponin.

#### 3.4.4. Uji Total Fenol

Pengujian total fenol dilakukan berdasarkan penelitian Ratnayanti *et al.* (2012), langkah pertama adalah membuat larutan stok asam galat dengan konsentrasi 100 ppm (mg/L) dibuat dengan cara melarutkan 0,01 g asam galat kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Diambil sebanyak 0; 0,2; 0,4; 0,8 mL dari larutan stok asam galat 100 ppm dan kemudian masing-masing kedalamnya ditambahkan reagen folin sebanyak 0,8 mL, dimasukkan pada labu ukur 10 mL. Kemudian ditambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% hingga mencapai tanda batas, sehingga menghasilkan larutan standar dengan konsentrasi 0; 2; 4; 8 ppm. Masing-masing larutan didiamkan selama 60 menit, dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang 760 nm. Dengan mengalurkan absorbansi terhadap konsentrasi, dapat diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan regresi  $y = bx + a$ . Hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk kurva, sebagai sumbu y adalah absorbansi dan panjang gelombang cahaya sebagai sumbu x. Dari kurva tersebut dapat ditentukan panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum.

Langkah kedua adalah pegujian total fenol. Sampel ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* sebanyak 0,2 g ditimbang dan dilarutkan dengan metanol 85% dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Campuran tersebut kemudian disaring dan filtratnya dipipet 1,0 mL. Selanjutnya ditambahkan dengan reagen folin 0,8 mL dan dimasukkan pada labu ukur 10 mL. Setelah itu dikocok dan ditambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% hingga tanda batas, sehingga volume total larutan menjadi 10 mL. Larutan didiamkan selama 60 menit, dan serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran dilakukan pengulangan

sebanyak 6 kali. Konsentrasi senyawa fenolat dalam sampel dapat ditentukan dengan mengalurkan absorbansi sampel pada kurva kalibrasi.

Perhitungan kandungan fenolik total menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{TPC} = \frac{C \cdot V \cdot fp}{g}$$

Keterangan:

- C = Konsentrasi fenolik
- V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)
- fp = Faktor pengenceran
- g = Berat sampel yang digunakan (g)

#### 3.4.5. Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan berdasarkan pada penelitian Diastuti *et al.* (2009), dengan menggunakan hewan uji larva *Artemia salina*. Proses uji ini diawali dengan penyiapan hewan uji larva *Artemia salina*. Telur *Artemia salina* sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam air laut sebanyak 1 liter dan diaerasi selama 48 jam. Kemudian disiapkan larutan induk 2000 ppm dengan melarutkan sampel 0,04 gram didalam air laur 20 ml. Selanjutnya dari larutan induk diambil sesuai konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25 ppm dimasukkan ke dalam botol vial dan ditambahkan air laut sampai volume 5 ml. Kontrol positif dengan penambahan air laut dan kontrol negatif dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, metanol dan DMSO. Kemudian dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* pada setiap botol vial. Selanjutnya setelah 24 jam dilakukan pengamatan jumlah larva *Artemia salina* yang mati. Larva *Artemia salina* yang mati kemudian dihitung nilai LC<sub>50</sub> dari masing-masing ekstrak yang diperoleh dari hasil perhitungan log konsentrasi terhadap nilai probit.

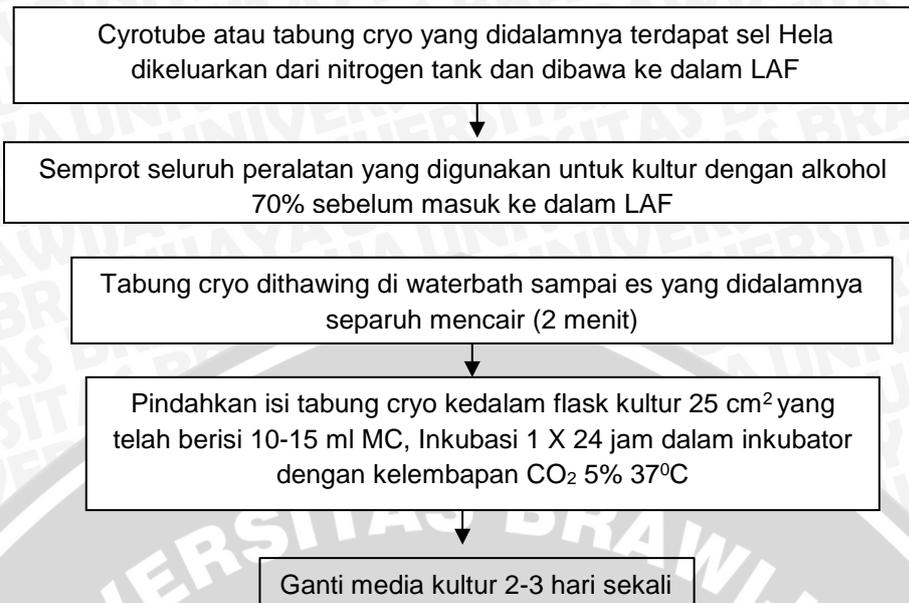
### 3.4.6. Uji Viabilitas Sel Hela

Uji sitotoksitas bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut dan penambahan dosis yang berbeda ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* terhadap kehidupan sel kanker. Sel kanker yang digunakan adalah sel Hela yaitu sel dari kanker serviks. Kultur sel Hela sering digunakan sebagai model dalam penelitian karena tumbuh cepat sehingga mampu memproduksi lebih banyak sel dalam satu flask dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (Ningrum, 2011).

Uji viabilitas sel Hela dilakukan dengan metode MTT Assay. Prinsip dari metode ini adalah mengetahui kerusakan sel secara mikroskopik yang dikombinasikan dengan penghitungan jumlah sel. Sel yang hidup akan tampak berwarna biru dengan nukleus tercatat lebih gelap, sedangkan sel yang mati tidak akan tercatat. Pada uji ini diawali dengan proses *thawing freezing* sel Hela kemudian proses uji sitotoksitas (Diastuti *et al.*, 2009).

#### 1. Proses *thawing freezing* sel Hela

*Thawing Freezing* Sel Hela diawali dengan mengeluarkan crytube atau tabung cryo yang terdapat sel Hela dari nitrogen tank dan dibawa ke dalam LAF (*Laminar Air Flow*) agar tidak terkontaminasi. Sebelumnya semprot seluruh peralatan yang digunakan untuk kultur dengan alkohol 70%. Selanjutnya tabung cryo di *thawing* sampai es yang didalamnya mencair. Pindahkan isi tabung cryo ke dalam flask kultur 25 cm<sup>2</sup> yang telah berisi 10-15 ml MC. Sel kemudian diinkubasi dengan kelembapan CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C. Penggunaan suhu 37°C bertujuan agar sel dapat tumbuh maksimal, sedangkan suasana CO<sub>2</sub> 5% bertujuan untuk menjaga pH sel agar sesuai dengan pH media yang digunakan. Media diganti setiap 2-3 hari sekali. Media digunakan untuk mencukupi kebutuhan nutrisi sel. Proses *thawing freezing* sel Hela dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Proses *thawing freezing* sel Hela

## 2. Proses uji sitotoksitas

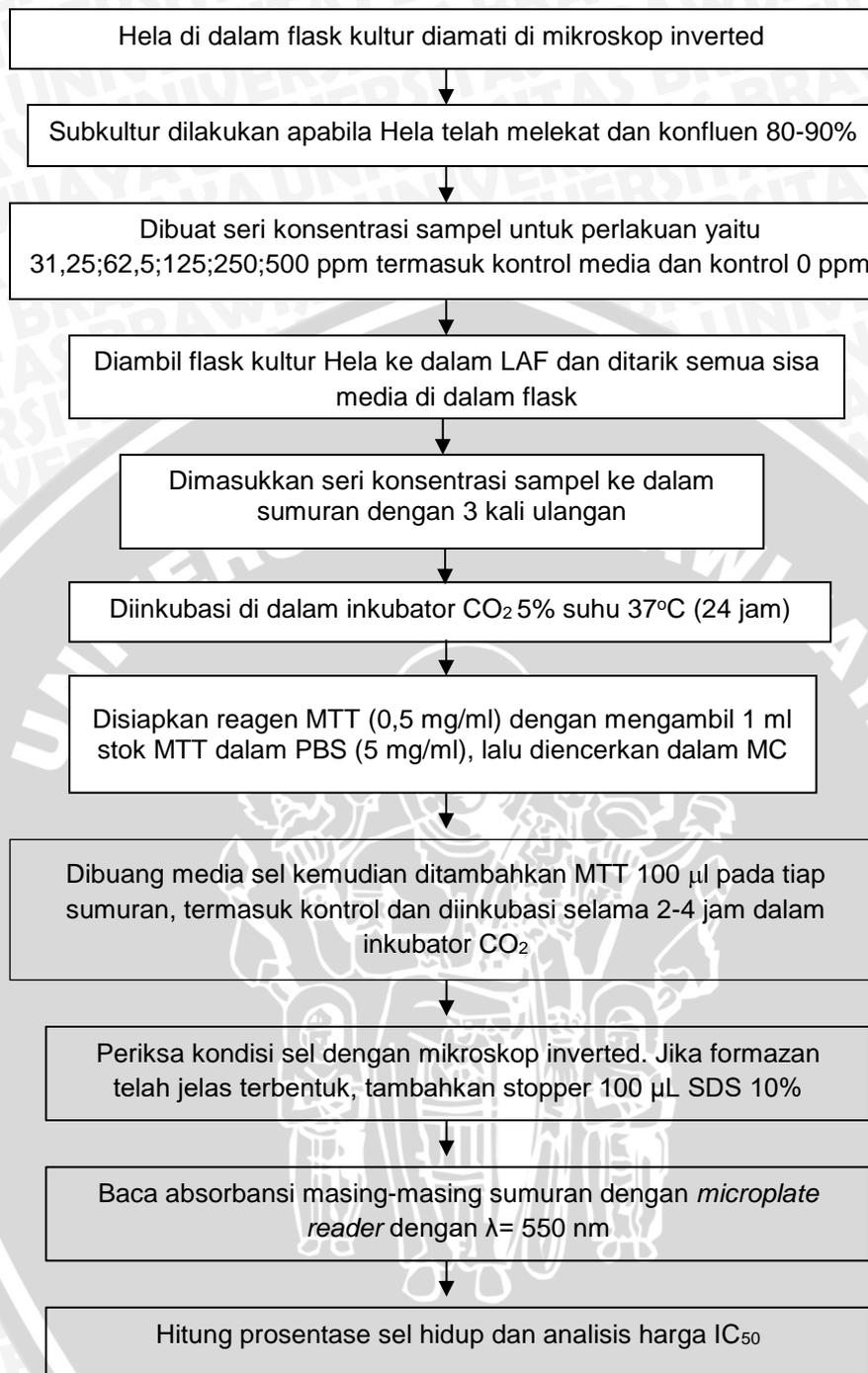
Dosis yang digunakan pada semua pelarut untuk uji viabilitas sel Hela yaitu 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm. Pembuatan dosis diawali dengan pembuatan larutan induk konsentrasi 1000 ppm. Pembuatan larutan induk dengan melarutkan ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* ke dalam DMSO. Perhitungan pembuatan larutan induk dapat dilihat pada Lampiran 6. Selanjutnya larutan uji disaring dengan filter 0,2  $\mu\text{m}$ . Lalu dimasukkan dalam *conical* steril ditutup dengan parafilm, dan disimpan dalam lemari es. Pembuatan larutan uji dilakukan didalam *laminar air flow cabinet* secara aseptis agar tidak terkontaminasi.

Suspensi sel uji yang digunakan sebanyak 100  $\mu\text{L}$  didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-*well plate*, ditambah sampel uji pada kadar masing-masing 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm. Sebagai kontrol medium digunakan 100  $\mu\text{L}$  suspensi sel ditambahkan medium. Pada kontrol negatif diberi penambahan DMSO. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Kemudian ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  MTT sebagai pewarnaan DNA. Pengecetan DNA

perlu dilakukan untuk menunjukkan bahwa sel yang mati benar-benar disebabkan oleh efek toksik dari ekstrak yang diujikan, bukan dari pemberian dosis atau kadar yang terlalu tinggi.

Sel diinkubasi selama 3 jam sampai terbentuk kristal ungu pada setiap sumuran. Sel uji yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan *reagen stopper*. Serapan absorbansi dibaca dengan menggunakan alat microplate plate reader (*elisa reader*). Pengamatan sel yang mati dan hidup dengan menggunakan mikroskop inverted. Tingkat sitotoksitas ekstrak uji terhadap sel kanker dapat dinyatakan dengan nilai  $LC_{50}$ . Data yang diperoleh dari hasil uji MTT selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai  $LC_{50}$  dengan menggunakan analisis probit. Proses uji sitotoksitas dapat dilihat pada Gambar 5.





Gambar 5. Uji Sitotoksitas Metode MTT Assay

Potensi aktifitas sitotoksik dapat ditentukan dengan pengamatan perubahan morfologis melalui analisis kualitatif dan nilai LC<sub>50</sub> melalui analisis probit. Proses selanjutnya pengukuran kadar absorbansi dan penghitungan persentase kehidupan dan kematian sel menggunakan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(OD \text{ perlakuan} - OD \text{ medium})}{(OD \text{ kontrol} - OD \text{ medium})} \times 100\%$$

$$\% \text{ sel mati} = \frac{(OD \text{ kontrol} - OD \text{ medium}) - (OD \text{ perlakuan} - OD \text{ medium})}{(OD \text{ kontrol} - OD \text{ medium})} \times 100\%$$

#### 3.4.7. Uji Liquid Chromatograph Mass Spectrometry (LCMS)

Uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LCMS) dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza*. Ekstrak sebanyak 1 mg dilarutkan dalam metanol (MeOH), kemudian larutan diambil menggunakan *syringe*, dan disuntikkan ke dalam vial hingga batas 1 mL menggunakan *syringe* yang telah dilengkapi filter. Larutan sampel dalam vial kemudian diukur dengan kromatografi cair-spektrometer massa melalui kolom C-18 (15 x 1 ml) dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit. Analisis menggunakan ion positif dengan sistem ESI-MS. Senyawa yang terkandung pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* akan ditampilkan dalam bentuk puncak dengan waktu retensi yang berbeda-beda. Luas area puncak terukur dapat menggambarkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak tersebut disertai dengan berat molekul senyawa yang diduga terdapat pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza*.

