

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Biwa (*Eriobotriya japonica* (Thunb.) Lindl.)

2.1.1 Klasifikasi Biwa (*Eriobotriya japonica* (Thunb.) Lindl.)

Menurut Ibrahim (2021), klasifikasi dari tumbuhan biwa sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Subkingdom : *Viridaeplantae*
Division : *Tracheophyta*
Subdivision : *Spermatophytina*
Class : *Magnoliopsida*
Order : *Rosales*
Family : *Rosaceae*
Genus : *Eriobotrya*
Species : *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.



Gambar 1. Bagian-bagian dari *Eriobotriya japonica*. (A) Pohon; (B) bunga dan daun; (C) buah.

Sumber : Liu *et al.* (2025)

2.1.2 Morfologi Biwa (*Eriobotriya japonica* (Thunb.) Lindl.)

Daun tanaman biwa umumnya memiliki tepi bergerigi, meskipun tingkat kegerigiannya bervariasi ada yang bergerigi sepanjang tepi daun, namun sebagian besar hanya hingga setengah bagian tepi. Warna daun bervariasi dari hijau muda hingga hijau tua, dengan tekstur yang relatif serupa. Pada daun muda, permukaan atas dan bawahnya ditutupi bulu halus, tetapi seiring pertambahan usia, bulu hanya tersisa di bagian bawah daun. Daunnya bersifat keras dan kaku, dengan bentuk pertulangan yang ada yang lurus dan ada pula yang sedikit membengkok. Ukuran daun juga beragam, dari kecil hingga besar, dan umumnya tumbuh menumpuk di ujung cabang. Batang tanaman biwa berukuran relatif kecil, dengan variasi pada permukaan batang yang bisa halus atau kasar. Batang yang permukaannya kasar biasanya memiliki daun dengan pertulangan yang membengkok. Batang muda bersifat lunak dan berbulu, sedangkan batang yang telah tua menjadi keras dan kehilangan bulunya (Pinem & Lailatussyifa, 2017).

Bunga biwa merupakan bunga majemuk yang terdiri atas benang sari dan putik. Bentuknya menyerupai bola dengan lapisan kelopak berjumlah antara 5 hingga lebih dari 10, tergantung ukuran bunga. Warna bunga umumnya putih, dan menjadi tempat terjadinya proses penyerbukan serta pembuahan ketika benang sari bersatu dengan putik hingga membentuk bakal biji. Buah biwa berbentuk bulat dengan diameter sekitar 3–5 cm. Daging buahnya berwarna bening, bertekstur kenyal, dan berair. Saat masih muda, buah berwarna hijau dan tertutup bulu halus, namun ketika matang, warna berubah menjadi kuning dan bulu pada permukaannya berkurang (Pinem & Lailatussyifa, 2017).

2.1.3 Kandungan Kimia Tumbuhan Biwa (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.)

Eriobotrya japonica merupakan tanaman yang mengandung beragam fitokimia, termasuk fenol, alkaloid, glikosida jantung, flavonoid, mukilago, gom, dan fitosterol. Baik daun maupun buahnya kaya akan senyawa bioaktif seperti vitamin, flavonoid, fenol, dan karotenoid. Pada buah yang telah matang, ditemukan berbagai senyawa fenolik utama seperti kafein, asam 4-O-kafeoilkinat, asam neoklorogenat, asam klorogenat, asam 4-hidroksibenzoat, asam protokatekuat, asam o-kumarat, asam elagat, dan asam ferulat. Biji tanaman ini mengandung tanin, pati, mineral, serta protein dalam jumlah tinggi. Bagian bunga *E. japonica* juga merupakan sumber penting flavonoid dan senyawa fenolik (Syahputra *et al.*, 2025).

Daun loquat mengandung asam fenolat, flavonoid, tanin, seskuiterpena, triterpena, serta glikosida megastigmane. Senyawa asam oleanolat dan ursolat ditemukan pada daun maupun bunga, dengan kadar yang bervariasi tergantung pada jenis kultivar dan tahap pertumbuhannya. Dari kulit batang tanaman ini telah berhasil diisolasi empat flavonoid, kaempferol 3-O- β -glukosida, kuersetin, kuersetin 3-O- α -rhamnosid, dan naringenin, serta tiga asam triterpena yaitu asam ursolat, korosolat, dan oleanolat. Selain itu, asam klorogenat diketahui sebagai senyawa fenolik utama yang terdapat pada daun, buah, dan bunga loquat (Syahputra *et al.*, 2025).

2.1.4 Bioaktivitas Tumbuhan Biwa (*Eriobotriya japonica* (Thunb.) Lindl.)

Biwa mengandung senyawa bioaktif yang memiliki fungsi biologis yang luas dan baik, salah satu yang paling signifikan adalah efek antioksidan, antiinflamasi, dan hipoglikemiknya. Fungsi-fungsi ini terutama disebabkan oleh kelimpahan fenol dan triterpenoid dalam loquat. Senyawa bioaktif ini bekerja melalui berbagai target dan jalur aksi. Dan telah terbukti memiliki potensi sifat antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker (Liu *et al.*, 2025).

