

# SKRIPSI

NADIA FATMA PRATIWI

**UJI PRASKRINING AKTIVITAS ANTIKANKER  
EKSTRAK ETER DAN EKSTRAK METANOL  
*Marchantia cf. planiloba* Steph. DENGAN METODE  
BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST)**



**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM  
SURABAYA  
2004**

**Lembar Pengesahan**

**UJI PRASKRINING AKTIVITAS ANTIKANKER  
EKSTRAK ETER DAN EKSTRAK METANOL  
*Marchantia cf. planiloba Steph.* DENGAN METODE  
BRINE SHRIMP LETHALY TEST (BST)**

**SKRIPSI**

**Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada  
Fakultas Farmasi UNAIR**

**Tahun 2004**

**Oleh :**

Nadia Fatma Pratiwi  
050012281

Disetujui Oleh :

Pembimbing utama

Drs. Sukardiman, MS  
NIP. 131801629

Pembimbing serta

Drs. Abdul Rahman, M.Si  
NIP. 131653432

## KATA PENGANTAR

### BISMILLAHIRRAHMANIRRAHIM

Alhamdulillahirrobbil'alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas segala limpahan rahmat, nikmat dan pertolonganNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **UJI PRASKRINING AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETER DAN EKSTRAK METANOL LUMUT HATI, *Marchantia cf. planiloba* Steph. DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST)** yang diajukan untuk memperoleh gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Penulisan skripsi ini dapat diselesaikan dengan adanya bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dengan hati yang tulus perkenankan penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
2. Drs. Sukardiman, MS. selaku dosen pembimbing utama yang senantiasa membimbing dan banyak memberikan semangat serta bantuan baik material maupun spiritual dan kepada Drs. Abdul Rahman, MSi. selaku dosen pembimbing serta yang sabar dalam memberikan bimbingan, saran dan kritik kepada penulis.
3. Drs. Herra Studiawan, Apt., MS. dan Dra. Aty Widyawaruyanti, Apt., MSi. selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan kritik dan saran kepada penulis.
4. Keluarga tercinta yang telah banyak memberikan dukungan, kasih sayang dan do'anya. Semoga Allah Subhanahu Wa Ta'ala selalu melindungi kita.
5. Saudari-saudariku fillah, jazakillah atas indahnya ukhuwah di antara kita.
6. Teman-teman seperjuangan, khususnya anak-anak lumutpepaya 2000, *What Incredible Team's !*
7. Para analis dan laboran Bagian Ilmu Bahan Alam, Multipurpose Laboratory I dan II terima kasih atas segala bantuannya

8. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah banyak membantu dan memberikan dukungan kepada penulis

Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia. Sesungguhnya kebenaran itu hanyalah milik Allah Subhanahu Wa Ta'ala.

Penulis mohon maaf bila ada kekhilafan dalam penyusunan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat, khususnya bagi kalangan ilmiah dan masyarakat pada umumnya.

Surabaya, Agustus 2004

Penulis

## RINGKASAN

Sampai saat ini penyakit kanker masih menjadi salah satu penyakit yang paling ditakuti masyarakat. Berbagai usaha telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit ini seperti pembedahan, terapi radiasi, kemoterapi dan sebagainya. Namun hingga kini masih belum ditemukan cara yang dapat mengatasi penyakit tersebut secara memuaskan. Cara lain yang dipilih sebagian penderita penyakit ini adalah dengan memanfaatkan bahan alam yaitu dengan menggunakan tanaman obat. Karena itu masih dicari obat yang efektif untuk mengobati kanker, termasuk obat tradisional.

Dalam suatu penelitian yang dilakukan di Jepang terhadap lumut hati dari spesies *Marchantia polymorpha* L. ternyata diperoleh senyawa bioaktif yang menunjukkan aktivitas sitotoksik (antikanker). Pada mulanya tumbuhan lumut sempat diabaikan karena mempunyai kandungan racun dan aroma yang tidak sedap sewaktu diremas. Namun setelah diadakan penelitian lebih lanjut, ternyata tumbuhan lumut mempunyai kandungan bioaktif yang dapat digunakan untuk antialergi, antimikroba, diuretik dan antikanker (Asakawa, 1984).

Berdasarkan studi kemotaksonomi maka tanaman yang memiliki kekerabatan cukup dekat kemungkinan memiliki kandungan senyawa yang hampir sama. Mengacu pada penelitian tersebut maka dilakukan penelitian terhadap spesies lain dari famili Marchantiaceae yang tumbuh di Indonesia yaitu *Marchantia cf planiloba* Steph.

Salah satu metode untuk menguji bahan-bahan yang bersifat sitotoksik adalah dengan uji toksisitas terhadap larva udang dari *Artemia Salina* Leach (*Brine Shrimp Lethality Test*). Hasil uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian anak udang *Artemia salina* Leach. Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya  $LC_{50}$  selama 24 jam dengan menggunakan *Probit Analysis*. Bila masing-masing ekstrak yang diuji kurang dari 1000  $\mu\text{g/ml}$  maka dianggap menunjukkan aktivitas biologik.

Dari ekstrak yang diuji yaitu ekstrak metanol dan ekstrak eter keduanya mempunyai harga  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ , masing-masing  $247,10 \pm 5,28 \mu\text{g/ml}$  dan  $453,16 \pm 3,66 \mu\text{g/ml}$ . Hal ini menunjukkan bahwa kedua-duanya baik ekstrak metanol maupun ekstrak eter mempunyai aktivitas biologik antikanker menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Dan dari hasil skrining diketahui bahwa dalam ekstrak metanol terkandung senyawa golongan steroid/triterpenoid.

Penelitian ini masih merupakan penelitian pendahuluan yang perlu dilanjutkan dengan uji aktivitas antikanker secara *in vitro* maupun *in vivo*. Dan untuk mengetahui senyawa yang mempunyai aktivitas biologik diperlukan penelitian lanjutan untuk mengisolasi zat aktif tunggal dan mengidentifikasinya.

## ABSTRACT

Bryophytes have been used as medicinal plants to cure burns, bruises and external wound. Some bryophytes show antimicrobial, antipyretic, diuretic and anticancer. *Marchantia sp.* is an example of a bryophytes that having high toxicity.

The aim of this research was to examine the toxicity of methanol and diethyl ether extracts of *Marchantia cf planiloba* Steph. against *Artemia salina* Leach by *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) method. The extracts effect on *Artemia salina* Leach. was examined in 24 hours to find out the death percentage of *Artemia salina* Leach. caused by each extract concentration. The data were analyzed statistically to find out the  $LC_{50}$  using probit analysis. And then the most toxic extract (methanol extract) was identified for substances contained.

The result showed that both extracts were toxic against *Artemia salina* Leach.  $LC_{50}$  of methanol and diethyl ether extracts were  $247,10 \pm 5,28 \mu\text{g/ml}$  and  $453,16 \pm 3,66 \mu\text{g/ml}$ . respectively. The substances contained in methanol extract were steroid/triterpenoid. Further characterization and isolation are still needed for development in the future.

Keywords : *Marchantia cf planiloba* Steph., Toxicity, *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)



## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Hipotesis Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman	6
2.1.1 Klasifikasi Tanaman	6
2.1.2 Nama Daerah	6
2.1.3 Morfologi Tanaman	6
2.1.4 Penyebaran Tanaman	7
2.1.5 Khasiat Tanaman	8
2.1.6 Kandungan Tanaman	8
2.2 Tinjauan Tentang Kanker	8
2.2.1 Definisi Kanker	8
2.2.2 Penyebab Kanker	9
2.2.3 Sifat Kanker	11
2.2.4 Perbedaan Sel Kanker dengan Sel Normal	12
2.3 Tinjauan Tentang Brine Shrimp Lethality Test	12
2.4 Tinjauan Tentang Antikanker	15

BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL	19
BAB IV. METODE PENELITIAN	
4.1 Bahan Penelitian	22
4.1.1 Bahan Tanaman	22
4.1.2 Bahan Kimia dan Bahan Lain	22
4.2 Alat-Alat Penelitian	22
4.3 Rancangan Penelitian	23
4.3.1 Penyiapan Bahan	23
4.3.2 Praskrining Aktivitas Antikanker	23
4.3.3 Skrining Zat Kandungan dalam Ekstrak yang Aktif	25
4.3.4 Analisis Data	29
BAB V. HASIL PENELITIAN	
5.1 Hasil Pembuatan Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	34
5.2 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	34
5.3 Hasil Uji Aktivitas Antikanker dari Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. Dengan Metode BST	35
5.4 Penentuan Harga LC <sub>50</sub> Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. Terhadap Larva <i>Artemia salina</i> Leach. Dengan <i>Probit Analysis</i>	38
5.5 Skrining Zat Kandungan dalam Ekstrak Yang Paling Aktif (Ekstrak Metanol) <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	39
5.6 Hasil KLT Steroid / Triterpenoid Ekstrak Metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	40
5.7 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Ekstrak Metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat	41
5.8 Profil Kromatogram KLT-Densitometri standart sterol (isolat <i>Marchantia geminata</i> ) Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat	42



BAB VI. PEMBAHASAN	43
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	49

**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
IV.1 Data yang diperlukan untuk mencari harga LC <sub>50</sub> masing-masing bahan yang diuji menggunakan <i>Probit Analysis</i>	30
V.1 Hasil pembuatan ekstrak eter dan ekstrak metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	34
V.2 Pembuatan larutan uji ekstrak eter dan ekstrak metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	35
V.3 Hasil uji aktivitas antikanker dari ekstrak eter dan ekstrak metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. dengan metode BST	36
V.4 Hasil penentuan harga LC <sub>50</sub> ekstrak eter dan ekstrak metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. terhadap larva <i>Artemia salina</i> Leach. dengan <i>Probit Analysis</i>	38
V.5 Hasil skrining kandungan kimia ekstrak metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	39

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Lumut hati, <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	7
2.2 Larva Udang, <i>Artemia salina</i> Leach. yang berumur 48 jam	14
3.1 Skema Kerangka Konseptual	21
4.1 Skema Ekstraksi dengan Pelarut Eter dan Metanol	31
4.2 Skema Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	32
4.3 Skema Rancangan Penelitian	33
5.1 Hasil KLT Steroid / Triterpenoid Ekstrak Metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	40
5.2 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Ekstrak Metanol (non hidrolisa) <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat	41
5.3 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Ekstrak Metanol (hidrolisa) <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat	41
5.4 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol ( Isolat <i>Marchantia geminata</i> ) Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat	42

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat Keterangan Determinasi Tanaman	49
2. Ilustrasi konsep dosis efektif median (ED <sub>50</sub> ) dan dosis kematian median (LD <sub>50</sub> )	50
3. Kurva konsentrasi-respon toksisitas menggunakan unit probit pada kertas semi log	51
4. Hasil Penentuan Harga LC <sub>50</sub> Ekstrak Metanol Replikasi I	52
5. Hasil Penentuan Harga LC <sub>50</sub> Ekstrak Metanol Replikasi II	54
6. Hasil Penentuan Harga LC <sub>50</sub> Ekstrak Metanol Replikasi III	56
7. Hasil Penentuan Harga LC <sub>50</sub> Ekstrak Eter Replikasi I	58
8. Hasil Penentuan Harga LC <sub>50</sub> Ekstrak Eter Replikasi II	60
9. Hasil Penentuan Harga LC <sub>50</sub> Ekstrak Eter Replikasi III	62
10. Profil Kromatogram KLT-Densitometri Steroid/ Triterpenoid Ekstrak Metanol (non hidrolisa dan hidrolisa) <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. Dengan UV 254	64
11. Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol (isolat <i>Marchantia geminata</i> ) Dengan UV 254	65
12. Hasil KLT Steroid/Triterpenoid Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	66
13. Profil Kromatogram KLT-Densitometri Steroid/ Triterpenoid Ekstrak Metanol dan Ekstrak Eter <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat ( $\lambda=521$ )	67
14. Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol (isolat <i>Marchantia geminata</i> ) Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat ( $\lambda=521$ )	68

15. Profil Kromatogram KLT-Densitometri Steroid/ Triterpenoid Ekstrak Metanol dan Ekstrak Eter <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph. Dengan UV 254	69
16. Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol (isolat <i>Marchantia geminata</i> ) Dengan UV 254	70

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Kanker hingga saat ini masih merupakan salah satu penyakit yang ditakuti, karena banyak orang yang terkena kanker berakhir dengan kematian. Insiden kanker di Indonesia diperkirakan 100 per 100.000 penduduk pertahun atau sekitar 200.000 penduduk pertahun. Pada survey kesehatan rumah tangga yang diselenggarakan Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan ditemukan bahwa 1,4% dari seluruh kematian disebabkan oleh kanker. Angka ini meningkat menjadi 3,4% pada tahun 1980 dan 4,3% pada tahun 1986. Dewasa ini, WHO menyatakan bahwa 1/3 dari seluruh kejadian kanker dapat dicegah, 1/3 lagi dapat disembuhkan dan 1/3 sisanya dapat dibebaskan dari rasa nyeri jika diberi pengobatan (Dalimartha, 2003).

Kelompok utama bahan penyebab kanker (karsinogenik) dilihat dari asalnya dibagi menjadi dua, yaitu karsinogen yang berasal dari luar tubuh (eksogen) dan yang berasal dari dalam tubuh (endogen).

Karsinogen yang berasal dari luar tubuh yang telah diketahui adalah karsinogen kimiawi, karsinogen virus, karsinogen radiasi, dan agen biologik (Djojopranoto, 1963; Tjarta, 1996). Sedangkan karsinogen yang berasal dari dalam tubuh adalah suku/ras, diet/makanan, faktor konstitusional, rangsang menahun, lesi dan kondisi pramaligna serta paparan transplasenta (Underwood, 1999; Tjarta, 1996).

Usaha pengobatan penyakit kanker telah banyak dilakukan, namun hingga saat ini belum ditemukan obat yang secara memuaskan dapat mengatasi penyakit tersebut. Hal ini disebabkan oleh rendahnya selektivitas obat-obat kanker yang digunakan karena perbedaan morfologi dan biokimia antara sel normal dan sel kanker kecil sekali. Disamping itu pemakaian kemoterapi mempunyai efek samping dan toksisitas yang sangat besar.

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai cara, yaitu pembedahan, terutama untuk tumor padat yang terlokalisasi; radiasi, sebagai

pengobatan penunjang sesudah pembedahan; kemoterapi, terutama untuk pengobatan tumor yang tidak terlokalisasi; endokrinoterapi, yang menggunakan hormon tertentu untuk pengobatan tumor dan imunoterapi, yang berperan penting dalam pencegahan mikrometastasis (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Seperti telah kita ketahui, Indonesia merupakan salah satu negara yang mempunyai keanekaragaman hayati yang tinggi. Ratusan diantaranya memiliki khasiat sebagai obat dan secara turun temurun telah dimanfaatkan oleh masyarakat untuk pengobatan tradisional, termasuk tanaman untuk pengobatan kanker. Pemanfaatan obat tradisional sebagai salah satu upaya dalam meningkatkan derajat kesehatan masyarakat cenderung meningkat. Hal ini disebabkan adanya keinginan masyarakat sendiri untuk kembali menggunakan bahan dari alam (back to nature).

Banyak usaha yang dilakukan oleh penderita untuk mengobati penyakit tersebut dengan menggunakan tanaman obat. Demikian juga penelitian-penelitian dalam upaya mengobati penyakit kanker telah banyak dilakukan, namun hasil pengobatan terutama untuk kasus dalam stadium lanjut hasilnya kurang memuaskan. Karena itu masih dicari obat yang efektif untuk mengobati kanker, termasuk obat tradisional (Santosa dkk., 1996). Disamping itu pemerintah Indonesia dengan segala upaya telah berusaha untuk menggalakkan penelitian tentang obat tradisional, baik dari tumbuhan tingkat tinggi maupun tumbuhan tingkat rendah, yang jarang digunakan (Purnomo, 1992).

Alam tumbuhan yang ditaksir meliputi 300.000 jenis tumbuhan dalam klasifikasinya dibagi menjadi sejumlah divisi, salah satunya adalah tumbuhan lumut (Bryophyta) yang banyak tersebar di seluruh dunia (Tjitrosoepomo, 1986).

Pada mulanya tumbuhan lumut sempat diabaikan karena mempunyai kandungan racun dan aroma yang tidak sedap sewaktu diremas. Namun setelah diadakan penelitian lebih lanjut, ternyata tumbuhan lumut mempunyai kandungan bioaktif yang dapat digunakan untuk antialergi, antimikroba, pembunuh serangga, regulator pertumbuhan tanaman dan diuretik serta antikanker (Asakawa, 1984). Salah satu tumbuhan lumut yang memiliki senyawa bioaktif sebagai antikanker adalah lumut hati (*Marchantia polymorpha* L.) dimana senyawa bioaktifnya kebanyakan berasal dari golongan terpenoid dan marchantin A.

Dalam suatu penelitian yang dilakukan di Jepang, ekstrak metanol dari lumut hati (*Marchantia polymorpha* L.) dengan senyawa bioaktif terbesar Marchantin A, menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap KB Cell. Aktivitas tersebut ditunjukkan pula oleh spesies yang lain dari famili Marchantiaceae seperti *Marchantia paleacea* Bertol var *diptera* dan *Marchantia tosana* Steph. (Asakawa,1984).

Berdasarkan studi kemotaksonomi maka tanaman yang memiliki kekerabatan cukup dekat kemungkinan memiliki kandungan senyawa yang hampir sama. Mengacu pada penelitian tersebut maka akan dilakukan penelitian terhadap jenis lain dari suku Marchantiaceae yang tumbuh di Indonesia yaitu *Marchantia cf planiloba* steph. Diharapkan dalam *Marchantia cf planiloba* Steph. juga terdapat senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik.

Perkembangan penggunaan dan penelitian tanaman obat merupakan suatu peluang yang sangat besar bagi Indonesia, karena sebagai suatu negara yang beriklim tropis banyak sumber daya alam hayati yang bisa dimanfaatkan. Meskipun penggunaan tanaman obat sudah banyak digunakan, namun hal tersebut belum disertai data-data yang menunjang mengenai aktivitas tanaman obat terhadap pengobatan suatu penyakit. Untuk itu diperlukan suatu penelitian pendahuluan atau praskrining. Selanjutnya dari hasil uji praskrining dapat dilakukan penelitian yang lebih lanjut, misal uji skrining. Dari data-data yang diperoleh dapat digunakan untuk menunjang penggunaan tanaman obat untuk pengobatan agar lebih diterima oleh masyarakat pada umumnya dan tenaga medis pada khususnya.