### 3.5. Rancangan Percobaan

Variabel merupakan objek penelitian yang dapat menentukan hasil penelitian. Ada beberapa macam variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yaitu variabel yang dapat diubah dan dimanipulasi oleh peneliti. Variabel terikat yaitu variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Ketika variabel bebas berubah, maka variabel terikat ikut berubah.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbedaan pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi daun *Bruguiera gymnorrhiza*. Pelarut yang digunakan adalah n-heksan, etil asetat dan metanol. Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah parameter uji yang diamati, yaitu pengaruh terhadap viabilitas sel Hela dengan pemberian ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan pelarut yang berbeda.

Berdasarkan perlakuan, penelitian ini dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Dimana dalam penelitian ini menggunakan 3 perlakuan dengan pelarut berbeda dengan ulangan sebanyak 3 kali. Hubungan antara perlakuan dan ulangan yang digunakan adalah  $(r \times t - 1) - (t-1)$ . Rancangan percobaan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rancangan Percobaan

Pelarut	Dosis	Ulangan		
		1	2	3
N-heksan	31,25	PN A1	PN A2	PN A3
	62,5	PN B1	PN B2	PN B3
	125	PN C1	PN C2	PN C3
	250	PN D1	PN D2	PN D3
	500	PN E1	PN E2	PN E3
Etil asetat	31,25	PE A1	PE A2	PE A3
	62,5	PE B1	PE B2	PE B3
	125	PE C1	PE C2	PE C3
	250	PE D1	PE D2	PE D3
	500	PE E1	PE E2	PE E3
Metanol	31,25	PM A1	PM A2	PM A3
	62,5	PM B1	PM B2	PM B3
	125	PM C1	PM C2	PM C3
	250	PM D1	PM D2	PM D3
	500	PM E1	PM E2	PM E3

Metode analisis yang digunakan adalah analisis keragaman yang memiliki rumus sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Keterangan:

$Y_{ij}$  : Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  : nilai tengah umum

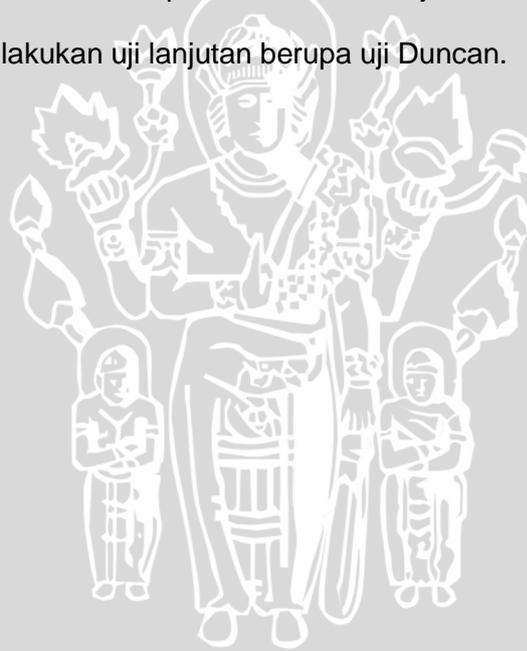
$T_i$  : Pengaruh perlakuan ke-i

$E_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$J$  : Ulangan

$I$  : Perlakuan

Hasil penelitian ini dilakukan pengujian normalitas dengan menggunakan aplikasi SPSS dengan uji ANOVA dua arah untuk mengetahui interaksi antara faktor A dan B. Apabila hasil menunjukkan adanya perbedaan pada taraf 5% maka dilakukan uji lanjutan berupa uji Duncan.



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Ekstrak Daun *Bruguiera gymnorhiza*

Hasil ekstrak daun *Bruguiera gymnorhiza* didapat dari proses ekstraksi. Metode yang digunakan untuk ekstraksi yaitu maserasi bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Hasil persentasi rendemen dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data rendemen ekstrak daun *Bruguiera gymnorhiza*

Jenis pelarut	Berat awal (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen ekstrak (%)
n-Heksan	150	10,346	6,897
Etil asetat	150	4,642	3,09
Metanol	150	17,906	11,037

Tabel 5 menunjukkan ekstrak daun *Bruguiera gymnorhiza* dari maserasi menggunakan pelarut yang berbeda mendapatkan hasil rendemen yang berbeda. Hasil perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran 2. Hasil persen rendemen menunjukkan rendemen tertinggi terdapat pada ekstrak metanol. Sedangkan rendemen terendah terdapat pada ekstrak etil asetat. Hal ini diduga karena senyawa yang terkandung dalam daun *Bruguiera gymnorhiza* dominan senyawa yang bersifat polar sehingga rendemen pada ekstrak metanol lebih tinggi daripada rendemen pelarut etil asetat dan n-heksan. Hal ini didukung oleh pernyataan Dia *et al.* (2015), bahwa besarnya rendemen ekstrak tergantung pada sifat kepolaran pelarut dalam melarutkan komponen bioaktif pada ekstrak, suhu, waktu ekstraksi serta tingkat kepolaran dari jumlah bahan yang diekstrak yang memiliki polaritas yang sama dengan pelarut.

#### 4.2. Hasil Uji Kadar Air

Pengujian kadar air dilakukan untuk mengetahui kandungan air pada ekstrak sebagai persen bahan kering dan kualitas ketahanan suatu sampel dalam penyimpanan yang cukup lama. Perhitungan kadar air dapat dilihat pada Lampiran 3. Hasil kadar air dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Data kadar air ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Pelarut	Berat cawan (g)	Berat sampel (g)	Berat cawan dan sampel (g)	% kadar Air
n-heksan	86,05	1	86,98	7
Etil asetat	83,59	1	84,46	13
metanol	83,63	1	84,52	11

Tabel 6 menunjukkan hasil kadar air yang berbeda pada setiap pelarut. Perbedaan tersebut dikarenakan setiap pelarut memiliki sifat kimia yang berbeda-beda. Hasil kadar air terendah pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* terdapat pada ekstrak n-heksan sebesar 7%. Sedangkan kadar air tertinggi terdapat pada ekstrak etil asetat yaitu sebesar 13%. Kadar air dalam bahan akan mempengaruhi ketahanan dalam penyimpanan dan aktivitas dari mikroba. Sehingga kadar air yang rendah akan membuat penyimpanan bahan lebih lama (Sastrawan *et al.*, 2013).

#### 4.3. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Fitokimia merupakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada tumbuhan. Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak. Pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia dari hasil ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dari masing-masing pelarut yang digunakan. Pengujian fitokimia meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan terpenoid. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Golongan Senyawa bioaktif	Perlakuan		
	n-Heksan	Etil Asetat	Metanol
Flavonoid	+	+	+
Alkaloid	-	-	-
Steroid	+	+	+
Terpenoid	+	+	-
Saponin	-	-	-

Keterangan: (+) terdeteksi (-) tidak terdeteksi

Tabel 7 menunjukkan bahwa hasil fitokimia ada perbedaan antara pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak n-Heksan daun *Bruguiera gymnorrhiza* mengandung komponen bioaktif flavonoid, steroid dan terpenoid. Pada ekstrak etil asetat didapat komponen bioaktif flavonoid, steroid dan terpenoid. Sedangkan pada ekstrak metanol didapat komponen bioaktif flavonoid dan steroid.

#### a. Flavonoid

Uji flavonoid ditandai dengan terbentuk warna orange merah pada ekstrak n-heksan, metanol dan etil asetat. Hasil positif flavonoid ditandai dengan warna orange merah. Diperkirakan karena terbentuknya garam flavilium (Mulyani *et al.*, 2013).

#### b. Steroid

Uji steroid menunjukkan semua ekstrak mengandung senyawa steroid dengan terbentuknya warna hijau. Warna hijau yang terbentuk disebabkan oleh ekstrak yang bereaksi terhadap asam ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Baud *et al.*, 2014).

#### c. Terpenoid

Uji terpenoid ditandai dengan terjadi perubahan warna menjadi merah atau ungu. Perubahan warna tersebut disebabkan karena adanya reaksi senyawa terpenoid dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan asam asetat anhidrida. Senyawa terpenoid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan

membentuk garam dengan menghasilkan perubahan warna menjadi merah atau ungu (Putri *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil pengujian fitokimia senyawa bioaktif yang diduga berpotensi sebagai antikanker yaitu flavonoid, steroid dan terpenoid. Hal ini didukung oleh pernyataan Diastuti *et al.* (2009), hasil fraksi kloroform dari ekstrak etanol daun *Rhizophora mucronata* berpotensi sebagai antikanker dan mengandung senyawa bioaktif flavonoid dan terpenoid.

#### 4.4. Hasil Uji Total Fenol Ekstrak Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Terdapat hubungan antara kandungan total fenol dengan aktivitas antioksidan. Semakin besar kandungan total fenol, maka aktivitas antioksidannya meningkat (Lushiani *et al.* 2015). Hasil perhitungan total fenol dapat dilihat pada Lampiran 4. Kandungan total fenol ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Kandungan total fenol ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza*

ekstrak	Total fenol (g GAE/100 g)
n-heksan	62,69592476
Etil asetat	16,71891327
Metanol	86,72936259

Tabel 8 menunjukkan kandungan fenolik ekstrak metanol daun *Bruguiera gymnorrhiza* memiliki nilai tertinggi sebesar 86,72936259 g GAE/100 g. Sedangkan pada ekstrak n-heksan kandungan fenolik sebesar 62,69592476 g GAE/100 g. Kandungan fenolik terkecil terdapat pada ekstrak etil asetat yaitu sebesar 16,71891327 g GAE/100 g. Hal ini menunjukkan senyawa yang terdapat pada ekstrak metanol sebagian besar merupakan senyawa fenol yang diduga bersifat polar. Pada penelitian Lushaini *et al.* (2015), kandungan total fenol tanaman lindur dari hasil ekstraksi etanol adalah 16,59 mgGAE/g ekstrak.

Senyawa fenol dapat menghambat radikal bebas tergantung pada kelompok hidroksilnya atau dengan secara langsung bertindak sebagai antioksidan. Senyawa fenolat juga berperan dalam menurunkan sinyal redoks sensitif untuk menghambat kerusakan DNA (Nurjanah *et al.*, 2014). Menurut Dai (2010), polifenol mempunyai sifat antioksidan yang kuat dan dapat mencegah stress oksidatif yang berhubungan dengan penyakit kanker. Polifenol memiliki beberapa tindakan biologis tertentu dalam mencegah atau mengobati penyakit.

#### 4.5. Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Senyawa yang diduga memiliki aktivitas antikanker, harus diujikan terlebih dahulu pada hewan percobaan. Penelitian ini menggunakan metode *Brine Shrimp Lethal Test* (BSLT) dengan hewan uji larva udang *Artemia salina* L. Metode ini banyak digunakan untuk mencari senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Hasil uji toksisitas dari metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksitas senyawa antikanker. Metode ini juga lebih murah, mudah dikerjakan, cepat dan cukup akurat (Nurhayati *et al.* 2006). Persentasi kematian yang didapatkan diubah menjadi angka probit dan didapatkan persamaan garis  $y=bx+a$ . Persamaan regresi yang diperoleh dapat dilihat pada Lampiran 5. Hasil uji toksisitas dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Uji Toksisitas

Ekstrak	31,25	62,5	125	250	500	1000	Nilai LC <sub>50</sub> (ppm)
n-heksan	1	2	4	5	6	6	347,78
Etil asetat	1	1	2	4	4	5	844,95
Metanol	1	2	3	3	5	6	561,97

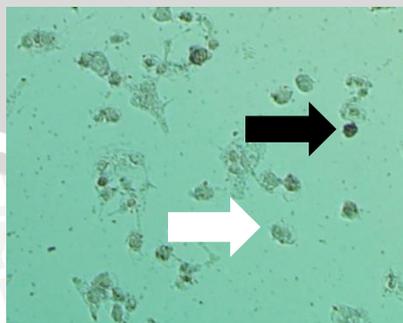
Tabel 9 menunjukkan hasil ppm terendah terdapat pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pelarut n-heksan. Sedangkan hasil ppm tertinggi terdapat pada ekstrak pelarut etil asetat. Hasil uji toksisitas ekstrak daun *Bruguiera*

*gymnorrhiza* tergolong bersifat toksik dikarenakan nilai  $LC_{50}$  yang dihasilkan masih  $<1000$  ppm sesuai dengan pernyataan dari Meyer *et al.* (1982), suatu ekstrak dinyatakan aktif dan bersifat toksik jika dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm dan bersifat tidak toksik jika ditemukan pada konsentrasi lebih dari 1000 ppm. Jika dibawah 31 ppm bersifat sangat toksik.

Perbedaan tingkat toksisitas disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Cara kerja senyawa bioaktif dengan bertindak sebagai racun perut. Oleh karena itu bila senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Lapisan kulit yang tipis pada larva dapat memicu terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme tubuhnya (Pradana *et al.*, 2014).

