

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DENGAN METODE BSLT  
BEBERAPA FRAKSI AKAR BIDURI (*Calotropis gigantea* L.)  
SERTA PENETAPAN TOTAL FLAVONOID DAN FENOLIK**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana  
Farmasi (S.Farm.) di bidang studi Farmasi pada Fakultas MIPA**



**Oleh :**  
**HASTI RIZKY WAHYUNI**  
**08121006069**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

**2016**

S  
541.590 7  
Has  
J  
2016

- 8984 -



# UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DENGAN METODE BSLT BEBERAPA FRAKSI AKAR BIDURI (*Calotropis gigantea* L.) SERTA PENETAPAN TOTAL FLAVONOID DAN FENOLIK

## SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana  
Farmasi (S.Farm.) di bidang studi Farmasi pada Fakultas MIPA



Oleh :  
**HASTI RIZKY WAHYUNI**  
**08121006069**

**PROGRAM STUDI FARMASI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

**2016**

## **HALAMAN PENGESAHAN MAKALAH SEMINAR HASIL**

Judul Makalah : UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DENGAN METODE BSLT BEBERAPA FRAKSI AKAR BIDURI (*Calotropis gigantea* L.) SERTA PENETAPAN TOTAL FLAVONOID DAN FENOLIK

Nama Mahasiswa : HASTI RIZKY WAHYUNI

NIM : 08121006069

Program Studi : FARMASI

Telah dipertahankan di hadapan Pembimbing dan Pembahas pada Seminar Hasil di Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya pada tanggal 04 Oktober 2016 dan telah diperbaiki, diperiksa, serta disetujui sesuai dengan saran yang diberikan.

Inderalaya, 04 November 2016

Pembimbing :

1. Fitrya, M.Si., Apt.

NIP. 197212101999032001

(.....)

2. Shaum Shiyan, M.Sc., Apt.

NIP. 198605282012121005

(.....)

Pembahas :

1. Herlina, M.Kes., Apt.

NIP. 197107031998022001

(.....)

2. Najma Annuria Fithri, S.Farm., M.Sc., Apt.

NIP. 198803252015042002

(.....)

3. Laida Neti Mulyani, M.Si.

NIP. 198504262015042002

(.....)



## HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Judul Makalah : UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DENGAN METODE BSLT BEBERAPA FRAKSI AKAR BIDURI (*Calotropis gigantea* L.) SERTA PENETAPAN TOTAL FLAVONOID DAN FENOLIK  
Nama Mahasiswa : HASTI RIZKY WAHYUNI  
NIM : 08121006069  
Program Studi : FARMASI

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Sidang Ujian Skripsi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sriwijaya pada tanggal 03 November dan telah diperbaiki, diperiksa, serta disetujui sesuai dengan saran yang diberikan.

Inderalaya, 04 November 2016

Ketua :

1. Herlina, M.Kes., Apt.  
NIP. 197107031998022001

(.....)

Anggota :

1. Fitrya, M.Si., Apt.  
NIP. 197212101999032001  
2. Najrina Annuria Fithri, S.Farm., M.Sc., Apt.  
NIP. 198803252015042002  
3. Indah Solihah, M.Sc., Apt.  
NIPUS. 198803082015107201  
4. Yosua Maranatha Sitohang, M.Si., Apt.  
NIK. 1671071509900014

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)

Mengetahui

Ketua Program Studi Farmasi

Fakultas MIPA UNSRI

Dr. rer. nat. Mardiyanto, M.Si., Apt.  
NIP. 197103101998021002

## **HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH**

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Hasti Rizky Wahyuni

NIM : 08121006069

Fakultas/Program Studi : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam/Farmasi

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan karya ilmiah ini belum pernah diajukan sebagai pemenuhan persyaratan untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata satu (S1) dari Universitas Sriwijaya maupun perguruan tinggi lain.

Semua informasi yang dimuat dalam skripsi ini yang berasal dari penulis lain baik yang dipublikasikan atau tidak telah diberikan penghargaan dengan mengutip nama sumber penulis secara benar. Semua isi dari skripsi ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya sebagai penulis.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Inderalaya, Oktober 2016



Hasti Rizky Wahyuni  
NIM. 08121006069

## **HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Sriwijaya, yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama Mahasiswa : Hasti Rizky Wahyuni

NIM : 08121006069

Fakultas/Program Studi : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam/Farmasi

Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Sriwijaya “hak bebas royalti non-ekslusif” (*non-exclusively royalty-free right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul: “Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode BSLT Beberapa Fraksi Akar Biduri (*Calotropis gigantea* L.) Serta Penetapan Total Flavonoid dan Fenolik” beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan hak bebas royalti non-ekslusif ini, Universitas Sriwijaya berhak menyimpan, mengalihmedia/memformatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir atau skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya.

Inderalaya, Oktober 2016  
Penulis,



Hasti Rizky Wahyuni  
NIM. 08121006069

## HALAMAN PERSEMPAHAN DAN MOTTO



(Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang)

“Berdoalah (mintalah) kepadaKu, niscaya Aku kabulkan untukmu.”  
(Q.S. Al-Mukmin: 60)

“Lihatlah mereka yang lebih tidak beruntung daripada dirimu sehingga kau tidak mungkin tidak berpuas diri atas keberuntungan yang diberikan Allah SWT kepadamu”  
(Nabi Muhammad SAW)

*Allhamdulillahi robbil alamin*

*Rasa syukur yang teramat atas satu langkah yang telah ku lewati  
Satu langkah penuh perjuangan, penuh hambatan, penuh rintangan  
dan merupakan langkah awal demi dimulainya langkah baru dari  
kehidupan yang sebenarnya*

*Saya persembahkan skripsi ini untuk Ibu, Ayah, dan Adik-adikku  
tercinta yang telah memberikan dukungan moril dan materil  
selama ini, serta para sahabat dan teman-teman seperjuangan  
farmasi 2012.*

“Hiduplah seperti pohon kayu yang lebat buahnya, hidup di tepi jalan dan ketika dilempari orang dengan batu, tetapi membalas dengan buah” (Abu Bakar Sibli).

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah, Tuhan Semesta Alam yang atas rahmat dan karunia-Nyalah sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode BSLT Beberapa Fraksi Akar Biduri (*Calotropis gigantea* L.) Serta Penetapan Total Flavonoid dan Fenolik”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat mendapatkan gelar Sarjana Farmasi di program studi Farmasi pada Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya. Selain itu, skripsi ini ditulis untuk memberikan informasi mengenai potensi akar biduri sebagai agen sitotoksik alami dalam pengobatan kanker.

