

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Manusia telah menggunakan bahan-bahan alam dari tumbuh-tumbuhan untuk digunakan sebagai bahan obat guna mengobati penyakit yang dideritanya. Demikian pula di Indonesia, secara tradisional masyarakatnya telah menggunakan bahan-bahan alam tersebut untuk mengobati berbagai macam penyakit dan kenyataan menunjukkan, bahwa dengan bantuan obat-obatan asal bahan alam tersebut, masyarakat dapat mengatasi masalah-masalah kesehatan yang dihadapinya (Anonim, 1983).

Penggunaan obat tradisional atau obat asli Indonesia mengalami peningkatan, baik untuk pemeliharaan kesehatan maupun untuk pengobatan gangguan kesehatan. Tumbuhan yang dipakai sebagai obat tradisional mempunyai aktivitas biologis karena mengandung berbagai senyawa kimia yang dapat mempengaruhi sel-sel hidup suatu organisme (Dalimartha, 2003).

Salah satu tanaman yang bisa digunakan sebagai obat tradisional atau obat alam adalah daun singkong. Manfaat daun singkong untuk terapi antara lain sebagai antikanker, mencegah anemia, mencegah konstipasi, dan meningkatkan daya tahan tubuh (Wirakusumah, 2002).

Pada penelitian terdahulu oleh Herawati terhadap *Artemia salina* Leach, menunjukkan bahwa getah dari tanaman *Euphorbia milii* Des Moulins ternyata mengandung senyawa terpenoid dan saponin yang mempunyai efek toksik

terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan harga $LC_{50} 73,26 \pm 0,9219 \mu\text{g/ml}$. Tanaman singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) dan *Euphorbia milii* Des Moulins dalam sistem taksonomi merupakan satu famili, selain itu daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) juga mempunyai kandungan yang sama dengan *Euphorbia milii* Des Moulins yaitu saponin. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensi efek toksik daun singkong.

Prinsip suatu tanaman dapat digunakan sebagai antikanker yaitu apabila tanaman tersebut mengandung senyawa yang bersifat sitotoksik. BST (*Brine Shrimp Test*) merupakan salah satu metode untuk skrining terhadap senyawa sitotoksik dengan menggunakan *Artemia salina* Leach (Meyer, *et al.*, 1982 *cit* Wahyuni, 2003). Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dalam rangka menemukan senyawa sitotoksik yang diharapkan dalam perkembangan selanjutnya dapat digunakan sebagai obat antikanker.

Prosedur klasik untuk memperoleh kandungan senyawa organik dan jaringan tumbuhan kering seperti biji kering, akar dan daun dapat dilakukan dengan mengekstraksi berkesinambungan serbuk bahan dengan alat Soxhlet dengan menggunakan sederetan pelarut secara berganti-ganti, mulai dengan eter, lalu eter minyak bumi, dan kloroform (untuk memisahkan lipid dan terpenoid). Kemudian digunakan alkohol dan etil asetat (untuk senyawa yang lebih polar) (Harbone, 1996). Untuk itu dalam penelitian ini digunakan dua pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu kloroform dan etanol.

B. PERUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang tersebut, timbul suatu masalah yang ingin dipecahkan dalam penelitian ini, yaitu apakah ekstrak kloroform dan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl) mempunyai efek toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach ?

C. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek toksik ekstrak kloroform dan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

D. TINJAUAN PUSTAKA

1. Tanaman Singkong (*Manihot utilissima* Pohl.)

a. Sistematika Tanaman

Kedudukan dari tanaman Singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) dalam taksonomi adalah sebagai berikut :

Divisio : Spermatophyta

Sub divisio : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Euphorbiales

Suku : Euphorbiaceae

Genus : Manihot

Spesies : *Manihot utilissima* Pohl.

(Becker, 1965)

b. Nama Daerah

Sumatera : Ubi kayu, Garingkau

Jawa : Anpen Singkong, Ubi Singkong

Bali : Kasela

Nusa Tenggara: Lau Ai, Ali Uhi, Uwi Kayu

Sulawesi : Kasubi, Lame Kayu

Maluku : Mangkale, Kawawa, Kasbi, Mangkau, Asbi, Kasibi

(Hutapea, 2000)

c. Morfologi Tanaman

Perdu, tinggi kurang lebih 3m, batang berbentuk bulat, bekas tangkai daun menonjol, dan berwarna putih kotor. Daun, tunggal, berbagi tiga sampai sembilan, tangkai panjang 6-30 cm, berwarna kuning hijau sampai hijau. Bunga, majemuk, bentuk tandan, tiga sampai lima, pangkal bunga betina berbagi lima, bunga jantan bentuk lonceng, bertajuk lima, benang sari sepuluh, tangkai putik bersatu, kepala sari berlekuk, berwarna putih kotor, mahkota segi tiga berwarna putih kotor. Buah, berbentuk kotak, bulat dan berwarna hijau. Biji berbentuk kecil dan berwarna coklat. Akar tunggang dan berwarna coklat muda (Hutapea, 2000).