#### 4.6. Hasil Uji Sitoksisitas Ekstrak Daun *Bruguiera gymnorrhiza*

Uji sitoksisitas ini menggunakan metode MTT. Metode MTT digunakan untuk memberikan perbedaan warna antara sel yang masih hidup dan sel yang telah mengalami sitoksisitas. Produk formazan yang dihasilkan berwarna biru yang selanjutnya dihitung intensitasnya dengan menggunakan elisa reader pada panjang gelombang 550 nm. Hasil sel Hela setelah pemaparan ekstrak dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Sel Hela paparan ekstrak n-heksan dosis 250 ppm,

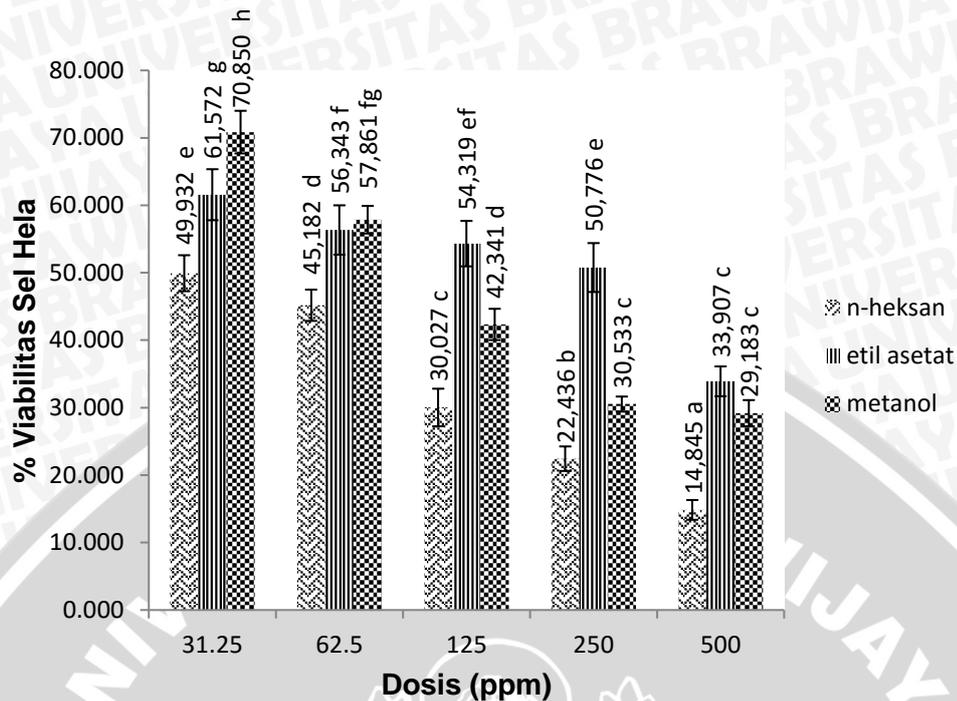
Keterangan:  = sel Hela mati  = sel Hela hidup

Gambar 6 memperlihatkan bahwa warna ungu tua adalah jumlah sel Hela yang masih hidup. Hal ini dapat terjadi karena antara larutan MTT dengan membran sel hidup membentuk warna biru formazan. Jumlah sel yang mengalami sitoksisitas ditunjukkan dengan warna yang lebih cerah.

Burt *et al.* (1992) mengatakan, prinsip dasar MTT assay adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan aktivitas enzim suksinat dehydrogenase mitokondria sel untuk mereduksi garam methythiazol tetrazolium (MTT). Pada proses metabolisme, sel-sel yang hidup akan menghasilkan suksinat dehydrogenase mitokondria. Enzim ini akan bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan ungu yang jumlahnya sebanding dengan sel hidup. Jika persentasi viabilitas sel lebih kecil dari 100 % maka material yang dipaparkan pada sel tersebut dapat dikatakan bersifat toksik.

#### **4.6.1. Pengaruh Perbedaan Pelarut Dan Variasi Dosis Terhadap Viabilitas Sel Hela**

Viabilitas sel merupakan pengukuran jumlah sel yang hidup. Sitotoksisitas yang terjadi pada sel biasanya diindikasikan dengan penurunan proliferasi sel, viabilitas sel, dan sintesis asam nukleat atau protein. Viabilitas sel bersifat segera, seperti perubahan permeabilitas membran atau gangguan pada jalur metabolisme tertentu. Oleh karena itu viabilitas sel dapat menjadi indikator sitoksisitas suatu bahan (Torneck dan Torabinejad, 1997). Grafik persen viabilitas sel Hela dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Grafik Persen Viabilitas Sel HeLa

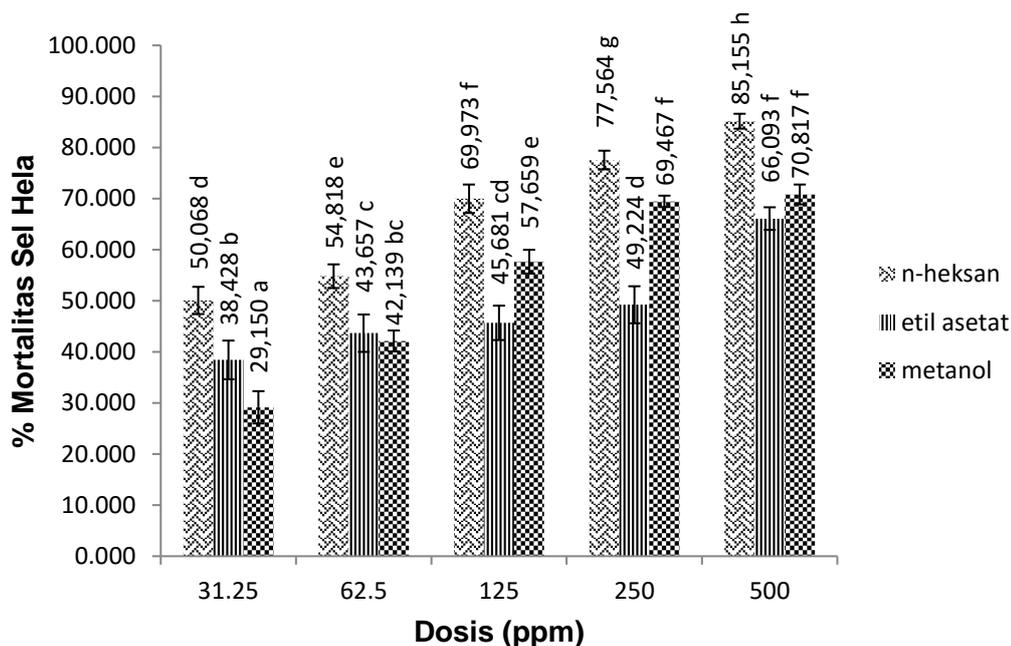
Gambar 7 menunjukkan hasil pengukuran dengan menggunakan *elisa reader* bahwa pada setiap ekstrak memiliki tingkat viabilitas yang berbeda-beda. Hasil tersebut menunjukkan seiring bertambahnya dosis, tingkat viabilitas semakin menurun. Hal ini sesuai dengan pernyataan Indiyah (2012), bahwa semakin besar konsentrasi senyawa yang ditambahkan, maka semakin menurun viabilitas sel HeLa. Viabilitas terendah terdapat pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pelarut n-heksan pada dosis 500 ppm yaitu sebesar 14,845%. Sedangkan viabilitas tertinggi terdapat pada ekstrak metanol *Bruguiera gymnorrhiza* pada dosis 31,25 ppm yaitu sebesar 70,850%. Hal ini menunjukkan jumlah kematian sel yang dipengaruhi paparan ekstrak metanol *Bruguiera gymnorrhiza* rendah dibanding dengan pelarut lain. Menurut Fajarningsih *et al.* (2006), semakin banyak sel yang hidup, semakin banyak kristal formazan yang terbentuk, semakin tinggi nilai absorbansi yang diperoleh dan mengindikasikan mortalitas yang rendah.

Viabilitas sel Hela pada pelarut n-heksan lebih rendah disebabkan beberapa hal, antara lain senyawa yang terkandung pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza*. Pada pengujian fitokimia diketahui ekstrak n-heksan mengandung senyawa bioaktif flavonoid, steroid dan terpenoid. Menurut Li *et al.* (2013), *Bruguiera gymnorrhiza* adalah tanaman yang dapat dijadikan sebagai pengobatan tradisional karena mengandung bioaktif seperti flavonoid dan terpen.

Berdasarkan perhitungan analisis keragaman ANOVA, interaksi antara perbedaan pelarut dengan viabilitas sel Hela didapat hasil F hitung lebih besar dari F tabel pada taraf kepercayaan 5%. Hasil interaksi antara variasi dosis dengan viabilitas sel Hela didapat hasil F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Interaksi antara dua faktor dengan viabilitas sel didapat hasil F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Hal ini menunjukkan bahwa hasil yang didapat memberikan pengaruh. Kemudian dilanjutkan dengan uji duncan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh pelarut yang berbeda dan variasi dosis ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* terhadap viabilitas sel Hela berdasarkan hasil notasi yang didapatkan dari setiap perlakuan. Perhitungan uji duncan dapat dilihat pada Lampiran 7.

#### **4.6.2. Pengaruh Perbedaan Pelarut Dan Variasi Dosis Terhadap Mortalitas Sel Hela**

Mortalitas sel merupakan pengukuran kematian jumlah sel. Menurut Wicaksono *et al.*, (2013), Selain proliferasi, apoptosis atau kematian sel merupakan suatu program sangat penting dalam mengontrol jumlah sel. Grafik persen mortalitas sel Hela dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 8. Grafik Persen Mortalitas Sel Hela**

Gambar 8 menunjukkan bahwa persentase kematian sel Hela mengalami peningkatan seiring penggunaan pelarut ekstraksi yang berbeda dan seiring dengan perbedaan dosis yang digunakan. Berbanding terbalik dengan persentase viabilitas, hasil tertinggi persentase kematian sel Hela pada perlakuan n-heksan dosis 500 ppm dan terendah pada perlakuan metanol dosis 31,25 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan n-heksan dosis 500 ppm merupakan dosis efisien pada kematian sel Hela.

Warsinah *et al.* (2007), menyampaikan dari hasil penelitiannya bahwa ekstrak kulit batang *Bruguiera gymnorrhiza* pada dosis 1000 ppm mendapatkan % kematian sebesar 72,06% pada sel Meiloma. Hasil ini lebih rendah apabila dibandingkan dengan ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang dipaparkan pada sel Hela. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* mampu bekerja sebagai antikanker pada sel Hela.

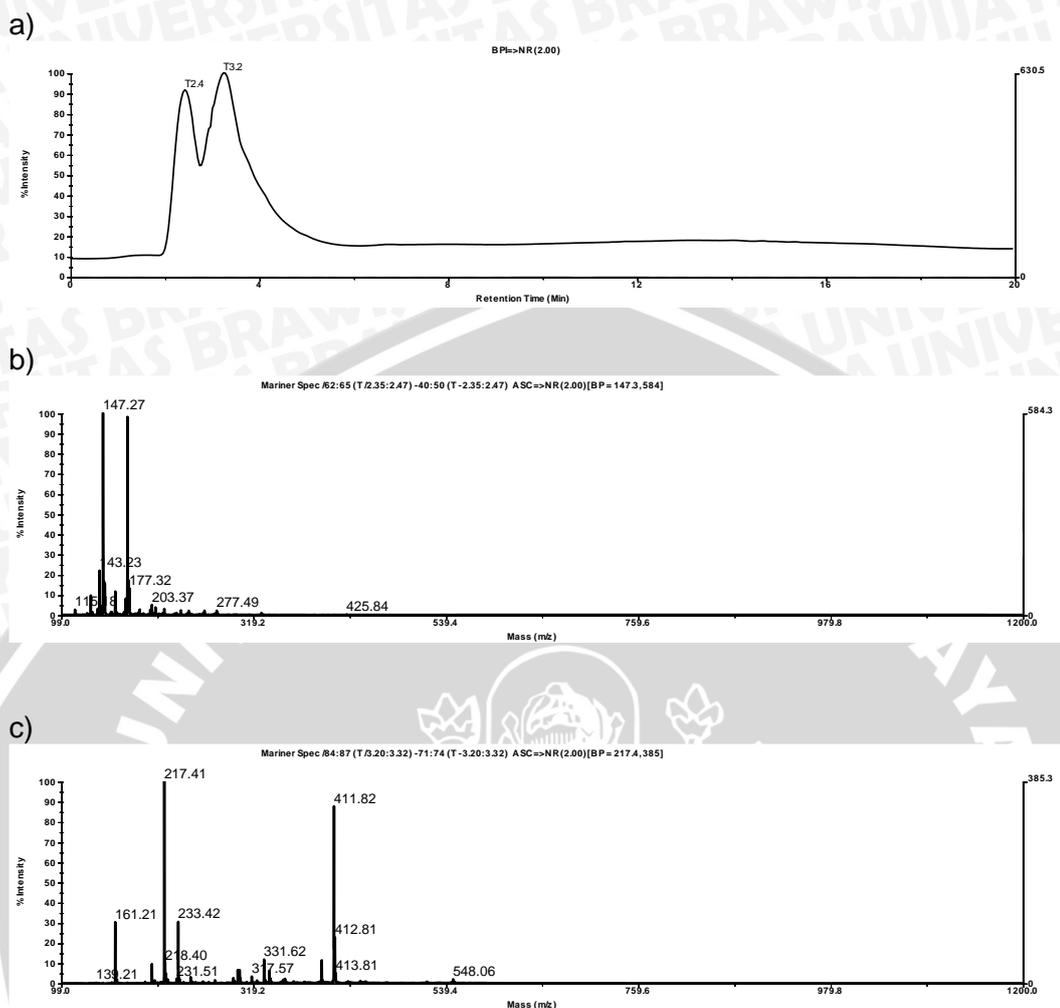
Menurut Puji *et al.* (2011), untuk melakukan uji sitoksisitas terhadap ekstrak, NCI (*National Cancer Institute*) menetapkan standar  $LC_{50}$  adalah  $\leq 20$  ppm. Hasil  $LC_{50}$  dari ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pelarut n-heksan, etil

asetat dan metanol berturut-turut sebesar 35,53 ppm, 128,85 ppm, 98,41 ppm. Berdasarkan hasil  $LC_{50}$  tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* tidak mempunyai aktivitas yang optimal terhadap sel kanker Hela berdasarkan kriteria yang ditetapkan oleh NCI (National Cancer Institute). Namun ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* masih bersifat toksik terhadap sel Hela.

Berdasarkan perhitungan analisis keragaman ANOVA, interaksi antara perbedaan pelarut dengan kematian sel Hela didapat hasil F hitung lebih besar dari F tabel pada taraf kepercayaan 5%. Hasil interaksi antara variasi dosis dengan kematian sel Hela didapat hasil F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Interaksi antara dua faktor dengan kematian sel didapat hasil F hitung lebih besar dari F tabel taraf kepercayaan 5%. Hal ini menunjukkan bahwa hasil yang didapat memberikan pengaruh. Kemudian dilanjutkan dengan uji duncan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh pelarut yang berbeda dan variasi dosis ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* terhadap kematian sel Hela berdasarkan hasil notasi yang didapatkan dari setiap perlakuan. Perhitungan uji duncan dapat dilihat pada Lampiran 8.