Penulis menyadari bahwa dalam penelitian maupun penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ayah (Hasanudin) dan Ibu (Nurti Amalah) tercinta yang selalu memberikan kasih sayang, memanjatkan doa yang tak henti-hentinya, menasehati, memberi semangat, memotivasi, hingga memberikan dukungan moril dan materil yang tak ternilai. Adik-adikku (Ayu dan Ikral) tersayang yang selalu memberikan warna kehidupan dalam setiap hari yang ku lewati.
2. Rektor Universitas Sriwijaya dan Dekan Fakultas MIPA serta Ketua Program Studi Farmasi atas sarana dan prasarana yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik dan lancar.
3. Ibu Fitrya, M.Si., Apt. selaku pembimbing akademik dan dosen pembimbing pertama, serta Bapak Shaum Shiyan, M.Sc., Apt. sebagai dosen pembimbing kedua yang telah bersedia meluangkan waktu dan kesabaran dalam membimbing, memberikan ilmu, arahan, bantuan, motivasi, serta kepercayaan kepada saya dalam menyelesaikan penelitian serta penulisan skripsi ini.
4. Ibu Najma Annuria Fithri, S.Farm., M.Sc., Apt., Ibu Indah Solihah, M.Sc., Apt., dan Bapak Yosua Maranatha Sitohang, M.Si., Apt. sebagai dosen penguji dan pembahas yang telah banyak memberikan masukan dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
5. Seluruh dosen, staf, dan analis Program Studi Farmasi FMIPA Universitas

Sriwijaya yang telah memberikan pengetahuan, wawasan, dan bantuan dalam studi sehingga penulis bisa menyelesaikan studi dengan baik dan lancar.

6. Partner in life (Defri Permadi) yang telah berperan sebagai sahabat serta kakak yang selalu menemani, memberi semangat, memberi canda dan tawa, serta setia mendengarkan keluh kesah hingga terselesaiannya skripsi ini.
7. Partner in kost (Lastri, Pita, Yuk Ica, Yuk Isnai) yang telah setia menemani, memberi bantuan yang tak terhitung, menyemangati, serta selalu mendengarkan keluh kesah dari awal perkuliahan hingga terselesaiannya skripsi ini. Serta The Boys Ar-Rahman (Kak Agung, Kak Maido, Kak Dimas) yang selalu setia membantu saat kesusahan.
8. Sahabat seperjuanganku CG (Nia, Della, Bella, Bunga, Nisa, Indah, Ita, Melvi) yang selalu mendengarkan curahan hati, menjadi tempat berbagi ilmu, memberikan arti kebersamaan, nasihat, masukan, semangat, perhatian, kecerian, serta bantuan hingga terselesaiannya skripsi ini.
9. Partner akar biduri (Della), partner lab (Fanny dan Kak Sebu), serta teman-teman lainnya yang telah memberikan banyak bantuan saat penelitian dan penyusunan skripsi.
10. Teman-teman seperjuangan farmasi 2012, kakak-kakak farmasi 2011 serta adik-adik farmasi 2013 hingga 2016 yang telah memberikan canda tawa, suka duka, inspirasi, semangat, bantuan, serta kenangan selama perkuliahan.

Penulis sangat bersyukur dan berterimakasih atas segala kebaikan, bantuan, dukungan, dan motivasi yang diberikan dari semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan skripsi ini. Semoga Allah memberkahi dan membalas setiap kebaikan semua pihak yang membantu. Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini masih banyak terdapat kekurangan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan dimasa yang akan datang. Semoga skripsi ini dapat memberikan banyak manfaat untuk kemajuan ilmu pengetahuan.

Inderalaya, Oktober 2016  
Penulis



Hasti Rizky Wahyuni  
08121006069

## **Cytotoxic Activity Test of *Calotropis gigantea* L. Roots by BSLT Method and Determination Of Total Flavonoids and Phenolic Content**

**Hasti Rizky Wahyuni  
08121006069**

### **ABSTRACT**

*Calotropis gigantea* L. roots had been known to contain flavonoids and phenolic component that could act as a cytotoxic agent. This study aimed to determine total flavonoid and phenolic content of crude extract and find cytotoxic activity of ethanol, ethyl acetate, and n-hexane fractions on *Calotropis gigantea* L. roots. The total content of flavonoid and phenolic were determined by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu reagent and AlCl<sub>3</sub> method respectively, while the cytotoxic test of each fraction was performed using BSLT method. The results showed that biduri roots contained 19.367 mg QE/g of total flavonoid and 344 mg GAE/g of total phenolic. The cytotoxic activity test was conducted using various concentrations of 10, 20, 40, 80, 160, and 320 ppm with control solution (artificial sea water). The resulting LC<sub>50</sub> value of each fractions were analyzed by probit analysis with SPSS 23.0™ program 23.0™ for Windows respectively of 54.495, 389.877, and 1652.133 µg/mL. Statistical analysis with anova showed a meaningful difference at each fraction, with significance value of 0.000 ( $p<0.05$ ). The result of this study indicated that the cytotoxic activity is highest in the ethanol fraction with LC<sub>50</sub> values of 54.495 µg/mL, its categorized as *medium toxic* level.

**Keyword(s):** *Biduri roots, Calotropis gigantea L., BSLT, total flavonoid, total phenolic*

**Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode BSLT Beberapa Fraksi  
Akar Biduri (*Calotropis gigantea* L.) serta Penetapan  
Total Flavonoid dan Fenolik**

**Hasti Rizky Wahyuni  
08121006069**

**ABSTRAK**

Akar biduri (*Calotropis gigantea* L.) diketahui mengandung flavonoid dan fenolik yang berpotensi sebagai agen sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kandungan total flavonoid dan fenolik yang terdapat pada ekstrak kasar, serta mengetahui aktivitas sitotoksik pada fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana akar biduri. Kandungan flavonoid dan fenolik total pada ekstrak kasar ditentukan dengan spektrofotometer masing-masing menggunakan metode Folin-Ciocalteu dan AlCl<sub>3</sub>, sedangkan uji sitotoksik setiap fraksi dilakukan menggunakan metode BSLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa akar biduri mengandung flavonoid sebesar 19,3667 mg QE/g ekstrak dan kandungan fenolik sebesar 344 mg GAE/g ekstrak. Aktivitas sitotoksik ditentukan dengan variasi konsentrasi larutan uji sebesar 10, 20, 40, 80, 160, dan 320 ppm dengan larutan kontrol (air laut buatan). Nilai LC<sub>50</sub> yang dihasilkan pada masing – masing fraksi menggunakan program analisis probit dengan SPSS 23.0™ for Windows secara berturut-turut adalah 54,495, 389,877, dan 1652,133 µg/mL. Analisis statistik dengan anova menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada masing-masing fraksi, dengan nilai signifikansi sebesar 0,000 (p<0,05). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik tertinggi terdapat pada fraksi etanol dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 54,495 µg/mL yang tergolong tingkat *medium toxic*.

