

**UJI TOKSISITAS (*Arthemia salina* Leach) DAN ANTIBAKTERI  
(*Staphylococcus aureus*) EKSTRAK ETANOL DAUN BENALU  
CENGKEH (*Dendropohtoe pentandra* (L.) Miq.)**

**SKRIPSI**



**Oleh :**

**BASRI SETIAWAN  
K100060007**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
SURAKARTA  
2010**

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang Masalah

Benalu (famili Loranthaceae) secara empirik telah digunakan untuk pengobatan beberapa penyakit, diantaranya untuk mengobati radang rahim, batuk rejan, amandel dan campak. Bagian yang digunakan adalah daun atau seluruh bagian tanaman dalam keadaan segar atau setelah dikeringkan. Salah satu benalu yang sering dimanfaatkan untuk pengobatan adalah benalu dari spesies *Dendrophthoe pentandra* yang tumbuh pada berbagai macam tanaman. Beberapa spesies dari famili Loranthaceae telah dilaporkan memiliki efek anti hipertensi (Alam, 1986), antiviral (Hasan, 1993; Lohezic-Le *et al*, 2002), anti diabetic (Harvala *et al*, 1984; Obatoni *et al*, 1994), respon imunobiologi (Fernandez *et al*, 2003), antikanker (Ohashi *et al*, 2003), antitumor (Zarkovic *et al*, 1998; Yoon *et al*, 1999), antimikrobia dan anti konvulsan (Amabeoku *et al*, 1998) dan untuk pengobatan schizoprenia (Block and Stevenson, 1971).

Artanti, *et al*. (2003) melakukan pengujian aktivitas antioksidan dan toksisitas benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dan benalu nangka (*Macrosolen cochinchinensis*). Hasil skrining benalu tersebut menunjukkan bahwa dengan metode DPPH *free radical scavenging activity* (Yen and Chen, 1995) yang dimodifikasi, semua ekstrak air dan etanol yang diuji aktif sebagai antioksidan dengan  $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ . Uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menunjukkan bahwa ekstrak etanol benalu relatif lebih

bersifat toksik dibanding ekstrak airnya. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan senyawa yang aktif sebagai antioksidan tidak selalu bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach.. Kromatografi lapis tipis (KLT) dan *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) menunjukkan bahwa kedua benalu tersebut mengandung senyawa yang serupa namun memiliki profil kromatogram yang berbeda. Nararto (1996) menyatakan bahwa isolat flavonoid dari benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dapat menghambat pertumbuhan larva udang *Artemia salina* Leach., suatu metode skrining awal agen antikanker. Isolat flavonoid tersebut dengan dosis 2,44 mg/0,2 mL mampu menghambat pertumbuhan kanker pada mencit yang diinduksi dengan benzo(a)piren pada daerah interskapuler ( $p < 0,05$ ) (Sukardiman, 1999).

Jamilah (2003) menemukan bahwa ekstrak air dan ekstrak etanol benalu spesies *Dendrophthoe pentandra* yang tumbuh pada berbagai inang memiliki senyawa utama yang sama. Senyawa tersebut diperkirakan merupakan senyawa kuersetin, yaitu suatu senyawa flavonoid glikosida yang merupakan marker taksonomi dari famili *Loranthaceae*. Senyawa yang sama juga telah diisolasi dari benalu nangka (*Macrosolen cochinchinensis*). Senyawa inilah yang kemudian dimungkinkan sebagai senyawa aktif yang bertanggungjawab terhadap aktivitas antikanker benalu. Senyawa ini dapat beraksi sebagai antikanker pada regulasi siklus sel, berinteraksi dengan reseptor estrogen (ER) tipe II dan menghambat enzim tirosin kinase (Lamson, *et al.* 2000).

Berdasarkan hal tersebut maka *Dendrophthoe pentandra* memiliki toksisitas terhadap artemia dan dapat dikembangkan sebagai antikanker. Salah

satu inang dari *Dendrophthoe pentandra* adalah cengkeh, dan benalu yang tumbuh pada cengkeh ini belum banyak diteliti.

