

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Bengkuang



Gambar 1. Bengkuang (*Pachyrhizus erosus L*)

2.1.1 Klasifikasi

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus L*) adalah tanaman hortikultura yang termasuk dalam keluarga polong-polongan. Tanaman ini berasal dari Benua Amerika, khususnya dari wilayah yang memiliki iklim tropis. Bengkuang dikenal karena umbinya yang dapat dikonsumsi dan kaya akan berbagai nutrisi serta senyawa bioaktif. Bengkuang adalah tanaman legum yang menghasilkan umbi akar yang dapat dikonsumsi dan dikenal karena potensi nutrisinya, kandungan pati dan proteinnya cukup tinggi, sehingga bisa dikembangkan (Andriansyah, 2018).

Klasifikasi tanaman bengkuang (*P. erosus*) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Fabales
Ordo	: Fabaceae
Famili	: Faboideae

Genus : *Pachyrhizus*

Spesies : *Urb. Pachyrhizus erosus* (L.)

2.1.2 Morfologi

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) adalah tanaman tahunan yang dikenal dengan umbinya yang berwarna putih, bertekstur renyah, dan memiliki cita rasa yang manis. Tanaman ini dapat tumbuh hingga 2-6 meter dengan akar mencapai panjang 2 meter. Batangnya merambat dan memelilit, sementara daun berbentuk seperti jantung dengan bunga biru keunguan yang tersusun dalam tangkai panjang. Umbi bengkuang dipanen setelah 4-6 bulan, ketika diameternya mencapai 10-15 cm dan Berat sekitar 2 kg. Varietas yang umum dibudayakan di Indonesia adalah bengkuang gajah dan bengkuang badur. Bengkuang gajah bisa dipanen pada usia 4-5 bulan, sedangkan bengkuang badur membutuhkan waktu panen lebih lama, yaitu 7-11 bulan (Nazara, 2019).

2.1.3 Kandungan Kimia Bengkoang (*Pachyrhizus erosus* L.)

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) memiliki berbagai kandungan zat yang bermanfaat untuk kesehatan. Beberapa komponen utama dan manfaatnya meliputi:

1. Antioksidan dan Vitamin C

Membantu melawan radikal bebas, mencegah kerusakan sel, dan memperlambat penuaan dini. Vitamin C juga penting untuk kesehatan kulit dan sistem kekebalan tubuh.

2. Flavonoid

Berfungsi sebagai tabir surya alami, mencegah kerusakan kulit, menghambat

pembentukan melanin, dan memiliki sifat anti- mikroba.

3. Pati

Berfungsi sebagai perekat dan pengental dalam masker, serta memberikan efek dingin dan menyejukkan pada kulit yang terpapar sinar matahari.

4. Saponin

Ditemukan pada daun dan biji bengkuang, saponin memiliki sifat menyerupai sabun, dapat membasmi bakteri, dan memiliki efek anti-mikroba serta potensi sebagai racun ikan dalam konsentrasi tertentu.

5. Minyak Atsiri

Ditemukan pada biji bengkuang, minyak atsiri mengandung senyawa seperti galangol dan kamfer yang memiliki sifat anti- bakteri dan memberikan aroma pada produk kosmetik dan parfum. Selain itu, bengkuang juga mengandung fosfor, kalsium, karbohidrat, lemak, protein, vitamin B1, dan zat besi yang mendukung berbagai fungsi kesehatan, termasuk memperbaiki jaringan kulit, menguatkan tulang, mencerahkan wajah, dan menurunkan kolesterol. Secara keseluruhan, bengkuang menawarkan manfaat kesehatan yang luas, baik dari segi nutrisi maupun dalam perawatan kulit dan pengobatan (Nazara, 2019).

Pada penelitian Estrella Parra dan teman-teman tahun 2014 menyatakan telah ditunjukkan bahwa rotenon yang terdapat dalam biji menunjukkan efek sitotoksik terhadap beberapa sel kanker termasuk sel kanker payudara manusia dan sel kanker paru-paru. Di mana rotenon dan 12 alfa- hidroksirotenon menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kuat. Ekstrak dari kulit bengkoang itu menghambat sel kanker striroid senyawa seperti rotenon yang diisolasi dari biji bengkoang diketahui memiliki ativitas sitotoksik

terhadap beberapa sel kanker.

2.2 Kanker

2.2.1 Pengertian Penyakit kanker

Menurut WHO, kanker adalah istilah umum untuk satu kelompok besar penyakit yang dapat mempengaruhi setiap bagian dari tubuh. Istilah lain yang digunakan adalah tumor ganas dan neoplasma. Salah satu fitur mendefinisikan kanker adalah pertumbuhan sel-sel baru secara abnormal yang tumbuh melampaui batas normal, dan yang kemudian dapat menyerang bagian sebelah tubuh dan menyebar ke organ lain. Proses ini disebut metastasis. Metastasis merupakan penyebab utama kematian akibat kanker. Menurut *National Cancer Institute* (2024), kanker adalah suatu istilah untuk penyakit di mana sel-sel membelah secara abnormal tanpa kontrol dan dapat menyerang jaringan di sekitarnya. Berdasarkan uraian diatas dapat disimpulkan bahwa, penyakit kanker merupakan penyakit berat dan bersifat kronis, yang ditandai pertumbuhan sel tubuh tidak normal, berkembang cepat menyebar, dan menekan organ atau saraf sekitar.

Para profesional kesehatan yang merawat pasien kanker harus memiliki pemahaman yang mendalam tentang sifat farmakokinetik, farmakodinamik, dan farmakogenomik dari semua agen antikanker yang tersedia, selain dari keamanan dan efikasi yang dilaporkan dari setiap agen dalam setiap populasi kanker. Para profesional kesehatan harus mampu mengevaluasi secara kritis, merangkum, dan mengkomunikasikan informasi penting kepada profesional kesehatan lainnya, pasien, dan penjaga (Dipiro, J.T, 2021).

2.2.2 Jenis-Jenis Kanker

1. Karsioma, berasal dari sel yang melapisi permukaan tubuh atau saluran tubuh (contoh: kanker kulit, testis, ovarium, payudara, dll).
2. Limfoma, berasal dari jaringan yang membentuk darah (contoh: leukemia, limfoma).
3. Sarkoma, akibat kerusakan jaringan penunjang di permukaan tubuh (contoh: jaringan ikat, otot, tulang).
4. Glioma, kanker susunan saraf (contoh: sel-sel glia di susunan saraf pusat).
5. Karsinoma in situ, sel epitel abnormal yang masih terbatas di daerah tertentu (lesi prainvasif).

2.2.3 Gejala - Gejala Kanker

1. Tahap Awal, kelelahan terus-menerus, demam, penurunan berat badan tidak sengaja, pertumbuhan rambut tidak normal, nyeri akibat penyebaran kanker.
2. Tahap Lanjut, nyeri karena tumor menekan saraf dan pembuluh darah, pendarahan atau pengeluaran cairan tidak wajar (contoh: batuk atau muntah darah, mimisan terus-menerus, cairan berdarah dari puting susu, darah dalam tinja atau urin).
3. Gejala Khusus, tergantung organ yang terkena kanker (contoh: kanker payudara stadium awal ditandai dengan benjolan berukuran 2 cm atau lebih kecil yang belum menyebar ke kelenjar getah bening).

2.2.4 Faktor Penyebab Kanker

1. Faktor Internal, keturunan, daya tahan tubuh yang buruk.
2. Faktor Eksternal, Pola hidup tidak sehat (konsumsi makanan dengan bahan karsinogen, makanan berlemak, minuman beralkohol, merokok), sinar

ultraviolet dan radioaktif, infeksi menahun, pencemaran lingkungan, obat yang mempengaruhi hormon, perilaku berganti-ganti pasangan.

Beberapa karsinogen yang diduga dapat meningkatkan risiko terjadinya kanker sebagai berikut:

1. Senyawa kimia (zat karsinogen), dalam hal ini adalah zat pewarna, zat pengawet, bahan tambahan pada makanan dan minuman.
2. Faktor fisika, dalam hal ini adalah bom atom dan radioterapi agresif (radiasi sinar pengion).
3. Virus, beberapa jenis virus berhubungan erat dengan perubahan sel normal menjadi sel kanker. Jenis virus ini disebut virus penyebab kanker atau virus onkogenik.
4. Hormon, dalam hal ini adalah zat yang dihasilkan oleh kelenjar tubuh yang berfungsi mengatur kegiatan alat-alat tubuh. Pada beberapa penelitian diketahui bahwa pemberian hormon tertentu secara berlebihan dapat menimbulkan kanker pada organ tubuh yang dipengaruhinya. Berdasarkan uraian diatas dapat disimpulkan bahwa, berupa faktor dari dalam diri individu dan faktor dari luar diri individu. Faktor dari dalam diri individu berupa faktor keturunan dan kelainan hormon tubuh. Faktor dari luar berasal dari faktor lingkungan. Berdasarkan uraian di atas, kanker adalah penyakit kronis yang ditandai dengan pertumbuhan sel tubuh tidak normal, berkembang cepat, menyebar, dan menekan organ atau saraf sekitarnya (Hadibroto, 2019).

2.2.5 Jamur Endofit Dalam Mengendalikan Kanker

Prospek obat dari sumber daya alam yang ditargetkan untuk mengendalikan

kanker memerlukan pendekatan strategis. Keberhasilan terapi kanker terarah telah menghasilkan prospek yang lebih menjanjikan untuk mengobati kanker, tetapi kanker tetap menjadi salah satu penyebab utama kematian di seluruh dunia. Munculnya resistensi terhadap kemoterapi dan kekambuhan setelah pengobatan menimbulkan tantangan signifikan terhadap rejimen terapi saat ini. Oleh karena itu, menyelidiki agen baru yang berasal dari alam dan menjelaskan mekanisme yang mendasarinya sangat penting. Selama beberapa dekade, fitokimia telah menjadi sumber utama untuk mengidentifikasi agen bioaktif terhadap kanker dengan mengisolasi senyawa spesifik yang ditujukan untuk memodulasi jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam karsinogenesis dan tumorigenesis.

