

Skripsi

**ANALISIS KANDUNGAN EKSTRAK PAKU GAJAH (*Angiopteris evecta*)
DAN BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI ANTITUMOR**

ASMIRAH

H031181032



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**ANALISIS KANDUNGAN EKSTRAK PAKU GAJAH (*Angiopteris evecta*)
DAN BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI ANTITUMOR**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh

ASMIRAH

H031181032



**MAKASSAR
2023**

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Asmirah
NIM : H031181032
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Analisis Kandungan Ekstrak Paku Gajah (*Angiopteris evecta*) dan Bioaktivitasnya Sebagai Antitumor" adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 14 Juni 2023

Yang Menyatakan,



Asmirah

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ANALISIS KANDUNGAN EKSTRAK PAKU GAJAH (*Angiopteris evecta*)
DAN BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI ANTITUMOR**

Disusun dan diajukan oleh

ASMIRAH

H031 18 1032

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi

Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Hasanuddin

Pada 14 Juni 2023


dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,


Pembimbing Utama


Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS
NIP. 19601215 198702 2 001

Pembimbing Pertama


Dr. Herlina Rasyid, S.Si
NIP. 19930414 202204 001

Ketua Program Studi


Dr. St Fauziah, M.Si.
NIP.19720202 199903 2 00202



=====PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya yang senantiasa dicurahkan kepada seluruh makhluk-Nya, juga sholawat serta salam atas junjungan Nabi Besar Muhammad SAW yang selalu dinantikan syafa'atnya di akhirat nanti. Alhamdulillah atas segala nikmat dan hidayah-Nya, penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Analisis Kandungan Ekstrak Paku Gajah (*Angiopteris evecta*) dan Bioaktivitasnya sebagai Antitumor**" disusun sebagai salah satu persyaratan akademik untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Banyak pihak yang telah berperan penting dalam membantu penyelesaian skripsi ini, baik secara moril, materil, maupun spiritual, maka dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua tercinta, **Arifin** dan **Sakka**, saudara dan keluarga yang telah mendoakan, memotivasi dan membantu dari awal hingga penyusunan skripsi, dan kepada:

1. Ibu **Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS** selaku dosen pembimbing utama sekaligus penasihat akademik yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan, ilmu, perhatian, dan motivasi hingga penulis mampu dan bisa berada pada tahap ini.
2. Ibu **Dr. Herlina Rasyid, S.Si** selaku dosen pembimbing pertama yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, motivasi, masukan serta pengarahan selama proses penyelesaian skripsi ini.
3. Bapak **Dr. Sci. Muhammad Zakir, M.Si** dan Ibu **Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si** selaku tim penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberi saran dan masukan selama proses penyusunan skripsi ini.

4. Seluruh *Analisis Laboratorium* yang senantiasa membantu penulis selama proses penelitian mulai dari awal hingga selesai.
5. Seluruh **staf Departemen Kimia dan Fakultas MIPA** yang senantiasa membantu penulis dalam hal administrasi.
6. Sahabat-sahabat terbaik penulis, **Jejak Petualang** (Windos, Iin, Bu Aji, Wahda, Ummul, dan Nada) dan **Ramsis Squad** (Nanna, Mage dan Fina) yang selalu menemani dan memberikan dukungan sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
7. Teman-teman seperjuangan **KIMIA 2018** yang selama ini telah berjuang sama-sama melewati masa studi dari awal perkuliahan hingga saat ini.
8. *Organic Chemistry Researcher* yang selalu ada untuk satu sama lain, teman beradu nasib dan saling support dari awal penelitian hingga saat ini.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah turut mendoakan dan mendukung penulis selama proses penyelesaian skripsi ini.
10. *Last but not least, I want to thank to me myself, Cila. Thank you for choosing to swim instead of sink. I sincerely hope it pays off and I think it will. Thank you for dreaming big and actually believing that you are destined for something amazing. I know and I believe you are.*

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan masih jauh dari kata sempurna. Oleh sebab itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang sangat membangun agar dapat bermanfaat bagi pihak lainnya.

Makassar, 12 Februari 2023

Asmirah
NIM. H031 18 1032

ABSTRAK

Paku gajah (*Angiopteris evecta*) merupakan salah satu tanaman paku terbesar di dunia yang telah dimanfaatkan secara empiris oleh suku Dayak Kalimantan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit, salah satunya untuk pengobatan tumor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi pemanfaatan ekstrak batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) sebagai antitumor melalui analisis kandungan metabolit sekunder, uji toksisitas dan aktivitas antitumor. Metode yang digunakan diantaranya maserasi bertingkat dengan menggunakan tiga jenis pelarut (*n*-heksana, etil asetat, dan metanol), skrining fitokimia, pengujian toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Letality Test* (BSLT), pengujian aktivitas antitumor dengan metode *Alamarblue*, dan analisis *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid, saponin, tanin, dan steroid. Ekstrak yang memiliki toksisitas kategori toksik adalah ekstrak etil asetat dengan LC_{50} 130,67 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak metanol dengan LC_{50} 314,31 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak yang memberikan aktivitas antitumor paling tinggi adalah ekstrak etil asetat dengan nilai IC_{50} 240,94 $\mu\text{g/mL}$ dan dari hasil analisis LC-MS menunjukkan ekstrak etil asetat mengandung violanthin dan angiopteriside.

Kata kunci: aktivitas antitumor, ekstrak etil asetat, LC-MS, metabolit sekunder, paku gajah (*Angiopteris evecta*), toksisitas.

ABSTRACT

Paku gajah (*Angiopteris evecta*) is one of the largest fern plants in the world which has been used empirically by the Dayak tribe of Kalimantan as a traditional medicine to treat various diseases, one of which is for the treatment of tumors. The purpose of this study was to determine the potential utilization of paku gajah (*Angiopteris evecta*) stem extract as an antitumor by analysing the content of secondary metabolites, testing the toxicity and the antitumor activity. The methods used in this study were gradual maceration using three solvents (*n*-hexane, ethyl acetate, and methanol), phytochemical screening, toxicity test using the Brine Shrimp Letality Test (BSLT) method, antitumor activity test with the Alamarblue method, and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) analysis. The results of this study indicated that paku gajah (*Angiopteris evecta*) stem extract contained groups of secondary metabolites such as flavonoids, saponins, tanins, and steroids. Extracts that have toxicity in the toxic category are ethyl acetate extract with LC₅₀ 130,67 µg/mL and methanol extract with LC₅₀ 314,31 µg/mL. The extract that showed the highest antitumor activity was ethyl acetate extract with an IC₅₀ value of 240,94 µg/mL and from the result of the LC-MS analysis showed that the ethyl acetate extract contained violanthin and angiopteroside.