#### 4.7. Hasil *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS)

Uji LCMS dilakukan dengan sistem *electrospray ionization* (ESI) yang menggunakan ion positif. Proses ESI positif akan menghasilkan ion molekul dengan penambahan kation misalnya  $[M+H]^+$ . Identifikasi senyawa secara kualitatif lebih spesifik karena LCMS mengamati waktu retensi dan juga pemisahan ion suatu senyawa (Rachmawati dan Widiyanti, 2013). Hasil uji LCMS ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dapat dilihat pada Gambar 9.

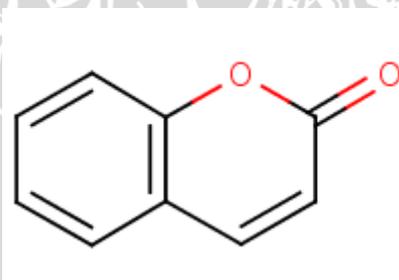


Gambar 9. a) Hasil kromatografi LC. b) Spektrum massa waktu retensi ke-1 (Rt. 2.42). c) Spektrum massa waktu retensi ke-2 (Rt. 3.24)

Gambar 9 (a) menunjukkan hasil kromatografi LC ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan pelarut n-heksan memiliki 2 puncak. Senyawa-senyawa yang berhasil dapat dilihat pada waktu retensi 2.42 pada puncak pertama dan 3.24 pada puncak kedua. Hasil dari puncak pertama lebih dominan daripada puncak kedua karena memiliki luas area yang lebih luas yaitu sebesar 3323.21. Sedangkan pada puncak kedua memiliki luas area sebesar 2529.25.

Gambar 9 (b) menunjukkan spectrum massa puncak pertama pada retensi waktu 2.24. Pada puncak spectrum ini diperoleh berat molekul 147 m/z  $[M+H]^+$ . Fragmentasi senyawa dengan berat molekul 146 m/z  $[M+H]^+$ . Hasil pencarian berat molekul di *massbank* menunjukkan senyawa yang diduga

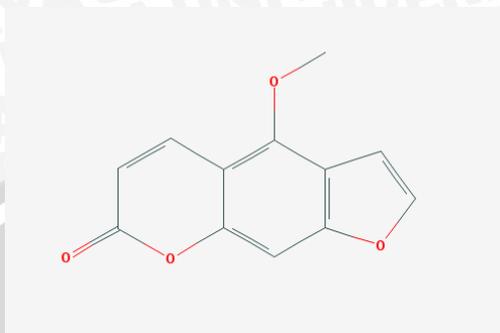
bertindak sebagai antikanker yaitu kumarin dengan rumus kimia  $C_9H_8O_2$ . Kumarin merupakan golongan senyawa fenilpropanoid yang memiliki cincin lakron lingkar enam dan memiliki inti 2H-1-benzopiran-2-on dengan rumus molekul  $C_9H_8O_2$  (Isnawati *et al.*, 2008). Pada dunia farmakologi kumarin dapat dijadikan sebagai antikanker, anti HIV, antibakteri dan anti inflamasi. Pada antitumor, kumarin dapat bertindak dengan menghalangi siklus pertumbuhan sel, merangsang apoptosis sel, mengganggu sintesa DNA/RNA terkait (Zhang *et al.*, 2016). Berbagai macam mekanisme kumarin dalam menghambat aktivitas antikanker, salah satunya yaitu dengan menginduksi apoptosis melalui penghambatan DNA topoisomerase serta peningkatan ekspresi gen p53 (Ihsan *et al.*, 2013). Pada beberapa penelitian, pelarut n-heksan dapat menyaring senyawa kumarin (Susilowati *et al.*, 2013). Struktur kimia senyawa kumarin dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Struktur Kimia Senyawa Kumarin  
Sumber: (CHEBI, 2016)

Gambar 9 (c) menunjukkan spectrum massa puncak kedua pada retensi waktu 3.24. Pada puncak spectrum ini diperoleh berat molekul 217 m/z  $[M+H]^+$ . Fragmentasi senyawa dengan berat molekul 216 m/z  $[M+H]^+$ . Hasil pencarian berat molekul di *massbank* menunjukkan senyawa yang diduga bertindak sebagai antikanker yaitu bergapten dengan rumus kimia  $C_{12}H_8O_4$ . Bergapten merupakan turunan dari kumarin. bergapten banyak digunakan dalam industri obat modern sebagai obat analgetika, anti fungi, antibakteri dan antikanker

(Trisilawati dan Pitono, 2012). Bergapten menjadi antiproliferasi dan menginduksi respon apoptosis pada kanker payudara (Panno *et al.*, 2010). Struktur kimia senyawa bergapten dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Struktur Kimia Senyawa Bergapten  
Sumber: (CHEBI, 2016)



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian tentang pengaruh ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan pelarut yang berbeda terhadap viabilitas sel Hela dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan jenis pelarut berbeda memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel Hela. Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan pelarut n-heksan memiliki persen viabilitas terendah yaitu 14,845%.
2. Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan variasi dosis memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel Hela. Ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* dengan dosis 500 ppm diketahui efektif dalam mematikan sel Hela.
3. Kombinasi antara jenis pelarut dan variasi dosis ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel Hela.
4. Senyawa yang diduga bertindak sebagai antikanker pada ekstrak daun *Bruguiera gymnorrhiza* pelarut n-heksan yaitu kumarin dan bergapten.

### 5.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu diharapkan adanya penelitian lanjutan dengan menggunakan sampel ekstrak yang dimurnikan misalnya dengan cara dipartisi atau fraksinasi dan dilakukan peningkatan dosis, serta dilakukan uji induksi apoptosis untuk mengetahui morfologi sel Hela setelah diberikan perlakuan pemberian ekstrak.

## DAFTAR PUSTAKA

- Apriyanto, H., E. Harpeni, A. Setyawan, Tarsim. 2014. Pemanfaatan Ekstrak Buah *Rhizophora* sp. Sebagai Anti Bakteri Terhadap Bakteri Patogen Ikan Air Tawar. e-Jurnal Rekayasa Dan Teknologi Budidaya Perairan Vol.III No.1 : 289-296.
- Artini, P.E.U.D., Astuti, K.W., Warditiani, N.K. 2013. Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). Jurusan Farmasi. FMIPA: Universitas Udayana. Bali. Hal 1-3.
- Astarina, N.W.G., Astuti, K.W., Warditiani N.K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). Jurusan Farmasi. FMIPA: Universitas Udayana. Bali. Hal 1-3.
- Balai Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2011, Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.03.1.23.08.11.07517 tahun 2011 Tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika, BPOM, Jakarta.
- Baraja, M. 2008. Uji toksisitas Ekstrak Daun *Ficus elastica* Nois ex Blume Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Baud, G.S., M.S. Sangi, H.S.J. Koleangan. 2014. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Batang Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli*) Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Jurnal Ilmiah Sains Vol. 14 No. 2 : 106-112
- Budiarto, Eko dan D. Anggraeni. 2003. Pengantar Epidemiologi Edisi 2. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. Hal 135.
- Burt, B.A., Eklund, S.A., Lewis, D.W. 1992. Dentistry, Dental Practice, and The Community 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 205-6
- Campbell, N.A., J.B. Reece, L.G. Mitchell. 1987. Biology. Alih Bahasa: Rahayu L., E.I.M. Adim, N. Anita, Andri, W.F. Wibowo, W. Manalu. 2002. Biologi. Edisi Kelima. Erlangga: Indonesia. Hal 398.
- Dai, J. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *J mol* 15,7313. Doi : 10.3390/molecules 15107313.
- Danarto, Y.C., S.A. Prihananto, Z.A. Pamungkas. 2011. Pemanfaatan Tanin Dari Kulit Kayu Bakau Sebagai Pengganti Gugus Fenol Pada Resin Fenol Formaldehid. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan" ISSN 1693-4393.
- Darmono, Ani, M. Hasan. 2002. Menyelesaikan Skripsi dalam Satu Semester. Jakarta: Grasindo. Hal 45.

- Dia, S.P.S., Nurjanah, A.M. Jacob. 2015. Komposisi Kimia Dan Aktivitas Antioksidan Akar, Kulit Batang Dan daun Lindur. JPHPI 2015, Vol. 18 No. 2: 205-219
- Diastuti, H. dan Suwandri. 2009. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Antikanker Ekstrak Kulit Batang *Rhizopora mucronata* serta Uji Toksisitasnya terhadap Larva Udang (*Artemia Salina* Leach). Molekul, Vol. 4. No. 2. : 54 – 61
- \_\_\_\_\_, Warsinah, Purwati. 2009. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun *Rhizopora mucronata* Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Dan Sel Raji. Molekul, Vol. 4 No. 1: 12-20.
- \_\_\_\_\_, dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker Dari Elstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora mucronata*. Majalah Farmasi Indonesia, 21 (4) : 266-271.
- Djajanegara, I. dan P. Wahyudi. 2009. Pemakaian Sel Hela Dalam Uji Sitoksisitas sFraksi Kloroform Dan Etanol Ekstrak Daun *Annona squamosa*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, Vol. 7 No. 1: 7-11.
- Djapiala, F.Y., Lita A.D.Y., Montulalu, F. Mentang. 2013. Kandungan Total Fenol Dalam Rumput Laut *Caulerpa racemosa* Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. FPIK Unsrat.
- Fajarningsih, N.D., H.I. Januar, M. Nursid, T. Wikanta. 2006. Poyensi Antitumor Ekstrak Spons *Crella papilata* Asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol.1 No.1 : 35-42.
- Freshney, R.I. 1987. Culture of Animal Cells : A Manual of Basif Technique. Edisi 4. Inc.Publication: New York 397.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Edisi Kedua. Bandung: Penerbit ITB.
- Hijaz, M.N. 2009. Uji Aktivitas Antioksidan Karaginan Dalam Alga Merah Jenis *Eucheuma spinosum* Dan *Gracillaria verrucosa*. Universitas Islam Negeri Malang. Malang.
- Hikmah, M.N. dan Zuliyana. 2010. Pembuatan Metil Ester (Biodisel) Dari Minyak Dedak Dan Metanol Dengan Proses Esterifikasi Dan Transesterifikasi. Skripsi Jurusan Teknik Kimia Universitas Diponegoro. Semarang. Hal 17.
- Huspa, D.H.P. 2009. Senyawa Antikanker Dan Inteksida Dari Genus *Aglaiia*. UNPAD Press. Hal 5.
- Jacob, A.M., Suptijah P., Zahidah. 2013. Komposisi Kimia, Komponen Bioaaktif dan Aktivitas Antioksidan Buah Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*). JPHPI, Vol. 16. 1 : 86-94.
- Ihsan, F., I. Setyawan, S. Satrio, A.D. Jayanti, S. Tito, E.H. Herningtyas. 2013. Ekstrak Purwaceng (*Pimpinella alpinna*) Sebagai Agen Kemopreventif Dan Kemoterapi Kanker Paru (*Kajian Antiproliferatif Serta Uji Apoptosis Melalui*

*Jalur P53, Bcl-2, Rb Dan Caspase- 9).* Fakultas Kedokteran UGM. Yogyakarta.

Indiyah, S.A. 2012. Aktivitas Antikanker dan Antioksidan Madu di Pasaran Lokal Indonesia. Skripsi. IPB. Bogor.

Isnawati, A., H. Mudahar, Kamilatunisah. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Kumarin Dari Tanaman *Artemia annua* (L). Media Litbang Kesehatan Vol. XVIII No. 3: 107-118.

Khairan, U.A. Jenie Dan R.S. Sudibyo. Fragmentation Studies Of  $\Delta^{6,7}$ -Anhydroeritromisin-A By Liquid Chromatography- Mass Spectroscopy (Lc- Ms). Indo. J. Chem., 9(3): 491-499.

Kumala, M. 2013. Karakteristik Aktivitas Antioksidan Dan Kandungan Polifenol Dari Teh Alga Cokelat (*Sargassum cristafolium*) Dengan Pelarut Etil Asetat. [Skripsi] Teknologi Hasil Perikanan. FPIK: Universitas Brawijaya. Malang.

Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida Dan Alkaloida. FMIPA: USU. Medan.

Lestari, P., S. Wijana, W.I. Putri. 2014. Ekstraksi Tanin Dari Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) Sebagai Pewarna Alami (Kajian Proporsi Pelarut Dan Waktu Ekstraksi). Jurusan Teknologi Industri Pertanian. FTP: Universitas Brawijaya. Malang.

Li, Q., N. Yu, Y. Wang, Y. Sun, K. Lu dan W. Guan. 2013. Extraction Optimization of *Bruguiera gymnorrhiza* Polysaccharides With Radical Scavenging Activities. Carbohydrate Polimers Vol.96 Issue 1, Pages 148-155.

Lushaini, S., M.A. Wibowo, P. Ardiningsih. Kandungan Total Fenol, Antivitas Antioksidan Dan Sitotoksik Daun Kedadai (*Ficus variegata* Blume). JKK, Vol. 4(2).

Maulida, D. dan N. Zulkarnaen. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) Dari Buah Tomat Dengan Menggunakan Solven Campuran, N-Heksan, Aseton, Dan Etanol. Skripsi Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Kimia: Universitas Diponegoro. Semarang.

Meyer, B.N. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. Drug Information Journal, Vol. 32: 513-524.

Muaja, A.D., H.S.J. Koleangan, M.R.J. Runtuwene. Uji Toksisitas Dengan /metode BSLT Dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauias bracteosa* DC). Dengan Metode Spxhletasi. Jurnal MIPA UNSRAT Inline 2(2): 115-118.

