

**POTENSI ANTIKANKER FRAKSI DIKLOROMETAN
DARI RIMPANG KUNYIT HITAM (*Curcuma caesia*)
HASIL EKSTRAKSI *ULTRASOUND-ASSISTED*
EXTRACTION (UAE)**

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Tugas dan Syarat
Guna Memperoleh Gelar Sarjana S1
Dalam Ilmu Kimia



Oleh:

FIRMAN FAJAR PUTRA ISNADI

2108036067

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG**

2023

LEMBAR KEASLIAN NASKAH

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Firman Fajar Putra Isnadi

NIM : 2108036067

Program studi : Kimia

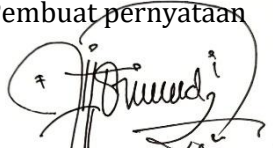
Menyatakan bahwa proposal skripsi yang berjudul:

**POTENSI ANTIKANKER FRAKSI DIKLOROMETAN
DARI RIMPANG KUNYIT HITAM (*Curcuma caesia*)
HASIL EKSTRAKSI *ULTRASOUND-ASSISTED
EXTRACTION (UAE)***

Secara keseluruhan adalah hasil penelitian/karya saya sendiri, kecuali bagian tertentu yang merujuk pada sumbernya.

Semarang,

Pembuat pernyataan



Firman Fajar Putra Isnadi

NIM. 2108036067

PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul : **POTENSI ANTIKANKER FRAKSI
DIKLOROMETAN DARI RIMPANG KUNYIT
HITAM (*Curcuma caesia*) HASIL EKSTRAKSI
ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION (UAE)**

Penulis: Firman Fajar Putra Isnadi

NIM : 2108036067

Prodi : Kimia

Telah diujikan dalam sidang munaqosyah oleh Dewan
Penguji Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo
Semarang dan dapat diterima sebagai salah satu syarat
memperoleh gelar sarjana ilmu Kimia.

Semarang, 24 Desember 2024

DEWAN PENGUJI

Ketua Sidang

Sekretaris Sidang

Ratih Rizqi Nirwana, S.Si., M.Pd

Sri Rahmania, M.Pd

NIP.198104142005012003

NIP.199301162019032017

Penguji I

Penguji II

Dr. R. Arizal Firmansyah,

Ana Mardiyah, M.Si

S.Pd., M.Si

NIP.198905252019032019

NIP.19790819200912160001

Pembimbing

Ratih Rizqi Nirwana, S.Si., M.Pd

NIP.198104142005012003

NOTA DINAS

Kepada

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri Walisongo

Di Semarang

Assalamualaikum Wr. Wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan, dan koreksi naskah proposal skripsi dengan:

Judul : **POTENSI ANTIKANKER FRAKSI
DIKLOROMETAN DARI RIMPANG
KUNYIT HITAM (*Curcuma caesia*) HASIL
EKSTRAKSI *ULTRASOUND-ASSISTED
EXTRACTION* (UAE)**

Nama : **Firman Fajar Putra Isnadi**

NIM : **2108036067**

Jurusan : **Kimia**

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diujikan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang *Munaqosah* (Seminar Hasil Penelitian).

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Pembimbing



Ratih Rizqi Nirwana, S. Si. M. Pd

NIP. 198104142005012003

ABSTRAK

Judul : **POTENSI ANTIKANKER FRAKSI DIKLOROMETAN DARI RIMPANG KUNYIT HITAM (*Curcuma caesia*) HASIL EKSTRAKSI *ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION* (UAE) MELALUI METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)**

Nama : Firman Fajar Putra Isnadi

NIM : 2108036067

Penelitian ini mengkaji potensi antikanker fraksi diklorometan dari rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE). Ekstraksi bertingkat dilakukan dengan pelarut n-heksana (non-polar), diklorometan (semi-polar), dan etanol (polar), menghasilkan rendemen masing-masing sebesar 0,71%, 8,14%, dan 5,06%. Uji toksisitas fraksi diklorometan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 8,15 ppm, mengindikasikan sifat sangat toksik dan potensi antikanker. Analisis fitokimia menunjukkan fraksi diklorometan mengandung alkaloid dan asam askorbat, yang diduga berkontribusi pada aktivitas sitotoksiknya. Penelitian ini menegaskan efektivitas UAE sebagai metode ekstraksi non-konvensional yang optimal dalam menghasilkan senyawa aktif, serta mendukung fraksi diklorometan memiliki potensi antikanker alami.

Kata kunci: Rimpang Kunyit Hitam (*Curcuma caesia*), *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE), Fraksi diklorometan, Fitokimia, LC_{50} (*Lethal Concentration 50*).

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Tuhan Yang Maha Esa, atas limpahan rahmat, bimbingan, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **POTENSI ANTIKANKER FRAKSI DIKLOROMETAN DARI RIMPANG KUNYIT HITAM (*Curcuma caesia*) HASIL EKSTRAKSI *ULTRASOUND-ASSINTED EXTRACTION* (UAE) MELALUI METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)**. Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi di Universitas Islam Negeri (UIN) Walisongo.

Penyelesaian skripsi ini tidak akan terwujud tanpa dukungan, bantuan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan kontribusi, baik secara langsung maupun tidak langsung, selama proses penulisan skripsi ini. Ucapan terima kasih secara khusus disampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Nizar Ali, M.Ag. selaku Rektor UIN Walisongo, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk menempuh pendidikan di UIN Walisongo.

2. Bapak Prof. Dr. H. Musahadi, M.Ag. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi yang telah memfasilitasi dan mendukung berbagai kegiatan akademik yang berkaitan dengan penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Ratih Rizqi Nirwana, S.Si., M.Pd. selaku dosen pembimbing skripsi, yang telah dengan sabar dan teliti memberikan bimbingan, nasihat, dan dukungan moril yang tidak ternilai harganya kepada penulis selama proses penyelesaian tesis ini. Saran dan masukan yang diberikan sangat membantu dalam pengembangan ide dan penyusunan skripsi.
4. Ibu Mulyatun, M.Si. selaku Ketua Program Studi yang telah memberikan dukungan dan dorongan selama proses pembelajaran akademik dan kegiatan terkait.
5. Ibu Kholidah, M. Si dan Bapak Kustomo, M.Si., selaku dosen wali penulis yang senantiasa sabar dalam menasehati dan tidak lupa selalu memberikan motivasi kepada penulis bahwa segala sesuatu harus dilewati dan dicoba tanpa merasa takut sebelum melangkah.
6. Bapak Dr. R. Arizal Firmansyah S.Pd., M.Si dan Ibu Dr. Anisa Adiweni Putri, M.Sc. selaku dosen yang memotivasi penulis untuk giat belajar, hingga penulis bisa mendapatkan nilai memuaskan yang sebelumnya tidak pernah penulis dapatkan, sebagai bentuk pembuktian

kepada diri penulis bahwa semua bisa dilalui dengan bagaimanapun caranya.

7. Seluruh dosen pengajar di Program Studi Kimia, yang telah memberikan ilmu, wawasan, dan pengalaman yang sangat berharga selama masa perkuliahan, yang telah memberikan kontribusi yang sangat berarti dalam pemahaman dan penyelesaian skripsi ini.
8. Bapak Ismadi dan Ibu Yuliana, Kedua orang tua penulis tercinta, yang senantiasa memberikan dukungan moral, spiritual, dan material selama penulis menempuh pendidikan dan penulisan skripsi ini. Kasih sayang, doa, dan dorongan mereka telah menjadi sumber kekuatan utama bagi penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. Azza Fauzun Nada, selaku rekan Penerbit Himawari yang telah memberikan dedikasinya dalam membersamai gerakan sosial melek literasi dan membantu mahasiswa untuk mengabadikan kisah/karyanya dalam buku ber-ISBN.
10. Rekan-rekan mahasiswa di Program Studi Kimia, Sahabat PMII, dan Kawan Komunitas Rumah Login, yang telah berbagi suka dan duka dalam menempuh pendidikan, serta saling memberikan dukungan, berbagi ilmu, dan inspirasi selama proses penulisan skripsi ini.

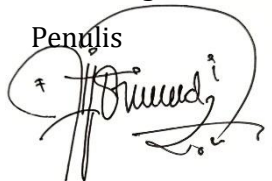
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, namun telah memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna, baik dari segi isi maupun penyajiannya. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan untuk lebih menyempurnakan tesis ini di masa yang akan datang.

Akhir kata, penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan manfaat yang berarti, baik bagi penulis maupun bagi kemajuan ilmu pengetahuan di bidang Kimia. Semoga segala usaha dan kerja keras yang telah dilakukan dalam penulisan skripsi ini mendapat berkah dari Tuhan Yang Maha Esa.

Semarang, 24 Desember 2024

Penulis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Firman Fajar Putra Isnadi', enclosed within a large, loopy circular flourish.

Firman Fajar Putra Isnadi

DAFTAR ISI

LEMBAR KEASLIAN NASKAH	ii
PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
NOTA DINAS.....	iv
ABSTRAK	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I.....	17
A. Latar Belakang	17
B. Rumusan Masalah	21
C. Tujuan Penelitian	21
D. Manfaat Penelitian	22
BAB II	23
A. Landasan Teori.....	23
1. Curcuma caesia	23
2. Ekstraksi	26
3. Kandungan senyawa dalam kunyit hitam (<i>Curcuma caesia</i>)	31

4. Interaksi molekuler antara golongan senyawa aktif dan larva udang <i>Artemia salina</i> Leach	41
5. Antikanker.....	45
6. Pengujian Potensi Antikanker <i>Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)</i>	47
B. Tinjauan Pustaka	51
C. Hipotesis.....	55
BAB III	56
A. Tempat dan Waktu	56
B. Alat dan Bahan	56
C. Metodologi Penelitian.....	57
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	68
A. Preparasi dan Ekstraksi Kunyit Hitam (<i>Curcuma caesia</i>)	68
B. Penapisan Fitokimia Ekstrak Kunyit Hitam (<i>Curcuma caesia</i>)	72
1. Identifikasi senyawa alkaloid	72
2. Identifikasi senyawa flavonoid	75
3. Identifikasi senyawa terpenoid	78
4. Identifikasi senyawa steroid	80
5. Identifikasi senyawa asam askorbat	81
6. Identifikasi senyawa kurkumin.....	83
C. Uji Toksisitas Kunyit Hitam (<i>Curcuma caesia</i>)	

D. Pengaruh Senyawa Aktif dan Mekanisme Reaksi Terhadap Sel Kanker	93
BAB V.....	100
A. Kesimpulan.....	100
B. Saran	100
DAFTAR PUSTAKA.....	102
DATA LAMPIRAN	127

DAFTAR GAMBAR

gambar 2. 1 daun kunyit hitam.....	24
gambar 2. 2 batang, bunga, dan rimpang kunyit hitam..	25
gambar 2. 3 struktur kurkumin.....	33
gambar 2. 4 struktur epigenin	34
gambar 2. 5 struktur cynaropicrin.....	35
gambar 2. 6 struktur barbarine.....	37
gambar 2. 7 struktur efedrin	38
gambar 2. 8 struktur taxol.....	38
gambar 2. 9 struktur asam askorbat.....	39
gambar 2. 10 struktur limonen	40
gambar 2. 11 interaksi molekuler pada fraksi diklorometana (alkaloid dan asam askorbat) terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang.....	43
gambar 2. 12 interaksi molekuler pada fraksi n-heksan (alkaloid dan terpenoid) terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang	43
gambar 2. 13 interaksi molekuler pada fraksi etanol (flavonoid, steroid, asam askorbat, dan kurkumin terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang.....	44
gambar 2. 14 larva udang <i>Artemia salina</i> Leach.	49
gambar 3. 1 analisa probit SPSS	66
gambar 3. 2 nilai probit	67
gambar 4. 1 hasil uji alkaloid (urut dari kiri: fraksi n- heksana, diklorometana, etanol)	74
gambar 4. 2 mekanisme reaksi alkaloid dengan reagen hager.....	75

gambar 4. 3 hasil uji flavonoid (urut dari kiri: fraksi n-heksana, diklorometana, etanol	76
gambar 4. 4 mekanisme reaksi penapisan flavonoid dengan HCl dan Zn.....	77
gambar 4. 5 hasil uji triterpenoid (urut dari kiri: fraksi n-heksana, diklorometana, etanol)	79
gambar 4. 6 mekanisme reaksi senyawa terpenoid dengan H_2SO_4	79
gambar 4. 7 Hasil uji steroid (urut dari kiri: fraksi n-heksana, diklorometana, etanol)	80
gambar 4. 8 mekanisme reaksi senyawa steroid dengan H_2SO_4	81
gambar 4. 9 hasil uji asam askorbat (urut dari kiri: fraksi diklorometana, n-heksana, etanol)	82
gambar 4. 10 mekanisme reaksi asam askorbat dengan DNPH.....	83
gambar 4. 11 reaksi metanol dengan kurkumin	84
gambar 4. 12 hasil uji refrensi	85
gambar 4. 13 hasil KLT lapis tipis kurkumin (dari kiri fraksi etanol, diklorometan, dan n-heksan.	86
gambar 4. 14 usulan interaksi molekuler pada fraksi n-heksan (alkaloid dan terpenoid) terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang	97
gambar 4. 15 usulan interaksi molekuler pada fraksi diklorometana (alkaloid dan asam askorbat) terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang	97
gambar 4. 16 usulan interaksi molekuler pada fraksi etanol (flavonoid, steroid, asam askorbat, dan kurkumin terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang	98

DAFTAR TABEL

tabel 4 1 hasil ekstraksi	70
tabel 4 2 hasil uji penapisan fitokimia	73
tabel 4 3 hasil uji toksisitas fraksi n-heksan metode BSLT	88
tabel 4 4 hasil uji toksisitas fraksi diklorometan metode BSLT	89
tabel 4 5 hasil uji toksisitas fraksi etanol metode BSLT ..	91
tabel 4 6 ringkasan hasil peneltian.....	92

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker merupakan kondisi sel yang tumbuh secara abnormal bersifat tidak menular, tetapi sebagai penyakit yang ganas dan dapat merambat ke jaringan sel lain secara cepat, bahkan kanker menjadi penyakit penyebab kematian nomor dua di dunia, setelah radio vaskular. Tercatat dalam *World Cancer Research Fund Internasional* pada tahun 2020 diperkirakan terdapat 18,1 juta pengidap penyakit kanker di dunia, dari jumlah keseluruhan 9,3 juta terjadi pada pria dan 8,8 juta pada wanita. *World Health Organization* (WHO) mengungkapkan kanker payudara sebagai jenis kanker dengan predikat pertama dunia dengan jumlah 2,26 juta kasus, kemudian diikuti dengan kanker paru-paru sejumlah 2,21 juta kasus di dunia, dan peringkat ketiga di tempati kanker usus besar dan rektum dengan jumlah 1,93 juta kasus di dunia. Setiap tahunnya, diperkirakan terdapat 400.000 anak mengidap penyakit kanker, dengan jenis kanker paling umum di 23 negara berupa kanker serviks (Nasir et al., 2020). Sedangkan, menurut Kementerian Kesehatan Indonesia pada tahun 2020 terdapat 396.914 kasus kanker di Indonesia, dengan

jumlah kematian mencapai lebih dari 22.000 jiwa kasus (Rokom, 2022).

Pengobatan penyakit kanker pada umumnya diobati melalui beberapa metode, diantaranya kemoterapi, radiasi, atau operasi. Metode tersebut sebagai upaya dalam menghancurkan sel berbahaya yang mengakibatkan kanker, akan tetapi diperlukan biaya yang cukup besar dengan persentase kesembuhan kurang memuaskan, bahkan memberikan efek samping bagi penderita kanker itu sendiri. Efek yang disebabkan dari operasi ialah tidak sepenuhnya efektif untuk menghilangkan sel kanker yang telah tersebar (metastasis), pengobatan melalui radiasi dapat berakibat mematikan sel normal lainnya, sedangkan kemoterapi dapat menyebabkan resistensi, berakibat sel kanker bersifat tidak sensitif (Hausman, 2019). Selain itu, kemoterapi dapat menyebabkan efek samping seperti muntah, mual, rambut rontok, iritasi kandung kemih (sistitis) disertai darah dalam air kemih (Hausman, 2019).

Pengobatan alternatif dibutuhkan sebagai rujukan penderita kanker, efek samping dari pengobatan pada umumnya masih banyak dan kurang maksimal. Penelitian uji toksisitas yang dapat digunakan sebagai antikanker

semakin diupayakan. Nilai *Lethal Concentration* 50% (LC_{50}) sebagai indikator yang menunjukkan konsentrasi zat toksik, untuk mengetahui tingkat toksisitas senyawa aktif dengan diketahui berdasarkan tersebut. Berbeda dengan uji IC_{50} (*Inhibisi Concentration* 50%) diperuntukkan untuk identifikasi senyawa antioksidan, pengukuran aktivasi diperoleh dari nilai IC_{50} yang menunjukkan kemampuan senyawa dalam menghambat proses oksidasi sebesar 50% (Weroy K. et al., 2019). Aplikasi pengujian toksisitas dapat diuji coba pada mencit (*Mus musculus*) (Ulfa et al., 2018), udang (*Artemia salina*) (Habibi et al., 2023), tikus (*Rattus norvegicus*) dan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) (Maysa et al., 2016).

Tahap uji LC_{50} terhadap *Curcuma caesia* diperlukan dalam memperoleh indikator sifat toksik, sebagai tahap awal memperkirakan kemampuan ekstrak *Curcuma caesia* sebagai antikanker. Kajian tambahan untuk memperkuat dugaan adanya potensi antikanker dapat dilakukan pada genus *Curcuma*. Genus *curcuma* telah banyak diyakini sebagai antikanker, sebagaimana dinyatakan menurut perspektif kemotaksonomi bahwa tumbuhan yang masih berkerabat dekat dalam taksonominya mengandung senyawa kimia yang sama atau mirip (Hao & Xiao, 2020).

Al-amin (2019) lebih khusus melaporkan bahwa senyawa aktif antikanker dari rimpang *Curcuma caesia* adalah *curcuzederone*. Senyawa *curcuzederone* ini terbukti aktif melawan sel kanker payudara. Senyawaini berasal dari fraksi kloroform. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa *curcuzederone* termasuk senyawa non-polar (kepolarannya sama dengan kloroform). Namun demikian, tidak menutup kemungkinan senyawa aktif lainnya yang kepolarannya berbeda dengan *cuurcuzederone* terdapat dalam dalam rimpang *Curcuma caesia*.

Fraksi lainnya dalam *Curcuma caesia*, yaitu fraksi n-heksan dan etanol dilaporkan juga mengandung senyawa aktif menghambat sel tumor (Jain, 2018). Sementara fraksi diklorometan dari rimpang *Curcuma caesia* berpotensi sebagai antioksidan dengan IC_{50} 80,13 $\mu\text{g/mL}$ (Ibrahim et al., 2023). Hal ini menarik karena senyawa aktif dalam fraksi diklorometan diduga memiliki aktifitas antikanker. Namun demikian, dugaan ini perlu diverifikasi melalui uji sitotoksik. Berdasarkan penelusuran literatur, uji sitotoksik terhadap fraksi diklorometan belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, hal ini menjadi peluang dilakukan penelitian lebih lanjut.

Uji sitotoksik awal pada penelitian dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji sitotoksik ini dilakukan pada tiga fraksi, yaitu n-heksana, diklorometan, ke etanol. Untuk memperoleh ketiga fraksi tersebut dilakukan ekstraksi *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE). Metode ekstraksi ini dipilih dikarenakan hasil ekstraksi yang diperoleh memungkinkan lebih banyak senyawa aktif yang terekstrak dibanding metode maserasi (refrensi).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan permasalahan yang melatar belakangi topik pembahasan pada penelitian yang akan dilakukan, dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah sebagai acuan penelitian, yaitu:

1. Golongan senyawa aktif apa yang terkandung dalam fraksi n-heksana, diklorometan, dan etanol?
2. Berapa nilai LC_{50} pada uji potensi antikanker ekstrak rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) melalui metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)?

C. Tujuan Penelitian

Rumusan masalah yang telah dituliskan menjadi tendensi penelitian yang dilakukan untuk mencapai hal yang diinginkan, melalui hal tersebut tujuan penelitian memiliki tujuan, yaitu:

1. Untuk memberikan informasi golongan senyawa aktif dalam fraksi n-heksana, diklorometan, dan etanol.
2. Mengetahui potensi kunyit hitam (*Curcuma caesia*) sesuai uji laboratorium dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) melalui nilai LC_{50} .

D. Manfaat Penelitian

Penelitian yang dilakukan diharapkan dapat selaras dengan rumusan masalah, tujuan penelitian, dan dapat memberikan dapat positif, sehingga diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan pengetahuan baru dalam analisis kimia mengenai tanaman herbal, terutama kebermanfaatan kunyit hitam (*Curcuma caesia*) sebagai antikanker.
2. Meningkatkan penggunaan kunyit hitam sebagai tanaman herbal yang berpotensi tinggi dalam pengobatan antikanker.
3. Membuka peluang usaha budidaya kunyit hitam di daerah Jawa Tengah sebagai meningkatkan potensi lapangan kerja di bidang pertanian dan kesehatan dari tanaman herbal.