Keywords: antitumor activity, ethyl acetate extract, LC-MS, paku gajah (*Angiopteris evecta*), secondary metabolites, toxicity.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Maksud Penelitian.....	5
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Paku Gajah (<i>Angiopteris evecta</i>).....	7
2.2 Ekstraksi.....	9
2.3 Skrining Fitokimia.....	12
2.4 Tumor.....	15
2.5 <i>Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)</i>	17

2.6 Uji Antitumor	19
BAB III METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Bahan Penelitian.....	22
3.2 Alat Penelitian	22
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	23
3.3.1 Waktu dan Tempat Pengambilan Sampel	23
3.3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	23
3.4 Prosedur Penelitian.....	23
3.4.1 Preparasi Sampel Batang Paku Gajah	23
3.4.2 Ekstraksi	23
3.4.3 Skrining Fitokimia.....	24
3.4.3.1 Uji Alkaloid.....	24
3.4.3.2 Uji Flavonoid	24
3.4.3.3 Uji Terpenoid/Steroid.....	24
3.4.3.4 Uji Saponin	25
3.4.3.5 Uji Tanin	25
3.4.4 <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	25
3.4.4.1 Penyiapan Larva Udang	25
3.4.4.2 Penyiapan Sampel Ekstrak Batang Paku Gajah.....	25
3.4.4.3 Uji Toksisitas	26
3.4.5 Uji Antitumor dengan Metode <i>Alamarblue</i> Terhadap Sel Tumor MCF-7	26
3.4.5.1 Preparasi Media, Kontrol Positif, dan Sampel.....	26
3.4.5.2 Preparasi Sel.....	27
3.4.5.3 <i>Seeding</i> Sel ke dalam 96 <i>Well Plate</i>	27

3.4.5.4 Perlakuan Sel dengan Sampel, Kontrol Positif, dan Kontrol Negatif.....	27
3.4.5.5 Pemberian Reagen <i>Presto Blue</i> dan Pengukuran Absorbansi	28
3.4.6 Analisis LC-MS	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Preparasi Sampel Batang Paku Gajah	29
4.2 Ekstraksi Batang Paku Gajah	29
4.3 Skrining Fitokimia Ekstrak Batang Paku Gajah	30
4.4 Uji Toksisitas Ekstrak Batang Paku Gajah dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	32
4.5 Uji Antitumor Ekstrak Batang Paku Gajah dengan Metode <i>Alamarblue</i> Terhadap Sel Tumor MCF-7	34
4.6 Analisis LC-MS Kandungan Ekstrak Etil Asetat Batang Paku Gajah	39
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	43
5.1 Kesimpulan.....	43
5.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Rendemen Hasil Maserasi Bertingkat.....	30
2. Skrining Fitokimia Ekstrak Batang Paku Gajah	30
3. Uji Toksisitas Metode BSLT	33
4. Uji Antitumor.....	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Paku Gajah (<i>Angiopteris evecta</i>).....	7
2. Struktur Angiopteroside	9
3. Reaksi Uji Tanin	12
4. Reaksi Uji Flavonoid	13
5. Reaksi Uji Saponin.....	13
6. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Dragendorff.....	14
7. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Mayer	14
8. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Wagner	14
9. Reaksi Uji Terpenoid dan Steroid.....	15
10. Perbedaan Tumor Jinak dan Tumor Ganas	16
11. Reaksi Reduksi Resazurin Menjadi Resorufin.....	20
12. Morfologi Sel MCF-7 Hasil Uji Antitumor dengan Cisplatin	36
13. Morfologi Sel MCF-7 Hasil Uji Antitumor dengan EEBPG.....	37
14. Morfologi Sel MCF-7 Hasil Uji Antitumor dengan EMBPG.....	37
15. Kromatogram EEBPG.....	39
16. MS <i>Peak</i> Waktu Retensi 15,30 Menit.....	40
17. Pola Fragmentasi Violanthin.....	41
18. MS <i>Peak</i> Waktu Retensi 6,49 Menit.....	41
19. Pola Fragmentasi Angiopteroside	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Diagram alir penelitian	50
2. Bagan prosedur penelitian.....	51
3. Perhitungan	59
4. Dokumentasi	64

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
BSLT	: <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>
MCF-7	: <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	: Dimetil Sulfoksida
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
LC-MS	: <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
IC ₅₀	: <i>Inhibition Concentration 50%</i>
LC ₅₀	: <i>Lethal Concentration 50%</i>
EHBPG	: Ekstrak <i>n</i> -Heksana Batang Paku Gajah
EEBPG	: Ekstrak Etil Asetat Batang Paku Gajah
EMBPG	: Ekstrak Metanol Batang Paku Gajah

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Angiopteris evecta merupakan tanaman paku dari famili Marattiaceae, yang memiliki nama umum paku gajah atau paku raja. Tanaman ini adalah salah satu tanaman paku terbesar di dunia (Hartini, 2015). Spesies tanaman ini telah dimanfaatkan secara empiris oleh suku Dayak Kalimantan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit, salah satunya untuk pengobatan tumor (Noorcahyati, 2012).

Penelitian mengenai bioaktivitas tanaman paku gajah cukup terbatas jumlahnya. Tercatat hanya terdapat beberapa penelitian yang melaporkan bioaktivitas tumbuhan ini, seperti yang dilaporkan oleh Khan dan Omoloso (2008) bahwa fraksi kloroform dan etil asetat dari daun dan kulit batang tumbuhan ini menunjukkan aktivitas antijamur yang baik. Ekstrak metanol daunnya juga menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Thomas, 2011). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mismawati dkk. (2015) yang melaporkan bahwa ekstrak metanol daun *Angiopteris evecta* memiliki kemampuan menghambat *Salmonella thypi*, *Propionibacterium acnes*, dan *Bacillus cereus*. Ekstrak daun tanaman juga dilaporkan memiliki aktivitas antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mohamad dkk., 2011), serta isolasi senyawa kimia dari rimpangnya yang diidentifikasi sebagai angiopteroside dan senyawa ini menunjukkan aktivitas yang signifikan untuk menghambat pertumbuhan *HIV 1 Reverse Transcriptase* (IC₅₀ 91 µM) (Taavepanich dkk., 2005) dan sampai saat ini

belum ada penelitian terkait bioaktivitasnya sebagai antitumor. Kendati demikian, penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Saleride dkk. (2017) melaporkan bahwa masing-masing ekstrak petroleum eter, kloroform, aseton, dan etanol batang paku gajah mengandung senyawa golongan flavonoid, tanin, terpenoid, fenolik, dan steroid. Senyawa golongan polifenol termasuk flavonoid dan tanin berpotensi sebagai senyawa antitumor karena telah terbukti sitotoksitasnya terhadap berbagai jenis sel tumor (Greenwell dan Rahman, 2015). Di sisi lain, penelitian terkait bioaktivitas antitumor ekstrak tumbuhan dari genus yang sama yaitu spesies *Angiopteris ferox* Copel juga menunjukkan aktivitas antitumor yang baik terhadap sel tumor payudara T47D dengan nilai IC₅₀ 84,8 µg/mL (Aisyah dkk., 2020). Hasil dari kedua penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Angiopteis evecta* kemungkinan berpotensi dapat menghambat pertumbuhan sel tumor.

