

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN RAMANIA (*Bouea macrophylla* Griffith) TERHADAP MORTALITAS LARVA *Artemia salina* Leach

Gusti Rifda Aqiila¹, Irham Taufiqurrahman¹, Erida Wydiamala²
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin

ABSTRACT

Background: *Ramania* is a typical local plant of Borneo. *Ramania* leaves contain secondary metabolic compounds i.e. flavonoid, saponin and triterpenoid which expected to be one of the alternatives for cancer treatment. **Purpose:** To analyzing the effectiveness of ethanol extract of *ramania* leaves against *Artemia salina* Leach larvae's mortality using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). **Methods:** A true experimental research with post test only with control group design, using 8 treatment groups obtained by a preliminary test. Eight groups consisting of 7 extract concentrations i.e 156,25; 312,5; 625; 1250; 2500; 5000 dan 10000 mg/L and 1 control negative. **Results:** LC_{50} value by probit analysis test is 408,950 mg/L. The p-value of Kruskal-Wallis test is 0,000, there is a significant effect of ethanol extract of *ramania* leaves against *Artemia salina* Leach larvae's mortality. The p-value of Mann-Whitney test is 0,021, there is a significant difference between negative control with all treatment groups. **Conclusion:** Ethanol extract of *ramania* leaves has effectiveness against *Artemia salina* Leach larvae's mortality using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) with LC_{50} values of 408.950 mg/L.

Keywords: The effectiveness test, *Ramania*, *Artemia salina* Leach, LC_{50} , BSLT

ABSTRAK

Latar Belakang: Tanaman *ramania* merupakan tanaman lokal khas Kalimantan. Daun *ramania* mengandung senyawa metabolik sekunder yaitu flavonoid, saponin dan triterpenoid yang diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif untuk pengobatan kanker. **Tujuan:** Untuk menganalisis efektivitas ekstrak etanol daun *ramania* terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). **Metode:** Penelitian eksperimental murni dengan post test only with control group design, menggunakan 8 kelompok perlakuan yang diperoleh dari uji pendahuluan. Delapan kelompok terdiri dari 7 konsentrasi ekstrak, yaitu 156,25; 312,5; 625; 1250; 2500; 5000 dan 10000 mg/L serta 1 kontrol negatif (0 mg/L) dengan tiap kelompok diberi 10 ekor larva dengan 4 kali replikasi. **Hasil:** Uji probit didapatkan nilai LC_{50} sebesar 408,950 mg/L. Uji Kruskal-Wallis diperoleh nilai $p=0,000$, terdapat pengaruh ekstrak etanol daun *ramania* terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach. Hasil uji Mann-Whitney diperoleh nilai $p=0,021$, terdapat perbedaan signifikan antara kontrol negatif dengan semua kelompok perlakuan. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol daun *ramania* memiliki efektivitas terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach dengan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dengan nilai LC_{50} sebesar 408,950 mg/L.

Kata-kata kunci: Uji efektivitas, *Ramania*, *Artemia salina* Leach, LC_{50} , BSLT

Korespondensi: Gusti Rifda Aqiila, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat, Jalan veteran No 128 B, Banjarmasin, Kal Sel, email: rifdaaqiila@gmail.com

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sekitar 30.000 spesies tanaman yang 940 spesies diantaranya dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Pemanfaatan tanaman obat untuk pengobatan tradisional telah banyak digunakan oleh masyarakat, hal ini dikarenakan tanaman obat memiliki beberapa keuntungan, salah satunya yaitu memiliki efek samping lebih rendah dibandingkan dengan obat yang terbuat dari bahan sintetik. Tanaman obat juga mengandung senyawa aktif seperti triterpenoid,

tanin, alkaloid dan flavonoid yang bermanfaat bagi kesehatan.^{1,2,3}

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolik sekunder yang hampir terdapat pada seluruh bagian tanaman termasuk buah, akar, daun dan kulit luar batang. Manfaat flavonoid antara lain melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, mencegah keropos tulang, memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antibiotik, antivirus, antialergi dan antikanker.^{4,5}

Tanaman *ramania* (*Bouea macrophylla* Griffith) yang dikenal sebagai tanaman gandaria.⁶ Selama

ini, pemanfaatan bagian tanaman ramania berupa daun ramania masih terbatas yaitu hanya dikonsumsi untuk lalap makanan. Diperlukan penelitian mengenai kandungan senyawa metabolik sekunder daun ramania untuk mengetahui manfaat lain dari daun ramania. Berdasarkan hasil penelitian perbandingan kandungan total flavonoid ekstrak daun ramania (*Bouea macrophylla* Griffith) antara pelarut etanol dengan pelarut metanol menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ramania mengandung senyawa metabolik sekunder berupa flavonoid yang diharapkan dapat diuji aktivitasnya sebagai antikanker.^{7,8,9,10,11}