BAB II

LANDASAN TEORI

A. Landasan Teori

1. *Curcuma caesia*

Kunyit hitam sebagian tanaman herbal merupakan tanaman yang tergolong pada keluarga *Zingiberaceae*. Termasuk famili tumbuhan terbesar dari ordo *Zingibarelas*, dengan perkiraan kurang lebih dari 50 genus dan 1000 spesies dari famili tersebut. Masyarakat mengenal famili *Zingiberaceae* sebagai tanaman jahe-jahean, dengan pemanfaatan sebagai bumbu masakan, pemberi rasa, bahan minyak wangi, dan tanaman hias. Selain itu, dalam bidang farmakologi *Zingiberaceae* dimanfaatkan sebagai obat herbal antioksidan pada umumnya. Salah satu spesies dari *Zingiberaceae*, yaitu Kunyit hitam dengan nama ilmiah *Curcuma caesia*, sering ditemui di daerah tropis dengan taksonomi tumbuhannya sebagai berikut (Nuraeni, 2023):

Kingdom: *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*

Sub divisi: *Angiospermae*

Kelas : *Monocotyledonae*

Ordo : *Zingiberales*

Famili : *Zingiberaceae*

Genus : *Curcuma*

Spesies : *Curcuma caesia* Roxb.

Kunyit hitam biasa dibudidaya dalam polybag, umumnya di usia 3-4 bulan kunyit hitam tumbuh daun sejumlah 4-5. Tanaman kunyit hitam memiliki tinggi hingga mencapai 100 cm, dengan banyak daun mencapai 8 lembar. Kunyit hitam memiliki batang semu, tegak, bulat, dan terdiri dari pelepah daun (sedikit lunak). Bentuk daun kunyit hitam termasuk daun tunggal berbentuk lanset dengan panjang 10-40 cm, lebar 8-12,5 cm, dan bertulang menyirip berwarna hijau pucat. Bentuk daun kunyit hitam dapat dilihat pada gambar 2.1 (Budi et al., 2023).



gambar 2. 1 daun kunyit hitam

Selain itu, kunyit hitam memiliki bunga majemuk yang berambut dan bersisik dari puncak batang semu, dengan panjang berkisar 10-15 cm, serta terdapat mahkota berukuran 1,5-3,0 cm berwarna putih kekuningan. Memiliki rimpang dengan warna kulit arinya jingga kecokelatan, sedangkan warna daging rimpang ungu kebiruan, Adapun gambar dari bunga, batang, dan rimpang dari kunyit hitam dapat dilihat pada gambar 2.2 (Budi et al., 2023).



*gambar 2. 2 batang, bunga, dan
rimpang kunyit hitam*

Kunyit hitam dapat tumbuh subur dalam tanah yang gembur, dengan jenis tanah yang ringan berbahan organik tinggi atau tanah lempung berpasir yang terbebas dari genangan air atau sedikit basah. Selain itu, pengaruh ketinggian daerah tanam juga dapat mempengaruhi

pertumbuhan dan juga kandungan dalam kunyit hitam. Kunyit hitam dapat tumbuh di daratan dengan ketinggian dari 240 mdpl hingga 2000 mdpl (Budi et al., 2023).

Kandungan dalam kunyit hitam sangat beragam, seperti senyawa metabolit sekunder berupa kurkumin, alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, flavonoid, tanin, fenol, dan asam askorbat. Tidak heran kunyit hitam diprediksikan dapat digunakan sebagai antikanker alami, sehingga sering digunakan sebagai obat terasional. Bahkan, kunyit hitam dapat berperan sebagai antibakteri dengan jenis tertentu. Bakteri yang dapat dibunuh dari ekstrak kunyit dengan jenis *Staphylococcus aureus* hingga *Staphylococcus epidermidis* (Nuraeni S., 2023).

2. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat kimia dari simplisia dalam keadaan yang saling tercampur, dengan cara dilarutkan menggunakan pelarut untuk melarutkan zat kimia di dalamnya. Teknik ekstraksi bertujuan mendapatkan senyawa atau zat tertentu dalam sampel, baik senyawa yang sudah diketahui atau belum diketahui. Proses

ekstraksi perlu memperhatikan teknik yang sesuai dengan karakteristik dari sampel yang digunakan atau mempertimbangkan senyawa yang diinginkan tanpa terjadi degradasi (RohmanYulianto & Devina, 2024).

Teknik ekstraksi yang baik yaitu teknik ekstraksi yang dapat menghasilkan senyawa produk sebanyak mungkin, cepat, mudah dilakukan, murah, ramah lingkungan, dan hasil yang diperoleh selalu konsisten ketika dilakukan berulang kali (Rohman Yulianto & Devina, 2024). Berdasarkan jenisnya, secara umum metode ekstraksi diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu metode konvensional dan metode non-konvensional. Metode ekstraksi konvensional yang paling sering digunakan berupa ekstraksi maserasi, akan tetapi terdapat kelemahan dalam proses ekstraksi, yaitu waktu ekstraksi yang lama, penggunaan pelarut yang banyak, dan hasil yang kurang maksimal. Metode maserasi dengan bantuan gelombang ultrasonik menjadi alternatif ekstraksi non-konvensional yang dapat dilakukan. Adapun secara lengkap sebagai berikut:

a. Metode Ekstraksi Konvensional

Teknik maserasi dilakukan dengan cara merendam bagian tanaman secara utuh yang sudah digiling kasar, kemudian direndam dengan pelarut dalam bejana tertutup pada suhu kamar, sekurang-kurangnya selama tiga hari, dengan dilakukan pengadukan berkali-kali sampai bahan dapat larut dengan pelarut. Keuntungan dari teknik maserasi, yaitu sampel bahan alam yang akan diambil ekstraknya tidak harus melalui penggilingan sampai berwujud bubuk halus, tidak perlu keahlian khusus. Namun, memiliki kekurangan diantaranya perlu dilakukan penggojogan, penyaringan, dan mutu produk yang tidak konsisten pada hasil akhir produk (Puspita et al., 2024).

b. Metode Ekstrak berbantu gelombang ultrasonik (*Ultrasound-Assisted Extraction/ UAE*)

Teknik yang dilakukan memanfaatkan bantuan dari gelombang ultrasonik, dengan frekuensi diantara 20 kHz hingga 2000 kHz untuk meningkatkan permeabilitas sel tanaman dan membangkitkan kavitasi. Proses kavitasi yang terjadi berakibat pembentukan dan pemecahan gelembung. Gelembung yang terjadi

ketika gelombang berbenturan di dekat sampel, gelembung akan pecah secara asimetris dan menghasilkan gerakan pelarut yang cepat seperti jet. Lucutan gerakan inilah yang berakibat pada penetrasi dari tanaman yang diekstraksi. Pemanfaatan energi ultrasonik, sehingga pengeluaran ekstrak dalam sampel dapat lebih cepat dan mengikat secara maksimal senyawa yang terkandung dalam sampel. Selain itu, kelebihan lainnya ialah rentang waktu yang relatif singkat, rendah energi, dan sedikit pelarut.

Hasil penelitian Fauziyah (2022), memperoleh kadar pelarut sisa ekstraksi sebanyak 47% dengan total rendemen 69% dari berat sampel sebanyak 3 kg. hasil tersebut menjadi pendukung terhadap pemilihan metode UAE sebagai proses ekstraksi yang baik dan efisien, dikarenakan waktu yang dibutuhkan relatif lebih banyak memperoleh rendemen dalam sampel, karena reaksi yang diakibatkan dari gelombang ultrasonik tersebut. Selain itu, proses ekstraksi lebih cepat dibandingkan metode konvensional, sehingga bisa meminimalisir waktu yang terbuang akibat

menunggu proses ekstraksi konvensional yang relatif lama. Selain itu, proses ekstraksi tanpa dilakukan pemanasan dari luar yang lebih aman menjaga sampel dari kerusakan (Fauziyah et al., 2022).

Pemilihan ekstraksi sampel akan mempengaruhi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya, dikarenakan senyawa aktif rentan akan temperatur tinggi, sehingga diantara variabel yang perlu diperhatikan dalam proses ekstraksi berupa temperatur, jenis pelarut, dan waktu. Penelitian dari Kumar (2021), menyatakan UAE cocok untuk proses pengambilan senyawa bioaktif dalam sampel, dikarenakan suhu ekstraksi rendah, waktu yang sangat singkat, rendah daya, dan pelarut sisa yang lebih banyak (Kumar et al., 2021).

Proses ekstraksi yang baik dan sesuai akan memberikan hasil yang signifikan dalam tahapan selanjutnya. Oleh sebab itu, penting dalam pemilihan metode ekstraksi, supaya tidak terjadi dekomposisi dan degradasi senyawa aktif. Metode UAE dalam penelitian Vinatoru, dkk. (2017) mengungkapkan bahwa metode UAE dapat menjaga komposisi senyawa aktif yang terkandung

tanpa terjadi proses degradasi, sehingga UAE disarankan sebagai metode untuk proses sintesis bahan alam (Vinatoru, 2017).

3. Kandungan senyawa dalam kunyit hitam (*Curcuma caesia*)

Penapisan fitokimia sebagai salah satu cara pengujian untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam sampel bahan alam, dengan hasil pengujian berupa data kualitatif. Melalui penapisan fitokimia dapat diketahui golongan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya dan dapat menjadi kemungkinan sebagai senyawa antikanker. Uji penapisan fitokimia dilakukan untuk membuktikan kandungan kurkumin, flavonoid, fenolik, asam askorbat, dan terpenoid, dan steroid yang diperkirakan sebagai komponen utama dalam memberikan manfaat antikanker.

Penelitian antioksidan dari rimpang kunyit hitam yang telah dilakukan Kartini, dkk. (2024) memperoleh hasil positif uji penapisan fitokimia berupa alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan saponin. Metode ekstraksi maserasi yang dilakukan menggunakan pelarut etanol 96%, sehingga belum diketahui golongan senyawa aktif sesuai tingkat

kepolarannya, dikarenakan pelarut etanol sebagai pelarut universal yang dapat mengikat senyawa non-polar hingga polar (Kartini et al., 2024).

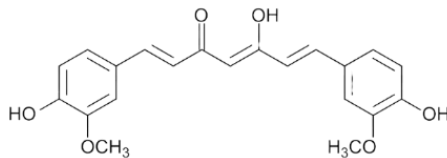
a. Kurkumin

Kurkumin merupakan salah satu senyawa aktif yang terdapat pada tanaman kunyit. Umumnya kurkumin dimanfaatkan sebagai bahan aditif, pemanfaatan sebagai bahan aditif berupa pewarna makanan. Secara tradisional kurkumin digunakan sebagai penambah stamina dan menjaga kesehatan, disajikan berupa perasan serat atau biasa disebut sebagai jamu. Pemanfaatannya digunakan sebagai obat alternatif nyeri perut, sembelit, infeksi saluran kencing, rematik, bengkak, hepatitis, bahkan dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan sakit setelah melahirkan (Gorzi, 2020).

Kurkumin di dalamnya terkandung protein (6,3%), lemak (5,1%), mineral (3,5%), karbohidrat (69,4%), air (13,1%), minyak esensial (5,8%), α -phellandrene (1%) sabinene (0,6%) cineol (1%) bomeol (0,5%) zingiberene (25%) dan sesquiterpen (53%). Kurkumin

(diferuloylmethan) (3-5%), kurkumin I 94% kurkumin II 6% dan kurkumin III (0,3%) (Sardjiman, 2024).

Berdasarkan penelitian Naganuma (2017) melakukan penelitian terhadap aktivitas kurkumin secara in-vitro pada sel Caco-2 didapati hasil penelitian yang menunjukkan kebermanfaatan dan fungsi dari kurkumin sebagai antikanker. Struktur kurkumin ditunjukkan pada gambar 2.3 (Nurhadi, 2018).

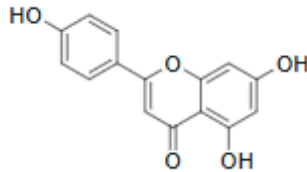


gambar 2. 3 struktur kurkumin

b. Flavonoid

Senyawa flavonoid merupakan senyawa polifenol yang mengandung dua inti fenolik yang dihubungkan melalui tiga satuan karbon. Keberadaan flavonoid kebanyakan terletak pada daun tanaman, dikarenakan flavonoid terbentuk dari proses fotosintesis tanaman, sehingga pada daun muda diketahui tidak mengandung flavonoid yang tinggi. Struktur yang terdapat pada flavonoid ialah atom karbon sebanyak 15,

dengan dihubungkan satuan karbon. Adapun gambar dari salah satu turunan struktur flavonoid berupa epigenin ditunjukkan pada gambar 2.4 (Nugraha, 2017).



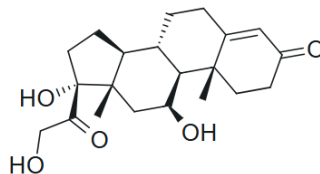
gambar 2. 4 struktur epigenin

Kebermanfaatan flavonoid memiliki kebermanfaatan yang tinggi. Secara farmakologi, flavonoid dimanfaatkan sebagai antioksidan. Kerja flavonoid dalam menangkal radikal bebas ialah secara mensupersi pembentukan *Reactive Oxygen Species* sebagai penghambat enzim-enzim atau mengikat *trace element*, sehingga meningkatkan proteksi dan regulasi dari antioksidan (Widiasari, 2018). Kebermanfaatan lainnya dari flavonoid dapat digunakan sebagai anti hipertensi, anti inflamasi, anti bakteri, bahkan flavonoid dapat dimanfaatkan sebagai antikanker. Pada prosesnya sebagai penghambat aktivitas reseptor tiroksin, dimana berperan

sebagai peningkat keganasan dari sel abnormal kanker (Widiasari, 2018).

c. Steroid

Steroid sebagai senyawa metabolit sekunder memiliki struktur dasar dengan keberadaan 17 atom C dengan struktur sikloheksana sebanyak 3 struktur dan 1 struktur siklopentana. Bentuk struktur steroid relatif berbeda-beda, dengan banyak variannya memberikan manfaat yang berbeda pula. Beberapa contoh dari senyawa steroid berupa antibiotik, kolesterol, asam empedu, vitamin D, hormon seks, dan kortikoid.



gambar 2. 5 struktur cynaropicrin

Steroid sering kali dimanfaatkan sebagai terapi medis, seperti halnya sebagai anti inflamasi. Adapun struktur turunan dari steroid berupa cynaropicrin diperlihatkan pada gambar 2.5.

d. Alkaloid

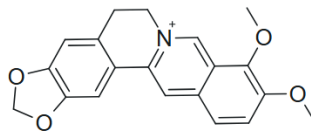
Senyawa alkaloid merupakan senyawa organik yang bersifat basa, pada umumnya memiliki ikatan dengan atom oksigen dan nitrogen dalam struktur heterosiklik. Senyawa alkaloid memiliki manfaat sebagai antifungal yang baik, dalam penghambat esterase DNA dan RNA polymerase. (Elfira et al., 2024). Cara kerja alkaloid sebagai antifungal, bergerak dengan cara merusak membran dinding sel. Alkaloid berikatan kuat dengan ergosterol, kemudian membentuk lubang yang menyebabkan kerusakan dari dinding membran (Chatri, 2018).

Alkaloid pada tumbuhan berfungsi sebagai racun, sebagai pelindung tanaman dari serangga, manfaat lainnya alkaloid sebagai penyuplai nitrogen pada tumbuhan. Senyawa alkaloid yang bersifat anti fungi dapat merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel, sehingga menyebabkan gagalnya proses pembentukan dinding sel secara utuh dan akan menyebabkan sel menjadi mati. Secara umum alkaloid terbagi dalam tiga jenis, yaitu true

alkaloid, proto alkaloid, dan pseudo alkaloid (Chattri, 2018).

1) *True* alkaloid

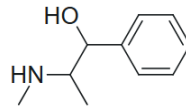
Senyawa jenis alkaloid yang bersifat basa, toksik, dengan struktur fisiologi yang cukup besar dengan kandungan unsur nitrogen dalam cincin heterosiklik dari turunan asam amino. Senyawa yang termasuk jenis *true* alkaloid salah satunya, yaitu barbarin dengan struktur ditunjukkan pada gambar 2.6 (Chattri, 2018).



gambar 2. 6 struktur barbarine

2) Proto alkaloid

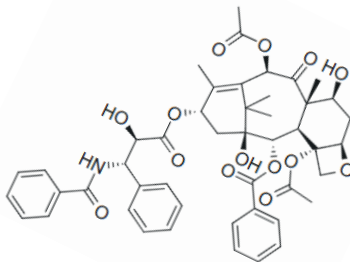
Senyawa alkaloid jenis ini memiliki struktur asam amino yang lebih sederhana, dimana unsur nitrogen tidak berada dalam cincin heterosiklik. Efedrin termasuk salah satu senyawa yang termasuk dalam jenis ini, dengan struktur yang diperlihatkan pada gambar 2.7 (Chattri, 2018).



gambar 2. 7 struktur efedrin

3) Pseudo alkaloid

Alkaloid jenis psedo tidak diturunkan dari asam amino, dengan sifat dasar berupa basa, struktur lebih sederhana dan tidak selalu heterosiklik, serta biosintesisnya tidak diturunkan langsung dari asam amino melainkan dari prekursor yang berikatan langsung dengan asam amino. Contoh alkaloid berupa taxol dengan struktur pada gambar 2.8 (Chatri, 2018).



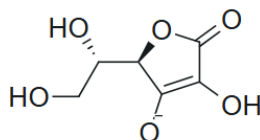
gambar 2. 8 struktur taxol

e. Asam askorbat

Asam askorbat mengandung antioksidan yang melindungi sel-sel dari radikal bebas, dan

juga dapat mencegah kanker melalui mengurangi cedera jaringan akibat stres oksidatif (Lamontagne et al., 2022). Berat molekul dari asam askorbat ialah 176,13 gr/mol dengan rumus molekulnya $C_6H_8O_6$ atau biasa disebut asam L-askorbat merupakan antioksidan yang larut dalam air (Winarsi, 2007).

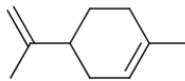
Bentuk dari asam askorbat dalam keadaan teroksidasi berupa asam dehidroaskorbat, dimana asam askorbat bermanfaat sebagai antioksidan dan antikanker yang baik. Mekanismenya asam askorbat dapat menjadi donor hidrogen pada radikal oksigen, dengan aktivitas singlet oxygen, dan penghilang oksigen monokuler. Struktur asam askorbat dapat dilihat pada gambar 2.9 (Muchtadi, 2013).



gambar 2. 9 struktur asam askorbat

f. Terpenoid

Terpenoid adalah biasa dikenal sebagai isoprenoid sebagai senyawa organik yang terdiri dari unit isoprena (C_5H_8) dan struktur isoprena sebagai struktur utama dalam membangun terpenoid. Terpenoid juga salah satu senyawa yang paling umum ditemukan dalam bahan alam, memiliki bau yang menyengat, dan tidak dapat larut dalam air. (Ryle, 2023).



*gambar 2. 10 struktur
limonen*

Pada penelitian terakhir sejak 2010, terpenoid memiliki manfaat sebagai antibakteri yang baik, didapati hasil penelitian lain mengungkapkan bahwa terpenoid dapat digunakan sebagai anti jamur dengan dikombinasikan dengan minyak sage. Jamur yang dapat diatasi dari senyawa aktif terpenoid diantaranya kutu air dan infeksi kulit (Ryle, 2023).

Perpaduan terpenoid dengan asam askorbat dan minyak jeruk, berpotensi sebagai antioksidan kuat. Kebermanfaatan terpenoid sebagai antikanker terdapat pada senyawa turunannya berupa triterpenoid. Penelitian lanjutan, memberikan hasil yang mengatakan bahwa triterpenoid dapat digunakan sebagai penyakit radio vaskular, melalui penurunan lipoprotein densitas rendah atau kolesterol jahat (Ryle, 2023). Rumus molekul dari triterpenoid terdiri dari tiga sikloheksana dan satu siklopentana, dengan gugus tambahan berupa gugus hidroksil, gugus metil, atau lain sebagainya. Struktur salah satu senyawanya berupa limonen ditampilkan pada gambar 2.10 (Doherty, 2023).

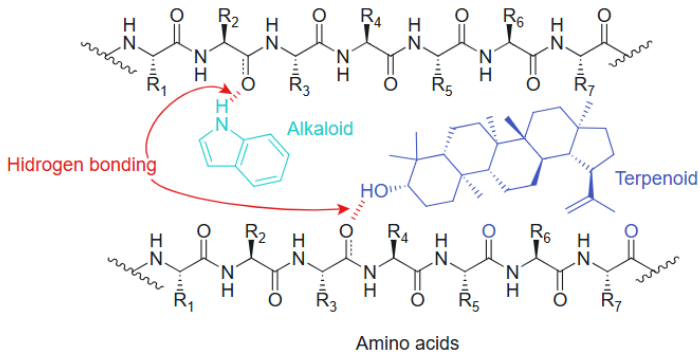
4. Interaksi molekuler antara golongan senyawa aktif dan larva udang *Artemia salina* Leach

Golongan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker memiliki lima mekanisme aksi terhadap sel target secara umum. Kelima aksi tersebut adalah menghalangi (*blocking*) fungsi utama melalui enzim atau protein, menimbulkan

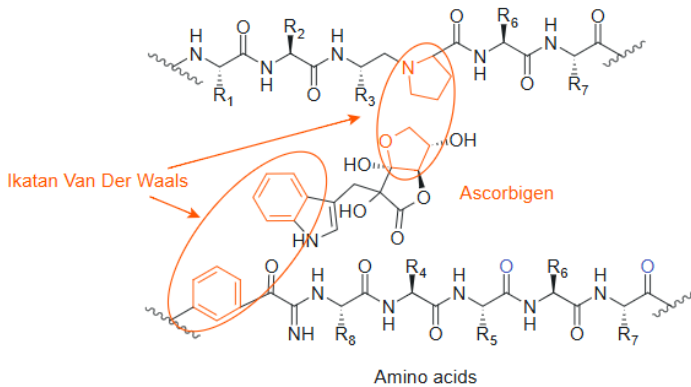
sitotoksik dan efek mutagenik, gangguan pada struktur di membran sel, mengganggu komunikasi antar sel dan mengganggu metabolisme intermediet (Rocha et al., 2022).