d. Ekologi dan Penyebaran

Tanaman ini berasal Amerika Selatan, di Jawa dan tempat-tempat lain di daerah khatulistiwa ditanam secara umum. Penduduk pada umumnya tidak menanamnya di sawah, melainkan hanya pada tanah yang kering, tidak tercampur, atau diselingi tanaman kacang-kacangan atau jagung. Tanaman ini

dapat ditemukan di daerah-daerah dengan musim kering yang sangat lunak, dan yang sangat kering, pada dataran rendah hingga pada ketinggian 4500 kaki di atas permukaan laut. Tanaman ini tumbuh meninggi dan memberi bayangan yang rindang (Heyne, 1987).

e. Kegunaan

Manfaat daun singkong untuk terapi antara lain sebagai antikanker, mencegah anemia, mencegah konstipasi, dan meningkatkan daya tahan tubuh (Wirakusumah, 2002).

f. Kandungan Kimia

Kandungan kimia pada umbi dan daun *Manihot utilissima* adalah saponin, selain itu daunnya juga mengandung flavonoid (Hutapea, 2000).

Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang manapun mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida. Semua flavonoid, menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon. Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air. Mereka dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau amonia, jadi mereka mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan (Harborne, 1996).

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol, telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Dari segi ekonomi, saponin penting juga karena kadang-kadang menimbulkan keracunan pada ternak atau karena rasanya yang manis. Pola glikosida saponin kadang-kadang rumit, banyak saponin yang mempunyai satuan gula sampai lima dan komponen yang umum adalah asam glukoronat (Harborne, 1996).

2. Metode Penyarian Simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun, kecuali dinyatakan lain dan biasanya berupa bahan yang telah dikeringkan (Anonim, 1985).

Proses ekstraksi merupakan proses penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikianrupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Sediaan ekstrak dibuat agar zat berkhasiat dari simplisia mempunyai kadar yang tinggi sehingga memudahkan dalam pengaturan dosis (Ansel, 1989).

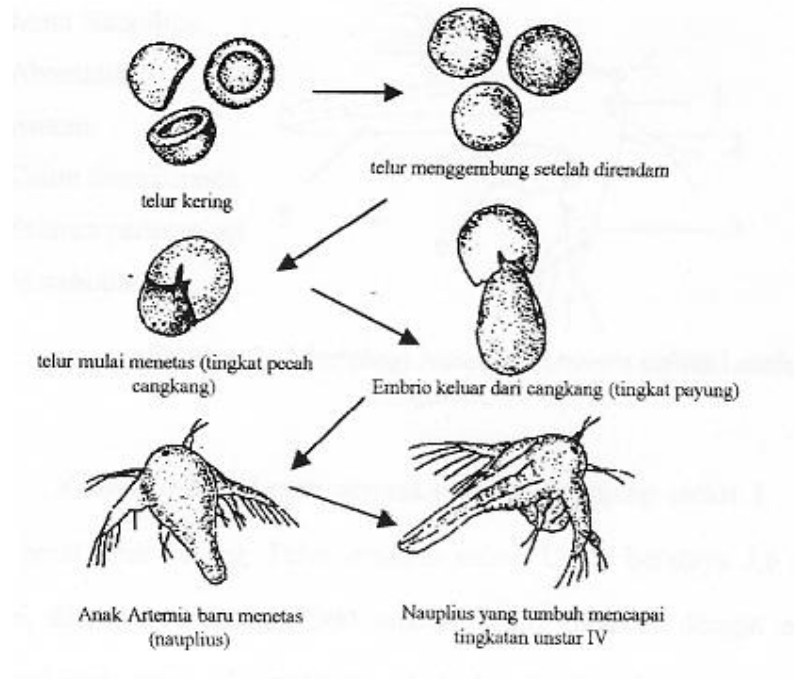
Pemilihan larutan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Larutan penyari yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah

diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, tidak mempengaruhi zat berkhasiat, diperbolehkan oleh peraturan (Anonim, 1986).

