

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIKANKER DARI EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG KAYU BITTI (*Vitex cofassus*)

Nuraini, Asriani Ilyas, Iin Novianty

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar

Email: Ainichemistry@ymail.com

Abstract: *Bitti wood (Vitex cofassus) is one of the plants in Verbenaceae family and known by the people of South Sulawesi as the building material. The aims of this research is to identify and characterize the anticancer bioactive compound in ethanol extract of vortex Bitti wood (Vitex cofassus) and to determine the bioactivity value. This research uses extraction and fraction method, identification uses thin layer chromatography (TLC) and phytochemical test to know metabolism secunder and characterization with FTIR. The result from isolation shows that the amorf shape with 18 mg has white and yellow colour. The purification is conduted by using spectroscopy test FTIR. The result shows that the crystal has flavonoids compound which is solid with phytochemical test like positive product by using FeCl₃ 5%, NaOH 10% and H₂SO₄ P. Thick extract, fraction combination and amorf continued with toxicity test with the animal test Artemia salina Leach it uses Brine Shrimp Lethality test (BST) method. LC₅₀ value which is gotten the three samples is thick extract 29,51 ppm, combination fraction 169,82 ppm and amorf 562,34 ppm.*

Keywords: *Bitti wood (Vitex cofassus), bioactive compound, Brine Shrimp Lethality Test (BST), isolation, LC₅₀.*

1. PENDAHULUAN

Indonesia termasuk salah satu Negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Keanekaragaman hayati yang terdapat di Indonesia terdiri dari ±30.000 ribu jenis flora, terutama yang memiliki potensi sebagai obat alami. Dari spesies flora Indonesia ini, sekitar 1.260 spesies memiliki aktivitas farmakologi termasuk antikanker (Chasanah). Tumbuhan obat merupakan bagian dari sumber daya alam hayati yang dimanfaatkan oleh manusia. Tumbuhan obat menjadi salah satu alternatif obat yang dipilih oleh masyarakat luas. Hal ini karena tumbuhan obat tidak mempunyai efek samping yang besar apabila dibandingkan dengan obat modern yang terbuat dari bahan kimia sintesis. Obat herbal diperoleh dari tumbuh-tumbuhan baik berupa akar, kulit batang, kayu, daun bunga maupun biji. Agar pengobatan dapat dipertanggungjawabkan, maka

diperlukan penelitian ilmiah seperti identifikasi dan isolasi zat kimia aktif yang terdapat dalam tumbuhan (Raina, 2011) Diantaranya berupa senyawa metabolit primer maupun metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, steroid dan flavonoid.

Senyawa-senyawa metabolit sekunder banyak digunakan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antipiritik serta antimikroba terutama untuk golongan senyawa fenolik, flavonoid dan alkaloid. Senyawa-senyawa ini diketahui juga memiliki aktifitas yang dapat menghambat pertumbuhan dan membunuh sel kanker atau sebagai antikanker. Seperti yang kita ketahui bahwa setiap tahun peningkatan angka kejadian kanker semakin bertambah dan belum adanya terapi yang dianggap tepat untuk mengatasinya sehingga memicu masyarakat pada umumnya dan peneliti pada khususnya untuk mengeksplorasi bahan-bahan alam yang dianggap potensial sebagai alternatif agen antikanker (Ikawati). Senyawa-senyawa toksik yang dapat membunuh sel kanker tersebar di berbagai tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang berpotensi adalah tumbuhan kayu Bitti (*Vitex cofassus*) yang merupakan tumbuhan endemik khas Sulawesi dan kayunya merupakan kayu unggulan Sulawesi Selatan (Prasetyawati, 2013). Tumbuhan lain yang memiliki genus yang sama dengan Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) adalah tumbuhan legundi (*Vitex trifolia*) yang telah banyak diteliti kandungan bioaktifnya dan memiliki beberapa efek farmakologi khususnya sebagai antikanker. Salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh (Hernández MM, *et.,al*, 1999), ekstrak n-heksana dan diklorometana dari batang dan daun spesies *Vitex trifolia* (Legundi) terbukti sangat toksik terhadap sel kanker. Kandungan senyawa bioaktifnya adalah jenis flavonoid yaitu jenis persikogenin, artemetin, luteolin, penduletin, vitexicarpin dan chrysoptenol-D. Keenam flavonoid tersebut mampu menghambat proliferasi sel kanker dengan mekanisme penghambatan siklus sel dan menginduksi apoptosis (Li, W.X,*et.,al*, 2005).