Pada penelitian ini ketiga fraksi (tabel 4.12) menunjukkan aktivitas sitotoksik pada sel larva udang. Hal ini disebabkan diduga terjadi sinergisitas antara golongan metabolit sekunder yang berbeda (Dębczak et al., 2024). Pada fraksi n-heksan, sinergi terjadi antara alkaloid dan terpenoid. Sementara pada fraksi diklorometan, sinergi terjadi antara alkaloid dan asam askorbat. Sinergi pada fraksi diklorometan ini bisa jadi alkaloid dan asam askorbat melakukan aksi secara terpisah atau kedua golongan senyawa ini terjadi interaksi secara kovalen. Interaksi kovalen antara asam askorbat dan alkaloid telah diketahui memiliki fungsi sebagai antikanker (Kesinger & Stevens, 2009). Kemungkinan interaksi secara kovalen asam askorbat dan alkaloid memiliki sinergisitas yang lebih besar dari pada golongan metabolit sekunder di fraksi lainnya. Begitu juga pada fraksi etanol, sinergisitas diduga

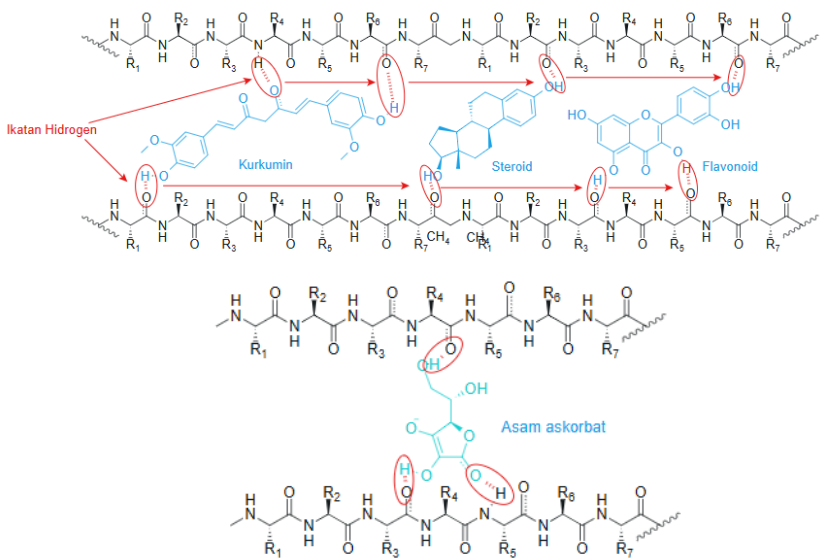
terjadi antara golongan flavonoid, steroid, kurkumin, dan asam askorbat.



gambar 2. 12 interaksi molekuler pada fraksi n-heksan (alkaloid dan terpenoid) terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang



gambar 2. 11 interaksi molekuler pada fraksi diklorometana (alkaloid dan asam askorbat) terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang



gambar 2.13 interaksi molekuler pada fraksi etanol (flavonoid, steroid, asam askorbat, dan kurkumin terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang

Interaksi molekuler pada penelitian ini dapat diusulkan sebagai berikut (gambar 2.11-2.13). Gugus fungsi yang bersifat polar, seperti gugus hidroksil, karbonil, dan amina (pada golongan senyawa aktif) membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino penyusun protein sel larva udang. Sementara bagian non polar dari golongan senyawa aktif berinteraksi secara van der Waals dengan bagian non polar dari asam amino penyusun protein sel larva udang (Liu et al., 2021).

Interaksi molekuler tersebut menyebabkan gangguan pada sel larva udang sebagaimana telah dijelaskan pada mekanisme aksi sititoksik di atas. Namun, gangguan spesifik yang ditimbulkan oleh golongan senyawa aktif terhadap sel larva udang perlu penelitian lebih lanjut.

5. Antikanker

Kanker sebagai salah satu penyakit yang mematikan, walaupun penyakit kanker tidak dapat menular tetapi cepat dalam merusak sel tubuh. Selain itu, penyakit kanker dapat diwariskan kepada keturunannya, sehingga permasalahan ini yang menjadi perhatian dalam dunia kedokteran. Peningkatan korban meninggal karena kanker semakin hari semakin bertambah, serta anak kecil sudah mulai banyak mengidap penyakit kanker. Pengobatan yang dilakukan pada umumnya belum memberikan kesembuhan total, seperti operasi, radiasi, dan kemoterapi (Trifani et al., 2023).

Sel kanker terjadi dikarenakan mutasi genetik dalam tubuh, pada tahap selanjutnya sel kanker akan berubah dan tumbuh semakin ganas. Akibatnya, dapat merusak sel-sel dan jaringan tubuh, sehingga merusak fungsi kerja organ-organ

tubuh (Honestdocs, 2020). Sel kanker yang bersifat tidak terkendali dan tidak dapat mati secara alami perlu bantuan obat atau senyawa tertentu untuk menekan penyebaran dari sel kanker itu sendiri, oleh itu, diperlukan bantuan obat dalam mengobati sel kanker. Salah satu tanaman herbal antikanker sebagai obat alternatifnya, salah satu tanaman yang digunakan sebagai antikanker berupa daun sirih, memiliki nilai LC_{50} 73,6 ppm ekstrak etanol 96% (Kewa et al., 2020).

Penelitian lebih lanjut dalam mencari pengobatan alternatif kanker semakin diupayakan, hingga pencarian bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker semakin berkembang. Maka tidak heran, pengobatan berdasarkan bahan alam mulai dikenalkan dan digemari, sebagai bentuk alternatif dan keyakinan melalui kearifan lokal yang menawarkan hidup sehat secara alami (Adi, 2018).

Sebanyak dua puluh lima persen obat-obatan yang beredar di dunia, mendapatkan bahan dasarnya dari isolasi dan pengembangan bahan hayati. Berdasarkan hal tersebut, Indonesia berpotensi mengupayakan pengobatan alternatif yang menawarkan pengobatan herbal, seperti daun

sirsak, biji anggur, melinjo, bawang putih, dan temu kunci. Kandungan senyawa aktif di dalam tanaman herbal dapat digunakan sebagai penangkal radikal bebas, antibakteri, hingga alternatif obat antikanker juga sangat berpotensi. Tidak heran, masyarakat Indonesia mengenal yang namanya jamu sebagai budaya dalam menjaga kebugaran tubuh, dengan memanfaatkan tanaman herbal yang banyak ditemui di Indonesia (Adi, 2018).

6. Pengujian Potensi Antikanker *Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*

Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)* merupakan salah satu metode awal yang digunakan untuk uji potensi toksisitas dari suatu sampel. Media analisis pada uji BSLT berupa larva udang, dengan jenis udang *Artemia salina Leach*. Pengamatan dilakukan dengan mengamati jumlah kematian dari larva udang yang digunakan sebagai media uji toksisitas sampel. Tahapan selanjutnya, berupa analisis menggunakan metode probit untuk mengetahui konsentrasi dari LC_{50} (*lethal concentration*) 50%, yaitu konsentrasi yang dapat menyebabkan mortalitas dari populasi larva udang *Artemia salina Leach* sebesar 50% dari jumlah

populasi total. Senyawa yang memiliki nilai LC_{50} lebih kecil dari 1000 ppm, dapat dikatakan sebagai senyawa yang memiliki sifat toksik, dengan tingkat toksisitas mulai dari 1-10 mg/L (*highly toxic*), 10-100 mg/L (*medium toxic*), dan 100-1000 mg/L (*low toxic*) (Sadli, 2016).

Uji BSLT untuk mengetahui nilai toksisitas sampel. Pengujian BSLT sebagai pengujian awal untuk membuktikan sampel memiliki potensi antikanker, ditunjukkan dari reaksi dari senyawa aktif yang terkandung dalam sampel, sehingga dapat memberikan sifat toksik kepada objek pengujian, selanjutnya dari pengujian tersebut dapat memberikan nilai persentase sifat toksik sampel uji. Penggunaan BSLT sebagai metode uji memiliki keunggulan berupa mudah dilakukan tanpa keahlian khusus, efisien, dan murah (Jannah et al., 2021).

Udang jenis *Artemia salina* Leach biasanya dikenal sebagai udang renik (Brine shrimp), yaitu udang yang biasa digunakan sebagai pakan ikan, dikategorikan dalam zooplankton yang tinggal di perairan yang tinggi kadar garamnya. Kadar garam dalam proses penetasan larva udang dari *Artemia*

salina Leach sangatlah mempengaruhi, dalam kadar udang sebesar 6% larva udang tidak dapat menetas dan tenggelam di dasar air, sedangkan dalam kandungan garam sebesar 20% telur akan berada pada kondisi tersuspensi, akibatnya dapat menetas dengan baik dan secara normal (Emslie, 2023). Larva udang *Artemia salina Leach* dapat dilihat pada gambar 2.10 dan Secara taksonomi *Artemia salina Leach* tergolong dalam:

Filum : *Arthropoda*

Kelas : *Crustacea*

Subkelas: *Branchipoda*

Ordo : *Anostraca*

Family : *Artemiidae*

Genus : *Artemia*

Spesies : *Artemia salina Leach*



gambar 2. 14 larva udang Artemia salina Leach.

Pemilihan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji dalam metode BSLT dikarenakan larva udang *Artemia salina* Leach identik dengan sel kanker pada manusia berupa sel HeLa, yaitu sel kanker turunan dari sel epitel kanker leher rahim manusia (kanker serviks). Sel HeLa diisolasi dari rahim wanita penderita kanker rahim bernama Henrieta Lacks usia 31 tahun pada tahun 1915 (Syahdana et al., 2017).

Selain hal tersebut, pemilihan larva udang *Artemia salina* Leach memiliki keunggulan daya tahan yang lama dalam kondisi kering, hingga bertahan beberapa tahun, serta lebih mudah ditetaskan dengan waktu yang dibutuhkan 24-48 jam untuk menghasilkan larva udang fase naupli dengan jumlah yang banyak. Alasan lain penggunaan larva udang *Artemia salina* Leach, dikarenakan memiliki membran kulit yang tipis, sehingga dapat dengan mudah mengalami kematian akibat efek sitoksitas dari senyawa aktif, dengan demikian dapat diselaraskan untuk memberikan hasil yang akurat sebagai antikanker, karena larva udang *Artemia salina* Leach memiliki representasi

yang sama dengan sel kanker HeLa (Syahdana et al., 2017).

Penetasan dari larva udang *Artemia salina* Leach cukuplah sederhana, dengan menggunakan media akuarium yang dilengkapi aerator untuk memberikan cadangan oksigen yang cukup dan lampu bolam membantu kehangatan suhu lingkungan untuk menjadi tempat yang sesuai dalam penetasan *Artemia salina* Leach. Penggunaan air yang sesuai pH termasuk dalam hal yang riskan, karena larva udang pada pH kurang dari 5 dan lebih dari 10 akan dapat mematikan *Artemia salina* Leach, sedangkan pH optimum pada penetasan *Artemia salina* Leach ialah pada rentang 8-9. Melalui bantuan sinar cahaya sebagai penghangat dan sirkulator udara berupa aerator sebagai pemasok oksigen yang cukup. Variabel tersebut merupakan hal yang penting dalam proses penetasan dari larva udang *Artemia salina* Leach (Syahdana et al., 2017).

B. Tinjauan Pustaka

analisis telah dilakukan terhadap beberapa acuan artikel ilmiah terkait dengan potensi antikanker pada beberapa ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dan kunyit hitam (*Curcuma caesia*). Berdasarkan penelitian

terdahulu, didapati artikel yang membahas uji potensi antikanker menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada genus *Curcuma*, sebagai penelitian yang paling dekat terhadap taksonomi dari kunyit hitam (*Curcuma caesia*).

Penelitian yang telah dilakukan Das, dkk. (2024) membahas potensi sitotoksik dari ekstrak rimpang *Curcuma caesia* menggunakan pelarut etanol untuk menekan sel kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi efek sitotoksik dari ekstrak etanolik rimpang *Curcuma caesia* terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan MDA MB-231. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perbandingan pelarut dengan rimpang 1:3 (b/v) selama 72 jam, dengan kurkuminoid sebagai senyawa yang memiliki peran antikanker. Rimpang kunyit hitam yang digunakan sebagai sampel di peroleh dari Khetri, Assam, India. Hasil penelitian menunjukkan efek sitotoksik signifikan terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan MDA MB-231 dengan IC₅₀ 15,70 µg/mL dan 21,57 µg/mL (Das et al., 2024). Hasil penelitian Al-Amin, dkk. (2021) mengenai bioaktivitas bahan kimia yang terkandung dalam kunyit hitam terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan MDA MB-231 berpotensi

signifikan. Senyawa yang berperan pada proses inhibisi sel kanker berupa curcuminoel, zerumbone, dan (1S, 10S), (4S, 5S)-germacrone-1 (Al-Amin et al., 2021).

Penelitian lain mengenai aktivitas antikanker rimpang *Curcuma caesia* dilakukan oleh Hadem, dkk. (2016) memberikan hasil efektivitas senyawa bioaktif yang dapat menurunkan aktivitas faktor transkripsi nuklir kappaB (NF-Kb), yaitu faktor transkripsi protein yang mengatur kekebalan tubuh dan pertahanan sel, melalui jalur yang dimediasi oleh tumor necrosis faktor-alpha (TNF- α). Metode ekstraksi melalui mesarasi pelarut metanol selama 72 jam, dengan hasil senyawa bioaktifnya berupa alkaloid, steroid, fenolik, dan flavonoid (Hadem et al., 2016),

Hasil penelitian dalam identifikasi nilai LC_{50} sebagai indikator tingkat toksisitas juga telah dilakukan, Shakya, dkk. (2015) memperoleh nilai LC_{50} sebesar 18.923 $\mu\text{g/ml}$ (petroleum ether), 1,086 $\mu\text{g/ml}$ (diethyl ether), 45, 289 $\mu\text{g/ml}$ (Kloroform), dan 100 $\mu\text{g/ml}$ (metanol). Ekstraksi yang digunakan menggunakan metode sokletasi dengan perbandingan 1:5 (b/v), menggunakan sampel bagian rimpang yang diperoleh dari Thapathali, Kathmandu, India. Kandungan senyawa aktif berupa golongan alkaloid, terpenoid, dan flavonoid

(Shakya et al., 2015). Analisa perhitungan LC_{50} juga dapat menggunakan probit seperti yang dilakukan oleh Razak, S., dkk. (2024) memberikan hasil LC_{50} sebesar 58,49 ppm. Rimpang kunyit hitam sebagai sampel di peroleh dari Kuala Pilah, Malaysia. Penelitian ini melakukan ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut n-heksan selama 4x24 jam, memperoleh senyawa metabolit sekunder melalui analisa GC-MS, berupa *champhor*, α -*elemene*, β -*elemene*, α -*caryophyllene*, β -*caryophyllene*, β -*germacrene*, γ -*germacrene*, *curzerene*, *alloaromadendrene*, *germacrone*, *furanodiene*, *spathulenol*, α -*copaene*, dan *pentadecanoic acid* yang diperkirakan berpotensi sebagai antikanker (Razak et al., 2024).

Hasil penelitian Sharma, A., dkk. (2024) ekstraksi non-konvensional *Curcuma caesia* sebagai antikanker memperoleh hasil yang lebih baik, dengan metode *supercritical fluid extraction* (SFE) dengan *co-solvent* etanol, hasil ekstrak kental (oleoserin) memperoleh kandungan kurkuminoid mencapai 223 $\mu\text{g/g}$ dwb (*dry weight basis*) lebih banyak dari pada ekstraksi konvensional. Memiliki kemampuan sitotoksitas efektif terhadap sel kanker HepG2 (IC_{50} 6 $\mu\text{L/mL}$) dan HPAC (IC_{50} 5 $\mu\text{L/mL}$) tanpa merusak sel normal, dengan

kandungan senyawa aktif yang diperoleh berupa polifenol, flavonoid, dan kurkuminoid (Sharma et al., 2024).

Hasil penelitian terdahulu menunjukkan potensi antikanker dari rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*), dengan berbagai metode memperoleh tingkat toksisitas ekstrak yang berbeda-beda. Hasil tersebut membuktikan bahwa toksisitas sampel dipengaruhi tempat pengambilan sampel, metode ekstraksi, hingga penggunaan pelarut.

C. Hipotesis

Metode ekstraksi UAE pada rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) menghasilkan tiga fraksi, yaitu fraksinasi pelarut non-polar (n-heksan), semi-polar (diklorometana), dan polar (etanol). Metode UAE diprediksikan berdampak pada jumlah dan jenis senyawa aktif dalam setiap fraksinya. Hal ini diharapkan mempengaruhi sifat toksisitas disetiap fraksinya. Fraksi diklorometan diduga memiliki aktifitas antikanker. Dugaan ini didasarkan pada sifat antioksidan pada fraksi diklorometan sebagaimana telah dilaporkan oleh Ibrahim, et al (2023) .

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan pada dua tempat yang berbeda, yaitu:

1. Tempat pengambilan sampel dan preparasi sampel dilakukan di Desa Manggis, Kecamatan Laksono, Kabupaten Wonosobo, Jawa Tengah.
2. Tempat penelitian untuk ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmasi UNIKA. Sedangkan uji penapisan fitokimia dilakukan di Laboratorium Analitik UIN Walisongo Semarang, uji BSLT dilakukan di Laboratorium Pendidikan Kimia Fakultas MIPA Universitas Muhammadiyah Semarang.

Penelitian dilaksanakan pada bulan September-November 2024.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya, yaitu: neraca analitik (Ohaus, Pioneer), sikat, pisau dapur, kipas angin (Panasonic, F-ER-303), gelas beker 25 ml (Herma), gelas beker 250 mL (Herma), gelas ukur 100 mL (Herma), tabung reaksi

(Iwaki), rak tabung reaksi, pipet ukur, corong kaca (Herma), plastik perekat, batang pengaduk, labu ukur 1L (Iwaki), labu ukur 100 mL (Iwaki), labu ukur 10 mL (Iwaki), termometer, pelat tetes, bejana, pelat KLT Silika Gel 60 F₂₅₄, akuarium penetasan 30x20 cm, lampu Philips, aerator (Armada, AM-AP-Q3A), oven (Memmert, UN30), *ultrasonic bath* (Branson, 1510), evaporator (Ika, RV10), botol vial uji BSLT, sinar UV, lemari asam.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu: rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*), akuades, etanol 96% (Merck), n-heksana (Merck), diklorometan (Merck), asam klorida 1% (Merck), reagen Hager, kloroform (Merck), asam sulfat pekat, serbuk Zn, dinitrofenil hidrasin (Smart Lab), etil asetat (Merck), metanol (Merck), larva udang *Artemia salina* Leach, *crude solar salt*, ragi roti, dan DMSO.

C. Metodologi Penelitian

Pengujian potensi senyawa aktif dan metode BSLT ekstrak kunyit hitam (*Curcuma caesia*) dilakukan beberapa tahapan pengujian, yaitu:

1. Preparasi sampel

Sampel rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) diperoleh di Desa Manggis, Kecamatan Laksono, Kabupaten Wonosobo, Jawa Tengah. Pengambilan rimpang sebagai sampel uji dipilih rimpang tua, diketahui warna daging rimpang berwarna ungu kebiruan. Pengambilan sampel dilakukan pada musim kemarau.

Rimpang kunyit hitam sebanyak 2 kg yang segar dibersihkan dengan air dan disikat untuk menghilangkan kotoran yang terdapat pada kulit. Rimpang kemudian dipotong tipis-tipis menggunakan pisau dapur dan dikeringkan menggunakan suhu ruangan, dengan bantuan kipas angin supaya mempercepat pengeringan. Pengeringan dilakukan kurang lebih selama 3×24 jam, bertujuan menghilangkan kadar air dalam rimpang yang ingin diekstrak. Rimpang kering dihaluskan menggunakan blander hingga menjadi bubuk (Fajar, 2016).

2. Ekstraksi dan fraksinasi sampel

Bubuk rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) dengan perbandingan 1:5 (b/v) dimaserasi dengan bantuan alat *ultrasonic bath*

frekuensi 42 kHz. Ekstraksi dilakukan tiga kali pengulangan selama 30 menit setiap pengulangannya. Setelah ekstraksi, dilakukan rotary evaporator untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak kental. Proses fraksinasi secara lengkap dijelaskan pada poin berikut (Togelang, 2023).

a. Ekstraksi fraksi n-heksana

Bubuk rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) sebanyak 200 gram direndam dengan 1000 mL n-heksana dalam gelas beker. Setelah itu, dimasukkan dalam *Ultrasonic bath*, dihitung mundur selama 30 menit dan dilakukan proses yang sama dalam tiga kali pengulangan. Selanjutnya, sampel bekas ekstraksi dikeringkan di dalam oven dengan suhu maksimal 35°C hingga sampel kering, ekstrak encer yang diperoleh kemudian dilakukan pemisahan dengan pelarut.

b. Ekstraksi fraksi diklorometan

Sampel kering bekas ekstraksi fraksi n-heksana digunakan untuk ekstraksi fraksi diklorometan, direndam dengan 1000 mL diklorometan dalam gelas beker. Setelah itu,

dimasukkan dalam *Ultrasonic bath*, dihitung mundur selama 30 menit dan dilakukan proses yang sama dalam tiga kali pengulangan. Selanjutnya, sampel bekas ekstraksi dikeringkan di dalam oven dengan suhu maksimal 35°C hingga sampel kering, ekstrak encer yang diperoleh kemudian dilakukan pemisahan dengan pelarut.

c. Ekstraksi fraksi etanol

Sampel kering bekas ekstraksi fraksi diklorometana digunakan untuk ekstraksi fraksi etanol, direndam dengan 1000 mL etanol dalam gelas beker. Setelah itu, dimasukkan dalam *Ultrasonic bath*, dihitung mundur selama 30 menit dan dilakukan proses yang sama dalam tiga kali pengulangan. Selanjutnya, sampel bekas ekstraksi dikeringkan di dalam oven dengan suhu maksimal 35°C hingga sampel kering, ekstrak encer yang diperoleh kemudian dilakukan pemisahan dengan pelarut.

