

Profil Metabolit Infusa Buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) Berdasarkan Analisis LC-MS serta Uji Toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach

Rahma Diyan Martha^{1*}, Choirul Huda², Dira Tarica Putri³, Danar⁴

^{1,2,3}Farmasi, STIKes Karya Putra Bangsa, Jln. Tulungagung-Blitar 04 Sumberdadi Sumbergempol Kota
Tulungagung Indonesia 66291

⁴Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Malang, Jln. Semarang 05 Sumbersari Lowokwaru Kota
Malang Indonesia 65145

***Email korespondensi:** rahmadiyan@stikes-kartrasa.ac.id

Received: 27 05 2026 – Revised: 29 07 2026 - Accepted: 04 08 2026 - Published: 05 08 2026

Abstrak. Kanker merupakan penyakit yang ditandai oleh proliferasi sel yang tidak terkendali akibat gangguan regulasi siklus sel. Pengembangan senyawa antikanker berbasis bahan alam menjadi salah satu alternatif untuk memperoleh terapi yang lebih aman dan efektif. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi metabolit sekunder pada infusa daging buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) menggunakan Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS/MS) serta mengevaluasi potensi sitotoksiknya dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan infusa daging buah Majapahit yang diperoleh melalui metode infundasi. Hasil analisis LC-MS/MS mengidentifikasi 101 senyawa metabolit, dengan senyawa dominan dari golongan flavonoid yaitu kaempferol-3-O-rhamnoside (3,29479%) dan hesperidin (3,18572%). Uji sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 675,46 ppm, yang menunjukkan bahwa infusa daging buah Majapahit tergolong toksik ($LC_{50} < 1000$ ppm) dan berpotensi sebagai kandidat antikanker pada tahap skrining awal. Temuan ini menunjukkan bahwa infusa daging buah Majapahit merupakan sumber metabolit sekunder yang berpotensi dikembangkan sebagai bahan baku obat antikanker berbasis bahan alam. Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengonfirmasi aktivitas sitotoksik melalui uji in vitro pada kultur sel kanker dan uji in vivo guna memastikan efektivitas serta keamanannya.

Kata kunci: Antikanker ; Buah Majapahit ; LCMS; BSLT

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara megabiodiversitas terbesar di dunia yang memiliki kekayaan sumber daya hayati sangat melimpah. Sebagai negara dengan kawasan hutan tropis terbesar setelah Brasil dan Republik Demokratik Kongo, Indonesia memiliki potensi besar dalam pengembangan obat berbasis bahan alam. Diperkirakan sekitar 1.260 spesies tumbuhan di Indonesia berpotensi dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Keanekaragaman hayati tersebut menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, tanin, saponin, dan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas biologis tinggi sebagai antioksidan, antimikroba, antiinflamasi, antidiabetes, hingga antikanker (Yuhernita et al., 2011).

Salah satu kelompok metabolit sekunder yang banyak mendapat perhatian dalam penelitian farmasi adalah flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa golongan polifenol yang tersebar luas pada berbagai bagian tumbuhan dan berperan sebagai sistem pertahanan

alami tanaman terhadap cekaman lingkungan. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa flavonoid memiliki aktivitas biologis yang sangat beragam, antara lain sebagai antioksidan, antivirus, antiinflamasi, imunomodulator, dan antikanker. Senyawa flavonoid seperti quercetin, genistein, hesperidin, kaempferol-3-O-rhamnoside, dan flavopiridol diketahui mampu menghambat pertumbuhan sel kanker melalui berbagai mekanisme, seperti menghambat angiogenesis, menginduksi apoptosis, menghambat proliferasi sel, serta menghambat pembentukan metastasis (Ravishankar et al., 2013) (Firjatillah et al., 2020). Oleh karena itu, eksplorasi tanaman yang mengandung flavonoid menjadi salah satu pendekatan yang menjanjikan dalam penemuan kandidat obat antikanker berbasis bahan alam.