Pengujian senyawa dari tumbuhan yang memiliki potensi bioaktivitas sebagai antikanker dapat dilakukan dengan pengujian toksisitasnya. Penelitian ini menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Metode ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tumbuhan. Hasil uji toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat. Uji toksisitas merupakan skrining awal untuk pencarian obat antikanker (Rolliana, 2010). Berdasarkan uraian di atas, maka perlu kiranya diadakan

suatu penelitian yang mengkaji kandungan bioaktif ekstrak etanol kulit batang tumbuhan kayu Bitti (*Vitex cofassus*).

Tujuan

Tujuan penelitian untuk mengetahui:

1. Untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa bioaktif antikanker yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*).
2. Untuk menentukan nilai bioaktivitas senyawa antikanker dari kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach.

2. METODE PENELITIAN

Alat

Penelitian ini menggunakan alat-alat gelas, *rotary evaporator*, chamber, corong *sintered glass*, lampu UV 254-366 nm, lampu pijar, kolom kromatografi gravitasi, neraca analitik, oven, alat penyemprot, pompa vakum, pipa kapiler, kaca pembesar, mikropipet, botol vial, cutter dan alat spektrofotometer FTIR Prestige 21 merek Shimadzu.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Bahan yang digunakan adalah kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*), akuades, akuabides, pelarut etanol, metanol, n-heksana, etil-asetat, kloroform, aseton, dimetil sulfoksida (DMSO) pereaksi Mayer, pereaksi Liebermann-Buchard, besi (III) klorida (FeCl_3) 5%, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendroff, asam sulfat (H_2SO_4) 10%, asam sulfat (H_2SO_4) pekat, natrium hidroksida (NaOH) 10%, natrium klorida (NaCl) murni, silika G_{60} (230-400 mesh) Merck nomor katalog 7730, 7733 dan 7734, silika gel G_{60} PF 254, aluminium foil, kertas saring dan telur *Artemia salina* Leach.

Prosedur Kerja

Ekstraksi

Kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dibersihkan kemudian ditumbuk sampai berbentuk serbuk dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) yang telah dikeringkan sebanyak 1000 gram dimaserasi dengan pelarut etanol selama 1x24 jam (3 kali). Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.

Fraksinasi

Ekstrak kental etanol yang diperoleh dianalisis menggunakan KLT dengan larutan pengembang (eluen) yaitu n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 8:2 kemudian dilanjutkan dengan kromatografi kolom cair vakum. Fasa gerak yaitu larutan pengembang yang diperoleh dari hasil KLT yang kepolarannya terus ditingkatkan yaitu 100% n-heksana, n-heksana:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), 100% etil asetat dan 100% metanol. Hasil fraksinasi dianalisis menggunakan KLT dengan eluen n-heksana:etil asetat 8:2 dan fraksi-fraksi yang mempunyai nilai R_f yang sama digabung. Fraksi yang sudah digabung dan terdapat tanda kristal dilanjutkan pada kromatografi kolom gravitasi dengan perbandingan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya yaitu 100% n-heksana, n-heksana:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3 dua kali, 6:4 dua kali, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) dan 100% etil asetat. Fraksi yang menghasilkan tanda-tanda kristal dilanjutkan dengan uji KLT, uji fitokimia dan pemurnian.

Pemurnian

Pemurnian dilakukan dengan cara kristalisasi dan rekristalisasi dengan pelarut n-heksana sehingga diperoleh amorf yang berwarna putih kekuningan yang ditandai dengan hasil KLT yang menunjukkan satu noda dan pengujian 3 sistem eluen dengan menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:kloroform (5:5) dan kloroform: etil asetat (2:8). Amorf dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan uji fitokimia yang dilanjutkan karakterisasi dengan menggunakan alat spektrofotometer FTIR serta uji toksisitas.