**Kata kunci:** *akar biduri, Calotropis gigantea L., BSLT, flavonoid total, fenolik Total*

UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
NO. DAFTAR : 162532
TANGGAL : 22-11-2016

## DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN MAKALAH HASIL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	v
HALAMAN PERSEMBAHAN DAN MOTTO .....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
ABSTRAK .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
 BAB I PENDAHULUAN .....	 1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	 5
2.1 Klasifikasi Biduri ( <i>Calotropis gigantea</i> Linn.) .....	5
2.2 Morfologi Tumbuhan Biduri .....	6
2.3 Kandungan Kimia, Aktivitas Farmakologis, dan Toksisitas Biduri..	7
2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi .....	9
2.5 Senyawa Fenolik dan Flavonoid.....	10
2.6 Metode Uji Sitotoksik .....	12
2.6.1 Metode MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazo- lium bromid).....	12
2.6.2 Metode <i>Direct Counting</i> .....	13
2.6.3 Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT) .....	14
2.7 Metode Penentuan LC <sub>50</sub> .....	15
2.8 Deskripsi Larva <i>Artemia salina</i> L.....	16
2.8.1 Klasifikasi <i>Artemia salina</i> L.....	16
2.8.2 Morfologi <i>Artemia salina</i> L.....	17
2.8.2 Habitat <i>Artemia salina</i> L. .....	18
2.9 Penggunaan <i>Artemia salina</i> L. sebagai Uji Toksisitas .....	19
 BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....	 22
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
3.2 Alat dan Bahan .....	22
3.2.1 Alat .....	22
3.2.2 Bahan .....	22

3.3	Prosedur Penelitian .....	23
3.3.1	Preparasi Ekstrak dan Fraksinasi Akar Biduri.....	23
3.3.2	Karakterisasi Ekstrak dan Fraksi .....	24
3.3.2.1	Organoleptik .....	
3.3.2.2	Senyawa Terlarut dalam Pelarut Tertentu .....	
3.3.2.3	Bobot Jenis .....	25
3.3.2.4	Susut Pengeringan .....	25
3.3.2.5	Kadar Air .....	26
3.3.2.6	Penapisan Fitokimia .....	26
3.3.2.7	Uji Kualitatif Ekstrak dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	27
3.3.3	Penetapan Total Fenolik Ekstrak Kasar Akar Biduri .....	28
3.3.3.1	Pembuatan Larutan Uji.....	28
3.3.3.2	Pembuatan Larutan Standar Asam Galat .....	28
3.3.3.3	Penentuan Kandungan Fenolik Total .....	28
3.3.4	Penetapan Total Flavonoid Ekstrak Kasar Akar Biduri .....	29
3.3.4.1	Pembuatan Larutan Uji.....	29
3.3.4.2	Pembuatan Larutan Standar Kuersetin.....	29
3.3.4.3	Penentuan Kandungan Flavonoid Total .....	29
3.3.5	Uji Aktivitas dengan Metode BSLT .....	30
3.3.5.1	Pembuatan Larutan Stok .....	30
3.3.5.2	Penyiapan dan Penetasan Larva <i>A. salina</i> Leach ....	30
3.3.5.3	Pengujian Sitotoksik Metode BSLT.....	30
3.3.5.4	Perhitungan Nilai LC <sub>50</sub> Metode BSLT.....	31
3.4	Analisis Data.....	31
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
4.1	Determinasi Tanaman .....	32
4.2	Ekstraksi dan Fraksinasi Akar Biduri.....	32
4.3	Karakterisasi Ekstrak dan Fraksi .....	35
4.3.1	Pemeriksaan Organoleptis .....	35
4.3.2	Senyawa Terlarut dalam Pelarut Tertentu .....	36
4.3.3	Bobot Jenis .....	37
4.3.4	Susut Pengeringan .....	38
4.3.5	Kadar Air .....	39
4.3.6	Penapisan Fitokimia .....	40
4.3.7	Uji Kualitatif Ekstrak dengan Kromatografi Lapis Tipis ....	42
4.4	Penetapan Total Fenolik Ekstrak Kasar Akar Biduri .....	46
4.5	Penetapan Total Flavonoid Ekstrak Kasar Akar Biduri .....	49
4.6	Hasil Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode BSLT .....	50
4.7	Perhitungan Nilai LC <sub>50</sub> .....	57
4.8	Hasil Analisis Statistik.....	59
<b>BAB V</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>61</b>
5.1	Kesimpulan .....	61
5.2	Saran .....	61
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	<b>62</b>
<b>LAMPIRAN</b>	.....	<b>71</b>

## **DAFTAR TABEL**

Halaman

Tabel 1.	Tingkat toksisitas uji BSLT .....	15
Tabel 2.	Hasil fraksinasi 20 g ekstrak kasar akar biduri .....	34
Tabel 3.	Organoleptis ekstrak kasar dan fraksi akar biduri.....	36
Tabel 4.	Persen kadar sari larut dalam etanol dan air .....	36
Tabel 5.	Nilai bobot jenis untuk ekstrak dan fraksi akar biduri .....	37
Tabel 6.	Persen susut pengeringan untuk ekstrak dan fraksi akar biduri .....	38
Tabel 7.	Persen kadar air untuk ekstrak dan fraksi akar biduri .....	39
Tabel 8.	Uji penapisan fitokimia ekstrak kasar dan fraksi akar biduri .....	40
Tabel 9.	Nilai LC <sub>50</sub> masing–masing fraksi .....	56