Kanker hingga saat ini masih menjadi salah satu penyebab utama kematian di dunia. Penyakit ini terjadi akibat perubahan genetik pada sel yang menyebabkan hilangnya kontrol terhadap siklus pembelahan sel sehingga sel mengalami proliferasi secara tidak terkendali. Perkembangan kanker dipengaruhi oleh berbagai faktor, baik genetik maupun lingkungan, yang mengakibatkan sel kehilangan kemampuan apoptosis dan terus berkembang menjadi jaringan ganas (Parwata, 2014). Meskipun berbagai metode terapi seperti pembedahan, radioterapi, kemoterapi, terapi target, dan imunoterapi telah berkembang pesat, pengobatan kanker masih menghadapi berbagai kendala seperti resistensi obat, efek samping yang tinggi, biaya pengobatan yang mahal, serta penurunan kualitas hidup pasien. Kondisi tersebut mendorong perlunya eksplorasi sumber bahan alam yang berpotensi menghasilkan senyawa antikanker yang lebih aman dan efektif.

Salah satu tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai sumber senyawa antikanker adalah tanaman majapahit (*Crescentia cujete* L.). Tanaman yang termasuk dalam famili Bignoniaceae ini berasal dari Amerika tropis dan telah banyak tumbuh di berbagai wilayah Indonesia. Secara empiris masyarakat memanfaatkan buah, daun, maupun kulit batang tanaman majapahit sebagai obat tradisional untuk mengatasi hipertensi, diare, gangguan pencernaan, luka, serta beberapa penyakit lainnya (Widyaningrum, 2011). Meskipun telah lama dimanfaatkan secara tradisional, pemanfaatannya sebagai sumber kandidat obat antikanker masih belum banyak dikembangkan.

Berbagai penelitian fitokimia menunjukkan bahwa buah majapahit mengandung senyawa fenol, flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, kardenolida, antrakuinon, dan berbagai metabolit sekunder lainnya. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas

antioksidan dan sitotoksik yang berpotensi menghambat pertumbuhan sel kanker. Flavonoid, saponin, tanin, dan senyawa fenolik pada buah Majapahit dilaporkan memiliki aktivitas antikanker dengan tingkat toksisitas yang relatif lebih rendah dibandingkan obat kemoterapi konvensional (Ejelonu et al., 2011). Selain itu, flavonoid juga diketahui mempunyai aktivitas sebagai antioksidan, antiinflamasi, antivirus, antidiabetes, kardioprotektif, serta antikanker sehingga berpotensi dikembangkan sebagai bahan baku obat herbal maupun fitofarmaka (Qinghu et al., 2016) (Marzouk, 2016).

Berbagai penelitian terdahulu telah mengidentifikasi keberadaan senyawa bioaktif pada tanaman Majapahit serta mengevaluasi aktivitas antioksidan maupun aktivitas farmakologinya. Namun demikian, informasi mengenai profil metabolit hasil infundasi daging buah Majapahit menggunakan instrumen *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) masih sangat terbatas. Padahal, identifikasi metabolit secara komprehensif sangat penting untuk mengetahui senyawa dominan yang berpotensi memberikan aktivitas biologis, khususnya aktivitas sitotoksik sebagai kandidat antikanker.

Metode infundasi dipilih karena merupakan salah satu metode ekstraksi berbasis air yang sederhana, ekonomis, mudah diaplikasikan oleh masyarakat, serta sesuai dengan cara pemanfaatan tanaman obat secara tradisional. Pada metode ini, bahan tanaman diekstraksi menggunakan pelarut air pada suhu sekitar 90°C sehingga diharapkan mampu mengekstraksi senyawa-senyawa polar yang berpotensi memberikan aktivitas farmakologis (Azzahra et al., 2018). Meskipun demikian, karakterisasi metabolit hasil infundasi masih memerlukan teknologi analisis yang memiliki sensitivitas dan selektivitas tinggi.

Salah satu instrumen analisis yang mampu mengidentifikasi senyawa metabolit secara akurat adalah *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS). Teknik ini menggabungkan pemisahan senyawa menggunakan kromatografi cair dengan identifikasi berdasarkan rasio massa terhadap muatan menggunakan spektrometer massa. LC-MS/MS mampu mengidentifikasi senyawa dalam jumlah sangat kecil, termasuk senyawa yang bersifat polar maupun tidak stabil terhadap panas, sehingga banyak digunakan dalam penelitian metabolomik tanaman obat (Himawan, 2010).