Karakterisasi dengan Spektrofotometer FTIR

Kristal murni dari hasil isolasi diambil 1 mg, kemudian dicampur dengan KBr dan digerus sampai homogen. Campuran dimasukkan kedalam alat pembuat pellet dengan tekanan 74 atm dan waktu 5 menit sehingga didapatkan pellet dengan ketebalan ± 1 mm. Plat diletakkan pada wadah plat kemudian diukur serapannya dengan alat FTIR.

Uji Toksisitas Larva *Artemia salina* Leach

1. Penetasan Larva *Artemia salina* Leach

Disiapkan wadah untuk penetasan telur udang *Artemia salina* Leach dalam satu ruang dimana ditempatkan dalam keadaan yang berbeda yaitu terang dan gelap. Kemudian ditimbang NaCl laut sebanyak 3,8 gram dan dilarutkan dalam 100 mL aquabides. Larutan NaCl dimasukkan ke dalam wadah. Ke dalam masing-masing wadah yang berisi larutan garam dimasukkan

telur *Artemia salina* Leach ke dalam ruang yang gelap untuk ditetaskan dan didiamkan selama 48 jam.

2. Pembuatan Larutan Sampel

Sampel yaitu ekstrak, fraksi dan kristal murni masing-masing ditimbang sebanyak 1 mg ke dalam botol vial dan dilarutkan dengan 100 μL DMSO kemudian diencerkan dengan 150 μL aquabidest sehingga volume menjadi 250 μL kemudian diambil 200 μL dan diencerkan dengan 600 μL aquabidest hingga volume sampel menjadi 800 μL sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 ppm. Selanjutnya dilakukan pengenceran ke dalam mikroplate. Mikroplate yang disediakan sebanyak 7 dan diberi kode A sampai G. Mikroplate A dan B diisi masing-masing sebanyak 100 μL sampel. Kedalam baris B sampai G dimasukkan aquabidest sebanyak 100 μL . Dari baris B dipipet sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam baris C sampai seterusnya yaitu sampai baris G.

3. Uji Toksisitas terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode BST

Larva udang *Artemia salina* Leach yang telah menetas dipipet 100 μL kedalam mikroplate A sampai G yang masing-masing berisi ekstrak, fraksi dan kristal. Kemudian diinkubasi selama 24 jam kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan hidup pada mikroplate.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Kulit batang dikeringkan dalam suhu kamar agar tidak terkena cahaya matahari langsung. Sebagian besar senyawa metabolit sekunder dalam sampel akan rusak oleh panas matahari langsung. Pengerinan bertujuan untuk mempermudah membuat serbuk dan mengurangi kadar air dalam sampel sehingga tidak ditumbuhi jamur dan senyawa dalam sampel tidak teroksidasi. Pelarut yang dipakai dalam proses maserasi adalah pelarut etanol. Pelarut etanol dipilih karena etanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang polar dan senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang rendah (Agus, 2007). Pelarut etanol memiliki gugus hidroksil yang menyebabkan dapat mengikat senyawa-senyawa polar seperti flavonoid dan alkaloid. Maserasi dilakukan selama 1x24 jam (3 kali) dan menghasilkan maserat yang berwarna coklat. Maserat selanjutnya dievaporasi yang bertujuan untuk memekatkan maserat sehingga menghasilkan ekstrak kental etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*).