Kanker menjadi masalah utama kesehatan di seluruh dunia dan penyakit pembunuh terbesar kedua setelah kardiovaskuler. Provinsi Kalimantan Selatan termasuk peringkat ke-12 pada prevalensi penderita kanker di Indonesia yaitu mencapai 1,6% serta termasuk peringkat ke-11 pada jumlah kaskanker rongga mulut dan tenggorokan di Indonesia. Ditemukan prevalensi kanker rongga mulut dan tenggorokan di Indonesia mencapai 0,2%. Pengobatan konvensional kanker dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi yang umum dilakukan sering menimbulkan efek samping, oleh karena itu diperlukan penemuan obat alternatif dari tanaman yang efektif dan aman baik untuk mencegah maupun menyembuhkan kanker. *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan penggunaan obat tradisional termasuk herbal dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit, terutama untuk penyakit kronis, degeneratif dan kanker.^{1,3,9,12,13}

Sebagai uji pendahuluan senyawa antikanker terhadap ekstrak tanaman, metode yang dapat digunakan adalah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT merupakan uji pendahuluan yang sederhana untuk menentukan tingkat toksisitas akut suatu senyawa atau ekstrak dengan menggunakan *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. *Artemia salina* Leach pada tahap *nauplii* atau tahap larva sering dimanfaatkan sebagai hewan uji aktivitas biologi terhadap ekstrak tanaman, hal ini dikarenakan *Artemia salina* Leach pada tahap *nauplii* sangat mirip dengan sel kanker manusia.^{14,15,16} Menurut Bagshaw (1976) dalam Elhardalao (2011), *DNA-dependent RNA polymerase* pada *Artemia salina* Leach mirip dengan *DNA-dependent RNA polymerase* pada mamalia. Struktur *Ribonucleic Acid* (RNA) *polymerase* II pada *Artemia salina* mirip dengan RNA *polymerase* II sel HeLa yang merupakan sel kanker turunan dari sel epitel leher rahim manusia dan paling banyak digunakan dalam penelitian selular manusia dan biologi molekuler. Secara histologi sel HeLa memiliki kemiripan dengan sel skuamosa karsinoma rongga mulut karena memiliki bentuk jaringan epitelium yang sama yaitu

epitelium skuamosa. Hal ini dapat berkaitan dengan turunan sel skuamosa karsinoma rongga mulut yaitu sel KB yang juga berasal dari sel HeLa.^{17,18,19}

Parameter yang akan diamati dalam penelitian ini adalah mortalitas larva *Artemia salina* Leach dan nilai *Lethal Concentration 50* (LC_{50}). LC_{50} adalah suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50%. Menurut Meyer *et al* (1982) dalam Sumihe dkk (2014), nilai LC_{50} kurang dari atau sama dengan 30 mg/L adalah sangat toksik, LC_{50} kurang dari atau sama dengan 1000 mg/L adalah tidak toksik. Tingkat toksisitas tersebut menyatakan adanya potensi antikanker pada suatu ekstrak tanaman.^{14,20,21} Tujuan dalam penelitian ini adalah untuk menganalisis efektivitas konsentrasi ekstrak etanol daun ramania terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air laut buatan, akuades, serbuk kering daun ramania, pelarut etanol 70% dan telur *Artemia salina* Leach. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *aerator*, *blender*, *rotary evaporator*, *waterbath*, batang pengaduk, kain hitam, lakban hitam, tabung ukur 10 mL, gelas ukur 250 mL, gelas, pipet tetes, neraca analitik, wadah plastik untuk penetasan telur *Artemia salina* Leach dengan 2 tipe ruang yaitu ruang terang dan gelap, *sterofoam*, lampu pijar, wadah plastik maserasi, *vial* ukuran 15 mL, sendok plastik berwarna putih, batu aerasi berukuran kecil, refraktrometer dan pH meter.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan rancangan *post test only with control group design*. Penelitian ini menggunakan 8 kelompok dengan 7 kelompok yang diberi perlakuan dan 1 kelompok kontrol negatif yang terdiri dari perlakuan 1 diberikan konsentrasi 156,25 mg/L, perlakuan 2 diberikan konsentrasi 312,5 mg/L, perlakuan 3 diberikan konsentrasi 625 mg/L, perlakuan 4 diberikan konsentrasi 1250 mg/L, perlakuan 5 diberikan konsentrasi 2500 mg/L, perlakuan 6 diberikan konsentrasi 5000 mg/L, perlakuan 7 diberikan konsentrasi 10000 mg/L dan kontrol negatif tidak diberikan konsentrasi (0 mg/L).