Setelah dilakukan identifikasi metabolit, tahapan berikutnya adalah melakukan skrining aktivitas sitotoksik sebagai langkah awal untuk mengetahui potensi antikanker ekstrak. Salah satu metode yang banyak digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva *Artemia salina* Leach. Metode BSLT merupakan metode bioassay yang sederhana, cepat, ekonomis, serta memiliki korelasi yang baik dengan

aktivitas sitotoksik berbagai senyawa bahan alam. Parameter yang digunakan adalah nilai LC_{50} , yaitu konsentrasi yang mampu menyebabkan kematian 50% larva uji setelah 24 jam. Ekstrak dengan nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm dikategorikan memiliki potensi toksisitas yang dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat antikanker (Reskiningsih, 2014) (Fatimah et al., 2022).

MASALAH

Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete* L.) merupakan salah satu tanaman obat yang telah lama dimanfaatkan secara tradisional oleh masyarakat Desa Wates, Kecamatan Sumbergempol, Kabupaten Tulungagung, namun pemanfaatannya masih bersifat empiris dan belum didukung oleh bukti ilmiah yang memadai. Di sisi lain, meningkatnya angka kejadian kanker serta keterbatasan terapi konvensional mendorong perlunya eksplorasi bahan alam sebagai sumber kandidat obat antikanker. Meskipun beberapa penelitian melaporkan bahwa buah Majapahit mengandung metabolit sekunder, seperti flavonoid, fenolik, alkaloid, saponin, dan tanin yang berpotensi memiliki aktivitas antikanker, informasi mengenai profil metabolit infundasi daging buah Majapahit berdasarkan analisis LC-MS/MS serta hubungannya dengan aktivitas sitotoksik menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder infundasi daging buah Majapahit, mengevaluasi potensi sitotoksiknya sebagai skrining awal aktivitas antikanker, serta menyediakan dasar ilmiah yang dapat mendukung pemanfaatan tanaman Majapahit sebagai sumber bahan baku obat berbasis bahan alam dan meningkatkan nilai manfaatnya bagi masyarakat.

METODE PELAKSANAAN

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 500 g daging buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) segar, akuades, garam laut noniodium, Fermipan, asam klorida (HCl) pekat, HCl 2 N, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, dan larutan $FeCl_3$. Seluruh bahan kimia yang digunakan memiliki kualitas pro-analisis.

Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan meliputi pipet tetes, gelas beker (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, aluminium foil, rotary vacuum evaporator, akuarium penetasan,

aerator, lampu sebagai sumber panas, kain hitam, sekat berlubang, kaca pembesar, mikropipet, serta instrumen Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman Majapahit (*Crescentia cujete* L.) dilakukan di UPT Materia Medica Batu, Jawa Timur. Tahapan ini bertujuan untuk memastikan kebenaran identitas spesies tanaman yang digunakan sebagai sampel penelitian sehingga menjamin keabsahan dan validitas bahan penelitian (Depkes RI, 2000).

Pembuatan Infusa Buah Majapahit

Pembuatan infusa mengacu pada metode infundasi yang direkomendasikan oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia (1995). Sebanyak 500 g daging buah Majapahit segar dicuci hingga bersih, dipotong menjadi ukuran kecil, kemudian dicampurkan dengan 1000 mL akuades. Campuran dipanaskan pada suhu 90°C selama 15 menit, kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh infusa. Selanjutnya, infusa diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 55°C, kecepatan putaran 60 rpm, dan tekanan 350 mBar hingga diperoleh ekstrak kental dengan bobot konstan.

Skrining Fitokimia

Ekstrak infusa buah Majapahit selanjutnya dilakukan skrining fitokimia secara kualitatif untuk mengidentifikasi keberadaan metabolit sekunder. Pengujian meliputi identifikasi golongan alkaloid menggunakan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff, flavonoid, saponin, serta tanin menggunakan metode standar sesuai prosedur farmakognosi. Skrining ini bertujuan memberikan gambaran awal mengenai kandungan senyawa bioaktif yang berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas biologis ekstrak.

Identifikasi Senyawa Menggunakan LC-MS/MS

Setelah diperoleh hasil skrining fitokimia, ekstrak infusa buah Majapahit dianalisis menggunakan instrumen *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) di Laboratorium Universitas Muhammadiyah Malang. Analisis ini bertujuan untuk mengidentifikasi profil metabolit sekunder secara lebih spesifik berdasarkan nilai *retention time*, rasio massa terhadap muatan (*mass-to-charge ratio*, *m/z*), serta pola fragmentasi senyawa, sehingga diperoleh informasi mengenai komposisi metabolit yang terkandung dalam infusa buah Majapahit.