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1.	Tumbuhan biduri .....	5
Gambar 2.	Senyawa kimia yang telah diisolasi dari ekstrak akar biduri .....	8
Gambar 3.	Kerangka dasar flavonoid.....	11
Gambar 4.	Larva <i>Artemia salina</i> L.....	19
Gambar 5	Kerja RNA <i>polymerase</i> dalam proses transkripsi .....	20
Gambar 6.	Reaksi senyawa flavonoid dengan NaOH .....	41
Gambar 7.	Reaksi senyawa fenolik dengan FeCl <sub>3</sub> .....	42
Gambar 8.	Struktur zinc <i>ortosilicate</i> .....	43
Gambar 9.	Plat hasil KLT untuk identifikasi fenolik .....	44
Gambar 10.	Plat hasil KLT untuk identifikasi flavonoid.....	45
Gambar 11	Plat hasil KLT untuk identifikasi steroid/terpenoid .....	46
Gambar 12.	Kurva kalibrasi standar asam galat .....	47
Gambar 13.	Reaksi senyawa fenol dengan pereaksi Folin–Ciocalteu.....	48
Gambar 14.	Kurva kalibrasi standar kuersetin .....	49
Gambar 15.	Reaksi senyawa flavonoid dengan AlCl <sub>3</sub> .....	50
Gambar 16.	Grafik hubungan konsentrasi dan persentase kematian larva .....	54
Gambar 17.	Kurva hubungan log konsentrasi dan nilai probit .....	55

## **DAFTAR LAMPIRAN**

Halaman

Lampiran 1.	Surat Keterangan Hasil Determinasi .....	71
Lampiran 2.	Skema Kerja.....	72
Lampiran 3.	Alur Proses Maserasi dan Fraksinasi .....	73
Lampiran 4.	Penetapan Total Flavonoid dan Fenolik .....	74
Lampiran 5.	Uji Sitotoksik Metode BSLT .....	75
Lampiran 6.	Tabel Probit .....	76
Lampiran 7.	Contoh Perhitungan LC <sub>50</sub> .....	77
Lampiran 8.	Perhitungan Rendemen Ekstrak Kasar dan Fraksi.....	78
Lampiran 9.	Perhitungan Senyawa Terlarut dalam Pelarut Tertentu .....	79
Lampiran 10.	Perhitungan Hasil Bobot Jenis .....	81
Lampiran 11.	Perhitungan Persen Susut Pengeringan .....	82
Lampiran 12.	Perhitungan Persen Kadar Air .....	83
Lampiran 12.	Hasil Perhitungan Total Fenolik .....	84
Lampiran 13.	Hasil Perhitungan Total Flavonoid .....	86
Lampiran 14.	Perhitungan LC <sub>50</sub> Berdasarkan Persamaan Regresi SPSS .....	88
Lampiran 15.	Hasil Uji Penapisan Fitokimia .....	91
Lampiran 16.	Dokumentasi Penelitian .....	92
Lampiran 17.	Analisis Statistik .....	94

## **DAFTAR SINGKATAN**

ADP	: Adenosin Difosfat
ATP	: Adenosin Trifosfat
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GAE	: <i>Gallic Acid Equivalent</i>
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
LC	: <i>Lethal Concentration</i>
MMI	: Materia Medika Indonesia
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
QE	: <i>Quersetin Equivalent</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UV	: Ultraviolet
Vis	: Visibel

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Pemanfaatan tanaman obat yang banyak dikembangkan saat ini adalah untuk membantu penyembuhan penyakit kanker. Menurut Indrayani *et al.* (2006), penyebab kematian tertinggi di negara berkembang disebabkan oleh penyakit kanker. Usaha penyembuhan dengan obat kanker sintetik umumnya masih relatif mahal dan memiliki efek samping yang besar diantaranya mukositis (peradangan pada membran mukosa pencernaan), diare, dan trombositopenia (penurunan jumlah platelet dalam darah di bawah batas minimal). Hal tersebut mendorong dilakukannya pencarian sumber obat baru yang berasal dari alam sebagai salah satu kandidat yang berkhasiat antikanker.

Salah satu uji pendahuluan untuk mengetahui potensi bahan alam sebagai antikanker adalah dengan melakukan uji sitotoksik. Menurut Kurnijasanti (2008), uji sitotoksik merupakan salah satu pengembangan metode untuk memprediksi keberadaan senyawa yang bersifat toksik pada sel yang merupakan syarat mutlak untuk obat-obat antikanker. Metode uji sitotoksik yang umum digunakan yaitu metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). BSLT merupakan suatu metode uji toksitas akut yang paling mudah, cepat, dan murah. Menurut Carballo *et al.* (2002), metode BSLT digunakan sebagai metode *bioassay guided* dalam melakukan skrining terhadap senyawa aktif ataupun ekstrak aktif dari bahan alam.

Salah satu tumbuhan yang diketahui memiliki potensi sebagai agen antikanker adalah tumbuhan *Calotropis gigantea* Linn. atau yang dikenal dengan nama biduri. Biduri secara luas digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan

penyakit seperti demam, rematik, gangguan pencernaan, batuk, pilek, asma, mual, muntah, dan diare (Patel *et al.*, 2014). Hampir setiap bagian, seperti bunga, kuncup, dan akar mengandung alkaloid, glikosida, fenolik, flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid (Kumar *et al.*, 2013). Dari hasil skrining pendahuluan, akar biduri terbukti mengandung flavonoid, alkaloid, fenolik, steroid, serta tanin. Kandungan metabolit sekunder dalam tumbuhan bertanggung jawab dalam menghasilkan suatu efek farmakologis tertentu. Metabolit sekunder terutama flavonoid dan fenolik merupakan golongan senyawa terbesar yang terdapat dalam biduri dan diketahui sebagai metabolit yang aktif memiliki aktivitas sitotoksik.

Penelitian mengenai efek sitotoksik biduri telah dibuktikan oleh Hossain *et al.* (2012) menggunakan bagian daun dari fraksi heksan dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 106,09 µg/mL. Ekstrak etil asetat bunga biduri juga memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 14,61 µg/mL (Habib *and* Kari, 2009). Hasil penelitian Bhagat (2010) pada akar tumbuhan *Calotropis procera* menunjukkan hasil yang positif terkait aktivitas sitotoksik menggunakan *cell line* KB (kanker mulut) dan SNB-78 (kanker sistem saraf sentral). Jalur kekerabatan antara *Calotropis procera* dengan *Calotropis gigantea* sangat dekat, sehingga dapat diasumsikan potensi antikanker pada biduri juga cukup besar.