3. Uji penapisan fitokimia

a. Alkaloid

Sampel ekstrak diambil, kemudian ditetesi larutan asam klorida encer 1% terlebih. Setelah itu, ekstrak ditambahkan reagen Hager beberapa mL, endapan kuning menunjukkan hasil positif (Kumoro, 2015).

b. Flavonoid

Uji flavonoid dengan cara diambil beberapa ekstrak, ditambah dengan 1 mL asam klorida pekat, ditambah serbuk Zn. Hasil positif ditandai warna merah setelah beberapa menit (Kumoro, 2015).

c. Terpenoid

Pengujian dilakukan dengan beberapa ekstrak ditambahkan dengan 1 mL kloroform, dan ditetesi asam sulfat pekat secara bertahap hingga muncul lapisan diatasnya, kemunculan warna coklat kemerahan menunjukkan hasil positif keberadaan terpenoid (Kumoro, 2015).

d. Steroid

Uji yang dilakukan sampel ekstrak diambil dengan ditambahkan asam sulfat pekat, sehingga akan membentuk lapisan

warna merah pada bagian bawah ekstrak sebagai hasil positif (Kumoro, 2015).

e. Asam askorbat

Ekstrak kental dikreasikan dengan 1 mL dinitrofenil hidrasin 1 M dan asam sulfat pekat sebanyak 1,5 mL. hasil positif menghasilkan endapan kuning (Kumoro, 2015).

f. Kurkumin

Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode KLT sebagai pengujian kualitatif keberadaan kurkumin, dengan fase diam berupa silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan etil asetat: metanol (9,5:0,5). Hasil positif diketahui pada lampu UV, warna fase gerak yang diperoleh berwarna coklat dan bercak noda terpisah dengan baik menunjukkan hasil positif (Yusuf, 2015).

4. Uji Toksisitas

Uji toksisitas rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) dilakukan dengan metode BSLT, sebagai pengujian tahap awal untuk mengetahui toksisitas suatu senyawa aktif dalam rimpang kunyit hitam, objek pengujian pada larva undang

(*Artemia salina* Leach), dengan tujuan membuktikan fraksi yang berpotensi sebagai antikanker dengan melihat nilai LC_{50} .

a. Pembuatan Air Laut Buatan

Air laut buatan dibuat menggunakan garam dapur atau *Crude Solar Salt* sebanyak 20 gram dilarutkan pada akuades sebanyak 1000 mL (Setyowati, 2016).

b. Penetasan Telur *Artemia salina* Leach

Air laut buatan yang telah dibuat dimasukkan dalam akuarium 30x20 cm yang sudah plastik hitam. Akuarium dilengkapi pompa air dan lampu Phillips untuk menjaga kadar oksigen dalam air dan kehangatan pada proses penetasan larva udang *Artemia salina* Leach (Setyowati, 2016).

Sebanyak 1,5 gram telur larva *Artemia salina* Leach dimasukkan dalam akuarium dan didiamkan selama 24 jam. Larva *Artemia salina* Leach akan sudah menetas, hanya bisa digunakan maksimal 2 hari, dikhawatirkan apabila lebih dari 2 hari larva udang akan mati sendiri, karena asupan makan yang telah habis (Setyowati, 2016).

c. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Sebanyak 10 mg ekstrak kental kunyit hitam (*Curcuma caesia*) dilarutkan dalam tiga pelarut berbeda (n-heksana, diklorometan, dan etnaol) sebanyak 100 mL, diperoleh larutan induk 100 ppm. Larutan diambil sebanyak 1,8 mL, 1,6 mL, 1,4 mL, 1,2 mL, 1,0 mL, 0,8 mL, 0,6 mL, 0,4 mL, dan 0,2 mL, kemudian dimasukkan dalam botol vial dan menunggu pelarutnya menguap hingga kering. Setelah itu, ditambahkan 0,1 mL DMSO, setetes ragi roti, dan 2 mL air laut buatan. Campuran dikocok hingga homogen, kemudian dituangkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan air laut buatan hingga tanda batas. Konsentrasi akhir diperoleh 18 ppm, 16 ppm, 14 ppm, 12 ppm, 10 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 4 ppm, dan 2 ppm, serta dibuat larutan pengontrol berisi 0,1 DMSO dan air laut buatan. Selanjutnya, dimasukkan 10 larva udang *Artemia salina* Leach dan ditunggu selama 24 jam. Kematian larva udang dihitung untuk memperoleh persen kematian sebagai variabel penentuan nilai LC_{50} . Perhitungan konsentrasi ppm dan rumus pengenceran

ditunjukkan pada persamaan 3.1 (Razak et al., 2024; Wardatul Jannah et al., 2020).

$$ppm = \frac{\text{massa zat terlarut (mg)}}{\text{volume larutan (L)}}$$

$$\text{Pengenceran: } V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2 \quad (3.1)$$

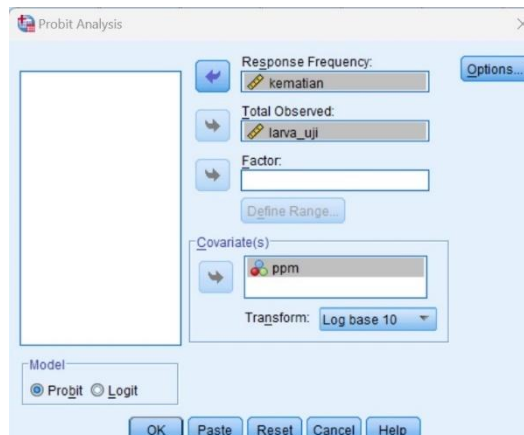
d. Menghitung nilai LC₅₀

Pengujian toksisitas suatu senyawa dilakukan dengan menghitung nilai LC₅₀, yaitu konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian pada 50% larva *Artemia salina* Leach, menggunakan analisis unit (Wilapangga, 2018). Efek toksisitas dianalisis melalui pengamatan, dan persentase kematian dihitung berdasarkan persamaan 3.2 berikut (Wardatul Jannah et al., 2020).

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100\% \quad (3.2)$$

Apabila persen kematian (% mortalitas) larva *Artemia salina* Leach diperoleh, nilai probabilitas dapat diketahui dengan bantuan alat analisa data SPSS. Data yang dimasukkan berupa variabel konsentrasi, jumlah larva yang mati, dan jumlah total larva.

Metode analisa menggunakan analisa probit (tabel data probit ditunjukkan pada tabel 3.1), dengan menempatkan variabel konsentrasi pada kolom co-varian, variabel jumlah total larva pada kolom total observasi, dan terakhir variabel rata-rata jumlah larva mati pada kolom respons frekuensi, seperti gambar 3.1 secara jelasnya. Setelahnya data ditransformasikan pada nilai Log 10 dengan tujuan memberikan hasil yang linear, supaya grafik tidak melengkung seperti parabola (Maheta, 2024).



gambar 3. 1 analisa probit SPSS

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
-	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

gambar 3. 2 nilai probit

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Preparasi dan Ekstraksi Kunyit Hitam (*Curcuma caesia*)

Rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) dipotong tipis-tipis dan kemudian dikeringkan selama 3x24 jam pada suhu ruangan dan diangin-anginkan menggunakan kipas untuk mempercepat pengeringan. Setelah kering, rimpang kunyit hitam dihaluskan menggunakan grinder, untuk memperoleh serbuk sampel, bertujuan mempermudah melarutkan senyawa yang terkandung dalam sampel, dikarenakan semakin banyak luas permukaan sampel akan mempengaruhi kecepatan ekstraksi dan jumlah senyawa yang diperoleh (Asworo & Widwiasuti, 2023). Serbuk rimpang kunyit hitam ditimbang sebanyak 200 gr dan dilakukan maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, diklorometana, dan etanol. Ekstraksi bertingkat dilakukan bertujuan untuk mengikat senyawa yang terkandung di dalam sampel sesuai tingkat kepolarannya, sehingga hasil akan lebih spesifik untuk mengetahui penggunaan pelarut dengan jenis apa yang dapat mengekstrak sampel sebagai antikanker dengan optimal, dikarenakan setiap jenis pelarut akan berbeda dalam reaksi terhadap senyawa

pada sampel, dengan ekstraksi bertingkat akan memperoleh senyawa yang spesifik setiap pelarutnya, sehingga akan mempengaruhi reaksi toksisitas yang berbeda pada proses uji antikanker (Madiabu et al., 2023).

Penggunaan pelarut n-heksan dipilih dikarenakan sifatnya yang selektif dalam mengekstrak senyawa yang bersifat non polar, selain itu juga sifat n-heksan yang stabil, cocok untuk digunakan sebagai pelarut (Constanty, 2021). Diklorometana dipilih sebagai pelarut, dikarenakan sifat selektifnya yang baik pada sifat semi polar senyawa, karena sifat polaritas diklorometana yang dapat memungkinkan tertarik ke beberapa molekul ketika bersentuhan langsung, serta titik didih yang rendah menjadi nilai positif sebagai pelarut, karena lebih rendah dari pada suhu degradasi senyawa metabolit sekunder (Fatma T. Nugraheni, 2017). Begitupun dengan pemilihan pelarut etanol sebagai fraksi pelarut polar, dengan sifat universalnya dapat dipastikan dapat bereaksi dengan baik terhadap senyawa polar yang terkandung dalam kunyit hitam. Selain itu, etanol tidak beracun dan mudah menguap memudahkan pada proses pemisahan pelarut setelah ekstraksi (Sugiarti, 2017).

Ekstraksi pada sampel kunyit hitam menggunakan metode ekstraksi bantuan ultrasonik atau *Ultrasound-assistent Extraction* (UAE) selama 30 menit dengan 3 kali pengulangan. Penggunaan UAE sebagai metode ekstraksi dikarenakan waktu ekstraksi yang singkat, penggunaan pelarut sedikit, dan hasil ekstraksi lebih banyak yang memberikan efektifitas dan hasil yang maksimal (Fauziyah et al., 2022). Hasil massa randemen n-heksana 1,425 gr, randemen diklorometana 16,274 gr, dan randemen etanol 10,120 gr, secara lengkap ditunjukkan pada tabel 4.1. Pengulangan 3 kali selama 30 menit setiap pengulangan bertujuan untuk memaksimalkan ekstraksi, supaya senyawa yang terikat lebih efektif, dari pada ekstraksi sekaligus (Rezki et al., 2015).

tabel 4 1 hasil ekstraksi

Pelarut	Massa sampel (g)	Massa eks. (g)	% rend.
n-Heksana	200	1,43	0,71
Diklorometana	200	16,27	8,14
Etanol	200	10,12	5,06

Ekstraksi dengan bantuan gelombang untrasounik akan mempermudah dan mempercepat reaksi pelarut dalam mengikat senyawa dalam sampel, karena gelombang untrasounik meningkatkan permeabilitas sel tanaman dan membangkitkan reaktif kavitasi, sehingga

akan terbentuk gelembung ketika berdekatan dengan sampel. Akibatnya, dinding dan membran sel akan mudah pecah, pelarut akan mudah berikatan dengan senyawa dalam sampel (Puspita et al., 2024). Senyawa yang sudah terikat akan terbawa oleh pelarut, dan dilakukan pemisahan antara pelarut dengan ekstrak, bertujuan memperoleh hasil senyawa murni tanpa terkontaminasi dengan pelarut, karena akan mempengaruhi hasil uji selanjutnya.

Proses pemisahan pelarut menggunakan *rotary evaporator*, dengan prinsip kerja pemisahannya terletak pada perbedaan titik didih untuk menguapkan pelarut dan didinginkan kembali menjadi pelarut yang murni, sehingga ekstrak akan tertinggal. Perlu diperhatikan dalam pengaturan suhu penguapan, dengan catatan suhu penguapan pelarut tidak merusak senyawa atau suhu untuk menguapkan pelarut di bawah titik didih senyawa yang terkandung di dalam ekstrak (Reo et al., 2017). Pemisahan pelarut n-heksana dan etanol pada proses *rotary evaporator* menggunakan suhu 55°C, sedangkan untuk diklorometan pada suhu 35°C. Alasan penggunaan suhu tersebut didasari pada titik didih etanol pada suhu 78,37°C, n-heksana 68,7°C, dan diklorometan 39,6°C (Irvan, 2015; Rachmadenawanti, 2016). Selain itu, juga

mempertimbangkan senyawa aktif yang diprediksikan terkandung dan berpotensi sebagai antikanker, yaitu alkaloid (138°C) (Pendidikan & Indonesia, 2016), flavonoid (75°C) (Guntarti et al., 2021), terpenoid (110°C) (Siddiqui et al., 2024), steroid (80°C), Asam askorbat (115°C) (Pebrizal, 2020), Kurkuminoid (118°C) (Mardiah et al., 2018; Nanang Fitoni et al., 2013).

B. Penapisan Fitokimia Ekstrak Kunyit Hitam (*Curcuma caesia*)

Hasil penapisan fitokimia terhadap keberadaan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak n-heksan, diklorometan, dan etanol ditunjukkan pada tabel 4.2.

1. Identifikasi senyawa alkaloid

Kunyit hitam merupakan tanaman herbal yang mengandung alkaloid sebagai salah satu senyawa metabolit sekundernya. Hasil positif pada fraksi n-heksana dan diklorometana, ditandai dengan adanya endapan kuning seperti pada gambar 4.1. Hasil negatif muncul pada fraksi etanol, diperkirakan senyawa alkaloid telah larut pada pelarut n-heksana dan diklorometan sewaktu ekstraksi, dikarenakan senyawa alkaloid dapat larut dalam pelarut non-polar, semi polar, dan polar (Renda et al., 2023).

tabel 4 2 hasil uji penapisan fitokimia

Senyawa	Ekstrak n- Heksan*	Ekstrak Dikloro metana*	Ekstrak Etanol*	Identi- fikasi
Alkaloid	++	+++	-	Endapan kuning
Flavanoid	-	-	+++	Larutan berwarna merah
Terpenoid	+++	-	-	Muncul warna merah kecoklata n
Steroid	-	-	+++	Warna merah pada bagian bawah
Asam askorbat	-	++	+++	Endapan kuning
Kurkumin	-	-	+++	Bercak noda terpisah dengan baik/nod a coklat

*) – (tidak ada), + (sedikit), ++ (sedang), +++ (banyak)

Hal tersebut diakibatkan dari proses ekstraksi bertingkat, sehingga senyawa lebih spesifik tergantung tergantung pada tingkat kepolaran senyawa. Sesuai dengan penelitian dari Yokoba Koni Rendra, dkk. (2023), hasil dari isolasi senyawa alkaloid memperoleh hasil positif pada fraksi non-polar dan semi-polar dengan ekstraksi bertingkat.

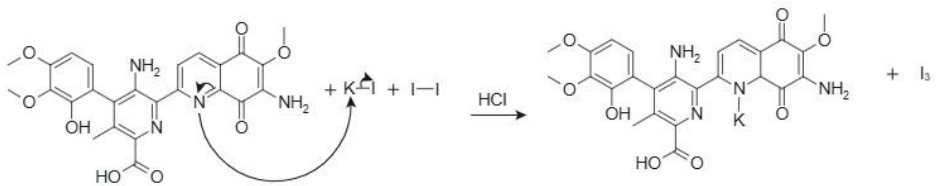


gambar 4. 1 hasil uji alkaloid (urut dari kiri: fraksi n-heksana, diklorometana, etanol)

Senyawa alkaloid sebagai kelompok senyawa basa dengan keberadaan nitrogen pada cincin heterosiklik. Terdapat pasangan elektron bebas pada atom N yang dapat berikatan dengan atom lain, sehingga membentuk senyawa kompleks (Renda et al., 2023). Keberadaan alkaloid dapat diketahui dengan uji menggunakan reagen hager, dengan reaksi yang terjadi antara atom N^- dengan atom K^+ dalam reagen hager

yang mengandung I_2 dan KI, hasil reaksi positif akan membentuk endapan kuning (Louradebi Kapondo & Jayanti, 2020). Penambahan HCl pada proses uji bertujuan untuk mengekstrak alkaloid yang bersifat basa, yaitu untuk memisahkan senyawa organik berdasarkan sifat asam-basanya, serta untuk menghilangkan protein sebelum ditambah pereaksi (reagen) (Fitriah, 2020). Supaya hasil yang ditunjukkan dari reaksi tidak menunjukkan hasil positif semu (Louradebi Kapondo & Jayanti, 2020).

Secara mekanisme reaksinya dapat dilihat pada gambar 4.2. Atom K lepas menjadi K kation, kemudian diserang atom N anion, membentuk ikatan kompleks Kalium-alkaloid (I. Illing, 2017).



gambar 4. 2 mekanisme reaksi alkaloid dengan reagen hager

2. Identifikasi senyawa flavonoid

Hasil positif flavonoid muncul pada ekstrak kunyit hitam fraksi etanol, dengan dibuktikan berupa perubahan warna merah. Fraksi n-heksana dan

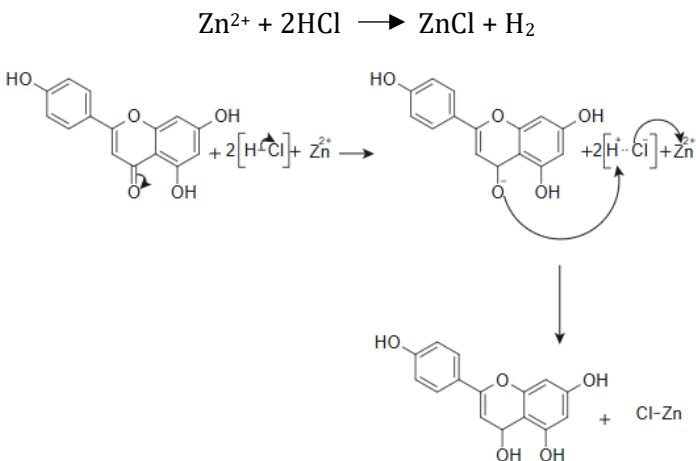
diklorometana menunjukkan warna kuning dan kuning kecoklatan, dengan hasil negatif seperti pada gambar 4.3. Keberadaan flavonoid pada dasarnya dapat larut dengan pelarut polar, sehingga fraksi etanol memperoleh hasil positif menunjukkan senyawa flavonoid (Puspa Yani et al., 2023).



gambar 4. 3 hasil uji flavonoid (urut dari kiri: fraksi n-heksana, diklorometana, etanol)

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Yasser, M., dkk. (2022) memberikan hasil positif flavanoid dengan indikator warna jingga hingga merah (Puspa Yani et al., 2023). Sedangkan Yani dkk. (2023) memberikan indikator positif dengan warna merah pada hasil uji positif kandungan flavonoid menggunakan pereaksi HCl dan serbut Zn (Yasser et al., 2023). Hasil positif pada penelitian tersebut teridentifikasi keberadaan flavonoid muncul pada pelarut polar, diantaranya metanol, etanol, etil asetat, dan air pada penelitian yang dilakukan.

Warna merah yang muncul terbentuk pada hasil uji merupakan garam favilium, terbentuk dari penambahan HCl dan serbuk Zn sebagai pereaksi dan reduktor pada senyawa benzopiron, dimana senyawa tersebut sebagai senyawa inti pada struktur flavonoid (Yasser et al., 2023). Reaksi secara umum ditunjukkan pada gambar 4.4. dengan menghasilkan reaksi eksoterm yang diakibatkan pelepasan H_2 dari reaksi Zn^{2+} dengan $2Cl^-$, sehingga terjadi pelepasan kalor dengan ditunjukkan gelembung dan uap pada saat HCl dan serbuk Zn dicampurkan, kemudian memberikan warna merah sebagai identifikasi keberadaan flavonoid.



gambar 4. 4 mekanisme reaksi penapisan flavonoid dengan HCl dan Zn

3. Identifikasi senyawa terpenoid

Ekstrak rimpang kunyit hitam dalam fraksi etanol mengandung senyawa terpenoid, dengan hasil uji positif berwarna merah-kecoklatan. Hasil tersebut juga selaras dengan hasil pengujian Takaeb dan Leo (2023), hasil uji keberadaan senyawa terpenoid dengan metode liberman-burchard dengan warna merah kecoklatan sebagai hasil positif (Takaeb& Leo, 2023)

Keberadaan terpenoid diketahui pada fraksi etanol dikarenakan terpenoid stabil dan larut pada pelarut polar (Sabaragamuwa& Perera, 2023). Hasil penelitian Hidayah (2023) memaparkan bahwa di dalam tanaman obat paling sering dijumpai senyawa terpenoid berupa triterpenoid (Hidayah, Fatmawati, et al., 2023).

