

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Daun Tin

Tin atau Ara (*Ficus carica*) sejenis tumbuhan penghasil buah-buahan yang dapat dimakan yang berasal dari Asia Barat. Buahnya bernama sama. Nama "Tin" diambil dari bahasa Arab, juga dikenal dengan nama "Ara" (buah ara / pohon ara). Sedangkan dalam bahasa Inggris disebut fig (common fig; "pohon ara umum"). Buan Tin tumbuh di daerah asia barat, mulai dari pantai Balkan hingga Afganistan. Sekarang dibudidayakan pula di Australia, Cile, Argentina, serta Amerika Serikat.

Menurut Mawa *et al* (2013) menjelaskan bahwa tanaman tin merupakan tanaman dari genus *Ficus* yang memiliki banyak varietas diantaranya adalah *green yordania*, *purple yordania*, *brown turkey*, *sultane*, *conadria*, *Bellone fig*, *Boerjasoette noire*, *dauphine figs*, *flander*, *negrone* dan lain-lain. Tanaman tin dapat tumbuh hingga mencapai 10 meter. Batang tanaman tin memiliki getah yang cukup banyak. Daun pada tanaman tin termasuk daun tunggal dan berselang-seling. Panjang daun tin antara 12-25 cm, lebar 10-18 cm, dan berlekuk dalam 3-7 cuping (Dovinda, 2014). Dalam Irget *et al* (2008) dinyatakan bahwa tanaman tin banyak tumbuh di daerah Mediterania. Namun saat ini tanaman tin sudah banyak dibudidayakan di Indonesia salah satunya yaitu di daerah Poncokusumo kabupaten Malang Jawa Timur (Novitasari, 2018). Dalam penelitian ini, jenis daun tin yang digunakan adalah daun yang berasal dari tanaman tin varietas *green yordania* yang memiliki ciri buahnya berukuran medium sedang dengan berat 40-60 gram,

berwarna hijau kekuningan, tekstur legit, rasa buah manis, daun menjari lima (Hidayah, 2017).

Kandungan fitokimia tanaman ini terutama buahnya sudah banyak diteliti oleh para peneliti di beberapa negara Timur Tengah, Eropa, dan Amerika Serikat. Buah tin merupakan sumber penting komponen bioaktif seperti fenol, benzaldehida, terpenoid, flavonoid, dan alkaloid yang memiliki sifat antioksidan. Sementara daun tin mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol. Menurut JosepH& Raj (2011), tanaman tin diklasifikasikan sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Rosales
Famili	: Moraceae
Genus	: Ficus
Upagenus	: Ficus
Spesies	: <i>Ficus carica</i>
Nama binomial	: <i>Ficus carica</i> L



**Gambar 2.1 Daun tin varietas *Green yordania* (Refli, 2012)**

Tanamana tin memiliki senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik, fitosterol, asam organik, antosianin, triterpenoid, dan senyawa volatile seperti hidrokarbon, alcohol alifatik, dan beberapa kelas metabolit sekunder lainnya dari berbagai bagian (Mawa *et al.*, 2013). Bagian dari daun tin yang bisa digunakan untuk pengobatan tradisional salah satunya adalah daunnya.

Daun tin memiliki kandungan metabolit sekunder lengkap baik itu tanin, saponin, steroid, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Mawa *et al* (2013) menyatakan bahwa daun tin mengandung senyawa fenolik, triterpenoid, antosianin dan asam organik. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Ahaddin (2014) juga disebutkan bahwa kandungan tertinggi metabolit sekunder daun tin (*Ficus carica*) adalah golongan flavonoid yaitu flavon dan flavonol. Daun tin (*Ficus carica*) mengandung flavonoid, triterpenoid/steroid, tannin dan alkaloid (Shirisa *et al*, 2010 dalam Refli, 2012). Adanya kandungan metabolit sekunder inilah yang dapat memberikan khasiat pengobatan dari daun tin. Selain itu daun tin memiliki aktivitas antioksidan (Patil *et al*, 2010).

Daun pohon tin/ara dapat menurunkan tingkat trigliserida, yang merupakan satu bentuk lemak yang ditemukan dalam aliran darah. oleh karena itu, setelah meminum teh daun tin badan akan mendapat efek lebih segar. Seduhan daun tin bermanfaat bagi peluruh batu ginjal, hal ini dikarenakan daun tin mengandung alkaloid dan saponin, yang bermanfaat sebagai diuretik (peluruh urine). Daun pohon tin juga memiliki sifat penyembuhan. Daun tin dapat membantu penderita diabetes mengurangi jumlah asupan insulin sehingga sedikit demi sedikit dapat mengurangi tingginya kandungan gula dalam darah. Daun pohon tin memiliki

aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, bakteri yang biasanya terdapat pada saluran pernafasan atas dan kulit. (Refli, 2012).

## 1.2 Tinjauan Tentang Fermentasi

Istilah fermentasi berasal dari bahasa itali "*ferfere*" yang artinya mendidih, yang menggambarkan kerja khamir pada buah-buahan atau biji gandum. Kondisi mendidih ini disebabkan karea terbentuknya gelembung-gelembung gas karbon dioksida akibat peristiwa katabolisme anaerobik yang terjadi pada ekstrak. Namun demikian, fermentasi memiliki arti yang berbeda dalam biokimia dan mikrobiologi industri. Secara biokimia, fermentasi berkaitan dengan proses menghasilkan energi melalui katabolisme senyawa organik. Secara mikrobiologi, fermentasi menggambarkan berbagai berbagai proses yang menghasilkan produk (metabolit) dari kultur massa mikroorganisme (Basyar, 2012). Mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi ini terutama dari golongan khamis (*yeast*), kapang (fungi) dan bakteri. Fermentasi adalah proses perubahan kimiawi, dari senyawa kompleks menjadi lebih sederhana dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh mikroba (Naland, 2004 dalam Az-zahro', 2018). Proses fermentasi akan menyebabkan terjadinya penguraian senyawa organik untuk menghasilkan energi serta terjadi pengubahan substrat menjadi produk baru oleh mikroba (Naland, 2004 dalam Az-zahro', 2018). Faktor-faktor yang harus diperhatikan dalam proses fermentasi yaitu ketersediaan nutrisi (unsur C, N, P dan K), pH optimum sekitar 5,5, suhu fermentasi 23-27°C, ketersediaan udara namun tidak dalam bentuk aerasi aktif, tidak boleh ada guncangan atau getaran, tidak boleh terkena sinar matahari secara langsung. Proses fermentasi oleh mikroba mampu memberikan keuntungan, yaitu mampu mengubah

makro molekul menjadi mikro molekul yang mudah dicerna dalam tubuh dan tidak menghasilkan senyawa kimia beracun, serta dapat meningkatkan kandungan protein dalam resum (Bidura *et al.*,2008).