Jumlah minimal pengulangan untuk setiap perlakuan adalah tiga kali untuk setiap konsentrasi. Untuk mendapatkan keakuratan data maka digunakan 4 kali replikasi untuk setiap konsentrasi sehingga didapatkan 32 sampel. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat dengan waktu penelitian mulai bulan Agustus – Oktober 2016.

Proses Ekstraksi

Berat simplisia diperoleh dengan 1 kg daun ramania selama 3 hari yang dikeringkan, kemudian daun tersebut dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan *blender*. Simplisia kering daun dimasukkan ke dalam wadah plastik maserasi. Kemudian direndam dengan 5 liter pelarut etanol 70%. Maserasi dilakukan selama 3 hari dan terlindung dari cahaya matahari. Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan dan diambil filtratnya kemudian filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental daun ramania. Ekstrak diuapkan kembali di *water bath*.

Pemilihan Telur *Artemia salina* Leach

Pemilihan telur *Artemia salina* Leach dengan telur dalam akuades direndam selama satu jam. Telur yang baik akan mengendap sedangkan telur yang kurang baik akan mengapung.¹

Pembuatan Air Laut Buatan

Pembuatan air laut buatan dengan mencampurkan 1 liter air dengan garam ikan tidak beryodium seberat 35 gram agar mendapatkan tingkat salinitas 35‰ sebagai media penetasan telur *Artemia salina* Leach.²²

Penetasan Larva *Artemia salina* Leach

Penetasan telur *Artemia salina* Leach dilakukan dengan cara merendam 1 gram telur *Artemia salina* Leach dalam wadah yang terbagi menjadi dua ruangan yaitu ruang terang dan ruang gelap yang berisi 1 liter air laut buatan. Ruang terang disinari lampu pijar dan dilengkapi dengan aerator sedangkan ruang gelap ditutupi oleh kain hitam dan lakban hitam. Setelah 24 jam, telur *Artemia salina* Leach menetas menjadi larva. Penambahan larutan ragi 0,06% setelah larva berumur 24 jam untuk setiap 1 liter air laut buatan pada wadah penetasan untuk menghindari kematian larva setelah 24 jam.

Pembuatan Konsentrasi Ekstrak yang akan Diuji

Besar konsentrasi ekstrak etanol daun ramania yang digunakan dalam penelitian ditentukan setelah melakukan uji pendahuluan terlebih dahulu. Dari uji pendahuluan dengan konsentrasi 0,001% (10 mg/L); 0,01% (100 mg/L); 0,1% (1000 mg/L) dan 1% (10000 mg/L) didapatkan serial konsentrasi uji lanjutan sebagai berikut 156,25 mg/L, 312,5 mg/L, 625 mg/L, 1250 mg/L, 2500 mg/L, 5000 mg/L dan 10000 mg/L. Ekstrak kental daun ramania ditimbang hingga mencapai 0,0156 gram; 0,0312 gram; 0,0625 gram; 0,125 gram; 0,25 gram; 0,5 gram dan 1 gram. Konsentrasi ekstrak etanol daun ramania dibuat dengan melarutkan setiap 0,0156 gram; 0,0312 gram; 0,0625 gram; 0,125 gram; 0,25 gram; 0,5 gram dan 1 gram ekstrak kental daun

ramania dengan akuades 100 mL sampai larutan uji homogen dan kontrol negatif tidak diberikan ekstrak etanol daun ramania, hanya berisi sekian 100 mL air laut buatan sehingga dianggap memiliki konsentrasi 0 mg/L.

Pengujian Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Ramania dengan Metode BSLT

Uji pendahuluan dilakukan dengan memasukkan 9 mL air laut buatan terlebih dahulu ke dalam masing-masing *vial* untuk kelompok perlakuan dan 10 mL air laut buatan untuk kelompok kontrol negatif. Ditambahkan sebanyak 1 mL konsentrasi ekstrak etanol daun ramania 10 mg/L, 100 mg/L, 1000 mg/L dan 10000 mg/L ke dalam masing-masing *vial* untuk kelompok perlakuan. Ke dalam tiap-tiap larutan konsentrasi bahan uji sebanyak 10 mL tersebut dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach yang sebelumnya telah dipersiapkan, pemaparan dilakukan selama 24 jam dengan 2 kali replikasi.