Mulia, K. 2015. Aktivitas Antikanker Dan Antioksidan Ekstrak Cabe Jawa Secara *In Vitro* Terhadap Sel MCF-7 Yang Berasal Dari Berbagai Lokasi Di Indonesia. [Tesis]. Pascasarjana ITB. Bogor. Hal 15

Mulyani, Y., E. Bachtiar, M.U. Kurnia. 2013. Peranan Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan Mangrove Terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas*

- hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). Jurnal Akuatika Vol.IV No.1: 1-9.
- Munawaroh, S dan P.A. Handayani. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) Dengan Pelarut Etanol Dan N-Heksan. Jurnal KompetensiTeksik Vol.2, No.1 : 73-78.
- Ningrum, I.P. 2011. Sitotoksisitas ekstrak Spons Laut *Aaptos suberitoides* Terhadap Siklus Sel Kanker Hela. Jurusan biologi.
- Noor, Y.R., M. Khazali, I.N.N Suryadiputra. Panduan Pengenalan Mangrove Di Indonesia. PHKA/WI-IP. Bogor.
- Nurhayati, A.P.D., N. Abdulgani, R. Febrianto. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma alvarezii* Terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. Akta Kimimdo Vol. 2 No. 1: 41-46.
- Ola, A.R.B., Z. Ikawati, Sismindari, E.D. Meye, B.D. Tawo. 2008. Identifikasi Molekular Dan Aktivitas Antikanker Alkil Fenol Dari Minyak Kulit Biji Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L) Asal Pulau Timor. Majalah Farmasi Indonesia 19(3): 137-144.
- Pane, E.R. 2013. Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan Dari Ekstrak Metanol Kulit Pisang Raja (*Musa paradisiaca* Sapientum). Valensi, Vol. 3 No.2: 76-81.
- Panno, M.I., F. Giordano, F. Mastroianni, M.G. Palma, V. Bartella, A. Carpino, S. Aquila, S. Andò. 2010. Breast Cancer Cell Survival Signal Is Affected Bybergapten Combined With An Ultraviolet Irradiation, FEBS Lett. 584 (2010): 2321–2326.
- Perry, R.H dan D.W. Green. 1984. *Perry's Chemical Engineering Handbook*, 6<sup>th</sup> ed, Mc Graw Hill Book Company, Inc, New York.
- Phoanda, T.C., R. Bara, P.M. Wonor, J. Posangi. 2014. Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit Akar Tumbuhan Bakau (*Bruguiera gymnorrhiza*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*. Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran, Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Pradana, D., D. Suryanto, Yunasfi. 2014. Uji Daya Hambat Ekstrak Kulit Batang *Rhizophora mucronata* Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* Dan Jamur *Saprolegnia* sp. Secara In Vitro. Universitas Sumatera Utara, Medan, Indonesia 20155.
- Prasetyorini, I.Y. Wiendarlina, A.B. Peron. toksisitas Beberapa Ekstrak Rimpang Cabang Temulawak (*Curcumanthorrhiza* Roxb.) Pada Larva Udang (*Artemia salina* Leach.). fitofarmaka Vol. 1 No. 2: 14-21.
- Puji, A.D.N., Sukardiman, H.T. Fadjri. 2011. Uji Sitoksisitas Dan Efek Ekstrak Spons Laut *Aaptos suberitoides* Terhadap Sel Kanker Serviks (Hela) Secara In Vitro. Fakultas MIPA: ITS. Surabaya
- Purnobasuki, H. 2014. Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat. Biota IX (2): 125-126.

- Putranti, R.I. 2013. Skrining Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum duplicatum* dan *Turbinaria ornata* Dari Jepara. Tesis FPIK: Universitas Diponegoro. Semarang.
- Putri, W.S., Warditiani, N.K., Larasati, L.P.F. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). Jurusan Farmasi. FMIPA: Universitas Udayana. Bali.
- Putri, H.L., R. Retnowati, Suratno. 2015. Fraksi N-Heksana Dari Ekstrak Metanol Daun Mangga Kasturi (*Mangifera casturi* Koesterm) Dan Uji Fitokimia. *Kimia Student Journal*, Vol.1, No.1 : 772-777.
- Rachmawati, S. Dan Widiyanti, P.M. 2013. Kadar Melamin pada Produk erbahan Susu dan Susu Bubuk yang Dianalisis secara *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS). *JITV* Vol. 18 No. 1: 63-69.
- Ratnayanti, K., A.A.A.I.A. Mayun., P. Indah S. 2012. Kadar Total Senyawa Fenolat Pada Madu Kelengkeng Serta Uji Aktivitas Antiradikal Bebas Dengan Metode DPPH. *Jurnal Kimia* 6(2): 163-168.
- Sakul, E. H., J.S.S. Manoppo, D. Taroreh, R.I.F. Gerungan, S. Gugule. 2012. Pengendalian Hama Kumbang Logong Dengan Menggunakan Ekstrak Biji Pangi (*Pangium edule* Reinw.). *Eugenia* Vol. 18 No. 3: 186-196
- Sangi, M.S., L.I. Momuat, M. Kumaunang. 2012. Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arenga pinnata*). *Jurnal Ilmiah Sains* Vol. 12 No. 2: 127-134
- Sari, D.K., D.H. Wardhani, A., Prasetyaningrat. 2012. Pengujian Kandungan Total Fenol *Kappahycus alvarezzi* Dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik Dengan Variasi Suhu Waktu. Prosiding SNST Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang Ke-3 tahun 2012, Hal 40-44.
- Sastrawan, I.N., M. Sangi, V. Kamu. Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Adas (*Foeniculum Vulgare*) Menggunakan Metode Dpph. *Jurnal Ilmiah Sains* Vol. 13 No. 2: 110-115.
- Septiana, A.T. dan A. Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargasuum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut Dan Metode Ekstraksi. *Agrointek* Vol. 6 No.1
- Sirait, M. 2007. Penuntun Fitokimia Dalam Farmasi. Bandung (ID): Penerbit ITB.
- Subekti, S. 2012. Pengolahan Mangrove Sebagai Salah Satu Keanekaragaman Bahan Pangan. Prosiding Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang: hal. 24-28.
- Sudarmadji, S., Bambang, H., Suhardi. 1984. Prosedur Analisis Untuk Bahan Makanan Dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Susanti, A.D., D. Ardiana, G. Gumelar, Y. Bening. 2012. Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak

Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glatinosa*). Simposium Nasional RAPI XI FT UMS, Hal 8-14.

Susilawati, H. Indriati N., W. Limra. 2013. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Steroid Dari Daun Rimpang (*Solanum torvum*). Repository University Of Riau.

Susilowati, S., A. Claesa, I. Arifin. 2013. Uji Sitotoksitas Fraksi N-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (*Medicago Sativa L.*) Pada Sel 47d Dan Sel Hela Serta Identifikasi Kandungan Senyawa Kimianya. Fakultas Farmasi Universitas wahid Hasyim Semarang. Semarang.

Torneck, C.D dan M. Torabinejad. 1997. Biologi Jaringan Pulpa dan Jaringan Sekitar Akar. Jakarta. EGC : 11-23.

Trisilawati, O Dan J. Pitono. 2012. Pengaruh Cekaman Defisit Air Terhadap Pembentukan Bahan Aktif Pada Purwoceng. Bul. Littro. Vol.23 No.1: 34-47.

Wahyunindiani, D.Y., S. Wijana, Sucipto. 2015. Pengaruh Perbedaan Suhu Dan Waktu Pengeringan Terhadap Aktivitas Antioksidan Bubuk Daun Sirsak (*Annona muricata L.*). Jurusan Teknologi Industri Pertanian. FTP: Universitas Brawijaya. Malang.

Warsinah, P. Lestari dan Trisnowati. 2007. Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Kulit Batang *Bruguiera gymnorrhiza* Terhadap Sel Meyloma. Molekul, Vol. 2 No. 1. Mei, 2007 : 23-29

Wicaksono, F.M., D.S.P. Sari, B.H. Sekti, Y. Sari, E. Natalia, D. Lyrawati, A.P. Febtiyanti. 2013. Pipecanthe Inovasi Terapi Kombinasi Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyntha*) dan Sirih Merah (*Piper crocaium*) Terhadap Peningkatan Aktivitas FAS/FAS-i Pada regresi Pertumbuhan Kanker Serviks Secara *in vitro*. Artikel. Hal 2-21.

Wink, M. 2013. Evolution Of Secondary Metabolites In Legumes (*Fabaceae*). South African Journal Of Butany. (89): 164-175.

Zhang, Li, Yu-Chao Yao, Meng-Ying Gao, Rui-Xue Rong, Ke-Rang Wang, Xiao-Liu Li, Hua Chen. 2016. Anticancer Activity And DNA Binding Property Of The Trimers Of Triphenylethylene-coumarin Hybrids. Chinese Chemical Letters 3716. Hal 1-9.

Zulaidah, A. Dan S. Subekti. 2015. Pengaruh Konsentrasi Asam Laktat dan Waktu Penyinaran Sinar UV Terhadap Baking Ekspansi Tepung Buah Mangrove Termodifikasi. Jurusan Teknik Kimia Universitas Pandanaran.

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Penelitian Pendahuluan

1. Kandungan fitokimia kulit batang, daun, buah *Bruguiera gymnorrhiza*

Bagian	Alkaloid	Flavonoid	Steroid	Terpenoid	Saponin
Daun	+	-	+	+	-
Buah	+	-	+	+	+
Kulit	+	+	+	+	+

2. Persentase kadar air kulit batang, daun, buah *Bruguiera gymnorrhiza*

Bagian	A	B	C	% Kadar air	Rata-rata
Kulit 1	73,63	75,5875	74,7971	40,37803321	40,28831
Kulit 2	94,4231	95,6316	95,1458	40,1985933	
Buah 1	81,7064	82,9004	82,3045	49,9078727	49,99327
Buah 2	83,6346	85,6051	84,6183	50,07866024	
Daun 1	86,1028	87,2147	86,5156	62,8743592	63,25536
Daun 2	83,6028	85,5674	84,3172	63,63636364	



**Lampiran 2. Hitungan Rendemen****a. Perhitungan rendemen ekstrak daun lindur pelarut n-heksan**

Berat serbuk daun lindur = 150 gram

Berat ekstrak daun lindur = 10,346 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak daun lindur}}{\text{berat serbuk daun lindur}} \times 100\%$$

$$= \frac{10,346}{150} \times 100\% = 6,897 \%$$

**b. Perhitungan rendemen ekstrak daun lindur pelarut etil asetat**

Berat serbuk daun lindur = 150 gram

Berat ekstrak daun lindur = 4,642 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak daun lindur}}{\text{berat serbuk daun lindur}} \times 100\%$$

$$= \frac{4,642}{150} \times 100\% = 3,09 \%$$

**c. Perhitungan rendemen ekstrak daun lindur pelarut metanol**

Berat serbuk daun lindur = 150 gram

Berat ekstrak daun lindur = 17,906 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak daun lindur}}{\text{berat serbuk daun lindur}} \times 100\%$$

$$= \frac{17,906}{150} \times 100\% = 11,937 \%$$

### Lampiran 3. Hasil Uji Kadar Air

#### a. Hasil kadar air daun lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*)

$$Wb = \frac{(\text{Berat botol} + \text{Berat sampel}) - \text{Berat akhir}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{(86,51+1) - 87,21}{1} \times 100\% = 63,64 \%$$

#### b. Hasil kadar air ekstrak daun lindur pelarut n-heksan

$$Wb = \frac{(\text{Berat botol} + \text{Berat sampel}) - \text{Berat akhir}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{(86,05+1) - 86,98}{1} \times 100\% = 7 \%$$

#### c. Hasil kadar air ekstrak daun lindur pelarut etil asetat

$$Wb = \frac{(\text{Berat botol} + \text{Berat sampel}) - \text{Berat akhir}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{(83,59+1) - 84,34}{1} \times 100\% = 25 \%$$

#### d. Hasil kadar air ekstrak daun lindur pelarut metanol

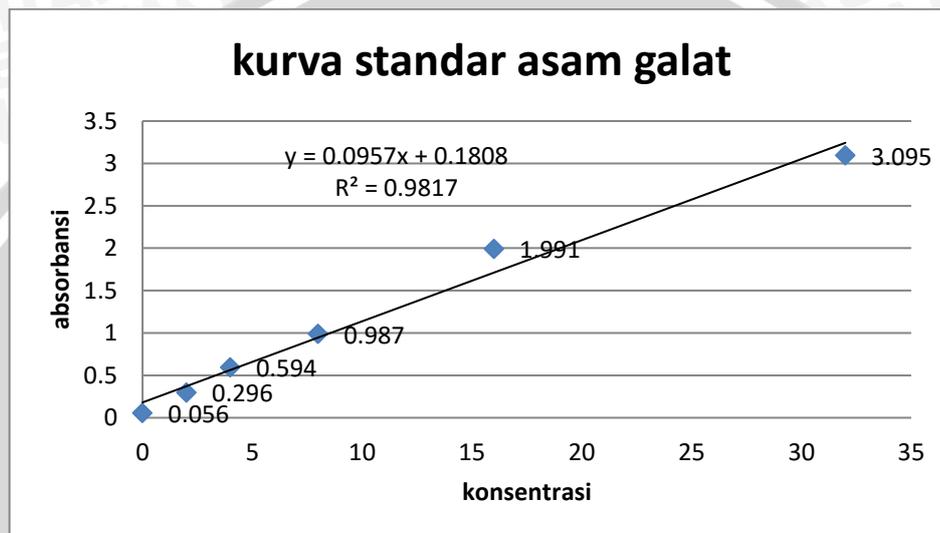
$$Wb = \frac{(\text{Berat botol} + \text{Berat sampel}) - \text{Berat akhir}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{(83,63+1) - 84,41}{1} \times 100\% = 22 \%$$

#### Lampiran 4. Hasil Uji Total Fenol

kurva standart asam galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0,056
2	0,296
4	0,594
8	0,987
16	1,991
32	3,095



Pelarut	Absorbansi / y	Berat Sampel (g)	a	b	x	Ekuivalen As. Galat
n-heksan	0,263	0,01	0,0957	0,180	0,8672	8,6729
Etil asetat	0,196	0,01	0,0957	0,180	0,1671	1,6718
metanol	0,240	0,01	0,0957	0,180	0,6269	6,2695