Skrining aktivitas biologi pada umumnya memerlukan waktu yang relatif panjang, berbulan-bulan sampai bertahun-tahun dan membutuhkan biaya yang sangat besar, sedangkan jumlah tumbuhan yang harus diteliti jumlahnya sangat banyak. Maka pencarian bahan bioaktif dari alam memerlukan suatu uji praskrining aktivitas biologi yang tepat yang dapat memisahkan tumbuhan yang memiliki prospek sebagai sumber bahan bioaktif, dalam waktu yang relatif singkat, murah biayanya, dan sederhana dalam pelaksanaannya. Praskrining aktivitas biologi dapat memperkecil jumlah tumbuhan yang akan diteliti lebih



lanjut secara bermakna sehingga banyak memberi keuntungan dalam hal waktu, biaya, dan lain-lain (Laughlin,1991; Anderson,1991; Meyer,1982).

Beberapa uji aktivitas biologik yang digunakan untuk mencari bahan bioaktif yang mempunyai aktivitas antikanker adalah sebagai berikut (Meyer,1982) :

- (1) Uji kematian larva udang laut atau *Brine Shrimp Lethality Test*
- (2) Uji hambatan tumor pada lempeng kentang atau *Potato Disc Crown Gall Tumor Inhibition Assay*
- (3) Uji proliferasi kuncup lemna atau *Lemna Prond Proliferation Assay*
- (4) Uji kultur sel tumor manusia atau *Cell Cultur Human Tumour Cell Line Assay*
- (5) Uji P-388 (Leukimia in vivo pada mencit) atau P-388 Mouse Leukimia

Sebagai praskrining senyawa antikanker, metode yang dapat dipergunakan adalah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) yaitu uji toksisitas senyawa terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Metode ini telah dibuktikan memiliki korelasi dengan daya sitotoksis senyawa-senyawa antikanker (Meyer, 1982). Selain itu metode ini mudah, murah, cepat dan cukup akurat. Hal tersebut mendorong dilakukannya uji toksisitas ekstrak eter dan metanol lumut hati, *Marchantia cf planiloba* Steph. terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan suatu masalah sebagai berikut :

- (1) Apakah ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati, *Marchantia cf. planiloba* Steph. menunjukkan hasil yang positif terhadap uji praskrining aktivitas antikanker dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) ?
- (2) Golongan kandungan kimia apa yang terdapat dalam ekstrak yang menunjukkan aktivitas yang positif antikanker dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) ?

### 1.3 Tujuan Penelitian

- (1) Melakukan praskrining aktivitas antikanker dari ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati, *Marchantia cf. planiloba* Steph. dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).
- (2) Mengetahui golongan kandungan kimia dari ekstrak yang positif terhadap uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).

### 1.4 Hipotesis Penelitian

Ekstrak eter dan ekstrak metanol lumut hati, *Machantia cf planiloba* Steph. memiliki aktivitas antikanker dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).

### 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang produk bahan alam dari tumbuhan. Selain itu juga dapat digunakan untuk menambah pengetahuan tentang obat-obatan golongan sitotoksik yang selama ini masih merupakan obat langka dan harganya mahal.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tinjauan Tentang Tanaman**

##### **2.1.1 Klasifikasi Tanaman (Tjitrosoepomo, 1986)**

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Bryophyta
Class	: Hepaticae
Ordo	: Marchantiales
Famili	: Marchantiaceae
Genus	: <i>Marchantia</i>
Spesies	: <i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.

##### **2.1.2 Nama Daerah**

Jawa	: lumut ati
Madura	: lomot ateh
Toraja	: limulun

##### **2.1.3 Morfologi Tanaman**

Habitus :

Lumut dengan thalus berbentuk lembaran-lembaran merayap seperti daun dengan rizoid berbentuk benang atau kadang-kadang memang telah menyerupai akar.

Thalus :

Seperti pita lebarnya  $\pm 0,5-1$  cm, agak tebal, berdaging, bercabang-cabang, menggarpu dan mempunyai 1 rusuk tengah yang menonjol. Pada sisi bawah thalus terdapat rizoid-rizoid yang bersifat fototrop negatif. Permukaan atas thalus mempunyai lapisan kutikula. Oleh sebab itu hampir tidak mungkin untuk dilalui air. Jika dilihat dari atas thalus itu terlihat berpetak-petak. Dibawah tiap-tiap petak di dalam thalus terdapat suatu ruang udara dan ditengah tiap petak terdapat suatu liang udara.

Liang udara :

Menghubungkan ruang udara dengan lingkungan. Dinding liang udara terdiri dari 4 cincin. Masing-masing cincin terdiri dari 4 sel. Pada dasar ruang udara terdapat sel-sel yang mengandung kloroplas dan merupakan jaringan asimilasi.

Gametangium :

Didukung oleh suatu cabang thalus yang tumbuh tegak. Bagian bawah thalus ini tergulung. Di dalam gulungan terdapat saluran dengan benang-benang rizoid. Bagian tersebut mengadakan percabangan menggarpu hingga akhirnya membentuk suatu badan seperti bintang.



Gambar 2.1 Lumut Hati, *Marchantia cf. planiloba* Steph.

#### 2.1.4 Penyebaran Tanaman

Lumut hati tersebar luas di seluruh dunia. Kebanyakan hidup di tempat-tempat yang basah, oleh sebab itu tubuhnya mempunyai struktur higromorf. Bentuk lain jarang ditemukan meskipun ada pula yang terdapat pada tempat yang amat kering. Misal pada kulit pohon, batu cadas atau di atas tanah, sehingga tubuhnya perlu mempunyai struktur yang xeromorf. Ada yang dapat hidup pada

daun pohon-pohon dalam hutan tropis dan karena hidupnya di atas daun, lumut hati merupakan suatu bentuk ekologi khusus yang dinamakan epifit.

### **2.1.5 Khasiat Tanaman (Asakawa, 1984)**

Belum diketahui tentang khasiat dari *Marchantia* cf. *planiloba* Steph. namun secara umum suku Marchantiaceae mempunyai aktivitas antimikroba, diuretik, pembunuh serangga, regulator pertumbuhan tanaman, anti kanker dan antialergi.

### **2.1.6 Kandungan Tanaman (Asakawa, 1984; Mues and Zinsmeister, 1988)**

Beberapa Hepaticae memiliki aktivitas biologik yang menarik, seperti antialergi, antitumor, antimikroba dan antijamur. Menurut laporan aktivitas tersebut disebabkan oleh senyawa terpenoid dan bis-bibenzil yang terkandung di dalamnya.

Hingga saat ini 18 macam bis-bibenzil telah diisolasi dari 9 spesies lumut hati. Enam diantaranya berasal dari ordo Marchantiales yaitu *Reboulia hemisphaerica*, *Plagiochasma intermedium*, dan 4 spesies *Marchantia*, yang merupakan varietas terbaik penghasil bis-bibenzil. Penyelidikan terakhir melaporkan bahwa *Marchantia polymorpha* L., *Marchantia paleacea* Bertol var *diptera* (Mont) dan *Marchantia tosana* Steph. mengandung turunan bis-bibenzil yaitu marchantin A.

Selain turunan bis-bibenzil kandungan lain dari *Marchantia* adalah flavonoid, terpenoid dan minyak atsiri.

## **2.2 Tinjauan Tentang Kanker**

### **2.2.1 Definisi Kanker**

Kanker adalah segolongan penyakit neoplasma yang bersifat ganas, penyakit yang terjadi karena timbul dan tumbuhnya sel-sel abnormal dalam tubuh. Sel-sel tubuh timbul secara teratur dan mempunyai fungsi tertentu dan ada koordinasi yang baik dengan lainnya. Sel kanker tumbuh dengan tidak teratur dan tidak berfungsi serta tidak ada koordinasi yang baik dengan sel tubuh lain (Rochadi,1986).

Menurut Robinson dan Kumar (1992), kanker adalah massa jaringan abnormal dengan pertumbuhan berlebih dan tidak ada koordinasi dengan jaringan normal dikarenakan terjadi gangguan atau kehilangan mekanisme pengontrol pertumbuhan dan pembelahan sel dan tetap tumbuh secara berlebih setelah stimulus yang menyebabkan pertumbuhan tersebut terhenti.

Sedangkan menurut Siswandono dan Soekardjo (2000), tumor adalah istilah umum untuk menunjukkan adanya pertumbuhan tidak normal dari massa atau jaringan yang tidak membahayakan kehidupan.

Kanker merupakan kata yang lebih sering digunakan dalam lingkungan masyarakat dibandingkan dalam lingkungan kedokteran; secara umum mempunyai arahan kepada tumor maligna (ganas) atau neoplasma.

Neoplasma secara umum sering diartikan sebagai tumor dan dibagi dalam dua kategori, jinak dan ganas. Suatu tumor dinyatakan jinak jika ciri-ciri mikroskopis dan sitologisnya tergolong relatif tidak berbahaya. Sedangkan suatu tumor dinyatakan ganas jika menembus dan menghancurkan struktur yang berdekatan dan dapat menyebar ke tempat yang jauh (metastasis) dan dapat menyebabkan kematian tumor ganas secara keseluruhan dinyatakan sebagai kanker (Robinson,1992).

Kanker merupakan penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur pertumbuhan sel dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995) bukan merupakan penyakit tunggal, melainkan sebagai hasil berbagai mekanisme yang bekerja dalam sebuah atau lebih sel sasaran, walaupun hasil kanker yang muncul bisa sama dalam perangsang pertumbuhan atau keganasannya (Bellanti,1985).

### **2.2.2 Penyebab Kanker**

Segala sesuatu yang menyebabkan terjadinya kanker disebut karsinogen. Karsinogen menyebabkan perubahan pada DNA yang satuan kecilnya adalah gen, sehingga karsinogen sering disebut bersifat mutagenik. Sangat sering lebih dari satu karsinogen diperlukan untuk terjadinya perubahan sel normal menjadi neoplasia (proses terbentuknya neoplasma) yang terjadi dalam beberapa tahap dan sering memerlukan waktu yang panjang. Terdapat masa laten (tidak

menunjukkan penampilan gejala klinis) sebelum menjadi progresif. Pada masa progresif terjadi invasi ke jaringan disekitarnya dan menyebar ke tempat yang jauh.

Kelompok utama bahan penyebab kanker (karsinogenik) yang telah diketahui, dilihat dari asalnya dapat dibagi menjadi dua yaitu :

Karsinogen yang berasal dari luar tubuh :

(1) Bahan kimia.

Kebanyakan karsinogen kimia adalah prokarsinogen yaitu karsinogen yang memerlukan perubahan metabolik agar menjadi perubahan pada DNA, RNA atau protein sel tubuh. Beberapa contoh karsinogen kimia :

- Hidrokarbon polisiklik aromatik

Hidrokarbon polisiklik aromatik mengandung Benzo(a)pyrene yang merupakan hasil antara pada proses pembakaran yang tidak sempurna.

- Amin aromatik dan pembawa Azo

Zat pewarna amin adalah prokarsinogen, masuk ke dalam tubuh melalui kulit, paru-paru atau saluran cerna. Banyak digunakan untuk pewarna di industri.

- Nitrosamin

Nitrosamin terbentuk di dalam saluran cerna dari gugus nitrat dan nitrit yang sering dipakai sebagai bahan tambahan pada makanan.

- Unsur logam

Unsur logam antara lain nikel dan timah bersifat elektrofilik, dapat bereaksi dengan pusat nukleofilik pada DNA menimbulkan kanker pada orang yang pekerjaannya banyak berhubungan dengan unsur logam tersebut.

(2) Virus.

Virus yang bersifat karsinogen disebut virus onkogenik. Dari berbagai penelitian diketahui bahwa virus DNA maupun virus RNA dapat menimbulkan transformasi sel.

(3) Radiasi.

Radiasi UV, panjang gelombang 290-370 nm berkaitan dengan terjadinya kanker kulit terutama pada orang kulit putih yang sering mendapat sinar matahari berlebihan. Radiasi pengion dapat langsung menimbulkan kerusakan “macromolecules” atau berinteraksi dengan cairan sel menimbulkan radikal bebas yang kemudian menimbulkan kerusakan atau perubahan ikatan kimia.

(4) Agen biologik.

Yaitu hormon, mikotoksin dan parasit. Contoh hormon adalah steroid androgenik dan steroid estrogen. Contoh mikotoksin adalah aflatoksin yang diproduksi oleh *Aspergillus flavus*. Dan contoh parasit adalah *Schistosoma sp.* dan *Clonorchis sinensis* (Tjarta, 1996; Djojopranoto, 1963).

Karsinogen yang berasal dari dalam tubuh :

- Suku/ras
- Diet/makanan
- Faktor konstitusional, yaitu jenis kelamin, resiko bawaan, umur dan sebagainya.
- Lesi dan kondisi premaligna
- Paparan transplasental

### 2.2.3 Sifat Kanker

Melalui perkembangan diagnostik, dapat diketahui sifat-sifat umum dari kanker (Nafrialdi,1995; Bellanti,1985 ) antara lain :

- (1) Otonomi, sel kanker mempunyai kemampuan untuk tumbuh diluar batas-batas normal
- (2) Anaplasia, hilangnya kemampuan mengorganisasi dan melaksanakan fungsinya sehingga menyebabkan gangguan deferensiasi sel dan jaringan
- (3) Invasif, kemampuan sel menembus jaringan yang ada disekitarnya dan menyebabkan rusaknya jaringan yang ditempati



- (4) Metastasis, kemampuan sel kanker untuk menyebar ke tempat lain melalui aliran darah atau limfe dan menyebabkan pertumbuhan baru
- (5) Memiliki hereditas bawaan, yaitu turunan sel kanker juga dapat menimbulkan kanker

#### **2.2.4 Perbedaan Sel Kanker dengan Sel Normal**

Sel kanker mempunyai beberapa ciri yang membedakannya dengan sel normal, antara lain :

- (1) Bentuk dan ukuran sel lebih besar daripada sel normal
- (2) Inti sel kelihatan membesar karena jumlah sitoplasma berkurang
- (3) Anak inti mengalami perubahan bentuk dan ukuran
- (4) Mitokondria berkurang jumlahnya (Ahern, 1992; Robbins, 1971).

### **2.3 Tinjauan Tentang Brine Shrimp Lethality Test**

Uji hayati terhadap *Artemia salina* Leach. (*Brine Shrimp Lethality*) adalah uji hayati umum yang digunakan untuk mendeteksi suatu rentang lebar aktivitas biologi dan keanekaragaman struktur kimia. Uji ini merupakan uji hayati pendahuluan (praskrining) yang sederhana untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas biologi senyawa tertentu. Metode ini memiliki beberapa keuntungan antara lain cepat, murah, sederhana, dan cukup dilakukan di dalam ruangan sebagai alat untuk menapis dan memantau hasil ekstraksi dan fraksinasi ekstrak aktif fisiologis, serta untuk mendeteksi senyawa aktif biologi dalam suatu isolasi.

Uji ini berdasar pemikiran bahwa toksikologi adalah farmakologi dalam dosis tinggi atau farmakologi secara sederhana adalah toksikologi dalam dosis rendah (Laughlin, 1991), yang artinya bila ditemukan suatu senyawa yang toksik maka dosis rendah non toksiknya dapat menimbulkan kegunaan farmakologi atau gangguan pada sistem fisiologi. Seperti diketahui, senyawa-senyawa yang aktif biologi hampir selalu toksik pada dosis tinggi sehingga kematian *in vivo* suatu organisme zoologi sederhana seperti *Artemia salina* Leach. dapat digunakan untuk memantau dan menapis secara cepat dan sederhana fraksinasi ekstrak suatu bahan alam yang aktif fisiologi serta untuk memantau pendeteksian dan isolasi senyawa aktif biologi dari suatu bahan alam.

Metode BST menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach. yang merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Hasil uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian anak udang *Artemia salina* Leach. karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam tumbuhan tertentu dari dosis yang telah ditentukan (Laughlin, 1991). Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya  $LC_{50}$  selama 24 jam (Meyer, 1982). Suatu ekstrak tanaman atau senyawa hasil isolasi yang memiliki nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$  dapat diduga memiliki efek sitotoksik (Dwiatmaka, 2000).

Udang air laut telah digunakan terlebih dahulu dalam berbagai sistem uji hayati antara lain untuk analisis residu pestisida, mikotoksin, polutan air, bahan anastesi, toksin dinoflagelata, senyawa serupa morfin, toksisitas pendispersi minyak dan ester forbol kokarsinogenik. Banyak peneliti yang telah mencipta kegunaan nauplii yang ditetaskan, bahkan penghambat penetasan telur juga telah diteliti (Meyer, 1982).

*Artemia* atau Brine Shrimp adalah sejenis udang-udangan primitif. Nama lainnya adalah *Cancer salinus* atau *Artemia salina*. *Artemia* hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi antara 15-300 per mil, temperature 25-30°C dan pH berkisar 7,3-8,4. Larva yang keluar disebut sebagai nauplius dan langsung hidup sebagai *artemia* muda. Terjadinya proses ovovivipar sangat tergantung pada kadar garam dan oksigen. *Artemia* mulai dewasa pada umur sekitar 2 minggu dan dapat hidup hingga 6 bulan, apabila keadaan lingkungannya cukup baik (Mulyadi, 1995).

Dari penelitian yang dilakukan oleh Meyer, dkk (1982) terbukti uji hayati terhadap anak udang memiliki korelasi yang baik terhadap uji antikanker menggunakan 9-PS. Penelitian tersebut menseleksi ekstrak etanol biji tanaman suku Euphorbiaceae, 24 ekstrak aktif terhadap uji antikanker menggunakan 9-PS dan 14 diantara ke-24 ekstrak tersebut juga aktif pada uji terhadap anak udang.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Laughlin (1991) terhadap sejumlah alkaloid kaktus dan derivat dihidroisokuinolin baik dengan udang air laut maupun dengan sel tumor 9-KB ditemukan suatu korelasi positif antara toksisitas udang air laut dan sitotoksitas 9-KB.

Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Anderson, dkk meneliti 10 senyawa murni yang diperoleh dari NCI, diperoleh hasil uji hayati terhadap anak udang berkorelasi baik terhadap antikanker, menggunakan P-388 (3-PS) ( $p=0,33$  dan  $kappa=0,78$ ). Demikian pula terhadap kultur sel tumor manusia A-549, MCF-7 dan HT-29, uji hayati terhadap anak udang ini mampu mendeteksi 5 senyawa dari 6 senyawa yang berkhasiat antitumor terhadap A-549 dan HT-29, sedangkan dari 6 senyawa yang berkhasiat antitumor terhadap MCF-7 uji ini hanya mendeteksi 4 senyawa.