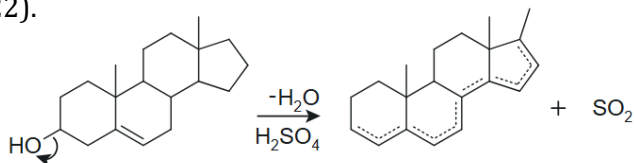
Identifikasi keberadaan senyawa terpenoid dengan kemunculan warna merah kecoklatan diakibatkan dari reaksi asam sulfat pekat senyawa terpenoid, hasil positif ditunjukkan pada gambar 4.3. Reaksi yang terjadi berupa reaksi oksidasi yang diakibatkan dari senyawa terpenoid dengan asam sulfat pekat, mengakibatkan ikatan rangkap terkonjugasi, dengan dibantu kloroform sebagai

pelarut, dikarenakan sifat senyawa terpenoid bersifat nonpolar (Mailuhu et al., 2017).



gambar 4. 5 hasil uji triterpenoid (urut dari kiri: fraksi n-heksana, diklorometana, etanol)

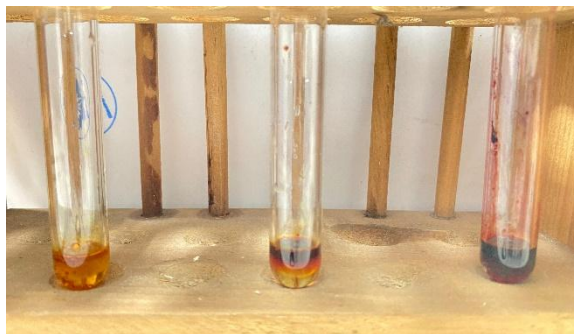
Pemilihan kloroform sebagai pelarut dikarenakan kloroform bersifat semi polar sehingga dapat rekatif pada polar maupun non polar (Hakim & Saputri, 2020). Selain terjadinya ikatan rangkap terkonjugasi, juga terjadi pelepasan hidroksil pada saat proses reaksi antara asam sulfat pekat dengan senyawa terpenoid. Reaksi resonansi terjadi ketika gugus hidrogen beserta elektronnya lepas, kemudian karbokation membuat ikatan rangkap baru, sehingga terjadi perpanjangan ikatan rangkap terkonjugasi seperti reaksi pada gambar 2.6 (Nurjannah et al., 2022).



gambar 4. 6 mekanisme reaksi senyawa terpenoid dengan H_2SO_4

4. Identifikasi senyawa steroid

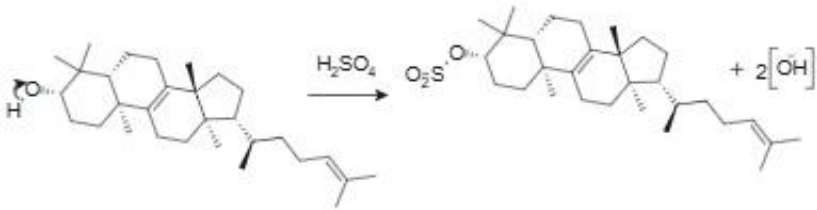
Kunyit hitam sebagai tanaman obat memiliki kandungan steroid, dengan ditunjukkan hasil positif pada uji penampisan fitokimia. Hasil uji positif ditunjukkan warna merah pada bagian bawah, yaitu pada fraksi etanol, dikarenakan senyawa steroid larut dalam pelarut polar, hasil seperti gambar 4.7. Hasil positif uji tersebut selaras dengan penelitian Sulistyarini (2020), penelitian tersebut memaparkan hasil positif keberadaan steroid dalam pelarut polar (Sulistyarini et al., 2020). Struktur steroid tidak jauh berbeda dengan terpenoid, yaitu dengan tiga sikloheksana, satu siklopentana, serta terdapat gugus metil dan hidroksil. Akan tetapi, steroid memiliki struktur yang kompleks dan besar, yaitu gabungan dari beberapa terpenoid (Susidarti, 2017).



gambar 4. 7 Hasil uji steroid (urut dari kiri: fraksi n-heksana, diklorometana, etanol)

Identifikasi senyawa steroid dilakukang dengan pengujian menggunakan asam sulfat pekat, sehingga akan bereaksi dan muncul lapisan merah pada bagian bawah. Penambahan asam sulfat pekat akan membentuk kompleks *Cholestahexaena Sulfonic Acid* (Anggraini & Wisnu Kusuma, 2020).

Mekanisme reaksi yang terjadi dapat digambarkan pada gambar 4.8



gambar 4. 8 mekanisme reaksi senyawa steroid dengan H_2SO_4

5. Identifikasi senyawa asam askorbat

Rimpang kunyit hitam sebagai tanaman herbal yang dipercaya dapat meningkatkan kekebalan tubuh memiliki kandungan asam askorbat. Hasil positif yang ditunjukkan dengan endapan kuning yang muncul. Endapan yang muncul pada fraksi diklorometana dan fraksi etanol. Kelarutan asam askorbat dalam pelarut polar sangat baik dan sedikit larut pada pelarut semi-polar, sehingga hasil positif muncul pada fraksi etanol dan fraksi diklorometana (Leksono et al., 2018). Asam

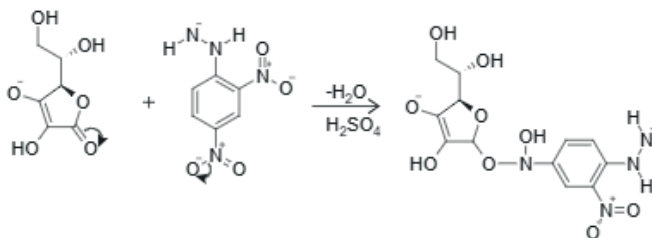
askorbat pada dasarnya senyawa polar karena memiliki ikatan hidroksil, sehingga dapat larut pada pelarut polar (Leksono et al., 2018).

Hasil positif dapat dilihat pada gambar 4.9, endapan yang muncul dikarenakan reaksi antara gugus amino dari 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) dengan karbonil aldehid dari asam askorbat (asam askorbat). Kemudian terjadi reaksi kondensasi dan membentuk endapan hidrazon berwarna kuning (Syarifuddin & Sulistyani, 2019). Reaksi kondensasi merupakan reaksi yang terjadi pada dua molekul bergabung menjadi molekul besar dengan menghilangkan molekul kecil (Mehmood et al., 2020).



gambar 4. 9 hasil uji asam askorbat (urut dari kiri: fraksi diklorometana, n-heksana, etanol)

Mekanisme reaksi aldehyd dan DNPH pada gambar 4.10, terjadi reaksi berupa reaksi adisi-eliminasi, dimana atom O pada gugus karbonil dalam struktur asam askorbat tereliminasi dan atom H pada gugus amino DNPH juga ikut tereliminasi, sehingga terjadi proses adisi dari gugus amino dengan atom C (Syarifuddin & Sulistyani, 2019). Sedangkan keberadaan H_2SO_4 untuk membuat larutan pereaksi brady, bertujuan untuk membantuk reaksi kimia berlangsung (Runciman, 2021).



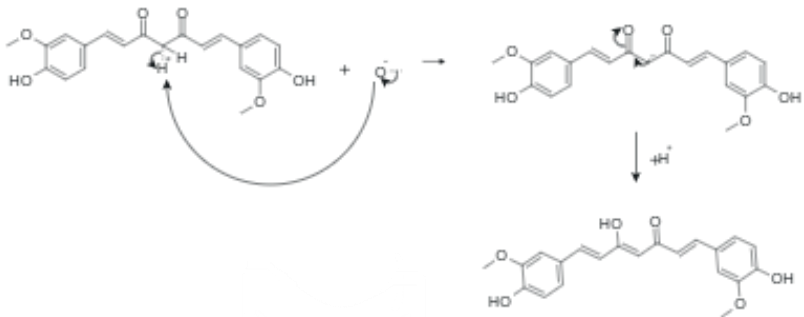
gambar 4. 10 mekanisme reaksi asam askorbat dengan DNPH

6. Identifikasi senyawa kurkumin

Kunyit hitam diperkirakan memiliki senyawa kurkumin yang tinggi, dikarenakan masih dalam famili Zingiberaceae. Kurkumin yang memiliki dua gugus metoksi, sehingga memiliki sifat gugus fungsi yang berbeda, yaitu bersifat polar dan semi-polar. Gugus metoksi yang dimaksud ialah gugus metil yang

berikatan dengan oksigen dengan rumus $R-O-CH_3$ (Shary, 2023).

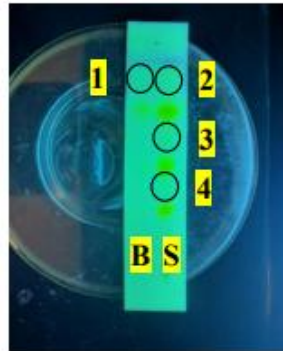
Pengujian keberadaan kurkumin dilakukan dengan bantuan KLT lapis tipis, menggunakan fase gerak kloroform:metanol (9,5:0,5) (v/v), dengan tujuan dapat mengikat dua gugus metoksi dengan tingkat kepolaran yang berbeda dan dapat memisahkan senyawa kurkumin, demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin. Mekanisme reaksi ditunjukkan gambar 4.11, dimana metanol berperan mendeteksi keberadaan senyawa kurkumin dan kloroform sebagai pelarut gugus metoksi.



gambar 4. 11 reaksi metanol dengan kurkumin

Hasil positif uji penapisan fitokimia terdapat pada fraksi etanol, ditunjukkan dengan bercak noda yang terpisah secara sempurna, yaitu menunjukkan keberadaan senyawa polifenol berupa kurkumin

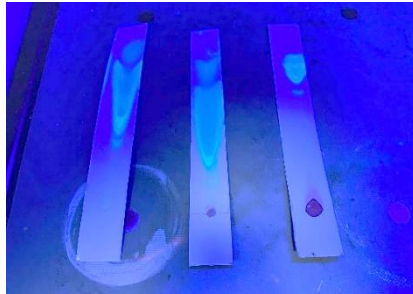
(Fadul, 2019). Selaras dengan hasil uji keberadaan kurkumin Shary (2023) hasil positif pada hasil ekstraksi pelarut etanol, hasil KLT lapis tipis pada gambar 4.12 dari pengujian Shary pada gambar 4.12.



gambar 4. 12 hasil uji
refrensi

Nomor 1 pada gambar menunjukkan bercak baku pembanding kurkumin, nomor 2 bercak senyawa kurkumin, nomor 3 bercak senyawa demetoksikurkumin, nomor 4 bercak senyawa bisdemetoksikurkumin, B sebagai baku pembanding dan S sampel uji. Sedangkan hasil uji yang telah dilakukan memiliki kesamaan pada hasil uji tersebut, dengan fraksi etanol yang memiliki kandungan kurkumin dengan bercak yang terpisah paling jauh, sedangkan fraksi diklorometana dan n-heksana diperkirakan memiliki senyawa

demetoksikurkumin dikarenakan terdapat 2 bercak yang berhimpitan di bawah bercak yang menandakan kurkumin, seperti hasil KLT lapis tipis gambar 4.12, dengan hasil KLT uji pada gambar 4.13.



gambar 4. 13 hasil KLT lapis tipis kurkumin (dari kiri fraksi etanol, diklorometan, dan n-heksan

C. Uji Toksisitas Kunyit Hitam (*Curcuma caesia*)

Kandungan kunyit hitam yang diprediksikan memiliki manfaat sebagai tanaman obat perlu diujikan secara farmakologis. Salah satu upaya dalam pembuktian kunyit hitam memiliki manfaat sebagai tanaman obat ialah uji toksisitas, bertujuan sebagai uji prediksi untuk mengetahui tingkat toksisitas sebagai tanaman obat antikanker.

Ekstrak kental rimpang kunyit hitam fraksi etanol, diklorometana, dan n-heksana dibuat larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm, dengan cara dilarutkan dalam pelarut organik sesuai fraksinya. Pengenceran

menggunakan pelarut organik sesuai fraksi, bertujuan untuk mempermudah proses pelarutan ekstrak kental dalam proses pengenceran. Variabel konsentrasi larutan uji sebesar 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2 dan 0 ppm, dengan alasan kisaran konsentrasi yang digunakan dapat mencakup rentang probit secara efektif, dan penurunan konsentrasi yang bertahap (2 ppm) memberikan *granularity* (kehalusan perubahan konsentrasi) yang baik (Marisa, 2021).

Larutan pengontrol dengan konsentrasi 0 ppm sebagai pembanding, dengan tujuan memberikan prediksi kematian pada larutan uji dikarenakan akibat terdapat senyawa lain di dalamnya. Larutan pengontrol hanya berisi DMSO, larutan ragi roti, air laut buatan dan larva udang *Artemia salina* Leach., sehingga indikasi keberadaan senyawa yang mengakibatkan kematian larva udang dapat divalidasi. Variabel larutan uji yang telah dibuat diambil 1,8, 1,6, 1,4, 1,2, 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 mL, kemudian diuapkan dan ditambahkan DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) sebanyak 0,1 mL digunakan untuk membantu kestabilan larutan uji dan kompatibilitas, serta membantu meningkatkan penyerapan senyawa dalam organisme uji. Selain itu, diberi ragi roti satu tetes sebagai asupan makanan untuk larva udang (Ulfa et al., 2024).

tabel 4 3 hasil uji toksisitas fraksi n-heksan metode BSLT

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva mati	Nilai Probit
2	1,33±0,577	3,87
4	2,33±0,577	4,26
6	3,33±0,577	5,56
8	4,00±0,000	4,75
10	5,00±0,577	5,00
12	5,67±0,577	5,15
14	6,33±0,577	5,33
16	6,67±0,577	5,41
18	7,33±0,577	5,61

Uji BSLT untuk mengetahui toksisitas sampel diulang tiga kali pengulangan untuk memperoleh hasil yang optimal, dengan hasil uji BSLT fraksi n-heksana yang ditunjukkan pada tabel 4.3. Kematian larva udang paling tinggi terjadi pada konsentrasi 18 ppm dengan rata-rata persen kematian 73%, sedangkan kematian terendah pada konsentrasi 2 ppm dengan persen kematian sebesar 13%. Hasil analisa probit menggunakan bantuan perangkat lunak *statistical product and service solutions* (SPSS) menggunakan analisa variabel konsentrasi dan variabel probit, sehingga diperoleh nilai singnifikansi $0.000 < 0.05$, dengan artian model regresi dapat memprediksi variabel partisipasi atau dalam kata lain

pengaruh variabel konsentrasi (x) terhadap variabel probit (y) memiliki pengaruh. Variabel konsentrasi berperan sebagai variabel bebas yang mempengaruhi variabel probit. Bahwa data yang diperoleh valid dengan nilai signifikansi kurang dari 0,05.

Nilai LC_{50} pada uji toksisitas metode BSLT memperoleh hasil sebesar 9,08 ppm, menunjukkan kategori sangat toksik menurut klasifikasi Suminhe, dkk. (2014). Berdasarkan klasifikasi nilai toksisitas, sadli (2016) mnyetakan bahwa LC_{50} 10-100 ppm tergolong pada *medium toxic*, sedangkan menurut Sumihe, dkk (2014) LC_{50} <30 ppm tergolong pada tingkatan sangat toksik. Semakin kecil nilai LC_{50} dari sampel maka menunjukkan semakin tinggi senyawa bioaktifnya (Sadli, 2016; Sumihe et al., 2014).

tabel 4 4 hasil uji toksisitas fraksi diklorometan metode BSLT

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva mati	Nilai Probit
2	1,00±0,000	3,72
4	2,67±0,577	4,36
6	3,67±0,577	4,64
8	4,67±0,577	4,87
10	5,67±0,577	5,13
12	6,33±0,577	5,33
14	7,00±1,000	5,52
16	7,33±0,577	5,61
18	8,00±0,000	5,84

Analisa BSLT selanjutnya dilakukan pada fraksi diklorometana sebagai pelarut fraksi semi-polar; hasil pengujian diperlihatkan pada tabel 4.4. Hasil uji toksisitas melalui metode BSLT yang telah dilakukan, memperoleh hasil kematian paling tinggi pada konsentrasi 18 ppm sebesar 80% dan terendah pada konsentrasi 2 ppm sebesar 1%.

Hasil yang diperoleh dapat digunakan, dikarenakan variabel konsentrasi dapat mempengaruhi variabel probit dengan nilai signifikansi $<0,05$ yang berarti data valid, dengan diperoleh nilai LC_{50} sebesar 8,15 ppm (Maheta, 2024). Tingginya aktivitas senyawa biokaktif pada fraksi diklorometana dipengaruhi oleh kandungan senyawa alkaloid dan asam askorbat. Hasil penelitian Shakya (2015) pada uji toksisitas kunyit hitam menggunakan pelarut semi polar berupa kloroform memperoleh hasil 45,3 ppm dalam kategori toksik (Shakya et al., 2015). Memberikan potensi pelarut diklorometan lebih baik dari pelarut kloroform dalam mempengaruhi tingkat toksisitas senyawa.

Berbeda dengan hasil fraksi etanol, memperoleh nilai LC_{50} sebesar 11,08 ppm, sedikit terpaut dari fraksi lainnya. Diperkirakan dipengaruhi dari proses ekstraksi bertingkat, terdapat senyawa yang dapat larut

dalam fraksi polar terbawa pada fraksi semi-polar. Tingkat kematian pada fraksi etanol paling tinggi sebesar 70% dalam konsentrasi 18 ppm dan terkecil 7% konsentrasi 2 ppm. Hasil uji dapat dilihat pada tabel 4.5 yang menguraikan hasil kematian dari uji BSLT sebagai metode toksisitas senyawa. Keberadaan senyawa dalam fraksi etanol cukup beragam, berupa steroid, flavonoid, asam askorbat, dan kurkumin.

tabel 4 5 hasil uji toksisitas fraksi etanol metode BSLT

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva mati	Nilai Probit
2	0,67±0,577	3,45
4	1,67±0,577	4,01
6	2,67±0,577	4,36
8	3,33±0,577	4,56
10	4,33±0,577	4,83
12	5,00±0,000	5,00
14	6,00±0,000	5,25
16	6,67±0,577	5,41
18	7,00±0,000	5,52

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil LC_{50} terkecil dari uji BSLT secara berurutan, yaitu fraksi diklorometan, fraksi n-heksana, dan fraksi etanol. Hasil uji toksisitas yang telah dilakukan memberikan hasil yang lebih baik dari pada penelitian terdahulu oleh Shakya, dkk. (2015) dengan hasil uji toksisitas sebesar 100 ppm (metanol), 45,3 ppm

(kloroform), dan 18,9 ppm (petroleum eter) melalui ekstraksi bertingkat (Shakya et al., 2015). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa proses ekstraksi bertingkat bantuan ultrasonik memberikan dampak yang signifikan, dibuktikan dengan keberadaan senyawa aktif yang mempengaruhi tingkat toksisitas sampel. Ringkasan hasil uji penelitian yang telah dilakukan diperoleh nilai seperti pada tabel 4.6.

tabel 4 6 ringkasan hasil penelitian

Fraksi	% Rendemen	Nilai LC₅₀	Tingkat toksisitas	Senyawa aktif
			*	
n-Heksana	1,43	9,59 ppm	Sangat toksik	Alkaloid dan Terpenoid
Diklorometana	16,27	8,15 ppm	Sangat toksik	Alkaloid dan asam askorbat
Etanol	10,12	11,08 ppm	Sangat toksik	Steroid, Flavonoid, asam askorbat, dan Kurkumin

*(Sumihe et al., 2014)

D. Pengaruh Senyawa Aktif dan Mekanisme Reaksi Terhadap Sel Kanker

1. Pengaruh Senyawa aktif terhadap sel kanker

Hasil LC_{50} dipengaruhi keberadaan senyawa aktif yang terkandung di setiap fraksinya. Fraksi n-heksan mengandung senyawa aktif berupa alkaloid dan terpenoid. Alkaloid sendiri memiliki kemampuan untuk berinteraksi dengan DNA dan enzim, merusak DNA dan menghambat proliferasi sel kanker dengan cara produksi Spesies Oksigen Reaktif (ROS), berakibat stres oksidatif pada sel kanker (Donohoe et al., 2013). Selain itu, alkaloid dengan dosis tinggi dapat mengubah fluiditas membran yang berfungsi sebagai transfer energi, kemudian terjadi kebocoran pada membran yang mengganggu keseimbangan ion dan osmotik (Indarsari et al., 2023).

Sedangkan untuk terpenoid dapat menginduksi apoptosis (kematian sel terprogram), dengan mencegah perkembangan sel kanker melalui penghambatan invansi dan metastatis sel kanker (Budhy et al., 2024). Selain itu, terpenoid dapat menginduksi autofagi dengan memodulasi jalur sinyal terlibat dalam autofagi, seperti jalur mTOR (mechanistic target of rapamycin) yang berperan

pada proses regulasi pertumbuhan sel dan metabolisme sel. Akibatnya, terbentuk autofagosom yang berperan menghancurkan sel yang tidak diinginkan (Herawati et al., 2022).

Manfaat dari proses autofagi yang dipicu oleh terpenoid dapat memberikan manfaat membersihkan sel yang tidak diinginkan dan komponen sel yang rusak, sehingga dapat menekan sel kanker pada tubuh, sehingga kunyit hitam dapat menjadi opsi alternatif dalam menekan sel yang rusak pada tubuh (Azzahra Attamimi & Indah Permata Yuda, 2022).