Fraksinasi

Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan KLT yang merupakan identifikasi awal untuk menentukan jumlah senyawa dari ekstrak kental serta pendeteksian awal dari hasil isolasi. KLT juga bertujuan untuk mengetahui eluen yang bagus untuk proses fraksinasi awal dengan kromatografi kolom cair vakum. Eluen dikatakan bagus apabila memiliki pola pemisahan yang paling baik karena fraksinya yang terpisah baik dan memiliki jumlah noda yang banyak. Eluen yang sesuai yang dipakai adalah eluen n-heksana:etil asetat (8:2) dengan R_f senyawa adalah 0,36. Fasa diam berupa plat KLT silika G₆₀ PF 254 dan penampak noda lampu UV 254-366 nm dan cairan penyemprot penampak noda H₂SO₄ 10%. Dari hasil uji fitokimia diperoleh bahwa ekstrak kental etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) mengandung senyawa metabolit sekunder jenis flavonoid dan alkaloid. Hal ini disebabkan karena pelarut etanol memiliki sifat yang polar sehingga dapat mengikat senyawa metabolit sekunder yang polar. Fraksinasi adalah proses pemisahan komponen-komponen senyawa dalam ekstrak kental menjadi fraksi. Fraksinasi awal dilakukan dengan kromatografi kolom cair vakum. Fasa diam yang dipakai adalah silika G₆₀ Merck. Pengemasan kolom harus betul-betul rapat yang bertujuan agar proses elusi dan pemisahan senyawanya sempurna. Fasa gerak berupa eluen yang ditingkatkan terus kepolarannya. Eluen yang dipakai adalah 100% n-heksana, n-heksana:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), 100% etil asetat dan 100% metanol.

Fraksi yang diperoleh dari hasil fraksinasi awal adalah sebanyak 15 fraksi. Fraksi-fraksi yang didapat selanjutnya di KLT dengan eluen n-heksan:etil asetat (8:2) dan yang memiliki penampakan noda yang sama pada KLT digabung. Hasil fraksi gabungan yaitu terdiri dari fraksi A, fraksi B, fraksi C, fraksi D, fraksi E dan fraksi F. Dari keenam fraksi, fraksi yang menunjukkan tanda-tanda kristal adalah fraksi D yang berbentuk pasta kering. Hasil uji fitokimia menunjukkan mengandung senyawa metabolit jenis flavonoid dan alkaloid. Fraksi ini belum murni sehingga dilakukan pemurnian melalui kromatografi kolom gravitasi.

Fraksinasi dengan kromatografi kolom gravitasi bertujuan untuk mendapatkan senyawa murni. Kromatografi kolom gravitasi memiliki prinsip yang sama dengan kromatografi kolom cair vakum yaitu sampel dielusi dengan eluen yang memiliki tingkat kepolaran yang rendah sampai eluen yang memiliki tingkat kepolaran tinggi. Fasa diam berupa silika G₆₀ Merck. Proses elusi dilakukan dengan metode bergradien, sehingga elusi diawali dengan eluen tunggal n-heksana yang bersifat non polar kemudian divariasikan dengan eluen yang lebih polar. Fasa gerak dibiarkan mengalir melalui kolom yang

disebabkan oleh gaya dorong gravitasi, dimana pita senyawa terlarut akan bergerak dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari kolom (Jayanti, 2012). Dari hasil kromatografi kolom gravitasi didapatkan 50 fraksi. Fraksi-fraksi yang dihasilkan dilanjutkan dengan proses KLT yang bertujuan untuk melihat penampakan noda yang sama. Penggabungan fraksi menghasilkan 5 fraksi gabungan. Fraksi yang dilanjutkan untuk pemurnian adalah fraksi D4.