2.2 Jamur Endofit

2.2.1 Definisi Jamur Endofit

Jamur endofitik merupakan mikroorganisme yang memiliki keragaman tinggi dan hidup di dalam jaringan sel serta di antara sel tumbuhan. Populasi jamur ini diperkirakan mencapai jutaan jenis, dan penyebarannya yang luas di berbagai ekosistem menunjukkan peran pentingnya dalam aspek ekologi maupun evolusi. Kehadiran jamur endofitik memberikan berbagai keuntungan bagi tanaman inang karena mampu menghasilkan metabolit yang berfungsi melindungi tanaman dari serangan patogen, serangga, dan herbivore (Nagarajan *et al.*, 2022).

Selain itu, jamur ini dikenal sebagai sumber potensial metabolit bioaktif dengan keragaman struktur kimia dan fungsi biologis yang tinggi. Senyawa yang dihasilkan dari jamur endofitik memiliki berbagai aktivitas farmakologis, termasuk sebagai antimikroba, antikanker, antioksidan, antiinflamasi, dan antidiabetes. Salah satu contoh penting adalah senyawa Taxol, obat antikanker

yang berhasil dikembangkan dari jamur endofitik dan digunakan dalam terapi berbagai jenis kanker pada manusia (Nagarajan *et al.*, 2022).

2.2.2 Hubungan Jamur Endofit dengan Inangnya

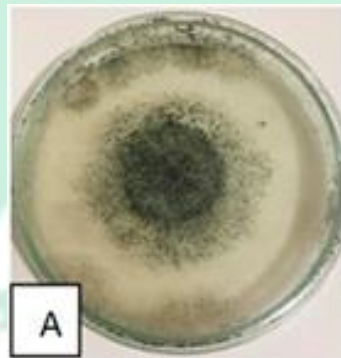
Jamur endofit hidup secara asimtomatik di dalam jaringan tanaman, baik intraseluler maupun interseluler. Mereka dapat ditemukan hampir di semua spesies tumbuhan yang ada di lingkungan alami. Sehingga jamur endofit dan inangnya berkoevolusi selama proses evolusi tanaman, keberadaan mereka sangat penting untuk kelangsungan hidup dan kebugaran tanaman. Hubungan keduanya bersifat simbiosis mutualistik, jamur endofit dapat meningkatkan fotosintesis pada tanaman tertentu melalui peningkatan kandungan klorofil, efisiensi penangkapan cahaya, aktivitas Rubisco, dan perbaikan transportasi elektron fotosintetik. Jamur endofit juga memiliki kemampuan untuk meningkatkan penyerapan hara dengan mengubah bentuk akar, mengembangkan enzim yang dapat memecahkan senyawa organik, meningkatkan ekspresi transporter hara, dan mengangkut nutrisi melalui hifa jamur (Sarkar *et al.*, 2021).

Selain itu, jamur endofit meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman abiotik seperti salinitas, kekeringan, logam berat, dan suhu ekstrim dengan meningkatkan sistem antioksidan dan mengatur respons fisiologis tanaman. Di sisi lain, jamur endofit meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik seperti patogen dan herbivora dengan menghasilkan metabolit sekunder seperti alkaloid, memperkuat jalur pertahanan tanaman, dan meningkatkan kompetisi ruang dalam jaringan tanaman (Sarkar *et al.*, 2021).

2.2.3 Identifikasi Jamur Endofit

1. Identifikasi Makroskopis

Ciri-ciri makroskopis yang diamati meliputi warna koloni, keberadaan pola pertumbuhan berupa garis radial atau konsentris, adanya eksudat (cairan yang dikeluarkan koloni), tekstur atau permukaan koloni, serta ukuran diameter koloni. Pengamatan makroskopis ini bertujuan untuk mengetahui karakter visual jamur, seperti warna, bentuk, dan pola pertumbuhan yang dapat membantu dalam proses identifikasi spesies (Khoirunisa *et al.*, 2024).



Gambar 2. Pengamatan secara makroskopis isolat jamur

Sumber: (Khoirunisa *et al.*, 2024)

2. Identifikasi Mikroskopis

Ciri-ciri mikroskopis yang diamati mencakup bentuk dan ukuran konidia (spora aseksual), struktur dan warna hifa (benang penyusun tubuh jamur), keberadaan sekat (septa) pada hifa, serta struktur pendukung seperti vesikel dan konidiofor. Pengamatan mikroskopis dilakukan untuk mengetahui karakter morfologi seluler jamur yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang, sehingga

hasilnya dapat digunakan sebagai dasar dalam penentuan jenis dan klasifikasi jamur secara lebih akurat (Khoirunisa *et al.*, 2024).