Meluasnya resistensi mikroba terhadap obat-obatan yang ada, mendorong pentingnya penggalan sumber antimikroba dari bahan alam. Tanaman obat diketahui potensial dikembangkan lebih lanjut pada penyakit infeksi namun masih banyak yang belum dibuktikan aktivitasnya secara ilmiah. Pada penelitian ini uji antibakteri dilakukan terhadap *Staphylococcus aureus*, karena menurut keterangan empiris, *Dendrophthoe pentandra* digunakan untuk mengobati radang tenggorokan sedangkan radang tenggorokan sering disebabkan oleh bakteri *S. aureus*.

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri patogen gram-positif yang bersifat invasif dan merupakan flora normal pada kulit, mulut, dan saluran nafas bagian atas. *Staphylococcus aureus* menyebabkan pneumonia, meningitis, endokarditis dan infeksi kulit (Jawetz, *et al.*, 2005). *Staphylococcus aureus* merupakan patogen paling utama pada manusia (Jawetz, *et al.*, 2005).

Sejauh ini belum ditemukan literatur tentang uji anti bakteri dan toksisitas ekstrak benalu spesies *Dendrophthoe pentandra* yang tumbuh pada tanaman cengkeh, maka dilakukan penelitian dengan judul “uji toksisitas (*Arthemisa salina* Leach) dan antibakteri (*Staphylococcus aereus*) ekstrak etanol daun benalu cengkeh (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.)”.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka disusun perumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol benalu cengkeh memiliki toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach?
2. Apakah ekstrak etanol daun benalu cengkeh aktif sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus*?

### **C. Tujuan Penelitian**

Berdasarkan perumusan masalah di atas maka tujuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun benalu cengkeh terhadap *Artemia salina* Leach.
2. Untuk mengetahui aktivitas anti bakteri ekstrak daun benalu cengkeh terhadap *Staphylococcus aureus*.

### **D. Tinjauan Pustaka**

#### **1. Uraian tentang tanaman**

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae

Classis : Dycotyledoneae

Ordo : Santalales

Famili : Loranthaceae

Genus : Dendrophtoe

Spesies : *Dendrophtoe pentandra* (L) Miq.

Nama lokal : Benalu (Indonesia), Kemladehan (jawa), Pasilan.

## **2. Karakteristik tanaman**

Semak bercabang kuat, sering kali lebih tinggi dari 1m, bagian muda berambut. Hanya ranting tua pada ruas membesar kuat. Daun tersebar, bertangkai pendek, bentuk lanset sampai bulat, kerap kali memanjang, 5-20 kali 2-12 kali, tebal, rapuh. Karangan bunga terdiri berdiri sendiri dalam ketiak, atau terkumpul lebih dari satu ruas yang tua, bunga 2-20. Tabung bunga pendek. Tabung kelopak cylindris sampai bentuk mangkuk, tinggi lebih kurang 2 mm; tepi mahkota pendek lebih kurang bergigi 5. Mahkota waktu kuncup dewasa : 1,5-2,5 cm panjangnya, separo bagian bawah cylindris, kelak melembung, separo bagian atas ellipsoid persegi 5; dengan ujung tumpul; seluruhnya kuning sampai merah oranye. Bagian bebas dari benang sari 2-4 mm. Kepala putik berbentuk tombol, tumpul. Buah bentuk telur, panjang 1 cm, kuning oranye. Pada bermacam-macam jenis pohon dan perdu; 1-1600 m (Steenis, 1975).

## **3. Ekstraksi**

Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif, yang semula berada di dalam sel ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik jika permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1986). Metode dasar penyarian adalah maserasi, perkolasi, dan soxhletasi. Pemilihan terhadap ketiga metode tersebut disesuaikan dengan kepentingan dalam memperoleh sari yang baik (Anonim, 1986).

### **a. Maserasi**

Maserasi merupakan proses penyarian yang sederhana dan banyak digunakan untuk menyari bahan obat yang berupa serbuk simplisia yang halus. Simplisia ini direndam dalam penyari sampai meresap dan melemahkan susunan

sel sehingga zat-zat akan terlarut, serbuk simplisia yang akan disari ditempatkan pada wadah bejana bermulut besar, ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang, sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan serbuk simplisia (Ansel, 1989).