Penemuan senyawa antikanker pertama taxol dari *Taxomyces andreanae*, jamur endofit dari endofit yew Pasifik Utara pada tahun 1993, memicu bioprospeksi jamur endofit. Beberapa senyawa ampuh lainnya telah dilaporkan dari endofit jamur termasuk Camptothecin, vincristine, dan pophyllotoxin. Lebih dari seratus senyawa antikanker dari 19 kelas berbeda dengan aktivitas terhadap 45 lini sel telah diisolasi dari 50 endofit jamur yang berbeda (Tyagi *et al.*, 2021)

Beberapa senyawa alami telah menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam pengembangan terapi antikanker seperti apsaicin (senyawa alkaloid dalam cabai), katekin, epikatekin, epigallocatechin dan epigallocatechin-3-gallate (fitokimia dalam teh hijau), lutein (karotenoid yang ditemukan dalam buah kuning), Garcinol (senyawa fenolik yang terdapat dalam pohon kokum) dan banyak senyawa alami lainnya juga sangat berharga untuk mengembangkan obat untuk mengobati kanker. Repositori alternatif dengan keragaman kimia serupa terdapat dalam

bentuk jamur endofit yang menghuni tanaman obat.

Terdapat keragaman tinggi jamur endofit yang berasosiasi dengan tanaman di alam yang merupakan penghasil senyawa antikanker yang ampuh dan memberikan harapan yang lebih kuat untuk penemuan obat antikanker yang efisien. Jamur ini menyediakan berbagai molekul bioaktif, seperti terpenoid, flavonoid, alkaloid, senyawa fenolik, kina, steroid, dll. yang menunjukkan sifat antikanker (Tyagi *et al.*, 2021).

Tabel 1. Kelas Senyawa Antikanker Diisolasi dan Dikarakterisasi dari Jamur Endofit Yang Menghuni Tanaman Obat (Tyagi *et al.*, 2021).

No.	Agen Bioaktif	Tanaman Inang	Jamur Endofit	Sel Jaringan
1.	Chaetomugilide A	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Jamur Chaetomium globosum TYI</i>	Karsinoma Hepatosit
2.	9-Daetoksifumigaklavin C	<i>Burung pipit Cynodon</i>	<i>Jamur Aspergillus fumigatus</i>	Sel leukemia
3.	Mikoleptodisin B	<i>Desmotes yang tak tertandingi</i>	<i>Mycoleptodiscus sp.</i>	Adenokarsinoma paru-paru
4.	Dotiorelon F	<i>Aegiceras corniculatus</i>	<i>Dothiorella sp.</i>	Garis sel hematopoietik
5.	Kapsaisin	<i>Paprika tahunan</i>	<i>Bunga Alternaria</i>	Leukemia promielositik manusia HL-60
6.	Sequoaitone	<i>Sequoia semperviens</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Kanker payudara
7.	Leptosferon C	<i>Bunga Aegiceras corniculatum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Adenokarsinoma paru-paru
8.	9-dehidroksieurotinon	<i>Kembang sepatu</i>	<i>Eurotium merah muda</i>	Kanker pankreas

1. Alkaloid

Alkaloid yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa yang mengandung atom nitrogen alami yang menunjukkan sifat obat. Sejumlah alkaloid tumbuhan telah terbukti sebagai senyawa antikanker yang kuat. Selanjutnya, telah diamati bahwa

jamur endofit juga mengandung alkaloid kuat yang ditujukan untuk efek antikanker. Alkaloid baru Chaetomugilide diisolasi dari jamur endofit *Chaetomium globosum* TY1, yang diasosiasikan dengan kulit kayu *Ginkgo biloba*, menunjukkan sitotoksitas terhadap hepatoma manusia HepG2 (Yuan *et al.*, 2019).

2. Terpenoid

Terpenoid adalah terpena termodifikasi yang mengandung kerangka Isoprena lima karbon, berbagai senyawa alami dengan potensi terapeutik yang besar. Banyak jamur endofit dilaporkan menjadi penghasil potensial berbagai macam senyawa terpenoid yang aktif secara biologis. Dua terpenoid baru, (+)-(3S,6S,7R,8S)-perikonon A dan (-)-(1R,4R,6S,7S)-2-karen-4,8-olida, telah diisolasi dari jamur *endofit Periconia sp.*, yang dikumpulkan dari tanaman *Annona muricata*. Dalam uji *in vitro*, kedua senyawa tersebut menunjukkan aktivitas sitotoksik rendah terhadap enam lini sel tumor manusia (HCT-8, Bel-7402, BGC-823, A549, A2780 dan MCF-7) dengan $IC_{50} > 10^{-5}$ M (Ge *et al.*, 2011).

3. Poliketida

Poliketida adalah keluarga penting metabolit sekunder yang mengandung gugus karbonil atau metilen yang meliputi struktur kimia dasar dari beberapa gugus antikanker. Dua poliketida baru, sitospiromarin (1), sitospiromarin (2), bersama dengan tiga metabolit yang diketahui dimetoksiftalida (3), integrasi A (4) dan integrasi B (5), diisolasi dari kultur *Cytospora sp.* dari hutan bakau Cina *Ceriops tagal*. Strukturnya dijelaskan melalui analisis spektroskopi ekstensif dan teori fungsional kerapatan bergantung waktu, perhitungan dikroisme sirkuler elektronik

dan data rotasi optic. Senyawa 2 menunjukkan aktivitas penghambatan lemah terhadap *Escherichia coli* GIM1. 201 (nilai konsentrasi penghambatan minimum (MIC) 0,35 mM). Senyawa 4 dan 5 menunjukkan sitotoksisitas yang signifikan terhadap garis sel kanker manusia HepG2 (nilai IC50 masing-masing $5,98 \pm 0,12$ μM dan $9,97 \pm 0,06$ μM), lebih kuat daripada kontrol positif 5-fluorouracil (nilai IC50 $43,50 \pm 3,69$ μM) (Wei *et al.*, 2020). 4. Kuinon Kuinon tersebar luas di kingdom tumbuhan dan sebagian besar terdapat pada tumbuhan tingkat tinggi, seperti dari famili melaporkan penjelasan struktur dan sitotoksisitas metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur endofit *Chaetomium* sp. diisolasi dari *Salvia officinalis* yang tumbuh di Maroko. Tanaman yang dikumpulkan di pegunungan Beni-Mellal di Maroko ini termasuk dalam famili Lamiaceae dan di Maroko diberi nama dengan nama vernakular “Salmia”. Jamur endofit *Chaetomium* sp. diisolasi dari jaringan batang tanaman ini. Jamur ini diidentifikasi dengan PCR. Ekstrak kasar jamur yang diisolasi sangat aktif pada sel kanker limfoma tikus L5178Y (Norrie, 2014).

2.3 Sitotoksik

Senyawa sitotoksik adalah zat yang dapat merusak sel kanker, dan digunakan untuk menghambat pertumbuhan tumor ganas. Senyawa ini berpotensi sebagai obat antikanker dengan cara menghambat pertumbuhan sel kanker. Hasil uji sitotoksisitas dapat memberikan informasi tentang persentase sel yang tetap hidup, sementara pada organ target, uji ini memberikan informasi langsung mengenai perubahan fungsi sel secara spesifik (Purwanto *et al.*, 2015).

2.4 Jenis-Jenis Ekstraksi

2.4.1 Definisi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat dari campurannya dengan menggunakan pelarut, pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Prinsip proses ekstraksi dimulai dengan proses pembukaan jaringan atau dinding sel dengan perlakuan panas, yang dilanjutkan dengan proses penarikan senyawa target menggunakan pelarut organik yang sesuai, berdasarkan prinsip kedekatan sifat kepolaran/polaritas dari senyawa dan pelarut. Berbagai macam pelarut organik ataupun air dapat digunakan untuk ekstraksi.

Pada proses ekstraksi, bahan yang akan diekstrak kontak secara langsung dengan pelarut. Selama itu akan terjadi proses yang berlangsung secara dinamik yang secara umum dapat dikelompokkan menjadi tiga fase, yaitu: pelarut akan merusak dinding sel dan jaringan, serta masuk ke dalam sel, setelah itu pelarut akan melarutkan senyawa-senyawa metabolit, dan akhirnya pelarut bersama senyawa metabolit yang terlarut dikeluarkan atau dipisahkan dari bahan atau biomassa penghasilnya. Oleh karena itu penggilingan atau pengecilan ukuran dan juga peningkatan temperatur sangat diperlukan untuk mempercepat fase-fase tersebut. Selanjutnya pelarut harus dipisahkan dari senyawa metabolit yang terlarut di dalamnya melalui proses evaporasi untuk menghasilkan ekstrak kasar, baik dalam bentuk cairan kental atau padatan (solid).

Ada beberapa metode ekstraksi berdasarkan prinsip kerja dan peralatan yang digunakan. Pemilihan metode didasarkan pada karakteristik bahan dan senyawa metabolit yang akan diekstrak, rendemen ekstrak yang ingin diperoleh, kecepatan

ekstraksi, dan juga biaya. Beberapa metode ekstraksi antara lain: maserasi, perkolasi, ekstraksi dengan reflux, ekstraksi dengan soxhlet, ekstraksi dengan ultrasonikasi, ekstraksi dengan tekanan, dan ekstraksi dengan *microwave* (Nugroho, 2017).

2.4.2 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Pemisahan secara ekstraksi didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Kalangit, 2024).

2.4.3 Metode Ekstraksi

1. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan kuno. Meskipun demikian, metode ini masih secara luas digunakan karena beberapa kelebihan seperti biaya yang murah, peralatan yang sederhana, serta tanpa perlakuan panas sehingga menjadi pilihan tepat untuk ekstraksi senyawa-senyawa yang tidak tahan panas (*termolabil*). Prosedur maserasi adalah dengan merendam bahan baku yang telah disiapkan (*dikeringkan dan digiling*) ke dalam pelarut yang sesuai pada suatu bejana dan ditempatkan pada suhu ruang dan ditunggu untuk beberapa waktu. Pengadukan secara kontinyu atau berkala juga dapat dilakukan untuk mempercepat proses ekstraksi.

Proses ekstraksi dapat dihentikan jika telah diperoleh titik jenuh (*equilibrium*) antara konsentrasi senyawa metabolit pada larutan ekstrak dengan konsentrasi senyawa metabolit pada bahan. Setelah selesai maka larutan ekstrak dapat disaring

dengan kertas saring untuk memisahkan dengan bahan asalnya. Untuk meningkatkan rendemen, maka prosedur di atas dapat diulangi hingga dua atau tiga kali dengan menggunakan sisa/ampas bahan hasil ekstraksi tahap pertama. Hal ini dimungkinkan karena pada ekstraksi tahap pertama, tepatnya pada saat titik *equilibrium* di mana kesetimbangan konsentrasi tercapai, masih ada sisa senyawa metabolit yang tertinggal pada bahan dan masih berpeluang untuk diambil kembali dalam rangka meningkatkan rendemen totalnya (Nugroho, 2017).

2. Perkolasi

Perkolasi dan maserasi memiliki persamaan sama-sama tidak memerlukan panas dalam proses ekstraksinya. Alat utamanya adalah perkolator, yaitu sebuah bejana berbentuk silindris atau kerucut terbalik yang dilengkapi dengan lobang atau kran di bagian ujung bawahnya. Proses perkolasi sendiri dilakukan dengan melarutkan senyawa metabolit pada suatu bahan yang akan diekstrak dengan cara mengalirkan pelarut yang sesuai pada matriks bahan atau sampel yang telah dipak atau ditata pada perkolator sehingga senyawa metabolit terikat dengan pelarut dan mengalir keluar dari bejana untuk ditampung. Prosedur ini dapat diulangi berkali-kali sampai dirasa mulai tidak efisien lagi dikarenakan metabolit yang terbawa terlalu sedikit yang terlihat dari perubahan warna larutan ekstrak atau dari hasil tes dengan bahan kimia tertentu (reagent) untuk mendeteksi dan memastikan apakah masih ada senyawa yang terikat apa tidak. Metode ini sudah tentu tidak membutuhkan proses filtrasi, karena ekstrak sudah tersaring pada perkolator. Metode ini hanya efektif untuk bahan-bahan dengan tingkat kelarutan yang tinggi terhadap pelarut. Atau dengan kata lain, metode ini efektif jika senyawa metabolit

di dalam bahan mudah terlarut dalam pelarut yang digunakan (Nugroho, 2017).

3. Ekstraksi dengan Reflux

Ekstraksi dengan reflux saat ini menjadi metode ekstraksi yang paling banyak diterapkan. Metode ini dinilai sebagai metode yang murah dan simpel dengan rendemen yang cukup tinggi, jika dibandingkan dengan metode maserasi atau perkolasi. Reflux berarti pelarut yang diputar kembali atau di-recycle secara kontinyu melalui pengkondensasian berulang pada sebuah alat kondensor. Pada metode ini bahan yang akan diekstrak direndam pada pelarut dalam sebuah bejana/labu yang biasanya berbentuk bulat yang kemudian ditempatkan pada sebuah pemanas (dapat menggunakan water bath, heating mantle, atau hot plate). Bagian atas labu ada sebuah lubang yang dihubungkan dengan alat pendingin balik (kondesor). Lubang pada bejana tersebut juga berguna untuk memasukkan dan mengeluarkan bahan, pelarut, maupun hasil ekstraknya. Selama proses pemanasan, pelarut akan mendidih dan menguap. Pada fase ini pelarut panas akan merusak jaringan dan dinding sel yang kemudian berpenetrasi ke bagian dalam sel dan melarutkan senyawa-senyawa metabolit yang kemudian terlarut bersama pelarut. Pada saat pelarut mendidih, maka zat-zat yang terlarut akan tertinggal di dalam labu ekstraksi. Sementara itu, pelarut akan mendidih, menguap dan mengalir dengan bergerak ke atas menuju kondensor. Pada saat yang sama, karena dialiri dengan fluida dingin, maka suhu kondensor jauh di bawah suhu uap pelarut. Dengan demikian uap pelarut akan cepat mengalami kondensasi (pendinginan dan berubah wujud menjadi cair kembali) yang kemudian mengalir ke bawah lagi menuju labu ekstraksi. Proses ini berlangsung secara kontinyu

sampai mekanisme pemanasan dihentikan (Nugroho, 2017).

4. Ekstraksi dengan Soxhlet

Ekstraksi dengan soxhlet juga termasuk salah satu metode yang paling banyak digunakan karena tingkat kepraktisan dan kenyamanannya. Prinsip ekstraksi dengan metode soxhlet adalah dengan mengekstrak bahan yang sudah dihaluskan dan dibungkus pada selembar kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam alat soxhlet yang sebelumnya telah ditempatkan pelarut pada labu soxhlet yang berada di bagian bawah. Persis di bawah labu soxhlet tersebut ditempatkan sebuah heating mantle atau hot plate untuk memanaskan labu soxhlet. Ketika soxhlet dipanaskan, maka pelarut pada labu soxhlet akan menguap dan terkondensasi kembali karena adanya sistem pendingin (kondensasi) pada bagian atas, sehingga mencair kembali dengan menyiram dan merendam bahan dalam bungkus kertas saring tadi. Akibatnya adalah pelarut tersebut akan mengekstrak bahan/sampel dan melarutkan senyawa metabolitnya. Setelah beberapa saat, maka larutan ekstrak akan mencapai volume tertentu, dan dengan mekanisme soxhlet maka larutan tadi akan terpompa dan mengalir ke bawah menuju bagian labu soxhlet. Pada saat yang sama, labu dalam kondisi panas, sehingga larutan tersebut akan kembali menguap dengan meninggalkan ekstraknya pada labu dan hanya pelarutnya yang menguap kembali untuk dikondensasi kembali (Nugroho, 2017).

2.5 Metode Pengujian Aktivitas Sitotoksik

2.5.1 Metode perhitungan langsung (*direct counting*)

Metode *direct counting* dalam uji in vitro adalah teknik yang digunakan untuk menghitung jumlah sel hidup atau mati setelah terpapar zat tertentu. Metode ini

sering diterapkan untuk mengukur efek sitotoksik bahan kimia atau obat terhadap kultur sel. Uji sitotoksitas secara langsung dilakukan dengan menghitung jumlah sel hidup dibandingkan dengan sel normal. Penghitungan sel hidup dilakukan secara manual dengan pengecatan menggunakan biru tripan. Sel yang mati akan menyerap biru tripan, sedangkan sel yang hidup tidak, karena sel mati mengalami kerusakan membran yang menyebabkan protein keluar dan berikatan dengan biru tripan. Penghitungan sel hidup dilakukan menggunakan haemocytometer (Meiyanto, 1999). Kelebihan metode ini meliputi kesederhanaan, kemudahan pelaksanaan, biaya yang rendah, dan waktu yang relatif singkat, serta memberikan indikator yang baik untuk integritas membran. Namun, ada beberapa kekurangan, seperti potensi ketidakakuratan penghitungan pada haemocytometer, masalah dengan pengisian yang tidak sempurna, gelembung udara dalam haemocytometer, ketidakcocokan untuk sampel dengan throughput tinggi, tidak efektif untuk efek sitotoksik progresif, dan kesulitan membedakan antara sel hidup yang sehat dan sel yang lemah (Meiyanto, 1999).

2.5.2 Metode MTT assay

Metode ini adalah metode kolorimetrik yang menggunakan reagen MTT, yaitu garam tetrazolium. Reagen ini dapat diubah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel di mitokondria sel yang masih hidup. Kristal formazan ini menghasilkan warna ungu yang dapat diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader (Junedy, 2005). Warna ungu yang lebih gelap dan absorbansi tinggi menunjukkan lebih banyak sel hidup, sementara warna pudar menandakan penurunan sel hidup dan efek

sitotoksik. Penggunaan multi well-plate mempermudah persiapan eksperimen untuk banyak sampel dalam waktu singkat. Kelebihan metode ini adalah kesederhanaan, keamanan, dan reproduktifitas tinggi. Namun, kelemahannya meliputi kebutuhan akan pelarut organik untuk melarutkan Formazan MTT dan perlunya kontrol tambahan untuk menghindari hasil positif/negatif palsu (Junedy, 2005).

2.5.3 Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah cara untuk mengukur toksisitas atau sitotoksik suatu senyawa dari ekstrak tanaman menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. BSLT adalah metode yang umum digunakan untuk skrining senyawa antikanker baru dari tanaman dan terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Tujuan uji BSLT adalah untuk menentukan kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan sel dan melanjutkan penelitian dalam penemuan obat antikanker (Kanwar, 2007). Larva *Artemia salina* dianggap sebagai perwakilan organisme untuk uji kematian in vivo. Larva udang dipilih karena kulitnya yang tipis dan sensitivitasnya terhadap lingkungan. Mereka mudah mati jika terpapar zat atau senyawa toksik, sehingga sering digunakan dalam pengujian toksisitas. Hasil uji menunjukkan adanya korelasi positif antara toksisitas senyawa uji dan penghambatan proliferasi karsinoma nasofaring. Uji dilakukan dengan mengamati tingkat kematian larva *A. salina* setelah diberi ekstrak dan diinkubasi selama 24 jam, dengan hasil dihitung sebagai nilai LC_{50} , yaitu konsentrasi ekstrak yang menyebabkan kematian 50% larva. Kelebihan metode ini murah, sampel yang dibutuhkan relatif sedikit dan sederhana.

Kekurangannya adalah tidak dapat menunjukkan efek senyawa pada hewan uji secara maksimal (Muaja *et al.*, 2013).

2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.6.1 Definisi

KLT Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan suatu metode yang dapat memisahkan suatu senyawa dari campurannya dengan menggunakan 2 fase yaitu fase diam dan fase gerak. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk memisahkan senyawa tunggal dari campurannya secara analitik (Miranti, *et al.*, 2023).

2.6.2 Prinsip KLT

Pada kromatografi lapis tipis (KLT), pemisahan senyawa terjadi berdasarkan perbedaan adsorpsi atau partisi antara fase diam dan fase gerak secara kompetitif. Senyawa yang terikat kuat pada fase diam akan terelusi lebih lama dan memiliki nilai R_f (*Retardation factor*) kecil, sedangkan senyawa yang lemah terikat akan dielusi lebih cepat dan memiliki nilai R_f lebih besar. Nilai R_f didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh garis depan fase pengembang (Miranti, *et al.*, 2023).

2.6.3 Kelebihan KLT

Teknik pemisahan dengan KLT memiliki banyak kelebihan, karena KLT merupakan Teknik yang serbaguna, yang dapat diaplikasikan untuk hampir semua senyawa. Pemisahan dapat dicapai dengan biaya tidak terlalu mahal, yang dihasilkan dari adsorben yang baik dan pelarut yang murni. Pemisahan dapat

dicapai dalam waktu yang singkat, sehingga memungkinkan KLT merupakan suatu Teknik dengan jaminan keberhasilan, di dalam pemisahan campuran yang tidak diketahui (Rosamah, 2019).

2.6.4 Kekurangan KLT

Beberapa kekurangan dari KLT diantaranya yaitu KLT bisa menjadi pekerjaan yang kurang bersih, khususnya bila plat disiapkan sendiri. Para peneliti disarankan untuk menggunakan plat yang siap pakai. KLT dapat dibuat sebagai kromatografi kuantitatif, dengan memodifikasi peralatan kromatografi (Rosamah, 2019).

2.7 Uji Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui dan mengidentifikasi senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman. Tujuannya adalah untuk mengetahui jenis-jenis senyawa kimia dalam tanaman. Proses skrining dilakukan dengan menguji sampel tanaman menggunakan reagen khusus yang akan menyebabkan perubahan warna, yang membantu peneliti mengenali senyawa kimia yang ada. Selain itu, senyawa yang berhasil diisolasi akan dibandingkan dengan senyawa dari tanaman lain untuk mengetahui perbedaannya (Muthmainnah. 2019)

Dalam uji fitokimia, dilakukan dengan metode uji warna menggunakan pereaksi tertentu yang dapat menunjukkan keberadaan senyawa seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan senyawa fenolik lainnya. Untuk uji alkaloid, reagen yang umum digunakan adalah reagen *Dragendorff*, *Mayer*, *Wagner*, jika hasil positif akan menghasilkan endapan merah atau orange, coklat, dan putih. Uji

flavonoid biasanya menggunakan uji pewarnaan dengan larutan amonia, yang akan menunjukkan perubahan warna kuning hingga merah. Saponin dapat diuji dengan uji busa, di mana larutan ekstrak dikocok dengan air dan terbentuk busa yang stabil jika saponin ada. Untuk mendeteksi tannin, digunakan reagen FeCl_3 (besi(III) klorida), yang akan menghasilkan perubahan warna biru atau hijau kehitaman. Sementara itu, senyawa fenolik juga dapat diuji dengan reagen FeCl_3 , yang memberikan warna ungu hingga biru kehitaman. Uji terpenoid dan steroid sering menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*, yang menunjukkan perubahan warna hijau atau merah. Dengan penggunaan reagen-reagen ini, keberadaan senyawa bioaktif dalam tumbuhan dapat diidentifikasi secara kualitatif sebelum dilakukan analisis lebih lanjut (Emilia, *et al.*,2023).

Keberhasilan skrining fitokimia sangat dipengaruhi oleh pemilihan pelarut dan metode ekstraksi yang digunakan. Pemilihan pelarut yang tidak sesuai dapat menyebabkan senyawa aktif yang diinginkan tidak terekstrak dengan optimal, sehingga mengurangi akurasi hasil analisis. Umumnya, pemilihan pelarut mengikuti prinsip "*like dissolves like*", di mana senyawa nonpolar lebih mudah larut dalam pelarut nonpolar, sedangkan senyawa polar larut dalam pelarut polar. Prinsip ini berperan penting dalam menentukan komponen kimia yang dapat diekstrak dan dianalisis lebih lanjut. Oleh karena itu, pemilihan metode ekstraksi dan pelarut yang tepat menjadi faktor krusial dalam skrining fitokimia untuk memastikan hasil yang optimal dan representatif dari kandungan metabolit sekunder dalam tumbuhan yang diteliti (Emilia, *et al.*,2023).

2.8 Jamur Endofit

2.8.1 Definisi

Endofit adalah simbiosis mutualistik yang hidup di dalam jaringan tanaman sehat, di mana mereka mendapatkan nutrisi dan tempat tinggal dari tanaman inang. Asosiasi ini diketahui dapat meningkatkan pertumbuhan dan vigor tanaman, memperbaiki pengambilan nutrisi tanaman, serta memberikan resistensi terhadap infeksi patogen. Endofit juga menghasilkan produk biokontrol aktif, seperti bahan antimikroba, yang membantu mereka berkompetisi untuk kolonisasi dan makanan, serta menstimulasi pertahanan tanaman terhadap berbagai patogen. Selain itu, jamur endofit dapat menginfeksi jaringan tanaman sehat dan memproduksi mikotoksin, enzim, dan antibiotik. Kehadiran jamur endofit dalam jaringan tanaman memberikan keuntungan seperti meningkatkan toleransi terhadap logam berat, ketahanan terhadap kekeringan, penekanan terhadap serangan hama, dan resistensi sistemik terhadap patogen (Chairunnisa, 2018).

2.8.2 Ekologi Jamur Endofit

Jamur endofit adalah jamur yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan gejala atau kerusakan yang jelas pada inangnya. Mereka dapat ditemukan di berbagai bagian tanaman seperti batang, akar, dan daun. Jamur endofit tumbuh di antara sel-sel tanaman dan sering kali di dalam pembuluh xylem. Mereka dapat masuk ke dalam tanaman melalui lubang alami atau jaringan muda tanpa menyebabkan luka. Keberadaan jamur endofit tidak menyebabkan kerugian pada tanaman yang sehat dan tidak menimbulkan serangan atau gejala yang merugikan. Jamur endofit ditemukan di banyak varietas tanaman di seluruh dunia, termasuk pohon, semak, rumput, lumut, tumbuhan paku, dan lumut kerak

(Purnawati & Herry, 2023).

2.8.3 Mekanisme Jamur Endofit dengan Inangnya

Berikut adalah lima mekanisme bagaimana jamur endofit dapat melindungi tanaman terhadap serangan patogen atau serangga:

1. **Penghambatan Pertumbuhan Patogen Secara Langsung**, Jamur endofit menghasilkan senyawa antibiotik dan enzim litik yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh patogen. Senyawa ini biasanya sangat toksik terhadap mikroba patogen tetapi relatif aman untuk tanaman inangnya. Contohnya adalah senyawa antimikroba yang mengganggu metabolisme sel mikroba, sintesis dinding sel, atau membran sel.
2. **Penghambatan Tidak Langsung Melalui Perangsang Metabolit Sekunder**, Jamur endofit dapat merangsang tanaman untuk menghasilkan metabolit sekunder seperti asam salisilat, asam jasmonat, dan etilen, yang berperan dalam pertahanan tanaman. Metabolit sekunder ini membantu tanaman melawan patogen atau berfungsi sebagai antimikroba.
3. **Perangsang Pertumbuhan Tanaman**, Jamur endofit dapat merangsang pertumbuhan tanaman sehingga tanaman menjadi lebih kuat dan tahan terhadap serangan patogen. Ini dapat mencakup peningkatan ketahanan tanaman terhadap stres lingkungan atau infeksi.
4. **Kolonisasi Jaringan Tanaman**, Dengan berkolonisasi di dalam jaringan tanaman, jamur endofit dapat menghalangi penetrasi patogen. Kolonisasi ini mengisi ruang yang mungkin digunakan oleh patogen untuk masuk ke jaringan tanaman.

5. Hiperparasit, beberapa jamur endofit dapat berperan sebagai hiperparasit, yaitu parasit yang menginfeksi patogen lain. Dengan demikian, mereka mengurangi jumlah patogen yang dapat menyerang tanaman inangnya.

2.8.4 Potensi Jamur Endofit

Jamur endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan efek negatif bahkan bersifat simbiosis mutualisme dengan tanaman inangnya, jamur endofit dapat diisolasi dari akar, biji, batang, daun, bunga, dan buah tumbuhan serta dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang berkhasiat untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat (Putri *et al.*, 2016).

Endofit menghasilkan hidrolisis ekstraselular sebagai mekanisme resistensi untuk mengatasi serangan dari tanaman inang atau untuk mendapatkan nutrisi. Enzim tersebut termasuk pectinases, esterases, cellulases and lipases, proteinase, α -1,4 glucan lyase and phosphatases. Kegiatan enzimatik ini terkait dengan hubungan tanaman inang dengan endofit, yang memungkinkan terjadi rekombinasi genetik sehingga endofit dapat menghasilkan beberapa Phytochemical (alkaloida, steroid, terpenoid, derivat isokumarin, quinon, flavonoid, fenol dan lain-lain) yang awalnya menjadi karakteristik dari tanaman inang. Senyawa metabolit yang dihasilkan oleh hubungan antara tanaman inang dan endofit tersebut dapat mempunyai aktivitas seperti anti kanker, anti oksidan, anti jamur, anti bakteri, anti virus, anti insektisida dan immunosupresan (Rofida, 2012).