##### a. N-heksan

$$\frac{x \text{ (ekuivalen asam galat)}}{\text{berat sampel}} = \frac{p}{100 \text{ g}}$$

$$\frac{0,8672}{0,01 \text{ g}} = \frac{p}{100 \text{ g}}$$

$$p = \frac{8,6729 \times 100}{0,01}$$

$$p = 86729,36 \text{ mg GAE}/100 \text{ g}$$

$$p = 86,72936 \text{ g GAE}/100 \text{ g}$$

**b. Etil asetat**

$$\frac{x \text{ (ekuivalen asam galat)}}{\text{berat sampel}} = \frac{p}{100 \text{ g}}$$

$$\frac{0,1671}{0,01 \text{ g}} = \frac{p}{100 \text{ g}}$$

$$p = \frac{1,6718 \times 100}{0,01}$$

$$p = 16718,91 \text{ mg GAE/100 g}$$

$$p = 16,71891 \text{ g GAE/100 g}$$

**c. Metanol**

$$\frac{x \text{ (ekuivalen asam galat)}}{\text{berat sampel}} = \frac{p}{100 \text{ g}}$$

$$\frac{0,6269}{0,01 \text{ g}} = \frac{p}{100 \text{ g}}$$

$$p = \frac{6,2695 \times 100}{0,01}$$

$$p = 62695,92 \text{ mg GAE/100 g}$$

$$p = 62,69592 \text{ g GAE/100 g}$$



**Lampiran 5. Data Hasil Uji Toksisitas**

Data jumlah *Artemia salina* yang mati setelah uji toksisitas 24 jam

Konsentrasi (ppm)	Ulangan	Pelarut					
		n-heksan	Rerata n-heksan	Etil asetat	Rerata etil asetat	metanol	Rerata metanol
31,25	1	1		2		1	
	2	2	1	1	1	1	1
	3	1		1		0	
62,5	1	2		1		2	
	2	2	2	2	1	2	2
	3	2		1		1	
125	1	4		1		3	
	2	3	4	2	2	4	3
	3	4		2		3	
250	1	5		4		3	
	2	5	5	4	4	3	3
	3	6		3		2	
500	1	6		4		5	
	2	6	6	4	4	4	5
	3	5		4		6	
1000	1	6		5		6	
	2	6	6	6	5	4	5
	3	6		4		6	

**a. N-heksan**

Pengolahan data dengan analisa probit pada pelarut n-heksan dimulai dengan mencari % kematian yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas } Artemia = \frac{\text{Jumlah } Artemia \text{ mati}}{\text{jumlah } Artemia \text{ uji}} \times 100 \%$$

$$31,25 \text{ ppm} = \frac{1}{10} \times 100 \% = 10\%$$

$$62,5 \text{ ppm} = \frac{2}{10} \times 100 \% = 20\%$$

$$125 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 \% = 40\%$$

$$250 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 \% = 50\%$$

$$500 \text{ ppm} = \frac{6}{10} \times 100 \% = 60\%$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{6}{10} \times 100 \% = 60\%$$



Hasil dari % kematian *Artemia* pada setiap konsentrasi ditentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit persentase dibawah ini :

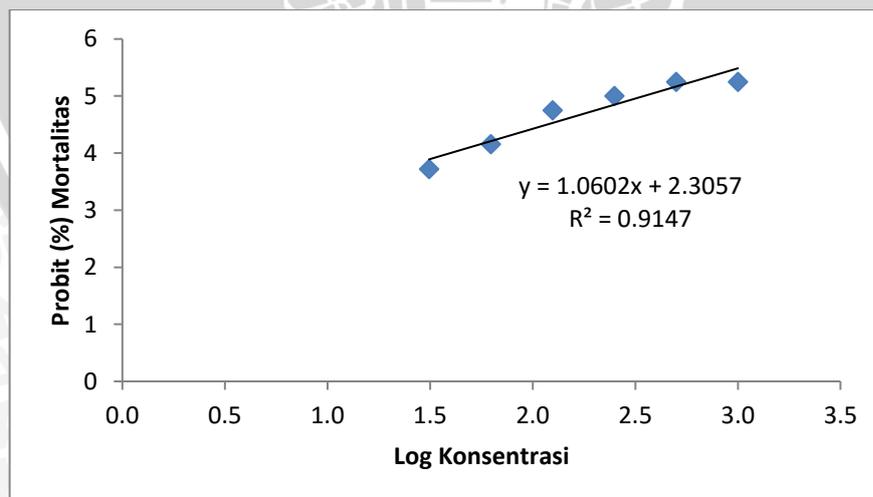
%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mortalitas										
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.30	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	0.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.40	7.51	7.58	7.65	7.75	7.58	8.09

Keterangan :

: kisaran angka (+) 1-9 % Mortalitas

- Log konsentrasi dan % probit mortalitas

Konsentrasi	Log Konsentrasi	% Probit
31,25	1,5	3,72
62,5	1,8	4,16
125	2,1	4,75
250	2,4	5,00
500	2,7	5,25
1000	3	5,25



Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan Probit % Mortalitas Ekstrak N-heksan Daun Lindur.

Didapatkan persamaan  $y = 1,0602x + 2,3057$ . Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, didapatkan konsentrasi yang menyebabkan sebanyak 50% kematian hewan uji.

$$y = 1,0602x + 2,3057$$

$$5 = 1,0602x + 2,3057$$

$$5 - 2,3057 = 1,0602x$$

$$2,6943 = 1,0602x$$

$$x = 2,6943 / 1,0602$$

$$x = 2,541$$

Anti Log dari 2,541 = 347,79 ppm

$$LC_{50} = 347,79 \text{ ppm}$$

#### b. Etil asetat

Pengolahan data dengan analisa probit pada pelarut n-heksan dimulai dengan mencari % kematian yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas } Artemia = \frac{\text{Jumlah Artemia mati}}{\text{jumlah Artemia uji}} \times 100 \%$$

$$31,25 \text{ ppm} = \frac{1}{10} \times 100 \% = 10\%$$

$$62,5 \text{ ppm} = \frac{1}{10} \times 100 \% = 10\%$$

$$125 \text{ ppm} = \frac{2}{10} \times 100 \% = 20\%$$

$$250 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 \% = 40\%$$

$$500 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100 \% = 40\%$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 \% = 50\%$$

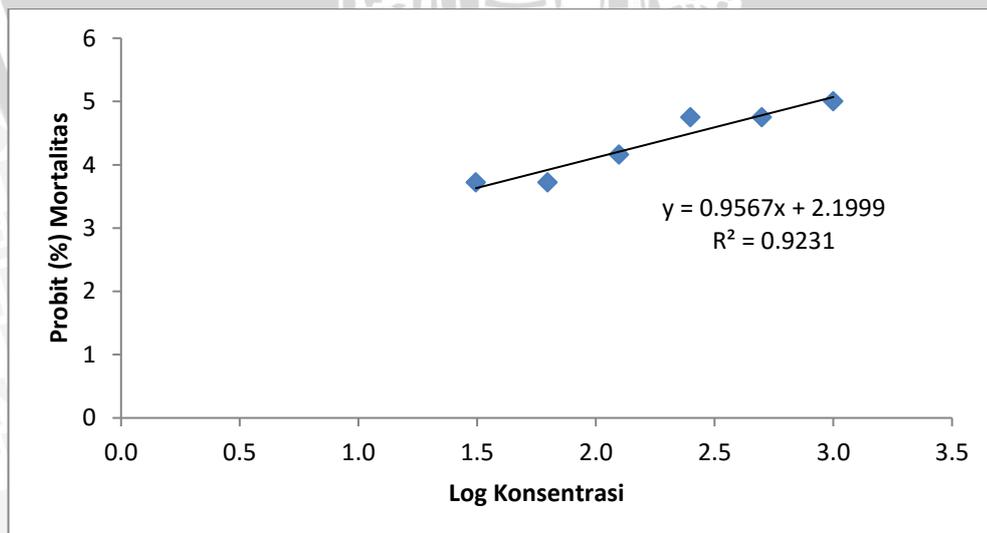
Hasil dari % kematian *Artemia* pada setiap konsentrasi ditentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit persentase dibawah ini :

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mortalitas										
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.30	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	0.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.40	7.51	7.58	7.65	7.75	7.58	8.09

Keterangan :

- : kisaran angka (+) 1-9 % Mortalitas
- Log konsentrasi dan % probit mortalitas

Konsentrasi	Log Konsentrasi	% Probit
31,25	1,5	3,72
62,5	1,8	3,72
125	2,1	4,16
250	2,4	4,75
500	2,7	4,75
1000	3	5



Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan Probit % Mortalitas Ekstrak Etil Asetat Daun Lindur.

Didapatkan persamaan  $y = 0,9567x + 2,1999$ . Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, didapatkan konsentrasi yang menyebabkan sebanyak 50% kematian hewan uji.

$$y = 0,9567x + 2,1999$$

$$5 = 0,9567x + 2,1999$$

$$2,1999 = 0,9567x$$

$$x = 2,1999 / 0,9567$$

$$x = 2,93$$

Anti Log dari 2,93 = 844,95 ppm

$$LC_{50} = 844,95 \text{ ppm}$$

### c. Metanol

Pengolahan data dengan analisa probit pada pelarut n-heksan dimulai dengan mencari % kematian yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas } Artemia = \frac{\text{Jumlah Artemia mati}}{\text{jumlah Artemia uji}} \times 100 \%$$

$$31,25 \text{ ppm} = \frac{1}{10} \times 100 \% = 10\%$$

$$62,5 \text{ ppm} = \frac{2}{10} \times 100 \% = 20\%$$

$$125 \text{ ppm} = \frac{3}{10} \times 100 \% = 30\%$$

$$250 \text{ ppm} = \frac{3}{10} \times 100 \% = 30\%$$

$$500 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100 \% = 50\%$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{6}{10} \times 100 \% = 60\%$$

Hasil dari % kematian *Artemia* pada setiap konsentrasi ditentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit persentase dibawah ini :

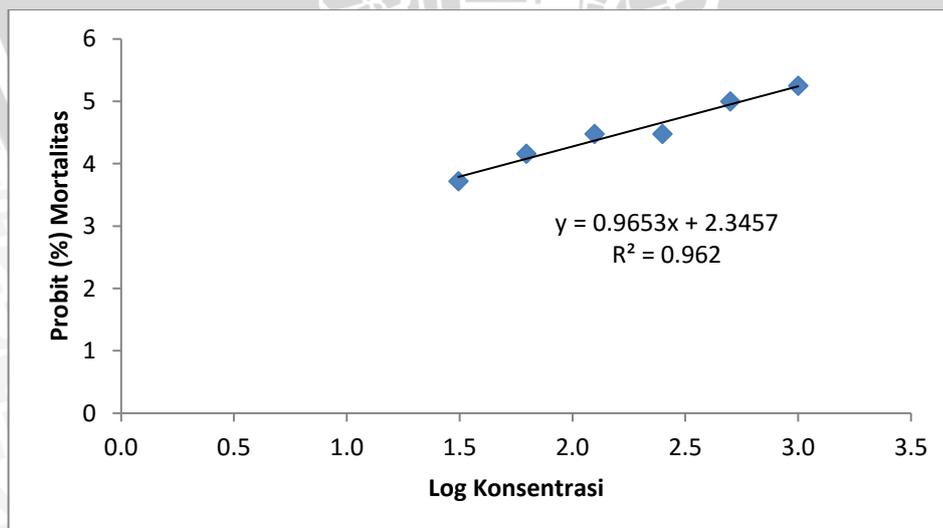
% Mortalitas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.30	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	0.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.40	7.51	7.58	7.65	7.75	7.58	8.09

Keterangan :

: kisaran angka (+) 1-9 % Mortalitas

- Log konsentrasi dan % probit mortalitas

Konsentrasi	Log Konsentrasi	% Probit
31,25	1,5	3,72
62,5	1,8	4,16
125	2,1	4,48
250	2,4	4,48
500	2,7	5
1000	3	5,25



Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan Probit % Mortalitas Ekstrak Metanol Daun Lindur.

Didapatkan persamaan  $y = 0,9653x + 2,3457$ . Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, didapatkan konsentrasi yang menyebabkan sebanyak 50% kematian hewan uji.

$$y = 0,9653x + 2,3457$$

$$y = 0,9653x + 2,3457$$

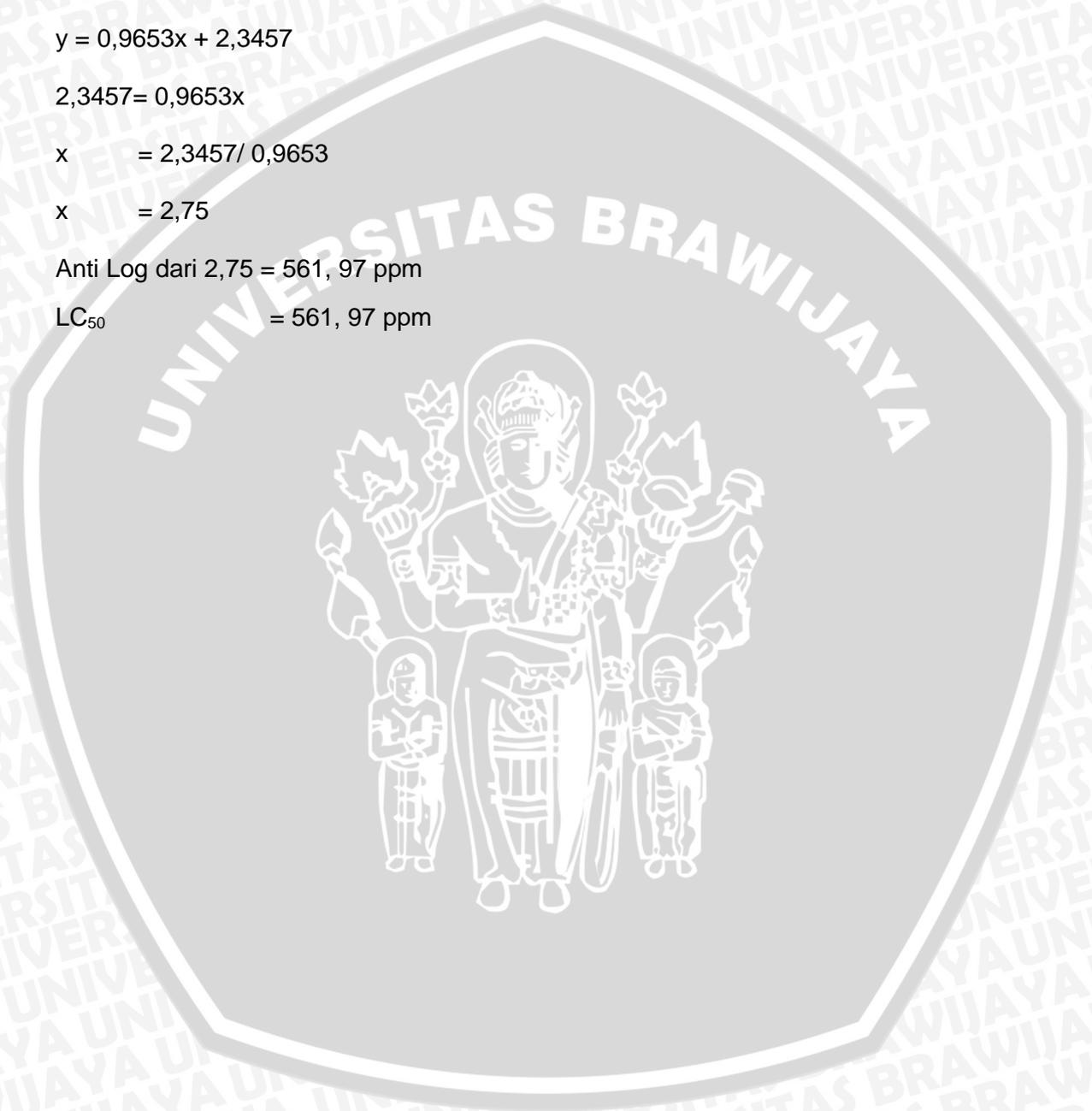
$$2,3457 = 0,9653x$$

$$x = 2,3457 / 0,9653$$

$$x = 2,75$$

Anti Log dari 2,75 = 561, 97 ppm

$$LC_{50} = 561, 97 \text{ ppm}$$



### Lampiran 6. Perhitungan Dosis Uji Sitotoksitas

- Pembuatan Larutan Induk

Diketahui: Berat sampel ekstrak n-heksan = 31 mg; volume pelarut = 13100  $\mu$ l