Dari penelitian diatas para peneliti di Purdue University Amerika Serikat mengembangkan metode ini sebagai uji untuk menyeleksi ekstrak tumbuhan yang diduga berkhasiat antikanker.

Beberapa keuntungan pemakaian metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST), seperti yang disampaikan oleh Laughlin (1991) adalah sebagai berikut :

1. Waktu pelaksanaannya cepat
2. Biayanya relatif murah
3. Pengerjaannya sederhana, tidak memerlukan teknik aseptis
4. Tidak memerlukan perawatan khusus
5. Menggunakan sampel yang relatif sedikit
6. Tidak memerlukan serum hewan



Gambar 2.2 Larva Udang, *Artemia salina* Leach. yang berumur 48 jam (pembesaran 400x)

## 2.4 Tinjauan Tentang Antikanker

Bentuk pengobatan utama untuk penyakit kanker adalah pembedahan, terapi radiasi dan obat (bahan kemoterapeutik kanker). Bahan-bahan kemoterapeutik kanker seringkali dapat memberikan pertolongan pada penderita, perpanjangan umur dan kadangkala penyembuhan (Dewick, 1983).

Antikanker diharapkan memiliki toksisitas yang selektif, artinya menghancurkan tanpa merusak jaringan normal. Pada umumnya anti neoplastik menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas karena menghambat sel yang proliferasinya cepat seperti sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran cerna dan folikel rambut. Tetapi dikatakan berhasil baik bila dosis yang digunakan dapat mematikan sel kanker dan tidak terlalu mengganggu sel normal yang berproliferasi (Nafrialdi dan Ganiswara, 1995).

Tujuan ini sering mengalami kegagalan yang disebabkan antara lain oleh perbedaan morfologi dan biokimia sel normal dengan sel kanker kecil sekali sehingga obat antikanker tidak ada yang selektif terhadap sel tumor tertentu. Kegagalan ini disebabkan pula karena banyak sel kanker bukan sesuatu yang asing bagi tuan rumah, sehingga tidak menimbulkan respon imunologis. Selain itu sel kanker cepat menjadi kebal terhadap obat antikanker dan banyak obat antikanker bersifat karsinogenik, teratogenik dan mutagenik.

Proses kehidupan sel merupakan suatu siklus yang terdiri beberapa fase sebagai berikut :

### 1) Fase G1

Fase G1 adalah fase istirahat, merupakan fase yang mendominasi siklus hidup dari sel. Fase ini terjadi setelah sel mengalami pembelahan (mitosis). Selama fase G1 tidak terjadi sintesa DNA, tetapi sintesa RNA dan protein tetap terjadi secara normal. Setelah fase G1 sel kemudian menuju fase S. kadang-kadang setelah mengalami pembelahan, sel bias menuju ke tipe lain dari fase istirahat yaitu fase G0 dimana sel keluar dari siklus tetapi masih bias untuk berproliferasi .

## 2) Fase S

Fase S adalah fase sintesa DNA yang terjadi setelah fase G1 dan didahului dengan peningkatan laju sintesa RNA. Hasilnya adalah replikasi DNA dan produksi kromatid.

## 3) Fase G2

Fase G2 adalah fase istirahat lain yang terjadi segera setelah fase S. sintesa DNA berhenti selama sintesa protein dan RNA berlanjut.

## 4) Fase M

Selama fase M (mitosis), terjadi pengurangan laju sintesa protein dan RNA. Pada fase ini kromosom berkondensasi dan kromatid berpisah, sel terbelah menjadi dua dan terjadi fase istirahat lagi.

Cara kerja antikanker (Siswandono dan Soekardjo, 2000) :

### (1) Alkilator

Senyawa pengalkilasi adalah senyawa reaktif yang dapat mengalkilasi DNA, RNA dan enzim-enzim tertentu. Senyawa pengalkilasi dapat membentuk senyawa kationik antara yang tidak stabil, diikuti pemecahan cincin membentuk ion karbonium reaktif. Ion ini bereaksi, melalui reaksi alkilasi membentuk ikatan kovalen dengan gugus-gugus donor elektron seperti karboksilat, amin, fosfat dan tiol yang terdapat pada struktur asam amino, asam nukleat dan protein yang sangat dibutuhkan untuk biosintesis sel. Reaksi ini membentuk hubungan melintang antara dua rangkaian DNA dan mencegah mitosis. Akibatnya proses pembentukan sel terganggu dan terjadi hambatan pertumbuhan sel kanker. Contoh : siklofosamid, klorambusil, busulfan, karmustin, dan semustin.

### (2) Antimetabolit

Antimetabolit adalah senyawa yang dapat menghambat jalur metabolik yang penting bagi kehidupan dan reproduksi sel kanker melalui penghambatan asam folat, purin, pirimidin dan asam amino serta jalur nukleosida pirimidin yang diperlukan dalam sintesa DNA. Hambatan replikasi DNA ini dapat secara langsung maupun tidak langsung, sehingga menyebabkan sel tidak berproliferasi

dan mengalami kematian. Contoh : sitarabin, floksuridin, 6-merkaptopurin, dan metotreksat.

### (3) Produk alam

#### a. Antibiotik Antikanker

Beberapa antibiotik yang mula-mula dikembangkan sebagai senyawa antibakteri ternyata didapatkan mempunyai efek sitotoksik tinggi. Efek samping tersebut dievaluasi dan kemudian dikembangkan menjadi obat-obat antikanker. Contoh : mitomisin, daktiomisin, doksorubisin dan bleomisin.

#### b. Antikanker Produk Tanaman (Dewick, 1983)

Senyawa antitumor yang berhasil diisolasi dari tanaman memiliki struktur kimia berbeda dan dikelompokkan berdasarkan struktur kimianya, sebagai berikut :

- Monoterpen, contohnya allamandin diisolasi dari *Allamanda cathartica*, Apocynaceae.
- Seskuiterpen, contohnya baccharin diisolasi dari *Baccharia megapotamica*, Compositae, helenalin dari *Helenium autumnale*, Compositae.
- Diterpen, contohnya taxol diisolasi dari *Taxus brevifolia*, Taxaceae.
- Triterpenoid, steroid dan lain-lain, contohnya cucurbitacin diisolasi dari *Maraah oreganus*, Aslepidaceae.
- Alkaloid, contohnya emetin diisolasi dari *Cephaelis acuminata*, Rubiaceae.
- Peptida, contohnya vinkristin dan vinblastin diisolasi dari *Catharanthus roseus*, Apocynaceae.

c. Antikanker Produk Rekayasa Genetik

Contohnya antineoplaston, interferon, dan avaron.

(4) Hormon

Beberapa neoplasma dapat dikontrol dengan baik oleh hormon seks, seperti androgen, progestin, estrogen dan adrenokortikoid. Biasanya untuk pengobatan tambahan sesudah pembedahan, dikombinasi dengan obat antikanker yang lain. Contoh hormon dan antihormon yang digunakan sebagai antikanker adalah :

Hormon androgen : testosteron propionat, testolakton, fluoksimesteron

Hormon estrogen : dietilbestrol, etinilestradiol, klortiasin

Hormon progestin : hidroksiprogesteron

Glukokortikoid : prednison, kortison, deksametason

Antiestrogen : tamoksifen sitrat

Antiandrogen : flutamid

### BAB III

#### KERANGKA KONSEPTUAL

Sampai saat ini penyakit kanker masih menjadi salah satu penyakit yang paling ditakuti masyarakat. Menurut Nafrialdi dan Ganiswara (1995) penyakit kanker merupakan penyebab kematian terbesar kedua setelah kardiovaskular. Dan menurut Siswandono dan Soekardjo (2000) sampai saat ini masih sedikit sekali obat antikanker yang bekerja secara selektif untuk pengobatan jenis kanker tertentu. Berbagai usaha telah dilakukan untuk menanggulangi penyakit ini seperti pembedahan, terapi radiasi, kemoterapi dan sebagainya. Namun hingga kini masih belum ditemukan cara yang dapat mengatasi penyakit tersebut secara memuaskan.

Cara lain yang dipilih sebagian penderita penyakit ini adalah dengan memanfaatkan bahan alam yaitu dengan menggunakan tanaman obat. Hal ini disebabkan adanya keinginan masyarakat sendiri untuk kembali menggunakan bahan dari alam (*back to nature*).

Dalam suatu penelitian yang dilakukan di Jepang terhadap lumut hati dari spesies *Marchantia polymorpha* L. ternyata diperoleh senyawa bioaktif yang menunjukkan aktivitas sitotoksik (antikanker). Aktivitas tersebut ditunjukkan pula oleh spesies yang lain dari famili yang sama, Marchantiaceae seperti *Marchantia paleaceae* Bertol var *diptera* (Mont) dan *Marchantia tosana* Steph. (Asakawa, 1984).

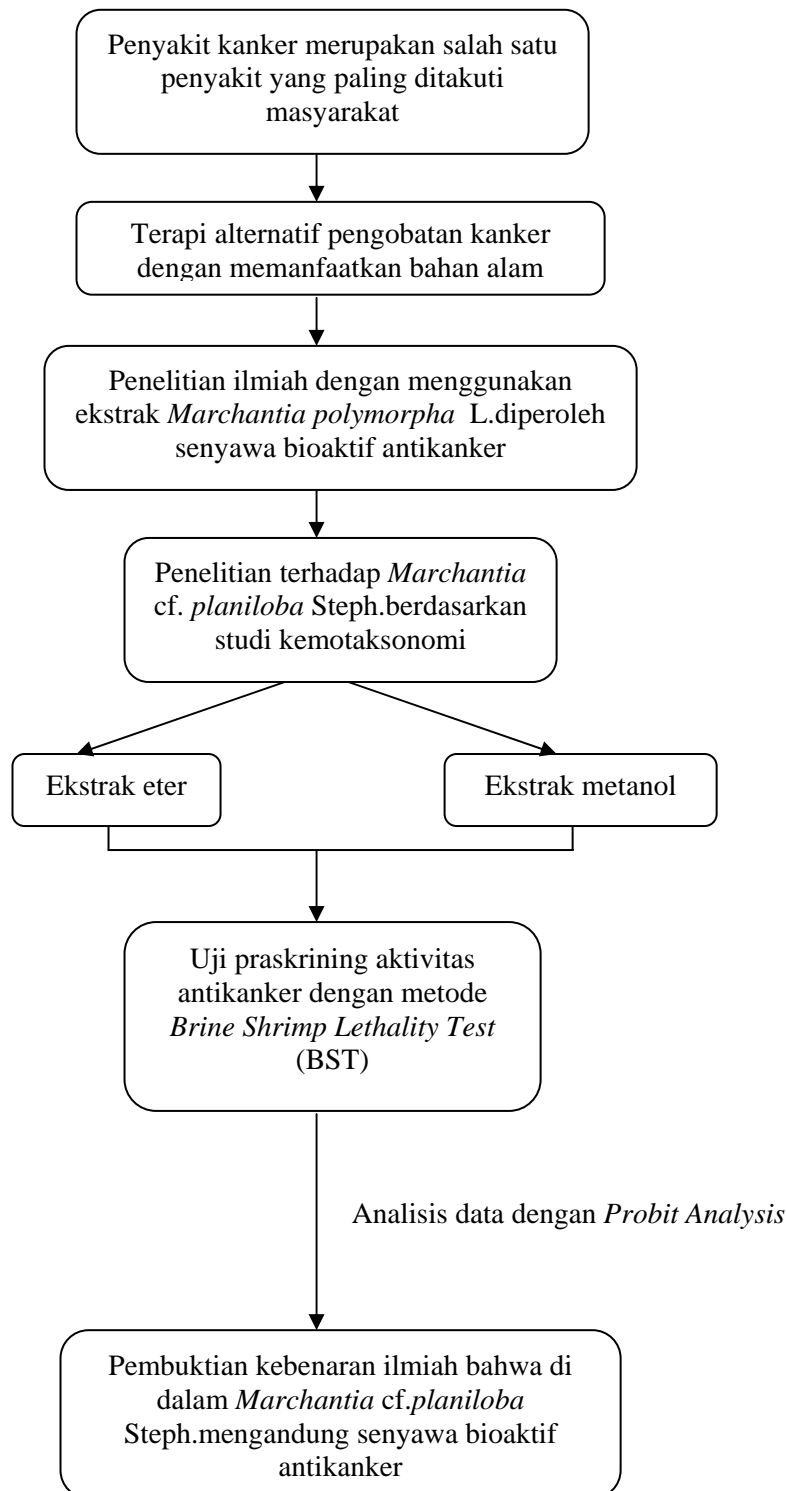
Berdasarkan studi kemotaksonomi maka tanaman yang memiliki kekerabatan cukup dekat kemungkinan memiliki kandungan senyawa yang hampir sama. Mengacu pada penelitian tersebut maka dilakukan penelitian terhadap spesies lain dari famili Marchantiaceae yang tumbuh di Indonesia yaitu *Marchantia cf planiloba* Steph. Diharapkan dalam *Marchantia cf planiloba* Steph. juga terdapat senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik.

Salah satu metode untuk menguji bahan-bahan yang bersifat sitotoksik adalah dengan uji toksisitas terhadap larva udang dari *Artemia Salina* Leach (*Brine Shrimp Lethality Test*). Metode ini sering digunakan untuk praskrining terhadap senyawa aktif yang terkandung di dalam



ekstrak tanaman karena murah, cepat, mudah (tidak perlu kondisi aseptis) dan dapat dipercaya (Meyer,1982). Lebih dari itu uji larva udang ini juga digunakan untuk praskrining terhadap senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antitumor. Dengan kata lain, uji ini mempunyai korelasi yang positif dengan potensinya sebagai antikanker (Anderson,1991).

Hasil uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian anak udang *Artemia salina* Leach, karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam tumbuhan tertentu dari dosis yang telah ditentukan. Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya  $LC_{50}$  selama 24 jam. Data tersebut dianalisis dengan komputer, menggunakan *Probit Analysis* untuk menentukan harga  $LC_{50}$ . Bila masing-masing ekstrak yang diuji kurang dari 1000  $\mu\text{g/ml}$  maka dianggap menunjukkan aktivitas biologik.



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Bahan Penelitian**

##### **4.1.1 Bahan Tanaman**

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah lumut hati, *Marchantia cf. planiloba* Steph. yang diambil dari Bromo pada bulan Oktober 2002. Determinasi tanaman diperoleh dari Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, Bogor.

##### **4.1.2 Bahan Kimia dan Bahan Lain**

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi :

- Eter teknis
- Metanol teknis

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas :

- Eter p.a (E. Merck)
- Metanol p.a (E. Merck)
- Telur udang laut *Artemia salina*, Ocean Star International, Amerika Serikat
- DMSO
- Air laut

#### **4.2 Alat-alat Penelitian**

- Maserator dan alat pengaduk
- Penyaring Buchner
- Pipet tetes
- Vial
- Mikropipet 50  $\mu$ l, 500  $\mu$ l (Socorex, Swiss )
- Bejana kromatografi
- Rotavapor (Heidolph, West Germany)

### **4.3 Rancangan Penelitian**

#### **4.3.1 Penyiapan Bahan**

Lumut hati, *Marchantia cf. planiloba* Steph. yang akan diteliti dan telah dideterminasi, dicuci bersih dengan air dan dilanjutkan pengeringan. Pengeringan dilakukan tidak dibawah sinar matahari langsung, cukup diangin-anginkan saja. Jika bahan sudah cukup kering, bahan tersebut dihaluskan dan diayak hingga diperoleh serbuk halus.

#### **4.3.2 Praskrining Aktivitas Antikanker**

##### **4.3.2.1 Pembuatan Ekstrak Bahan**

Bahan yang sudah dikeringkan dan diserbuk, kemudian diekstraksi dengan menggunakan pelarut eter dan metanol dengan cara maserasi. Tujuan pemilihan pelarut ini adalah untuk memisahkan komponen non polar, semi polar dan polar.

Serbuk bahan dimasukkan dalam bejana, ditambahkan dengan pelarut eter sampai terbasahi dan selanjutnya tertutup rapat. Kemudian biarkan selama 24 jam, saring filtratnya dengan penyaring Buchner dengan bantuan pompa vakum. Maserasi ini dilakukan beberapa kali dengan pelarut baru hingga filtrat jernih atau sampai filtrat memberikan reaksi negatif terhadap pereaksi tertentu.

Setelah itu residu dikeringkan untuk kemudian dilanjutkan proses maserasi dengan mengganti pelarut dari eter ke metanol lalu maserasi dilakukan dengan cara yang sama seperti pada pelarut eter. Hasil filtrat yang ditampung kemudian diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak eter dan ekstrak metanol.

##### **4.3.2.2 Uji Praskrining Antikanker Ekstrak dengan Metode BST**

(Meyer, 1982)

- (1) Disiapkan air laut.
- (2) Air laut dimasukkan dalam wadah kecil yang sudah dibagi menjadi dua bagian ruangan dengan menggunakan sekat. Sedikit telur udang *Artemia salina* Leach. dimasukkan dalam salah satu ruang, kemudian ruangan ini ditutup sedang sisi lain dibiarkan terbuka atau diberi lampu untuk menarik

udang yang telah menetas melalui lubang sekat, sehingga anak udang dapat terpisahkan dari bagian telur atau kulit telur.

- (3) Setelah dua hari, telur udang akan menetas menjadi udang-udang kecil yang disebut nauplii dan siap digunakan untuk melakukan pengujian.
- (4) Disiapkan vial untuk melakukan uji. Lalu masing-masing ekstrak diujikan pada konsentrasi 10, 50, 100, 500 dan 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Disiapkan 3 vial untuk replikasi pada masing-masing konsentrasi dan sebuah vial untuk kontrol.
- (5) Pembuatan larutan hasil ekstraksi.
  - a. Pembuatan larutan induk

Ditimbang 50 mg hasil fraksinasi, ditambah pelarutnya sampai 50,0 ml, campur sampai homogen.

Perhitungan konsentrasi larutan induk :

$$50 \text{ mg} / 50,0 \text{ ml} = 1000 \mu\text{g/ml}$$
  - b. Pembuatan larutan uji

Dimasukkan sejumlah tertentu larutan induk dalam vial hingga diperoleh konsentrasi larutan uji 10, 50, 100,500 dan 1000  $\mu\text{g/ml}$ , uapkan sampai kering. Masing-masing konsentrasi disiapkan dalam 3 vial sebagai replikasi.