Soxhletasi merupakan metode penyarian yang menggunakan alat Soxhlet. Pada proses ini, sampel yang akan diekstraksi dimasukkan dalam sebuah kantung ekstraksi, lalu diletakkan dibagian alat Soxhlet, dan digenangi dengan pelarut yang cocok. Pemanasan yang dilakukan akan menyebabkan pelarut menguap ke atas dan akan diembunkan oleh pendingin udara menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali, bila melewati batas lubang pipa samping Soxhlet maka akan terjadi sirkulasi yang berulang-ulang dan menghasilkan sirkulasi yang baik (Harborne, 1996). Larutan berkumpul di dalam wadah gelas dan setelah mencapai tinggi maksimumnya, secara otomatis dipindahkan ke dalam labu. Dengan demikian zat yang terekstraksi terakumulasi melalui penguapan bahan pelarut murni berikutnya. Keuntungan penyarian dengan alat Soxhlet adalah membutuhkan pelarut yang sedikit, karena penyarian terjadi berulang-ulang sehingga simplisia terus-menerus diperbaharui dan zat yang tersari oleh pelarut lebih banyak. Kerugian dari prosedur penyarian dengan alat Soxhlet adalah hanya bisa dipergunakan untuk konstituen-konstituen yang relatif aman terhadap pengaruh pemanasan dan hanya dipergunakan untuk simplisia tumbuhan dalam jumlah yang kecil oleh karena keterbatasan daya tampung dari alat Soxhlet tersebut (Voigt, 1995).

b. Tahap Penetasan dan Morfologi

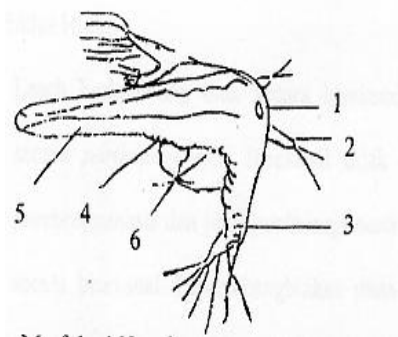
Artemia diperjualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut dengan kista. Kista ini apabila dilihat dengan mata telanjang berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna kecoklatan dengan diameter berkisar antara 200-350 mikron. Kista yang berkualitas baik akan menetas sekitar 18-24 jam apabila diinkubasikan dalam air bersalinitas 5-70/mil. Ada beberapa tahapan proses penetasan *Artemia* seperti yang digambarkan pada gambar 1, yaitu tahap hidrasi, tahap pecah cangkang, dan tahap payung atau tahap pengeluaran.



Gambar 1. Tahapan penetasan *Artemia salina* Leach (Mujiman, 1992)

Artemia yang baru menetas disebut nauplius. Nauplius berwarna oranye, berbentuk bulat lonjong dengan panjang sekitar 400 mikron, lebar 170 mikron, dan beratnya 0,002 mg. Ukuran-ukuran tersebut sangat bervariasi

tergantung strainnya. Nauplius mempunyai sepasang antennulla dan sepasang antenna. Antennulla berukuran lebih kecil dan pendek dibandingkan dengan antenna. Selain itu, di antara antennulla terdapat bintik mata yang disebut dengan ocellus. Sepasang mandibula rudimenter terdapat di belakang antenna. Sedangkan labrum (semacam mulut) terdapat di bagian ventral seperti yang terlihat pada gambar 2.



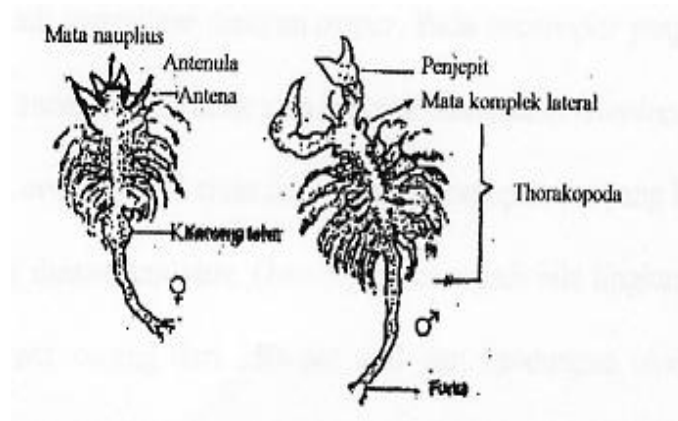
Keterangan :

1. Mata nauplius
2. Antennulla
3. Antena
4. Calon thoracopoda
5. Saluran pencernaan
6. Mandibula

Gambar 2. Morfologi nauplius (Isnansetyo *et al.*, 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 gasper), sepasang penis terdapat di bagian belakang tubuh. Sedangkan pada *Artemia* betina, antenna mengalami penyusutan, sepasang indung telur atau ovari terdapat di kedua sisi saluran pencernaan, di belakang thorakopoda. Morfologi *Artemia* dapat dilihat pada gambar 3, telur yang sudah

matang akan disalurkan ke sepasang kantong telur atau uterus (Isnansetyo *et al.*, 1995).