Tumor merupakan gangguan patologis pertumbuhan sel yang ditandai dengan proliferasi sel yang berlebihan atau abnormal (Sinha, 2018). Tumor ganas menjadi salah satu penyebab utama kematian di seluruh dunia. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan jumlah kematian karena tumor ganas rata-rata 8,4 juta setiap tahun di dunia (Ferlay dkk., 2020). Berdasarkan riset dari Globocan, total penderita tumor ganas sekitar 0,13% dari jumlah penduduk Indonesia (Globocan, 2021). Data tersebut juga didukung oleh riset kesehatan dasar Kementerian Kesehatan tahun 2018 yang melaporkan bahwa prevalensi tumor ganas di Indonesia 1,8 per 1000 penduduk dan dari data tersebut juga menyebutkan tumor terbanyak yaitu tumor ganas payudara sebesar 16,7% dari total 396.914 kasus, diikuti oleh tumor ganas serviks 12,8%; tumor ganas paru-paru 8,6%; tumor ganas usus 8,6%; tumor ganas hati 5,3%; dan tumor ganas nasofaring 5% (Kemenkes, 2018).

Pengobatan untuk penyakit tumor sampai saat ini masih mengandalkan obat-obatan imunoterapi, pembedahan, dan kemoterapi yang biayanya relatif mahal dan memiliki efek samping yang berbahaya bagi tubuh (Sinha, 2018). Oleh karena itu diperlukan alternatif pengobatan lain dengan biaya yang relatif terjangkau dan tidak menimbulkan efek samping yang merugikan bagi tubuh. Salah satu upaya yang dapat dilakukan yaitu dengan memanfaatkan obat-obatan berbasis bahan alam atau tanaman obat.

Tanaman obat telah digunakan sejak zaman dahulu untuk pengobatan berbagai macam penyakit termasuk tumor (Gogoi dkk., 2017). Beberapa contoh tanaman yang telah diteliti khasiatnya sebagai tanaman obat, yaitu tumbuhan sengkubak (*Pycnarrhena cauliflora* (Miers.) Diels.) yang telah diteliti sebagai antimikroba (Sholikhah dkk., 2021) dan ciplukan (*Physalis minima* L.) sebagai antidiuretik, antiinflamasi, antidiabetes, dan antimikroba (Novita dkk., 2020). Selain itu, ada juga halalang (*Imperata cylindrica*) sebagai antitumor, antioksidan, antiinflamasi, dan antibakteri (Jung dan Shin, 2021); kaledang (*Artocarpus lanceifolius*) sebagai antioksidan (Hamsidar dkk., 2019); dan bajakah tampala (*Spatholobus littoralis*) sebagai antioksidan (Iskandar dan Warsidah, 2020).

Penelitian mengenai tanaman obat diawali dengan prosedur ekstraksi yang merupakan langkah penting dalam pengolahan senyawa bioaktif dari tanaman (Azwanida, 2015). Pemilihan jenis pelarut ekstraksi dapat memengaruhi jenis komponen atau senyawa yang terekstrak serta memengaruhi bioaktivitasnya. Diketahui terdapat banyak penelitian yang memvariasikan kepolaran pelarut ekstraksi (Asbanu dkk., 2019; Istiqomah dkk., 2021). Hasil penelitian tersebut menunjukkan terdapat perbedaan kandungan kimia dan bioaktivitas ekstrak yang diperoleh dari pelarut yang berbeda kepolarannya. Hal ini juga

berpengaruh pada potensinya sebagai tanaman obat termasuk sebagai obat antitumor.

Potensi tanaman sebagai obat antitumor diketahui melalui serangkaian uji, yang dimulai dengan pengujian toksisitas dan uji *in vitro* terhadap sel tumor. Menurut Marliza dan Oktaviani (2021), hasil uji toksisitas metode BSLT memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antitumor, sehingga sering digunakan untuk skrining awal pencarian senyawa antitumor. Khusus kajian antitumor payudara, penelitian oleh Eltayeb dkk. (2017), Nordin dkk. (2018), dan Mallick dkk. (2022) menggunakan sel tumor payudara MCF-7 pada ekstrak tanaman *Aerva javanica*, *Ardisia crispa*, dan *Bacopa monnieri*.

Berdasarkan uraian tersebut maka dilakukan penelitian mengenai kandungan kimia dan potensi batang tumbuhan paku gajah sebagai antitumor. Dilakukan ekstraksi batang paku gajah (*Angiopteris Evecta*) pada penelitian ini dengan metode maserasi bertingkat menggunakan tiga pelarut, yaitu *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian dianalisis kandungan kimianya melalui uji fitokimia dan instrumen LC-MS. Selanjutnya dilakukan uji toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Setelah dilakukan uji toksisitas, selanjutnya diuji potensinya sebagai antitumor terhadap sel tumor payudara MCF-7.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. metabolit sekunder golongan apa saja yang terkandung dalam masing masing ekstrak metanol, etil asetat, dan *n*-heksana batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) melalui analisis fitokimia?

2. bagaimana toksisitas ekstrak metanol, etil asetat, dan *n*-heksana batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) berdasarkan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)?
3. bagaimana aktivitas antitumor ekstrak terpilih batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) terhadap sel tumor payudara MCF-7?
4. metabolit sekunder apa yang dapat diketahui dalam ekstrak paling aktif batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) melalui analisis LC-MS?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak paku gajah, toksisitas dan bioaktivitasnya sebagai antitumor.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. menganalisis golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol, etil asetat, dan *n*-heksana batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) melalui analisis fitokimia,
2. menguji toksisitas ekstrak metanol, etil asetat, dan *n*-heksana batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) berdasarkan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*),
3. menguji aktivitas antitumor ekstrak terpilih batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) terhadap sel tumor payudara MCF-7.
4. menganalisis metabolit sekunder apa yang dapat diketahui dalam ekstrak paling aktif batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) melalui analisis LC-MS,

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang potensi pemanfaatan ekstrak batang paku gajah (*Angiopteris evecta*) sebagai antitumor.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Paku Gajah (*Angiopteris evecta*)

Angiopteris evecta (Gambar 1) umumnya dikenal dengan nama pakis raksasa, paku gajah atau pakis raja. Tumbuhan ini adalah salah satu tumbuhan pakis terbesar di dunia (Hartini, 2015). Merupakan tumbuhan paku yang dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian hingga 7 meter dan memiliki pelepah besar yang dapat mencapai 5-6 meter dengan tangkai daun sepanjang 2 meter. Umumnya ditemukan di Indonesia, Papua Nugini, pesisir utara Australia dan bagian selatan dan barat kepulauan pasifik (Christenhusz dan Toivonen, 2008). Tumbuhan ini biasanya tumbuh di daerah yang teduh dan lembab yang dekat dengan sumber air (Hartini, 2015).



Gambar 1. Paku Gajah (*Angiopteris evecta*) (Hartini, 2015)

Menurut Christenhusz dan Toivonen (2008), tumbuhan paku gajah secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut.

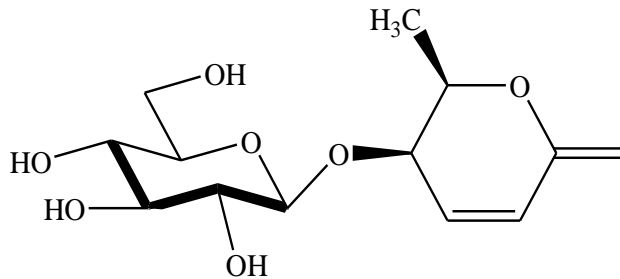
Kingdom : Plantae
Divisi : Pteridophyta
Kelas : Marattiopsida

Ordo : Marattiales
Famili : Marattiaceae
Genus : *Angiopteris*
Spesies : *Angiopteris evecta* (G. Forst.) Hoffm.