### **1.3 Tinjauan Kombucha**

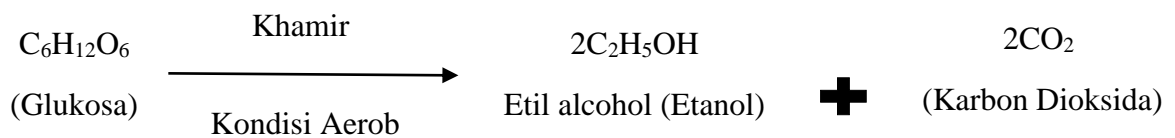
Kombucha atau dikenal masyarakat Indonesia sebagai jamur teh, atau jamur dipo, adalah fermentasi teh menggunakan campuran kultur bakteri dan khamir sehingga diperoleh cita rasa asam dan terbentuk lapisan nata (Naland, 2004). Ada yang mengatakan bahwa kombucha sebenarnya sudah populer sebagai minuman kesehatan sejak 3000 tahun yang lalu. Minuman kombucha diduga berasal dari Cina. Sejak tahun 221 SM, orang-orang Cina sudah menganggap kombucha sebagai minuman berbahan teh yang bisa membuat kehidupan kekal. Orang Cina memberi nama minuman ini “tea of immortality”. Dari negeri Cina, penyebaran kombucha mengikuti jalur perdagangan dan akhirnya tersebar ke berbagai penjuru dunia (Naland, 2008).

Secara fisik, kombucha merupakan selaput, lapisan, atau lempengan berwarna putih agak transparan yang tumbuh secara bertahap di atas permukaan air teh manis tersebut yang sedang di fermentasi (agar dapat berfungsi sebagai obat), yang memenuhi seluruh luasan wadah air teh manis tersebut (wadah fermentasi teh). Lapisan putih agak transparan yang berupa massa yang kenyal tersebut dinamakan nata (*nata de tea*) (Putra, 2016 dalam Umami, 2018).

Kultur kombucha mengandung berbagai macam bakteri dan khamir, diantaranya *Acetobacter xylinum*, *A. Aceti*, *A. Pasteurianus*, *Gluconobacter*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. Intermedius*, *Candida fomata*, *Mycoderma*,

*Mycotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces bailii* dan *Z.Rouxii* (Greenwalt, *et.al.*, 2000 dalam Az-zahro' 2018). Proses fermentasi teh kombucha merupakan fermentasi yang optimum, karena terjadinya reaksi-reaksi kimia secara asimilatif dan disimilatif oleh kultur kombucha selama fermentasi berlangsung (Mardiani, 2014). Sukrosa dipecah menjadi glukosa dan fruktosa oleh khamir (Naland, 2008 dalam Az-zahro' 2018). Biotransformasi glukosa dan fruktosa oleh bakteri akan menghasilkan asam glukonat dan asam-asam organik lainnya seperti asam laktat, asam oksalat, asam butirat, asam glukoronik (Susilowati, 2013).

Menurut wood (1998) dalam penelitian Az-zahro' (2018) menjelaskan, proses fermentasi gula (pengubahan glukosa menjadi alkohol dan O<sub>2</sub>) oleh khamir terjadi melalui reaksi berikut:



Gambar 2.3 Reaksi Proses Fermentasi

*Saccharomyces cerevisiae* mempunyai kemampuan untuk menghasilkan senyawa fenol, dimana asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi berperan sinergis dan dapat meregenerasi senyawa antioksidan yang terkandung pada daun tin. Selain itu kondisi asam akibat adanya asam-asam organik tersebut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan lebih stabil dalam suasana asam. Fermentasi secara aerob terjadi pemecahan zat gula menjadi komponen ikatan karbon pembentuk selulosa (Partiwi *et.al*, 2011). Menurut kunasepah (2008) dalam Novitasari (2018), dalam proses fermentasi khamir memiliki kemampuan

menghasilkan enzim *vinyl phenol reductase*. Enzim *vinyl phenol reductase* akan membentuk fenol akibat dekarboksilasi asam sinamat dan asam firulat. Asam sinamat merupakan senyawa fenol yang berperan sebagai antioksidan alami dalam tumbuhan (Suranto, 2011). Asam firulat merupakan turunan dari golongan asam hidroksi sinamat yang memiliki kelimpahan yang tinggi dalam dinding sel tanaman dan merupakan senyawa aktif yang bersifat antioksidan (Hasan,*et al.*,2013). Seduhan daun kelor akan memiliki peningkatan nilai gizi jika difermentasi menjadi minuman kombucha, dikarenakan minuman kombucha memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi jika dibandingkan dengan minuman yang belum dibuat kombucha (Velicanski, 2007 dalam Az-zahro', 2018).

Kelebihan starter kombucha dibandingkan dengan starter lainnya adalah kombucha bisa menghasilkan warna pada hasil fermentasi, menghasilkan rasa baru misalnya menghilangkan rasa pahit menjadi asam. Selain itu bisa mengubah senyawa yang kompleks menjadi senyawa lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna oleh tubuh (Syaufiana, 2015).