Uji Sitotoksik Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Potensi sitotoksik infusa buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) dievaluasi menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), yaitu metode bioassay yang banyak digunakan sebagai skrining awal aktivitas sitotoksik senyawa bahan alam. Prinsip pengujian didasarkan pada kemampuan sampel dalam menyebabkan kematian 50% larva *Artemia salina* Leach yang dinyatakan sebagai nilai LC50. Semakin rendah nilai LC50, semakin tinggi aktivitas sitotoksik suatu ekstrak sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat senyawa antikanker (Meyer *et al.*, 1982;).

Telur *Artemia salina* Leach ditetaskan dalam air laut buatan yang diaerasi secara kontinu pada suhu 25–30°C selama 48 jam hingga diperoleh larva (nauplius) yang siap digunakan sebagai organisme uji. Larva berumur 48 jam dipilih karena telah memiliki sistem pencernaan yang berkembang dengan baik sehingga lebih sensitif terhadap paparan senyawa bioaktif. Pengujian dilakukan menggunakan 110 larva yang dibagi ke dalam 11 kelompok, masing-masing terdiri atas 10 larva, yaitu satu kelompok kontrol negatif dan sepuluh kelompok perlakuan dengan konsentrasi infusa 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, dan 1000 ppm. Larutan uji dibuat dari larutan induk berkonsentrasi 1000 ppm yang disiapkan dengan melarutkan 100 mg ekstrak kental ke dalam 100 mL pelarut, kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga diperoleh konsentrasi yang diinginkan.

Setelah larva dipaparkan terhadap masing-masing konsentrasi selama 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung pada setiap kelompok perlakuan. Larva dinyatakan mati apabila tidak menunjukkan pergerakan selama ± 10 detik setelah diberikan rangsangan ringan. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk meningkatkan keandalan data. Persentase mortalitas yang diperoleh kemudian dikonversi menjadi nilai probit dan dianalisis menggunakan regresi linear untuk menentukan nilai LC50, yang selanjutnya digunakan sebagai parameter dalam menilai tingkat toksisitas dan potensi sitotoksik infusa buah Majapahit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining Fitokimia

Tabel 1 . Hasil Uji Skrining Ekstrak Fitokimia Infus Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)

Senyawa kelas	Reaktor	Perubahan warna	Hasil
Flavonoid	HCL pekat	endapan + warna kuning/merah	(+)
Alkaloid	HCL 2N + Mayer	endapan + warna kuning/putih	(+)
	HCL 2N + Wagner	mengendapkan cokelat berwarna	(+)
	HCL2N+ Dragendorff	endapan berwarna jingga	(+)
Saponin	air + HCL 2N	Ada buih	(+)
Tanin	Air panas + FeCl ₃	Hijau biru/biru hitam	(+)

Keterangan: (+) Ya senyawa dan (-) Tidak ditemukan senyawa

Hasil skrining fitokimia infusa daging buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) menunjukkan adanya beberapa golongan metabolit sekunder, yaitu flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin (Tabel 1). Hasil positif ditunjukkan melalui terbentuknya perubahan warna atau endapan spesifik pada masing-masing pereaksi, yaitu endapan merah kekuningan pada uji flavonoid menggunakan HCl pekat, endapan putih kekuningan, cokelat, dan jingga pada uji alkaloid menggunakan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff, terbentuknya buih stabil pada uji saponin, serta perubahan warna hijau kebiruan hingga biru kehitaman pada uji tanin menggunakan FeCl₃. Hasil ini menunjukkan bahwa infusa daging buah Majapahit mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berpotensi memberikan aktivitas farmakologis.

Keberadaan flavonoid merupakan temuan penting karena golongan senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antimutagenik, dan antikanker. Flavonoid bekerja melalui berbagai mekanisme, antara lain menghambat pembentukan radikal bebas, menghambat proliferasi sel kanker, menginduksi apoptosis, serta menghambat angiogenesis dan metastasis tumor. Senyawa flavonoid juga dilaporkan

mampu memodulasi berbagai jalur pensinyalan sel, seperti PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B, dan p53, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai kandidat obat antikanker berbasis bahan alam (Imran et al., 2019) (Imran et al., 2019).

Hasil uji alkaloid yang positif pada ketiga pereaksi menunjukkan bahwa infusa daging buah Majapahit mengandung senyawa alkaloid dalam jumlah yang cukup untuk bereaksi dengan pereaksi spesifik. Endapan yang terbentuk terjadi akibat pembentukan kompleks antara atom nitrogen pada alkaloid dengan ion logam pada pereaksi Mayer, Wagner, maupun Dragendorff. Secara farmakologis, alkaloid diketahui memiliki aktivitas sitotoksik melalui mekanisme penghambatan replikasi DNA, inhibisi pembelahan sel, serta induksi apoptosis. Berbagai alkaloid dari tanaman telah berhasil dikembangkan menjadi obat kemoterapi, seperti vinblastin dan vinkristin, sehingga keberadaan golongan senyawa ini semakin memperkuat potensi bioaktivitas *Crescentia cujete* sebagai sumber kandidat antikanker (Atanasov et al., 2021).

Infusa buah Majapahit juga memberikan hasil positif terhadap uji saponin yang ditandai dengan terbentuknya buih stabil setelah penambahan HCl 2 N. Sifat tersebut disebabkan oleh struktur saponin yang bersifat amfifilik sehingga mampu menurunkan tegangan permukaan dan membentuk busa yang stabil. Selain dikenal sebagai senyawa antimikroba dan antiinflamasi, saponin dilaporkan mampu meningkatkan permeabilitas membran sel kanker, menghambat proliferasi sel, serta mengaktivasi jalur apoptosis intrinsik melalui aktivasi kaspase dan peningkatan ekspresi protein Bax (Podolak et al., n.d.).

Uji tanin menunjukkan hasil positif melalui terbentuknya warna hijau kebiruan setelah penambahan FeCl_3 . Perubahan warna tersebut terjadi akibat pembentukan kompleks antara gugus fenolik tanin dengan ion Fe^{3+} . Tanin merupakan senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi dan diketahui mampu menghambat pertumbuhan berbagai jenis sel kanker melalui mekanisme penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, serta penurunan stres oksidatif. Aktivitas biologis tersebut menjadikan tanin sebagai salah satu metabolit sekunder yang banyak dieksplorasi dalam pengembangan obat berbasis bahan alam (Sharifi-Rad et al., 2022).

Secara keseluruhan, hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa infusa daging buah Majapahit mengandung berbagai metabolit sekunder yang berpotensi memberikan aktivitas biologis, khususnya sebagai antioksidan dan antikanker. Temuan ini sejalan dengan hasil identifikasi menggunakan LC-MS/MS yang menunjukkan dominasi senyawa

flavonoid, sehingga mendukung hasil uji sitotoksik menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Dengan demikian, keberadaan flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin diduga berkontribusi secara sinergis terhadap aktivitas sitotoksik infusa daging buah Majapahit dan menjadi dasar ilmiah untuk pengembangan penelitian lanjutan pada uji kultur sel kanker maupun uji praklinis.

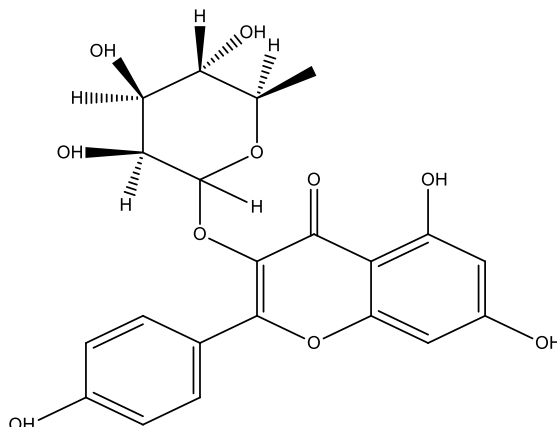
Identifikasi Senyawa Infus Daging Buah Majapahit dengan LCMS