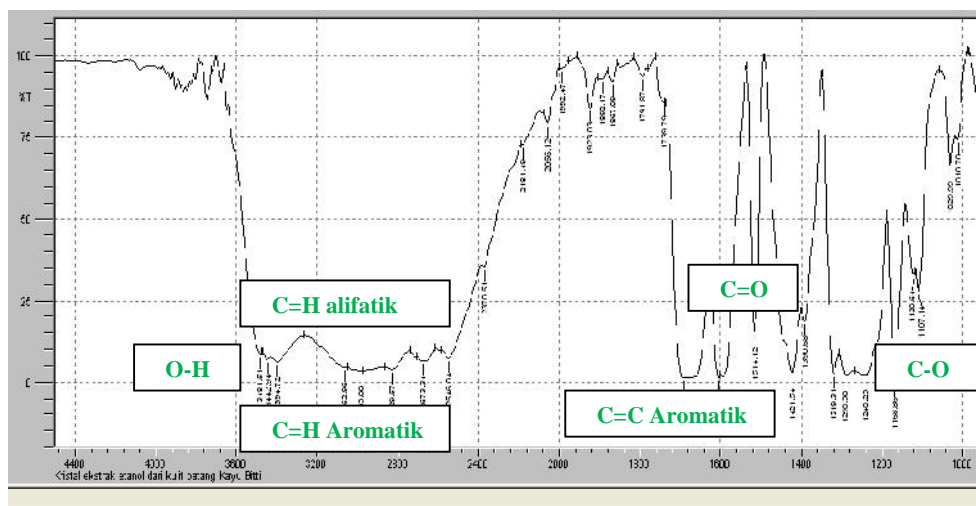
Pemurnian

Untuk mengetahui kemurnian dari amorf yang didapat dari kromatografi kolom gravitasi maka dilakukan uji kemurnian komponen hasil pemisahan dengan kromatografi lapis tipis hingga tampak satu noda tunggal pada minimal tiga sistem eluen. Apabila amorf belum murni maka dilanjutkan pemurnian dengan cara kristalisasi dan rekristalisasi. Teknik rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai. Pada proses kristalisasi terjadi kesetimbangan antara molekul dalam larutan dan kesetimbangan dengan kisi-kisi kristalnya (Firdaus, 2011). Proses pemurnian dilakukan dengan pelarut n-heksana. Senyawa yang diperoleh dari hasil rekristalisasi adalah berupa amorf berwarna putih kekuningan yang selanjutnya dilakukan kembali uji tiga sistem eluen. Eluen yang digunakan adalah eluen n-heksana:etil asetat (7:3), n-heksana:kloroform (5:5) dan kloroform: etil asetat (2:8). Penampakan satu noda dari tiga sistem eluen membuktikan bahwa amorf yang diperoleh telah murni. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa amorf mengandung jenis senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid karena positif dengan pereaksi FeCl_3 , NaOH 10% dan H_2SO_4 . Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik yang memiliki banyak gugus OH dengan adanya perbedaan keelektronegatifan yang tinggi sehingga sifatnya polar. Golongan senyawa ini mudah terekstrak dalam pelarut polar seperti etanol yang memiliki sifat polar karena adanya gugus hidroksil sehingga dapat terbentuk ikatan hidrogen.

Karakterisasi dengan Spektrofotometer FTIR

Spektroskopi inframerah (IR) digunakan untuk mengetahui jenis gugus fungsi dalam suatu jaringan tumbuhan yang diisolasi. Tampilan spektrum menunjukkan puncak-puncak yang menunjukkan gugus-gugus tertentu dengan grafik perbandingan serapan bilangan gelombang terhadap transmitansi (%T). Hasil karakterisasi IR terhadap kristal murni memperlihatkan adanya serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi, diantaranya adalah pada daerah panjang gelombang $3442,94 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya serapan melebar sebagai vibrasi regang O-H terikat yang

khas untuk gugus hidroksil tapi dengan intensitas sangat lemah dan frekuensi yang lebar sehingga hasil serapan tidak terdeteksi. Serapan pada panjang gelombang 3062,96 cm^{-1} menunjukkan pita serapan untuk C-H aromatik. Vibrasi pada bilangan gelombang 2983,88 cm^{-1} dan 2829,57 cm^{-1} memberi petunjuk adanya vibrasi C-H alifatik. Serapan khas untuk gugus C=C aromatik terletak pada bilangan gelombang 1689,64 cm^{-1} . Sedangkan serapan untuk gugus fungsi C=O terletak pada bilangan gelombang 1604,77 cm^{-1} . Vibrasi yang tajam pada daerah bilangan gelombang 1168,86 cm^{-1} menandakan adanya vibrasi dari gugus C-O. Berdasarkan data spektroskopi IR dapat diketahui bahwa senyawa yang terdapat dalam kristal yang mempunyai vibrasi gugus O-H, gugus C-H aromatik, gugus C-H alifatik, gugus C=C aromatik, gugus C=O, serta gugus C-O mengindikasikan sebagai senyawa flavonoid.



