

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Tentang Sirsak Gunung (*Annona montana* Macf.)

Sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) berasal dari daerah beriklim tropis yaitu Amerika Tengah dan Selatan. Tanaman ini kemudian menyebar luas ke daerah Asia Selatan dan Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Sirsak gunung termasuk tanaman yang tumbuh liar, tetapi pada abad ke-19 mulai dikembangkan menjadi tanaman pekarangan (Faizin, 2019).

Sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) termasuk dalam famili *Annonaceae*, yaitu satu famili dengan tanaman sirsak. Pohon sirsak tingginya mencapai 6-13 meter. Kulit buah berwarna hijau tua saat masih muda dan berwarna kuning saat masak. Buah sirsak gunung berbentuk bulat tidak beraturan, memiliki diameter 10 cm dengan daging buah yang berwarna kuning, beraroma harum atau wangi dengan rasa hambar (Dahana and Warisno, 2012).

##### 2.1.1 Klasifikasi *Annona montana*

Kingdom : *Plantae*  
Divisi : *Spermatophyta*  
Clasis : *Dicotyledonae*  
Ordo : *Polycarpiceae*  
Familia : *Annonaceae*  
Genus : *Annona*  
Spesies : *Annona montana* Macf.



**Gambar 2.1 Sirsak Gunung (Dokumentasi Pribadi, 2020)**

### 2.1.2 Kandungan Zat Aktif

Tanaman *Annona montana* Macf. termasuk dalam spesies *Annona* lainnya dan banyak digunakan sebagai obat tradisional. Buah sirsak mengandung karbohidrat yang tinggi yaitu gula pereduksi (glukosa dan fruktosa) dengan kadar 81,9 % hingga 93,6% (Dumanauw *et al.*, 2017). Menurut Wulandari (2017) buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) mengandung senyawa metabolit sekunder terpenoid. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Arifianti *et al.*, (2014) buah sirsak gunung juga mengandung senyawa acetogenin.

#### 1. Terpenoid

Terpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C<sub>30</sub> asiklik, yaitu skualena. Terpenoid merupakan senyawa tanpa warna, berbentuk kristal, sering kali mempunyai titik leleh tinggi dan aktif optik yang umumnya sukar dicirikan karena tak ada kereaktifan kimianya (Wulandari, 2017).

Senyawa terpenoid pada kadar tertentu dapat menyebabkan kematian terhadap hewan uji yaitu larva *Artemia salina* Leach. Mekanisme kerjanya yaitu berhubungan dengan kandungan senyawa terpenoid yang dapat menghambat daya makan larva (*antifeedant*). Senyawa tersebut bekerja sebagai racun perut atau

*stomach poisoning*. Sehingga apabila senyawa tersebut masuk kedalam tubuh larva maka alat pencernaanya akan terganggu. Selain itu dapat menghambat stimulus perasa pada mulut larva sehingga larva tidak mengenali makanannya menyebabkan larva mati kelaparan.

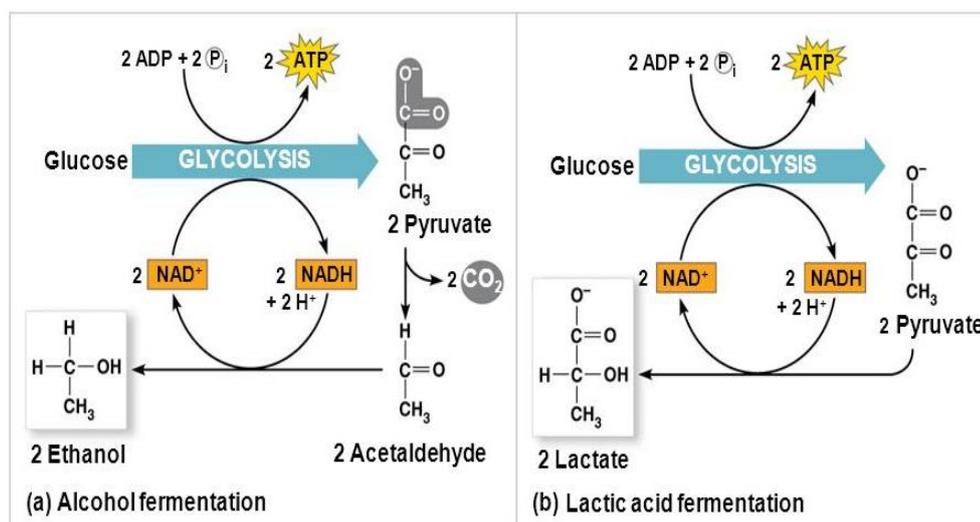
## 2. Annonaceous acetogenin

Annonaceous acetogenin merupakan metabolit sekunder yang hanya dapat ditemukan pada tanaman dengan famili Annonaceae. Annonaceous acetogenin merupakan senyawa turunan dari asam lemak rantai panjang dan termasuk dalam senyawa potikelida dengan struktur rantai karbon 30-32 tidak memiliki cabang dan terikat pada gugus 5-methyl-2-furanone. Furanone merupakan rantai dari gugus hydrofuranone pada C23 dan memiliki aktivitas sitotoksik.

Annonaceous acetogenin berfungsi sebagai antitumor, antiparasit, antikanker, antihelmintik, antiprotozoa, antimikroba dan pestisidal (Hanifah, 2015). Aktivitas sitotoksik berasal dari rantai furanone dalam gugus hydrofuranone pada C23 yang meliputi asimicin, bulatacin, dan squamocin. Pada konsentrasi tinggi acetogenin berfungsi sebagai antifeedent (suatu substansi yang dapat menghambat atau menghentikan aktivitas makan serangga secara sementara atau permanen), sehingga serangga maupun hewan uji tidak lagi tertarik mengonsumsi makanannya (Pradana *et al.*, 2015). Sedangkan pada konsentrasi rendah, acetogenin bersifat racun yang mengakibatkan serangga hama mati. Selain itu ekstrak daun sirsak juga menghambat pertumbuhan dan perkembangan serta dapat mematikan *Nimfa R. Linearis* pada konsentrasi 4,0% (Pradana *et al.*, 2015).

## 2.2 Tinjauan Tentang Fermentasi

Fermentasi merupakan proses perubahan struktur kimia dari bahan organik dengan menggunakan aktivitas agen-agen biologis terutama enzim sebagai biokatalis. Proses penguraian tersebut menggunakan bahan-bahan yang mengandung karbohidrat dengan menggunakan bakteri asam laktat. Salah satu bahan karbohidrat yang terdapat dalam buah berupa gula pereduksi seperti seperti glukosa dan fructosa seperti yang terdapat dalam buah sirsak gunung (Mardiana and Ratnasari, 2011). Fermentasi dapat mengubah sifat pangan sebagai akibat pemecahan kandungan-kandungan bahan pangan tersebut (Winarno, 1980). Menurut Muchtadi and Ayustaningwarno (2010) fermentasi didefinisikan sebagai suatu proses oksidasi anaerobik atau partial anaerobik karbohidrat yang menghasilkan alkohol serta beberapa asam, namun banyak proses fermentasi yang menggunakan substrat protein dan lemak .



Gambar 2.3 Reaksi Fermentasi (B. Reece *et al.*, 2010)

Menurut Azizah *et al.*, (2012) lama fermentasi dipengaruhi oleh faktor – faktor secara langsung maupun tidak langsung, yaitu:

#### 1. Substrat

Substrat adalah bahan baku untuk fermentasi karena mengandung nutrient yang dibutuhkan oleh mikroba fermentasi. Nutrient dibutuhkan oleh mikroba untuk tumbuh dan menghasilkan produk fermentasi oleh karbohidrat.

#### 2. Suhu

Suhu fermentasi berpengaruh pada lama fermentasi dikarenakan pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh suhu lingkungan fermentasi. Setiap mikroba memiliki kriteria pertumbuhan yang berbeda-beda, dipengaruhi oleh suhu optimum, minimum dan maksimumnya. Suhu juga dapat berpengaruh pada ukuran sel, produk metabolik yang dihasilkan, kebutuhan gizi serta reaksi enzimatik.

#### 3. Derajat keasaman (pH)

Derajat keasaman merupakan salah satu faktor yang perlu diperhatikan saat proses fermentasi. Oleh sebab itu sebelum pelaksanaan penelitian, substrat yang akan digunakan harus dilakukan uji pH. Dalam proses fermentasi, pH sangat berpengaruh terhadap laju pertumbuhan mikroba dan berhubungan erat dengan suhu. Jika suhu naik maka pH optimum juga akan naik.

#### 4. Air

Air merupakan salah satu faktor yang penting dalam proses fermentasi. Hal ini dikarenakan mikroba tidak akan tumbuh tanpa adanya air. Air berfungsi sebagai pelarut untuk sebagian besar aktivitas metabolik dalam sel.

### 2.3. Tinjauan Tentang Probiotik

Istilah probiotik memiliki arti sebagai hasil substansi yang diperoleh dari satu mikroba yang dapat menstimulasi pertumbuhan mikroba lain. Probiotik merupakan bahan pangan yang mengandung organisme hidup yang dapat meningkatkan kesehatan dengan cara memperbaiki keseimbangan flora usus apabila dikonsumsi dalam batas tertentu (Sunaryanto *et al.*, 2014). Mekanisme kerja probiotik yaitu dengan mengeliminasi antigen yang berasal dari makanan.

Probiotik harus memenuhi kriteria yaitu harus memiliki efek menguntungkan bagi host. Kriteria probiotik meliputi, mampu bertahan melakukan metabolisme dalam usus halus dengan memberikan efek positif bagi mikroflora di usus halus, harus mampu membentuk koloni pada saluran pencernaan dan mampu menghasilkan zat antimikroba serta tidak bersifat patogen dan aman untuk dikonsumsi. Produk yang dikatakan sebagai probiotik harus mengandung bakteri probiotik dengan jumlah  $\geq 10^6$  cfu/ml (Boro, 2017).

Stain yang digunakan sebagai agen probiotik harus memiliki resistensi terhadap asam dan empedu sehingga dapat mencapai intestin dan dapat menempel pada mukosa intestin (Allen *et al.*, 2011). Syarat lain yang harus dimiliki oleh agen probiotik yaitu mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen enterik dengan menghasilkan substansi antimikroba. Selain itu, mikrobia probiotik harus dapat tumbuh baik secara *in vitro*, memiliki stabilitas dan viabilitas yang tinggi dan aman bagi manusia. Dari berbagai persyaratan yang harus dipenuhi, *Lactobacillus* yang merupakan salah satu penghuni alami jalur intestin dan merupakan bakteri yang banyak digunakan sebagai agensia probiotik (Ahmed *et al.*, 2010).

Menurut Wulandari (2017), manfaat minuman probiotik bagi tubuh antara lain:

1. Mencegah terjadinya kanker dengan menghilangkan bahan penyebab kanker (prokarsinogen) dan mengaktifkan kembali sistem imun dalam tubuh.
2. Dapat menghasilkan antitumor.
3. Dapat memproduksi sebagian vitamin thiamin (B1), riboflavin (B2), piridoksin (B6), asam folat, sianokobalamin (B12) yang mudah diserap oleh tubuh.
4. Karena memiliki kemampuan untuk memproduksi asam asetat dan asam laktat dalam usus sehingga mampu menekan pertumbuhan *E-coli* serta mengurangi penyerapan amonia.
5. Dapat berperan untuk menurunkan kolesterol, dimana bifidobakteri menghasilkan niasin yang memberikan kontribusi terhadap penurunan kolesterol.

#### **2.4. Tinjauan Tentang Bakteri Asam Laktat**

Bakteri Asam laktat adalah bakteri gram positif yang memiliki bentuk menyerupai batang atau bulat, tidak berspora, fermentasi anaerob, tidak mempunyai sitokrom, tidak memiliki kemampuan untuk mereduksi nitrat dan memanfaatkan laktat, oksidasi negatif, katalase negatif dan dapat memfermentasi glukosa menjadi asam laktat (Boro, 2017). Menurut Rivaldi (2017) BAL dikelompokkan kedalam beberapa genus yaitu *Streptococcus* (termasuk *Lactococcus*), *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Lactobacillus*. Berikut merupakan genus dan spesies BAL yang berpotensi sebagai probiotik :

**Tabel 2. 1 Kelompok BAL Probiotik**

<i>Genus</i>	<i>Spesies</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus, L. plantarum, L. casei, L. rhamnosus, L. delbrueckii subsp. bulgaricus,, L. reuteri, L. fermentum, L. brevis, L. lactis, L. Cellobiosus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis, S. cremoris, S. alivarius subsp. thermophilus, S. intermedius</i>
<i>Leuconostoc</i>	-
<i>Pediococcus</i>	-

(Pato *et al.*, 2019)

Ditinjau dari hasil metabolisme glukosa BAL dibagi menjadi dua kelompok yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Perbedaan metabolisme glukosa oleh BAL homofermentatif dan heterofermentatif dapat dibedakan dengan mengetahui keberadaan enzim-enzim yang berperan di dalam jalur metabolisme glikolisis (Pato *et al.*, 2019). Contoh dari bakteri ini homofermentatif adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*. Grup bakteri asam laktat heterofermentatif, seperti *Leuconostoc* dan beberapa species *Lactobacillus* (Boro, 2017).

BAL menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen pada makanan sehingga dapat memperpanjang masa simpan produk makanan tersebut. Senyawa antimikroba yang dihasilkan BAL meliputi, asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin. Asam organik terbentuk melalui proses fermentasi glukosa dengan melalui dua tahap yaitu melalui pemecahan rantai karbo dari glukosa menjadi asam piruvat yang selanjutnya akan tereduksi menghasilkan asam laktat dan senyawa lainnya seperti asam asetat, CO<sub>2</sub> dan etanol (Khoiriyah and Ardiningsih, 2014).

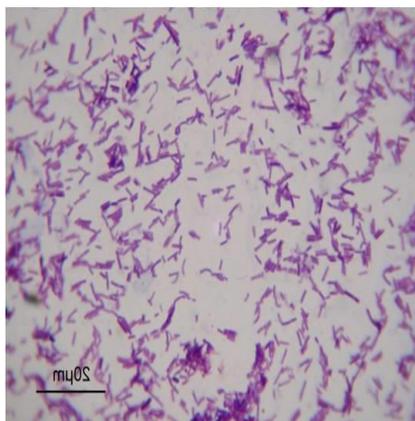
Selama proses fermentasi BAL akan memanfaatkan karbohidrat yang terkandung pada buah selama fermentasi berlangsung sehingga terbentuk asam laktat yang merupakan hasil metabolit, semakin banyak asam laktat yang terbentuk menyebabkan pH turun (Setianto *et al.*, 2016).

#### 2.4.1 Tinjauan *Lactobacillus*

*Lactobacillus* memiliki kemampuan yaitu dapat mengubah laktosa menjadi asam laktat sehingga sering disebut kelompok asam laktat (Sheeladevi and Ramanathan, 2011). Kelebihan dari genus *Lactobacillus* sebagai agen probiotik yaitu mampu bertahan pada kondisi pH rendah, garam empedu, mampu menghasilkan antimikroba dan dapat antagonistik terhadap patogen enterik, dan mampu tumbuh dengan baik pada medium sederhana. Menurut Sunaryanto *et al.*, (2014) telah didapatkan beberapa strain *Lactobacillus* dari berbagai bahan minuman fermentasi yaitu yogurt, makanan tradisional seperti tape, gatot dan growol.

Berdasarkan produk fermentasinya, *Lactobacillus* dibedakan menjadi dua yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif menghasilkan produk utama gula menjadi asam laktat dan karbondioksida. Bakteri homofermentatif dapat tumbuh pada suhu optima 37°C atau di atasnya, meliputi *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus thermophilus* dan *Lactobacillus delbrueckii*. Sedangkan heterofermentatif yaitu dapat menghasilkan produk fermentasi berupa alkohol dan asam laktat. Bakteri heterofermentatif dapat tumbuh pada suhu bawah optimal, meliputi *L. casei*, *L. plantarum* dan *L. leichmanii*. Sedangkan *Lactobacillus* heterofermentatif meliputi *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. pastorianus* (Sunaryanto *et al.*, 2014).

#### 2.4.2 *Lactobacillus casei*



**Gambar 2.3** *Lactobacillus casei* (Boro, 2017)

Morfologi dari *Lactobacillus casei* yaitu memiliki bentuk seperti batang pendek dalam koloni tunggal maupun berantai dengan panjang 1,5-5,00 mm dan lebar 0,6-0,7 mm. *Lactobacillus casei* termasuk dalam bakteri yang bersifat gram positif, katalase negatif, tidak memiliki flagela dan dapat tumbuh dengan baik pada kondisi anaerob fakultatif. Menurut suhu pertumbuhannya, bakteri ini termasuk dalam bakteri mesofil yaitu dapat hidup pada suhu 15 - 41°C dan pada pH 3,5 atau lebih dengan suhu optimum pertumbuhannya yaitu 37°C dan pH 6,8 (Putri, 2017).

#### 2.5. Tinjauan Tentang Toksisitas

Toksisitas merupakan kondisi dimana suatu sediaan dapat menimbulkan kerusakan maupun kematian terhadap hewan uji. Suatu zat kimia pada dasarnya memiliki sifat toksik yang biasanya disebabkan karena faktor dosis sehingga suatu zat kimia harus diuji toksisitas dan keamanannya terlebih dahulu (Hasanah and Wijayanti, 2020). Pengujian toksisitas memiliki manfaat dalam berbagai bidang, yaitu dapat digunakan sebagai skrining awal ekstrak tumbuhan untuk keperluan pengobatan, menentukan pertahanan anti-herbivora pada tumbuhan, menilai

potensi dan efek berbahaya dari pestisida baru, menilai toksisitas yang mungkin ditimbulkan oleh sumbernya.

Uji toksisitas merupakan uji dengan pemberian suatu senyawa pada hewan uji pada suatu saat atau uji ketoksikan suatu senyawa yang diberikan dengan dosis tunggal pada hewan uji tertentu dan pengamatan dilakukan selama 24 jam. Pengamatan aktivitas biologi uji toksisitas berupa pengamatan gejala klinik, kematian hewan uji atau pengamatan organ (Hanifah, 2015). Prinsip uji toksisitas ialah komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dalam dosis tinggi, sebaliknya obat adalah racun dari suatu bahan bioaktif dosis rendah (Ajrina, 2015). Uji toksisitas dilakukan untuk mempersempit kisaran dosis dan terakhir dilakukan uji toksisitas untuk mendapatkan persentase kematian. Menurut (Hasanah and Wijayanti, 2020), uji toksisitas dapat dibedakan menjadi menjadi tiga macam, yaitu:

#### 1. Uji toksisitas akut

Uji toksisitas akut merupakan uji yang bertujuan untuk menentukan efek toksik suatu senyawa dengan waktu uji yang relatif singkat dengan pemberian takaran atau dosis tertentu. Uji ini dilakukan dengan memberikan senyawa tunggal kepada hewan uji dengan konsentrasi tertentu. Konsentrasi yang disarankan yaitu sedikitnya empat peringkat, terdiri dari konsentrasi terendah yang hampir atau bahkan tidak menyebabkan kematian terhadap hewan uji sampai konsentrasi yang sangat tinggi yang menyebabkan sebagian besar atau seluruh hewan uji mati. Pengamatan dilakukan selama 24 jam.

## 2. Uji toksisitas subakut atau subkronis

Uji toksisitas sub merupakan uji yang dilakukan dengan pemberian zat kimia terhadap hewan uji secara berulang-ulang selama kurang lebih tiga bulan. Uji ini bertujuan untuk mengetahui spektrum efek toksik senyawa uji dengan melihat adanya hubungan antara spektrum toksik dengan takaran konsentrasi.

## 3. Uji toksisitas kronis

Uji toksisitas kronis merupakan uji yang dilakukan dengan pemberian zat kimia terhadap hewan uji secara berulang-ulang selama lebih dari tiga bulan atau hampir semua hidupnya. Walaupun penelitian tergolong waktu lebih pendek, namun apabila dibandingkan dengan uji toksisitas akut maupun uji toksisitas sub akut tergolong lebih lambat.

### **2.6. Tinjauan Metode BSLT**

*Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode awal yang digunakan untuk uji sitotoksik suatu senyawa yang berasal dari tanaman (Muaja *et al.*, 2013). Parameter yang digunakan dalam metode ini adalah kematian yang ditunjukkan oleh hewan uji berupa larva *Artemia salina* Leach. Senyawa yang memiliki tingkat ketoksikan yang tinggi sering dihubungkan dengan potensinya sebagai antikanker (Hasanah and Wijayanti, 2020).

Metode BSLT banyak digunakan dalam uji toksisitas awal suatu senyawa aktif yang terkandung pada suatu tanaman karena cepat, mudah, sederhana dengan tingkat kepercayaan sampai 95%. Penentuan efek toksik dilakukan dengan pemberian suatu zat uji dengan konsentrasi berbeda dalam waktu yang singkat. Prosedur uji menggunakan BSLT yaitu dengan menentukan nilai LC<sub>50</sub> dari senyawa aktif suatu tanaman menggunakan hewan uji larva *Artemia salina* Leach.

Suatu ekstrak dikatakan toksik berdasarkan metode BSLT apabila nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm, sedangkan suatu senyawa bahan alam dikatakan memiliki efek tidak toksik apabila nilai  $LC_{50} > 1000$  ppm.

Berikut merupakan kategori senyawa toksik :

**Tabel 2.2 Kategori Toksisitas Berdasarkan Nilai  $LC_{50}$**

Kategori	$LC_{50}$ (ppm atau $\mu$ /mL)
Sangat Toksik	$< 30$
Tidak Toksik	$>1000$

**(Hendri and Puspitasari, 2018)**

Hewan Uji yang digunakan yaitu larva udang (*Artemia salina* Leach) karena merupakan organisme zoologi intervebrata yang sederhana. Sedangkan media uji yang digunakan yaitu air laut murni atau air laut buatan dengan menggunakan garam murni tanpa sodium yang dilarutkan kedalam air. Uji toksisitas menggunakan metode BSLT dilakukan dengan pengamatan 24 jam dihitung setelah dosis atau konsentrasi diberikan (Wulandari, 2014). Berikut merupakan keuntungan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT):

1. Pengerjaan dilakukan dengan mudah dan relatif tidak mahal serta tidak membutuhkan keahlian khusus dalam pelaksanaannya.
2. Waktu uji tergolong cepat (24 jam), sederhana (tanpa membutuhkan teknik aseptik), menggunakan jumlah hewan uji tidak banyak serta samel uji yang tergolong sedikit.
3. Telah teruji hasilnya dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengamati toksisitas senyawa dalam ekstrak kasar tanaman.

4. Banyak digunakan untuk tahap awal isolasi senyawa yang bersifat toksis dalam tanaman.
5. Sering dihubungkan dengan metode penampisan untuk menyarian senyawa antikanker dalam tanaman.
6. Dapat digunakan untuk mengevaluasi toksisitas logam berat, pestisida, dan obat-obatan (terutama ekstrak tanaman alami).

BSLT merupakan *bioassay* pertama yang digunakan untuk menelitian bahan alam. Jika didapatkan hasil uji BSLT ekstrak tanaman berpotensi toksik maka dapat dilanjutkan dengan megisolasi senyawa tersebut sehingga dapat dikembangkan sebagai antikanker. Namun apabila suatu ekstrak tanaman tidak berpotensi toksik maka dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang khasiat dan manfaat tanaman tersebut (Ajrina, 2015).

## 2.7. Tinjauan Tentang *Artemia salina* Leach

*Artemia salina* Leach merupakan arthropoda primitive air (danau garam) dengan famili *Artemiidae*. Ditemukan pertama kali oleh serong ahli geografi iran pada tahun 1982 di danau Urmia (Hasanah and Wijayanti, 2020). Pada tahun 1758 oleh Linny diberika nama *Cyncer salinus*, kemudian pada tahun 1919 dirubah menjadi *Artemia salina* Leach (Wulandari, 2014). Berikut adalah taksonomi

*Artemia salina* Leach :

Kingdom` : *Animalia*

Filum : *Arthropoda*

Subfilum : *Crustacea*

Kelas : *Branchiopoda*

Ordo : *Anostraca*

Famili : *Artemiidae*  
Genus : *Artemia*  
Spesies : *Artemia salina*

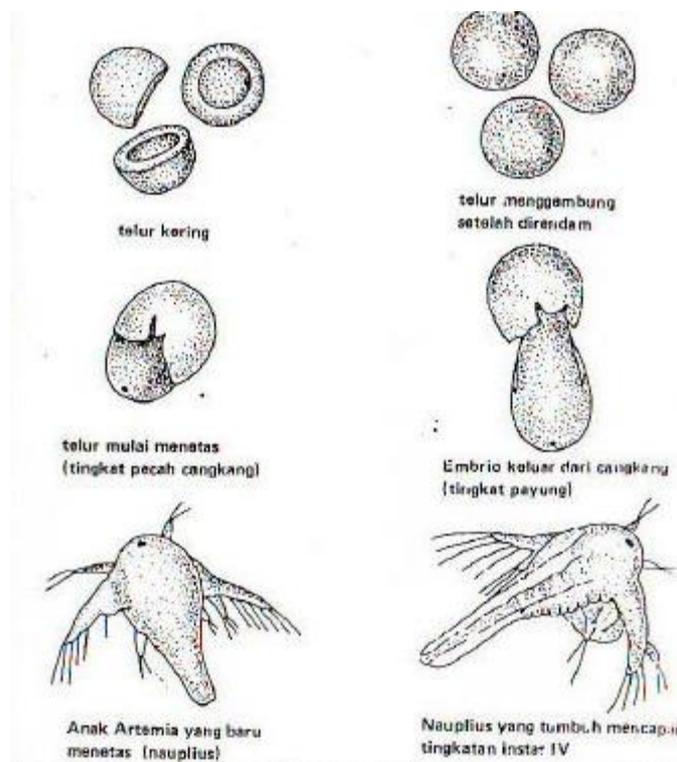


**Gambar 2.4 *Artemia salina* Leach (Dumitrascu, 2011)**

#### 2.7.1 Morfologi

*Artemia salina* Leach banyak ditemukan dalam bentuk telur istirahat yang sering disebut kista. Kista memiliki diameter 200-300  $\mu\text{m}$  dengan bentuk bulatan-bulatan kecil. Kualitas kista yang baik apabila menetas pada sekitar 18-24 jam saat diinkubasi dengan air berkadar garam 2-70 permil. *Artemia salina* Leach yang baru menetas disebut nauplii yaitu berwarna orange dan berbentuk bulat lonjong dengan panjang sekitar 400 mikron, lebar 170 mikron dan berat 0.002 mg. *Naupili* akan mengalami perubahan bentuk (*metamorfosis*). *Naupili* tingkat I diberi nama instar I, tingkat II instar II, tingkat III instar III dan seterusnya hingga instar XV. Setelah itu baru berubah menjadi *artemia* dewasa (Husniar, 2017).

### 2.7.3 Penetasan



**Gambar 2.5 Tahap Penetasan *Artemia salina* Leach (Baraja, 2008)**

Tahap penetasan *Artemia salina* Leach meliputi tahap dehidrasi, tahap pecah cangkang dan tahap payung atau pengeluaran. Tahap dehidrasi terjadi penyerapan air terhadap telur udang sehingga kista dalam bentuk kering akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap pecah cangkang yang selanjutnya terjadi tahap pengeluaran yang terjadi sebelum *nauplii* keluar dari cangkang (Hasanah and Wijayanti, 2020).

Penetasan larva dilakukan dalam aquarium yang terbagi menjadi dua bagian yaitu gelap dan terang yang diberi sekat berlubang pada bagian bawahnya. Penetasan dilakukan menggunakan air laut dengan suhu 25-30°C. Kista direndam dalam ruang gelap, setelah 24 jam kista akan menetas menjadi nauplius yang aktif bergerak menuju bagian terang. larva yang akan digunakan berusia 48 jam (Hasanah and Wijayanti, 2020).

#### 2.7.4 Penggunaan Larva *Artemia salina* Leach

*Artemia salina* banyak digunakan sebagai hewan uji di *National cancer institute* (NCI) Amerika Serikat sebagai skrining aktivitas antikanker. Penggunaan *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji pada metode BSLT karena memiliki kesamaan respon/ tanggapan dengan mamalia. DNA-dependent RNA-Polymerase yang dimilikinya mirip dengan mamalia dan organisme yang memiliki oubaine sensitif Na<sup>+</sup> dan K<sup>+</sup> dependent ATPase. Mekanisme kerjanya yaitu dengan menghambat RNA polymerase menyebabkan DNA tidak dapat mensintesis RNA, dengan begitu RNA tidak dapat terbentuk sehingga sintesis protein ikut terhambat. Protein memiliki peran penting karena berfungsi sebagai unsur structural, hormon, imunoglobulin dan berperan dalam transport oksigen. Apabila protein tidak terbentuk maka metabolisme sel terhambat sehingga dapat menyebabkan kematian sel. Suatu senyawa yang mengganggu metabolisme *Artemia salina* dan menyebabkan kematian, maka senyawa tersebut bersifat toksik dan dapat mematikan mamalia. Selain itu *Artemia salina* memiliki respon stress yang sama dengan manusia yaitu respon perilaku dan fisiologi terhadap lingkungan (Ajrina, 2015). Selain itu larva udang (*Artemia salina* Leach) memiliki membran kulit yang sangat tipis, sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya selain itu memiliki pori-pori yang besar sehingga dapat menyerap toksik lebih banyak (Ajrina, 2015).

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

LC<sub>50</sub> (*Lethal concentration*) merupakan konsentrasi yang diberikan tunggal ataupun beberapa kali yang secara statistik dapat yang menyebabkan kematian hewan uji (*Artemia salina* Leach) 50% dalam waktu 24 jam (Hasanah and Wijayanti, 2020). Konsentrasi yang dimaksud memiliki satuan ppm (*Part per million*), mg/m<sup>3</sup> atau µg/mL. Semakin tinggi nilai LC<sub>50</sub> maka semakin rendah toksisitasnya, dan apabila semakin rendah nilai LC<sub>50</sub> maka semakin toksis senyawa tersebut (Ajrina, 2015).

Nilai LC<sub>50</sub> dapat ditentukan dengan beberapa metode, yaitu :

### 1. Metode Weil

Metode Weil dilakukan dengan menggunakan tabel weil yang sudah ada. Tabel weil terdiri dari respons dan koefisien nomor atau angka., beberapa kelompok subjek untuk setiap konsentrasi obat. Syarat pada tabel Weil yaitu apabila terdapat kelompok dosis atau konsentrasi yang berbeda dapat digunakan apabila diukur tiap kelompok menjadi sama. Berikut merupakan rumus hitung Weil :

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

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 salah satu metode menghitung toksisitas yang banyak digunakan dengan cara membandingkan suatu konsentrasi atau dosis. Analisis probit termasuk dalam jenis regresi yang digunakan untuk menganalisis variabel respons binomial, biasanya digunakan untuk menguji respons organisme terhadap bahan kimia dalam toksikologi. Beberapa syarat untuk menggunakan metode probit yaitu harus memiliki tabel probit, menentukan nilai probit dari % kematian hewan uji, menentukan log dosis tiap kelompok, menentukan persamaan garis lurus antara nilai probit dan log dosis, memasukkan nilai 5 (Probit 50% kematian hewan uji) pada persamaan garis lurus, berikut rumus persamaannya:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

$y = 5$  = nilai probit dari 50% kematian hewan uji

$x$  = nilai  $LC_{50}$  ketika diubah menjadi antilog  $X$

## 3. Cara Farmakope Indonesia

Syarat yang harus dipenuhi apabila menggunakan cara FI III yaitu menggunakan dosis dari kelipatan yang tetap, jumlah hewan uji yang digunakan harus sama setiap kelompok uji, dosis atau konsentrasi yang digunakan yaitu 0%-100%. Berikut merupakan rumus perhitungannya :

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

Keterangan:

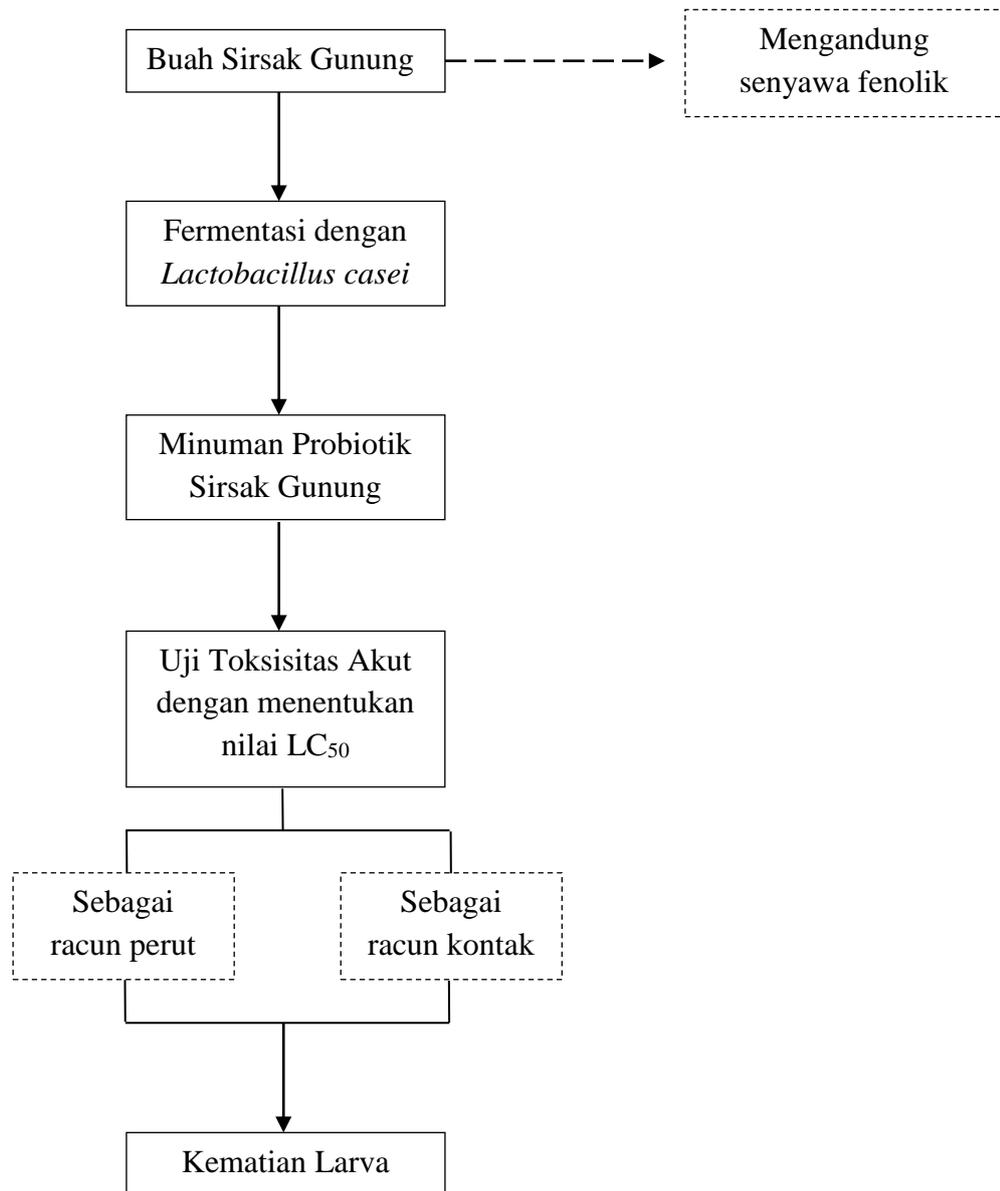
$M$  = Log  $LC_{50}$

$A$  = Log konsentrasi terendah yang masih menyebabkan jumlah kematian 100% tiap kelompok

- b = beda log dosis yang berurutan
- $p_i$  = Jumlah hewan yang mati menerima dosis  $i$  dibagi jumlah hewan seluruhnya

## 2.9 Kerangka Teori dan Kerangka Konsep

Buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) mengandung berbagai macam senyawa metabolit sekunder meliputi *annonaceous acetogenin* dan golongan fenolik yaitu terpenoid. Pertumbuhan buah sirsak tergolong cepat dan selalu berbuah sepanjang tahun, namun pemanfaatan buah sirsak gunung masih sangat rendah karena rasanya yang hambar, saat dikonsumsi sebagai buah segar, sehingga diperlukan adanya upaya yang dapat meningkatkan penerimaan buah sirsak gunung di masyarakat salah satunya dengan diolah menjadi minuman probiotik. Dalam hal ini buah sirsak gunung di fermentasi dengan menggunakan starter *Lactobacillus casei* selama 24 jam. Fermentasi menyebabkan senyawa fenolik meningkat sehingga menyebabkan rasa menjadi masam. Minuman probiotik buah sirsak gunung perlu diuji toksisitas akutnya dengan menggunakan metode BSLT. Metode tersebut memiliki mekanisme kerja dengan menghambat stimulus rasa hewan uji serta menjadi racun perut (*stomach poisoning*) dan racun kontak. Nilai  $LC_{50}$  diperoleh dari jumlah kematian larva udang yang dihitung menggunakan analisis probit.



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

**Gambar 2.6 Bagan Kerangka Konsep**