Fraksi diklorometan mengandung senyawa aktif berupa alkaloid dan asam askorbat. Asam askorbat dengan dosis tinggi dapat memicu reaksi oksidatif, dengan memicu pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan, yang dapat merusak lipid membran sel (Mulyani et al., 2023). Peran alkaloid dalam proses antikanker sama seperti sebelumnya, bahwa alkaloid dapat merusak struktur membran dan menghambat proses transfer energi.

Fraksi etanol dengan kandungan senyawa aktif berupa steroid, flavonoid, asam askorbat, dan kurkumin. Steroid berperan mengurangi peradangan

dengan memodulasi lingkungan tumor dan dapat mempengaruhi respon sel terhadap proses terapi, dalam artian steroid berperan sebagai aktivator yang memicu sel kanker supaya dapat lebih mudah bereaksi ketika proses kemoterapi pada pasien kanker, serta dapat menghambat pembelahan sel kanker (Azah, 2019). Sedangkan flavonoid dan kurkumin dapat menghambat proliferasi (proses perbaikan jaringan atau pertumbuhan sel) di sel kanker, dilakukan melalui modulasi protein (pengaturan aktivitas protein) dalam sel (Hidayah, Widyaningsih, et al., 2023; Husada & Dias Puteri, 2020). Selain itu, kelebihan dari kurkumin berupa sifat selektifnya, sehingga dapat bereaksi terhadap sel kanker tanpa harus merusak sel normal (Husada & Dias Puteri, 2020). Sedangkan asam askorbat dalam reaksinya sama dengan yang telah dipaparkan sebelumnya, mengakibatkan reaksi oksidatif pada sel.

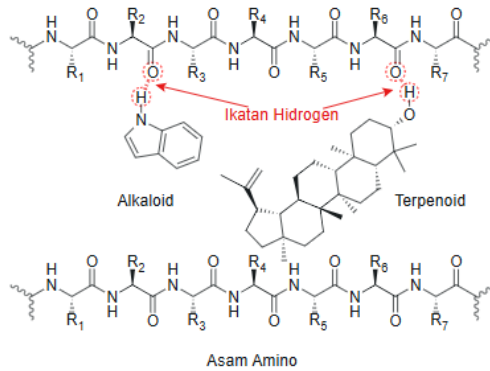
2. Interaksi molekuler antara golongan senyawa aktif dan larva udang *Artemia salina* Leach

Golongan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker memiliki lima mekanisme aksi terhadap sel target secara umum. Kelima aksi tersebut adalah menghalangi (*blocking*) fungsi utama

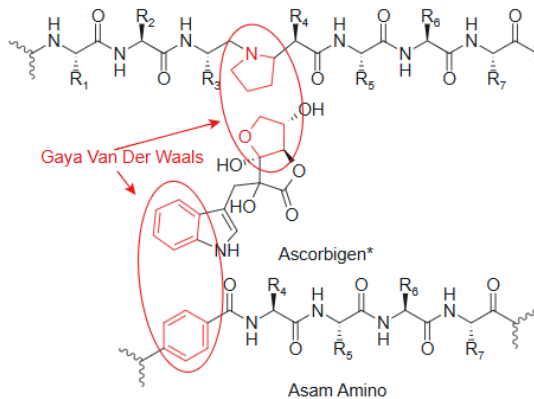
melalui enzim atau protein, menimbulkan sitotoksik dan efek mutagenik, gangguan pada struktur di membran sel, mengganggu komunikasi antar sel dan mengganggu metabolisme intermediet (Rocha et al., 2022).

Pada penelitian ini ketiga fraksi (tabel 4.12) menunjukkan aktivitas sitotoksik pada sel larva udang. Hal ini disebabkan diduga terjadi sinergisitas antara golongan metabolit sekunder yang berbeda (Dębczak et al., 2024). Pada fraksi n-heksan, sinergi terjadi antara alkaloid dan terpenoid. Sementara pada fraksi diklorometan, sinergi terjadi antara alkaloid dan asam askorbat. Sinergi pada fraksi diklorometan ini bisa jadi alkaloid dan asam askorbat melakukan aksi secara terpisah atau kedua golongan senyawa ini terjadi interaksi secara kovalen. Interaksi kovalen antara asam askorbat dan alkaloid telah diketahui memiliki fungsi sebagai antikanker (Kesinger & Stevens, 2009). Kemungkinan interaksi secara kovalen asam askorbat dan alkaloid memiliki sinergisitas yang lebih besar dari pada golongan metabolit sekunder di fraksi lainnya. Begitu juga pada fraksi etanol, sinergisitas diduga terjadi

antara golongan flavonoid, steroid, kurkumin, dan asam askorbat.

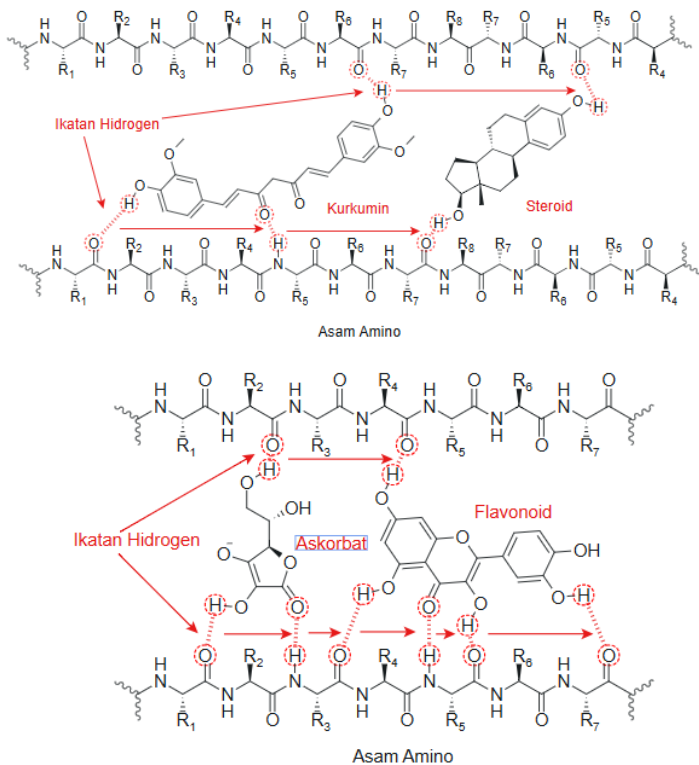


gambar 4. 14 usulan interaksi molekuler pada fraksi n-heksan (alkaloid dan terpenoid) terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang



*) Ascorbigen adalah alkaloid yg berikatan secara kovalen dengan asam askorbat

gambar 4. 15 usulan interaksi molekuler pada fraksi diklorometana (alkaloid dan asam askorbat) terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang



gambar 4. 16 usulan interaksi molekuler pada fraksi etanol (flavonoid, steroid, asam askorbat, dan kurkumin terhadap asam amino penyusun protein sel larva udang

Interaksi molekuler pada penelitian ini dapat diusulkan sebagai berikut (gambar 14-16). Gugus fungsi yang bersifat polar, seperti gugus hidroksil, karbonil, dan amina (pada golongan senyawa aktif) membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino penyusun protein sel larva udang.

Sementara bagian non polar dari golongan senyawa aktif berinteraksi secara van der Waals dengan bagian non polar dari asam amino penyusun protein sel larva udang (Liu et al., 2021). Interaksi molekuler tersebut menyebabkan gangguan pada sel larva udang sebagaimana telah dijelaskan pada mekanisme aksi sitotoksik di atas. Namun, gangguan spesifik yang ditimbulkan oleh golongan senyawa aktif terhadap sel larva udang perlu penelitian lebih lanjut.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan dari penelitian meliputi:

1. Senyawa aktif yang terkandung pada fraksi n-heksan ekstrak rimpang kunyit hitam (*Curcuma caesia*) mengandung alkaloid dan terpenoid, pada fraksi diklorometana mengandung alkaloid dan asam askorbat, dan fraksi etanol mengandung steroid, flavonoid, asam askorbat, dan kurkumin.
2. Nilai LC_{50} fraksi n-heksan, diklorometana, dan etanol secara berturut-turut sebesar 9,59 ppm, 8,15 ppm, dan 11,08 ppm. Hasil tersebut memberikan klasifikasi ekstrak kunyit hitam (*Curcuma caesia*) dari fraksi non-polar, semi-polar, dan polar termasuk sangat toksik (< 30 ppm) (Sumihe et al., 2014).

B. Saran

Penelitian yang telah dilakukan perlu dikembangkan pada tahap selanjutnya, seperti

1. Menelusuri fraksi diklorometan lebih lanjut sebagai antikanker.

2. Membandingkan proses yang lebih sederhana untuk memberikan variabel yang mempengaruhi hasil secara akurat.
3. Uji penyarian senyawa tunggal dalam rimpang kunyit hitam yang berperan sebagai antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Amin, M., Eltayeb, N. M., Khairuddean, M., & Salhimi, S. M. (2021). Bioactive chemical constituents from *Curcuma caesia* Roxb. rhizomes and inhibitory effect of curcuzederone on the migration of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. *Natural Product Research*, 35(18), 3166–3170. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1690489>
- Anggraini, D. I., & Wisnu Kusuma, E. (2020). Uji Potensi Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Apel Hijau (*Pyrus malus* L.) terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 7–15. <https://doi.org/10.3194/CE.V4I1.2668>
- Asworo, R. Y., & Widwastuti, H. (2023). Pengaruh Ukuran Serbuk Simplisia dan Waktu Maserasi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Sirsak. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 3(2). <https://doi.org/10.37311/ijpe.v3i2.19906>
- Azah, S. N. (2019).). Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil Kltp Ekstrak N-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla Verticillata* Menggunakan Uv-Vis dan LC-MS/MS. *Central Library of Maulana Malik Ibrahim State Islamic University*, 1–107.

- Azzahra Attamimi, F., & Indah Permata Yuda, dan. (2022). Aktivitas Antibakteri Terpenoid dari Umbi Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) Terhadap *Streptococcus Sanguinis* ATCC10556. *Yarsi Journal of Pharmacology*, 3(2).
- Budhy, T. I., Arundina, I., Irmawati, A., Sidarningsih, Surboyo, M. D. C., Raharjo, C. O., Akbar, C. S., & Rahmalia, M. Q. (2024). Anticancer activity of *Aucklandia costus* Falc. terpenes: Targeting MDM2 protein inhibition for therapeutic advancements. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 12(4), 748–758. https://doi.org/10.56499/jppres23.1910_12.4.748
- Budi, P., Kunit, D., Sebagai, H., Tambahan, S., Keluarga, P., Menjadi, D., Bahan Minuman, S., Prihatma, G. T., & Fatah, A. (2023). Pengelolaan Budi Daya Kunyit Hitam Sebagai Sumber Tambahan Pendapatan Keluarga Dan Menjadi Sumber Bahan Minuman Kesehatan. *Dasabhakti*. <https://e-jurnal.lppmunsera.org/index.php/dasabhakti>
- Chatri, M. & P. S. A. (2018). Efektivitas Ekstrak *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Dalam Menghambat Pertumbuhan Jamur *Sclerotium rolfsii* Secara In

Vitro. *BioSains*, 1, 59–66.
<https://ejournal.unp.ac.id/students/index.php/bio/article/view/3161/2556>

Constanty, I. C. (2021). Aktivitas Antioksidan Dari Fraksi n-Heksana Kulit Batang Tumbuhan Jambu Semarang (*Syzygium samarangense*). *Jurnal Kimia Riset*, 6(1), 1–7.

Das, A. K., Borah, M., Kalita, J. J., & Bora, U. (2024). Cytotoxic potential of *Curcuma caesia* rhizome extract and derived gold nanoparticles in targeting breast cancer cell lines. *Scientific Reports*, 14(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-66175-x>

Dębczak, A., Grzegorzczak, A., Świątek, Ł., Sandomierski, M., Fekner, Z., Tyśkiewicz, K., & Milovanovic, S. (2024). Green and sustainable recovery of Polyphenols, Flavonoids, Alkaloids, and Pigments from Green Tea Leaves: Comparative Analysis of Soxhlet, Accelerated Solvent, and Supercritical Fluid Extraction Techniques. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 42.
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101810>

Doherty, A. (2023). Struktur Champagne. In <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.83155.html>. Chemspider.

- Donohoe, T. J., Jones, C. R., Kornahrens, A. F., Barbosa, L. C. A., Walport, L. J., Tatton, M. R., O'Hagan, M., Rath, A. H., & Baker, D. B. (2013). Total synthesis of the antitumor antibiotic ($\pm$)-streptonigrin: First- and second-generation routes for de novo pyridine formation using ring-closing metathesis. *Journal of Organic Chemistry*, 78(24), 12338–12350. <https://doi.org/10.1021/jo402388f>
- Elfira, E., Oktavinola Kaban, F., & Lestari, D. (2024). ANALISIS UJI SKRINING FITOKIMIA EKSTRAK ETANOL DAUN SENDUDUK. In *Jurnal Farmasetis* (Vol. 13).
- Emslie, S. (2023). *Artemia Salina. (On-Line) Animal Diversity Web.*
- Fadul, F. M. (2019). Pharmaceutica. *Journal Of Indonesia.*
- Fajar, A. K. (2016). JI POTENSI ANTIKANKER PADA EKSTRAK AIR DAUN JAMBU AIR (*Syzygium samarangense*) (BL.) Merrill & Perry VARIETAS DELI HIJAU DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT). *Repository UIN Walisongo.*
- Fatma T. Nugraheni, F. T., D. M., S. R. (2017). Perbandingan Rendemen Kristal Kafein pada Biji Kopi (*Coffea*

arabica l.) dan Coklat (*Theobroma cacao* l.) dengan Menggunakan Metode Refluks. *Cendekia Journal of Pharmacy STIKES Cendekia Utama Kudus*, 1, 41–48.
www.jurnal.stikescendekiautamakudus.ac.id

Fauziyah, R., Widyasanti, A., & Rosalinda, S. (2022). Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Kadar Sisa Pelarut dan Rendemen Total Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.). *Jurnal Kimia Padjajaran*, 1, 18–25. <https://jurnal.unpad.ac.id/jukimpad>

Fitriah, N. (2020). Analisa Perbedaan Indikator Asam Dan Basa Menggunakan Variasi Ekstrak Bunga (Mawar, Kembang Sepatu, Bougenvile). *Journal of Science and Technology) Jurusan Teknik Kimia Politeknik NegeriLhokseumawe*, 18(01), 6–11.

Gorzi, A. , A. M. (2020). Useful Effects of Curcumin Supplementation on Gastric Superoxide Dismutase Activity and Serum Malondialdehyde Level During Endurance Training in Male Wistar Rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 22.

Guntarti, A., Yuningtyas, R., Susanti, H., & Zainab, ; (2021). Jurnal Farmasi Sains dan Praktis ANALYSIS OF TOTAL FLAVONOID LEVEL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST PURPLE CABBAGE (BRASSICA

OLERACEA L. VAR. CAPITATA F. RUBRA) AND WHITE CABBAGE (BRASSICA OLERACEA L. VAR. CAPITATA F. ALBA) ETHANOL EXTRACT USING DPPH METHOD (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL). In *JFSP* (Vol. 7, Issue 2).
<http://journal.ummgl.ac.id/index.php/pharmacy>

Hadem, K. H., Sharan, R., & Kma, L. (2016). Phytochemicals of *Aristolochia tagala* and *Curcuma caesia* exert anticancer effect by tumor necrosis factor- α -mediated decrease in nuclear factor kappaB binding activity. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.170585>

Hakim, A. R., & Saputri, R. (2020). Narrative Review: Optimasi Etanol sebagai Pelarut Senyawa Flavonoid dan Fenolik. *Jurnal Surya Medika*, 6(1), 177–180. <https://doi.org/10.33084/jsm.v6i1.1641>

Hao, D. cheng, & Xiao, P. gen. (2020). Pharmaceutical resource discovery from traditional medicinal plants: Pharmacophylogeny and pharmacophylogenomics. In *Chinese Herbal Medicines* (Vol. 12, Issue 2, pp. 104–117). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.03.002>

- Hausman, D. (2019). *What is Cancer? Perspectiv in Biology and Medicine*.
- Herawati, I. E., Lesmana, R., Levita, J., & Subarnas, A. (2022). PREDICTION OF ANTICANCER ACTIVITY OF RICIN-A THROUGH AUTOPHAGY PATHWAY USING MOLECULAR DOCKING ON BECLIN-1, LC3, AND p62. In *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari* (Vol. 13, pp. 22–30). <https://doi.org/10.2210/pdb2aai/pdb>
- Hidayah, H., Fatmawati, F., Khairunnisa, J., & Hestina Putri, M. (2023). AktivitasTriterpenoid Sebagai Senyawa Antikanker. *Journal Of Social Science Research*, 3, 10168–10183.
- Hidayah, H., Widyaningsih, A., Pangestu, A. D., & Dewi, S. R. (2023). Literatur Riview: Flavonoid Activity As an Anti-Cancer Compound. *MAHESA : Malahayati Health Student Journal*, 3(5), 1255–1263. <https://doi.org/10.33024/mahesa.v3i5.10296>
- Honestdocs. (2020). Sel Kanker, Stadium, dan Tingkatannya. In *honestdocs.id* (p. 1). <https://www.honestdocs.id/sel-kanker-stadium-dan-tingkatannya>

- Husada, S., & Dias Puteri, F. (2020). Efek Kurkumin Pada Kunyit (*Curcuma longa*) Sebagai Pengobatan Kanker Lambung. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, 9, 860–864. <https://doi.org/10.35816/jiskh.v10i2.426>
- I. Illing, W. S. and E. (2017). Uji Fitokimia Ekstrak Buah Degen. *J. Din.*, 2, 66–84.
- Ibrahim, N. N. A., Wan Mustapha, W. A., Sofian-Seng, N. S., Lim, S. J., Mohd Razali, N. S., Teh, A. H., Rahman, H. A., & Mediani, A. (2023). A Comprehensive Review with Future Prospects on the Medicinal Properties and Biological Activities of *Curcuma caesia* Roxb. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2023). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2023/7006565>
- Indarsari, A., Somar, E., Sumarna, S., & Gunung Salju Amban, J. (2023). Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Buah Hitam (*Haplolobus cf. monticola* Husson) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Photochemical Screening And Toxicity Test of Black Fruit (*Haplolobus Cf. Monticola* Husson) Leaves Extract Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. In *Jurnal Natural* (Vol. 19).

- Irvan, P. B. M. J. S. (2015). EKSTRAKSI 1,8-CINEOLE DARI MINYAK DAUN EUCALYPTUS UROPHYLLA DENGAN METODE SOXHLETASI. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 4(2337–4888), 52–57.
- Jain, P. (2018). In-vitro antidiabetic potential of endangered *Curcuma caesia* rhizome extracts and its characterization by FTIR and GC/HR-MS analysis. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, 6, 16–22.
- Jannah, D. W., Maunatin, A., Jannah, A., & Kimia, J. (2021). Identifikasi dan Uji Toksisitas terhadap Larva Udang (*Artemia salina* L.) Ekstrak Bekatul Menggunakan Variasi Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi. *Alchemy: Jurnal of Chemistry*, 8(2), 16–23.
- Kartini, S., Yusnita, F., Putri, N., & Serawaldi, A. (2024). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Ethanol Extract of *Curcuma caesia* Roxb by DPPH Method Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kunyit Hitam (*curcuma caesia* Roxb) dengan Metode DPPH. *Journal of Pharmacy and Science*, 7(2), 143–149. <http://jurnal.univrab.ac.id/index.php/jops>

Kesinger, N. G., & Stevens, J. F. (2009). Covalent Interaction of Ascorbic Acid with Natural Products. In *Phytochemistry* (Vol. 70, Issues 17–18, pp. 1930–1939).

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.09.028>

Kewa, M. M., Almet, J., & Laut, M. M. (2020). MEDIAN LETHAL CONCENTRATION (LC50) EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn) TERHADAP LARVA *Culex* sp DI KOTA KUPANG. *JURNAL KAJIAN VETERINER*, 8(2), 147–152.

<https://doi.org/10.35508/jkv.v8i2.3078>

Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 70). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Kumoro, A. C. (2015). *Teknologi Ekstraksi Senyawa Bahan Aktif dari Tanaman Obat*. Plantaxia.