Perhitungan konsentrasi larutan uji :

$$(5 \text{ ml} / 5,0 \text{ ml}) \times 1000 \mu\text{g/ml} = 1000 \mu\text{g/ml}$$
$$(2,5 \text{ ml} / 5,0 \text{ ml}) \times 1000 \mu\text{g/ml} = 500 \mu\text{g/ml}$$
$$(0,5 \text{ ml} / 5,0 \text{ ml}) \times 1000 \mu\text{g/ml} = 100 \mu\text{g/ml}$$
$$(0,25 \text{ ml} / 5,0 \text{ ml}) \times 1000 \mu\text{g/ml} = 50 \mu\text{g/ml}$$
$$(0,05 \text{ ml} / 5,0 \text{ ml}) \times 1000 \mu\text{g/ml} = 10 \mu\text{g/ml}$$
  - c. Pembuatan larutan kontrol

Larutan kontrol dibuat tanpa penambahan hasil fraksinasi larutan ekstrak sama sekali. Untuk ekstrak yang sulit berdifusi dalam air dilarutkan dalam DMSO menggunakan alat penggetar ultrasonik.
- (6) Setelah telur udang menetas, maka anak udang (nauplii) telah siap digunakan sebagai uji aktivitas. Pada masing-masing vial ditambah 5 ml air laut dan 10 ekor larva udang (30 ekor larva udang tiap-tiap konsentrasi).

- (7) Setelah 24 jam, jumlah larva udang yang mati untuk tiap-tiap konsentrasi dihitung dan dicatat. Bila dalam larutan kontrol terdapat larva udang yang mati, maka pada tiap-tiap konsentrasi dikurangi jumlah larva udang yang mati dalam larutan kontrol.
- (8) Data tersebut dianalisis dengan komputer, menggunakan *Probit Analysis* untuk menentukan harga  $LC_{50}$ . Bila masing-masing ekstrak yang diuji kurang dari 1000  $\mu\text{g/ml}$  maka dianggap menunjukkan aktivitas biologik.

### 4.3.3 Skrining Zat Kandungan dalam Ekstrak yang Aktif

Terhadap ekstrak yang positif terhadap uji BST dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya (Harborne, 1987).

#### 4.3.3.1 Skrining Flavonoid

##### Penyiapan ekstrak bahan pemeriksaan

Ekstrak etanol sebanyak 2 ml diuapkan diatas penangas air sampai kering, kemudian diekstraksi berulang-ulang dengan petroleum eter sampai cairan tidak berwarna. Residu ditambah dengan 20 ml etanol 80%, kemudian disaring dan filtratnya dibagi empat (A, B, C, D).

##### Reaksi warna

##### Uji Bate Smith & Metcalf

Larutan A sebagai blanko, larutan B ditambah 0,5 ml HCl pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian dipanaskan 15 menit di atas penangas air dan diamati lagi perubahan warna yang terjadi. Bila perlahan-lahan menjadi warna merah terang atau violet menunjukkan adanya senyawa leukoantosianin (dibandingkan dengan blanko).

##### Uji Wilstatter

Larutan A sebagai blanko, larutan C ditambah 0,5 ml HCl pekat dan 4 potong Mg. Diamati warna yang terjadi, diencerkan dengan air suling, kemudian ditambah 1 ml butanol. Diamati warna yang terjadi di setiap lapisan. Perubahan warna merah jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonoid, merah tua menunjukkan adanya flavonon.

#### Kromatografi lapis tipis

Larutan D ditotolkan pada fase diam. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan

Fasa diam : lapisan tipis selulose

Eluen : butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5)

Penampak noda : pereaksi citrat borat atau uap amonia

Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning.

#### **4.3.3.2 Skrining glikosida Saponin**

##### Uji buih

Ekstrak etanol diambil 5 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan air suling 10 ml dan dikocok kuat-kuat selama 30 detik (larutan A). sebagai pembanding digunakan larutan yang dibuat dari sedikit daging buah Sapindus rarak, ditambah 10 ml air suling kemudian dikocok dengan kuat (larutan B). Sebagai blanko digunakan 10 ml air suling ditambah dengan sedikit etanol 80% dan dikocok kuat-kuat (larutan C). Tes buih positif mengandung saponin bila terjadi buih yang stabil lebih dari 30 menit dengan tinggi buih 3 cm diatas permukaan cairan. Pengamatan dilakukan pada larutan A yang dibandingkan dengan larutan B dan C.

#### **4.3.3.3 Skrining Steroid dan Triterpen**

##### Penyiapan ekstrak bahan pemeriksaan

Ekstrak etanol sebanyak 15 ml diuapkan diatas penangas air sampai kering. Setelah dingin dikocok dengan petroleum eter, didekantir dan filtratnya dibuang. Ulangi sampai petroleum eter tidak berwarna. Residu ditambah dengan 10 ml kloroform dan dikocok selama 5 menit, kemudian didekantir dalam tabung reaksi yang berisi 100 mg  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  kering lalu disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian yang selanjutnya dinamakan larutan A, B dan C.

### Reaksi warna

#### Uji Liebermann-Burchard

Larutan A digunakan sebagai blanko, larutan B sebanyak 5 ml ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes  $H_2SO_4$  pekat lalu dikocok perlahan dan diamati terjadinya perubahan warna. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya saponin steroid, warna merah ungu menunjukkan adanya saponin triterpen dan warna kuning muda menunjukkan adanya sapogenin jenuh.

#### Uji Salkowski

Larutan A digunakan sebagai blanko, larutan C sebanyak 5 ml ditambah 1-2 ml  $H_2SO_4$  pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbulnya cincin warna merah.

#### Deteksi steroid dan triterpen dengan KLT

Ekstrak etanol sebanyak 5 ml ditambah 2 ml HCl 2N, dididihkan dalam tabung reaksi yang mulutnya ditutup dengan corong berisi kapas dibasahi air selama 2 jam untuk menghidrolisa saponin. Setelah dingin dinetralkan dengan ammonia kemudian diuapkan diatas penangas air sampai kental. Setelah dingin, residu diekstraksi dengan heksana 3 ml, beberapa kali sampai sempurna (3 kali). Dikumpulkan semua ekstrak heksana, kemudian diuapkan. Residu yang terjadi dilarutkan dalam 5 tetes kloroform dan siap untuk pemeriksaan kromatografi lapis tipis.

Fasa diam : silika gel 60 GF<sub>254</sub>

Eluen : heksana : etil asetat (4:1)

Penampak noda : anisaldehyd-asam sulfat atau antimon klorida

Adanya sapogenin ditunjukkan oleh timbulnya noda warna merah muda.

### **4.3.3.4 Skrining Alkaloid**

#### Penyiapan ekstrak

Ekstrak etanol diambil 20 ml, kemudian dipanaskan diatas penangas air hingga diperoleh cairan seperti sirup kental. Setelah dingin ditambah 10 ml HCl 2N, diaduk, kemudian dipanaskan kembali di atas penangas air selama 2-3 menit, sambil diaduk. Setelah dingin ditambah NaCl 0,5 g, diaduk sampai



rata kemudian disaring. Filtrat ditambah dengan HCl 2N hingga bervolume 40 ml. Filtrat dibagi 3 dan selanjutnya disebut larutan A,B, dan C..

#### Reaksi pengendapan

Larutan A ditambah pereaksi Meyer, larutan B ditambah pereaksi Wagner dan larutan C dipakai sebagai kontrol. Kemudian diamati terjadinya pengendapan. Adanya alkaloid ditunjukkan oleh timbulnya kekeruhan atau endapan.

#### Deteksi Alkaloid dengan KLT

Larutan C ditambah dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$  28% secukupnya sampai larutan suasananya basa, kemudian diekstraksi dengan 20 ml kloroform ditambah  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  eksikatus secukupnya hingga lapisan kloroform babas air, kemudian disaring. Filtrat kloroform diuapkan sampai kering, kemudian dilarutkan metanol siap untuk pemeriksaan KLT.

Fasa diam : silika gel 60 GF<sub>254</sub>

Eluen : etil asetat : metanol : air (100:16,5:13,5)

Penampak noda : pereaksi Dragendorf

Jika timbul noda warna jingga menunjukkan adanya alkaloid..

### **4.3.3.5 Skrining Tanin dan Senyawa Polifenol**

#### Penyiapan ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 2 ml diuapkan diatas penangas air sampai kering. Setelah dingin ditambah 20 ml air suling panas, dikocok sampai homogen dan kemudian ditambah 5 tetes NaCl 10%, disaring dan filtratnya dibagi 3 bagian (A,B,C).

#### Reaksi warna

#### Uji Gelatin

Larutan A digunakan sebagai blanko. Larutan B ditambah dengan sedikit larutan gelatin 1% dan NaCl 10%. Diamati terjadinya endapan serta dibandingkan dengan larutan A. Jika terbentuk endapan putih menunjukkan adanya tanin.

#### Uji Ferriklorida

Larutan C diberi 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ , kemudian diamati terjadinya perubahan warna. Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin. Jika pada penambahan gelatin dan  $\text{NaCl}$  tidak timbul endapan, tetapi setelah ditambahkan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  terjadi perubahan warna menjadi hijau biru hingga hitam, menunjukkan adanya senyawa polifenol.

#### **4.3.3.6 Skrining Glikosida Jantung**

##### Uji Liebermann-Burchard

Dilakukan seperti pemeriksaan steroid dan triterpen

##### Uji Keller-Killiani

Ekstrak etanol sebanyak 10 ml diuapkan diatas penangas air sampai kering. Setelah dingin diekstraksi berulang-ulang dengan heksana tidak berwarna. Residu diuapkan untuk menghilangkan heksana. Kemudian ditambah dengan 6 ml larutan  $\text{FeCl}_3$ , diaduk dan dituangkan kedalam 2 tabung reaksi, bagi 2 bagian yang sama (larutan A dan B). Larutan A digunakan sebagai kontrol sedangkan larutan B ditambah 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat melalui dinding tabung secara perlahan-lahan. Diamati perubahan warna yang terjadi. Bila terbentuk cincin berwarna merah ungu atau terjadi warna dari coklat menjadi merah kemudian perlahan-lahan berubah menjadi biru atau ungu, menunjukkan adanya gula-2-deoksi.

##### Deteksi glikosida jantung dengan KLT

Bahan : 0,1-0,2 ml ekstrak etanol ditotolkan pada fase diam

Fase diam : silika gel 60 GF<sub>254</sub>

Eluen : kloroform : metanol (4:1)

Penampak noda : pereaksi Kedde

Untuk menunjukkan adanya inti lakton tak jenuh apabila ada noda biru ungu.

#### **4.3.4 Analisis Data**

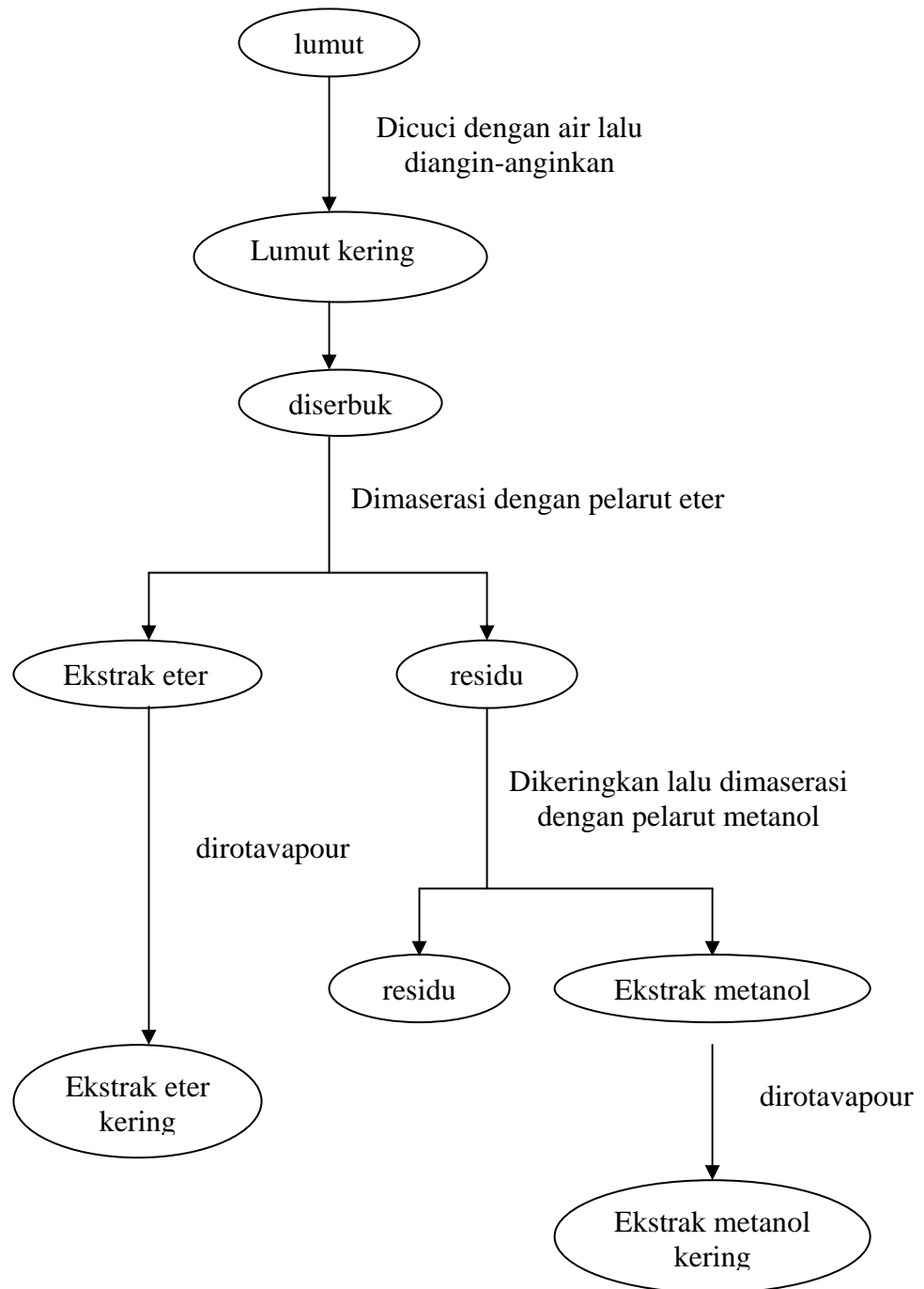
Data-data yang diperoleh dari hasil penelitian diolah dengan program SPSS yaitu *Probit Analysis*.

Analisis probit digunakan untuk mengukur suatu hubungan antara kekuatan suatu stimulus dengan proporsi dari respon yang terjadi. Metode ini dapat digunakan untuk menimbulkan respon dalam proporsi tertentu, seperti data  $ED_{50}$  (Median Effective Dose) dan  $LC_{50}$  (Median Lethal Concentration). Dengan Penggunaan analisis probit akan diperoleh kekuatan hubungan antara konsentrasi dan jumlah hewan coba yang mati dan dapat ditentukan pula berapa dosis efektif pada obat tersebut.

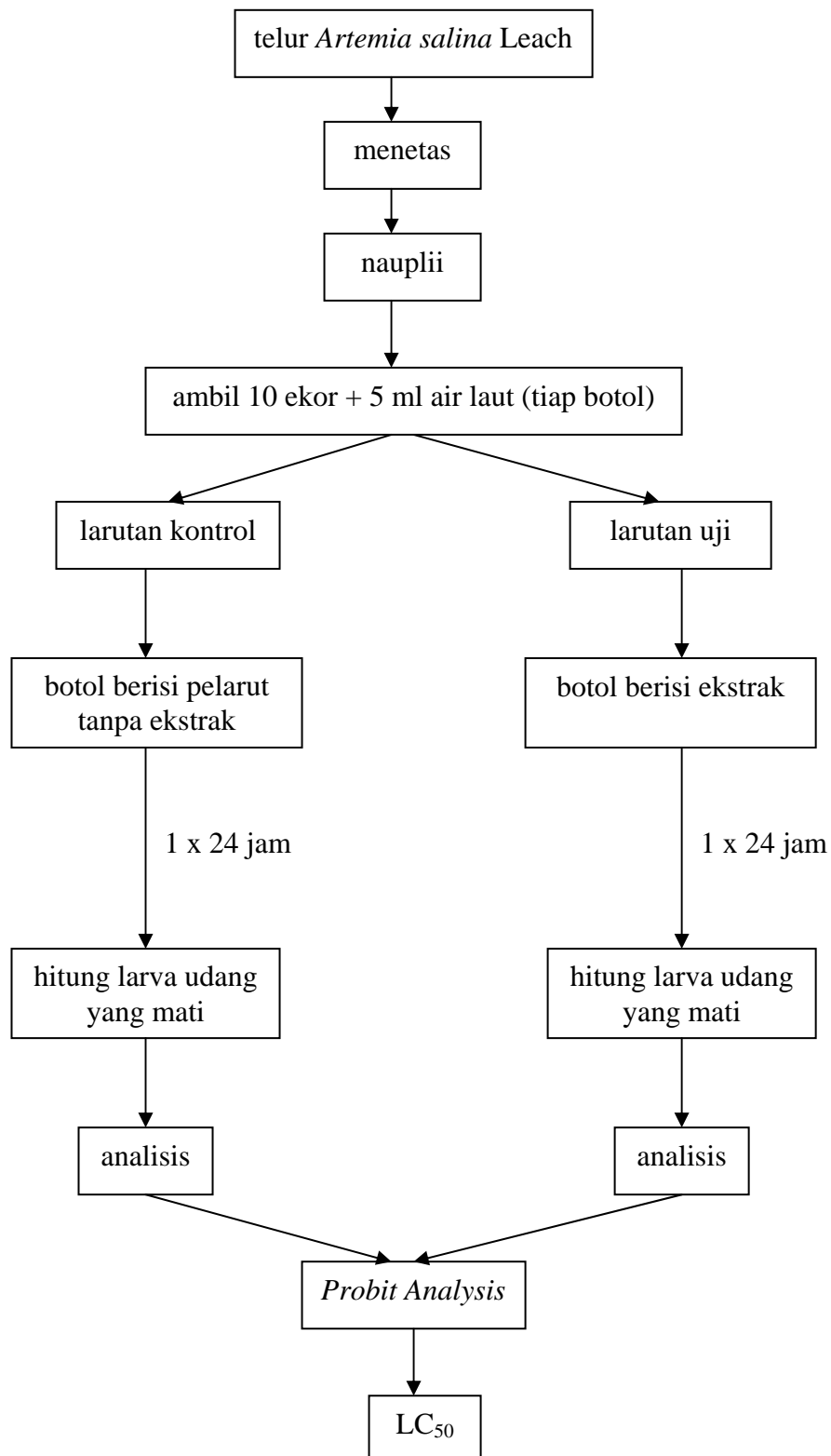
Data yang diperlukan untuk masing-masing bahan yang diuji dapat dilihat pada tabel IV.1.