Gambar 3. Pengamatan secara mikroskopis

Sumber: (Khoirunisa *et al.*, 2024)

3. Identifikasi Molekuler

Fungi endofit merupakan jamur yang berkoloni dan hidup di dalam jaringan tanaman sehat tanpa menimbulkan gejala penyakit. Penentuan spesies fungi endofit dapat dilakukan melalui identifikasi morfologi maupun molekuler. Identifikasi fungi secara morfologi dilakukan dengan memisahkan koloni yang berbeda ke dalam media baru berdasarkan perbedaan warna koloni, tekstur, serta rata-rata waktu pertumbuhan koloni. Namun, penyusunan taksonomi berdasarkan morfospesies belum mampu merepresentasikan hubungan filogenetik hingga tingkat spesies, sehingga diperlukan pendekatan identifikasi yang dipelajari dalam biologi molekuler. Seiring dengan penemuan struktur DNA, dikembangkan teknik identifikasi molekuler untuk mengatasi permasalahan dalam taksonomi fungi. Perbandingan sekuens gen penyandi ribosomal DNA dapat dimanfaatkan sebagai karakter dalam identifikasi molekuler suatu organisme karena gen tersebut

memiliki daerah sekuens yang bersifat terkonservasi maupun variable (Novaldi *et al.*, 2021).

Identifikasi isolat fungi dapat dilakukan secara molekuler melalui analisis genetik parsial pada lokus *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dari ribosomal DNA fungi. Tahapan awal dalam identifikasi molekuler meliputi isolasi DNA dan amplifikasi PCR pada wilayah ITS rDNA. Sekuen DNA pada daerah ITS rDNA mengalami evolusi lebih cepat dibandingkan daerah gen lainnya, sehingga menunjukkan variasi antarspesies. Kondisi ini memudahkan proses identifikasi spesies dengan cara membandingkan tingkat kemiripan atau homologi sekuen DNA ITS suatu fungi dengan fungi lain. Identifikasi berdasarkan morfologi belum mampu memberikan kepastian spesies maupun menjelaskan hubungan kekerabatan antarfungi, sehingga diperlukan metode identifikasi yang lebih akurat melalui analisis sekuen DNA ribosomal pada daerah ITS. Metode ini secara luas digunakan untuk mengetahui informasi basa-basa nukleotida yang merepresentasikan keseluruhan genom dalam suatu sel atau organisme. Sebelum dilakukan penentuan sekuen ITS rDNA untuk identifikasi spesies fungi, daerah ITS tersebut harus terlebih dahulu diamplifikasi. Terdapat dua wilayah ITS rDNA yang bersifat diagnostik dan dapat dimanfaatkan dalam identifikasi spesies fungi karena tingkat keragamannya yang tinggi, yaitu ITS-1 dan ITS-2 (Novaldi *et al.*, 2021).

Verifikasi hasil pemeriksaan morfologi serta identifikasi fungi hingga tingkat spesies dapat dilakukan melalui analisis filogenetika dengan menggunakan sekuen ITS-1 dan ITS-2 dari gen DNA ribosomal (rDNA). Pada sebagian besar

kasus, data sekuens beserta hubungan filogenetiknya memungkinkan penentuan identitas fungi sampai pada tingkat spesies. Isolasi DNA merupakan tahapan awal dalam berbagai teknologi analisis DNA dan bertujuan untuk memperoleh DNA murni yang selanjutnya digunakan sebagai bahan amplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi DNA pada daerah ITS rDNA dari templat DNA kromosomal diperlukan untuk mempermudah penentuan sekuens DNA ITS tersebut. Hal ini karena tanpa proses amplifikasi, sekuens ITS rDNA sulit dianalisis, mengingat daerah ITS rDNA hanya mencakup sekitar 0,0002% dari keseluruhan kromosom, sehingga tanpa amplifikasi gangguan dari sekuens DNA lain akan sangat besar (Novaldi *et al.*, 2021).