#### b. Penyari

Cairan penyari yang digunakan dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kemampuannya melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimum mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel, 1989). Cara penyarian harus dapat mencapai seluruh serbuk dan secara terus-menerus mendesak larutan yang memiliki konsentrasi lebih tinggi untuk keluar. Cairan penyari yang baik harus memiliki kriteria murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah terbakar, selektif hanya mampu menarik zat berkhasiat yang dikendaki dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Anonim, 1986).

#### 4. Bakteri *Staphylococcus aureus*

Divisio : Protophyta

Classis : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Familia : Micrococcacus

Genus : Staphylococcus

Spesies : *Staphylococcus aureus* (Salle. 1961)

Kuman ini sering ditemukan sebagai kuman flora pada kulit dan selaput lendir pada manusia, penyebab infeksi baik pada manusia maupun pada hewan. Kuman ini berbentuk *sferis*. Bila bergerombol dalam susunan yang tidak teratur

mungkin sisinya agak rata karena tertekan. Diameter kuman antara 0.8-0.9 mikron. Sediaan langsung yang berasal dari nanah dapat terlihat sendiri. Berpasangan, menggerombol dan bahkan dapat tersusun seperti rantai pendek. Kuman ini tidak bergerak, tidak berspora dan merupakan Gram positif. Batas-batas pertumbuhannya ialah 15°C dan 40°C. sedangkan pertumbuhan optimum ialah 35°C, pada suasana aerob, pH optimum untuk pertumbuhan ialah 7,4 pada agar miring dapat tetap hidup sampai berbulan-bulan, baik dalam lemari es atau pada suhu kamar. Keadaan kering pada benang, kertas, kain dan dalam nanah dapat tetap hidup selama 6-14 minggu (Karsinah, 1994).

*Staphylococcus aureus* bersifat meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menimbulkan gas. Bakteri tersebut dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berkembang biak dan menyebar luas dalam jaringan karena kemampuannya menghasilkan banyak zat ekstraselular (Karsinah, 1994). Zat ekstraselular tersebut adalah :

a. Eksotoksin

Suatu campuran termolabil yang dapat disaring dan dimatikan bagi binatang pada penyuntikan, menyebabkan nekrosis pada kulit dan mengandung beberapa hemolisin yang dapat larut dan dipisahkan dengan elektroforesis (Jawetz, *et al.*, 1982).

b. Leukosidin

Suatu zat yang dapat larut dan mematikan sel darah putih dari berbagai spesies binatang yang kontak dengannya (Jawetz, *et al.*, 1982).



c. Enterotoksin

Suatu zat yang dapat larut yang dihasilkan oleh strain tertentu, merupakan penyebab penting keracunan makanan (Jawetz, *et al.*, 1982).

d. Koagulase

*Staphylococcus aureus* mampu menghasilkan koagulase, yaitu suatu enzim yang dapat menggumpalkan plasma atau serat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat pada serum. Faktor koagulase reaktif serum beraksi dengan koagulase untuk menghasilkan entorase dan aktivitas pembekuan dengan cara yang sama seperti pengaktifan protrombin menjadi trombin. Koagulase dapat mengendapkan fibrin pada permukaan *Staphylococcus aureus* (Jawetz, *et al.*, 1982).

e. Enzim lain

Zat lain yang dihasilkan adalah hialuronidase adalah faktor penyebar Staphylokinase yang mengakibatkan fibrinolisis tetapi bekerja lebih lambat daripada streptokinase, lipase dan betalaktamase, toksin eksfoliatif yang menyebabkan sindroma lepuh kulit. Infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ini terutama menimbulkan penyakit pada manusia. Setiap jaringan ataupun alat tubuh dapat diinfeksi olehnya dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses. Infeksinya dapat berupa furunkel yang ringan pada kulit sampai berupa suatu piemia yang fatal. Kecuali impetigo, umumnya kuman ini menimbulkan penyakit yang bersifat sporadik bukan epidemik (Jawetz, *et al.*, 1982).