Oleh karena itu, akan dilakukan penelitian antikanker dengan melakukan uji pendahuluan aktivitas sitotoksik terkait nilai LC<sub>50</sub> dari metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) pada fraksi n-heksana, etil asetat, dan etanol akar biduri. Metode BSLT dipilih karena merupakan uji sitotoksik dengan waktu uji yang cepat, mudah, murah, dan sederhana (tanpa teknik aseptik) (Achmad, 2004). Perbedaan berbagai pelarut dimaksudkan agar seluruh kandungan senyawa

metabolit sekunder dalam sampel dapat terekstraksi sesuai polaritasnya. Pada prinsipnya, suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya (Sudarmadji dkk., 1989). Senyawa metabolit sekunder yang diketahui telah memiliki aktivitas sitotoksik terbesar adalah senyawa flavonoid dan fenolik. Senyawa ini memiliki sifat yang umumnya polar, sehingga akan lebih terlarut dalam pelarut polar dan semipolar (Harborne, 1987). Pada pelarut etanol dan etil asetat diharapkan senyawa flavonoid dan fenolik akan terlarut, sehingga menghasilkan aktivitas sitotoksik yang tinggi, sedangkan pada pelarut n-heksana dengan kandungan senyawa flavonoid dan fenolik yang sedikit bahkan hampir tidak ada akan dilihat pengaruhnya terhadap aktivitas sitotoksik dengan parameter nilai  $LC_{50}$  yang dihasilkan. Harapan dari penelitian ini dapat diperoleh data uji sitotoksik yang komprehensif untuk pengembangan penelitian kemopreventif dan terapi kanker. Selanjutnya, akan dilakukan penetapan total flavonoid dan fenolik dari ekstrak kasar etanol akar biduri terkait dengan aktivitasnya sebagai agen sitotoksik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, permasalahan pada penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Berapakah nilai  $LC_{50}$  fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana pada akar tumbuhan biduri?
2. Berapakah total kandungan senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstrak kasar akar tumbuhan biduri?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Menentukan nilai LC<sub>50</sub> fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana pada akar tumbuhan biduri.
2. Menentukan total kandungan senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstrak kasar akar tumbuhan biduri.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai total kandungan metabolit sekunder flavonoid dan total fenolik dari akar biduri. Uji aktivitas sitotoksik merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui efek toksisitas tanaman, sehingga diharapkan penelitian dapat dikembangkan sebagai agen terapi penyakit metabolismik dan degeneratif, serta memberikan informasi ilmiah lainnya mengenai khasiat akar biduri terkait dengan berbagai penelitian yang telah dilakukan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, R. 2004, *Kimia Lingkungan*, ANDI, diakses pada tanggal 30 November 2015, <[https://books.google.co.id/books?id=fzfcAAAAACAAJ&dq=Kimia+Lingkungan&hl=en&sa=X&redir\\_esc=y](https://books.google.co.id/books?id=fzfcAAAAACAAJ&dq=Kimia+Lingkungan&hl=en&sa=X&redir_esc=y)>.
- Ahmed, M.K.K., Rana, A.C. & Dixit, V.K. 2005, Calotropis Species (Asclepiadaceae) – A Comprehensif Review, *Pharmacognosy Magazine*, 1(2): 48-52.
- Adva, M. 2007, Isolasi senyawa flavonoid aktif berkhasiat sitotoksik dari daun kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack.), *Jurnal Gradien*, 3(2): 262-266, dalam Putri A. 2015, Larvacidal activity of kemuning leaf extract (*Murraya paniculata* (L.) Jack.) against dengue hemorrhagic fever vector, *J Majority*, 4(3): 1-8.
- Ainsworth, E.A. & Gillespie, K.M. 2007, Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using *Folin-Ciocalteu* reagent, *Nature protocols*, 2(4): 875-877.
- Ansel, H.C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi Edisi IV*, Universitas Indonesia Press, Jakarta, Indonesia.
- Aprilia, H.A., Pringgenies, D. & Yudiat, E. 2012, Toksisitas ekstrak kloroform cangkang dan duri landak laut (*Diadema setosum*) terhadap mortalitas nauplius *Artemia* sp, *Journal of Marine Research*, 1(1): 75-83.
- Apsari, P.D. & Susanti, H. 2011. Perbandingan kadar fenolik total ekstrak metanol kelopak merah dan ungu bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa*, Linn) secara spektrofotometri, *Prosiding Seminar Nasional "Home Care"*, ISBN: 978-979-18458-4-7, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia.
- Artemia Reference Center. 2007, *Artemia salina - Brine Shrimp - Ses Monkeys*, diakses pada tanggal 11 Desember 2015, <<http://www.aquaculture.ugent.be/coursmat/artbiol/arc.htm>>.
- Beck, W.T., Mo, Y.Y. & Bhat, U.G. 2001, Cytotoxic signalling by inhibitor of DNA topoisomerase II, *Biochemical Society*, 29(6), 702–703, dalam Pebriana, R.B., Wardhani, B.W.K., Widayanti, E., Wijayanti, N.L.S., Riyanto, S. & Meiyanto, E. 2008, Pengaruh ekstrak metanolik daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) terhadap pemacuan apoptosis sel kanker payudara, *Pharmacon*, 9(1): 21-26.
- Bodhi, W., Fatimawali & Oratmangun, S.A. 2014, Uji tokisisitas ekstrak tanaman patah tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) terhadap *Artemia salina* dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) sebagai studi pendahuluan potensi antikanker, *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3(3): 317-324.