#### **1.4 Tinjauan Umum Tentang Metabolit Sekunder Daun Tin**

Menurut JosepH& Raj (2011) daun tin mengandung metabolit sekunder diantaranya yaitu alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol. Sedangkan menurut (Sirisha *et.,al.* 2010) daun tin mengandung flavonoid, steroid/triterpenoid, alkaloid, dan tannin

##### **1.4.1 Flavonoid**

Flavonoid merupakan senyawa yang tidak tahan panas, cahaya, dan bahan kimia tertentu. Flavonoid merupakan senyawa polifenol sehingga bersifat kimia

senyawa fenol yaitu agak asam dan dapat larut dalam basa, dan karena merupakan senyawa polihidroksi (gugus hidroksil) maka juga bersifat polar sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, aseton, air, butanol, dimetil sulfoksida, dimetil formamida. Disamping itu dengan adanya gugus glikosida yang terikat pada gugus flavonoid sehingga cenderung menyebabkan flavonoid mudah larut dalam air. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru, dan sebagai zat berwarna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Perkembangan pengetahuan menunjukkan bahwa flavonoid termasuk salah satu kelompok senyawa aromatik yang termasuk polifenol dan mengandung antioksidan.

Flavonoid banyak ditemukan di alam karena sekitar 2% karbon yang disintesis tumbuhan diubah menjadi flavonoid (Markham, 1988 dalam Umami, 2018). Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Oleh karena itu, pelarut yang mengekstraksi flavonoid juga merupakan senyawa polar seperti etanol, metanol, *n*-butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, dan air (Markham 1988). Flavonoid berperan pada berbagai aktivitas biologis. Menurut para peneliti kanker di UCLA, perokok yang mengonsumsi makanan yang mengandung flavonoid dapat mengurangi risiko penyakit kanker paru-paru (Irwin 2008) dalam Refli (2012). Flavonoid tidak hanya dapat menghambat dan membunuh sel-sel kanker, tetapi juga menghambat invasi tumor (Stauth 2007). Menurut Miller (1996) dalam Refli (2012), sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, dan antialergi. Menurut Pietta *et al.* (2003) dalam Refli (2012), flavonoid memiliki aktivitas sebagai antiradang.



#### 1.4.2 Terpenoid dan Triterpenoid

Triterpenoid senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon  $C_{30}$  asiklik, yaitu skualena. Triterpenoid dapat dipilah menjadi sekurang-kurangnya empat golongan senyawa triterpena yaitu, steroid, saponin, dan glikosida jantung.

Sterol adalah triterpena yang kerangka dasarnya system cincin siklopentana perhidrofenantrena. Dahulu sterol terutama dianggap sebagai senyawa satwa (sebagai hormone kelamine, asam empedu, dll) tetapi pada tahun – tahun terakhir ini banyak senyawa tersebut yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan (Harbrone 1987).

#### 1.4.3 Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa yang terdapat pada tumbuhan, tanin juga merupakan substansi yang tersebar luas dalam tanaman, seperti daun, buah yang belum matang, batang dan kulit kayu, pada buah yang belum matang tanin digunakan sebagai energi dalam proses metabolisme dalam bentuk oksidasi tannin (Harbone, 1987). Tanin terbagi menjadi 2 golongan yang tersebar di alam yaitu tanin dapat terhidrolisis yang biasa disebut dengan tanin terkondensasi.

Tanin dapat terhidrolisis terbentuk dari esterifikasi gula (glukosa) dengan asam fenolat sederhana yang merupakan tanin turunan sikimat (asam galat). Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis berasal dari reaksi kondensasi kotekin tunggal. Tanin ditandai oleh sifatnya yang dapat menciutkan dan mengendapkan protein dari larutan dengan membentuk senyawa yang tidak larut (Cannas 2009). Adapun beberapa sifat fisika dari tannin diantaranya yaitu ;

1. Apabila dilarutkan ke dalam air, tanin akan membentuk koloid dan akan memiliki rasa asam dan sepat. Apabila dicampur dengan alkaloid dan glatin, maka akan terbentuk endapan.
2. Tanin tidak dapat mengkristal.
3. Tanin dapat mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut sehingga tidak dipengaruhi oleh enzim protiolitik.

Tanin merupakan senyawa kompleks yang memiliki bentuk campuran polifenol yang Sulit untuk dipisahkan sehingga sulit membentuk kristal. Tanin dapat diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi Senyawa fenol yang ada pada tanin mempunyai aksi adstringensia, antiseptic dan pemberi warna.

#### 1.4.4 Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan metabolit sekunder terbesar yang telah menyumbang banyak bagi dunia medis. Seorang ahli farmasi Jerman Karl Friedrich Wilhem Meissner (1881) dalam Umami (2018), pertama kali menciptakan istilah “Alkaloid“ untuk menjelaskan senyawa yang mempunyai sifat seperti alkali. Sifat fisika kimi alkaloid diantaranya yaitu tidak berwarna, dominan bentuk Kristal pada suhu kamar, tidak larut atau sukar larut dalam air, mempunyai aktifitas fisiologi tertentu, bersifat basa, mudah terdekomposisi atau rusak.

Pada kadar tertentu senyawa-senyawa tersebut dapat bersifat toksik yang dapat menyebabkan kematian terhadap hewan coba yaitu larva udang (*Artemia salina*) (Cahyadi, 2009). Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa alkaloid, triterpenoid, saponin dan flavonoid dalam daun tin yang dapat menghambat daya makan larva (antifedant). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Oleh karena

itu, bila senyawa-senyawa ini masuk kedalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya. Akibatnya larva akan mati kelaparan (Rita dkk, 2008 dalam Cahyadi, 2009).

### **1.5 Tinjauan Senyawa Yang Berpotensi Menyebabkan Toksisitas**

Senyawa fenolik didalam daun tin dapat meningkat dengan adanya fermentasi. Menurut kunasepah (2008) dalam Novitasari (2018), dalam proses fermentasi khamir memiliki kemampuan menghasilkan enzim *vinyl phenol reductase*. Enzim *vinyl phenol reductase* akan membentuk fenol akibat dekarboksilasi asam sinamat asam firulat. Asam sinamat merupakan senyawa fenol yang berperan sebagai antioksidan alami dalam tumbuhan (Suranto, 2011). Asam firulat merupakan turunan dari golongan asam hidroksi sinamat yang memiliki kelimpahan yang tinggi dalam dinding sel tanaman dan merupakan senyawa aktif yang bersifat antioksidan (Hasan, *et al.*, 2013).