Lamontagne, F., Masse, M.-H., Menard, J., Sprague, S., Pinto, R., Heyland, D. K., Cook, D. J., Battista, M.-C., Day, A. G., Guyatt, G. H., Kanji, S., Parke, R., McGuinness, S. P., Tirupakuzhi Vijayaraghavan, B.-K., Annane, D.,

- Cohen, D., Arabi, Y. M., Bolduc, B., Marinoff, N., ... Adhikari, N. K. J. (2022). Intravenous Vitamin C in Adults with Sepsis in the Intensive Care Unit. *New England Journal of Medicine*, 386(25), 2387–2398. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2200644>
- Leksono, W. B., Pramesti, R., Santosa, G. W., & Setyati, W. A. (2018). Jenis Pelarut Metanol Dan N-Heksana Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Gelidium* sp. Dari Pantai Drini Gunungkidul – Yogyakarta. *Jurnal Kelautan Tropis*, 21(1), 9. <https://doi.org/10.14710/jkt.v21i1.2236>
- Liu, K., Zha, X. Q., Li, Q. M., Pan, L. H., & Luo, J. P. (2021). Hydrophobic interaction and Hydrogen Bonding Driving The Self-Assembling of Quinoa Protein and Flavonoids. *Food Hydrocolloids*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106807>
- Louradebi Kapondo, G., & Jayanti, M. (2020). *Isolasi, Identifikasi Senyawa Alkaloid Dan Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (Piper betle L.) Terhadap Bakteri Staphylococcus epidermidis*. 8(2), 180–186. <https://doi.org/10.35790/ebm.8.1.2020.28706>

- Madiabu, M. J., Taufik Abdul Aziz, I., Supriyono, S., Putra, A. P., Cahyotomo, A., & Panglipur, H. S. (2023). Skrining Fitokimia Hasil Ekstraksi Bertingkat Daun Jengkol (*Archidendron jiringa*) dan Aplikasinya Sebagai Zat Antijamur. *JURNAL SAINS TEKNOLOGI & LINGKUNGAN*, 9(1), 17–24. <https://doi.org/10.29303/jstl.v9i1.403>
- Maheta, D. (2024). 59. *Probit Regresion in IBM SPSS*.
- Mailuhu, M., Runtuwene, M. R. J., & Koleangan, H. S. J. (2017). SKRINING FITOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL KULIT BATANG SOYOGIK (*Saurauia bracteosa* DC). *Chem. Prog*, 10(1). <https://doi.org/10.35799/cp.10.1.2017.27737>
- Mardiah, Nurhayati, S., & Amalia, D. L. (2018). Upaya Mengurangi Bau Khas pada Kunyit (*Curcuma Domestica* Val.) sebagai Pewarna Alami Makanan The Effort Reduced The Peculiar Smell In Turmeric (*Curcuma Domestica* Val.) As A Natural Food Coloring. *Jurnal Pertanian*.
- Marisa, C. R. (2021). Otomatisasi Sistem Pengendalian Dan Pemantauan Kadar Nutrisi Air Menggunakan Teknologi NODEMCU ESP8266 pada Tanaman Hidroponik. *Jurnal Teknologi Terpadu*, 7, 127–134.

Maysa, A., Widiastuti, E. L., Nurcahyani, N., & Busman, H. (2016). Uji Senyawa Taurin Sebagai Antikanker Terhadap Jumlah Sel-Sel Leukosit Dan Sel-Sel Eritrosit Mencit (*Mus musculus L.*) yang Diinduksi Benzo (A) Pyren Secara In Vivo Taurine For Anticancer With Reference To The Total Count Of Leucocyte Cells And Erythrocyte Cells Of Mice (*Mus musculus L.*) Induced To Benzo (A) Pyrene In Vivo. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 16(2), 68–75. <http://www.jptonline.or.id>

Mehmood, A., Mubarak, N. M., Khalid, M., Walvekar, R., Abdullah, E. C., Siddiqui, M. T. H., Baloch, H. A., Nizamuddin, S., & Mazari, S. (2020). Graphene based nanomaterials for strain sensor application - A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103743>

Muchtadi, D. (2013). *Antioksidan dan Kiat Sehat di Usia Produktif*. Alfabeta.

Mulyani, S., Budi, S., Cahyono, I., & Khairiman, K. (2023). Effect of Vitamin C Bioencapsulation in Natural Feed on Protein, Fat, Energy, and Mortality of Milkfish Larvae (*Chanos chanos*). *Jurnal Kelautan Tropis*,

26(2), 272–282.
<https://doi.org/10.14710/jkt.v26i2.17969>

Nanang Fitoni, C., Tri Asri, M., Thamrin Hidayat Jurusan Biologi, M., & Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, F. (2013). Pengaruh Pemanasan Filtrat Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap Pertumbuhan Koloni Bakteri Coliform Secara In Vitro Effect of Heating of Turmeric Filtrate (*Curcuma longa*) on the Colony Growth of Bacteria Coliform In Vitro. *Lentera Bio-Ejournal Unesa*, 2, 217–221.
<http://ejournal.unesa.ac.id/index.php/lenterabio>

Nasir, B., Baig, M. W., Majid, M., Ali, S. M., Khan, M. Z. I., Kazmi, S. T. B., & Haq, I. U. (2020). Preclinical anticancer studies on the ethyl acetate leaf extracts of *Datura stramonium* and *Datura inoxia*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 188.
<https://doi.org/10.1186/s12906-020-02975-8>

Nugraha, G. (2017). Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi. Dasar. . *Kesehatan Bakti Tunas Husada*.

Nuraeni S., R. R. , S. U. , W. W. U. (2023). Ulasan Botani dan Potensi Kunyit Hitam (*Curcuma caesia* Roxb.) sebagai Program Pengelolaan Keanekaragaman

Hayati dan Pembinaan Kelompok Tani Cianjur oleh PT. Tirta Investama (TIV) Cianjur. *Undip* , 25, 1–10.

Nurhadi, D. (2018). Metode Statistik Principal Component Regression Dalam Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur Dan Aktivitas Penghambat Lipoksigenase Senyawa Turunan Kurkumin (Vol. 1).

Nurjannah, I., Ayu, B., Mustariani, A., & Suryani, N. (2022). SPIN JURNAL KIMIA & PENDIDIKAN KIMIA SKRINING FITOKIMIA DAN UJI ANTIBAKTERI EKSTRAK KOMBINASI DAUN JERUK PURUT (*Citrus hystrix*) DAN KELOR (*Moringa oleifera* L.) SEBAGAI ZAT AKTIF PADA SABUN ANTIBAKTERI. *SPIN*, 4(1), 23–36. <https://doi.org/10.20414/spin.v4i1.4801>

Pebrizal, H. (2020). *PERBANDINGAN KADAR VITAMIN C PADA CABAI HIJAU SEGAR DAN CABAI HIJAU KERING (Capsicum annum var) HASIL PERKEBUNAN KABUPATEN KEPAHANG.*

Pendidikan, J., & Indonesia, B. (2016). Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Batang Karamunting (*Rhodomyrtus Tomentosa*) Sebagai Bahan Ajar Biologi Untuk Sma Kelas X Alkaloid Compound Identification of *Rhodomyrtus tomentosa* Stem as Biology Instructional Material for Senior High School

X Grade. *JURNAL PENDIDIKAN BIOLOGI INDONESIA*,
2.

Permana, A. (2018). Guru Besar ITB Rekomendasikan 10 Tanaman Obat Pelawan Sel Kanker. In A. Permana (Ed.), *itb.ac.id* (penelitian). ITB Press.
[https://itb.ac.id/berita/guru-besar-itb-rekomendasikan-10-tanaman-obat-pelawan-sel-kanker/56823#:~:text=Kesepuluh%20tanaman%20tersebut%20adalah%20Tapak,dan%20Propolis%20\(dari%20lebah%20madu\)](https://itb.ac.id/berita/guru-besar-itb-rekomendasikan-10-tanaman-obat-pelawan-sel-kanker/56823#:~:text=Kesepuluh%20tanaman%20tersebut%20adalah%20Tapak,dan%20Propolis%20(dari%20lebah%20madu))

Puspa Yani, N. K. L., Nastiti, K., & Noval, N. (2023). Pengaruh Perbedaan Jenis Pelarut Terhadap Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Surya Medika*, 9(1), 34–44.
<https://doi.org/10.33084/jsm.v9i1.5131>

Puspita, S. I., Sekarlita, Y., Kurniati, E., Susilowati, T., & Billah, M. (2024). Perbandingan Efektivitas Ekstraksi Pektin dari Kulit Durian dengan Bantuan Gelombang Ultrasonik dan Metode Konvensional. *Jurnal Fisika Unand*, 13(3), 427–432.
<https://doi.org/10.25077/jfu.13.3.427-432.2024>

Rachmadenawanti, E. , H. B. , H. Y. (2016). *Uji Aktivitas Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle*

(Zingiber cassumunar Roxb.) sebagai Terapi Komplementer Malaria secara In Vivo. 205–209.

Rahman Habibi, A., Ovi Harsachatri, D., Anthony Ignatius, W., Adistin, Y., Studi Analis Kesehatan, P., Analis Kesehatan Putra Jaya Batam, A., Studi Teknologi Bank Darah, P., & Kesehatan Kartini Batam, A. (2023). *Uji Praskrining Antikanker Ektrak Daun Salam Syzygium polyanthum Menggunakan Artemia salina Leach dengan Metode BSLT.*
<https://journal.unhas.ac.id/index.php/jai2>

Razak, S., Luh Suriani, N., Ermayanti, N. G. A. M., Seng Ho, T., Mayani, G. A., & Dewi, K. (2024). Toxicity Test of Black Turmeric Extract (*Curcuma caesia* Roxb.) on *Artemia salina* Larva and Its Potential as an Anti-Cancer Agent. *Qabas Journals*, 4, 111.

Renda, Y. K., Pote, L. L., & Nadut, A. (2023). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid dari Kulit Batang Tumbuhan Halay (*Alstonia spectabilis* R. Br) Asal Desa Wee Rame Kabupaten Sumba Barat Daya. *Jurnal Sains Dan Edukasi Sains*, 6(1), 44–50.
<https://doi.org/10.24246/juses.v6i1p44-50>

Reo, A. R., Berhimpon, S., & Montolalu, R. (2017). METABOLIT SEKUNDER GORGONIA (Paramuricea

- clavata) (Secondary Metaboliti of Gorgonia, Paramuricea clavata). *Jurnal Ilmiah Platax*, 5(1).
<http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/platax><http://pasca.unsrat.ac.id/s2/ipa/>
- Rezki, R. S., Anggoro, D., & Mz, S. (2015). EKSTRAKSI MULTI TAHAP KURKUMIN DARI KUNYIT (Curcuma domestica Valet) MENGGUNAKAN PELARUT ETANOL. In *Jurnal Teknik Kimia USU*. Article in Press.
- Rocha, J. D., Carneiro, F. M., Fernandes, A. S., Morais, J. M., Borges, L. L., Chen-Chen, L., de Almeida, L. M., & Bailão, E. F. L. C. (2022). Toxic Potential of Cerrado Plants on Different Organisms. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/ijms23073413>
- Rohman Yulianto, M. F., & Devina, S. P. (2024). Ekstraksi Antosianin Buah Naga Menggunakan Metode Solvent Extraction. *Journal of Biobased Chemicals*, 4(1), 69–80. <https://doi.org/10.19184/jobc.v4i1.841>
- Rokom. (2022). Kanker Payudara Paling Banyak di Indonesia, Kemenkes Targetkan Pemerataan Layanan Kesehatan, . *Kemenkes*.
- Runciman, C. (2021). *Brady Test Microscale Experiment*.

- Ryle, S. (2023). Paduan Camphane, Terpen yang menawarkan beragam Manfaat medis . In <https://leafwell.com/blog/camphene> . Leafwell.
- Sabaragamuwa, R., & Perera, C. O. (2023). Total Triterpenes, Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Bioactive Phytochemicals of *Centella asiatica* by Different Extraction Techniques. *Foods*, 12(21). <https://doi.org/10.3390/foods12213972>
- Sadli, I. S. (2016). *Toxic Activity Of N -Hexane Xane The Cytot Ura Linn .) Extract Of Kersen (Muntingia Calabura Ng The Brine Shrimp Leth Leaves Using Test (BSLT) Method . 2*(16), 11–12.
- Sardjiman, R. R. , S. , E. W. N. Rahma. (2024). *Efektivitas Antibakteri Kurkumin dan Asam Tanat terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli in vitro*. <http://jurnal.unw.ac.id/index.php/ijpnp>
- Setyowati, W. A. E. , & C. M. A. S. (2016). Kandungan Kimia dan Uji AKtivitas Toksik Menggunakan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) dari Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia (JKPK, 2*, 41–47.

- Shakya, S., Giri, A., Chhetri, P., & Shakya, S. (2015). Preliminary investigation of different extracts of *Curcuma caesia* for its antibacterial effects and cytotoxic activity. ~ 116 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(2), 116–120.
- Sharma, A., Ray, A., & Singhal, R. S. (2024). Co-solvent assisted supercritical fluid extraction of *Curcuma caesia* Roxb. (black turmeric) as a green and sustainable technology: Its bioactivity and anti-cancer properties. *Green Analytical Chemistry*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2024.100173>
- Shary, K. A. (2023). *Skrining Fitokimia Dan Uji Kadar Kurkumin Pada Fraksi Etil Asetat Rimpang Kunyit (Curcuma longa) Dengan Metode KLT Dan Spektrofotometri UV-Vis.* 37(2), 111–118. <https://jurnal.unikal.ac.id/index.php/pena>
- Siddiqui, T., Khan, M. U., Sharma, V., & Gupta, K. (2024). Terpenoids in essential oils: Chemistry, classification, and potential impact on human health and industry. In *Phytomedicine Plus* (Vol. 4, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2024.100549>
- Sugiarti, L., E. P. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Echerichia Coli*. *Cendekia Journal of Pharmacy STIKES Cendekia Utama Kudus*, 1.

Sulistiyarini, I., Sari, A., Tony, D., Wicaksono, A., Tinggi, S., Farmasi, I., Yayasan, ", Semarang, P., Letjend, J., Wibowo, S. E., & Semarang, P. (2020). *Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga SKRINING FITOKIMIA SENYAWA METABOLIT SEKUNDER BATANG BUAH NAGA (Hylocereus polyrhizus)*.

Sumihe, G., Runtuwene, M. R. J., & Rorong, J. A. (2014). *ANALISIS FITOKIMIA DAN PENENTUAN NILAI LC50 EKSTRAK METANOL DAUN LIWAS PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND DETERMINING LC50 VALUE OF LIWAS LEAVE METHANOL EXTRACT*.

Susidarti, R. A. (2017). ISOLASI SENYAWA STEROID DARI KUKIT AKAR SENGGUGU (*Clerodendrum serratum* L.Moon). In *PHARMACONJurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT* (Vol. 6, Issue 3).

Syahdana, N. L., Taufiqurrahman, I., & Wydiamala, E. (2017). UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN BINJAI (*Mangifera caesia*) TERHADAP MORTALITAS

LARVA *Artemia salina* Leach. *Jurnal Kedokteran Gigi*, 1(1), 39–44.

Syarifuddin, A., & Sulistyani, N. (2019). Karakterisasi Fraksi Teraktif Senyawa Antibiotik Isolat KP 13 dengan Metode Densitometri dan KLT-Semprot. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 4, 156–166.

Takaeb, M. J., & Leo, M. I. (2023). Identifikasi Metabolit Sekunder pada Sopi Kualin (SOKLIN) yang Dibuat Dengan dan Tanpa Fermentasi di Desa Kualin Nusa Tenggara Timur. *Jurnal Sains Dan Edukasi Sains*, 6(2), 111–116.

<https://doi.org/10.24246/juses.v6i2p111-116>

Togelang, A. V, Simbala, H. E. I., Abdullah, S. S., Program,), Farmasi, S., Matematika, F., Ilmu, D., Alam, P., & Ratulangi, S. (2023). Toxicity Test Of The Extract Of Pepper Elder (*Peperomia Pellucida*) Using Brine Shrimp Lethality Test Uji Toksisitas Ekstrak Sirih Cina (*Peperomia Pellucida*) Dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test. *Pharmacon Jurnal*, 12(3), 8–275.

Trifani, D., Nur, D., Sari, P., Mukhaira, I., Keperawatan, F., & Madani, Y. (2023). Hubungan Tingkat Pengetahuan dengan Kecemasan Perawat dalam Pemberian

Kemoterapi pada Pasien Kanker di Ruang Rawat Inap Rumah Sakit Kanker Dharmais. *Jurnal Ilmu Kesehatan Insan Sehat*, 11(2).
<http://jurnalstikesintanmartapura.com/index.php/jikis>

Ulfa, D. M., Tulandi, S. M., & Sulistiyo, J. (2024). Toxicity Evaluation with Brine Shrimp Lethality Test and Phytochemical Analysis of Some Indonesian Plant Extracts As Potential Anti-Colon Cancer Agents. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 8(4), 6864–6867.

<https://doi.org/10.26538/tjnpr/v8i4.16>

Ulfa, N. M., Kusumo, G. G., & Zulfa, I. M. (2018). Uji Aktivitas Antikanker Biji Pepaya (Carica Papaya Semen L) Pada Hewan Coba Mencit Dengan Carcinoma Mamae Ninik Mas Ulfa Galuh Gondo Kusumo. *Seminar Nasional Hasil Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat*, 646–657.

Vinatoru, M. , M. T. J. , C. I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178.

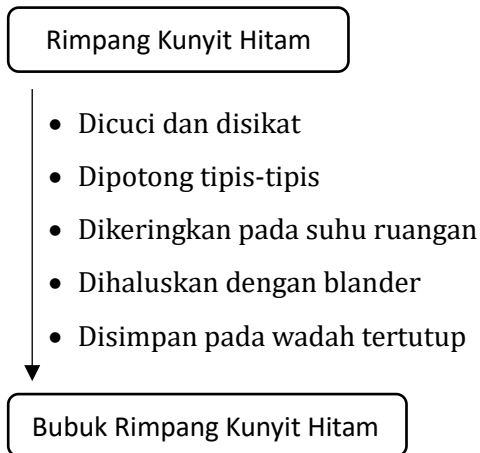
- Wardatul Jannah, D., Maunatin, A., Jannah, A., & Kimia, J. (2020). *Identifikasi dan Uji Toksisitas terhadap Larva Udang (Artemia salina L.) Ekstrak Bekatul Menggunakan Variasi Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi*.
- Weroy K., G., Simbala, H. E., & Jayanto, I. (2019). Identifikasi Fitokimia, Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode 1.1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (Dpph), dan Toksisitas dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Bslt) dari Ekstrak Etanol Tangkai Buah Pinang Yaki (Areca vestiaria Giseke). *Parmachom*, 8, 619–620.
- Widiasari, S. (2018). Mekanisme inhibisi Angiotensin Converting Enzym oleh flavonoid pada hipertensi. . *Collaborative Medical Journal* , 30–44.
- Wilapangga, A. , & S. S. (2018). Analisis Antibakteri metode Agar Cakram dan Uji Toksisitas menggunakan BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) dari Ekstrak Metanol Daun Salam (Eugenia polyantha). . *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2, 47–49.
- Winarsi, H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kansinius.

- Yasser, M., Ilham Nurdin, M., Bangngalino, H., Angraini, N., Urfi Said, R., & Teknik, J. (2023). Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid, Alkaloid, Saponin, Steroid Dan Terpenoid Dari Daun Kopasanda (*Chromoloena odorata* L.). *Prosiding 6th Seminar Nasional Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat 2022, Bidang Ilmu Teknik Kimia, Kimia Analisis, Teknik Lingkungan, Biokimia Dan Bioproses*, 90–94.
- Yusuf, F. M., N. (2015). Evaluasi Kadar Kurkumin. *UI Jurnal*, 2(2407–2354), 3.

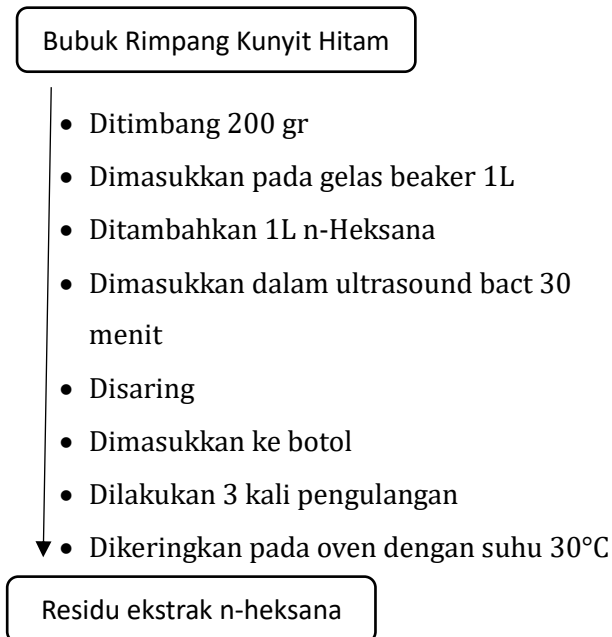
DATA LAMPIRAN

Lampiran 1 Langkah Kerja Penelitian

1. Preparasi sampel



2. Ekstrasi Kunyit Hitam (*Curcuma caesia*)



- Dimasukkan pada gelas beaker 1L
- Ditambahkan 1L diklorometana
- Dimasukkan dalam ultrasound bath 30 menit
- Disaring
- Dimasukkan ke botol
- Dilakukan 3 kali pengulangan

Residu ekstrak diklorometana

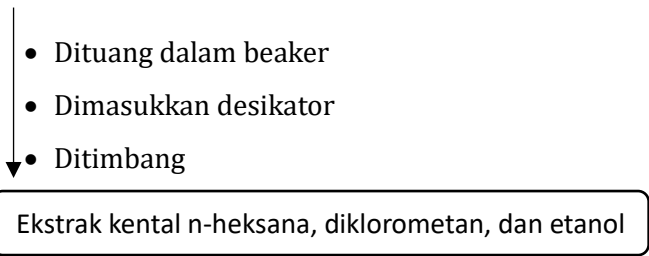
- Dikeringkan pada oven dengan suhu 30°C
- Dimasukkan pada gelas beaker 1L
- Ditambahkan 1L etanol
- Dimasukkan dalam ultrasound bath 30 menit
- Disaring
- Dimasukkan ke botol
- Dilakukan 3 kali pengulangan

Ekstrak cair n-heksan, diklorometan, dan etanol

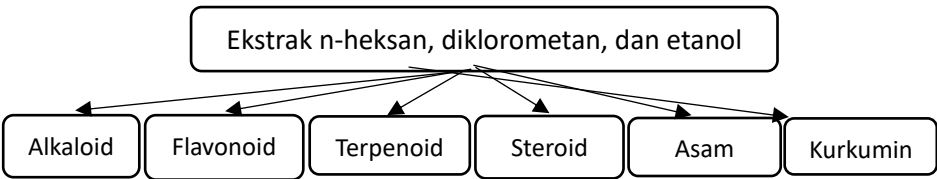
3. Pemisahan ekstrak dengan pelarut

Ekstrak cair n-heksan, diklorometan, dan etanol

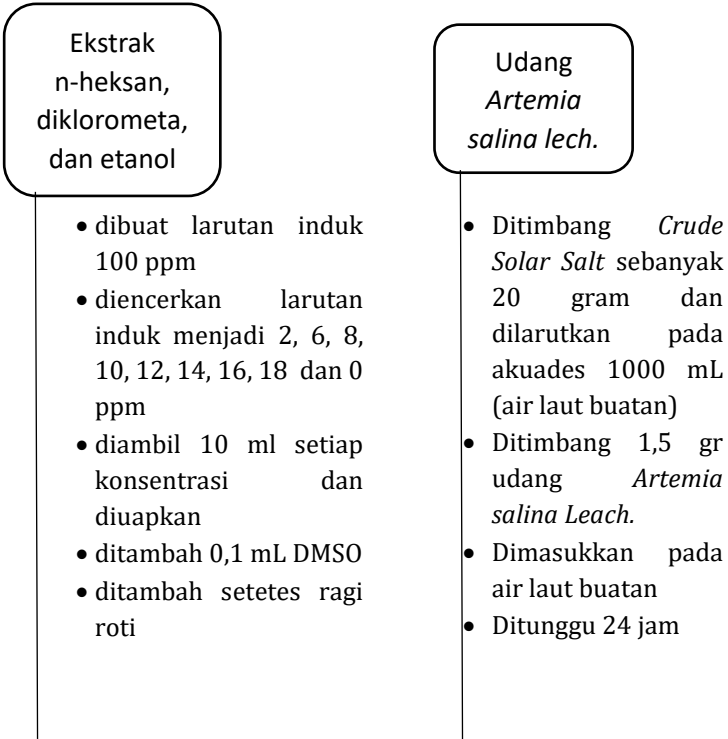
- Dilakukan proses rotary evaporasi dengan suhu 55°C (n-heksana), 35°C (diklorometana), 55°C (etanol).



4. Uji penapisan fitokimia



5. Uji toksisitas Kunyit Hitam (*Curcuma caesia*)



- ditambah 2 mL air laut buatan
- dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambah air laut buatan hingga tanda batas

- Diambil 10 ekor untuk setiap botol vial
- Dimasukkan botol vial

- Didiamkan 24 jam
- Dihitung larva udang yang hidup dan mati
- Dihitung nilai LC_{50}

Nilai LC_{50}

Lampiran 2 Perhitungan Randemen

Nilai rendemen ekstrak rimpang kunyit hitam

$$\text{Randemen: } \frac{\text{Berat Ekstrak (gr)}}{\text{Berat Sampel (gr)}} \times 100\%$$

1. Nilai randemen fraksi n-Heksana

$$\text{Randemen: } \frac{1,43 \text{ gr}}{200 \text{ gr}} \times 100\% = 0,71\%$$

2. Nilai randemen fraksi Diklorometana

$$\text{Randemen: } \frac{16,27 \text{ gr}}{200 \text{ gr}} \times 100\% = 8,14\%$$

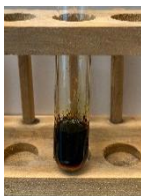
3. Nilai randemen fraksi Etanol

$$\text{Randemen: } \frac{10,12 \text{ gr}}{200 \text{ gr}} \times 100\% = 5,06\%$$

Lampiran 3 Hasil Uji Penapisan Fitokimia Kunyit Hitam

No	Metabolit Sekunder	Fraksi n-Heksana	Fraksi Diklorometana	Fraksi Etanol
1.	Alkaloid			
		(+)	(+)	(-)
2.	Flavonoid			
		(-)	(-)	(+)
3.	Terpenoid			
		(+)	(-)	(-)
4.	Steroid			
		(-)	(-)	(+)

5. Asam askorbat



(-)



(+)



(+)

6. Kurkumin



(-)



(-)



(+)

Lampiran 4 Perhitungan Pembuatan Larutan Induk dan rumus pengenceran

$$\begin{aligned}
 100 \text{ ppm} &= \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \\
 &= \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \\
 &= \frac{0,01 \text{ gr}}{100 \text{ mL}}
 \end{aligned}$$

Larutan 18 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 18 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,8 \text{ mL}$$

Larutan 16 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 16 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,6 \text{ mL}$$

Larutan 14 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 14 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,4 \text{ mL}$$

Larutan 12 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 12 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,2 \text{ mL}$$

Larutan 10 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 10 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,0 \text{ mL}$$

Larutan 8 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 8 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,8 \text{ mL}$$

Larutan 6 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 6 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,6 \text{ mL}$$

Larutan 4 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 4 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,4 \text{ mL}$$

Larutan 2 ppm

$$M_1 \times V_2 = M_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V_1 = 2 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,2 \text{ mL}$$

Lampiran 5 Perhitungan % mortalitas

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Fraksi n-Heksana

2 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{4}{30} \times 100\% = 13\%$$

4 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{7}{30} \times 100\% = 23\%$$

6 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{10}{30} \times 100\% = 33\%$$

8 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{12}{30} \times 100\% = 43\%$$

10 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{15}{30} \times 100\% = 50\%$$

12 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{17}{30} \times 100\% = 57\%$$

14 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{19}{30} \times 100\% = 63\%$$

16 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{20}{30} \times 100\% = 67\%$$

18 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{22}{30} \times 100\% = 73\%$$

Fraksi Diklorometana

2 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{3}{30} \times 100\% = 10\%$$

4 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{8}{30} \times 100\% = 27\%$$

6 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{11}{30} \times 100\% = 37\%$$

8 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{14}{30} \times 100\% = 47\%$$

10 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{17}{30} \times 100\% = 57\%$$

12 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{19}{30} \times 100\% = 63\%$$

14 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{21}{30} \times 100\% = 70\%$$

16 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{22}{30} \times 100\% = 73\%$$

18 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{24}{30} \times 100\% = 80\%$$

Fraksi Etanol

2 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{2}{30} \times 100\% = 7\%$$

4 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{5}{30} \times 100\% = 17\%$$

6 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{8}{30} \times 100\% = 27\%$$

8 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{10}{30} \times 100\% = 33\%$$

10 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{13}{30} \times 100\% = 43\%$$

12 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{15}{30} \times 100\% = 50\%$$

14 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{18}{30} \times 100\% = 60\%$$

16 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{20}{30} \times 100\% = 67\%$$

18 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{21}{30} \times 100\% = 70\%$$

Lampiran 6 Hasil Uji Toksisitas Metode BSLT

LC₅₀ fraksi n-heksana 9,59ppm

Pengujian	Larutan uji (ppm)									
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
1	0	1	2	3	4	4	5	6	7	7
2	0	2	3	4	4	5	6	6	6	7
3	0	1	2	3	4	5	6	7	7	8
Total kematian	0	5	7	10	12	14	17	19	20	22
Rata-rata kematian	0	1.3	2.3	3.3	4.0	5.0	5.7	6.3	6.7	7.3
% mortalitas	0%	13%	23%	33%	40%	50%	57%	63%	67%	73%
SD		0.577	0.577	0.577	0.000	0.577	0.577	0.577	0.577	0.577

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	ppm	1.873	.526	3.562	.000	.842	2.903
	Intercept	-1.838	.519	-3.539	.000	-2.358	-1.319

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	.255	7	1.000 ^a

a. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

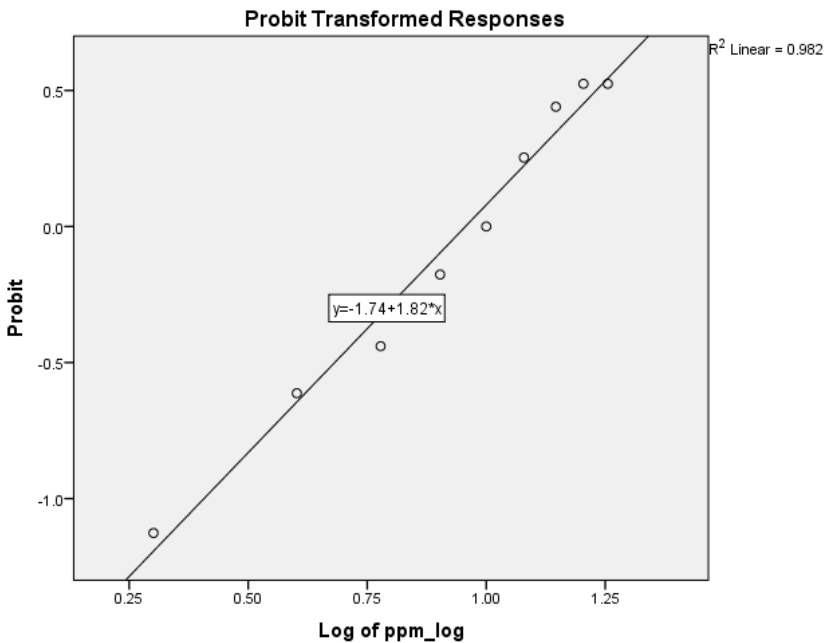
b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Confidence Limits

		Probability		95% Confidence Limits for ppm		95% Confidence Limits for log(ppm) ^a	
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	.549	.017	1.533	-.261	-1.760	.186
	.020	.767	.036	1.912	-.115	-1.438	.282
	.030	.949	.058	2.202	-.023	-1.235	.343
	.040	1.114	.083	2.450	.047	-1.082	.389
	.050	1.269	.110	2.672	.103	-.957	.427
	.060	1.417	.141	2.879	.151	-.852	.459
	.070	1.562	.174	3.074	.194	-.759	.488
	.080	1.704	.211	3.261	.231	-.676	.513
	.090	1.844	.250	3.441	.266	-.601	.537
	.100	1.983	.294	3.617	.297	-.532	.558
	.150	2.681	.565	4.461	.428	-.248	.649
	.200	3.406	.946	5.302	.532	-.024	.724
	.250	4.184	1.460	6.192	.622	.164	.792
	.300	5.032	2.136	7.187	.702	.330	.857
	.350	5.970	2.996	8.367	.776	.477	.923
	.400	7.022	4.049	9.863	.846	.607	.994
	.450	8.216	5.267	11.897	.915	.722	1.075
	.500	9.589	6.587	14.819	.982	.819	1.171
	.550	11.191	7.952	19.122	1.049	.900	1.282
	.600	13.094	9.354	25.504	1.117	.971	1.407
	.650	15.401	10.836	35.068	1.188	1.035	1.545
	.700	18.273	12.472	49.762	1.262	1.096	1.697
	.750	21.977	14.372	73.330	1.342	1.158	1.865
	.800	26.991	16.703	113.776	1.431	1.223	2.056

.850	34.297	19.781	191.006	1.535	1.296	2.281
.900	46.362	24.336	368.608	1.666	1.386	2.567
.910	49.863	25.569	432.314	1.698	1.408	2.636
.920	53.967	26.974	514.169	1.732	1.431	2.711
.930	58.870	28.601	622.311	1.770	1.456	2.794
.940	64.875	30.527	770.376	1.812	1.485	2.887
.950	72.474	32.874	982.971	1.860	1.517	2.993
.960	82.547	35.851	1309.260	1.917	1.555	3.117
.970	96.869	39.867	1863.103	1.986	1.601	3.270
.980	119.826	45.886	2979.507	2.079	1.662	3.474
.990	167.544	57.213	6251.063	2.224	1.757	3.796

a. Logarithm base = 10.



LC₅₀ fraksi diklorometana 8,15 ppm

Pengujian	Larutan uji (ppm)									
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
1	0	1	2	3	4	5	6	6	7	8
2	0	1	3	4	5	6	6	7	7	8
3	0	1	3	4	5	6	7	8	8	8
Total kematian	0	3	8	11	14	17	19	21	22	24
Rata-rata kematian	0	1.0	2.7	3.7	4.7	5.7	6.3	7.0	7.3	8.0
% mortalitas	0%	10%	27%	37%	47%	57%	63%	70%	73%	80%
SD		0.000	0.577	0.577	0.577	0.577	0.577	1.000	0.577	0.000

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	ppm	2.157	.540	3.997	.000	1.099	3.215
	Intercept	-1.966	.530	-3.713	.000	-2.496	-1.437

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.113	7	1.000 ^a

a. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

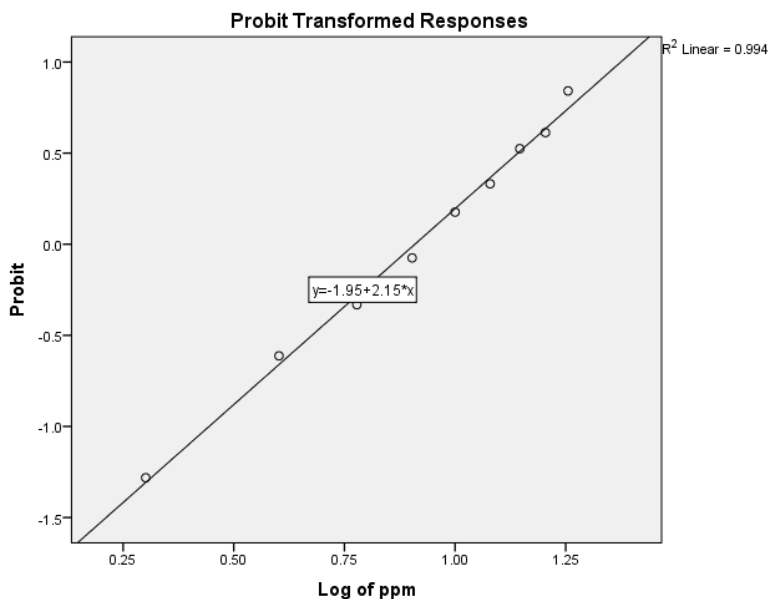
b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Confidence Limits

		Probability		95% Confidence Limits for ppm		95% Confidence Limits for $\log(\text{ppm})^a$	
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	.681	.056	1.637	-.167	-1.252	.214
	.020	.911	.099	1.999	-.041	-1.006	.301
	.030	1.095	.141	2.270	.040	-.851	.356
	.040	1.259	.185	2.498	.100	-.733	.398
	.050	1.409	.230	2.702	.149	-.638	.432
	.060	1.551	.277	2.890	.191	-.557	.461
	.070	1.688	.326	3.065	.227	-.487	.486
	.080	1.820	.377	3.232	.260	-.423	.509
	.090	1.949	.431	3.393	.290	-.366	.531
	.100	2.077	.486	3.548	.317	-.313	.550
	.150	2.697	.803	4.280	.431	-.095	.631
	.200	3.321	1.191	4.988	.521	.076	.698
	.250	3.969	1.663	5.714	.599	.221	.757
	.300	4.659	2.232	6.491	.668	.349	.812
	.350	5.404	2.910	7.359	.733	.464	.867
	.400	6.222	3.707	8.371	.794	.569	.923
	.450	7.130	4.623	9.611	.853	.665	.983
	.500	8.154	5.644	11.207	.911	.752	1.049
	.550	9.324	6.747	13.346	.970	.829	1.125
	.600	10.685	7.913	16.291	1.029	.898	1.212
	.650	12.301	9.149	20.419	1.090	.961	1.310
	.700	14.270	10.492	26.322	1.154	1.021	1.420
	.750	16.749	12.015	35.045	1.224	1.080	1.545

.800	20.020	13.841	48.659	1.301	1.141	1.687
.850	24.646	16.198	71.892	1.392	1.209	1.857
.900	32.016	19.602	118.312	1.505	1.292	2.073
.910	34.104	20.510	133.545	1.533	1.312	2.126
.920	36.527	21.538	152.363	1.563	1.333	2.183
.930	39.391	22.722	176.178	1.595	1.356	2.246
.940	42.856	24.115	207.265	1.632	1.382	2.317
.950	47.180	25.799	249.551	1.674	1.412	2.397
.960	52.822	27.917	310.500	1.723	1.446	2.492
.970	60.690	30.747	406.385	1.783	1.488	2.609
.980	72.994	34.935	581.551	1.863	1.543	2.765
.990	97.642	42.674	1024.267	1.990	1.630	3.010

a. Logarithm base = 10.



Nilai LC50 FRksi etanol 11,79 ppm

Pengujian	Larutan uji (ppm)									
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
1	0	1	2	3	3	4	5	6	7	7
2	0	0	1	2	3	5	5	6	6	7
3	0	1	2	3	4	4	5	6	7	7
Total kematian	0	3	8	11	14	17	19	21	22	24
Rata-rata kematian	0	0.7	1.7	2.7	3.3	4.3	5.0	6.0	6.7	7.0
% mortalitas	0%	7%	17%	27%	33%	43%	50%	60%	67%	70%
SD		0.577	0.577	0.577	0.577	0.577	0.000	0.000	0.577	0.000

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	ppm	2.161	.574	3.763	.000	1.035	3.286
	Intercept	-2.257	.578	-3.904	.000	-2.835	-1.679

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	.201	7	1.000 ^a

a. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

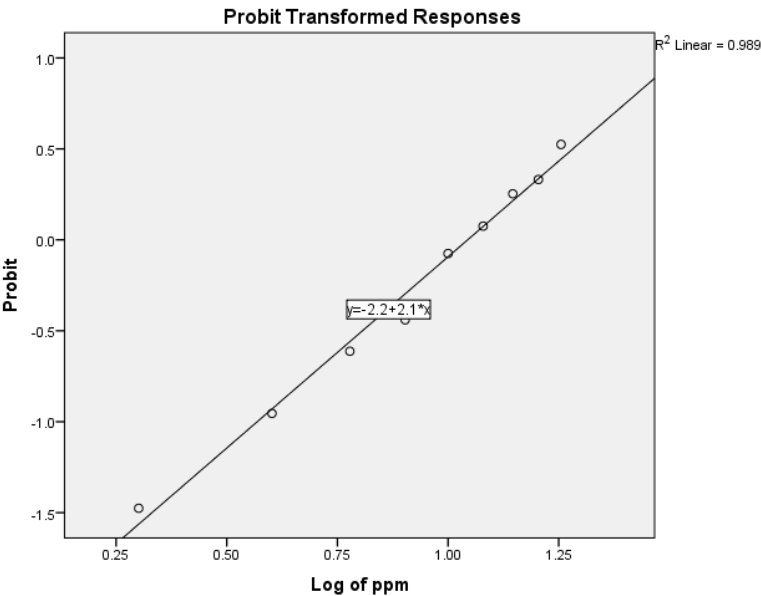
b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Confidence Limits

		Probability		95% Confidence Limits for ppm		95% Confidence Limits for $\log(\text{ppm})^a$	
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	.928	.072	2.131	-.032	-1.144	.329
	.020	1.241	.131	2.593	.094	-.883	.414
	.030	1.493	.192	2.938	.174	-.717	.468
	.040	1.715	.255	3.230	.234	-.593	.509
	.050	1.919	.322	3.490	.283	-.492	.543
	.060	2.113	.392	3.730	.325	-.407	.572
	.070	2.298	.466	3.954	.361	-.332	.597
	.080	2.478	.544	4.168	.394	-.265	.620
	.090	2.654	.625	4.373	.424	-.204	.641
	.100	2.827	.711	4.573	.451	-.148	.660
	.150	3.671	1.206	5.521	.565	.081	.742
	.200	4.518	1.824	6.457	.655	.261	.810
	.250	5.399	2.578	7.448	.732	.411	.872
	.300	6.336	3.479	8.562	.802	.541	.933
	.350	7.348	4.522	9.894	.866	.655	.995
	.400	8.458	5.680	11.589	.927	.754	1.064
	.450	9.690	6.905	13.848	.986	.839	1.141
	.500	11.079	8.154	16.937	1.045	.911	1.229
	.550	12.667	9.415	21.185	1.103	.974	1.326
	.600	14.513	10.713	27.051	1.162	1.030	1.432
	.650	16.705	12.093	35.254	1.223	1.083	1.547
	.700	19.374	13.621	47.012	1.287	1.134	1.672
	.750	22.735	15.389	64.552	1.357	1.187	1.810

.800	27.168	17.539	92.350	1.434	1.244	1.965
.850	33.437	20.339	140.798	1.524	1.308	2.149
.900	43.419	24.405	240.349	1.638	1.387	2.381
.910	46.247	25.491	273.619	1.665	1.406	2.437
.920	49.528	26.722	315.054	1.695	1.427	2.498
.930	53.405	28.138	367.957	1.728	1.449	2.566
.940	58.095	29.803	437.695	1.764	1.474	2.641
.950	63.949	31.816	533.618	1.806	1.503	2.727
.960	71.584	34.346	673.675	1.855	1.536	2.828
.970	82.231	37.721	897.488	1.915	1.577	2.953
.980	98.876	42.708	1314.714	1.995	1.631	3.119
.990	132.210	51.897	2401.660	2.121	1.715	3.381

a. Logarithm base = 10.



Lampiran 7 dokumentasi penelitian

No.	dokumentasi	Keterangan
1.		Serbuk Rimpang Kunyit hitam
2.		Ekstraksi fraksi etano
3.		Ekstraksi fraksi diklorometana

4.



Ekstraksi fraksi n-
heksana

5.



Sampel kering
etanol,
diklorometana,
dan n-heksan

6.



Larutan induk
fraksi etanol dan
larutan uji

7.



Larutan induk
fraksi
diklorometana
dan larutan uji

8.



Larutan induk
fraksi n-heksana
dan larutan uji

9.



Proses uji BSLT

10.



Larva udang
Artemia salina
Leach.

11.

Alat evaporator



12.

Alat ultrasonik
bath

13.

Proses penetasan
udang