- Bonifasius, N.M.H. 2009, Perbandingan uji tukey (uji beda nyata jujur (BNJ) dengan uji fisher (uji beda nyata terkecil (BNT)) dalam uji lanjut data rancangan percobaan, *Majalah Ilmiah Panorama Nusantara*, 7: 11-17.
- Brian, V. 2002, An identification guide to the brine shrimps (crustacea: anostraca: artemiina) of Australia, *Museum Victoria Science Reports*, 16: 1–36.
- Burdall, E.S., Hanby, M.A., Landsdown, R.J.M. & Speirs, V. 2003, Breast cancer cell line, *Breast Cancer Research*. 5(2): 89-95.
- Busvine, J. R. 1971, *A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides* 2nd Ed, The Commonwealth Institute of Entomology, London, UK.
- Campbell, N.A. Reece, J.B. & Mitchell, L.G. 2002. *Biologi* Edisi Kelima Jilid 2, Erlangga, Jakarta, Indonesia.
- Cannell, R. J.P. 1998, How to approach the isolation of a natural product, *Natural Products Isolation*, 4: 1– 51.
- Carballo, J.L.I., Inda, Z.L.H. & Perez. 2002, A Comparison between two brine shrimp passay to detect in vitro cytotoxicity in marine natural product, *BMC Biotechnology*, 2(17): 1-5.
- Chang, C., Yang, H.M., Wen, H.M. & Chern, J.C. 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J. Food Drug Anal*, 10(3): 178-181.
- Chobchuenchum, M.W. & Inthorn, S.D. 2004, Molluscicidal activity of Thai Indigenous plants extracts against *Pomacea canaliculata*, *Asian J of Mic. Bio & Envi. Sc*, 6: 143-149.
- Davis, B.D. & Brodbelt, J.S. 2007, Regioselectivity of human UDP-glucuronosyl-transferase 1A1 in the synthesis of flavonoid glucuronides determined by metal complexation and tandem mass spectrometry, *J of the American Soc for Mass Spect*, 19(2) : 246-256.
- Depamade, S.N. & Rosyidi, A. 2009, Penghambatan proliferasi limfosit mencit Balb/C: peran TGF- $\beta$ , *Media Peternakan*, 32(2): 95-103.
- Departemen Kesehatan RI. 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta, Indonesia.
- Departemen Kesehatan RI. 1995, *Materia Medika Indonesia* Jilid VI, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta, Indonesia.
- Dewick, P.M. 2002, *Medicinal Natural Product : A Byosynthetic Approach*, John Wiley and Sons, Ltd, England, diakses pada tanggal 21 Juli 2016, <<https://books.google.co.id/books?id=SeKMT1u3dugC&printsec=frontcover&>

[dq=Medicinal+Natural+Product+:+A+Byosynthetic+Approach&hl=en&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Medicinal%20Natural%20Product%20%3A%20A%20Byosynthetic%20Approach&f=false>](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3903037/)

Doyle, A. & Griffiths J.B., 2000, *Cell dan Tissue Culture for Medical Research*, John Willey & Sons LTD, England, dalam, Setiawati, A. & Dwiatmaka, Y. 2015, Efek sitotoksik ekstrak dietil eter herba pegagan embun (*Hydrocotyle sibthorpioide Lmk.*) terhadap sel kanker payudara MCF-7, *J. Farmasi Sains dan Komunitas*, 12(1): 1-5.

Dwitiyanti. 2015, Daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) sebagai antikanker payudara, *Pharm Sci Res*, 2(2): 79-88.

Elliot, A.C. & Woodward W.A. 2007, *Statistical analysis quick reference guidebook with SPSS example*, 1st edition, Sage Publications, London, UK.

Emslie, S. 2003, *Artemia salina - Brine Shrimp - Ses Monkeys*, diakses pada tanggal 11 Desember 2015, <[http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artemia\\_salina.html](http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artemia_salina.html)>.

Fessenden & Fessenden. 1986, *Kimia Organik Edisi Ketiga*. Erlangga, Jakarta, Indonesia.

Gandjar, I.G. 2007, *Kimia farmasi analisis*, Pustaka Pelajar, Yoyakarta, Indonesia.

Ganong, W.F. 1995, *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*, EGC, Jakarta, Indonesia.

Gomez, R.C., Langa, E., Murillo, P., Valero, M.S., Berzoa, C. & Lopez, V. 2014, Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil againts L3 larva of *Anisakis simplex*, *BioMed Research Internasional*, 3: 6-11.

Gunawan, C.K., Mulawarmawati, D. & Laihad, F.M. 2014, Sitotoksitas ekstrak daun *Avicennia marina* terhadap sel fibroblas, *Jurnal Kedokteran Gigi Denta*, 8(2), 67-76.

Guntarti, A., Sholehah, K., Irma, N. & Fistianingrum,W. 2015, Penentuan parameter non spesifik ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostan*) pada variasi asal daerah, *Farmasains*, 2(5): 202–207.

Guo, L., Lin, H., Fan B., Cui, X. & Chen, J. 2013, Impact of root water content on root biomass estimation using ground penetrating radar: evidence from forward simulations and field controlled experiments, *Plant and Soil*, 371(1): 503-520.

Habib, M.R. & Karim, M.R. 2009, Antimicrobial and cytotoxic activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate and Anhy-drosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower, *Mycobiology*, 37(1) : 31-36.

- Halliwell, B. 2007, Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health, *J. Cardiovascular Research*, 73: 341-347.
- Harahap, Y. 2007, Uji sitotoksitas sediaan jadi daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) terhadap sel MCF-7 secara *in vitro*. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6(2): 24-31.
- Harborne, J.B. 1987, *Metode Fitokimia edisi II*, ITB Press, Bandung, Indonesia.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A. 2000, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- Harwati, T. 2007, Pengaruh kekurangan air (*water deficit*) terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman tembakau, *Jurnal Inovasi Pertanian*, 6(1): 44-51.
- Hendrajaya, K. & Kesuma, D.K. 2003, Skrining fitokimia limbah rimpang *Acorus Calamus* L, yang telah terdestilasi minyak atsirinya, *Prosiding: Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia*, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta.
- Hossain, S.F., Islam, S., Parvin, S., Shams, T., Kadir, M.F., Islam, S.M.A., et al. 2012, Antimicrobial screening and brine shrimp lethality bioassay of *Calotropis gigantea* (Fam: Asclepiadaceae), *J. Nat. Prod. Plant Resour*, 2(1): 49-59.
- Hudha, M. & Widyaningsih, T. D. 2015, Serbuk effervescent ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* less) sebagai sumber antioksidan alami, *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(4): 1412-1422.
- Indrayani, L., Soetjipto, H. & Sihasale L. 2006, Skrining fitokimia dan uji toksitas ekstrak daun pecut kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, *Berkala Penelitian Hayati*, 12: 57-61.
- Integrated Taxonomic Information System. 2007, *Plants Profile of Calotropis gigantean (L) Ait. f.* diakses pada tanggal 2 Oktober 2015, <<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=CAGI11.htm>>.
- Iriti, M. & Varoni, M.E. 2013, Chemopreventive potential of flavonoids in oral squamous cell carcinoma in human studies. *Nutrients*, 5: 2564-2576.
- Isnawati, A. & Arifin K.M. 2006, Karakterisasi daun kembang sungsang (*Gloria superba* L.) dari aspek fitokimia, *Media Litbang Kesehatan*, 16(4): 8-14.
- Kanadaswarni, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T., et al. 2005, The antitumor activities of flavonoids, *In Vivo*, 19(5): 895-909.