Gambar 3. Morfologi *Artemia salina* Leach dewasa (Mujiman, 1992)

c. Siklus Hidup

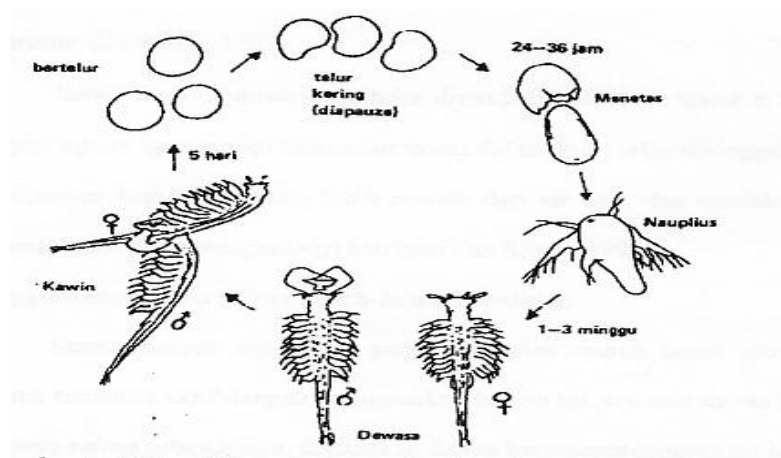
Artemia banyak ditemukan di danau-danau yang kadar garamnya sangat tinggi sehingga disebut juga *brine shrimp*. Toleransi terhadap kadar garam sangat menakjubkan, bahkan pada siklus hidupnya memerlukan kadar garam yang tinggi agar dapat menghasilkan kista. Kadar garam yang diperlukan agar *artemia* tersebut dapat menghasilkan kista bervariasi tergantung strainnya, pada umumnya membutuhkan kadar garam di atas 100/mil.

Keasaman air (pH) juga mempengaruhi kehidupan *Artemia*. Seperti halnya hewan-hewan yang hidup di air laut, *Artemia* juga membutuhkan pH air yang sedikit bersifat basa untuk kehidupannya. Agar *Artemia* dapat tumbuh baik maka pH air yang digunakan untuk budidaya berkisar antara 7,5-8,5.

Artemia bersifat pemakan segala atau omnivora. *Artemia* mengambil pakan dari media hidupnya terus-menerus sambil berenang. Pengambilan

makanan dibantu dengan antenna II pada nauplius, sedangkan pada artemia dewasa dibantu oleh telopodite yang merupakan bagian dari thorakopoda.

Menurut cara reproduksinya, *Artemia* dipilah menjadi dua, yaitu *Artemia* yang bersifat biseksual dan *Artemia* yang bersifat partenogenetik. Keduanya mempunyai cara berkembangbiak yang berlainan. *Artemia* biseksual berkembangbiak secara seksual, yaitu didahului dengan perkawinan antara jantan dan betina. Sedangkan *Artemia* partenogenesis berkembangbiak secara partenogenesis, yaitu betina menghasilkan telur atau nauplius tanpa adanya pembuahan.



Gambar 4. Siklus hidup *Artemia salina* Leach (Mujiman, 1992)

Siklus hidup *Artemia* cukup unik, baik jenis biseksual maupun partenogenetik. Perkembangannya dapat secara ovovivipar maupun ovipar tergantung kondisi lingkungan terutama salinitas. Pada salinitas tinggi akan dihasilkan kista yang keluar dari induk betina sehingga disebut dengan berkembangbiakan 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 *et al.*, 1995).

5. Brine Shrimp Test (BST)

Artemia salina Leach (*Brine Shrimp*) secara umum disebut *Artemia* merupakan salah satu organisme yang sering digunakan untuk pengujian senyawa bioaktif. Pengujian menggunakan *Artemia* ini biasa dikenal dengan istilah metode *Brine Shrimp Test* (BST). Penggunaan *Artemia* untuk pengujian aktivitas suatu senyawa sangat dimungkinkan karena *Artemia* memiliki kesamaan tanggapan dengan mamalia.