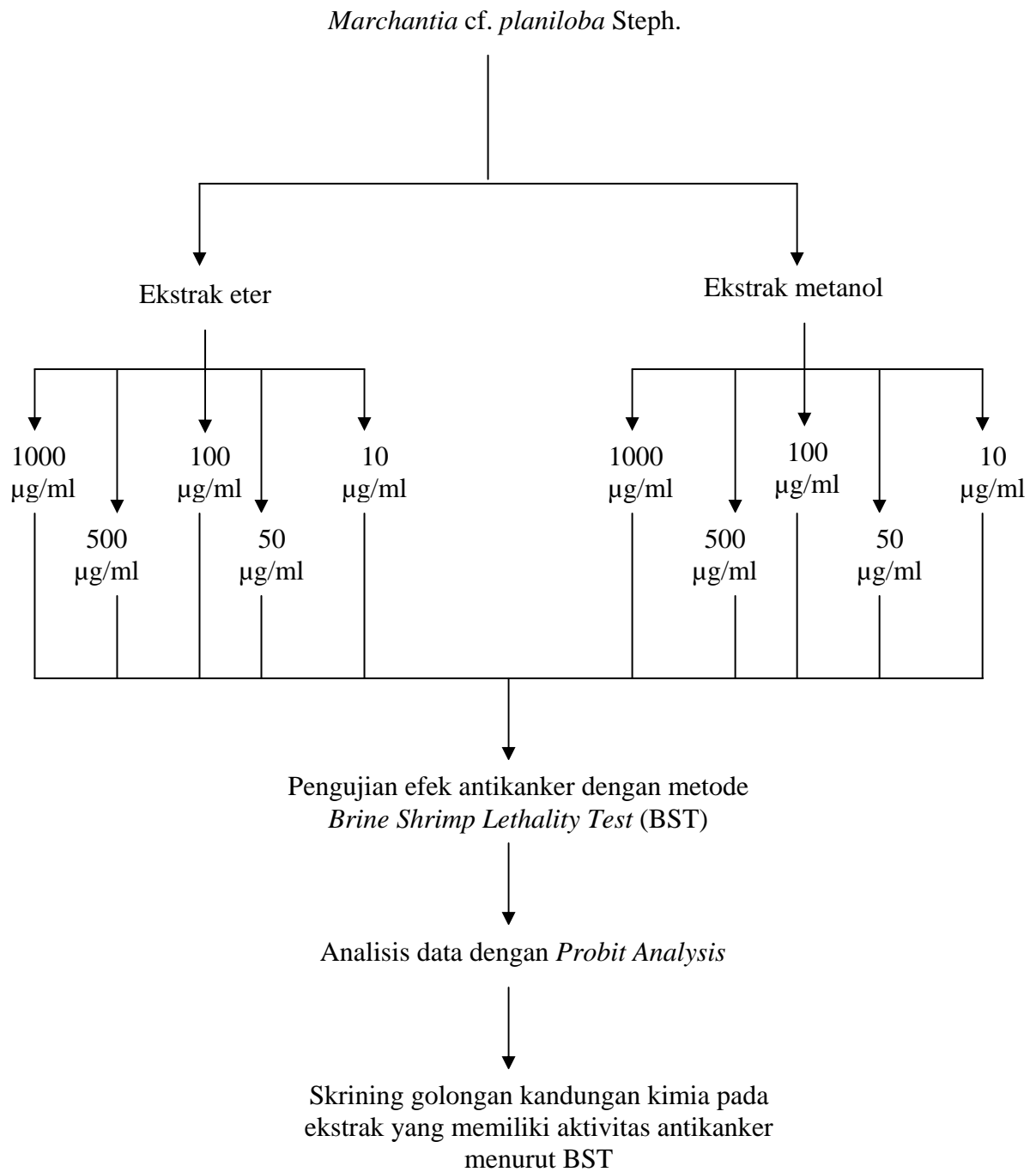
Tabel IV.1 Data yang diperlukan untuk mencari harga  $LC_{50}$  masing-masing bahan yang diuji menggunakan *Probit Analysis*

Jumlah anak udang yang mati	Jumlah anak udang yang diuji	Konsentrasi larutan ( $\mu\text{g/ml}$ )
X 1	30	1000
X 2	30	500
X 3	30	100
X4	30	50
X5	30	10



Gambar 4.1 Skema Ekstraksi dengan Pelarut Eter dan Metanol

Gambar 4.2 Skema *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)



Gambar 4.3 Skema Rancangan Penelitian

## BAB V

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Hasil Pembuatan Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.

Dari tumbuhan lumut hati, *Marchantia cf. planiloba* Steph. yang telah diserbuk, ditimbang 500 gram kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut eter dan metanol untuk mendapatkan ekstrak kering. Hasil ekstraksi dari masing-masing pelarut dan berat ekstrak kering *Marchantia cf. planiloba* Steph. yang diperoleh tertera pada tabel V.1.

Tabel V.1. Hasil pembuatan ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.

Nama bahan	Berat serbuk yang ditimbang	Berat ekstrak kering
Ekstrak eter	500 g	3,895 g
Ekstrak metanol	500 g	2,287 g

#### 5.2 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.

Dari ekstrak eter yang diperoleh ditimbang 50 mg kemudian ditambah dengan pelarut eter sampai tepat 50 ml untuk mendapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Untuk ekstrak metanol ditimbang 25 mg kemudian ditambah dengan pelarut metanol sampai tepat 25 ml. Dari larutan tersebut masing-masing dibuat 5 macam konsentrasi larutan uji seperti yang tertera pada tabel V.2 yang kemudian diuapkan sampai kering.

Tabel V.2. Pembuatan larutan uji ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.

Nama bahan	Ekstrak yang ditimbang	Konsentrasi larutan induk ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konsentrasi larutan uji ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ekstrak metanol	I. 24,8 mg	992	496; 396,8; 198,4; 99,2; 9,92
	II. 24,8 mg	992	496; 396,8; 198,4; 99,2; 9,92
	III. 24,9 mg	996	498; 398,3; 199,2; 99,6; 9,96
Ekstrak eter	I. 49,6 mg	992	992; 496; 99,2; 49,6; 9,92
	II. 50,4 mg	1008	1008; 504; 100,8; 50,4; 10,08
	III. 50,3 mg	1006	1006; 503; 100,6; 50,3; 10,06

### 5.3 Hasil Uji Aktivitas Antikanker dari Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol

#### *Marchantia cf. planiloba* Steph. dengan Metode BST

Metode uji antikanker dengan metode BST dilakukan dengan menghitung larva *Artemia salina* Leach. yang mati pada masing-masing larutan. Hasil pengamatan pada tabel V.3.

Tabel V.3. Hasil uji aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph. dengan metode BST

Nama bahan	Replikasi	Konsentrasi larutan uji ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah larva udang yang diuji	Jumlah larva udang yang mati setelah perlakuan
Ekstrak metanol	I	0	10	0
			10	0
			10	0
	II	9,92	10	1
			10	2
			10	2



		99,2	10	3
			10	3
			10	2
		198,4	10	5
			10	6
			10	3
		396,8	10	7
			10	6
			10	4
		496	10	9
			10	9
			10	10
	II	0	10	0
			10	0
			10	0
		9,92	10	2
			10	1
			10	1
		99,2	10	3
			10	3
			10	2
		198,4	10	4
			10	6
			10	4
		396,8	10	6
			10	5
			10	5
		496	10	10
			10	10
			10	10
	III	0	10	0
			10	0
			10	0
		9,96	10	2
			10	1
			10	2
		99,6	10	3
			10	2
			10	2
		199,2	10	4
			10	6
			10	4
		398,4	10	7
			10	6
			10	5
		498	10	10
			10	10
			10	10
Ekstrak eter	I	0	10	0
			10	0
			10	0

		9,92	10 10 10	2 3 0
		49,6	10 10 10	2 2 3
		99,2	10 10 10	3 5 5
		496	10 10 10	5 6 7
		992	10 10 10	7 7 8
	II	0	10 10 10	0 0 0
		10,08	10 10 10	1 2 3
		50,4	10 10 10	2 2 3
		100,8	10 10 10	4 4 5
		504	10 10 10	4 5 7
		1008	10 10 10	8 8 7
	III	0	10 10 10	0 0 0
		10,06	10 10 10	1 2 1
		50,3	10 10 10	2 4 3
		100,6	10 10 10	5 6 4
		503	10 10 10	6 7 5
		1006	10 10 10	8 7 6

#### 5.4 Penentuan Harga LC<sub>50</sub> Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph. terhadap Larva *Artemia salina* Leach. dengan *Probit Analysis*

Dari hasil pengamatan respon kematian larva *Artemia salina* Leach. pada masing-masing konsentrasi larutan uji ditentukan harga LC<sub>50</sub> ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph. dengan menggunakan *Probit Analysis*

Tabel V.4. Hasil penentuan harga LC<sub>50</sub> ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph. terhadap larva *Artemia salina* Leach. dengan *Probit Analysis*

Nama bahan	Replikasi	Harga LC <sub>50</sub> (µg/ml)	Rata-rata harga LC <sub>50</sub> (µg/ml)
Ekstrak metanol	I	251,93	247,10 ± 5,28
	II	249,62	
	III	239,76	
Ekstrak eter	I	452,85	453,16 ± 3,66
	II	457,79	
	III	448,83	

Ekstrak dikatakan aktif (memiliki aktivitas antikanker) menurut metode BST jika mempunyai harga LC<sub>50</sub> <1000 µg/ml. Dari ekstrak yang diuji yaitu ekstrak eter dan ekstrak metanol kedua-duanya mempunyai harga LC<sub>50</sub> < 1000 µg/ml, masing-masing 453,16 ± 3,66 µg/ml dan 247,10 ± 5,28 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa kedua-duanya baik ekstrak metanol maupun ekstrak eter mempunyai aktivitas biologik antikanker menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).

## 5.5 Skrining Kandungan Kimia Ekstrak yang Paling Aktif (Ekstrak Metanol)

### *Marchantia cf. planiloba* Steph.

Pada ekstrak yang paling aktif (menunjukkan aktivitas biologik antikanker) menurut BST dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui golongan kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak tersebut (ekstrak metanol) *Marchantia cf. planiloba* Steph.

Tabel V.5. Hasil skrining kandungan kimia ekstrak metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.

Uji golongan	Hasil	Keterangan
A. Flavonoid		
1. Uji Bate Smith & Metcalf	(-)	warna kuning
2. Uji Wilstatter	(-)	warna kuning
3. KLT	(-)	tidak ada noda
B. Saponin		
1. Uji buih	(+)	buih stabil
C. Steroid / Triterpen		
1. Uji Liebermann-Burchard	(+)	warna merah-ungu
2. Uji Salkowski	(+)	cincin merah
3. KLT	(+)	noda warna ungu
D. Tanin dan Polifenol		
1. Uji Gelatin-NaCl	(-)	tidak ada endapan
2. Uji Ferriklorida	(-)	warna kuning
E. Alkaloid		
1. Reaksi pengendapan	(-)	tidak ada endapan
2. KLT	(-)	tidak ada noda
F. Glikosida jantung		
1. Uji Keller-Killiani	(-)	warna orange

### 5.6 Hasil KLT Steroid / Triterpenoid Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.

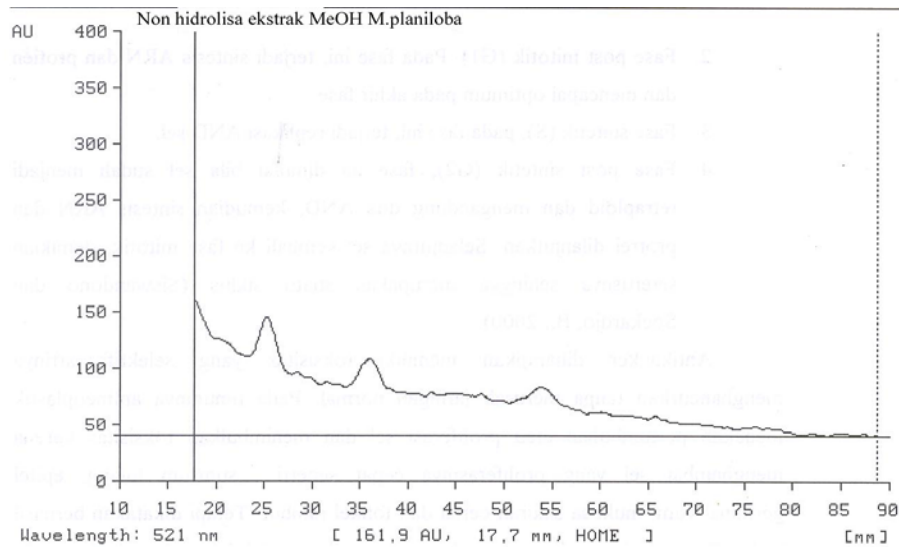


Gambar 5.1 Hasil KLT Steroid / Triterpenoid Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.

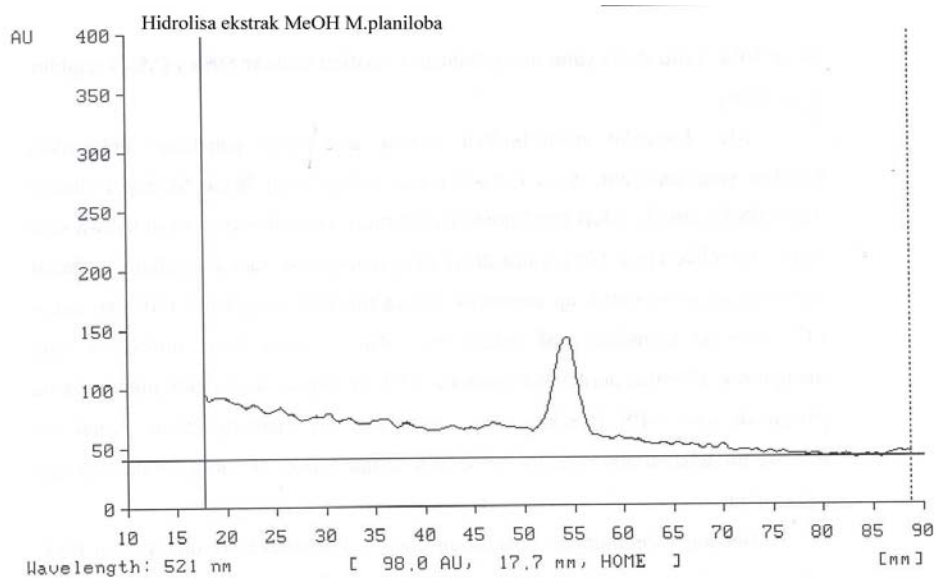
Fase diam : silika gel 60 GF<sub>254</sub>  
Fase gerak : heksana : etil asetat (4:1)  
Penampak noda : anisaldehyd-asam sulfat

1 : ekstrak metanol (hidrolisa) *Marchantia cf. planiloba* Steph.  
2 : ekstrak metanol (non hidrolisa) *Marchantia cf. planiloba* Steph.  
3 : standart sterol (isolat *Marchantia geminata*)

### 5.7 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph. Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat

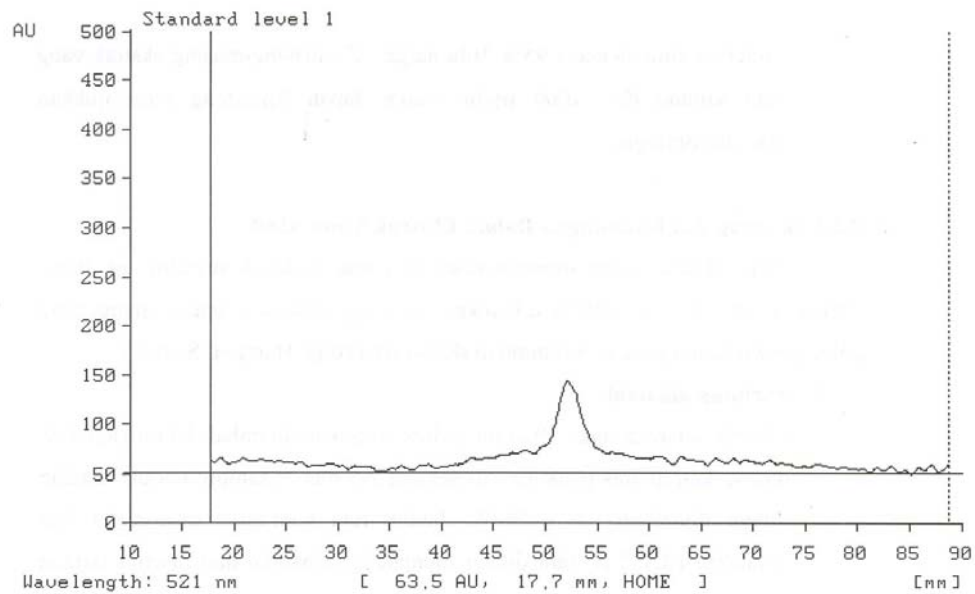


Gambar 5.2 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Ekstrak Metanol (non hidrolisa) *Marchantia cf. planiloba* Steph. Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat



Gambar 5.3 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Ekstrak Metanol (hidrolisa) *Marchantia cf. planiloba* Steph. Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat

### 5.8 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol (Isolat *Marchantia geminata*) Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat



Gambar 5.4 Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol (Isolat *Marchantia geminata*) Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Terdapat bermacam-macam metode untuk mengetahui aktivitas biologik ekstrak, isolat tumbuhan dan senyawa dari bahan alam. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) yaitu uji toksisitas senyawa terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Metode ini telah dibuktikan memiliki korelasi dengan daya sitotoksis senyawa-senyawa antikanker (Meyer, 1982). Selain itu metode ini mudah, murah, cepat dan cukup akurat. Hal tersebut mendorong dilakukannya uji toksisitas ekstrak eter dan metanol lumut hati, *Marchantia cf planiloba* Steph. terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

Pada penelitian ini digunakan ekstrak lumut hati, *Marchantia cf planiloba* Steph. yang diperoleh dengan proses ekstraksi secara maserasi. Cara ini dipilih karena waktu yang diperlukan relatif lebih cepat dibandingkan perkolasi. Proses ekstraksi ini dilakukan secara bertahap dengan menggunakan 2 macam pelarut yaitu eter dan metanol. Tujuan digunakannya pelarut dengan polaritas yang berbeda agar zat-zat kimia yang terkandung dalam tumbuhan dapat tersari pada pelarut yang sesuai dengan kepolarannya masing-masing (zat kimia yang non polar akan tersari pada pelarut eter sedangkan yang polar akan tersari pada pelarut metanol).