Uji lanjutan dilakukan dengan menyiapkan 32 *vial* 15 mL bahan uji yang terdiri dari 8 serial konsentrasi ekstrak etanol daun ramania yaitu 0 mg/L, 156,25 mg/L, 312,5 mg/L, 625 mg/L, P4 1250 mg/L, 2500 mg/L, 5000 mg/L dan 10000 mg/L dengan 4 replikasi. Setiap *vial* yang mengandung sampai 9 mL air laut buatan dan 1 mL konsentrasi ekstrak etanol daun ramania, dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach dengan masa pemaparan selama 24 jam. Sebuah *vial* yang berisi 10 mL air laut buatan dan 10 larva *Artemia salina* Leach tanpa penambahan konsentrasi ekstrak disiapkan sebagai kontrol negatif.

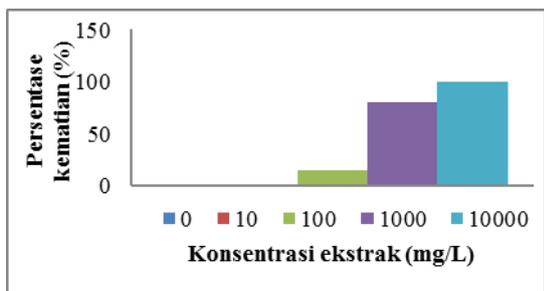
HASIL PENELITIAN

Hasil Ekstraksi Daun Ramania

Serbuk simplisia daun ramania didapatkan seberat 600 g dan ekstrak kental daun ramania seberat 22,32 g.

Hasil Uji *Brine Shrimp Lethality Test*

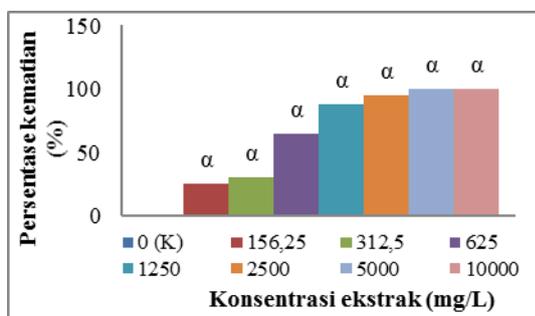
Pengujian efektivitas ekstrak etanol daun ramania terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach ini menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang diawali dengan dilakukan uji pendahuluan untuk memperoleh kisaran konsentrasi bahan uji yang mampu membunuh larva uji 10 - 90%.²³ Kisaran konsentrasi yang digunakan pada uji pendahuluan adalah 0 mg/L; 100 mg/L; 1000 mg/L dan 10000 mg/L.



Gambar 5.1 Jumlah rata-rata kematian larva *Artemia salina* Leach pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun ramania setelah 24 jam pada uji pendahuluan

Gambar 5.1 menunjukkan hasil uji pendahuluan dengan kisaran konsentrasi 0 mg/L; 100 mg/L; 1000 mg/L dan 10000 mg/L terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach. Hasil menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0 mg/L (kontrol negatif) tidak ditemukan adanya kematian larva. Rerata persentase kematian larva pada gambar 5.1 menunjukkan bahwa konsentrasi 100 mg/L sampai konsentrasi 10000 mg/L telah membunuh larva uji 10 - 90%.

Berdasarkan hasil uji pendahuluan tersebut didapatkan 8 serial konsentrasi bahan uji untuk uji lanjutan yang terdiri dari 7 konsentrasi untuk kelompok perlakuan, yaitu konsentrasi 0 mg/L; 156,25 mg/L; 312,5 mg/L; 625 mg/L; 1250 mg/L; 2500 mg/L; 5000 mg/L dan 10000 mg/L dan 1 kelompok kontrol negatif yaitu konsentrasi 0 mg/L yang hanya terdiri dari air laut buatan dan larva *Artemia salina* Leach tanpa penambahan ekstrak etanol daun ramania. Kontrol negatif digunakan untuk menguji jika terdapat pengaruh lain selain ekstrak uji yang menyebabkan mortalitas larva *Artemia salina* Leach seperti kondisi air laut buatan. Uji lanjutan ini dilakukan dengan 4 kali replikasi (n1, n2, n3 dan n4) pada tiap kelompok untuk memperoleh data yang akurat.