- Kanwar, A.S. 2007, Brine shrimp (*Artemia salina*) a marine animal for simple and rapid biological assays, *Chinese Clinical Med*, **2**(4): 35-42.
- Katyal, P., Bhardwaj, N. & Khajuria, R. 2014, Flavonoid and their therapeutic potential as anti cancer agents: biosynthesis, metabolism and regulation. *WJPPS*, **3**(6): 2188-2216.
- Kerbel, R. & Folkman J. 2001, Clinical translation of angiogenesis inhibitor, *Nature Rev*, **2**: 727-739.
- Khoswanto, C. 2008, Uji sitotoksisitas dentin kondisioner asam sitrat 50% menggunakan MTT assay, *Dental Journal*, **41**: 103–106.
- Kumar, G., Karthik, L. & Rao, K.V. 2011, A review on pharmacological and phytochemical profile of *Calotropis gigantea* Linn., *Pharmacology online*, **1**: 1-8.
- Kumar, D. & Kumar, S. 2015, *Calotropis gigantea* (L.) Dryand – A review update, *IJRPB*, **3**(3) : 218-230.
- Kumar, P., Suresh, E. & Kalavathy, S. 2013, Review on a potential herb *Calotropis gigantea* (L.) R. Br, *Sch. Acad. J. Pharm*, **2**(2):135-143
- Kurnijasanti, R., Hamid, I.S. & Rahmawati, K. 2008, Efek sitotoksik in vitro dari ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap kultur sel kanker mieloma, *J. Penelit. Med. Eksakta*, **7**(1): 48-5.
- Kusumawati R., Tazwir. & Wawanto A. 2008, Pengaruh rendemen dalam asam klorida terhadap kualitas gelatin tulang kakap merah (*Lutjanus sp.*), *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, **3**(1): 63-68.
- Lee, K.I., Kim, Y.J., Lee, H.J. & Lee, C.H. 2003, Cocoa has more phenolic phytochemical and higher antioxidant capacity than theas and red wine, *J. Agric. Food Chem*, **51**: 7292-7295.
- Lhinhatrakool, T. & Sutthivaiyakit, S. 2006, 19- Nor - and 18,20-Epoxy-cardenolides from the Leaves of *Calotropis gigantean*, *J. Natural Product*, **69** (8), 1249 -1251.
- Markham, K.R. 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, ITB, diakses pada tanggal 21 November 2015, [https://books.google.co.id/books?id=chjwAAAAMAAJ&q=Cara+Mengidentifikasi+Flavonoid&dq=Cara+Mengidentifikasi+Flavonoid&hl=en&sa=X&redir\\_esc=y](https://books.google.co.id/books?id=chjwAAAAMAAJ&q=Cara+Mengidentifikasi+Flavonoid&dq=Cara+Mengidentifikasi+Flavonoid&hl=en&sa=X&redir_esc=y).
- Meiyanto, E.S., Susidarti, S.A., Handayani, S. & Rahmi, F. 2008, Ekstrak etanolik biji buah pinang (Areca catechu L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7, *Majalah Farmasi Indonesia*, **19**(1): 12-19.

- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. & McLaughlin, J.L. 1982, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Med*, **45**(5): 31-4.
- Mohadi, R., Fitrialiana & Lesbani, A. 2015, Conversion of cyclohexanone to adipic acid catalyzed by heteropoly compounds, *Indones. J. Chem*, **15**(1): 64-69.
- Middleton, E., Kandaswami, C. & Theoharidis, T.C. 2000, The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for inflammations, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, **52**: 673-751 cit. Kanadasmawi *et al.* 2005, The antitumor activities of flavonoids, *review in vivo*, **19**: 895-910.
- Millipore, M. 2014, *Chrome book the world of chromatography in your hands*, Merck KGaA, Darmstadt, Germany.
- Mudjiman, A. 1989, *Udang Renik Air Asin (Artemia salina)*, Bhatara Karya Aksara, Jakarta, Indonesia cit Sulistyowati, E.B., Widiani, T. & Soni, A.F.M. 2006, Peningkatan kuantitas dan kualitas kista artemia setelah pemberian silase ikan, *Bioteknologi*, **3**(2): 35-41.
- Murtijaya, J. & Lim Y.Y. 2007, Antioxidant properties of *Phylanthus amarus* extracts as affected by different drying methods, *LWT-Food Sci. Technol.*, **40**: 1664-1669.
- Naczk, M. & Shahidi, F. 2004, Extraction and analysis of phenolic in food, *J of Chromatography A*, **1054**: 95-111.
- Nurdiana, R. & Tukiran. 2012, Pemanfaatan ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan nyiri batu (*Xylocarpus moluccensis* (Lamk) M. Roem.) (Meliaceae) sebagai bioinsektisida, *Journal of Chemistry*, **1**(2): 66-68.
- Nurhayati, A.P.D.N., Asdulgani & Febriyanto. R. 2006, Uji toksisitas ekstrak *Echeuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai studi pendahuluan potensi antikanker, *Akta Kimindo*, **2**(1): 41-46.
- Nuryono & Narsito. 2005, Pengaruh konsentrasi asam terhadap karakter silika gel hasil sintesis dari natrium silikat, *Indo. J. Chem*, **5**(1): 23-30.
- Nuswantari, D. 1998, *Kamus Saku Kedokteran Dorland* Edisi 25, EGC, Jakarta, Indonesia.
- Olowa, F.L. & Nuneza, O.M. 2013, *Brine shrimp lethality assay of the ethanolic extracts of three selected species of medicinal plants from Iligan City, Philippines*, *Int. Res. J. Biological Sci*, **2**(11): 74-77.
- Palmer, M. 2007, *Biochemical Pharmacology Lecture Notes*, Department of Chemistry, University of Waterloo, Canada.