Penelitian dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) ini menghitung respon kematian 50% larva udang ( $LC_{50}$ ) yaitu dengan mengkorelasikan jumlah kematian larva udang dengan konsentrasi larutan uji. Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan Program SPSS yaitu *Probit Analysis* untuk menentukan harga  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak.

Pada metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) ini digunakan larva udang jenis *Artemia salina* Leach. yang berumur 48 jam dan biasa disebut nauplii. Ekstrak hasil maserasi setelah dikeringkan, masing-masing dibuat 5 macam konsentrasi sebagai larutan uji dalam vial. Tiap-tiap vial ditambah 5 ml air laut dan 10 ekor nauplii dengan replikasi 3 kali. Setelah 24 jam jumlah nauplii yang mati pada masing-masing konsentrasi dihitung.



Tingkat toksisitas dari ekstrak tanaman dapat ditentukan dengan melihat harga  $LC_{50}$ -nya. Apabila harga  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$  dikatakan toksik sebaliknya apabila harga  $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$  dikatakan tidak toksik. Tingkat toksisitas tersebut akan memberi makna terhadap potensi aktivitasnya sebagai antikanker.

Dari ekstrak yang diuji yaitu ekstrak metanol dan ekstrak eter kedua-duanya mempunyai harga  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ , masing-masing  $247,10 \pm 5,28 \mu\text{g/ml}$  dan  $453,16 \pm 3,66 \mu\text{g/ml}$ . Hal ini menunjukkan bahwa kedua-duanya baik ekstrak metanol maupun ekstrak eter *Marchantia cf planiloba* Steph. mempunyai aktivitas biologik antikanker menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Aktivitas tersebut ditunjukkan pula oleh spesies yang lain dari famili Marchantiaceae yaitu *Marchantia polymorpha* L. Dalam suatu penelitian yang dilakukan di Jepang, oleh Asakawa (1984) ekstrak metanol dari *Marchantia polymorpha* L. menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap KB Cell.

Dalam penelitian ini digunakan DMSO (Dimetil Sulfoxide) untuk meningkatkan kelarutan ekstrak eter dalam air laut. Batas penggunaan DMSO adalah 50  $\mu\text{l}$  tiap 5 ml air laut sebelum menimbulkan efek toksik (Laughlin, 1991).

Untuk mengetahui seberapa jauh pengaruh DMSO yang ditambahkan dan pelarut yang digunakan maka dibuat larutan kontrol. Disini ada 2 macam perlakuan yaitu untuk larutan kontrol ekstrak metanol digunakan air laut dan pelarut metanol tanpa penambahan DMSO sedangkan untuk larutan kontrol ekstrak eter digunakan air laut dan pelarut metanol dengan penambahan DMSO sejumlah 50  $\mu\text{l}$  tiap 5 ml air laut pada masing-masing konsentrasi larutan uji.

Larutan kontrol ini juga berfungsi untuk menghilangkan pengaruh-pengaruh lain di luar ekstrak uji yang menyebabkan kematian nauplii misalnya salinitas air laut, suhu percobaan, pengotor-pengotor toksik dari air laut dan sebagainya.

Ekstrak metanol mempunyai toksisitas yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak eter, hal ini mendorong dilakukan skrining golongan kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak metanol.

Berdasarkan skrining kandungan kimia diperoleh hasil yang positif pada uji buih yaitu terjadi buih yang stabil selama  $\pm 30$  menit. Uji buih yang positif

memberi indikasi terhadap sapogenin yang mungkin mempunyai gugus steroid atau triterpenoid. Demikian juga untuk uji Liebermann-Burchard dan uji Salkowski, diperoleh hasil yang positif. Sehingga dapat diketahui bahwa dalam ekstrak metanol *Marchantia cf planiloba* Steph terkandung senyawa golongan steroid/triterpenoid. Karena ekstrak ini masih mengandung campuran senyawa yang relatif banyak maka usaha pemisahan dan identifikasi lebih lanjut senyawa yang bersifat toksik tersebut perlu dilakukan.

Pada KLT golongan steroid/triterpenoid dilakukan 2 preparasi sampel yang berbeda yaitu hidrolisa dan non hidrolisa ekstrak metanol untuk mengetahui adanya senyawa sterol. Sebagai pembanding digunakan standart sterol (isolat *Marchantia geminata*). Berdasarkan hasil KLT diperoleh noda warna ungu untuk hidrolisa dan standart sterol dan warna merah untuk non hidrolisa pada nilai Rf yang sama. Yang berarti di dalam ekstrak metanol *Marchantia cf planiloba* Steph juga terkandung senyawa sterol. Hal ini ditunjukkan pula dalam profil kromatogramnya, baik pada standart sterol maupun hidrolisa dan non hidrolisa terdapat gambar puncak (peak) pada jarak migrasi yang sama yaitu 50-55 mm.

Dalam suatu penelitian disebutkan bahwa beberapa tanaman dari famili Araceae telah dibuktikan mempunyai aktivitas antikanker, diantaranya *Pinellia pedatisecta* dan *Typhonium giganteum* Engl. Akar dari *Pinellia pedatisecta* memiliki kandungan  $\beta$ -sitosterol-3- $\alpha$ - $\beta$ -D-glukosida. Sedangkan dalam *Typhonium giganteum* Engl terkandung senyawa  $\beta$ -sitosterol dan glikosidanya, inositol, phlegm dan saponin (Swee Hock Goh, 1997).

Untuk melihat gambaran komponen-komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak eter dan ekstrak metanol dilakukan juga KLT golongan steroid/triterpenoid dan KLT-densitometri, seperti yang tertera pada lampiran.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah pelarut eter dan metanol yang digunakan dalam pembuatan larutan induk harus berderajat *pro analysis* (p.a), penghitungan jumlah larva udang yang mati dapat dilakukan dengan bantuan pipet dan kriteria mati untuk larva udang adalah bila tidak menunjukkan adanya gerakan sama sekali selama pengamatan meskipun larva udang tampak diam tetapi jika masih ada sedikit gerakan pada saat pipet digoyang maka larva udang masih hidup.



## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### KESIMPULAN

1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik ekstrak metanol maupun ekstrak eter *Marchantia cf. planiloba* Steph. mempunyai aktivitas biologik antikanker menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan harga  $LC_{50}$  masing-masing  $247,10 \pm 5,28 \mu\text{g/ml}$  dan  $453,16 \pm 3,66 \mu\text{g/ml}$ .
2. Hasil skrining golongan kandungan kimia yang terkandung dalam ekstrak metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph. adalah senyawa golongan steroid/triterpenoid.

#### SARAN

1. Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan uji aktivitas antikanker secara in vitro maupun in vivo.
2. Untuk mengetahui senyawa yang mempunyai aktivitas biologik antikanker yang terdapat pada ekstrak metanol diperlukan penelitian lanjutan untuk mengisolasi zat aktif tunggal dan mengidentifikasinya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahern, H., 1992. **Introduction to Experimental Cell Biology**, United States of America: WMC Brown Publisher, hal. 83-87
- Anderson, J.E and Mc. Laughlin, J.L., 1991. A Blind Comparison of Simple Bench Top Bioassay and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumour Prescreens, **Phytochemical Analysis**, Vol.2, hal.107-111
- Anonim, 1997. **Materia Medika**, Jilid I, Departemen Kesehatan RI
- Asakawa, Y., 1984. Phytochemistry of Hepaticae: **Isolation of Biologically Active Aromatic Compound and Terpenoids**, Rev. Latinomer. Quim, Japan, hal. 109-114
- Bellanti, A.J., 1985. **Immunology III**, W.B.Sounders Company, Philadelphia, hal. 356-359
- Coll, J.C., and Bowden, B.F., 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to The Separation of Terpen Mixtures, **J. Nat. Prod.**, hal. 934-936
- Dalimartha, Setiawan, 2003. **Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker**, Seri Agrisehat, Penebar Swadaya, Jakarta
- Dewick, P.M., 1989. Tumour Inhibitor From Plants, in: **Trease and Evan's Pharmacognosy**, 13<sup>th</sup> edition Bailliere Tindal: English Language Book Society, hal. 629, 631-632
- Djojopranoto, Moeljono, 1963. **Buku Pelajaran Patologi, Djilid I s.d. IV**, Dasar-dasar Patologi, Departemen Urusan Research Nasional RI, hal. 50-51
- Dwiatmaka, Y., 2000. Skrining Tanaman Berkhasiat Antikanker Dengan Metode Brine Shrimp Lethality, dalam Yuswanto, Ag. dan Sinaradi (Eds.). **Kanker**, Penerbit Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, hal.110-113
- Harborne, J.B., 1973. **Phytochemical Methods**, London: Chapman and Hall LTD.
- Mc. Laughlin, J.L., 1991. **Grown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractionation**, Methods in Plant Biochemistry, Assay for Bioactivity, Vol.6, London: Academic Press

- Meyer, Laughlin and Ferrigni, 1982. Brine Shrimp: Convenient General Bioassay for Active Constituents, **Planta Medica**, Vol.45, hal.31-34
- Mues, R. and Zinsmeister, H.D., 1988. Biologically Active Substances Obtained From Bryophytes: **The Chemotaxonomy of Phenolic Compounds In Bryophytes**, J.Hattori Bot. Lab. No. 64, hal. 109-141
- Mulyadi, S.M., 1995. **Isolasi Struktur Kandungan Daun *Eupatorium Inulifolium* yang Bersifat Sitotoksik**, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
- Nafrialdi dan Ganiswara,S., 1995. Antikanker dan Imunosupresan, **Farmakologi dan Terapi**, Edisi 4, Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 686-687
- Purnomo,S., 1992. **Penelitian Obat Tradisional dan Bahan Nabati Ditinjau Dari Aspek Biokimia**, Simposium Pengembangan dan Penelitian Obat Tradisional Fitofarmaka, Yayasan Widya Husada, Surabaya, hal. 9-10
- Robbins, Stanley L., and Marcia Angell, 1971. **Basic Pathology**, Philadelphia: W.B. Saunders Company
- Robinson, S.L. and Kumar,V., 1992. Neoplasia, **Buku Ajar Patologi**, Edisi 4, Editor alih bahasa Jonathan Uswari, Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC, hal. 203-238
- Santoso,S.O., dkk., 1996. Survey beberapa tanaman obat yang digunakan untuk kanker dan pengaruh infusnya terhadap pertumbuhan tumor kelenjar susu pada mencit galur C<sub>3</sub>H, **Majalah Farmakologi dan Terapi Indonesia**, Vol.12, No.2, Edisi Mei-Agustus
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal**, Edisi kedua, Surabaya: Airlangga University Press
- Tjarta, Ahmad, 1996. Neoplasma, **Patologi**, Edisi I, Jakarta: Bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal.77-109
- Tjitrosoepomo, G., 1986. **Taksonomi Tumbuhan** (Taksonomi Khusus), PT. Bhratara Aksara Karya, Yogyakarta, hal. 168-176
- Underwood, J.C.E, 1999. **Patologi Umum dan Sistemik**, Edisi kedua, Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC, hal. 258-304

## Lampiran-1



Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia  
( Indonesian Institute of Sciences )

PUSAT PENELITIAN BIOLOGI

(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16002, Indonesia P.O Box 208 Bogor  
Telp. (0251) 321038 - 321041 Fax. 325854

Bogor, 6 Juni 2002

Nomor : 310 /IPH.1.02/If.8/2002  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

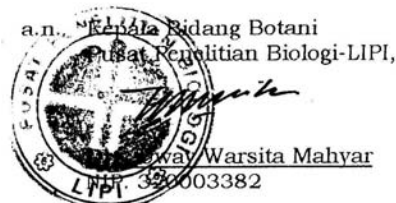
Kepada Yth.  
Sdr. **Drs. Sukardiman, Apt., MS.**  
Jur. Farmasi Univ. Airlangga  
SURABAYA

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

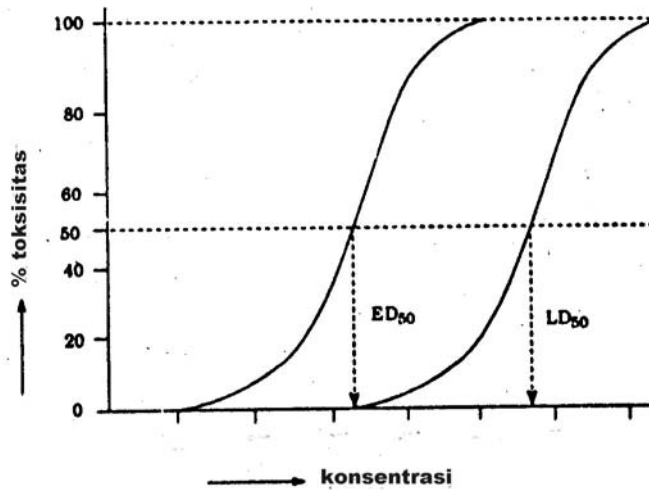
No.	No. Kol./ Nama daerah	Jenis	Suku
1	Tengger 1	<i>Marchantia geminata</i> Reinw., Bl., Nees	Marchantiaceae
2	Tengger 2	<i>Marchantia cf. treubii</i> Schiffner	Marchantiaceae
3	Tengger 3	<i>Marchantia geminata</i> Reinw., Bl., Nees	Marchantiaceae
4	Tengger 4	<i>Marchantia</i> sp.	Marchantiaceae
5	Tengger 5	<i>Marchantia cataractarum</i> Schiffn.	Marchantiaceae
6	Tengger 6	<i>Marchantia</i> sp.	Marchantiaceae
7	Tengger 7	<i>Marchantia polymorpha</i> L.	Marchantiaceae
8	Tengger 8	<i>Marchantia nitida</i> Lehn. et. Lindenb.	Marchantiaceae
9	Tengger 9	<i>Marchantia cf. planiloba</i> Steph.	Marchantiaceae

Demikian, semoga berguna bagi saudara.



## Lampiran-2.

Ilustrasi konsep dosis efektif median (ED<sub>50</sub>) dan dosis kematian median (LD<sub>50</sub>)

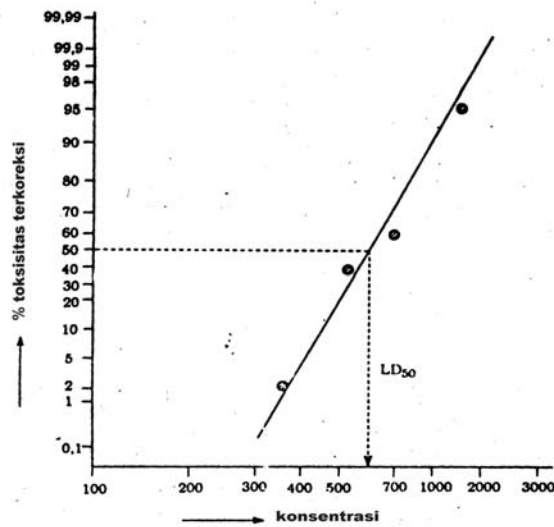
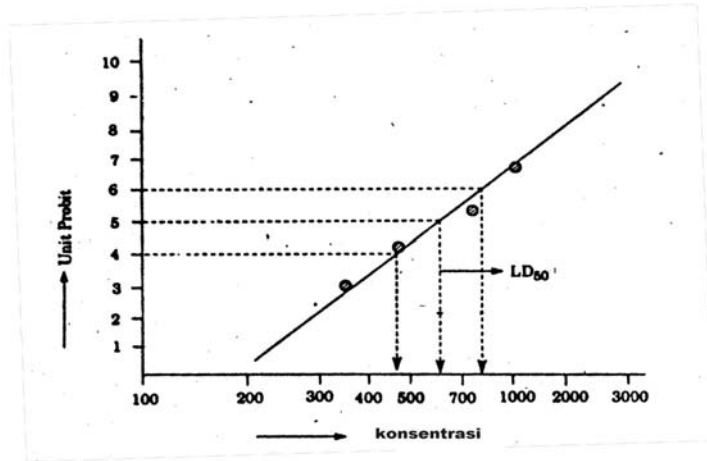


(Disadur dari Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal**, Edisi kedua, Surabaya: Airlangga University Press, hal 247, dengan modifikasi)



Lampiran-3

Kurva konsentrasi-respon toksisitas menggunakan unit probit pada kertas semi log



(Disadur dari Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal**, Edisi kedua, Surabaya: Airlangga University Press, hal 247, dengan modifikasi)

Lampiran-4. Hasil Penentuan Harga LC50 Ekstrak Metanol Replikasi I

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

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 0 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 12 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	.00404	.00066	6.12908

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.01666	.19199	-5.29535

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 5.888 DF = 3 P = .117

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

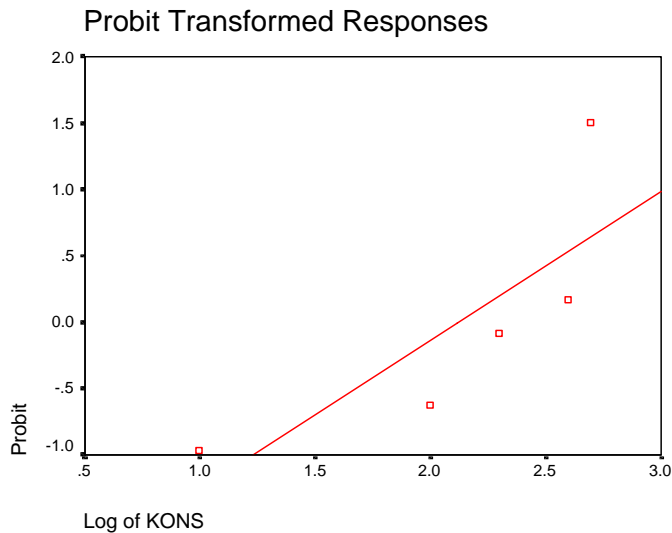
	KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
	9.92	30.0	5.0	4.931	.069	.16438
	99.20	30.0	8.0	8.065	-.065	.26883
	198.40	30.0	14.0	12.435	1.565	.41448
	396.80	30.0	17.0	21.618	-4.618	.72059
	496.00	30.0	28.0	25.130	2.870	.83767

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective KONS

Prob	KONS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-324.54480	-1839.98349	-69.64252
.02	-256.99384	-1594.66686	-28.03950
.03	-214.13493	-1439.39283	-1.27221