Paku gajah berkembang biak secara vegetatif. Rimpang bulatnya yang besar dapat tumbuh setinggi 1,5 meter dan lebar 1 meter. Daun dewasanya mengandung ribuan sporangia yang masing-masing menghasilkan hingga 1440 spora. Terdapat stipula berdaging di dasar setiap tangkai daun yang menghasilkan banyak tunas yang dapat tumbuh menjadi tanaman baru ketika stipula putus pada tanah yang cocok (Christenhusz dan Toivonen, 2008).

Terdapat beberapa penelitian sebelumnya yang melaporkan bioaktivitas tumbuhan ini, antara lain yaitu Khan dan Omoloso (2008) melaporkan bahwa fraksi kloroform dan etil asetat dari daun dan kulit batang tumbuhan ini menunjukkan aktivitas antijamur yang baik terhadap jamur *Aspergillus niger*, *A. versicolour*, *A. vitis*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cladosporium cladosporides*, *Penicillium notatum*, *Trichophyton mentagophyte* dengan zona hambat 8 mm dan 10 mm. Ekstrak metanol daun paku gajah juga menunjukkan aktivitas antibakteri dengan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) 25 mg/mL terhadap *Staphylococcus aureus* dan 50 mg/mL terhadap *Pseudomonas aeruginosa* (Thomas, 2011). Pada penelitian sebelumnya oleh Mismawati dkk. (2015) dilaporkan bahwa ekstrak metanol daun *Angiopteris evecta* memiliki kemampuan menghambat *Sallmonela thypi* (11,22 mm \pm 1,02); *Propionibacterium acnes* (10,22 mm \pm 1,26) dan *Bacillus cereus* (10,30 mm \pm 0,00). Ekstrak daun tanaman juga dilaporkan memiliki aktivitas antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mohamad dkk., 2011), dan hanya

satu referensi yang ditemukan dalam literatur yang melaporkan isolasi senyawa kimia dari rimpangnya yang diidentifikasi sebagai angiopteraside (Gambar 2) (Taveepanich dkk., 2005). Angiopteraside sebelumnya telah diisolasi dan diidentifikasi dari tumbuhan paku *Angiopteris lygodifolia* Ros. (Hseu, 1981) dan *Angiopteris esculenta* Ching (Chen dkk., 2010). Senyawa ini memiliki struktur sebagai berikut.



Gambar 2. Struktur Angiopteraside (Kamitakahara dkk., 2018)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Taavepanich dkk. (2005), angiopteraside menunjukkan aktivitas antitumor spesifik terhadap sel tumor paru-paru dengan persen kelangsungan hidup sangat tinggi yaitu sebesar 55% jika dibandingkan dengan *doxorubicin* (sebagai kontrol positif) sebesar 63%. Senyawa ini juga menunjukkan aktivitas yang signifikan untuk menghambat pertumbuhan *HIV-1 Reverse Transcriptase* (IC₅₀ 91 µM). Kamitakahara dkk. (2018) melaporkan angiopteraside menunjukkan aktivitas antibakteri yang lemah terhadap bakteri *E. coli* InaCC B5, *K. Pneumoniae* BCC1758, dan *B. subtilis* InaCC B1.

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi pada tanaman dapat didefinisikan sebagai pemisahan bagian tanaman yang aktif secara medis dari komponen yang tidak aktif melalui penggunaan pelarut. Selama proses ekstraksi, pelarut berdifusi ke dalam jaringan

tanaman dan melarutkan senyawa dengan polaritas yang sama. Cara ekstraksi yang tepat secara alami tergantung pada tekstur dan kandungan air dari bahan tanaman yang diekstraksi dan pada jenis zat yang diisolasi (Bandiola, 2018). Maserasi merupakan proses ekstraksi yang dilakukan dengan cara memasukkan simplisia dan pelarut ke dalam wadah yang sesuai dalam keadaan *inert* dan tertutup rapat pada suhu kamar. Maserasi dapat dilakukan dengan satu macam pelarut dan dapat juga dimodifikasi dengan beberapa pelarut yang ditingkatkan kepolarannya yang disebut maserasi bertingkat. Maserasi bertingkat bertujuan untuk mengekstrak keseluruhan senyawa dalam suatu sampel berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan (Mukhriani, 2014).

Berdasarkan penelitian Asbanu dkk. (2019), pemilihan jenis pelarut pada maserasi bertingkat memengaruhi komponen senyawa yang terekstrak serta memengaruhi bioaktivitasnya. Asbanu dkk. (2019) melaporkan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) hasil maserasi bertingkat menunjukkan kandungan metabolit sekunder yang berbeda. Ekstrak metanol daun sirsak mengandung hampir semua golongan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, dan steroid berdasarkan uji fitokimia, sedangkan ekstrak etil asetat dan *n*-heksana mengandung alkaloid, flavonoid, dan steroid. Hasil uji bioaktivitasnya sebagai antioksidan juga menunjukkan hasil yang berbeda untuk setiap ekstrak. Ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} masing-masing sebesar 7,711 ppm (tidak mempunyai aktivitas antioksidan); 56,894 ppm (antioksidan kuat); dan 24,895 ppm (antioksidan sangat kuat).

Menurut penelitian Edison dkk. (2020), kandungan senyawa bioaktif yang dihasilkan pada maserasi bertingkat berbeda untuk jenis pelarut yang digunakan.

Penelitian tersebut melaporkan bahwa senyawa bioaktif *S. plagyophyllum* paling banyak terdapat pada ekstrak etil asetat. Senyawa bioaktif *S. plagyophyllum* ekstrak *n*-heksana mengandung steroid/triterpenoid, ekstrak etil asetat mengandung alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid, saponin, dan fenolik, sedangkan ekstrak metanol tidak terdapat senyawa flavonoid. Adapun untuk aktivitas antioksidan ketiga ekstrak dengan pelarut yang berbeda ditunjukkan dari nilai IC₅₀ pelarut etil asetat yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak yaitu sebesar 532,42 ± 7,80 (etil asetat); 777,79 ± 16,82 (metanol); dan 1105,58 ± 16,62 (*n*-heksana).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Widyasanti dkk. (2019) melaporkan bahwa tiga ekstrak teh putih hasil maserasi bertingkat yaitu ekstrak *n*-heksana, aseton dan etanol memiliki kadar polifenol yang berbeda dengan kadar polifenol terendah dihasilkan oleh pelarut *n*-heksana sedangkan kadar polifenol tertinggi dihasilkan oleh pelarut etanol. Hal ini sesuai dengan prinsip “*like dissolve like*”, dimana senyawa yang terkandung dalam sampel akan terekstrak oleh pelarut yang memiliki sifat yang sama dengan senyawanya. Teh putih pada penelitian ini, memiliki senyawa terbesar yang bersifat polar yaitu polifenol, jadi ketika teh putih diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% (pelarut bersifat polar) maka akan menarik polifenol cukup banyak.

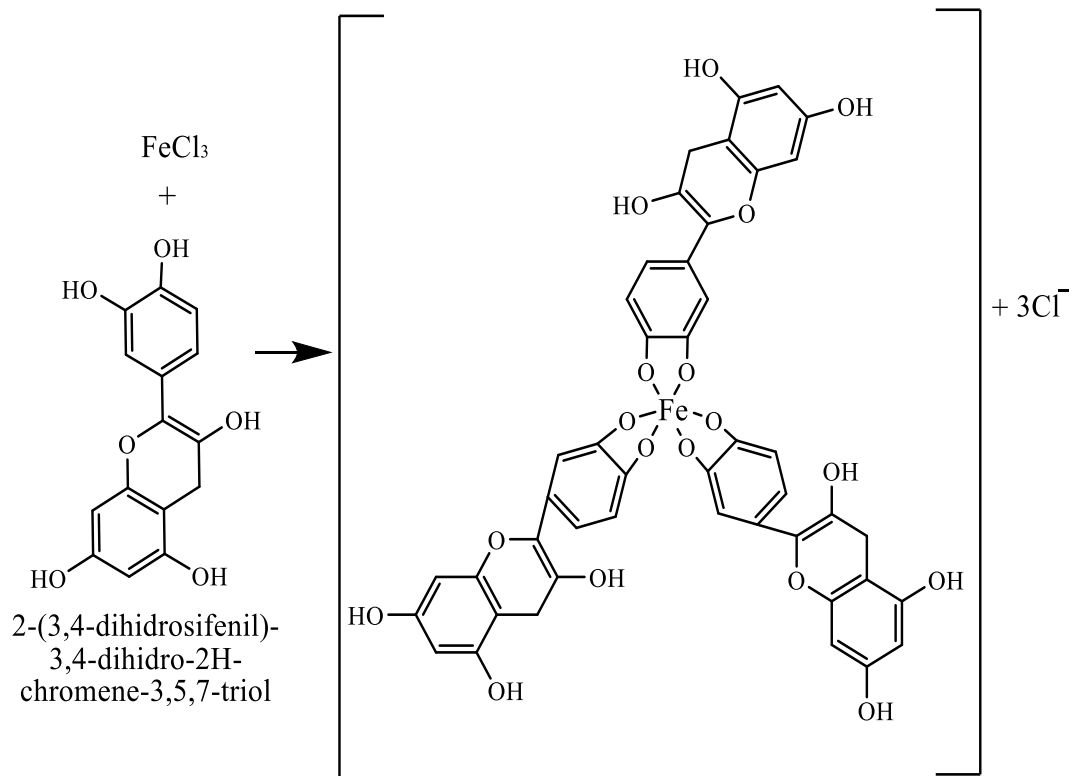
Hasil penelitian lain tentang maserasi bertingkat diantaranya yaitu oleh Aziz dan Anggarani (2021), pada sampel daun bawang kucai dengan pelarut etanol, etil asetat dan diklorometana diperoleh hasil yaitu ekstrak etanol daun bawang kucai mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan fenolik, ekstrak etil asetat mengandung senyawa flavonoid, steroid dan fenolik, sedangkan ekstrak diklorometana hanya mengandung

senyawa steroid. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, diperoleh pula aktivitas antioksidan pada ekstrak etil asetat daun bawang kucai yaitu sebesar 563,1250 ppm, sementara itu pada ekstrak etanol diperoleh sebesar 312,7957 ppm.

2.4 Skrining Fitokimia

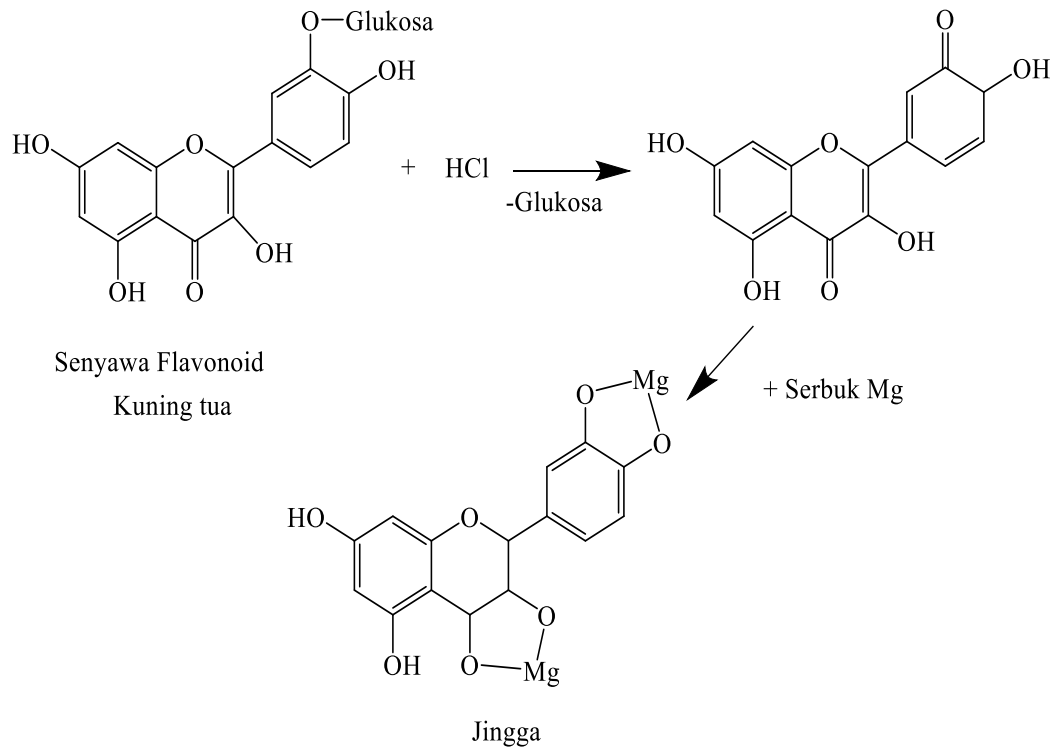
Skrining fitokimia merupakan langkah penting sebagai upaya untuk mengungkap potensi sumber daya tanaman obat sebagai antibiotik, antioksidan, dan antitumor. Skrining fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam berbagai jenis ekstrak tanaman (Parbuntari dkk., 2018). Berikut ini merupakan beberapa uji yang dilakukan pada skrining fitokimia.