Brine Shrimp Test (BST) merupakan metode pengujian toksisitas suatu bahan dengan organisme uji berupa nauplius (larva) *Artemia salina* Leach. Penelitian dengan menggunakan metode BST memiliki beberapa keuntungan diantaranya cepat, mudah, dan biaya yang relatif murah jika dibandingkan dengan metode lain (Meyer *et al.*, 1982 *cit* Wahyuni, 2003).

6. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan fisikokimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas bahan yang berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa plat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah, berupa larutan yang ditotolkan sebagai bercak atau pita. Setelah plat atau lapisan diletakkan dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Pemisahan didasarkan atas penyerapan, pembagian atau

gabungan dari keduanya tergantung dari cara pembuatan fase diam dan jenis fase gerak yang digunakan (Stahl, 1985).

Fase diam merupakan lapisan yang dibuat dari salah satu penyerap yang khusus digunakan untuk KLT. Sebelum digunakan, lapisan disimpan dalam lingkungan yang tidak lembab dan bebas dari uap laboratorium. Penyerap yang biasa digunakan adalah silika gel, alumunium oksida, kieselgur, selulosa dan turunannya, poliamida, dan lain-lain (Stahl, 1985).

Sifat-sifat umum dari penyerap-penyerap untuk kromatografi lapisan tipis adalah mirip dengan sifat-sifat penyerap untuk kromatografi kolom. Dua sifat yang penting dari penyerap adalah besar partikel dan homogenitasnya, karena adhesi terhadap penyokong sangat tergantung pada mereka.

Kebanyakan penyerap yang digunakan adalah silika gel. Silika gel yang digunakan kebanyakan diberi pengikat (binder) yang dimaksud untuk memberikan kekuatan pada lapisan, dan menambah adhesi pada gelas penyokong. Pengikat yang digunakan kebanyakan kalsium sulfat. Tetapi biasanya dalam perdagangan silika gel telah diberi pengikat. Jadi tidak perlu mencampur sendiri, dan diberi nama dengan kode silika gel G (Sastrohamidjojo, 2002).

Fase gerak adalah medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase ini bergerak pada fase diam karena adanya gaya kapiler. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang bermutu analitik dan bila diperlukan sistem pelarut multi komponen maka harus berupa campuran sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimum tiga komponen, akan tetapi sistem pelarut yang terdiri satu atau dua komponen lebih disukai. Angka banding campuran biasanya dinyatakan

dalam bagian volume sedemikian sehingga volume total 100. Pada proses penyerapan yang menggunakan fase diam silika gel, alumina, atau zat anorganik lain, pemilihan sistem pelarut mengikuti kriteria hampir sama dengan kromatografi kolom. Sistem tak berair paling banyak digunakan, yang meliputi metanol asam asetat, etanol, aseton, etil asetat, eter, kloroform, benzena, sikloheksana dan petroleum eter. Semakin ke kanan sifat lipofilisitasnya semakin besar, oleh karena itu pemilihan pelarut didasarkan atas sifat zat yang akan dipisahkan (Stahl, 1985).

Terdapat beberapa kemungkinan untuk mendeteksi senyawa tak berwarna pada kromatogram. Deteksi paling sederhana adalah jika senyawa menunjukkan penyerapan di daerah ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau jika senyawa itu dapat dieksitasi ke fluoresensi radiasi ultraviolet gelombang pendek atau gelombang panjang (366 nm). Jika kedua cara itu senyawa tidak dapat dideteksi, harus dicoba dengan reaksi kimia, pertama tanpa dipanaskan, kemudian bila perlu dengan pemanasan, menghasilkan warna atau berfluoresensi.

Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram, biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf.

$$Rf = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{Jarak batas pengembangan dihentikan}}$$

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

E. HIPOTESIS

Pada penelitian terdahulu oleh Herawati terhadap *Artemia salina* Leach, menunjukkan bahwa getah dari tanaman *Euphorbia milii* Des Moulins ternyata mengandung senyawa terpenoid dan saponin yang mempunyai efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan harga LC_{50} $73,26 \pm 0,9219$ $\mu\text{g/ml}$. Tanaman singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) dan *Euphorbia milii* Des Moulins dalam sistem taksonomi merupakan satu famili, selain itu daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) juga mempunyai kandungan yang sama dengan *Euphorbia milii* Des Moulins yaitu saponin. Dari uraian tersebut dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini yaitu ekstrak kloroform dan ekstrak etanol daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) mempunyai efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach.