

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)

*Turbinaria ornata* adalah salah satu jenis alga coklat yang umum ditemukan di perairan tropis. Alga ini mengandung senyawa bioaktif, seperti polisakarida sulfat, flavonoid, dan terpenoid, yang memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk antikanker, antimikroba, dan antiinflamasi (Radhika et al., 2012).

Selain itu, alga coklat sering menjadi habitat mikroorganisme endofit, termasuk jamur, yang dapat menghasilkan metabolit sekunder dengan potensi biologis yang tinggi. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme ini sering kali lebih kuat dibandingkan senyawa yang diekstraksi langsung dari alga (Silva et al., 2015). Alga ini telah menjadi subjek penelitian yang luas untuk eksplorasi sumber senyawa antikanker alami.

##### 2.1.1 Klasifikasi Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)



**Gambar 1.** Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)

Klasifikasi dari alga coklat (*Turbinaria ornata*) termasuk ke dalam:

Kingdom : Chromista

Filum : Heterokontophyta

Kelas : Phaeophyceae

Ordo : Fucales

Family : Sargassaceae

Genus : *Turbinaria*

Spesies : *Turbinaria ornata* (Turner) (J.Argardh ,1848)

### **2.1.2 Morfologi Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)**

#### **3.2.2.1 *Thallus***

Tubuh *Turbinaria ornata* berbentuk talus yang bercabang dengan tekstur kasar dan keras. Tingginya dapat mencapai 20–50 cm, tergantung pada kondisi lingkungan seperti intensitas cahaya dan nutrisi (Radhika et al., 2012).

#### **3.2.2.2 Paku Daun**

Talus utama memiliki cabang berbentuk paku daun (phylloids) yang kaku dan berkerut di tepinya. Phylloids ini memiliki ujung meruncing dan sering kali mengandung vesikula udara kecil untuk membantu mengapung di air (Mayer et al., 2011).

#### **3.2.2.3 Warna**

Warna talus bervariasi dari coklat gelap hingga keemasan, tergantung pada kandungan pigmen fukosantin dan kondisi habitatnya.

#### **3.2.2.4 Holdfast**

Talus dilengkapi dengan holdfast yang kuat, berbentuk seperti cakram, yang berfungsi untuk menempel pada substrat keras seperti batu karang atau dasar laut (Silva et al., 2015).

#### **3.2.2.5 Reproduksi**

*Turbinaria ornata* bereproduksi secara seksual melalui gamet dan aseksual melalui fragmentasi talus. Struktur reproduktif berupa konseptakel kecil yang terletak pada phylloids (Radhika et al., 2012).

#### **2.1.3 Kandungan Kimia Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)**

Secara kimia, *Turbinaria ornata* mengandung polisakarida sulfat, terutama fucoidan, yang memiliki aktivitas antioksidan, antikoagulan, dan imunomodulator (Wijesinghe & Jeon, 2012). Selain itu, alga ini juga mengandung alginat, yaitu polisakarida struktural yang banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi dan makanan sebagai agen pengental atau pembentuk gel (Rioux et al., 2007).

Kandungan polifenol pada *Turbinaria ornata* berperan sebagai antioksidan alami yang dapat menangkal radikal bebas, sedangkan senyawa terpenoid dan flavonoid di dalamnya menunjukkan aktivitas antibakteri dan antiinflamasi (Samarakoon & Jeon, 2012).

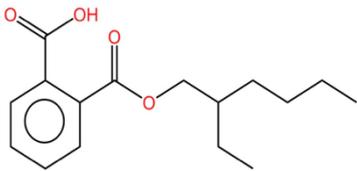
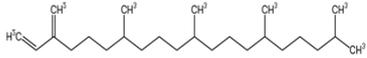
Selain metabolit sekunder, *Turbinaria ornata* juga mengandung sejumlah mineral seperti kalsium, magnesium, dan yodium yang mendukung manfaatnya sebagai sumber nutrisi laut. Pigmen seperti

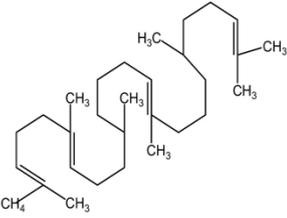
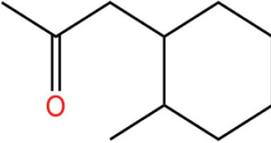
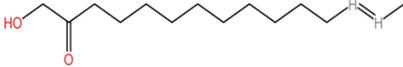
fucoxanthin, yaitu karotenoid utama pada alga coklat, juga ditemukan dalam alga ini dan berkontribusi terhadap sifat antioksidannya (Peng et al., 2011).

#### 2.1.4 Kandungan Bioaktif Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)

*Turbinaria ornata* merupakan alga coklat yang diketahui memiliki berbagai bioaktivitas berkat kandungan senyawa bioaktif seperti fucoidan, flavonoid, polifenol, dan terpenoid. Ekstrak alga ini memiliki aktivitas antioksidan yang kuat karena kandungan polifenol dan pigmen fucoxanthin yang mampu menangkal radikal bebas dan mencegah stres oksidatif (Zubia et al., 2008).

**Tabel 1.** Kandungan Bioaktif Alga Coklat (*Turbinaria ornata*)

Senyawa Bioaktif	Struktur	Aktivitas	Referensi
1,2 <i>benzenedicarboxylic acid, mono (2 ethylhexyl) ester</i>		Antikanker	Deepak et al., 2017
<i>neophytadiene</i>		Antikanker	Rajkumar, G., 2017

<i>squalene</i>		Antikanker	Rajkumar, G., 2017
<i>Cyclohexene,1,5,5-trimethyl-6-acetylmethyl</i>		Antikanker	Alwaleed, et, al., 2024
<i>16-Octadecenoic acid</i>		Antikanker	Alwaleed, et, al., 2024

## 2.2 Jamur Endofit

### 2.2.1 Pengertian Jamur Endofit

Jamur endofit merupakan kelompok mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tumbuhan secara simbiotik tanpa menimbulkan gejala penyakit pada inangnya. Jamur ini dapat ditemukan di hampir semua bagian tumbuhan, seperti daun, batang, dan akar (Arnold et al., 2003). Interaksi antara jamur endofit dan tanaman inang bersifat mutualisme, di mana jamur memperoleh nutrisi dari tanaman, sementara tanaman mendapatkan perlindungan terhadap patogen atau stres lingkungan.

Selain perannya dalam ekologi tumbuhan, jamur endofit juga dikenal sebagai penghasil berbagai senyawa bioaktif yang memiliki potensi farmakologis, seperti senyawa antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker (Strobel & Daisy, 2003).

### **2.2.2 Hubungan Jamur Endofit dengan Inangnya**

Jamur endofit hidup di dalam jaringan tumbuhan inang tanpa menyebabkan gejala penyakit. Hubungan antara jamur endofit dan tumbuhan inangnya umumnya bersifat mutualistik, di mana kedua pihak saling mendapatkan manfaat. Jamur memperoleh tempat hidup dan nutrisi dari tumbuhan, sedangkan tumbuhan mendapatkan perlindungan dari patogen, peningkatan toleransi terhadap stres abiotik (seperti kekeringan atau logam berat), serta produksi metabolit sekunder yang bermanfaat (Rodriguez et al., 2009). Beberapa jamur endofit bahkan dapat merangsang pertumbuhan tanaman melalui produksi fitohormon seperti auksin dan giberelin. Selain itu, mereka juga dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap serangan hama atau infeksi melalui induksi resistensi sistemik (Arnold et al., 2003).

### **2.2.3 Jamur Endofit Yang Memiliki Aktivitas Antikanker**

Jamur endofit adalah jamur yang hidup di dalam jaringan tumbuhan tanpa menyebabkan penyakit. Beberapa jamur endofit diketahui mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antikanker. Senyawa ini dapat bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan sel

kanker, memicu kematian sel kanker (apoptosis), dan mencegah pembentukan pembuluh darah baru yang dibutuhkan oleh tumor (Strobel & Daisy, 2003). Contohnya adalah jamur *Taxomyces andreanae*, yang hidup di pohon *Taxus brevifolia* dan mampu menghasilkan paklitaksel (taxol), yaitu obat yang digunakan untuk mengobati kanker payudara dan kanker ovarium (Stierle et al., 1993). Selain itu, jamur endofit lain seperti *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, dan *Colletotrichum* juga dilaporkan menghasilkan senyawa antikanker yang potensial. Oleh karena itu, jamur endofit dianggap sebagai sumber alami yang menjanjikan untuk pengembangan obat kanker di masa depan.

#### **2.2.4 Identifikasi jamur endofit**

Identifikasi jamur endofit dilakukan untuk mengetahui jenis jamur yang hidup di dalam jaringan tumbuhan. Langkah awal biasanya dimulai dengan isolasi, yaitu menanam bagian tumbuhan (seperti daun, batang, atau akar) yang telah disterilkan pada media seperti PDA (*Potato Dextrose Agar*). Setelah jamur tumbuh, dilakukan identifikasi morfologi, misalnya dengan melihat bentuk koloni, warna, dan bentuk spora di bawah mikroskop (Schulz et al., 1993).