Gambar 1. Spektrum Inframerah (IR) Amorf

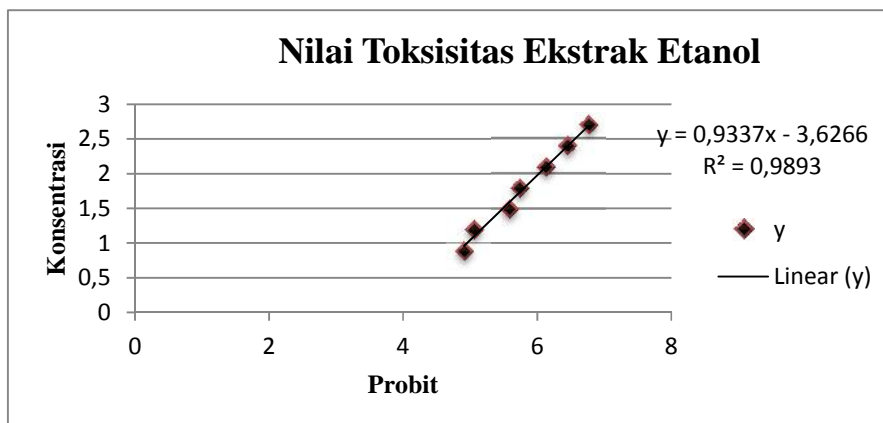
Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan skrining awal untuk pencarian obat antikanker karena telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa antikanker. Penelitian ini menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Larva udang (*Artemia salina* Leach) merupakan organisme sederhana dari biota laut yang sangat kecil dan mempunyai kepekaan yang cukup tinggi terhadap toksik. Penetasan telur *Artemia salina* Leach menggunakan wadah penetasan yang dipisahkan yaitu antara yang gelap dan terang. Yang gelap adalah tempat penetasan. Telur udang *Artemia salina* Leach ditetaskan dengan menggunakan 3,8 gram garam laut murni yang dilarutkan dengan 100 mL aquabidest. Kemudian diinkubasi selama 48 jam (Olowa, 2013).

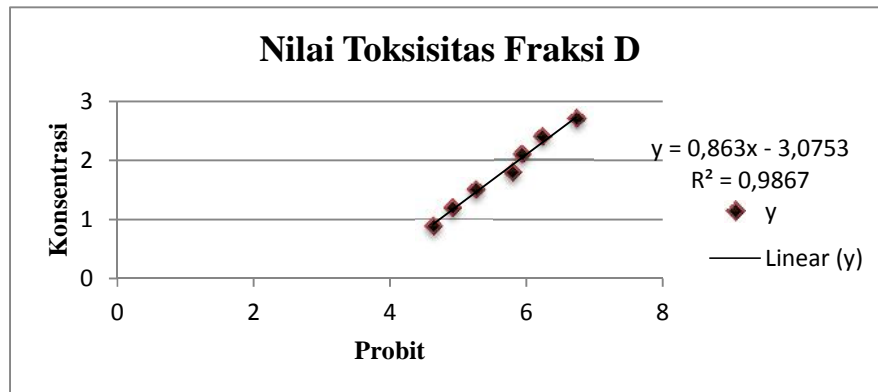
Sampel yaitu ekstrak kental, fraksi gabungan (fraksi D) dan senyawa murni dalam bentuk amorf masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan 100 μ L DMSO. Hal ini dilakukan karena pelarutan sampel dengan menggunakan air laut sering menimbulkan masalah karena adanya perbedaan tingkat kepolaran. Sampel tidak mampu larut dengan air laut sehingga digunakan DMSO untuk melarutkannya (Kamilah, 2010). Sampel yang telah dilarutkan dengan DMSO diencerkan dengan aquabidest sehingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Pengerjaan dilakukan dengan triplo dan konsentrasi hasil pengenceran yaitu 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, 15,625 ppm dan 7,8125 ppm. Udang *Artemia salina* Leach yang telah menjadi larva dipipet sebanyak 7-15 ekor ke dalam wadah pengujian dan di tambah dengan sampel yaitu sebanyak 100 μ L. Selanjutnya sampel yang telah dikontakkan dengan larva diinkubasi selama 1x24 jam kemudian dihitung jumlah larva yang mati kemudian dihitung persen kematian (mortalitas) dengan menggunakan persamaan:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