Gambar 5.2 Efektivitas ekstrak etanol daun ramania terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach setelah pemaparan selama 24 jam pada uji lanjutan. Data disajikan rerata. Data diikuti dengan hasil uji *Mann-Whitney* (α jika nilai $<0,05$ terhadap kontrol negatif)

Gambar 5.2 menunjukkan hasil uji lanjutan mengenai efektivitas ekstrak etanol daun ramania (*Bouea macrophylla* Griffith) terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach setelah pemaparan selama 24 jam. Pada konsentrasi 0 mg/L (kontrol negatif) tidak terdapat adanya kematian pada larva. Dari grafik tersebut terjadi peningkatan angka kematian larva seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak. Hasil rerata persentase kematian larva telah sesuai dengan teori, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula jumlah kematian larva yang menunjukkan semakin tinggi sifat toksik ekstrak tersebut.¹

Besar nilai *Lethal Concentration 50* (LC_{50}) dari ekstrak etanol daun ramania terhadap mortalitas *Artemia salina* Leach dalam penelitian ini didapatkan dengan menggunakan metode analisis probit pada program SPSS 23.0 for Windows. Efek ekstrak etanol daun ramania terhadap larva *Artemia salina* Leach dipertimbangkan atas dasar besarnya LC_{50} dengan *Confidence Limit* (CL) 95%. Dari hasil analisis probit menunjukkan bahwa besar nilai LC_{50} ekstrak etanol daun ramania terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach adalah 408,950 mg/L sehingga nilai LC_{50} ekstrak etanol daun ramania adalah toksik. Hasil ini sudah sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa jika LC_{50} suatu ekstrak daun kurang dari atau sama dengan 1000 mg/L maka ekstrak daun tersebut termasuk toksik.¹⁴

Uji statistik *One Way Anova* digunakan dalam penelitian ini dengan tingkat kepercayaan 95%. Dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dengan jumlah sampel 32 untuk mengetahui kebermaknaan perbandingan antara masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun ramania terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach.

Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai p pada kontrol negatif adalah 0,972 ($p>0,05$), konsentrasi 156,25 mg/L adalah 0,195 ($p>0,05$), konsentrasi 312,5 mg/L adalah 0,162 ($p>0,05$), konsentrasi 625 mg/L adalah 0,195 ($p>0,05$), konsentrasi 1250 mg/L adalah 0,225 ($p>0,05$), konsentrasi 2500 mg/L adalah 0,024 ($p<0,05$), konsentrasi 5000 dan 10000 mg/L adalah 0,972 ($p>0,05$). Berdasarkan hasil uji normalitas tersebut hanya konsentrasi 2500 mg/L yang berdistribusi tidak normal ($p<0,05$) sedangkan data variabel lainnya berdistribusi normal ($p>0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa secara keseluruhan data tersebut tidak berdistribusi normal. Pada hasil uji homogenitas menggunakan *Levene's Test* didapatkan nilai $p = 0,003$ ($p<0,05$) sehingga data bersifat tidak homogen.

Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data berdistribusi tidak normal dan tidak homogen sehingga tidak memenuhi persyaratan uji statistik *One Way Anova*. Dari hasil uji statistik *Kruskall-Wallis* diperoleh

nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat adanya perbedaan bermakna antara masing-masing konsentrasi terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach. Dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach.

Hasil uji *Mann-Whitney* pada gambar 5.2 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol negatif (K) dengan kelompok perlakuan dengan konsentrasi 156,25 mg/L, 312,5 mg/L, 625mg/L, 1250mg/L, 2500mg/L, 5000mg/L, 10000mg/L dengan nilai $p = 0,021$ ($p < 0,05$). Hasil ini menyebabkan kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan memiliki perbedaan efektivitas konsentrasi yang bermakna, sehingga dapat dibuktikan bahwa terdapat efektivitas konsentrasi ekstrak etanol daun *ramania* terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach. Ruangan yang digunakan sebagai tempat penetasan telur dan pemeliharaan larva kelompok perlakuan dan kelompok negatif merupakan tempat yang sama dan dengan kondisi air yang sama. Kelompok kontrol negatif tidak ditemukan adanya kematian larva, sehingga kematian larva *Artemia salina* Leach dalam penelitian ini hanya disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol daun *ramania*.

PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, peneliti menggunakan *Artemia salina* Leach dalam metode BSLT pada tahap larva (*nauplii*) usia 48 jam. Hal ini dikarenakan pada usia tersebut merupakan usia yang paling sensitif untuk melakukan suatu uji dan berdasarkan morfologinya, larva *Artemia salina* Leach yang berusia 48 jam sudah mulai mempunyai mulut dan saluran pencernaan untuk mengonsumsi partikel tertentu. Cadangan makanan berupa kuning telur (*yolk*) yang dikandungnya sudah mulai habis, berbeda dengan larva *Artemia salina* Leach berusia 24 jam meskipun sudah memiliki saluran pencernaan tetapi masih tidak mampu berkontak dengan lingkungannya, sehingga ekstrak atau senyawa luar tidak dapat diabsorpsi oleh larva.^{14,24,25}

Larva *Artemia salina* Leach sangat mirip dengan sel kanker manusia. Hal ini didukung dalam penelitian yang menunjukkan bahwa struktur subunit *Ribonucleid Acid (RNA) polymerase II* pada *Artemia salina* Leach salah satunya mirip dengan *RNA polymerase II* sel HeLa. Sel HeLa merupakan salah satu sel kanker turunan dari sel epitel leher rahim manusia dan paling banyak digunakan dalam penelitian selular manusia dan biologi molekuler. Perbedaan utama antara enzim *Artemia* dengan yang sel HeLa hanya terletak pada ukuran dan jumlah subunit kecil, namun strukturnya sangat mirip.^{1,14,15,16,17} Suatu penelitian

menunjukkan bahwa secara histologi, sel HeLa dengan sel skuamosa karsinoma rongga mulut memiliki bentuk jaringan epitelium yang sama yaitu epitelium skuamosa. Hal ini didukung oleh suatu penelitian mengenai hubungan klinis pada turunan sel kanker yang menunjukkan bahwa sel KB merupakan salah satu turunan sel skuamosa karsinoma rongga mulut berasal dari sel HeLa yang banyak digunakan dalam penelitian obat antikanker.^{18,19}

Kematian larva *Artemia salina* Leach pada saat dilakukan uji dengan metode BSLT disebabkan karena kandungan metabolit sekunder yang dimiliki oleh daun *ramania*, salah satunya flavonoid. Senyawa flavonoid mempunyai kemampuan sebagai *stomach poisoning* atau racun perut sehingga dapat menghambat daya makan larva. Ketika senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva maka akan mengakibatkan larva tidak mampu memperoleh stimulus rasa, sehingga tidak mampu mengenali makanannya yang pada akhirnya mengakibatkan kematian pada larva dikarenakan larva dalam kondisi kelaparan.^{8,24}

Peran antikanker ekstrak etanol daun *ramania* dapat berkaitan dengan kandungan kimia ekstrak daun *ramania* yaitu antosianin. Bioaktif ini merupakan salah satu kelompok flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan dengan menangkap oksigen reaktif seperti superoksida (O_2^-), oksigen singlet (O_2), peroksida (ROO^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan hidroksil radikal (OH). Antosianin juga memiliki peran sebagai antikarsinogenesis seperti menangkap oksigen reaktif secara langsung, mengurangi pembentukan oksidatif dalam DNA, mengurangi peroksidasi lipid, menghambat terjadinya mutagenesis yang disebabkan oleh toksin lingkungan dan karsinogen, mengurangi proliferasi selular dengan mengganggu tahap siklus sel protein regulator seperti p53, p21, p27 dan sebagainya. Hal ini menyebabkan apoptosis sel kanker dan sebagai antiinflamasi dengan menghambat dua protein peradangan yaitu *nuclear factor-kappa B (NF- κ B)* and *cyclooxygenase-2 (COX-2)* yang sering muncul pada kanker, antiangiogenesis dengan mengurangi *vascular endothelial growth factor (VEGF)* dengan *VEGF receptors* pada sel endothelial yang memberikan peran dalam perkembangan kanker dan antiinvasif dengan mencegah terjadinya perubahan aktivitas *MMPs* terhadap sel kanker.²⁶