Untuk hasil yang lebih akurat, digunakan identifikasi molekuler dengan melihat bagian DNA jamur, terutama pada gen ITS (Internal Transcribed Spacer). DNA jamur diperbanyak dengan metode PCR, lalu dibandingkan dengan data di database seperti GenBank (White et al., 1990).

## **2.3 Kanker**

### **2.3.1 Definisi Kanker**

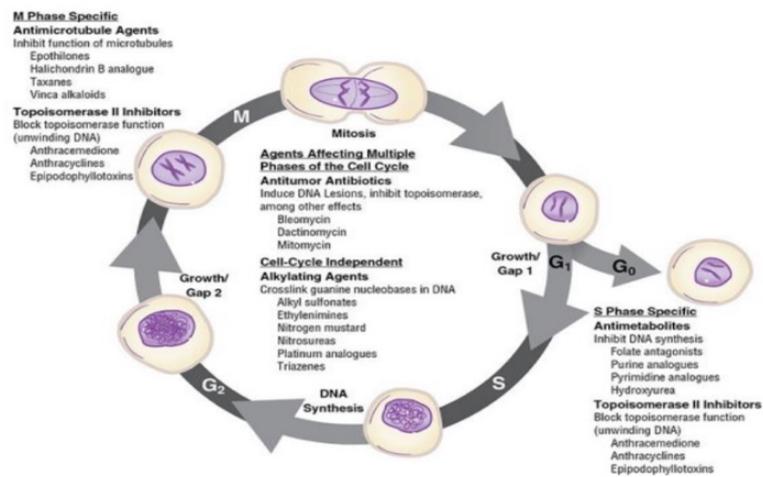
Kanker merupakan penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan sel abnormal yang tidak terkendali dan dapat menyebar ke jaringan sekitarnya maupun ke organ lain melalui aliran darah atau sistem limfatik. Sel-sel kanker kehilangan mekanisme pengaturan pertumbuhan normal dan cenderung membelah secara terus-menerus, sehingga membentuk massa atau tumor (WHO, 2022). Tidak semua tumor bersifat kanker, namun tumor ganas memiliki kemampuan untuk bermetastasis atau menyebar ke bagian tubuh lain (American Cancer Society, 2022).

### **2.3.2 Patofisiologi Kanker**

Sel kanker terbentuk akibat gangguan pada proses pembelahan dan pengendalian siklus sel. Proses ini dimulai dari fase M (mitosis), ketika sel membelah diri menjadi dua sel anak. Pada kondisi normal, tubuh mengatur pembelahan ini melalui mekanisme pengawasan sel. Setelah fase M, sel memasuki fase G1, yaitu fase pertumbuhan awal, di mana sel mempersiapkan diri untuk menggandakan DNA. Jika terdapat kerusakan DNA, tubuh seharusnya memperbaikinya pada fase ini. Namun, pada kondisi kanker, kerusakan tersebut sering tidak dikenali, sehingga mutasi tetap terbawa ke fase berikutnya.

Selanjutnya, sel memasuki fase S, yaitu fase sintesis, di mana DNA digandakan atau direplikasi. Mutasi yang tidak diperbaiki akan disalin

menjadi dua, sehingga selanjutnya diwariskan ke sel anak. Kemudian, sel melanjutkan ke fase G<sub>2</sub>, yaitu fase pertumbuhan lanjutan, di mana sel mempersiapkan diri untuk kembali membelah. Pada fase ini, sel seharusnya memeriksa ulang hasil replikasi DNA. Namun, jika pengawasan tidak berjalan dengan baik, maka sel yang rusak akan terus membelah. Proses ini menyebabkan terbentuknya sel kanker, yaitu sel yang terus membelah tanpa kendali dan membawa kerusakan genetik (Dipiro et al., 2021).



**Gambar 2.** Siklus Sel Kanker

### 2.3.3 Mekanisme Kerja Senyawa Antikanker dari Jamur Endofit

Mekanisme kerja antikanker dari metabolit jamur endofit dapat meliputi beberapa jalur berikut:

#### 1. Induksi Apoptosis

Jamur endofit menghasilkan senyawa yang dapat mengaktifkan jalur apoptosis intrinsik maupun ekstrinsik. Aktivasi caspase-3, peningkatan

ekspresi Bax, serta penurunan ekspresi Bcl-2 menyebabkan terjadinya kematian sel terprogram pada sel kanker (Fulda & Debatin, 2006).