Peningkatan senyawa fenolik khususnya flavonoid dan turunannya dapat meningkatkan khasiatnya sebagai antioksidan, selain itu juga sebagai antikanker. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antikanker ada beberapa teori. Pertama, flavonoid sebagai antioksidan yakni melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker, yang merupakan akibat fragmentasi DNA yang diawali dengan dilepasnya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil (Ramadhani, 2009). Kedua, flavonoid sebagai antioksidan (Hasan, *et al.*, 2013). Efek antioksidan flavonoid terutama berupa proteksi terhadap *Reactive*

*Oxygen Species* (ROS). Ketiga, Flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor/kanker salah satunya dengan cara menghambat protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran sel ke inti sel (Ramadhani, 2009). Keempat, dengan cara menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase. Karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan keganasan (Ramadhani, 2009).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Ramadhani (2009) dijelaskan bahwa senyawa flavonoid dalam tumbuhan nangka-nangkaan dapat menyebabkan efek toksik. Pada kadar tertentu flavonoid, alkaloid, tannin, steroid, saponin dapat bersifat toksik yang dapat menyebabkan kematian terhadap hewan coba yaitu larva udang (*Artemia salina*) (Cahyadi, 2009). Peningkatan kadar fenolik didalam kombucha daun ini juga dikhawatirkan menimbulkan efek toksik jika dikonsumsi melebihi batas maksimalnya. Sehingga perlu diteliti lebih lanjut mengenai toksisitasnya dengan menggunakan hewan uji larva udang. Senyawa fenolik terutama flavonoid dan turunannya dapat menyebabkan toksisitas akut terhadap hewan uji dengan menjadi racun perut (*Stomach Poisoning*) yang menyebabkan kerusakan pada saluran pencernaan larva. Selain itu senyawa fenolik juga bekerja sebagai penghambat reseptor perasa, dengan begitu larva udang akan kehilangan stimulus rasa yang mengakibatkan larva tidak dapat mengenali makanannya dan akhirnya akan mati kelaparan (Rita dkk, 2008 dalam Cahyadi, 2009).

## **1.6 Sitotoksitas**

Uji sitotoksitas sebuah obat bisa dilakukan melalui serangkaian uji farmakologi dan toksikologi baik yang dilakukan pada hewan uji (praktikum)

maupun secara klinik. Uji tersebut sebagian besar masih menggunakan hewan percobaan meskipun terdapat kesulitan untuk diekstrapolasikan ke manusia. Perkembangan metode *in vitro* sebagai alternative pengganti pengujian menggunakan hewan uji mempunyai relevansi cukup baik yang bertujuan untuk mendeteksi potensi ketoksikan suatu obat pada manusia (Doyle dan Griffith, 2003 dalam Fathiyawati,2009).

Uji sitotoksisitas merupakan kelanjutan dari uji toksisitas dari senyawa bahan alam yang dapat dilakukan dengan menggunakan kultur sel secara *in vitro*. Uji sitotoksisitas ini merupakan perkembangan metode untuk memprediksikan keberadaan obat yang bersifat sitotoksik baru dari bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker (Burger, 1970 dalam Fathiyawati, 2009). Akhir dari uji sitotoksisitas ini dapat memberikan informasi konsentrasi obat maksimal yang masih mungkin sel bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksisitas pada organ target memberikan informasi tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Fathiyawati, 2009).

## **1.7 Tinjauan Tentang Toksisitas**

Toksisitas adalah suatu kondisi dimana suatu sediaan dapat menyebabkan kematian terhadap hewan uji. Ilmu yang mempelajari tentang toksisitas disebut dengan toksikologi. Toksikologi merupakan suatu disiplin ilmu yang mempelajari sifat-sifat racun zat kimia terhadap makhluk hidup dan lingkungannya (Kurniawan, 2009). Setiap zat kimia pada dasarnya bersifat racun, tetapi setiap terjadinya keracunan ditentukan oleh banyak faktor terutama dosis. Setiap zat kimia yang akan digunakan harus diuji toksisitas dan keamanan nya (Hendrawati, 2009). Manfaat

dari pengukuran toksisitas dalam berbagai bidang adalah dapat digunakan sebagai skrining ekstrak tumbuhan untuk kepentingan pengobatan, menentukan pertahanan anti-herbivora pada tumbuhan, menilai potensi dan efek berbahaya dari pestisida baru, menilai toksisitas yang mungkin ditimbulkan oleh sumbernya (Priyanto, 2009). Uji toksisitas dibagi menjadi tiga macam diantaranya yaitu:

1. Uji toksisitas akut

Uji toksisitas akut dirancang untuk menentukan efek toksik suatu senyawa yang akan terjadi dalam masa pemejanaan dengan waktu yang sesingkat-singkatnya atau pemberiannya dengan takaran tertentu. Uji ini dilakukan dengan pemberian konsentrasi tunggal senyawa uji pada hewan uji. Takaran konsentrasi yang dianjurkan paling tidak empat peringkat konsentrasi, berkisar dari konsentrasi terendah yang hampir atau bahkan tidak menyebabkan kematian terhadap seluruh hewan uji sampai dengan konsentrasi tertinggi yang menyebabkan kematian terhadap hampir atau bahkan seluruh hewan uji. Biasanya pengamatan dilakukan selama 24 jam (Ramadhani, 2009).

2. Uji toksisitas subakut atau subkronis

Uji toksisitas sub akut dilakukan dengan memberikan zat kimia yang sedang diuji tersebut secara berulang-ulang terhadap hewan uji selama kurang lebih 3 bulan. Uji ini ditujukan untuk mengungkapkan spectrum efek toksik senyawa uji, serta untuk melihat adanya kaitan antara spectrum toksik dengan takaran konsentrasi (Ramadhani, 2009).

3. Uji toksisitas kronis

Uji toksisitas kronis dilakukan dengan memberikan zat kimia secara berulang-ulang pada hewan uji selama lebih dari 3 bulan atau sebagian besar dari

hidupnya. Meskipun pada penelitian digunakan waktu lebih pendek, tetapi tetap lebih lambat dibandingkan uji toksisitas akut maupun uji toksisitas sub akut (Ramadhani, 2009).

### **1.8 Tinjauan Metode BSLT (*Brine shrimp lethality test*)**

*Brine shrimp lethality test* (BSLT) merupakan salah satu metode skrining untuk menentukan ketoksikan suatu ekstrak ataupun senyawa. Metode ini juga sering digunakan untuk *bioassay* dalam usaha mengisolasi senyawa toksik tersebut dari ekstrak. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologi suatu senyawa terhadap *Artemia Salina* adalah kematian. Senyawa senyawa yang menunjukkan ketoksikan yang tinggi dalam BSLT sering dikaitkan dengan potensinya sebagai antikanker (sariningsih, 2005 dalam Fathiyawati, 2008).

Metode uji toksisitas ini sering digunakan untuk penapisan awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam suatu ekstrak karena cepat, mudah, sederhana dan dapat dipercaya. Metode BSLT merupakan suatu uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat setelah pemberian dosis atau konsentrasi uji. Prosedur ujinya yaitu dengan menentukan nilai  $LC_{50}$  dari aktivitas komponen aktif tanaman terhadap *Artemia salina*. Suatu ekstrak dikatakan aktif sebagai antikanker berdasarkan metode BSLT jika harga  $LC_{50} < 1000\mu\text{g/mL}$  (Ramadhani, 2009). Apabila suatu senyawa bahan alam memberikan efek toksik pada  $LC_{50}$  dengan konsentrasi  $>1000\mu\text{g/mL}$  maka termasuk ke dalam kategori senyawa tidak toksik. Secara umum senyawa yang bersifat sitotoksik juga menunjukkan sifat toksiknya terhadap *Artemia salina*. Uji toksisitas akut dengan hewan uji *Artemia salina* Leach dapat digunakan sebagai uji pendahuluan pada

penelitian yang mengarah ke uji sitotoksik karena ada kaitan antara uji toksisitas akut dengan uji sitotoksik (Wulandari, 2014). Kategori toksisitas senyawa toksik dapat dilihat pada tabel 2.1.

**Tabel 2.1 Kategori Toksisitas Berdasarkan Nilai LC50**

Kategori	LC50 (ppm atau $\mu\text{g/mL}$ )
Sangat Toksik	< 30
Toksik	30-1000
Tidak Toksik	>1000

Sumber : Batubara I *et al.* Kandungan kimia senyawa aktif dan toksisitas dari *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa* sp dan *Solen* sp. Departemen kimia FMIPA IPB dalam Ajrina 2013.

Uji ini menggunakan larva udang (*Artemia salina* Leach) sebagai hewan uji karena merupakan organisme zoology intervertebrata yang sederhana. Sebagai media uji digunakan air laut murni atau air laut buatan dengan melarutkan garam murni tanpa yodium kedalam air (Sriwahyuni, 2010). Uji toksisitas dengan metode BSLT merupakan uji toksisitas akut, dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu 24 jam setelah dosis uji diberikan (Wulandari, 2014).

Berdasarkan penelitian Lisdawati tahun 2009 dalam wulandari (2014) menjelaskan beberapa keuntungan metode BSLT, diantaranya yaitu :

1. Metode penapisan farmakologi awal yang mudah dilakukan dan relatif tidak mahal serta tidak membutuhkan keahlian khusus dalam pelaksanaannya.
2. Cepat waktu ujinya, sederhana (tanpa membutuhkan teknik aseptik), jumlah organisme tidak banyak dan membutuhkan sedikit sampel uji.
3. Metode yang telah teruji hasilnya dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengamati toksisitas suatu senyawa di dalam ekstrak kasar tanaman.
4. Sering digunakan dalam tahap awal isolasi senyawa toksis yang terkandung didalam ekstrak tanaman



5. Sering dikaitkan sebagai metode penapisan untuk penyarian senyawa antikanker dari tanaman
6. Dapat mengevaluasi toksisitas logam berat, pestisida dan obat-obatan (terutama ekstrak tanaman alami).

Hewan uji yang digunakan dalam uji toksisitas dengan metode BSLT adalah larva udang (*Artemia salina* Leach). *Artemia salina* Leach adalah arthropoda primitive air (danau garam) dari family *Artemiidae*. Ditemukan oleh seorang ahli geografi iran untuk pertama kalinya pada tahun 1982 didanau urmia (Asem., 2008 dalam Wulandari 2009), lalu diberi nama *Cyncer salinus* oleh Linny pada tahun 1758 kemudian dirubah menjadi *Artemia salina* Leach pada tahun 1819 (Wulandari, 2014). Adapun taksonomi *Artemia salian* sebagai berikut :

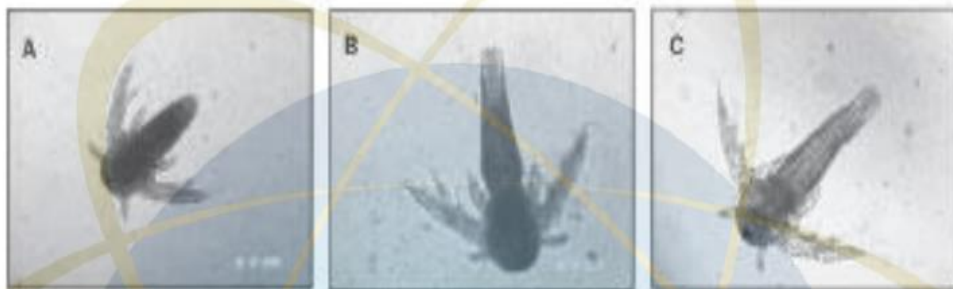
Kingdom : *Animalia*  
Filum : *Arthropoda*  
Subfilum : *Crustacea*  
Kelas : *Branchiopoda*  
Ordo : *Anostraca*  
Famili : *Artemiidae*  
Genus : *Artemia*  
Spesies : *Artemia salina*

Siklus *Artemia salina* secara umum dapat dilihat dalam tiga fase yaitu bentuk telur, larva (*nauplii*) dan artemia dewasa. Telur berbentuk bulat dengan ukuran 0,2-0,3 mm. selanjutnya telur akan menetas menjadi larva. Telur yang baru menetas ini berukuran kurang lebih 300  $\mu$ . Sebelum berubah menjadi artemia dewasa, larva mengalami 15 kali perubahan bentuk dalam satu tingkatan hidup.

Waktu yang dibutuhkan hingga menjadi artemia dewasa sekitar 2 minggu. Pada fase artemia dewasa, berbentuk silinder dengan panjang 12-15 mm dan tubuh terbagi atas bagian kepala, dada dan perut. Hewan ini dapat bertahan hidup dalam air dengan suhu 25°-30°C. Perairan yang berkadar garam tinggi (antara 15-30 permil), oksigen terlarut sekitar 3 mg/mL dan pH sekitar 8-9 (Panjaitan, 2011 dalam Ajrina, 2013).

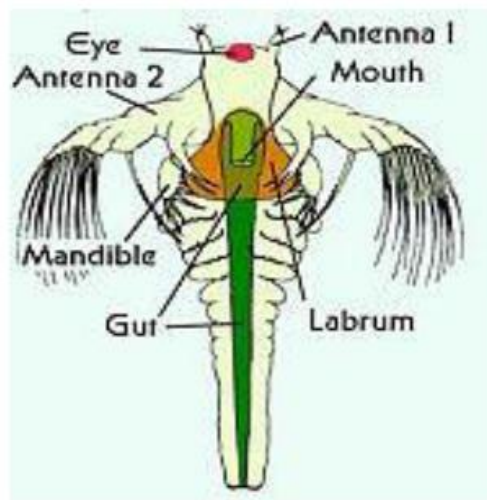
Tahap penetasan *Artemia salina* yaitu tahap dehidrasi, tahap pecah cangkang dan tahap payung atau pengeluaran. Tahap dehidrasi terjadi penyerapan air sehingga kista dalam bentuk kering akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap pecah cangkang dan kemudian tahap pengeluaran yang terjadi beberapa saat sebelum *nauplii* keluar dari cangkang. *Artemia* yang baru menetas disebut *nauplii*, berwarna orange dan berbentuk bulat lonjong (Baraja, 2008).

Didalam air laut yang bersuhu 25° C, telur-telur yang kering direndam dan akan menetas dalam waktu 24-36 jam. Setelah telur menetas, maka terjadi larva yang juga disebut dengan istilah naupilus. Larva akan mengalami 15 kali perubahan bentuk (metamorfosis). Larva tingkat I dinamakan instar I, tingkat II instar II, tingkat III instar III demikian seterusnya sampai instar XV. Setelah itu baru berubah menjadi artemia dewasa (Panjaitan, 2011 dalam Ajrina, 2013).



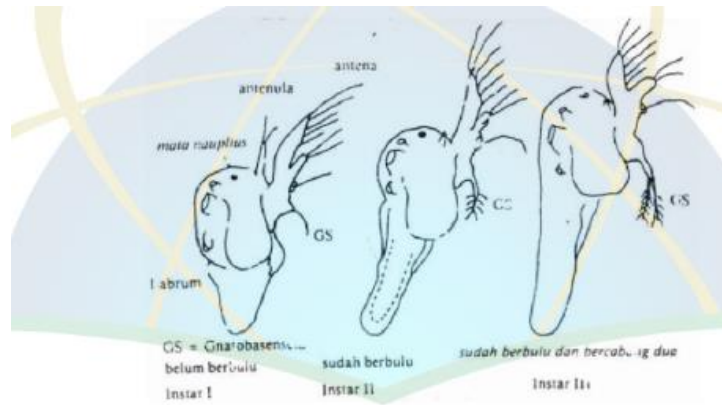
**Gambar 2.2 *Artemia salina* A) Menetas 24 jam B) 48 jam C) 72 Jam**

Larva yang baru saja menetas atau tingkat instar I, berbentuk bulat lonjong dengan panjang sekitar 400 mikron (0,4 mm) dan beratnya 15 mikrogam. Nauplius instar II panjang nya sekitar 0,6 mm, sedangkan nauplius instar III sudah sepanjang 0,7 mm, warna tubuhnya kemerah-merahan karena masih banyak mengandung makanan cadangan sehingga belum perlu makanan. Anggota badan nya berdiri dari antenula atau antena I dan sepasang antena II. Dibagian depan diantara kedua antena I terdapat titik merah yang merupakan mata larva (oselus).



**Gambar 2.3** Bagian tubuh larva *Artemia salina* Leach

Pada pangkal antena II terdapat bentuk seperti duri yang menghadap ke belakang dan dinamakan gnotobasen seta, merupakan ciri khusus untuk membedakan larva instar I, instar II dan instar III. Pada larva instar I, gnotobasen setanya masih belum berbulu dan juga bercabang. Sekitar 24 jam setelah menetas, larva akan berubah menjadi II dimana gnotobasen setanya sudah berbulu tetapi masih belum bercabang. Sedangkan pada instar III, gnotobasen setanya sudah berbulu dan bercabang.



**Gambar 2.4 Karakteristik Morfologi *Artemia* instar I, II dan III**

Pada tingkatan instar II, larva mulai mempunyai mulut dan saluran pencernaan sehingga mereka mulai mencari makan untuk memenuhi cadangan makanan yang mulai berkurang. Pengumpulan makanan dilakukan dengan cara menggerakkan antena II-nya. Selain itu antena II juga berfungsi untuk pergerakan larva. Tubuh instar III lebih panjang dibandingkan instar I dan instar II. Pada tingkat instar selanjutnya, mulai terbentuk sepasang mata majemuk. Selain itu, dibagian samping tubuhnya (kanan dan kiri) juga mulai tumbuh tunas kakinya yang disebut torakopoda. Awalnya tumbuh dibagian depan kemudian diikuti oleh bagian-bagian yang lebih ke belakang. Setelah menjadi instar XV, sudah memiliki kaki lengkap sebanyak 11 pasang sehingga berakhir fase larva dan berubah menjadi *Artemia* dewasa (Panjaitan, 2011 dalam Ajrina, 2013).

*Artemia* sering digunakan sebagai hewan uji untuk skrining aktivitas antikanker di *National Cancer Institute* (NCI), Amerika Serikat. *Artemia salina* Leach digunakan dalam metode BSLT karena memiliki kesamaan tanggapan/respons dengan mamalia, misalnya DNA-dependent RNA-Polymerase serupa dengan yang terdapat pada mamalia dan organisme yang memiliki ouabaine sensitive  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  dependent ATPase. Jika RNA polymerase dihambat, maka DNA tidak dapat mensintesis RNA, dengan begitu RNA tidak dapat terbentuk

sehingga sintesis protein juga dihambat. Protein merupakan komponen utama sel yang berfungsi sebagai unsur structural, hormon, imunoglobulin dan berperan dalam transport oksigen. Jika protein tidak terbentuk maka metabolisme sel terganggu dan pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel. Apabila suatu senyawa mengganggu kerja sistem pada *Artemia* dan menyebabkan kematian *Artemia*, maka senyawa tersebut bersifat toksik dan dapat mematikan sel mamalia (Panjaitan, 2011 dalam Ajrina, 2013). *Artemia* memiliki respons stres yang sama dengan manusia, yaitu respons perilaku dan fisiologi terhadap stressor lingkungan (Gajardo, 2012 dalam Ajrina, 2013).

Spesies *Artemia salina* Leach merupakan salah satu organisme yang sesuai untuk mengetahui bioaktivitas senyawa melalui uji toksisitas karena :

1. *Artemia salina* memiliki respon yang sama dengan mamalia sehingga senyawa maupun ekstrak yang memiliki aktivitas pada sistem tersebut dapat terdeteksi misalnya tipe *DNA-dependent RNA polymerase* pada *Artemia salina* serupa dengan *ouabaine-sensitive Na<sup>+</sup> dan K<sup>+</sup> dependent ATPase* pada mamalia (Solis et al., 1993 dalam Wulandari.,2009). Jika *RNA polymerase* dihambat, maka DNA tidak dapat mensintesis RNA, akibatnya sintesis protein terhambat sehingga mengganggu metabolisme sel dan menyebabkan kematian sel (Panjaitan, 2011).
2. Telur *Artemia salina* Leach dapat hidup dalam kondisi kering selama beberapa tahun dan mudah menetas dalam 48 jam sehingga dihasilkan larva udang (*Artemia salina* Leach) dalam jumlah banyak untuk diuji (Kurniawan, 2011).
3. Larva *Artemia salina* memiliki toleransi yang tinggi terhadap selang salinitas air tawar hingga air yang memiliki garam jenuh (Diah, 1991 dalam wulandari

2009) mampu mengatasi perubahan tekanan osmotik dan regulasi ionik yang tinggi serta memiliki membran kulit yang tipis sehingga kematian larva akibat efek sitotoksik dari bioaktif dianalogikan dengan kematian sel dalam organisme (Fenton, 2001 dalam Wulandari, 2009).

## 1.9 Nilai LC<sub>50</sub>

Nilai LC<sub>50</sub> (*Lethal concentration*) mengacu pada konsentrasi bahan kimia di udara atau dalam air. Konsentrasi yang diberikan sekali (tunggal) atau beberapa kali dalam waktu 24 jam dari suatu zat yang secara statistik dapat mematikan 50% hewan uji disebut LC<sub>50</sub> (Priyanto, 2009). LC<sub>50</sub> digunakan untuk perlakuan secara inhalasi atau uji toksisitas dalam media air (Klaassen, 1986 dalam Wulandari, 2014). Konsentrasi ini memiliki satuan yaitu ppm (*part per million*), mg/m<sup>3</sup>, atau µg/mL. Uji toksisitas dengan larva udang (*Artemia salina*) yang hasilnya dihitung menggunakan metode LC<sub>50</sub> dengan menyebabkan kematian pada hewan uji setelah 24 jam pemaparan (Wulandari, 2014). Pada umumnya semakin tinggi nilai LC<sub>50</sub> suatu senyawa maka semakin rendah toksisitasnya. Namun sebaliknya, semakin kecil nilai LC<sub>50</sub> maka semakin toksik senyawa tersebut (Priyanto, 2009 dalam Ajrina, 2013).

Menurut Reskianingsih (2014) nilai LC<sub>50</sub> dapat ditentukan beberapa cara diantaranya sebagai berikut:

### 1. Cara Weil

Metode weil ini menggunakan tabel weil yang telah ada, dimana tabel tersebut berisi tentang respons dan koefisien nomor atau angka. Pada tabel weil juga terdiri dari beberapa kelompok subjek untuk tiap konsentrasi obat, dimana 4 atau

lebih kelompok dosis atau konsentrasi yang beda dapat digunakan jika diukur tiap kelompok menjadi sama merupakan syarat pada tabel Weil. Adapun rumusnya sebagai berikut:

$$\text{Log } m = \text{Log } D + d (f+1)$$

Keterangan:

Log m = nilai LC<sub>50</sub>

D = Dosis terkecil yang digunakan

d = Log dari kelipatan dosis

f = suatu nilai dalam tabel weil, karena angka kematian tertentu (r)