## **5. Media**

Media adalah satu bahan atau campuran bahan dengan komposisi tertentu sesuai kebutuhan yang dapat digunakan untuk mengembangkan bakteri. Tujuan dari penggunaan medium adalah antara lain untuk isolasi, pemeliharaan, identifikasi suatu jasad renik dari habitatnya. Media harus dibuat sedemikian rupa sehingga mampu tumbuh pada media tersebut. Agar mikroba dapat tumbuh dan berkembang dengan baik didalam media, diperlukan persyaratan tertentu, yaitu: media harus terkandung semua unsure hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba. Media harus dalam keadaan steril, artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi mikroba lain yang tidak diharapkan. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan, dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba, sehingga sesuai dengan habitatnya (Timotius, 1987).

## **6. Sterilisasi**

Sterilisasi didefinisikan sebagai proses menghilangkan atau mematikan semua mikroorganisme hidup. Sterilisasi seluruh mikroba yang ada dimatikan atau dihilangkan, dan obyek menjadi steril. Metode sterilisasi yang umum dilakukan adalah: sterilisasi secara fisik, missal dengan pemanasan, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar-X, sinar gamma, sinar ultra violet, dan sebagainya. Sterilisasi secara kimia dengan menggunakan disinfektan. Larutan alkohol, larutan formalin, dan sebagainya. Sterilisasi secara mekanik, misal dengan penggunaan saringan atau filter (Timotius, 1987).

## 7. Antibakteri

Antimikroba ialah obat pembasmi mikroba, khususnya yang dapat merugikan manusia, tidak termasuk golongan parasit. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, antimikroba dibagi menjadi dua: pertama aktivitas bakteriostatik yaitu antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, kedua aktivitas bakterisid adalah antimikroba yang bersifat membunuh mikroba. Sifat antimikroba dapat berbeda satu dengan yang lainnya, misalnya ada antimikroba yang efektif untuk bakteri Gram positif saja atau sebaliknya (Ganiswarna, 1995).

Pengamatan potensi antibakteri dari suatu zat dapat dilakukan dengan metode, yaitu:

### 1). Metode dilusi

Pada metode dilusi ini ada 2 macam, yaitu dilusi cair dan dilusi padat. Pada prinsipnya metode ini dilakukan dengan mengencerkan zat yang akan diuji menjadi beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi ditambah suspensi kuman dalam media, sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi zat uji dicampur dengan media agar, lalu ditanami kuman. Hasil yang didapat dari metode ini adalah Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Anonim, 2000).

### 2). Metode difusi

Cakram kertas saring, cawan yang berliang renik atau silinder tidak beralat, yang mengandung zat uji dalam jumlah tertentu ditempatkan dalam pembenihan padat yang telah ditanami dengan biakan tebal organisme yang diperiksa. Setelah pengeraman, hasil yang diperoleh adalah :

- a) *Radical zone*, yaitu daerah di sekitar zat uji dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri.
- b) *Irradical zone*, yaitu suatu daerah di sekitar zat uji yang pertumbuhan bakteri dihambat oleh zat uji tersebut (Jawetz *et al.*, 2001).

### **8. *Artemia salina* Leach**

Hewan uji yang digunakan dalam metode BST ini adalah *Artemia Salina* Leach atau *Brine Shrimp* merupakan zooplankton dan tergolong udang primitif. Nama *Arthemia* diberikan untuk pertama kali oleh Schlosser yang menemukannya disuatu danau asin pada tahun 1755. Kemudian oleh Linnaeus (1758) melengkapi jasad renik ini menjadi *Artemia salina* (Harefa, 2003).

#### a. Klasifikasi

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Crustaceae
Sub Kelas	: Branchiopoda
Bangsa	: Anostraca
Suku	: Artemida
Marga	: Artemia
Jenis	: <i>Artemia salina</i> Leach (Harefa, 2003)

#### b. Morfologi

*Artemia* dijualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut dengan kista. Kista ini apabila dilihat dengan mata telanjang berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter berkisar antara 200-350 mikron. Satu gram kista *Artemia* kering rata-rata terdiri atas 200.000-300.000

butir kista. Kista yang berkualitas baik akan menetas antara 18-24 jam apabila diinkubasikan dalam air bersalinitas 5-70 permil. Ada beberapa tahapan proses penetasan *Artemia* ini yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang dan tahap *payung* atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga air kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan disusul dengan tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum nauplius keluar dari cangkang.