Peran antosianin dalam menyebabkan apoptosis pada sel kanker didukung oleh penelitian mengenai karakteristik antosianin sebagai bioaktivitas antikanker pada tanaman *Perilla frutescens* var. *Acuta*. Tanaman tersebut mampu menyebabkan apoptosis pada sel HeLa. Peran antosianin dalam mengurangi proliferasi sel kanker juga didukung dalam penelitian mengenai aktivitas antosianin dalam ekstrak bluberri sebagai antiproliferatif dan apoptosis terhadap metastasis sel murine melanoma

yang menunjukkan bahwa kandungan antosianin dalam bluberri mampu mengurani proliferasi dan apoptosis sel kanker yang berupa sel murine melanoma.^{27,28}

Faktor yang perlu diperhatikan dalam mencapai penetasan telur dan pertumbuhan larva *Artemia salina* Leach adalah pH, suhu ruangan dan salinitas air yang digunakan dalam penelitian. Pengaturan pH pada air laut buatan yang digunakan dalam penelitian dikendalikan dengan mengukur air laut buatan tersebut dengan menggunakan pH meter di laboratorium kualitas air dan hidro-bioekologi Fakultas Perikanan Universitas Lambung Mangkurat yang didapatkan pH sebesar 8,14. Hal ini menyebabkan enzim-enzim penetasan *Artemia salina* Leach bekerja secara optimal, dimana enzim tersebut akan berkerja secara optimal pada kondisi pH 8 - 9.²⁹ Suhu air laut buatan dalam penelitian ini adalah 27,4 °C. Suhu hangat mampu mempercepat penetasan telur terutama pada suhu air laut dengan kisaran 25 - 28°C yang merupakan suhu optimal dalam penetasan. Suhu air laut di bawah 25°C menyebabkan telur menetas lebih lambat.²⁹

Pada saat melakukan penelitian, pengaturan suhu air laut buatan dikendalikan dengan menggunakan lampu pijar yang diletakkan di dekat wadah tempat penetasan larva. Salinitas air laut buatan yang digunakan dalam penelitian ini mencapai 30%. Menurut Bahari *et al* (2014), apabila kadar garam kurang dari 35% telur *Artemia* akan tenggelam karena nilai salinitas tidak sesuai dengan penetasan telur sehingga telur sulit menetas, sedangkan apabila kadar garam 35% telur akan menetas dalam kondisi terapung sehingga telur dapat menetas optimal.²⁹ Proses penetasan telur larva pada penelitian ini dapat berjalan dengan baik meskipun salinitas air laut buatan yang didapatkan belum mencapai 35%. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun ramania memiliki efektivitas terhadap mortalitas larva *Artemia salina* Leach dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan nilai *Lethal Concentration* 50 (LC₅₀) sebesar 408,950 mg/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Oratmangun, Sandriani A., Fatimawati dan Widhi Bodhi. Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) terhadap *Artemia salina* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) sebagai Studi Pendahuluan Potensi Anti Kanker. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT*. 2014;3(3):318-322.
- Anggraeni S, Devidan Erwin. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) Ekstrak Daun Kelakai (*Stenochlaena palustris*). *Prosiding Seminar Tugas Akhir FMIPA UNMUL*. 2015. Hal: 71-75.
- Kanto. Tingkat Manfaat, Keamanan dan Efektifitas Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Badan Penelitian dan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jawa Tengah : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT). 2008. Hal: 5-14.
- Lumbessy, Mirna., Jemmy Abidjulu dan Jessy J. E. Paendong. Uji Total Flavonoid pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional di Desa Waitina Kecamatan Mangoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. 2013;2(1):50-55.
- Redha, Abdi. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Berlian*. 2010;9(2):109-202.
- Antarlina, Sri S. Identifikasi Sifat Fisik dan Kimia Buah-Buahan Lokal Kalimantan. *Buletin Plasma Nuftah*. 2009;15(2):80-90.
- Fitrya., Lenny Anwar dan Era Novita Sari. Isolasi Senyawa Fenolat dan Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Tumbuhan Gandaria. *Jurnal Penelitian Sains*. 2010;13(1):10-14.
- Hermalinda, Risa., Irham Taufiqurrahman dan Zairin. Perbandingan Kandungan Total Flavonoid Ekstrak Daun Ramania (*Bouea macrophylla* Griffith) terhadap Pelarut Etanol dengan Pelarut Metanol. [Skripsi]. Universitas Lambung Mangkurat. Banjarmasin. 2014. Hal: 36-38
- Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 2013. Hal: 86
- Lolaen, Landy A. Ch., Fatimawali dan Gayatri Citraningtyas. Uji Aktivitas Antioksidan Kandungan Fitokimia Jus Buah Gandaria (*Bouea macrophylla* Griff). *Pharmakon Jurnal Ilmiah UNSRAT*. 2013;2(2):1-7
- Londo, Nita., Eva Johannes, Hasnah Natsi dan Si Suhadiyah. Bioaktivitas Ekstrak Kasar Biji Gandaria *Bouea macrophylla* Griff Sebagai Bahan Antioksidan. [Skripsi]. Universitas Hasanuddin. Makassar. 2015. Hal: 2
- Yuandani., Aminah Dalimunthe, Poppy Anjelisa Z, Hsb dan Abdi Wira Septama. Uji Aktivitas Antikanker (Preventif dan Kuratif) Ekstrak Etanol Temu Mangga (*Curcuma Mangga* Val.) pada Mencit yang Diinduksi Siklofosamid. *Majalah Kesehatan Pharma Medika*. 2011;3(2):255-259.
- Sirait, Anna Maria. Faktor Risiko Tumor/Kanker Rongga Mulut dan Tenggorokan Di Indonesia (Analisis Riskesdas 2007). *Media Litbangkes*. 2013;23(3):122-129.
- Sumihe, Gerry., Max R. J. Runtuwene dan Johnly A. Rorong. Analisis Fitokimia dan Penentuan Nilai LC₅₀ Ekstrak Metanol Daun Liwas. *Jurnal Ilmiah Sains*. 2014;14(2):125-128