2.3 Kanker

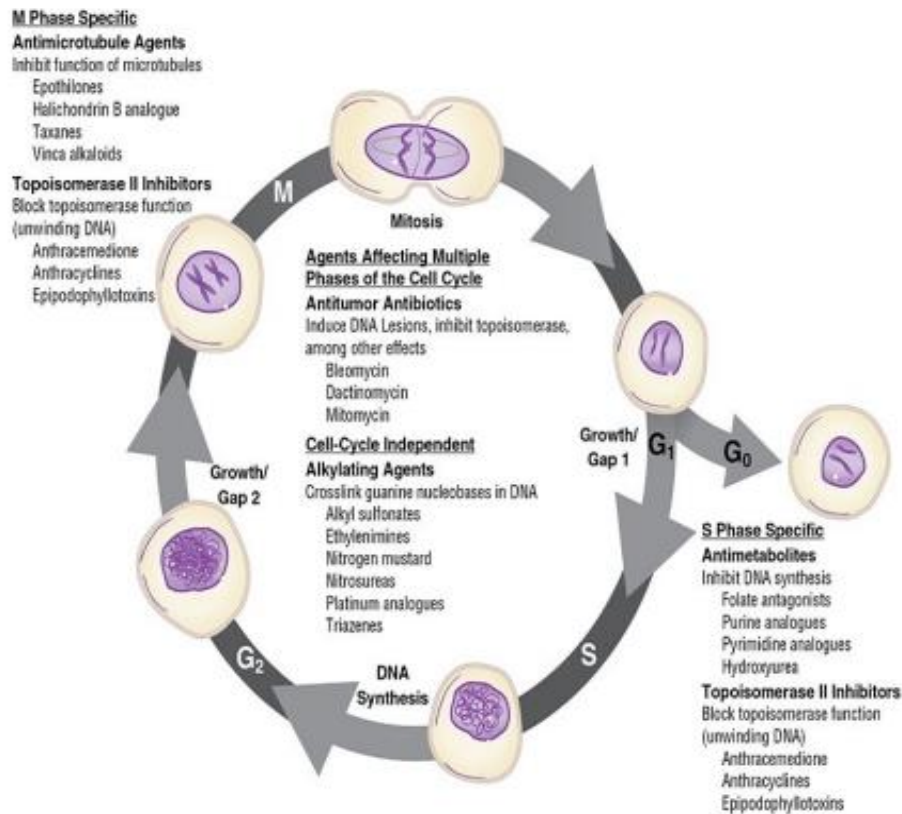
2.3.1 Definisi kanker

Kanker merupakan 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. Kanker adalah suatu istilah untuk penyakit di mana sel-sel membelah secara abnormal tanpa kontrol dan dapat menyerang jaringan di sekitarnya. Proses ini disebut metastasis. Metastasis merupakan penyebab utama kematian akibat kanker (WHO, 2022).

2.3.2 Patofisiologi kanker

Siklus sel mencakup serangkaian peristiwa di mana sel normal dan sel kanker membelah dan membentuk sel baru. Proses ini diatur secara ketat pada sel yang sehat. Onkogen dan gen penekan tumor memberikan sinyal stimulasi dan penghambatan yang mengatur siklus sel. Sinyal-sinyal ini bertemu pada sistem molekuler di inti yang dikenal sebagai jam siklus sel. Fungsi dari Jam dalam sel yang sehat berfungsi untuk mengintegrasikan sinyal masukan dan menentukan apakah siklus sel harus dilanjutkan. Jam ini terdiri dari serangkaian protein yang saling berinteraksi, yang paling penting adalah siklin dan kinase tergantung siklin (CDK). Siklin dan CDK mendorong masuknya ke dalam siklus sel dan diekspresikan secara berlebihan pada beberapa jenis kanker. Inhibitor CDK telah diidentifikasi sebagai pengatur negatif penting dari siklus sel (Dipiro *et al.*, 2023).

Siklus sel berlangsung dari satu pembelahan sel ke pembelahan sel berikutnya. Siklus ini melibatkan lima fase: replikasi DNA (fase S), pembelahan sel (fase M), dua fase istirahat (G1 dan G2), dan keadaan tidak membelah (fase G0). Pada fase istirahat pertama, G1, sel tumbuh dalam ukuran dan memutuskan apakah akan melanjutkan siklus sel atau tetap dalam keadaan istirahat. Jika sel normal, sel akan masuk ke fase S untuk mensintesis DNA-nya. Selanjutnya, sel memasuki fase istirahat kedua, G2, di mana sel mempersiapkan diri untuk membelah. Pada fase M, sel memasuki mitosis dan menghasilkan dua sel anak. Jika sel tidak sehat, sel dapat berhenti membelah dan memulai apoptosis (Dipiro *et al.*, 2023).



Gambar 2.4. Aktivitas siklus sel untuk kemoterapi.

Sumber : (Dipiro *et al.*, 2023)

2.3.3 Mekanisme Kerja Senyawa Antikanker dari Jamur Endofit

Jamur endofit memiliki potensi sebagai agen antikanker karena mampu menghasilkan senyawa aktif yang dapat menghambat proliferasi sel kanker. Senyawa tersebut bekerja dengan cara mengganggu proses siklus sel atau menyebabkan kerusakan pada DNA, sehingga memicu terjadinya kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Selain itu, beragam metabolit sekunder yang dihasilkan bersifat lipofilik, yaitu mudah larut dalam lemak. Sifat lipofilik ini disebabkan oleh adanya gugus nonpolar pada struktur cincin aromatik, yang memungkinkan senyawa-senyawa tersebut menembus membran sel secara pasif

dan berinteraksi dengan komponen di dalam sel kanker. Interaksi ini selanjutnya mengganggu berbagai fungsi penting sel, termasuk menyebabkan perubahan struktur sel, yang pada akhirnya mengarah pada kematian sel kanker (Anwar & Futra, 2019).

2.4 Ekstraksi

2.4.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan atau hewan menggunakan pelarut tertentu. Hasilnya yaitu ekstrak yang merupakan sediaan pekat diperoleh dengan mengekstrak zat aktif dan menguapkan hampir semua pelarut, sehingga tersisa massa atau serbuk yang diperlakukan sesuai standar yang ditetapkan (Depkes RI, 1995).

Prinsip ekstraksi diawali dengan pembukaan jaringan atau dinding sel melalui perlakuan panas, kemudian dilanjutkan dengan proses penarikan senyawa target menggunakan pelarut organik yang sesuai berdasarkan kesesuaian sifat kepolaran atau polaritas antara senyawa dan pelarut. Beragam jenis pelarut organik maupun air dapat dimanfaatkan dalam proses ekstraksi. Selain itu, terdapat pula metode ekstraksi tanpa pelarut, yaitu *supercritical fluid extraction* (SFE). Pada metode ini, peran pelarut sebagai ekstraktan digantikan oleh gas karbondioksida yang bersifat inert, sehingga metode tersebut lebih ramah lingkungan karena tidak menghasilkan limbah pelarut organik (Nugroho, 2017).

2.4.2 Metode Ekstraksi

Menurut Nugroho (2017), ekstraksi dibagi dalam beberapa jenis metode yaitu:

1. Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi yang paling sederhana dan bersifat tradisional. Walaupun demikian, metode ini masih banyak diterapkan karena memiliki beberapa keunggulan, seperti biaya yang rendah, penggunaan peralatan yang sederhana, serta tidak melibatkan perlakuan panas, sehingga sesuai digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang tidak tahan terhadap panas (*termolabil*). Namun demikian, metode ini juga memiliki beberapa keterbatasan, di antaranya waktu ekstraksi yang cukup lama, yaitu berkisar antara satu hingga tujuh hari tergantung pada jenis bahan yang digunakan. Semakin kuat struktur jaringan dan dinding sel bahan, maka semakin lama pula waktu yang dibutuhkan. Selain itu, metode ini memerlukan volume pelarut yang cukup besar serta berpotensi menyebabkan kehilangan sebagian senyawa metabolit akibat teradsorpsi pada bahan, kertas saring, atau dinding wadah ekstraksi.

Prosedur maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel yang telah disiapkan, yaitu dalam bentuk kering dan berukuran halus, ke dalam pelarut yang sesuai di dalam suatu wadah, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama jangka waktu tertentu. Pengadukan dilakukan secara berkala guna mempercepat proses penyarian senyawa. Untuk memperoleh rendemen yang lebih tinggi, proses

maserasi dapat diulangi dua hingga tiga kali dengan memanfaatkan ampas bahan dari hasil ekstraksi tahap sebelumnya.

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 terikut dengan pelarut dan mengalir keluar dari bejana untuk ditampung.

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. Untuk itu, pemilihan jenis pelarut memegang peranan sangat penting di sini. Perkolasi juga memungkinkan untuk diaplikasikan pada skala yang lebih besar, seperti pada industri. Jika menginginkan proses yang lebih efisien dengan rendemen yang lebih tinggi, maka penggunaan pelarut panas juga dimungkinkan asalkan tidak merusak senyawa, terutama senyawa yang labil pada suhu tinggi (*thermolabile*).

Terdapat beberapa kelemahan mendasar dari metode perkolasi. Kelemahan pertama adalah volume pelarut yang dibutuhkan tentu lebih banyak, karena dilakukan secara kontinyu dan tanpa adanya waktu kontak yang lama. Selain itu,

karena sampel bahan dipak pada bejana perkolator, maka ada kemungkinan packing tersebut tidak homogen, ada bagian yang padat tetapi ada juga yang kurang padat. Sudah tentu pada bagian padat akan lebih sulit bagi pelarut untuk melewatinya sehingga kemungkinan senyawa metabolit yang tertinggal pada bagian itu menjadi cukup tinggi. Kelemahan lain yang perlu diatasi adalah masalah sumbatan pada perkolator yang disebabkan terlarutnya beberapa jenis resin yang menggumpal serta sifat bahan tanaman yang mudah hancur dan larut sehingga menyumbat perkolator.

3. 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.

Metode ini memungkinkan penghematan penggunaan pelarut, karena proses ekstraksi berlangsung secara berkelanjutan. Selain itu, rendemen ekstrak yang dihasilkan lebih tinggi, karena ekstraksi dilakukan pada suhu tinggi, yang mempercepat kerusakan sel dan jaringan tumbuhan serta mempercepat pelarutan senyawa. Namun, kelemahan metode ini adalah penggunaan suhu tinggi yang dapat menyebabkan degradasi senyawa yang tidak stabil pada temperatur tinggi. Selain itu, proses pemanasan dan pendinginan pada kondensor memerlukan energi lebih besar, sehingga meningkatkan biaya