*Artemia* yang baru menetas disebut nauplius. Nauplius berwarna oranye, berbentuk bulat lonjong dengan panjang sekitar 400 mikron, lebar 170 mikron, dan berat 0,002 mg. Ukuran-ukuran tersebut sangat bervariasi tergantung strainnya. Nauplius mempunyai sepasang antenulla dan sepasang antenna. Selain itu, di antara antenulla terdapat bintik mata yang disebut ocellus. Sepasang mandibula rudimeter terdapat dibelakang antenna. Sedangkan labrum (semacam mulut) terdapat di bagian ventral (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

*Artemia* dewasa biasanya berukuran panjang 8-10 mm yang ditandai dengan adanya tangkai mata yang jelas terlihat pada kedua sisi bagian kepala, antenna sebagai alat sensori, saluran pencernaan yang terlihat jelas, dan 11 pasang thorakopoda. Pada *Artemia* jantan, antenna berubah menjadi alat penjepit (*mascular grasper*), sepasang penis terdapat di bagian belakang tubuh. Sedangkan pada *Artemia* betina antenna mengalami penyusutan sepasang indung telur atau ovary terdapat di kedua sisi saluran pencernaan, dibelakang thorakopoda. Telur yang sudah matang akan disalurkan ke sepasang kantong telur atau uterus (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

### c. Lingkungan Hidup

*Artemia* hidup secara planktonik di perairan laut yang kadar garamnya berkisar antara 19-300 permill dan suhunya berkisar antara 26-31°C serta nilai pHnya antara 7,3-8,4. Keistimewaan *Artemia* sebagai plankton adalah memiliki toleransi (kemampuan beradaptasi dan mempertahankan diri) pada kisaran kadar garam yang sangat luas. Pada garam yang sangat tinggi dimana tidak ada satupun organisme lain yang mampu bertahan hidup, ternyata *Artemia* mampu mentolerirnya (Djarajah, 1996).

Secara alami, makanan *Artemia* terdiri dari detritus bahan organik (sisa-sisa jasad hidup yang sedang menghancur) ganggang-ganggang renik (ganggang hijau, ganggang biru, diatomeae), bakteri dan cendawan. *Artemia* hanya dapat menelan makanan yang kecil-kecil, yang ukurannya 50 mikron ke bawah. Apabila lebih besar dari itu, *Artemia* tidak dapat menelannya bulat-bulat. Makanan yang akan ditelan itu dikumpulkan dulu kedepan mulutnya dengan menggerak-gerakkan kakinya. Arus air yang ditimbulkan oleh gerakan kaki itu akan membawa makanan ke arah mulut, sehingga *Artemia* tinggal menelannya saja. Selain untuk mengambil makanan, kakinya berfungsi juga sebagai alat bergerak (Mujiman, 1992).

### d. Reproduksi

Menurut cara reproduksinya *Artemia* dipilah menjadi dua yaitu, *Artemia* yang bersifat biseksual dan *Artemia* yang bersifat partenogenik. Keduanya mempunyai cara berkembang biak yang berlainan. *Artemia* biseksual berkembangbiak secara seksual, yaitu perkembangbiakannya didahului dengan perkawinan antara jantan dan betina. Sedangkan *Artemia* partenogenetik

berkembangbiak secara parthenogenesis yaitu betina menghasilkan telur atau nauplius tanpa adanya pembuahan (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

Siklus hidup *Artemia* cukup unik, baik biseksual maupun partenogenetik perkembangbiakannya dapat secara ovovivipar maupun ovipar tergantung kondisi lingkungan terutama salinitas. Pada salinitas tinggi akan dihasilkan kista yang keluar dari induk betina sehingga disebut dengan perkembangbiakan secara ovipar. Sedangkan pada salinitas rendah tidak akan menghasilkan kista akan tetapi langsung menetas dan dikeluarkan sudah dalam bentuk nauplius sehingga disebut dengan perkembangbiakan secara ovovivipar (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

Pada jenis biseksual perkembangbiakan diawali dengan perkawinan. Perkawinan sendiri diawali dengan adanya pasangan-pasangan jantan dan betina yang berenang bersama (*riding pair*). *Artemia* betina di depan sedangkan jantannya “memeluk” dengan menggunakan penjepit dibelakangnya. *Riding pair* berlangsung cukup lama, walaupun perkawinan/kopulasinya hanya membutuhkan waktu singkat. *Artemia* jantan memasukkan penis ke dalam lubang uterus betina dengan cara membengkokkan tubuhnya ke depan (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