15. Djajanegara, Ira dan Prio Wahyudi. Pemakaian Sel HeLa dalam Uji Sitotoksitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstrak Daun *Annona squamosa*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2009;7(1):7-11.
16. Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N and Gagneur J. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. G3: Genes| Genomes| Genetics. 2013;3(8):1213-24.
17. Elhardallou, Sirelkhatim Balla. Cytotoxicity and biological activity of selected Sudanese medicinal plants. Research Journal of Medicinal Plant. 2011;5(3):201-29.
18. Lucey, Brendan P., Walter A. Nelson-Rees and Grover M. Hutchins. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. Archive Pathology Laboratory Medical. 2009;133:1463–1467.
19. Dos Reis, PP., Bharadwaj RR, Machado J, MacMillan C, Pintilie M, Sukhai MA, Perez-Ordenez B, Gullane P, Irish Jand Kamel-Reid S. Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. Cancer. 2008;113(11):3169-80.
20. Atmoko, Tri dan Amir Ma'ruf. Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Ekstrak Tumbuhan Sumber Pakan Orangutan terhadap Larva *Artemia salina* Leach. Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam. 2009;6(1):37-45.
21. Indiasuti, Danti Nur., Sri Purwaningsih, Yuani Setiawati dan Noor Cholies. Skrining Pendahuluan Toksisitas Beberapa Tumbuhan Benalu terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2008;6(2):81-85.
22. Misbah, Mohammad Nurul. Analisis Pengaruh Salinitas dan Suhu Air Laut Terhadap Laju Korosi Baja A36 Pada Pengelasan SMAW. Jurnal Teknik ITS. 2012;1(1): G75-G77.
23. Govindarajan, M. Larvicidal and repellent activities of *Sida acuta* Burm. F.(Family: Malvaceae) against three important vector mosquitoes. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2010;3(9):691-5.
24. Ajrina, Aulia., Nurul Hiedayati dan Puteri Amalia. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Daun *Garcinia benthami* Pierre Terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. 2015. Hal: 39.
25. Hamidi, Mentor RR., Blagica Jovanova and Tatjana Kadifkova Panovska. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Macedonian pharmaceutical bulletin. 2014;60(1):9-18
26. Wang, Li-Shu, and Gary D. Stoner. Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer letters. 2008;269(2): 281-290.
27. He, Yan-Kang, You-Yuan Yao and Ya-Ning Chang. Characterization of Anthocyanins in *Perilla frutescens* var. *acuta* Extract by Advanced UPLC-ESI-IT-TOF-MSn Method and Their Anticancer Bioactivity. Molecules. 2015;20(5): 9155-9169.
28. Bunea A, Ruginã D, Sconța Z, Pop RM, Pintea A, Socaciu C, Tăbăran F, Grootaert C, Struijs K and VanCamp J. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. Phytochemistry. 2013;95:436-44.
29. Bahari, Muhammad Chalil., Djoko Suprpto dan Sahala Hutabarat. Pengaruh Suhu dan Salinitas terhadap Penetasan Kista *Artemia salina* Skala Laboratorium. Diponegoro Journal of Maquares Management of Aquatic Resources. 2014;3(4):188-194.