4. Soxhlet

Ekstraksi dengan metode Soxhlet merupakan salah satu metode yang paling sering digunakan karena tingkat kepraktisan dan kenyamanannya. Prinsip dasar dari ekstraksi ini adalah dengan mengekstrak bahan yang telah dihaluskan dan dibungkus dalam kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam alat Soxhlet

yang sudah berisi pelarut dalam labu Soxhlet yang terletak di bagian bawah alat. Tepat di bawah labu, dipasang sebuah pemanas, seperti *heating mantle* atau *hot plate*, untuk memanaskan labu tersebut. Ketika dipanaskan, pelarut dalam labu akan menguap dan terkondensasi kembali berkat sistem pendingin di bagian atas alat. Pelarut cair yang terkompresi ini kemudian akan menyiram dan merendam bahan dalam kertas saring. Proses ini memungkinkan pelarut untuk mengekstrak senyawa metabolit dari bahan tersebut. Setelah beberapa saat, volume larutan ekstrak akan mencapai jumlah tertentu, dan mekanisme Soxhlet akan memompakan larutan tersebut ke bawah menuju labu. Pada saat yang sama, larutan akan menguap lagi, meninggalkan ekstrak di labu dan hanya pelarut yang menguap kembali untuk dikondensasi. Proses ini berlangsung secara berkelanjutan, sehingga bahan terus-menerus terpapar efek mekanik dan kimia pelarut, yang mempercepat dan meningkatkan efisiensi ekstraksi.

5. Ultrasonikasi

Metode Ultrasonikasi merupakan pengembangan dari metode maserasi. Pada maserasi bahan dimasukkan pada labu atau bejana dan kemudian proses ekstraksi dipercepat dengan pengadukan, maka pada metode ini proses pengadukan digantikan dengan pemberian gelombang ultrasonik, yaitu gelombang suara yang memiliki frekuensi yang tinggi (20.000 Hz), frekuensi di atas ambang batas kemampuan telinga manusia menangkap gelombang suara. Gelombang ultrasonik tersebut menghasilkan getaran dengan intensitas tinggi yang menimbulkan tekanan mekanis pada sel dan jaringan bahan. Kerusakan struktur

sel akibat getaran tersebut mempercepat pelepasan serta kelarutan senyawa metabolit, sehingga dapat meningkatkan rendemen ekstrak yang dihasilkan.

2.5 Metode Pengujian Aktivitas Sitotoksik

2.5.1 Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan metode untuk mengukur toksisitas atau sitotoksik suatu senyawa dari ekstrak tanaman menggunakan larva udang *Artemia salina*. 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. 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 *Artemia 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)

2.5.2 Metode perhitungan langsung (*direct counting*)

Metode perhitungan langsung merupakan pengujian yang dilakukan secara manual dengan menghitung jumlah sel yang masih hidup kemudian membandingkannya dengan jumlah sel normal, menggunakan pewarna biru tripan yang dapat membedakan sel hidup dan sel mati. Sel yang mati cenderung menyerap pewarna biru tripan akibat terjadinya kerusakan pada membran sel. Kerusakan membran tersebut menyebabkan terjadinya kebocoran, sehingga protein dan komponen sel keluar dan berikatan dengan pewarna biru tripan. Sebaliknya, sel yang masih hidup tidak menyerap pewarna tersebut karena membran selnya tetap utuh dan tidak memungkinkan masuknya pewarna. Perhitungan jumlah sel hidup dilakukan secara langsung menggunakan haemocytometer, yaitu alat khusus untuk menghitung jumlah sel dalam sampel cair dengan bantuan mikroskop. Melalui metode ini, dapat diperoleh informasi yang lebih akurat mengenai jumlah sel yang bertahan hidup serta perbandingan dampak toksisitas dari berbagai substansi yang diuji. Metode ini memberikan gambaran yang jelas mengenai tingkat kerusakan sel dan potensinya dalam menyebabkan kematian sel, yang penting dalam penelitian biomedis dan pengembangan obat (Djajanegara, 2008).

2.5.3 Metode *MTT assay*

MTT assay adalah metode yang digunakan untuk menilai tingkat sitotoksitas, yaitu kemampuan suatu bahan dalam membunuh sel. Metode ini memungkinkan peneliti untuk menentukan jumlah sel yang tetap hidup setelah

diberi perlakuan sampel. Penilaian dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi menggunakan alat pembaca ELISA. Sel yang masih hidup dapat terdeteksi melalui perubahan warna yang terjadi setelah penambahan reagen MTT. Prinsip utama MTT assay didasarkan pada aktivitas enzim dehidrogenase di dalam mitokondria sel hidup yang mampu mereduksi cincin tetrazol pada reagen MTT. Proses reduksi tersebut menyebabkan warna reagen yang awalnya kuning berubah menjadi kristal ungu yang dikenal sebagai formazan. Kristal formazan ini dapat dilarutkan dalam pelarut seperti dimetil sulfoksida (DMSO) atau pelarut organik lainnya. Jumlah kristal ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah serta tingkat aktivitas sel yang masih hidup. Dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu, dapat diketahui jumlah sel yang hidup dan tingkat aktivitasnya setelah perlakuan sampel. Metode ini sangat bermanfaat untuk mengevaluasi efek toksik berbagai bahan terhadap sel (Renggana *et al.*, 2022).