1. Uji Tanin



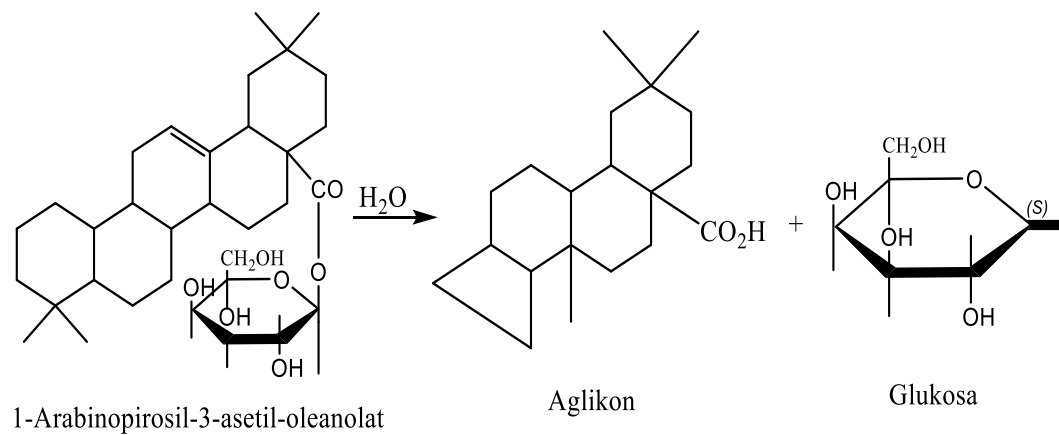
Gambar 3. Reaksi Uji Tanin (Nugahani dkk., 2016)

2. Uji Flavonoid



Gambar 4. Reaksi Uji Flavonoid (Nugahani dkk., 2016).

3. Uji Saponin

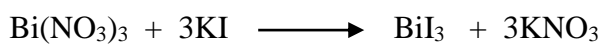


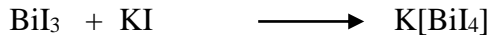
Membentuk Busa

Gambar 5. Reaksi Uji Saponin (Setyowati dkk., 2014)

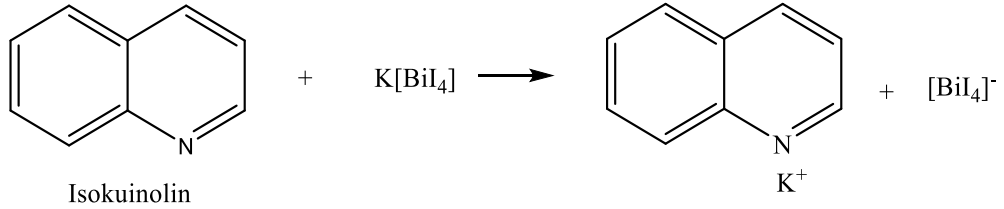
3. Uji Alkaloid

Pereaksi Dragendorff





Kalium tetraiodobismutat(III)



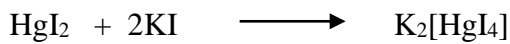
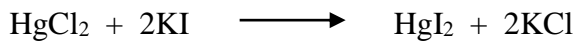
Isokuinolin

Kalium-Isokuinolin

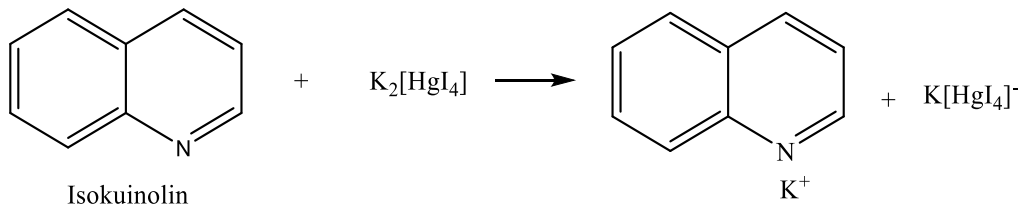
Endapan jingga/Merah Bata

Gambar 6. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Dragendorff (Nugahani dkk., 2016).

Pereaksi Mayer



Kalium tetraiodomerkurat(II)



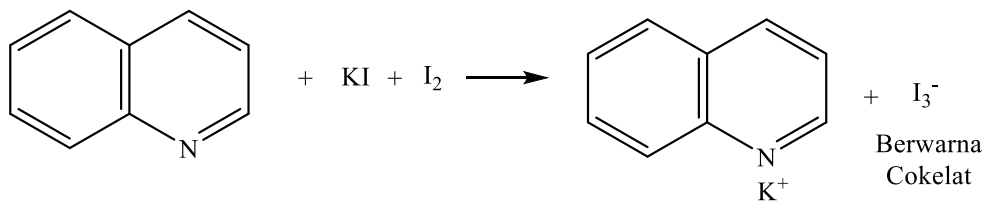
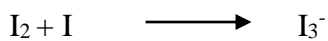
Isokuinolin

Kalium-Isokuinolin
endapan

Endapan putih/kuning

Gambar 7. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Mayer (Nugahani dkk., 2016).

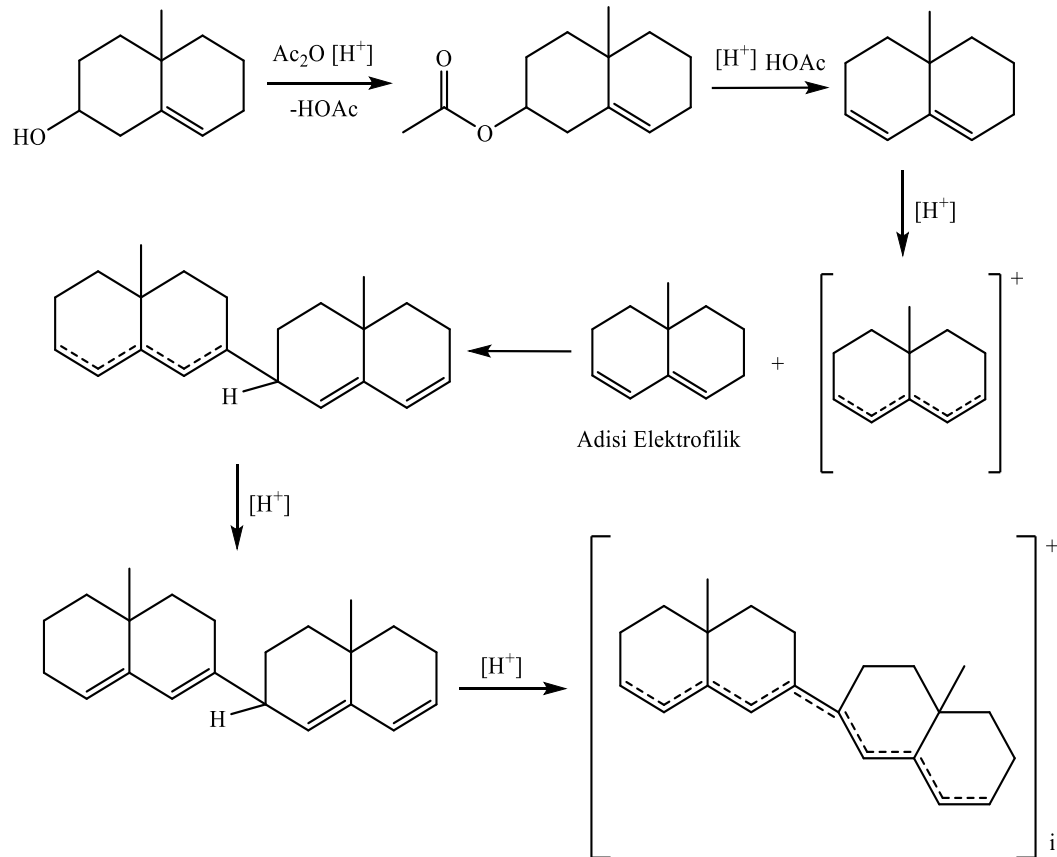
Pereaksi Wagner



Berwarna
Cokelat

Gambar 8. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Wagner (Nugahani dkk., 2016).