- Pan, M., Chen, W., Lin-Shiau, S., Ho, C. & Lin, J. 2002, Tangeretin induces cell cycle G1 arrest through inhibiting cyclin dependent kinase 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells, *Carcinogenesis*, 23(10): 1677-1684.
- Patel, H.V., Patel, J.D. & Patel, B. 2014, Comparative efficacy of phytochemical analysis and antioxidant activity of methanolic extract of *Calotropis gigantea* and *Calotropis procera*, *Int J of Bio & Pharm Res*, 5(2): 107-113.
- Pelczar & Chan. 1988, *Dasar – Dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia Press, Jakarta, Indonesia.
- Pelletier, S.W., Chokshi, H.P. & Desao H.K. 1986, Separation of Diterpenoid, Alkaloid Mixtures using Vacuum Liquid Chromatograph, *J. Nat. Prod.*, 49(5): 892-900.
- Pervin, R., Afrin, S., Sabrin, F., Zohora, U.S., Rahman, M.S., Islam, K.D. & Billah, M. 2016, Antioxidant, antibacterial and brine shrimp lethality bioassay of *Amoora cucullata*, a Mangrove Plant, *J Young Pharm*, 8(1): 33-38.
- Perwiratami, C., Suzery, M. & Cahyono, B. 2014, Korelasi fenolat total dan flavonoid total dengan antioksidan dari beberapa sediaan ekstrak buah tanjung (*Mimusops elengi*), *Chem. Prog.*, 7(1): 35-39.
- Poon, H.F., Calabrese, V. & Butterfield, D.A. 2004, Free radicals and brain aging, *Clinical Geriatric Medical*, (20): 329-359.
- Pratap, B., Kumar, R., Tiwari, D., Yadav, S. & Singh, S. 2010, Evaluation of antidiarrheal property of the hydroalcoholic extract of roots of *Calotropis gigantea* R.BR. on castor-induced diarrhea in rats, *Scholars Research Library*, 3: 309-314.
- Rafsanjani, M.K. & Putri, W.D.R. 2015, Karakterisasi ekstrak kulit jeruk bali menggunakan metode *ultrasonic bath* (kajian perbedaan pelarut dan lama ekstraksi), *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(4): 1473-1480.
- Ratnani, R.D., Hartati, I., Anas, Y., Endah, D.P. & Khilyati, D.D. 2015, Standarisasi spesifik dan non spesifik ekstraksi hidrotofi andrographolid dari sambiloto (*Andrographis paniculata*), *Prosiding Seminar Nasional Peluang Herbal Sebagai Alternatif Medicine*, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.
- Rohman, A., Riyanto, S. & Utari, D. 2006, Aktivitas antioksidan, kandungan fenolik total dan kandungan flavonoid total ekstrak etil asetat buah mengkudu serta fraksi-fraksinya, *Jurnal MFI*, 17(3): 136-142.
- Reichardt, C. 2003, *Solvents and solvent effects in organic chemistry* 3rd ed, Wiley-VCH Publishers, Germany.

- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. & Zhang, L. 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Med Research Reviews*, 23(4):519-534.
- Rivai, H., Septika, R. & Boestari, A. 2013, Karakterisasi herba meniran (*Phyllnthus niruri* Linn.) dengan analisa fluoresensi, *Jurnal Farmsi Higea*, 5(2): 15-2.
- Saifudin A., Rahayu & Teruna. 2011, *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Graha Ilmu, Yogyakarta, Indonesia.
- Sangi, M.S., Momuat, L.I. & Kumaunang, M. 2012, Uji toksisitas dan skrining fitokimia tepung gabah pelepas aren (*Arenga pinnata*), *J. Ilmiah S*, 12: 128-134.
- Sarkar, S., Chakraverty, R. & Ghosh, A. 2014, *Calotropis gigantea* Linn. - a complete basket of indian traditional medicine, *Int. J. Pharm. Res. Sci*, 02(1): 7-17.
- Sawyer, S.F. 2008, Analysis of variance: the fundamental concepts, *J. of Manual & Manipulative Therapy*, 17(2): 27-38.
- Schmitz, G., Leppe, H. & Heidrich, M. 2001, *Farmakologi dan Toksikologi*, Edisi ke 3, Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia.
- Sevita, V., Suhanda, H. & Zackiyah. 2013, Pengembangan metode penentuan kadar natrium benzoat secara spektrofotometri UV dalam jamur kancing kemasan plastik, *J. Si. Tek. Kim*, 4(2): 174-183.
- Sheelaa, B., Hussain,S.M., Kumar, P.S., Kalaichelvam, V.K. & Venkatachalam, V.K. 2010, Vasodilatation effect of latex from *Calotropis gigantea* in green frog *Rana hexadactyla*, *Asian J of Med Sci*, 2(1): 22-24.
- Shur, M.S. & Zuskauskas, A. 2003, *UV Solid-State Light Emitters and Detectors*, Kluwer Academic Publishers, Nedherlands.
- Sieuwerts, A.M., Kliin, J.G., Peters, H.A. & Foekens, J.A. 2005. The MTT tertazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC<sub>50</sub>-values and cell survival. *Eur J Clin ChemBiochem*, 33: 813-823.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. 1965, *Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent*, *Amer. J. Enol. Viticult*, 16: 144-158.

- Solis, P.N., Wright, C.W, Anderson, M.M., Gupta, M.F. & Philipson, J.D. 1993, A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp), *Planta Medica*; **59**:250-252.
- Sorgeloos, P. 2006, *Life History of The Brine Shrimp Artemia*, Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center and Academic Computing Center - Ghent University, Belgium.
- Srivastava, S., Singh, A.P. & Rawat, A.K.S. 2015, Comparative botanical and phytochemical evaluation of *Calotropis procera* Linn. and *Calotropis gigantea* Linn. Root, *J of App Pharm Sci*, **5(07)**: 041-047.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. & Suhardi. 1989, *Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Liberty, Yogyakarta, Indonesia.
- Suirta, I.W., Puspawati, N.M. & Gumiaty, N.K. 2007, Isolasi dan identifikasi senyawa aktif larvasida dari biji mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap larva nyamuk demam Berdarah (*Aedes aegypti*), *Jurnal Kimia*, **1(1)**: 47-54.
- Sukardiman., Abdul, R. & Fatma, P.N. 2004, Uji praskrining aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia planiloba* Steph. dengan metode uji kematian larva udang dan profil densitometri ekstrak aktif, *Majalah Farmasi Airlangga*, **4(3)**: 97 –100.
- Susanty, E. 2014, Skrining fitokimia ekstrak etanol daun gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd), *Pharmacy*, **11(1)**: 98-107.
- Tawaha, K.A. 2006, Cytotoxicity evaluation of Jordanian wild plants using brine shrimp lethality test, *J. J. Appl. Sci*, **8(1)**: 12-17.
- Tzong, S.C. & Jiann, C.C. 1987, Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *penaeus monodon*, *Aqua Culture*, **66**: 247-253.
- Vogel, A.I., Tatchell, A.R., Furnis, B.S., Hannaford, A.J. & Smith, P.W.G. 1996, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry* 5th Edition, Prentice Hall, England.
- Voight, R. 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Ekstraksi*, Diterjemahkann oleh Soewandhi, S. N. Edisi 5, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, Indonesia.