Berat sampel ekstrak etil asetat = 41 mg; volume pelarut = 14100  $\mu$ l

Berat sampel ekstrak metanol = 25 mg; volume pelarut = 12500  $\mu$ l

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

Konsentrasi larutan induk:

$$\begin{aligned} \text{N-heksan} &= \frac{31 \text{ mg}}{13100 \mu\text{l}} \times 10^6 \\ &= 2366 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Etil Asetat} &= \frac{41 \text{ mg}}{14100 \mu\text{l}} \times 10^6 \\ &= 2907 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Metanol} &= \frac{25 \text{ mg}}{12500 \mu\text{l}} \times 10^6 \\ &= 2000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

- Perhitungan dosis ekstrak n-heksan

Diketahui : media sel 100  $\mu$ l

dosis (31,25ppm, 62,5ppm, 125ppm, 250ppm, dan 500ppm)

- Konsentrasi 31,25 ppm

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

$$V_1 \times 2366 = 100 \times 31,25$$

$$V_1 \times 2366 = 3125$$

$$V_1 = \frac{3125}{2366}$$

$$V_1 = 1,320 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 62,5 ppm

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

$$V_1 \times 2366 = 100 \times 62,5$$

$$V_1 \times 2366 = 6250$$

$$V_1 = \frac{6250}{2366}$$

$$V_1 = 2,641 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 125 ppm

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

$$V_1 \times 2366 = 100 \times 125$$

$$V_1 \times 2366 = 12500$$

$$V_1 = \frac{12500}{2366}$$

$$V_1 = 5,2831 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 250 ppm

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

$$V_1 \times 2366 = 100 \times 250$$

$$V_1 \times 2366 = 25000$$

$$V_1 = \frac{25000}{2366}$$

$$V_1 = 10,56 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 500 ppm

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

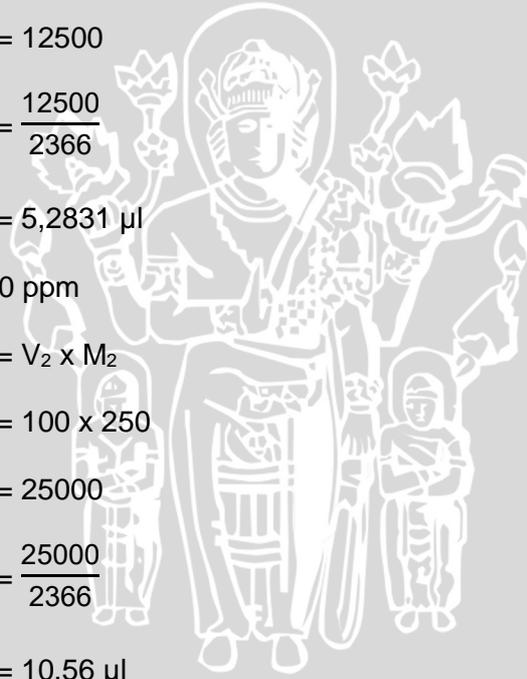
$$V_1 \times 2366 = 100 \times 500$$

$$V_1 \times 2366 = 50000$$

$$V_1 = \frac{50000}{2366}$$

$$V_1 = 21,13 \mu\text{l}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



- **Perhitungan dosis ekstrak etil asetat**

Diketahui : media sel 100  $\mu$ l

dosis (31,25ppm, 62,5ppm, 125ppm, 250ppm, dan 500ppm)

- Konsentrasi 31,25 ppm

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

$$V_1 \times 2907 = 100 \times 31,25$$

$$V_1 \times 2907 = 3125$$

$$V_1 = \frac{3125}{2907}$$

$$V_1 = 1,749 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 62,5 ppm

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

$$V_1 \times 2907 = 100 \times 62,5$$

$$V_1 \times 2907 = 6250$$

$$V_1 = \frac{6250}{2907}$$

$$V_1 = 2,149 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 125 ppm

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

$$V_1 \times 2907 = 100 \times 125$$

$$V_1 \times 2907 = 12500$$

$$V_1 = \frac{12500}{2907}$$

$$V_1 = 4,299 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 250 ppm

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

$$V_1 \times 2907 = 100 \times 250$$

$$V_1 \times 2907 = 25000$$

$$V_1 = \frac{25000}{2907}$$

$$V_1 = 8,599 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 500 ppm

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

$$V_1 \times 2907 = 100 \times 500$$

$$V_1 \times 2907 = 50000$$

$$V_1 = \frac{50000}{2907}$$

$$V_1 = 17,199 \mu\text{l}$$

- **Perhitungan dosis ekstrak metanol**

Diketahui : media sel 100  $\mu\text{l}$

dosis (31,25ppm, 62,5ppm, 125ppm, 250ppm, dan 500ppm)

- Konsentrasi 31,25 ppm

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

$$V_1 \times 2000 = 100 \times 31,25$$

$$V_1 \times 2000 = 3125$$

$$V_1 = \frac{3125}{2000}$$

$$V_1 = 1,562 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 62,5 ppm

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

$$V_1 \times 2000 = 100 \times 62,5$$

$$V_1 \times 2000 = 6250$$

$$V_1 = \frac{6250}{2000}$$

$$V_1 = 3,125 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 125 ppm

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

$$V_1 \times 2000 = 100 \times 125$$

$$V_1 \times 2000 = 12500$$

$$V_1 = \frac{12500}{2000}$$

$$V_1 = 6,25 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 250 ppm

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

$$V_1 \times 2000 = 100 \times 250$$

$$V_1 \times 2000 = 25000$$

$$V_1 = \frac{25000}{2000}$$

$$V_1 = 12,5 \mu\text{l}$$

- Konsentrasi 500 ppm

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

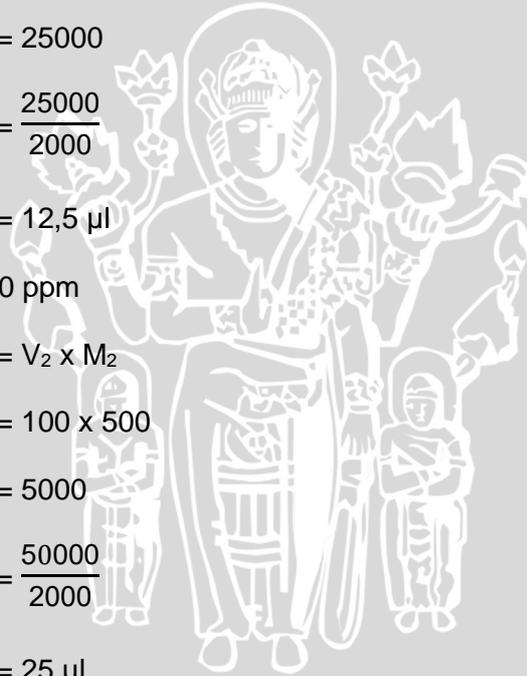
$$V_1 \times 2000 = 100 \times 500$$

$$V_1 \times 2000 = 50000$$

$$V_1 = \frac{50000}{2000}$$

$$V_1 = 25 \mu\text{l}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran 7. Hasil Uji Viabilitas Sel Hela

Pelarut	Dosis (ppm)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
N-heksan	31.25	0.226	0.232	0.222
	62.5	0.216	0.213	0.222
	125	0.190	0.181	0.191
	250	0.159	0.154	0.159
	500	0.169	0.176	0.172
Etil asetat	31.25	0.247	0.244	0.258
	62.5	0.243	0.231	0.232
	125	0.238	0.233	0.247
	250	0.235	0.229	0.221
	500	0.190	0.198	0.197
Metanol	31.25	0.270	0.261	0.273
	62.5	0.240	0.247	0.240
	125	0.189	0.190	0.186
	250	0.207	0.212	0.216
	500	0.189	0.182	0.186

Optical density kontrol media = 0,128

Optical density kontrol negatif = 0,3256

Rumus:

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{(\text{OD Perlakuan} - \text{OD Medium})}{(\text{OD Kontrol} - \text{OD Medium})} \times 100\%$$

### 1. N-heksan

#### • 31,25 ppm

a.  $\% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,226 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 49,595\%$

b.  $\% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,232 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 52,753\%$

c.  $\% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,222 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 47,449\%$

#### • 62,5 ppm

a.  $\% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,216 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 44,676\%$

b.  $\% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,213 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 43,158\%$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,222 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 47,713\%$$

- **125 ppm**

$$a. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,190 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 31,377\%$$

$$b. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,181 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 26,822\%$$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,191 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 31,883\%$$

- **250 ppm**

$$a. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,159 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 15,688\%$$

$$b. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,154 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 13,158\%$$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,159 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 15,688\%$$

- **500 ppm**

$$a. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,169 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 20,700\%$$

$$b. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,176 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 24,328\%$$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,172 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 22,279\%$$

## 2. Etil asetat

- **31,25 ppm**

$$a. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,247 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 60,308\%$$

$$b. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,244 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 58,583\%$$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,258 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 65,826\%$$

- **62,5 ppm**

$$a. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,243 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 58,198\%$$

$$b. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,231 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 52,126\%$$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,232 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 52,632\%$$

- **125 ppm**

$$a. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,238 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 55,789\%$$

$$b. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,233 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 52,992\%$$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,247 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 60,247\%$$

- **250 ppm**

$$a. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,235 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 54,150\%$$

$$b. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,229 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 51,235\%$$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,221 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 46,943\%$$

- **500 ppm**

$$a. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,190 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 31,377\%$$

$$b. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,198 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 35,474\%$$

$$c. \% \text{ Viabilitas} = \frac{(0,197 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 34,870\%$$

### 3. Metanol

- **31,25 ppm**

a. % Viabilitas =  $\frac{(0,270 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 71,862\%$

b. % Viabilitas =  $\frac{(0,261 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 67,308\%$

c. % Viabilitas =  $\frac{(0,273 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 73,381\%$

- **62,5 ppm**

a. % Viabilitas =  $\frac{(0,240 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 56,680\%$

b. % Viabilitas =  $\frac{(0,247 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 60,223\%$

c. % Viabilitas =  $\frac{(0,240 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 56,680\%$

- **125 ppm**

a. % Viabilitas =  $\frac{(0,189 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 30,773\%$

b. % Viabilitas =  $\frac{(0,190 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 31,510\%$

c. % Viabilitas =  $\frac{(0,186 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 29,316\%$

- **250 ppm**

a. % Viabilitas =  $\frac{(0,207 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 39,943\%$

b. % Viabilitas =  $\frac{(0,212 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 42,510\%$

c. % Viabilitas =  $\frac{(0,216 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 44,571\%$

- **500 ppm**

a. % Viabilitas =  $\frac{(0,189 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 31,089\%$

b. % Viabilitas =  $\frac{(0,182 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 27,206\%$

c. % Viabilitas =  $\frac{(0,186 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 29,255\%$

a. **Tabel Anova Viabilitas Sel Hela**

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable:hasil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10718.277 <sup>a</sup>	14	765.591	106.918	.000
Intercept	84526.955	1	84526.955	1.180E4	.000
perlakuan_a	2856.291	2	1428.146	199.447	.000
perlakuan_b	7017.036	4	1754.259	244.990	.000
perlakuan_a * perlakuan_b	844.950	8	105.619	14.750	.000
Error	214.816	30	7.161		
Total	95460.049	45			
Corrected Total	10933.094	44			

a. R Squared = ,980 (Adjusted R Squared = ,971)

**b. Tabel Duncan (Pelarut)**

hasil				
Duncan				
pelarut	N	Subset		
		1	2	3
n-heksan	15	32.4856		
metanol	15		46.1518	
etil asetat	15			51.3833
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 7,161.