4. Uji Steroid dan Terpenoid

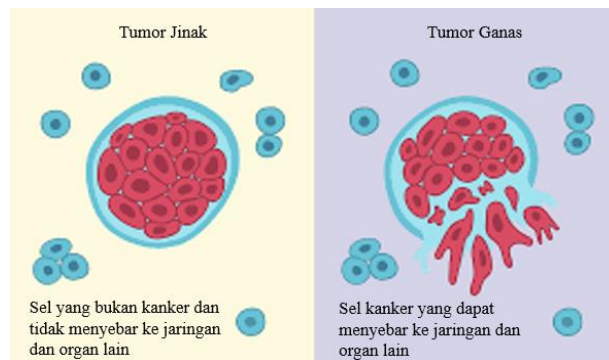


Gambar 9. Reaksi Uji Terpenoid dan Steroid (Setyowati dkk., 2014).

2.5 Tumor

Tumor adalah istilah umum yang digunakan untuk menjelaskan adanya pertumbuhan massa (berbentuk solid atau padat) atau jaringan abnormal dalam tubuh (Bhosale dkk., 2020). Penyebab tumor dapat disebabkan oleh banyak faktor, mulai dari faktor eksternal (bahan kimia, radiasi, dan organisme menular) serta faktor internal (faktor genetik atau keturunan, hormon, kondisi kekebalan, dan mutasi sel). Penyebab tumor beragam dan banyak pula hal yang diketahui dapat meningkatkan risiko pertumbuhannya, termasuk faktor makanan, infeksi tertentu, kurangnya aktivitas fisik, obesitas, dan polusi lingkungan. Tumor dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu tumor jinak (*benign tumor*) dan tumor ganas

(*malignant tumor*) atau yang lebih dikenal dengan kanker. Tumor jinak tidak akan menyerang jaringan di sekitarnya atau menyebar ke area lain dari tubuh (bermetastasis). Tumor jenis ini kurang berbahaya kecuali jika berada di dekat organ vital, jaringan, saraf, atau pembuluh darah dan menyebabkan kerusakan. Tumor ganas berarti tumor tersebut tersusun dari sel kanker dan dapat menyerang jaringan di sekitarnya. Beberapa sel kanker dapat berpindah melalui aliran darah atau kelenjar getah bening. Kemampuan sel kanker menyebar ke jaringan lain di dalam tubuh ini disebut metastasis (Sinha, 2018).



Gambar 10. Perbedaan Tumor Jinak dan Tumor Ganas (Sinha, 2018)

Adapun untuk pengobatan tumor khusus tumor jinak biasanya dapat diobati sepenuhnya dengan pembedahan, meskipun beberapa dapat diobati dengan terapi radiasi atau kemoterapi. Pengobatan untuk tumor ganas selain dengan pembedahan diperlukan pula kemoterapi, terapi radiasi, atau obat imunoterapi untuk menghilangkan sel tumor yang masih tersisa setelah perawatan atau untuk mengobati tumor sekunder yang ada di bagian lain dari tubuh (Sinha, 2018). Namun demikian, pengobatan seperti kemoterapi dan radioterapi memiliki kelemahan, termasuk resistensi kanker terhadap obat antikanker dan efek radioterapi yang merugikan bagi tubuh (Bhosale dkk., 2020). Oleh karena itu, saat ini banyak dilakukan penelitian untuk mencari pengobatan yang bisa mengurangi efek

samping tersebut yaitu dengan mengganti obat-obatan kemoterapi dengan senyawa antitumor dari tumbuhan (Pratama dan Nuwarda, 2015).

Senyawa-senyawa antitumor yang telah diteliti dan ditemukan sebelumnya, menghancurkan dan menyerang sel kanker dengan memacu apoptosis sel yang menyebabkan kematian sel semakin banyak serta membuat antiproliferasi yang menyebabkan pertumbuhan sel tidak dapat dilakukan dan bisa berhenti. Mekanisme apoptosis dan antiproliferasi dapat terjadi melalui berbagai mekanisme seperti penggunaan *channel calcium ion*, protein kinase, unsur-unsur transduksi sel, serta modifikasi hormon steroid yang ada di dalam tubuh. Banyak ekstrak tanaman bahan alam mampu menghambat apoptosis dan antiproliferasi sel, sejak awal inisiasi kerusakan DNA sampai proses progresif (Golonko dkk., 2022). Senyawa fenolik seperti flavonoid adalah metabolit sekunder yang berasal dari tumbuhan yang paling efektif untuk pengobatan tumor. Polifenol dapat memberikan efek antitumor melalui berbagai mekanisme, yang mencakup penghilangan sel tumor dengan modifikasi jalur persinyalan, penghambatan peristiwa siklus sel, dan induksi apoptosis. Polifenol juga mengatur aktivitas enzim yang terlibat dalam proliferasi sel tumor. Studi terbaru melibatkan senyawa polifenol dan potensi antitumornya melalui berbagai sifat, seperti antiangiogenik, antitimetastasis, interaksi DNA, dan lain-lain (Bhosale dkk., 2020).

2.6 *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*

Uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)* menggunakan *Artemia salina* Leach merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui adanya bioaktivitas dari suatu sampel. Uji ini berguna untuk menentukan berbagai aktivitas biologis pada tanaman seperti aktivitas

sitotoksik (Veni dan Pushpanathan, 2014). Janakiraman dan Johnson (2016) juga menyatakan bahwa BSLT dapat digunakan sebagai dasar untuk uji toksisitas terhadap sel *line*, aktivitas antitumor dan antikanker.

Arwan (2017) melakukan uji toksisitas fraksi ekstrak etanol 70% akar tanaman parang romang (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill.) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Diperoleh hasil fraksi B yang memiliki tingkat toksik yang lebih besar dibandingkan fraksi lainnya dengan nilai LC_{50} sebesar 16,21 $\mu\text{g/mL}$, selanjutnya fraksi B difraksinasi kembali menggunakan kolom kromatografi cair vakum dan diperoleh 3 fraksi gabungan yakni fraksi B1, B2 dan B3, setelah masing-masing fraksi diuji toksisitasnya maka diperoleh hasil fraksi B1 yang memiliki toksisitas yang lebih besar dengan nilai LC_{50} sebesar 2,19 $\mu\text{g/mL}$. Hasil identifikasi fraksi B1 menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid dan terpen.

Penelitian sebelumnya juga dilakukan oleh Puspitasari dkk. (2018) dengan tujuan untuk menghitung dan menganalisis tingkat toksisitas serta membandingkan kemampuan toksisitas ekstrak daun, batang dan akar mangrove (*A. marina*, *R. mucronata*, *S. alba* dan *X. ganatum*) yang berasal dari Pesisir Banyuasin, Sumatera Selatan dengan uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan analisis data menggunakan analisa probit. Hasil penelitian tersebut menunjukkan terdapat tiga ekstrak yang bersifat toksik dan sembilan ekstrak tidak toksik terhadap larva *A. salina*. Ekstrak yang bersifat toksik terdapat pada daun ditandai dengan nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Ekstrak daun *A. marina* 403,44 $\mu\text{g/mL}$; *R. Mucronata* 709,7 $\mu\text{g/mL}$; dan *S. Alba* 801,75 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak daun *A. marina* memiliki kemampuan toksisitas lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak lainnya.