2.6 Identifikasi LC-MS/MS (*Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*)

Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) merupakan salah satu teknik analisis instrumental yang menggabungkan kemampuan pemisahan senyawa menggunakan kromatografi cair (*Liquid Chromatography/LC*) dengan kemampuan identifikasi dan kuantifikasi menggunakan spektrometri massa tandem (*Tandem Mass Spectrometry/MS-MS*). Kombinasi kedua teknik tersebut menghasilkan metode analisis yang memiliki sensitivitas, selektivitas, dan akurasi yang sangat tinggi sehingga banyak digunakan dalam bidang farmasi, bioanalitik, toksikologi, analisis klinis,

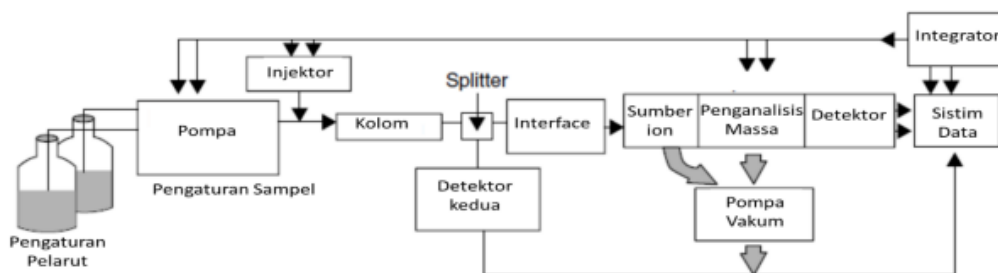
keamanan pangan, serta analisis lingkungan. Dibandingkan dengan metode kromatografi konvensional, LC-MS/MS mampu menganalisis senyawa yang bersifat polar, tidak mudah menguap (non-volatil), memiliki berat molekul relatif besar, dan bersifat termolabil tanpa memerlukan proses derivatisasi terlebih dahulu.

Prinsip kerja LC-MS/MS diawali dengan proses pemisahan analit menggunakan sistem kromatografi cair. Sampel yang telah dipersiapkan diinjeksikan ke dalam sistem kemudian dibawa oleh fase gerak melewati kolom kromatografi. Selama melewati kolom, setiap komponen dalam sampel akan mengalami interaksi yang berbeda dengan fase diam sehingga menghasilkan waktu retensi (*retention time*) yang berbeda-beda. Perbedaan waktu retensi tersebut menyebabkan komponen sampel keluar dari kolom secara terpisah sehingga memudahkan proses identifikasi pada tahap berikutnya. Setelah keluar dari kolom, analit dialirkan menuju interface ionisasi untuk diubah menjadi ion fase gas sebelum memasuki spektrometer massa.

Pada sistem *tandem mass spectrometry*, ion yang terbentuk pertama kali masuk ke spektrometer massa pertama (MS1). Bagian ini berfungsi memilih ion berdasarkan rasio massa terhadap muatan (*mass-to-charge ratio* atau m/z) sehingga hanya ion prekursor (*precursor ion* atau *parent ion*) tertentu yang diteruskan menuju *collision cell*. Di dalam *collision cell*, ion prekursor mengalami tumbukan dengan gas inert, seperti nitrogen atau argon, yang menyebabkan terjadinya proses *collision-induced dissociation* (CID). Proses ini menghasilkan ion-ion fragmen yang disebut ion produk (*product ion* atau *daughter ion*). Ion produk kemudian

dianalisis kembali oleh spektrometer massa kedua (MS2) sehingga dihasilkan spektrum massa yang khas untuk setiap senyawa. Kombinasi waktu retensi, massa ion prekursor, dan pola fragmentasi menghasilkan identifikasi analit yang sangat spesifik sehingga kemungkinan terjadinya interferensi dari komponen matriks menjadi lebih kecil.

Instrumen LC-MS/MS terdiri atas beberapa komponen utama yang saling terintegrasi. Bagian pertama adalah sistem kromatografi cair yang meliputi reservoir fase gerak, pompa bertekanan tinggi, degasser, autosampler atau injector, kolom kromatografi, dan oven kolom. Reservoir digunakan sebagai tempat penyimpanan fase gerak, sedangkan pompa berfungsi mengalirkan fase gerak secara konstan dengan tekanan tinggi. Autosampler memungkinkan injeksi sampel dilakukan secara otomatis sehingga meningkatkan ketelitian dan reproduksibilitas analisis. Kolom kromatografi merupakan tempat terjadinya pemisahan analit berdasarkan interaksi antara fase diam dan fase gerak. Kolom fase terbalik berbasis silika C18 merupakan kolom yang paling banyak digunakan dalam LCMS/MS karena mampu memisahkan berbagai senyawa nonpolar hingga semipolar dengan efisiensi yang tinggi. Selain kolom C18, tersedia pula kolom C8, fenil, amino, sianopropil, penukar ion, kolom berbasis polimer, dan kolom berbasis zirkonium yang dipilih sesuai karakteristik analit. Kolom zirkonium memiliki keunggulan berupa stabilitas pada rentang pH yang luas (sekitar pH 1–11) serta ketahanan terhadap suhu tinggi sehingga sesuai digunakan pada pemisahan campuran yang kompleks.