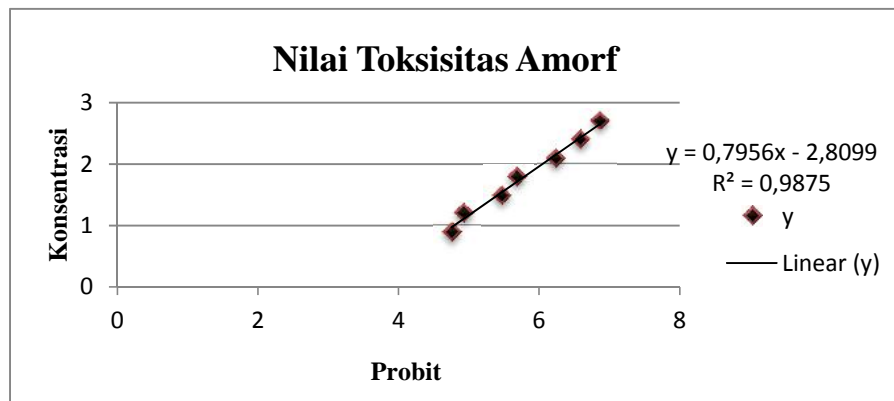
Presentasi kematian larva dapat digunakan untuk menghitung nilai probit yang selanjutnya dapat diketahui nilai LC_{50} yang diperoleh dari nilai grafik. Nilai sampel yaitu ekstrak kental, fraksi gabungan (fraksi D) dan amorf dapat dilihat dari grafik berikut ini:



Gambar 2. Grafik Nilai Toksisitas Ekstrak Etanol



Gambar 3. Grafik Nilai Toksisitas Fraksi D



Gambar 4. Grafik Nilai Toksisitas Amorf

Dari grafik dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi, semakin besar pula persen mortalitas (kematian) sehingga nilai probitnya pun semakin tinggi baik pada ekstrak kental, fraksi D maupun amorf. Hal ini disebabkan karena cara kerja senyawa yang terdapat dalam sampel yaitu ekstrak kental, fraksi D dan amorf dalam membunuh larva udang *Artemia salina* Leach. *Artemia salina* Leach. bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Oleh karena itu, apabila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini akan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya dan larva mati kelaparan (Muaja, 2013) Dengan mengetahui kematian larva *Artemia salina* Leach kemudian dicari

angka probit melalui tabel probit dan dibuat persamaan garis: $y=ax + b$ dimana sumbu y adalah log konsentrasi dan sumbu x adalah angka probit. Dari persamaan tersebut kemudian dihitung LC_{50} dengan memasukkan nilai $y=ax+b$. Nilai LC_{50} yang didapat dari ketiga sampel yang didapat terlihat seperti pada tabel berikut:

Tabel 1. Uji Toksisitas

No.	Sampel	Nilai LC_{50} ($\mu\text{L}/\text{mg}$)	Keterangan
1.	Ekstrak kental	29,51	Sangat Toksik
2.	Fraksi D	169,82	Toksik
3.	Amorf	562,34	Toksik

Nilai LC_{50} yang didapatkan menunjukkan bahwa yang paling toksik diantara ketiga sampel adalah ekstrak kental. Suatu senyawa dianggap sangat toksik apabila senyawa memiliki nilai $LC_{50} < 30$ ppm, toksik dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm dan tidak toksik apabila $LC_{50} > 1000$ ppm dan tingkat kematian dari larva udang sebanyak 50% terhadap ekstrak uji (Vivi, 2006) Tingginya toksisitas dari ekstrak kental dibandingkan dengan fraksi D dan kristal murni disebabkan karena didalam ekstrak kental masih banyak mengandung senyawa metabolit sekunder jenis flavonoid dan alkaloid.

Senyawa flavonoid dan alkaloid dikatakan terbukti toksik sebagai antikanker karena dilihat dari nilai LC_{50} yang diperoleh. Flavonoid dan alkaloid memiliki mekanisme sebagai antikanker karena flavonoid sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis sel pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi ini diawali dengan dilepasnya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Efek lainnya adalah flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor/kanker yang salah satunya dengan menghambat aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan keganasan sel kanker. Flavonoid juga berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi. Penyebab lain flavonoid dapat membunuh sel kanker disebabkan karena adanya menyebabkan gugus OH- pada flavonoid berikatan dengan protein integral membran sel. Hal ini menyebabkan terbungahnya transpor aktif $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Transpor aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion Na^+ yang tidak

terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membran sel. Pecahnya membran sel inilah yang menyebabkan kematian sel (Nurhayati, 2006).