## 2. Metode Probit

Analisis probit merupakan suatu metode yang telah digunakan secara luas untuk menghitung toksisitas dengan cara membandingkan setiap konsentrasi ataupun dosis (Landis, 2011). Analisis probit merupakan jenis regresi yang digunakan untuk menganalisa variabel respons binomial. Analisis ini biasanya digunakan dalam toksikologi untuk menentukan toksisitas relative dari bahan kimia untuk organisme hidup dengan menguji respons organisme pada berbagai masing-masing bahan kimia (Ajrina, 2013). Syarat dalam penggunaan metode probit diantaranya yaitu harus mempunyai tabel probit, menentukan nilai probit dari setiap % kematian tiap kelompok uji, menentukan log dosis tiap-tiap kelompok, menentukan persamaan garis lurus hubungan antara nilai probit dengan log dosis, memasukkan nilai 5 (Probit 50% kematian hewan uji) pada persamaan garis lurus. Persamaannya yaitu:

$$Y = mX + b$$

Keterangan:

Y=5=nilai probit dari 50% kematian hewan uji

X = nilai LC<sub>50</sub> ketika diubah menjadi antilog X

### 3. Cara Farmakope Indonesia

Jika menggunakan cara FI III, maka syarat yang harus dipenuhi adalah dosis yang digunakan merupakan seri dari kelipatan yang tetap, hewan uji yang digunakan harus sama untuk setiap kelompok uji, dosis yang digunakan untuk uji harus mematikan hewan uji mulai dari 0%-100% dan hitungan terbatas pada rentang tersebut (Reskianingsih, 2014). Adapun rumusnya bagai berikut:

$$M = a - b (\sum p_i - 0,5)$$

Keterangan:

$M = \text{Log LC}_{50}$

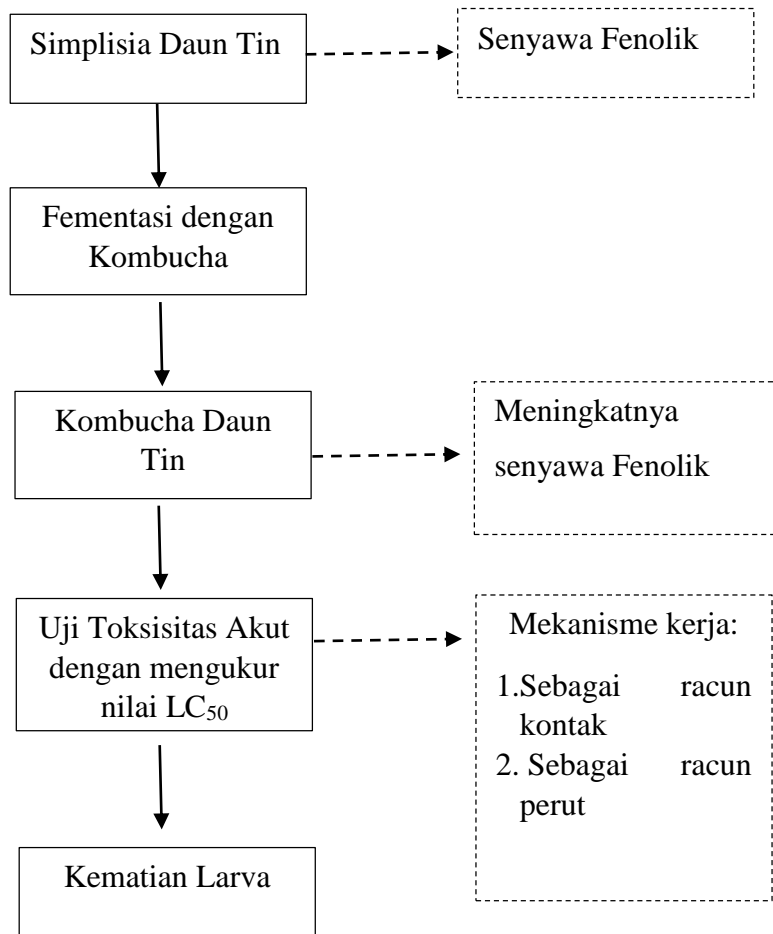
$A = \text{Log konsentrasi terendah yang masih menyebabkan jumlah kematian 100\% tiap kelompok}$

$b = \text{beda log dosis yang berurutan}$

$p_i = \text{Jumlah hewan yang mati menerima dosis } i \text{ dibagi jumlah hewan seluruhnya}$



### 1.10 Kerangka Konsep



Keterangan :

1. Garis lurus artinya dilakukan dalam penelitian
2. Garis putus-putus artinya tidak dilakukan dalam penelitian

**Gambar 2.5 Bagan Kerangka Konsep**

### 1.11 Kerangka Teori

Daun tin mengandung metabolit sekunder salah satunya yaitu golongan fenolik. Senyawa fenolik diantaranya yaitu asam sinamat, asam firulat, asam fenolat aldehid, tannin, flavonoid, flavonol, flavanol, flavon yang kesemuanya masih

tergolong kompleks. Simplisia daun tin jika diseduh akan menghasilkan rasa pahit sehingga perlu dimodifikasi salah satunya yaitu dengan cara difermentasi. Dalam hal ini fermentasi daun tin dilakukan dengan menggunakan starter kombucha selama 12 hari. Hasil fermentasi dengan kultur kombucha akan meningkatkan senyawa fenolik didalamnya, sehingga rasa yang dihasilkan juga tidak akan pahit melainkan asam. Kombucha daun tin perlu diuji toksisitas akutnya dengan cara mengukur nilai  $LC_{50}$  menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hewan uji yang digunakan adalah larva udang karena larva udang dinilai memiliki kepekaan sangat tinggi terhadap senyawa yang bersifat toksik. Mekanisme kerja metode BSLT yaitu dengan cara menjadi racun perut (*Stomach Poisoning*) dan menghambat stimulus rasa hewan uji. Toksisitas akut kombucha daun tin dapat diketahui dengan adanya kematian sebanyak 50% pada hewan uji larva udang (*Artemia salina*) atau yang disebut dengan  $LC_{50}$ .