## 2. Penghambatan Siklus Sel

Beberapa senyawa endofitik dapat menyebabkan penghentian siklus sel pada fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, atau G<sub>2</sub>/M. Misalnya, camptothecin menghambat enzim topoisomerase I, yang penting dalam replikasi DNA, sehingga menghalangi pembelahan sel kanker (Pommier, 2006).

## 3. Inhibisi Angiogenesis

Senyawa dari jamur endofit mampu menurunkan ekspresi faktor pertumbuhan pembuluh darah seperti VEGF, sehingga menghambat pembentukan vaskularisasi baru yang diperlukan untuk pertumbuhan tumor (Carmeliet & Jain, 2011).

## 4. Induksi Stres Oksidatif

Jamur endofit juga dapat meningkatkan produksi Reactive Oxygen Species (ROS) di dalam sel kanker. Akumulasi ROS menyebabkan kerusakan oksidatif pada membran, protein, dan DNA, yang akhirnya memicu kematian sel kanker (Trachootham et al., 2009).

## 5. Imunomodulasi

Beberapa metabolit jamur endofit dapat memperkuat sistem imun, meningkatkan aktivitas sel NK (Natural Killer) dan makrofag dalam mengenali serta menghancurkan sel kanker (Song et al., 2014).

## **2.4 Ekstraksi**

### **2.4.1 Definisi Ekstraksi**

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 Jenis-Jenis 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 (termolabile). 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 haswahnya. 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 perkulator. 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 a perkolasi. Reflux berarti pelarut yang diputar kembali mau di-recycle secara kontinyu melalui pungkondensasian berilang pada sebuah alat kondensor. Pada metode ini bahan yang akan diekstrak direndan pada pelarut dalam sebuah bejanalabu yang biasanya berbentuk bulat yang kemudian ditempatkan pada sebuah pemanas (dapat menggunakan water bath, heating mantle, atin hot plate) Bagian atas labu nda 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 selembur kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam alat soxhlet yang sebelumnya telah ditempatkan pelarut pada labu soxhlet yang berada di bagian bawah.

Persis di bawah tahu soxhlet tersebut ditempatkan chsua heating mantle atau hot plate untuk memanaskan labu Soxhlet.

Ketika wixhlet dipanaskan, maka pelarut pada labu soxhlet akan menguap dan terkondensasi kembali karena adanya sistens pendingin (kondensasi) pada Baglan atas, sehingga mencair kembali dengan menyinum dan merendan bahan dalam bungkus kertas saring tadi. Akibatnya adalah pelarut tersebut akan mengekstrak bahar/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 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 *Artemia salina* setelah diberi ekstrak dan diinkubasi selama 24 jam, dengan hasil dihitung sebagai nilai LC<sub>50</sub>, 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 dkk., 2013).

### **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 reprodutifitas 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 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 hiru tripan. Penghitungan sel hidup dilakukan menggunakan baemocytometer (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 lenah (Meiyanto, 1999).

## **2.6 Kromatografi Lapis Tipis (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, dkk., 2023). 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, dkk., 2023).

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).

Sedangkan beberapa kerugia 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

Uji fitokimia dilakukan untuk mendeteksi secara kualitatif keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan triterpenoid dalam ekstrak tumbuhan. Uji ini menggunakan pereaksi kimia spesifik yang menghasilkan perubahan warna atau endapan sebagai indikasi adanya senyawa tertentu (Harborne, 1987).

Beberapa kelompok senyawa fitokimia yang diharapkan terdapat dalam ekstrak *Turbinaria ornata* antara lain:

1. Alkaloid: Dideteksi menggunakan reagen Dragendorff atau Mayer.  
Alkaloid berpotensi berperan sebagai antimikroba dan sitotoksik.
2. Flavonoid: Diperiksa menggunakan serbuk magnesium dan HCl pekat, yang menunjukkan perubahan warna merah atau oranye.

3. Saponin: Uji buih dilakukan untuk mendeteksi saponin, yang berperan dalam meningkatkan permeabilitas membran sel.
4. Steroid dan Terpenoid: Diuji menggunakan reaksi Liebermann–Burchard dengan indikator perubahan warna hijau kebiruan.
5. Fenolik dan Tanin: Dideteksi menggunakan larutan  $\text{FeCl}_3$ , yang memberikan warna biru tua atau hijau gelap.
6. Polisakarida Sulfat: Pada alga, khususnya *Turbinaria ornata*, polisakarida sulfat seperti fukoidan dapat diuji dengan metode toluidin blue yang menunjukkan pewarnaan khas (Li et al., 2008).