Alkaloid yang berasal dari tumbuhan memiliki mekanisme sitotoksik yaitu berperan sebagai *tubulin inhibitor*. Pada proses siklus sel alkaloid berikatan dengan tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus. Terikatnya tubulin pada alkaloid mengakibatkan polimerisasi protein menjadi mikrotubulus akan terhambat sehingga pembentukan *spindle* mitotik akan terhambat pula dan siklus sel akan berhenti pada metafase. Karena tidak dapat melakukan pembelahan sel, sel tersebut kemudian akan mengalami apoptosis (Bertomi, 2011)

4. PENUTUP

Kesimpulan

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Senyawa bioaktif antikanker yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit batang kayu Bitti (*Vitex cofassus*) adalah senyawa metabolit sekunder jenis flavonoid.
2. Nilai LC₅₀ yang didapatkan dari metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) menggunakan larva *Artemia salina* Leach adalah untuk ekstrak kental 29,51 ppm, fraksi D 169,82 ppm dan amorf 562,34 ppm.

Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya:

1. Perlu dilakukan karakterisasi lanjutan kristal menggunakan uji spektroskopi GC-MS dan NMR.
2. Perlu dilakukan uji kandungan senyawa bioaktif semua komponen dari tumbuhan Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) yang meliputi daun, buah dan akar.

DAFTAR PUSTAKA

- Agus, G., 2007, *Teknologi Bahan Alam*, Bandung: ITB.
- Bertomi R. P., 2011, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST), *Skripsi Sarjana*, Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, h. 6.
- Chasanah U, *et.al.* Anti Cancer Pre-Screening for Several Plant Using Brine Shrimp Lethality Test, *Jurnal Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang*. h. 1.

- Herna'ndez, M.M, *et.,al*, 1999, Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae), *J. of Ethnopharmacol Jurnal*.
- Firdaus, 2011, *Laporan Hibah Penulisan Buku Ajar Teknik dalam Laboratorium Kimia Organik*. Makassar: Unhas.
- Ikawati, M., *et.,al*. Pemanfaatan Benalu Sebagai Agen Antikanker, *Jurnal*. h. 1.
- Jayanti N. W., *et.,al*, 2012, Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Aktif dari Ekstrak Metilena Klorida (MTC) Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* (L)willd), *Chem. Prog.*, 5 (2):102.
- Kamilah E. H. dan Nurhalimah, 2010, Pytochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach of Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Plant Extract, *Alchemy*, 1(2) : 81.
- Li, W.X, *et.,al*, 2005, Flavonoids from *Vitex trifolia* Inhibit Cell Cycle Progression at G2/M phase and Induce Apoptosis in Mammalian Cancer Cells, *J Asian Nat*, h. 615.
- Lisdawati V., Sumali W. L. Broto S. K., 2006, *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*), *Bul. Penel. Kesehatan*, 34 (3), h. 112.
- Muaja, D. A., Harry S. J. K. dan Max R. J. R., 2013, Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi, *Jurnal MIPA Unsrat Online*, 2 115-118 h. 115.
- Nurhayati A. P. D., Nurlita A. dan Rachmat F., 2006, Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia Salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker, *Akta Kimindo*, 2 (1) : 118.
- Olowa , L. F. dan Olga M. N., 2013, Brine Shrimp Lethality Assay of the Ethanolic Extracts of Three Selected Species of Medicinal Plants from Iligan City, Philippines, *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(11): 74-77, ISSN 2278-3202..
- Prasetyawati, A., 2013, "Eksplorasi Benih Bitti (*Vitex Cofassus*) Di Sulawesi Selatan".
- Raina, 2011, *Tanaman Obat Untuk Kesehatan*. Yogyakarta: Absolut.
- Rolliana R. E., 2010, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kamboja Skrining Awal Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria alba l.*) terhadap Larva *Artemia Salina leach* dengan Metode Brine Shrimp Lethality test (BST), *Artikel Karya Tulis Ilmiah*.