.04	-181.89383	-1322.83696	19.11452
.05	-155.66819	-1228.22452	35.89432
.06	-133.34605	-1147.86139	50.34348
.07	-113.77390	-1077.54722	63.16114
.08	-96.24937	-1014.72593	74.77449
.09	-80.31152	-957.72126	85.46514
.10	-65.64069	-905.37195	95.42950
.15	-4.89957	-690.29254	138.34528
.20	43.37555	-522.21838	175.31753
.25	84.79130	-381.45133	210.46203
.30	121.98393	-259.47170	246.45642
.35	156.44844	-152.44009	285.81128
.40	189.15190	-59.05293	331.33056
.45	220.79286	20.67626	385.99496
<b>.50</b>	<b>251.93218</b>	<b>86.79363</b>	<b>452.14042</b>
.55	283.07149	140.65523	530.54165
.60	314.71246	184.96186	620.62861
.65	347.41591	222.77094	721.72598
.70	381.88042	256.74200	834.14138
.75	419.07305	289.03765	959.81975
.80	460.48880	321.60954	1103.15941
.85	508.76392	356.74064	1273.07472
.90	569.50505	398.28125	1489.52931
.91	584.17587	408.00878	1542.11544
.92	600.11373	418.47192	1599.34762
.93	617.63825	429.86550	1662.38869
.94	637.21040	442.46932	1732.91670
.95	659.53255	456.70839	1813.48992
.96	685.75819	473.27883	1908.31172
.97	717.99928	493.45219	2025.08096
.98	760.85820	519.99307	2180.58140
.99	828.40916	561.33243	2426.16170



Lampiran-5. Hasil Penentuan Harga LC50 Ekstrak Metanol Replikasi II

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

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 0 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 13 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	.00453	.00069	6.57361

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.13146	.19804	-5.71321

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 12.357 DF = 3 P = .006

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

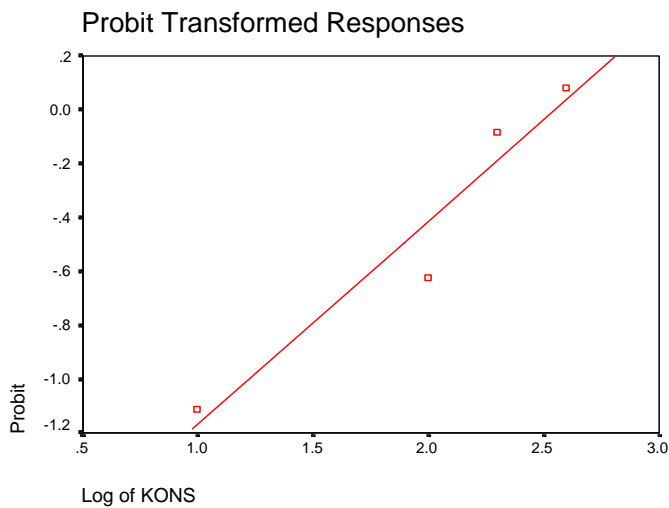
KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
9.92	30.0	4.0	4.159	-.159	.13863
99.20	30.0	8.0	7.430	.570	.24768
198.40	30.0	14.0	12.246	1.754	.40820
396.80	30.0	16.0	22.430	-6.430	.74765
496.00	30.0	30.0	26.039	3.961	.86795

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective KONS

Prob	KONS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-263.61547	-28292.23621	10.36210
.02	-203.47500	-24850.12359	44.46743

.03	-165.31780	-22666.80031	66.69298
.04	-136.61362	-21024.77383	83.81498
.05	-113.26499	-19689.43271	98.06315
.06	-93.39164	-18553.12380	110.46669
.07	-75.96659	-17557.05263	121.59163
.08	-60.36455	-16665.42269	131.78568
.09	-46.17511	-15854.74395	141.27977
.10	-33.11371	-15108.73038	150.23664
.15	20.96398	-12023.08762	190.37319
.20	63.94322	-9576.44188	227.99777
.25	100.81557	-7485.39487	268.23349
.30	133.92809	-5620.47046	317.26683
.35	164.61177	-3917.26620	387.62967
.40	193.72758	-2361.91853	515.22374
.45	221.89746	-1052.86195	834.43276
<b>.50</b>	<b>249.62073</b>	<b>-297.75154</b>	<b>1681.77243</b>
.55	277.34399	-26.06870	3012.53966
.60	305.51387	87.46790	4527.26867
.65	334.62968	152.08505	6145.59326
.70	365.31336	197.53727	7873.70813
.75	398.42588	234.46777	9750.73540
.80	435.29824	267.93868	11848.54721
.85	478.27747	301.37447	14299.38173
.90	532.35516	338.68334	17387.85218
.91	545.41656	347.17682	18134.32914
.92	559.60600	356.23195	18945.44684
.93	575.20805	366.00764	19837.49513
.94	592.63309	376.73079	20833.96809
.95	612.50644	388.74454	21970.66680
.96	635.85508	402.60906	23306.39157
.97	664.55925	419.34493	24948.80417
.98	702.71645	441.16602	27132.53191
.99	762.85692	474.80706	30575.10882



Lampiran-6. Hasil Penentuan Harga LC50 Ekstrak Metanol Replikasi III

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

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 0 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*  
 Parameter estimates converged after 13 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	.00470	.00070	6.74030

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-1.12617	.19708	-5.71427

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 9.309 DF = 3 P = .025

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

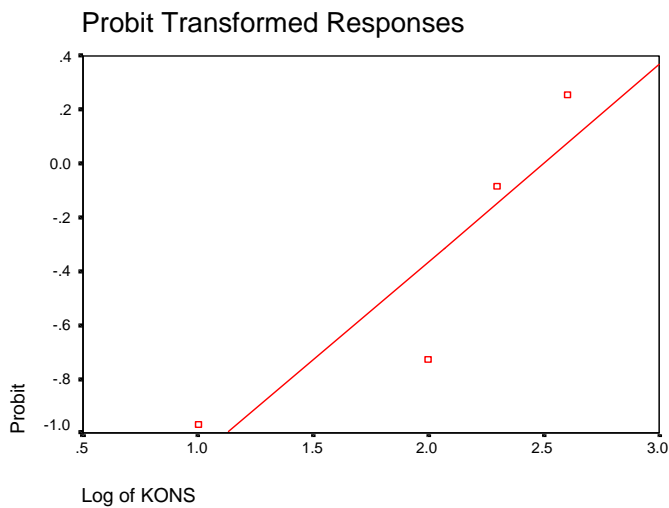
KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
9.96	30.0	5.0	4.206	.794	.14021
99.60	30.0	7.0	7.655	-.655	.25516
199.20	30.0	14.0	12.734	1.266	.42446
398.40	30.0	18.0	23.157	-5.157	.77191
498.00	30.0	30.0	26.623	3.377	.88744

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective KONS

Prob	KONS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-255.51330	-2671.64775	-12.09528
.02	-197.47808	-2329.92541	22.73612

.03	-160.65659	-2113.58245	45.30444
.04	-132.95723	-1951.15291	62.59855
.05	-110.42593	-1819.27795	76.91491
.06	-91.24825	-1707.24305	89.31179
.07	-74.43318	-1609.19879	100.36986
.08	-59.37729	-1521.58541	110.44460
.09	-45.68457	-1442.06834	119.77097
.10	-33.08039	-1369.03019	128.51334
.15	19.10428	-1068.75731	166.83372
.20	60.57900	-833.80625	200.98583
.25	96.16062	-636.73144	234.77759
.30	128.11401	-465.70461	271.07606
.35	157.72359	-315.55730	313.04655
.40	185.82018	-184.97042	364.76068
.45	213.00397	-74.92160	431.09019
<b>.50</b>	<b>239.75676</b>	<b>13.55607</b>	<b>516.19443</b>
.55	266.50955	81.97710	621.35532
.60	293.69333	134.67998	745.03077
.65	321.78993	176.71094	885.30081
.70	351.39951	212.21293	1041.91663
.75	383.35290	244.22150	1217.23336
.80	418.93451	275.10667	1417.21476
.85	460.40923	307.21821	1654.20639
.90	512.59390	344.03619	1955.98166
.91	525.19808	352.52170	2029.27668
.92	538.89081	361.60183	2109.03999
.93	553.94670	371.43920	2196.89074
.94	570.76177	382.26677	2295.16550
.95	589.93944	394.43762	2407.42642
.96	612.47074	408.52917	2539.52620
.97	640.17011	425.59461	2702.18441
.98	676.99159	447.92078	2918.76952
.99	735.02681	482.47082	3260.77323



Lampiran-7. Hasil Penentuan Harga LC50 Ekstrak Eter Replikasi I

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

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 0 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 10 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	.00141	.00030	4.76211

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-.63993	.14536	-4.40230

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 5.097 DF = 3 P = .165

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

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
9.92	30.0	5.0	7.971	-2.971	.26569
49.60	30.0	7.0	8.532	-1.532	.28439
99.20	30.0	13.0	9.259	3.741	.30863
496.00	30.0	18.0	15.729	2.271	.52431
992.00	30.0	22.0	23.308	-1.308	.77693

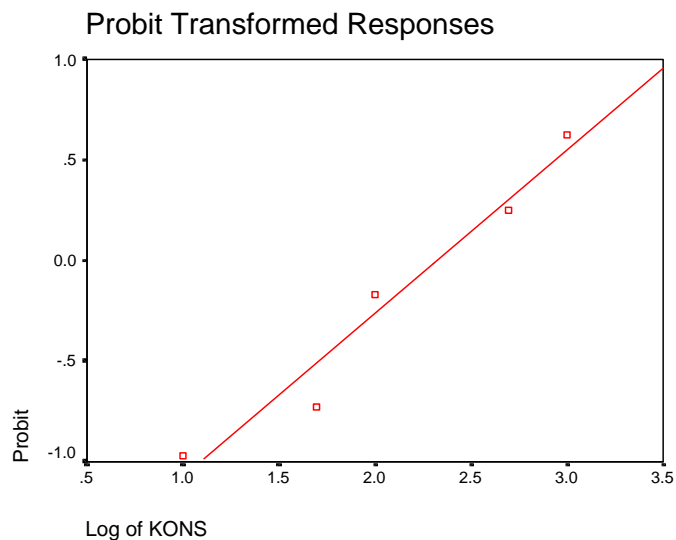
\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective KONS

Prob	KONS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-1193.40770	-2274.76286	-732.27374
.02	-1000.50088	-1949.43454	-593.10230



.03	-878.10768	-1743.42086	-504.40577
.04	-786.03605	-1588.71670	-437.41092
.05	-711.14288	-1463.09295	-382.69962
.06	-647.39702	-1356.35291	-335.94622
.07	-591.50438	-1262.92967	-294.78574
.08	-541.45919	-1179.43542	-257.77632
.09	-495.94509	-1103.64834	-223.97012
.10	-454.04928	-1034.02924	-192.70845
.15	-280.58946	-747.75163	-61.31266
.20	-142.72908	-523.72736	46.61664
.25	-24.45716	-335.88638	143.56228
.30	81.75468	-172.98188	236.40495
.35	180.17579	-29.84531	330.25626
.40	273.56779	95.85057	429.43869
.45	363.92563	205.75514	537.10650
<b>.50</b>	<b>452.85088</b>	<b>302.43217</b>	<b>654.55231</b>
.55	541.77613	389.51991	781.58742
.60	632.13397	470.82527	917.85443
.65	725.52597	549.70088	1063.85714
.70	823.94707	629.09114	1221.45475
.75	930.15892	711.96120	1394.33187
.80	1048.43084	802.00791	1589.07177
.85	1186.29121	905.04383	1817.98942
.90	1359.75104	1032.81970	2107.88695
.91	1401.64684	1063.46158	2178.12586
.92	1447.16095	1096.67344	2254.50726
.93	1497.20614	1133.10980	2338.57458
.94	1553.09878	1173.71373	2432.55437
.95	1616.84463	1219.92131	2539.84023
.96	1691.73780	1274.08969	2666.00689
.97	1783.80944	1340.53231	2821.26328
.98	1906.20263	1428.64407	3027.86173
.99	2099.10946	1567.13613	3353.86944



### Lampiran-8. Hasil Penentuan Harga LC50 Ekstrak Eter Replikasi II

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

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 0 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*  
 Parameter estimates converged after 10 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	.00140	.00029	4.75556

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-.63958	.14501	-4.41061

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 3.260 DF = 3 P = .353

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

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

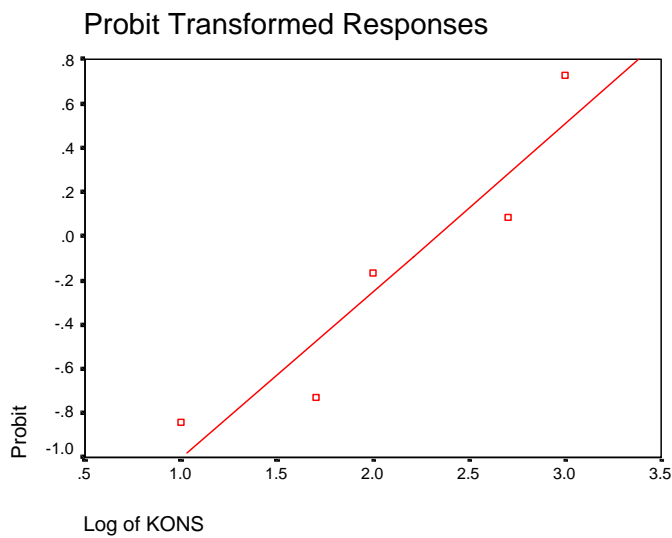
KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
10.08	30.0	6.0	7.975	-1.975	.26582
50.40	30.0	7.0	8.539	-1.539	.28462
100.80	30.0	13.0	9.269	3.731	.30898
504.00	30.0	16.0	15.772	.228	.52574
1008.00	30.0	23.0	23.369	-.369	.77896

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective KONS

Prob	KONS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	-1207.33652	-2302.14510	-741.08408
.02	-1012.21864	-1972.77295	-600.36795
.03	-888.42260	-1764.19962	-510.68534
.04	-795.29566	-1607.57420	-442.94443
.05	-719.54408	-1480.39113	-387.62280

.06	-655.06758	-1372.32691	-340.34686
.07	-598.53431	-1277.74542	-298.72541
.08	-547.91551	-1193.21675	-261.30060
.09	-501.87973	-1116.49148	-227.11406
.10	-459.50373	-1046.01130	-195.49973
.15	-284.05574	-756.20489	-62.60760
.20	-144.61524	-529.44462	46.57952
.25	-24.98771	-339.34781	144.69566
.30	82.44151	-174.54520	238.71719
.35	181.99070	-29.82412	333.83525
.40	276.45314	97.16346	434.43156
.45	367.84664	208.11255	543.67251
<b>.50</b>	<b>457.79114</b>	<b>305.67039</b>	<b>662.81368</b>
.55	547.73563	393.55916	791.62393
.60	639.12914	475.64107	929.73206
.65	733.59158	555.30070	1077.65631
.70	833.14076	635.50576	1237.29039
.75	940.56998	719.24628	1412.37401
.80	1060.19752	810.25436	1609.57889
.85	1199.63802	914.40300	1841.37764
.90	1375.08600	1043.57010	2134.90908
.91	1417.46201	1074.54685	2206.02683
.92	1463.49779	1108.12208	2283.36341
.93	1514.11659	1144.95751	2368.48147
.94	1570.64986	1186.00661	2463.63530
.95	1635.12635	1232.72131	2572.26077
.96	1710.87793	1287.48474	2700.00204
.97	1804.00487	1354.65792	2857.19518
.98	1927.80092	1443.73943	3066.36962
.99	2122.91880	1583.75728	3396.44005



### Lampiran-9. Hasil Penentuan Harga LC50 Ekstrak Eter Replikasi III

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

5 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 0 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 9 iterations.  
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
KONS	.00120	.00029	4.18694

Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
-.53868	.14288	-3.77004

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 8.523 DF = 3 P = .036

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

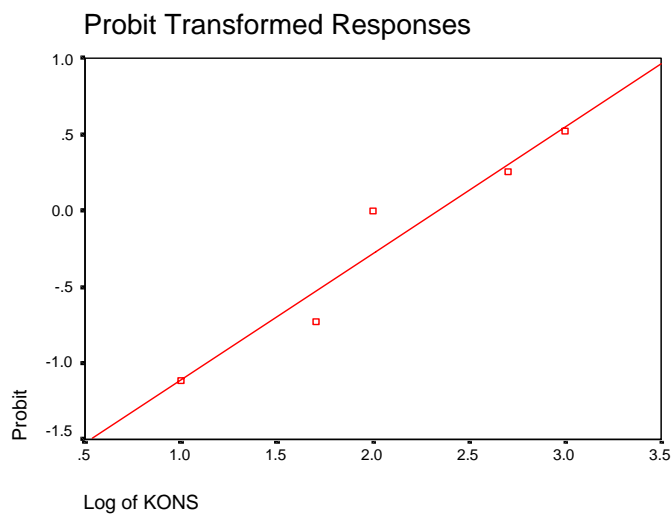
KONS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
10.06	30.0	4.0	8.977	-4.977	.29923
50.30	30.0	9.0	9.486	-.486	.31622
100.60	30.0	15.0	10.140	4.860	.33800
503.00	30.0	18.0	15.777	2.223	.52592
1006.00	30.0	21.0	22.445	-1.445	.74815

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Confidence Limits for Effective KONS

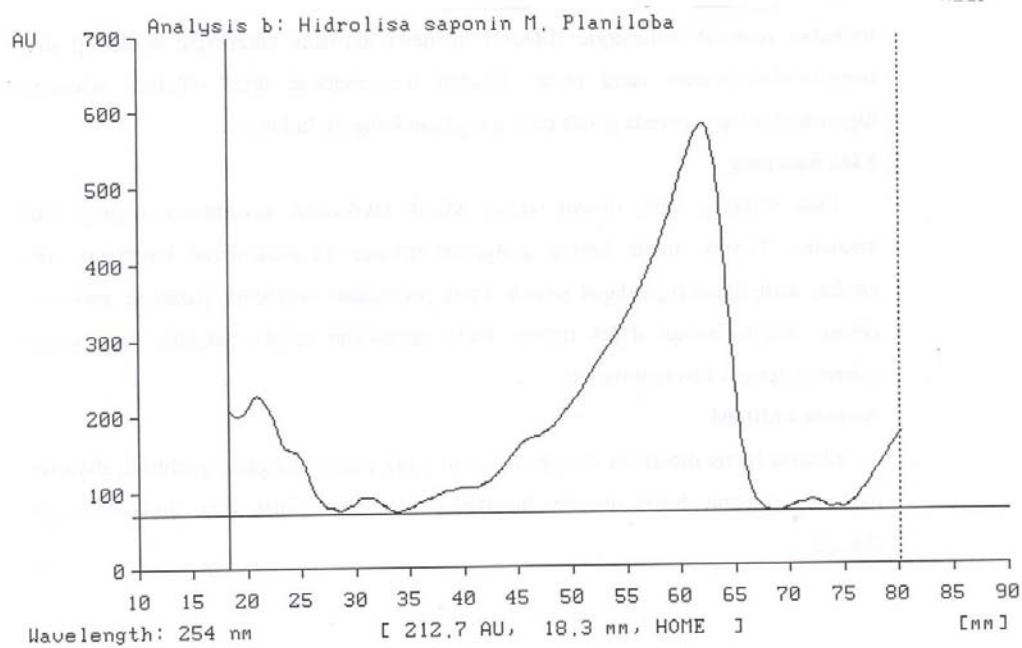
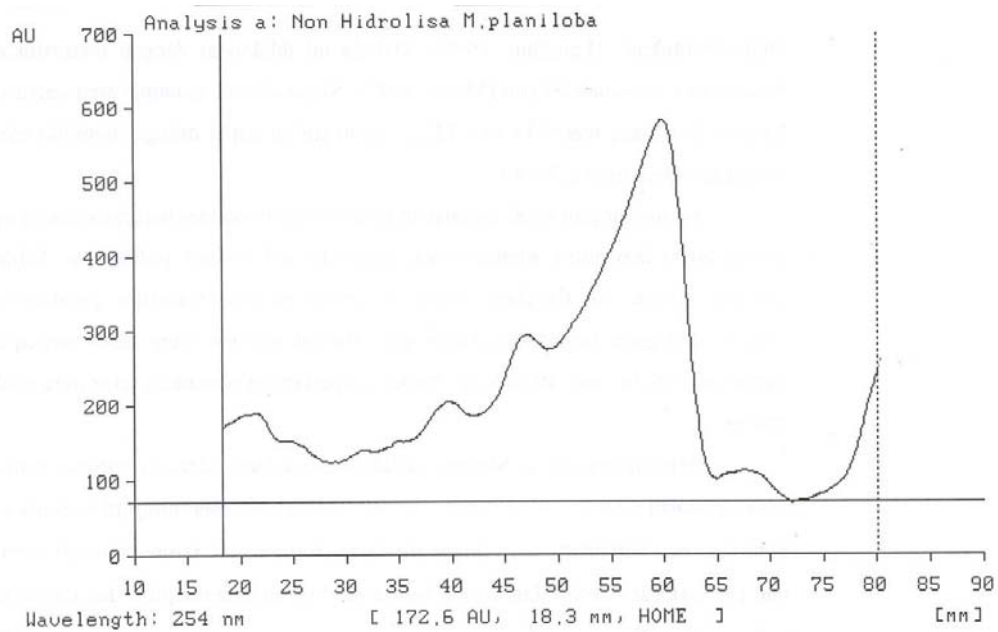
Prob	KONS	95% Confidence Lower	95% Confidence Upper
.01	-1489.51331	.	.
.02	-1262.37981	.	.
.03	-1118.27089	.	.
.04	-1009.86336	.	.
.05	-921.68220	.	.