**c. Tabel Duncan (Dosis)**

hasil						
Duncan						
dosis	N	Subset				
		1	2	3	4	5
500	9	25.9750				
250	9		34.5816			
125	9			42.2291		
62.5	9				53.1306	
31.25	9					60.7850
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 7,161.



d. Tabel Interaksi

hasil

Duncan

interaksi	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
n-heksan 500	3	14.8447							
n-heksan 250	3		22.4357						
metanol 500	3			29.1733					
n-heksan 125	3			30.0273					
metanol 250	3			30.5330					
etil asetat 500	3			33.9070					
metanol 125	3				42.3413				
n-heksan 62.5	3				45.1880				
n-heksan 31.25	3					49.9323			
etil asetat 250	3					50.7760			
etil asetat 125	3					54.3187	54.3187		
etil asetat 62.5	3						56.3427		
metanol 62.5	3						57.8610	57.8610	
etil asetat 31.25	3							61.5723	
metanol 31.25	3								70.8503
Sig.		1.000	1.000	.055	.203	.066	.135	.100	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## Lampiran 8. Hasil Mortalitas Sel Hela

Pelarut	Dosis (ppm)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
N-heksan	31.25	0.226	0.232	0.222
	62.5	0.216	0.213	0.222
	125	0.190	0.181	0.191
	250	0.159	0.154	0.159
	500	0.169	0.176	0.172
Etil asetat	31.25	0.247	0.244	0.258
	62.5	0.243	0.231	0.232
	125	0.238	0.233	0.247
	250	0.235	0.229	0.221
	500	0.190	0.198	0.197
Metanol	31.25	0.270	0.261	0.273
	62.5	0.240	0.247	0.240
	125	0.189	0.190	0.186
	250	0.207	0.212	0.216
	500	0.189	0.182	0.186

Optical density kontrol media = 0.128

Optical density kontrol negatif = 0.3256

Rumus:

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{(\text{OD Kontrol} - \text{OD Medium}) - (\text{OD Perlakuan} - \text{OD Medium})}{(\text{OD Kontrol} - \text{OD Medium})} \times 100\%$$

### 1. N-heksan

#### • 31,25 ppm

a.  $\% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,226 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 50,405\%$

b.  $\% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,232 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 47,247\%$

c.  $\% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,222 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 52,551\%$

#### • 62,5 ppm

a.  $\% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,216 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 55,324\%$

b.  $\% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,213 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 56,842\%$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,222 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 52,287\%$$

- **125 ppm**

$$a. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,190 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 68,623\%$$

$$b. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,181 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 73,178\%$$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,191 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 68,117\%$$

- **250 ppm**

$$a. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,159 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 84,312\%$$

$$b. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,154 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 86,842\%$$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,159 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 84,312\%$$

- **500 ppm**

$$a. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,169 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 79,300\%$$

$$b. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,176 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 75,672\%$$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,172 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 77,721\%$$

## 2. Etil asetat

- **31,25 ppm**

$$a. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,247 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 39,692\%$$

$$b. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,244 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 41,417\%$$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,258 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 34,174\%$$

- **62,5 ppm**

$$a. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,243 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 41,802\%$$

$$b. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,231 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 47,874\%$$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,232 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 47,368\%$$

- **125 ppm**

$$a. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,238 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 44,211\%$$

$$b. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,233 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 47,008\%$$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,247 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 39,753\%$$

- **250 ppm**

$$a. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,235 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 45,850\%$$

$$b. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,229 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 48,765\%$$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,221 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 53,057\%$$

- **500 ppm**

$$a. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,190 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 68,623\%$$

$$b. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,198 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 64,526\%$$

$$c. \% \text{ Mortalitas} = \frac{(0,3256 - 0,128) - (0,197 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 65,130\%$$

### 3. Metanol

- **31,25 ppm**

a. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,270 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 28,138\%$

b. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,261 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 32,692\%$

c. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,273 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 26,619\%$

- **62,5 ppm**

a. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,240 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 43,320\%$

b. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,247 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 39,777\%$

c. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,240 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 43,320\%$

- **125 ppm**

a. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,189 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 69,227\%$

b. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,190 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 68,490\%$

c. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,186 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 70,684\%$

- **250 ppm**

a. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,207 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 60,057\%$

b. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,212 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 57,490\%$

c. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128) - (0,216 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 55,429\%$

- **500 ppm**

a. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128)-(0,189 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 68,911\%$

b. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128)-(0,182 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 72,794\%$

c. % Mortalitas =  $\frac{(0,3256 - 0,128)-(0,186 - 0,128)}{(0,3256 - 0,128)} \times 100\% = 70,745\%$

e. **Tabel Anova Mortalitas Sel Hela**

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable:hasil

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10717.365 <sup>a</sup>	14	765.526	106.950	.000
Intercept	144463.282	1	144463.282	2.018E4	.000
perlakuan_a	2856.829	2	1428.415	199.561	.000
perlakuan_b	7015.661	4	1753.915	245.036	.000
perlakuan_a * perlakuan_b	844.875	8	105.609	14.754	.000
Error	214.734	30	7.158		
Total	155395.381	45			
Corrected Total	10932.099	44			

a. R Squared = ,980 (Adjusted R Squared = ,971)



**f. Tabel Duncan (Pelarut)**

hasil				
Duncan				
pelarut	N	Subset		
		1	2	3
etil asetat	15	48.6167		
metanol	15		53.8462	
n-heksan	15			67.5155
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 7,158.

**g. Tabel Duncan (Dosis)**

hasil						
Duncan						
dosis	N	Subset				
		1	2	3	4	5
31.25	9	39.2150				
62.5	9		46.8713			
125	9			57.7709		
250	9				65.4184	
500	9					74.0217
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 7,158.



h. Tabel Interaksi

hasil

Duncan

interaksi	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
metanol 31.25	3	29.1497							
etil asetat 31.25	3		38.4277						
metanol 62.5	3		42.1390	42.1390					
etil asetat 62.5	3			43.6573					
etil asetat 125	3			45.6813	45.6813				
etil asetat 250	3				49.2240				
n-heksan 31.25	3				50.0677				
n-heksan 62.5	3					54.8177			
metanol 125	3					57.6587			
etil asetat 500	3						66.0930		
metanol 250	3						69.4670		
n-heksan 125	3						69.9727		
metanol 500	3						70.8167		
n-heksan 250	3							77.5643	
n-heksan 500	3								85.1553
Sig.		1.000	.100	.135	.066	.203	.055	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 9. Ekstraksi Daun *Bruguiera gymnorrhiza*



Daun *Bruguiera gymnorrhiza*



Pengovenan daun *Bruguiera gymnorrhiza*



Daun *Bruguiera gymnorrhiza* yang telah kering diblender



Penimbangan sampel



Dimasukkan kedalam botol kaca



Penambahan larutan



Dikocok ± 6 jam dan didiamkan selama 2x24 jam



Penyaringan dengan kertas saring



Proses evaporasi



Penyemprotan nitrogen

Lampiran 10. Ekstraksi Daun *Bruguiera gymnorrhiza*



Kultur *artemia salina* selama 2x24 jam



Pembuatan larutan stok ekstrak



Larutan ekstrak dimasukkan ke botol vial sesuai dosis yang digunakan dan ditambahkan air laut hingga volume mencapai 5 ml



*Artemia salina* dimasukkan ke botol vial sebanyak 10 ekor



Pengamatan *artemia salina* setelah 24 jam



### Lampiran 11. Uji Viabilitas Sel Hela



Penimbangan sampel



Penambahan DMSO



Larutan sampel di vortex sampai homogen



Penyaringan dan penggantian ampul pada larutan sampel



Kultur sel Hela diambil dari inkubator



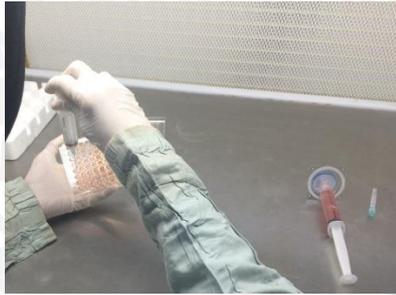
Pemetaan plate



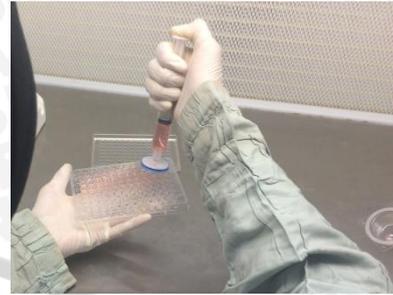
Penambahan larutan ekstrak sesuai dosis



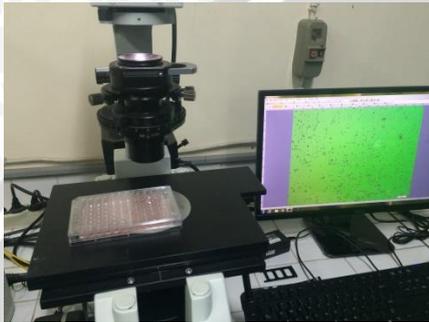
Inkubasi selama 24 jam



Pengambilan media yang bercampur dengan ekstrak



Pemberian media baru



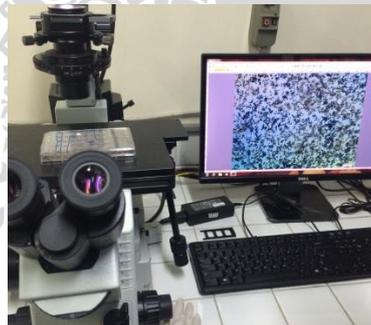
Pengamatan pada mikroskop inverted sebelum penambahan MTT



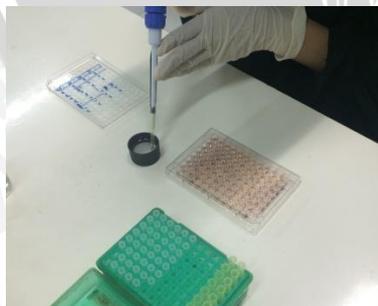
Penambahan MTT



Di inkubasi selama 3 jam sampai membentuk kristal ungu



Pengamatan sel pada mikroskop inverted setelah pemberian MTT

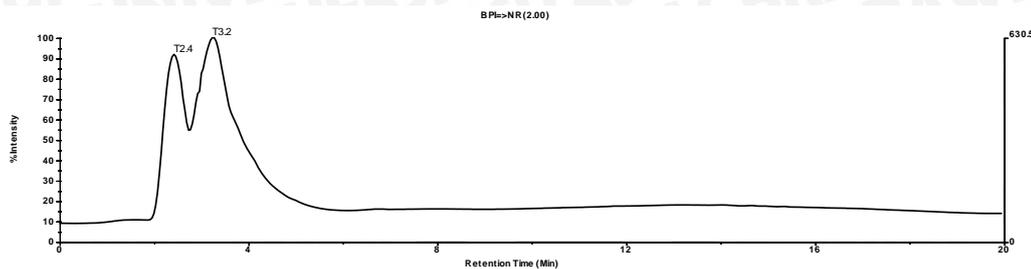


Pemberian larutan stopper



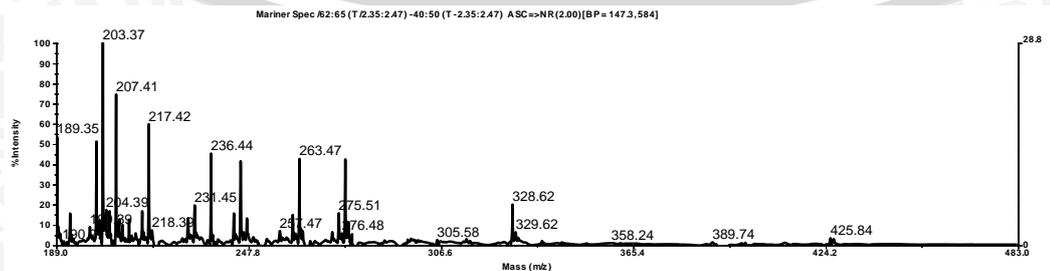
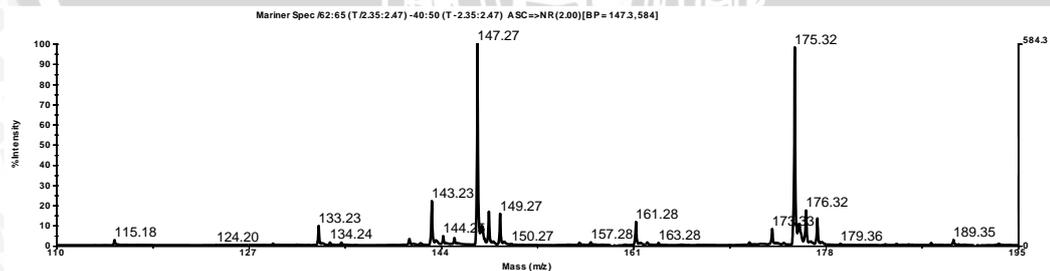
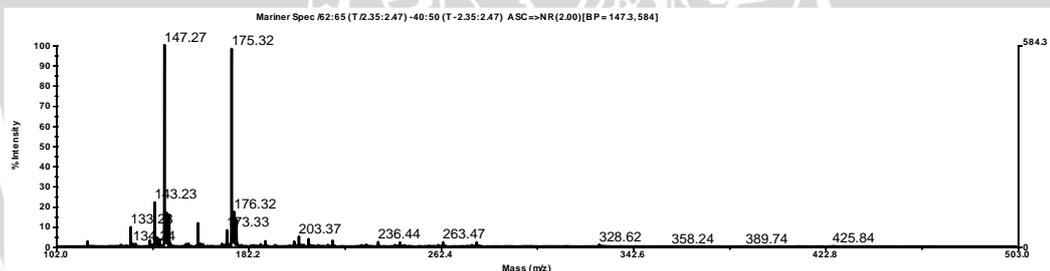
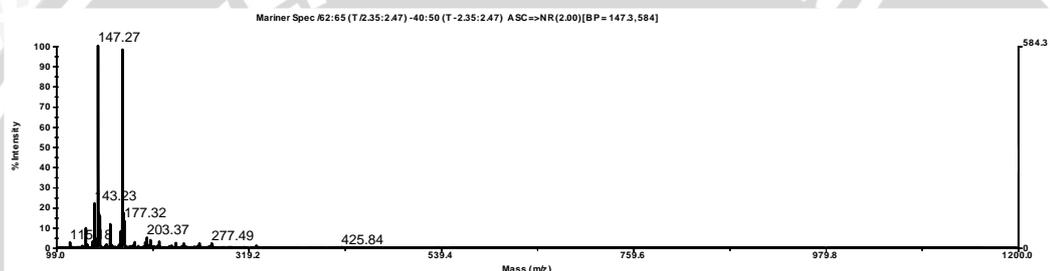
Perhitungan sel pada *elisa reader*

Lampiran 12. Hasil Uji LCMS



Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	2.426833	1.886717	2.737267	578	6663.63
2	3.241833	2.814383	5.997967	631	13994.02

Rt 2.42



Rt 3.24