Penelitian lain dilakukan oleh Zuraida (2018) mengenai analisis toksisitas beberapa tumbuhan hutan (biji suren (*Toona sureni* (Blume) Merr.), mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.), mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq.), dan saga (*Adenanthera pavonina* L.) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Nilai LC_{50} dari ekstrak etanol biji suren, mahoni, mimba, dan saga berturut-turut adalah 75, 84, 323 dan 449 $\mu\text{g/mL}$. Keempat ekstrak tersebut memiliki bioaktivitas dengan nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$, dan ekstrak biji suren paling berpotensi memiliki bioaktivitas paling tinggi karena nilai LC_{50} paling rendah.

Lestari dkk. (2019) melakukan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap umbi bawang tiwai (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb). Hasil Pengujian BSLT menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki toksisitas LC_{50} sebesar 66,68 ppm (kategori toksik), fraksi *n*-heksana memiliki toksisitas LC_{50} sebesar 47,64 ppm (kategori sangat toksik), fraksi kloroform memiliki toksisitas LC_{50} sebesar 295,1 ppm (kategori toksik), dan fraksi air memiliki toksisitas LC_{50} sebesar 194,54 ppm (kategori toksik).

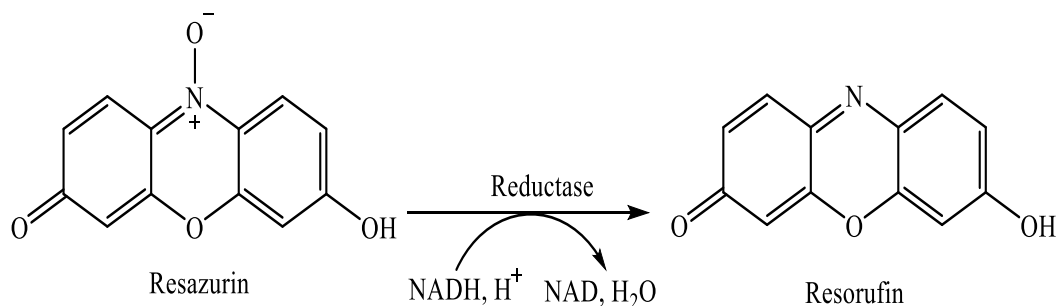
Marliza dan Oktaviani (2021) melakukan uji toksisitas ekstrak etanol daun kemumu (*Colacasia gigantea* Hook) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil penelitian tersebut menunjukkan toksisitas dari ekstrak etanol daun kemumu terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} 75,093 ppm. Hal ini menunjukkan ekstrak etanol daun kemumu bersifat toksik dan berpotensi sebagai antitumor.

2.7 Uji Antitumor

Pengujian aktivitas antitumor dapat dilakukan melalui uji sitotoksik. Uji sitotoksik dilakukan secara *in vitro* untuk menentukan potensi sitotoksik suatu

senyawa, seperti halnya antitumor. Toksisitas merupakan kejadian kompleks secara *in vivo* yang menimbulkan kerusakan sel akibat penggunaan obat antitumor yang bersifat sitotoksik. Respon sel terhadap obat sitotoksik dipengaruhi oleh kerapatan sel (Gordon dkk., 2018).

Uji reduksi resazurin (RR) atau yang dikenal dengan uji *alamarblue* merupakan salah satu uji sitotoksik yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa antitumor. Uji ini digunakan untuk memperkirakan jumlah viabilitas sel dengan mengukur reduksi resazurin menjadi resorufin. Tingkat reduksi dapat diukur dengan spektrofotometer karena resazurin menunjukkan puncak serapan pada 600 nm dan resorufin pada panjang gelombang 570 nm. Metode ini sering digunakan karena cara kerjanya yang cepat, sederhana, akurat, tidak beracun, dan hemat biaya. Komponen aktif dalam uji ini adalah resazurin (*7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide*) yang dapat digunakan sebagai indikator reaksi reduksi oksidasi (Walzl dkk., 2014). Resazurin (alias *alamarblue*) merupakan senyawa berwarna biru (*nonfluorescent*) dengan berat molekul kecil yang dapat direduksi menjadi resorufin berwarna merah muda (*fluorescent*) oleh NADH, NADPH, FADH, atau spesies reduktif lainnya yang berlimpah secara biologis dalam mitokondria atau sitoplasma (Lavogina dkk., 2022) (Gambar 10).



Gambar 11. Reaksi Reduksi Resazurin Menjadi Resorufin (Lavogina dkk., 2022)

Sel tumor payudara yang digunakan untuk uji sitotoksitas terdapat

beberapa macam, antara lain MCF-7, MDA-MB-231, dan T-47D. Sel *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) merupakan salah satu model sel tumor payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diisolasi pertama kali pada tahun 1970 diambil dari jaringan payudara *malignant adenocarcinoma* seorang wanita Kaukasia berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif. Sel MCF-7 merupakan sel yang menyerupai sel epitel yang tumbuh secara *monolayer* dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis tumor payudara pada penderita kanker payudara. Biakan sel MCF-7 memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda termasuk dalam kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kesanggupannya untuk membentuk *dome*. Sel MCF-7 adalah sel yang umum digunakan untuk menguji efek kanker payudara secara *in vitro* karena bentuknya terbaik dari semua jenis sel kanker payudara pada manusia (Gordon dkk., 2018).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah akuades, serbuk magnesium (Merck), larutan FeCl₃ 10%, larutan H₂SO₄ 95% (Merck), asam asetat glasial (Merck), etanol 90% (Merck), pereaksi Dragendorff (Merck), pereaksi Mayer (Merck), pereaksi Wagner (Merck), kertas saring *Whatmann* 40, etil asetat p.a (Merck), *n*-heksana p.a (Merck), metanol p.a (Merck), batang paku gajah (*Angiopteris evecta*), aluminium foil, kertas saring, air laut, telur udang *Artemia salina* Leach, sel tumor payudara MCF-7, *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco 10270-106), cisplatin (EDQM C2210000), antibiotik (Sigma aldrich P4333), *phosphate buffered saline* (PBS) (Gibco 18912-014), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck D1435), *trypan blue* (Sigma aldrich T-8154), media *Roswell park memorial institute* (RPMI) (Gibco 11875-093), reagen *presto blue cell viability* (Thermofisher A13262), dan tripsin-EDTA (Gibco 25200-056).

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium, ayakan 60 mesh, pompa vakum, neraca analitik (Ohaus), instrumen *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC-MS) (UPLC BEH C18 scan ES+), *rotary evaporator*, corong *Buchner*, toples, pisau, *blender*, lampu bohlam 15 watt, vial, spatula, mikropipet 10-100 µL, tabung ependorf (Merk gene follower MCTB015), aerator, inkubator CO₂ (Thermo scientific series 8000DH), *vortex*, *biosafety cabinet* (BSC) (Thermo scientific 1300 series a2),