.06	-846.62618	.	.
.07	-780.81673	.	.
.08	-721.89222	.	.
.09	-668.30274	.	.
.10	-618.97353	.	.
.15	-414.73743	.	.
.20	-252.41705	.	.
.25	-113.16062	.	.
.30	11.89596	.	.
.35	127.77951	.	.
.40	237.74168	.	.
.45	344.13134	.	.
<b>.50</b>	<b>448.83424</b>	.	.
.55	553.53714	.	.
.60	659.92680	.	.
.65	769.88897	.	.
.70	885.77253	.	.
.75	1010.82910	.	.
.80	1150.08553	.	.
.85	1312.40591	.	.
.90	1516.64201	.	.
.91	1565.97122	.	.
.92	1619.56070	.	.
.93	1678.48521	.	.
.94	1744.29466	.	.
.95	1819.35068	.	.
.96	1907.53184	.	.
.97	2015.93937	.	.
.98	2160.04829	.	.
.99	2387.18179	.	.



## Lampiran-10

Profil Kromatogram KLT-Densitometri Steroid/Triterpenoid Ekstrak Metanol (non hidrolisa dan hidrolisa) *Marchantia* cf. *planiloba* Steph. Dengan UV 254 Menggunakan Fase Diam Silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan Fase Gerak Heksana : Etil asetat (4:1)



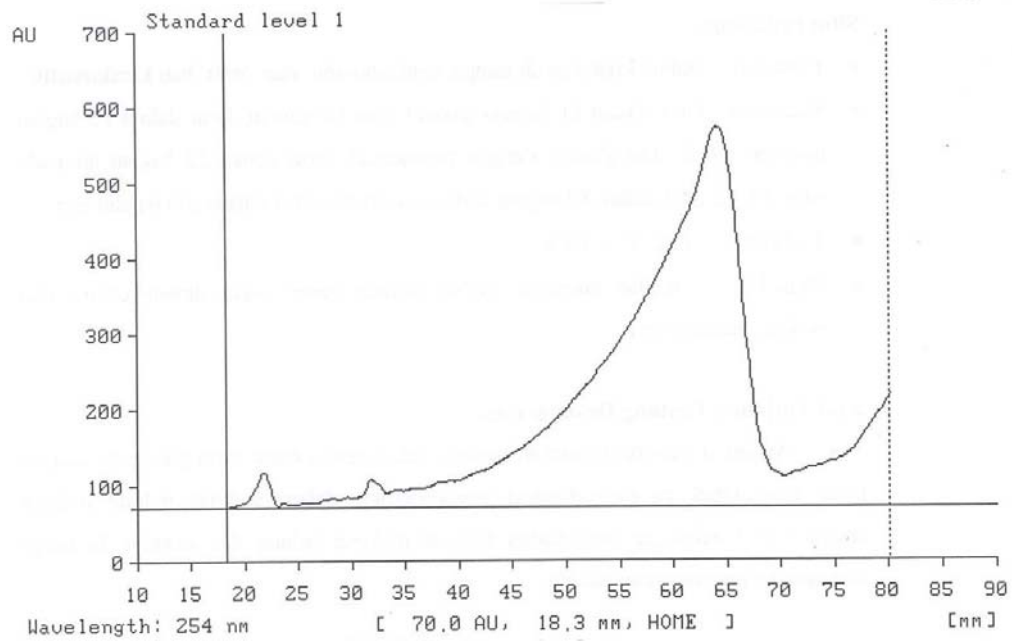


## Lampiran-11

Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol (isolat *Marchantia geminata*) Dengan UV 254

Fase diam : silika gel 60 GF<sub>254</sub>

Fase gerak : heksana : etil asetat (4:1)



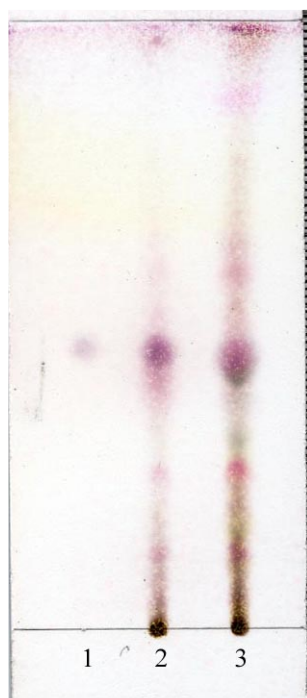


## Lampiran-12

Hasil KLT Steroid/Triterpenoid Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia* cf. *planiloba* Steph.

Fase diam : silika gel 60 GF<sub>254</sub>

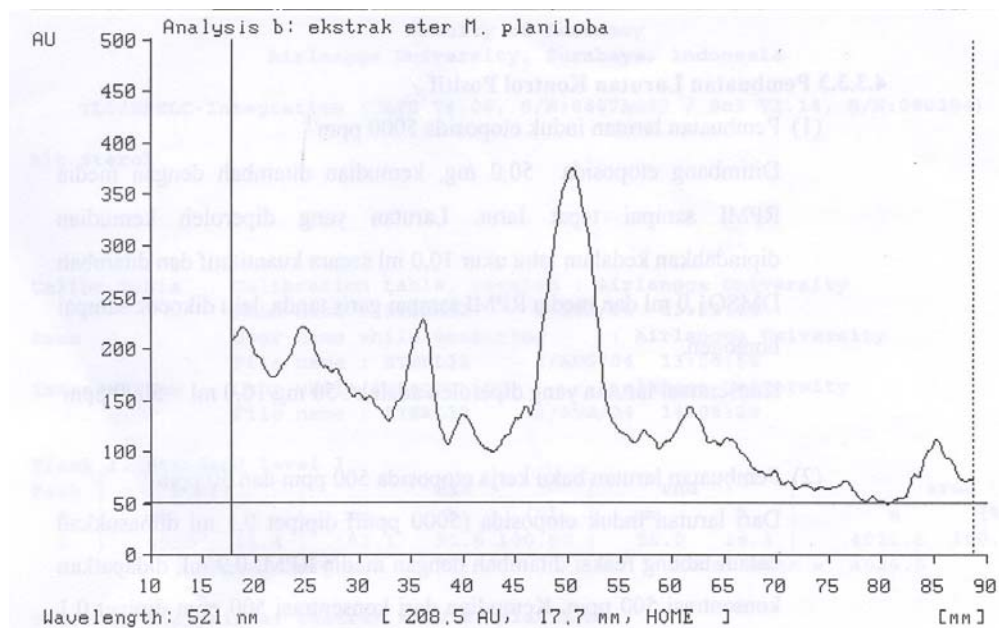
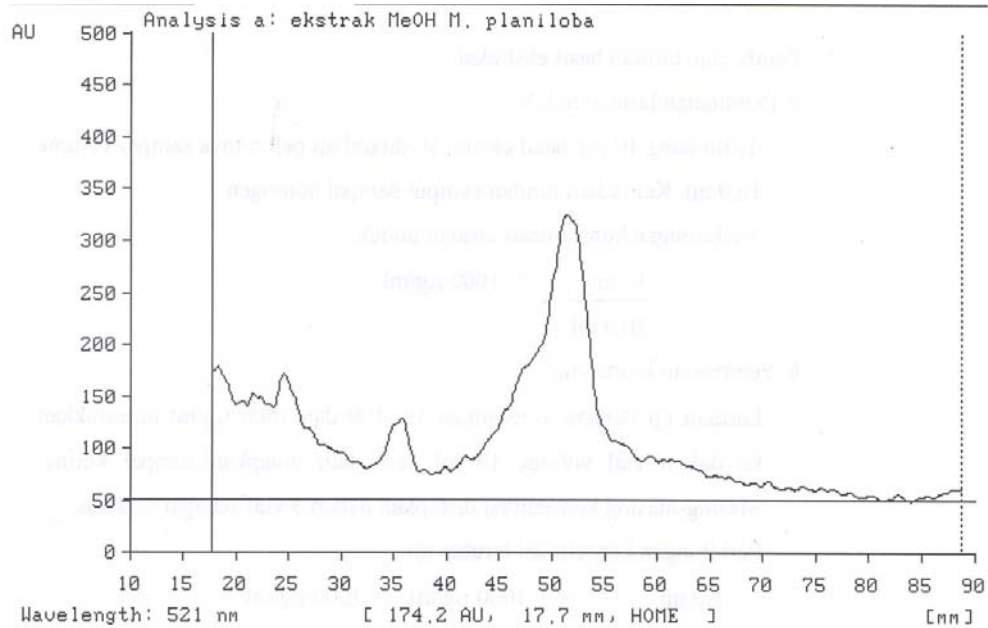
Fase gerak : heksana : etil asetat (4:1)



- 1 : standart sterol (isolat *Marchantia geminata*)
- 2 : ekstrak metanol *Marchantia* cf. *planiloba* Steph.
- 3 : ekstrak eter *Marchantia* cf. *planiloba* Steph.

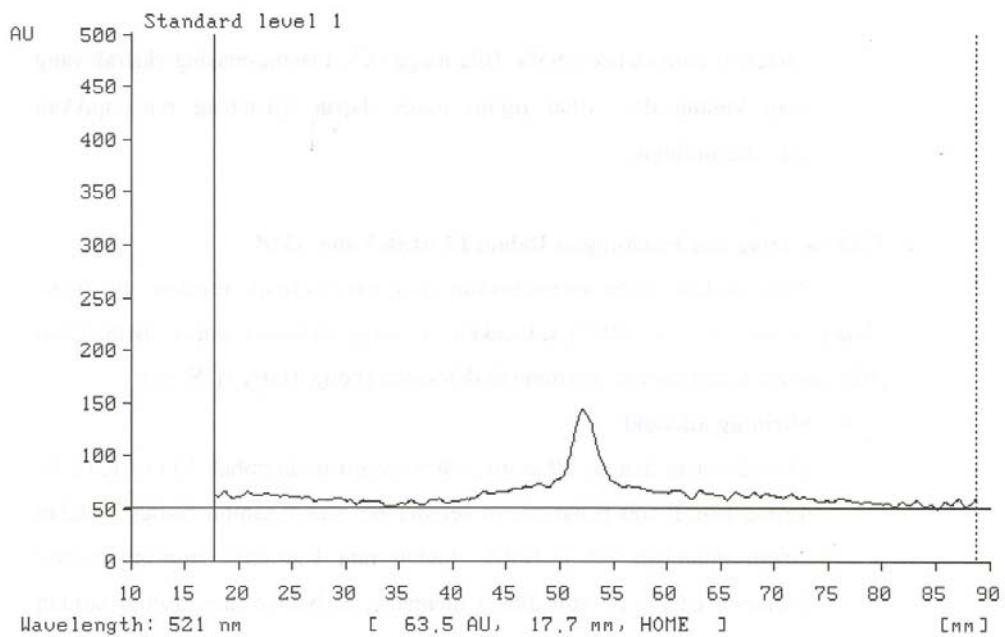
## Lampiran-13

Profil Kromatogram KLT-Densitometri Steroid/Triterpenoid Ekstrak Metanol dan Ekstrak Eter *Marchantia* cf. *planiloba* Steph. Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat ( $\lambda=521$  nm) Menggunakan Fase Diam Silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan Fase Gerak Heksana : Etil asetat (4:1)



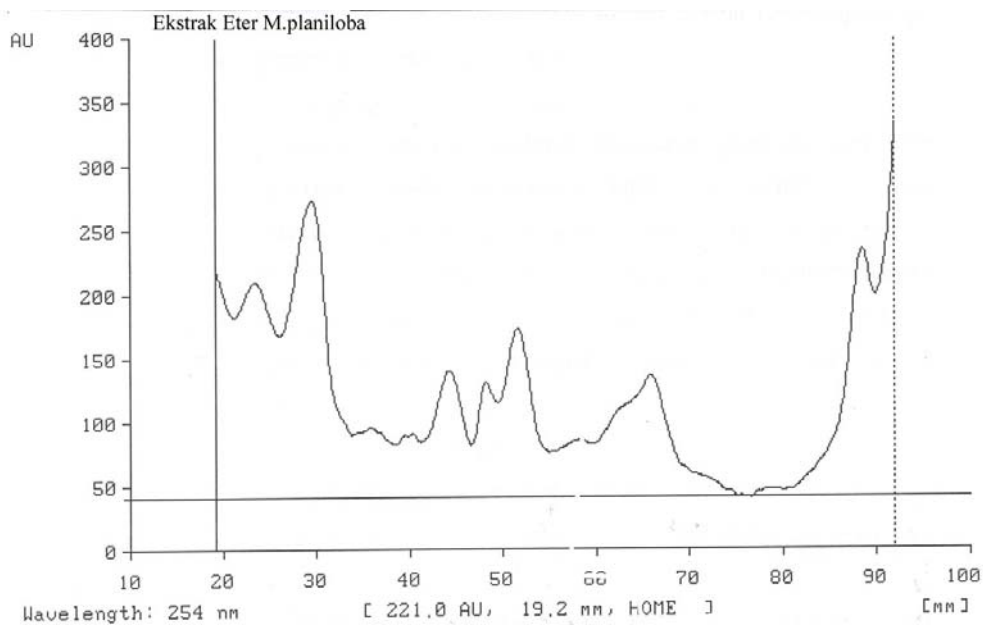
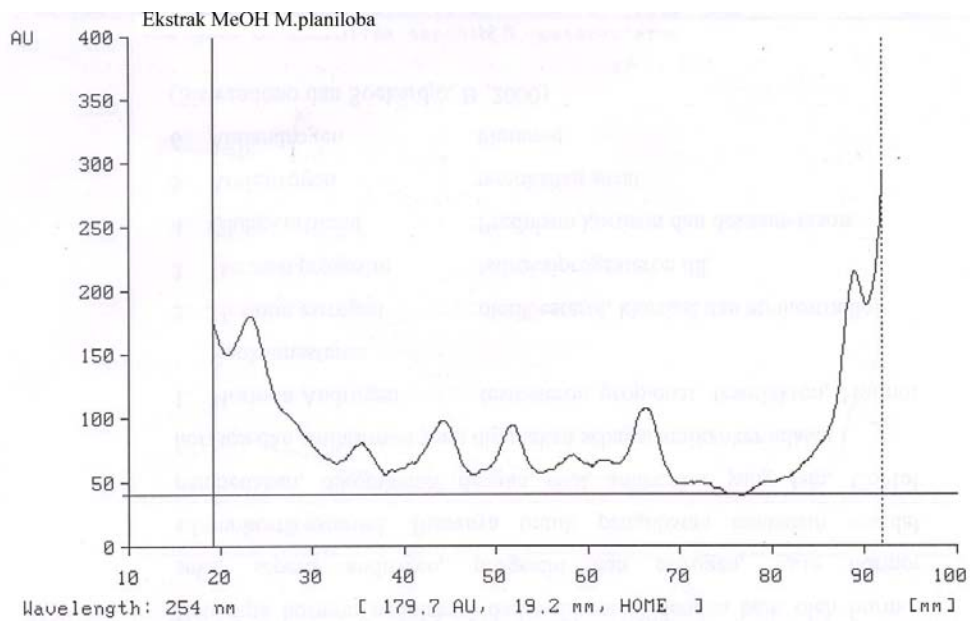
## lampiran-14

Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol (isolat *Marchantia geminata*) Dengan Penampak Noda Anisaldehyd-asam sulfat ( $\lambda=521$  nm) Menggunakan Fase Diam Silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan Fase Gerak Heksana : Etil asetat (4:1)



## Lampiran-15

Profil Kromatogram KLT-Densitometri Steroid/Triterpenoid Ekstrak Metanol dan Ekstrak Eter *Marchantia* cf. *planiloba* Steph. Dengan UV 254 Menggunakan Fase Diam Silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan Fase Gerak Heksana : Etil asetat (4:1)



## Lampiran-16

Profil Kromatogram KLT-Densitometri Standart Sterol (isolat *Marchantia geminata*) Dengan UV 254 Menggunakan Fase Diam Silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan Fase Gerak Heksana : Etil asetat (4:1)