Gambar 5. Diagram Skema LC-MS/MS

Sumber: (Harmita *et al.*, 2019)

Setelah proses pemisahan, analit memasuki sumber ionisasi (ion source). Sumber ionisasi merupakan bagian yang sangat penting karena berfungsi mengubah molekul netral dalam fase cair menjadi ion fase gas yang dapat dianalisis oleh spektrometer massa. Teknik ionisasi yang paling banyak digunakan pada LCMS/MS adalah *Electrospray Ionization* (ESI). Pada teknik ini, larutan analit disemprotkan melalui kapiler yang diberi tegangan tinggi sehingga membentuk tetesan-tetesan kecil bermuatan (*charged droplets*). Pelarut kemudian menguap akibat bantuan gas panas hingga menghasilkan ion bebas yang masuk ke spektrometer massa. Teknik ESI sangat sesuai untuk analisis senyawa polar, biomolekul, peptida, protein, metabolit, dan berbagai senyawa farmasi karena proses ionisasinya berlangsung secara lembut (*soft ionization*) sehingga tidak banyak menyebabkan fragmentasi molekul. Selain ESI, terdapat pula *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) yang lebih sesuai untuk senyawa dengan kepolaran rendah hingga sedang, *Atmospheric Pressure Photoionization* (APPI) untuk senyawa yang sulit terionisasi menggunakan ESI maupun APCI, serta

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) yang umumnya digunakan untuk analisis protein dan biomolekul dengan massa molekul besar.

Ion yang dihasilkan selanjutnya difokuskan oleh sistem lensa elektrostatik menuju *mass analyzer*. Analyzer berfungsi memisahkan ion berdasarkan nilai m/z . Pada LC-MS/MS, dua analyzer dipisahkan oleh *collision cell* sehingga memungkinkan proses seleksi ion prekursor dan pembentukan ion produk berlangsung secara berurutan. Setelah melewati analyzer kedua, ion diterima oleh detektor dan diubah menjadi sinyal listrik. Sinyal tersebut kemudian diolah menggunakan perangkat lunak komputer menjadi kromatogram dan spektrum massa. Komputer tidak hanya digunakan untuk akuisisi data, tetapi juga untuk mengendalikan seluruh sistem instrumen, menghitung luas area puncak, menentukan berat molekul, mengidentifikasi senyawa berdasarkan pola fragmentasi, serta membandingkan hasil analisis dengan pustaka spektrum yang tersedia.

Dalam analisis kuantitatif, LC-MS/MS umumnya dioperasikan menggunakan mode *Selected Reaction Monitoring* (SRM) atau *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Pada mode SRM hanya satu transisi ion prekursor menuju satu ion produk yang dipantau sehingga analisis menjadi sangat spesifik. Sementara itu, pada mode MRM beberapa transisi ion dapat diamati secara bersamaan dalam satu kali analisis. Mode MRM merupakan mode yang paling banyak digunakan dalam analisis bioanalitik karena memiliki sensitivitas tinggi, mampu meminimalkan gangguan matriks, serta memungkinkan analisis beberapa senyawa sekaligus dalam waktu yang relatif singkat. Dengan demikian, metode

ini sangat sesuai untuk penetapan kadar obat dalam plasma, studi farmakokinetika, uji bioekuivalensi, analisis metabolit, maupun pengujian residu obat pada berbagai matriks biologis.

Keunggulan utama LC-MS/MS terletak pada sensitivitas dan selektivitasnya yang sangat tinggi. Teknik ini mampu mendeteksi analit hingga kadar jejak (*trace level*) dengan ketelitian yang baik. Selain itu, kombinasi pemisahan kromatografi dan identifikasi berdasarkan pola fragmentasi menghasilkan spesifisitas yang tinggi sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya kesalahan identifikasi. LC-MS/MS juga memiliki waktu analisis yang relatif singkat, membutuhkan volume sampel yang kecil, serta mampu menganalisis berbagai senyawa dengan sifat fisikokimia yang berbeda. Penggunaan sistem UHPLC semakin meningkatkan efisiensi pemisahan melalui penggunaan kolom berukuran partikel kecil dan tekanan operasi yang tinggi sehingga resolusi kromatografi menjadi lebih baik dan waktu analisis lebih cepat.

Meskipun memiliki banyak keunggulan, LC-MS/MS juga memiliki beberapa keterbatasan. Instrumen ini memerlukan biaya investasi, operasional, dan pemeliharaan yang tinggi. Pengoperasiannya membutuhkan analis yang memiliki kompetensi khusus karena setiap parameter analisis harus dioptimasi sesuai karakteristik analit. Selain itu, adanya efek matriks (*matrix effect*) dapat memengaruhi efisiensi ionisasi sehingga menyebabkan peningkatan atau penurunan respons analit pada detektor. Oleh karena itu, metode LC-MS/MS harus divalidasi sebelum digunakan secara rutin. Parameter validasi meliputi selektivitas, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi (*Limit of Detection/LOD*),

batas kuantifikasi (*Limit of Quantification/LOQ*), *robustness*, *ruggedness*, dan evaluasi efek matriks untuk memastikan bahwa metode tersebut sesuai dengan tujuan penggunaannya (Harmita *et al.*, 2019).