## **9. Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)**

Brine Shrimp Lethality Test (BST) merupakan salah satu metode untuk menguji bahan-bahan yang bersifat toksik dan digunakan sebagai suatu *bioassay* yang pertama untuk penelitian bahan alam. Metode ini menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan coba. Uji toksisitas dengan metode BST ini merupakan uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan

dalam waktu singkat, yaitu rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji. Prosedurnya dengan menentukan nilai LC<sub>50</sub> dari aktivitas komponen aktif tanaman terhadap larva *Artemia salina* Leach. Suatu ekstrak dikatakan toksik berdasarkan metode BST jika harga LC<sub>50</sub> < 1000 µg/ mL. Penelitian Carballo dkk menunjukkan adanya hubungan yang konsisten antara toksisitas dan letalitas *Brine shrimp* pada ekstrak tanaman. Metode BST dapat dipercaya untuk menguji aktivitas farmakologis dari bahan-bahan alami. Apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut harga LC<sub>50</sub> dengan metode BST, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat anti kanker. Namun, bila tidak bersifat toksik maka tanaman tersebut dapat diteliti kembali untuk mengetahui khasiat lainnya dengan menggunakan hewan coba lain yang lebih besar dari larva *Artemia salina* seperti mencit dan tikus secara in vivo (Meyer *et. al.*, 1982)

Meyer *et. al.*, 1982 cit Wahyuni 2003 melaporkan metode uji toksisitas senyawa bahan alam yang cepat dan mudah dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. Uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian larva tersebut dan uji ini dikenal dengan *Brine Shrimp Lethally Test* (BST), metode BST ini tidak spesifik untuk mengetahui senyawa anti tumor (Meyer *et. al.*, 1982 cit Wahyuni, 2003), oleh karena itu setelah uji toksisitas dengan BST perlu diadakan uji sitotoksitas. Hal ini dikarenakan uji aktivitasnya anti kanker didasarkan pada adanya efek toksik pada sel (sitotoksik). Jadi uji toksisitas dengan metode BST ini merupakan uji awal untuk mengetahui suatu senyawa memiliki potensi atau tidak sebagai anti kanker. Sampai saat ini dikenal 2 macam uji untuk menentukan suatu



bahan alam bersifat anti kanker yaitu uji toksisitas dan uji sitotoksitas (Mulyani, 1995).

Penggolongan toksisitas atas dasar jumlah besarnya zat kimia yang diperlukan untuk menimbulkan bahaya untuk harga  $LC_{50}$  dibedakan menjadi:

a. Toksik  $(LC_{50} < 1000 \text{ ug/mL})$

b. Tidak toksik  $(LC_{50} > 1000 \text{ ug/mL})$

(Meyer, *et. al.*, 1982 *cit* Wahyuni, 2003)

## 10. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis ialah metode pemisahan fisikakimia. Lapisan yang memisahkan, yang terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa plat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan di pisah, berupa larutan, di totolkan berupa bercak atau pita. Setelah pelat atau lapisan di taruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan).

Fase diam yang sering di pakai adalah silika gel, alumunium oksida, kieselgur, selulosa dan turunannya, dan lain-lain. Silika gel ini menghasilkan perbedaan dalam efek pemindahan yang tergantung kepada cara pembuatannya. Fase gerak ialah media angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Yang di gunakan hanyalah pelarut bertingkat, sistem pelarut multi komponen ini harus berupa suatu campuran sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimal 3 komponen (Stahl, 1985).

Dalam mengidentifikasi noda-noda dalam kromatogram sangat lazim menggunakan harga Rf (Retardation factor) (Sastrohamidjoyo, 1991). Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf/hRf.

$$Rf = \frac{\text{jarak yang di tempuh solute (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

Angka Rf berjangka antara 0,00 dan 1 dan hanya dapat ditentukan dua desimal. hRf adalah angka Rf dikalikan faktor 100 (h) menghasilkan nilai berjangka 0 sampai 100 (Stahl, 1985).