Identifikasi senyawa metabolit sekunder pada infus daging buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) dilakukan menggunakan instrumen *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) di Laboratorium Terpadu Universitas Muhammadiyah Malang. Metode LC-MS/MS merupakan teknik analisis yang mengombinasikan kromatografi cair dengan spektrometri massa sehingga mampu memisahkan, mendeteksi, dan mengidentifikasi senyawa berdasarkan interaksi senyawa dengan fase diam dan fase gerak serta rasio massa terhadap muatan (*mass-to-charge ratio*, m/z). Metode ini memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi dalam mengidentifikasi metabolit sekunder pada sampel yang kompleks, sehingga banyak digunakan dalam penelitian bahan alam untuk mengetahui profil fitokimia suatu tanaman (Bhardwaj et al., 2023). Hasil analisis menunjukkan bahwa infus daging buah Majapahit mengandung 101 senyawa metabolit, yang menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki komposisi fitokimia yang beragam dan berpotensi memberikan berbagai aktivitas biologis.

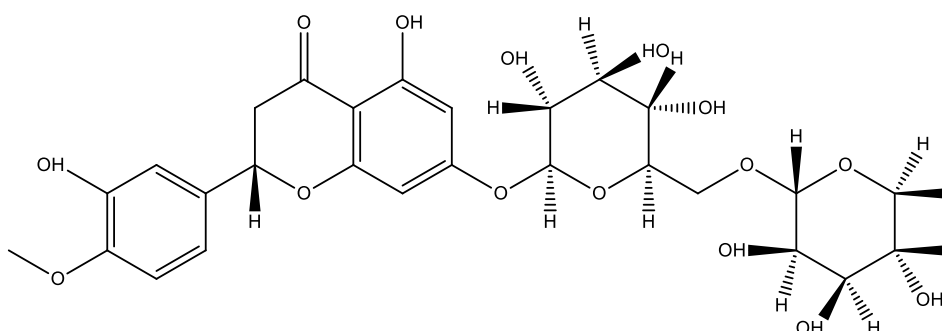
Dari seluruh senyawa yang teridentifikasi, kaempferol-3-*O*-rhamnoside dan hesperidin merupakan dua senyawa dengan intensitas puncak (*peak area*) tertinggi. Kaempferol-3-*O*-rhamnoside memiliki kadar relatif sebesar 3,29479%, berat molekul m/z 432,3810, dan rumus molekul $C_{21}H_{20}O_{10}$, sedangkan hesperidin memiliki kadar relatif 3,18572%, berat molekul m/z 610,1898, dan rumus molekul $C_{28}H_{34}O_{15}$. Kedua senyawa tersebut termasuk dalam golongan flavonoid yang diketahui memiliki berbagai aktivitas farmakologis, terutama sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker. Keberadaan kedua senyawa sebagai komponen dominan mengindikasikan bahwa aktivitas biologis infus daging buah Majapahit diduga dipengaruhi oleh kandungan flavonoid yang relatif tinggi dibandingkan metabolit lainnya.

Berbagai penelitian melaporkan bahwa kaempferol-3-*O*-rhamnoside mampu menghambat proliferasi sel kanker melalui penghambatan siklus sel, aktivasi jalur kaspase, peningkatan ekspresi protein proapoptosis (Bax), serta penurunan ekspresi protein

antiapoptosis (Bcl-2), sehingga memicu apoptosis pada berbagai jenis sel kanker (Imran et al., 2019;). Sementara itu, hesperidin diketahui memiliki aktivitas antikanker melalui penghambatan jalur pensinyalan PI3K/Akt, MAPK, dan NF- κ B, menghambat angiogenesis dan metastasis, serta menginduksi apoptosis pada berbagai lini sel kanker, seperti kanker payudara, kolon, paru-paru, lambung, dan mesothelioma (Garg *et al.*, 2021).



Gambar 1. Struktur hasil senyawa *kaempferol-3-O-rhamnoside*



Gambar 2. Struktur hasil senyawa *hesperidin*

Skrining Potensi Anti Kanker dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Skrining awal potensi antikanker pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), yaitu metode bioassay sederhana yang banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak bahan alam. Metode ini memanfaatkan larva *Artemia salina* Leach sebagai organisme uji karena memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap berbagai senyawa bioaktif, mudah diaplikasikan, cepat, ekonomis, serta memiliki korelasi yang baik dengan aktivitas sitotoksik pada beberapa lini sel kanker sehingga sesuai digunakan sebagai tahap awal penemuan kandidat senyawa antikanker (Meyer et al., 1982) (Hamidi et al., 2014).

Media penetasan dibuat menggunakan air laut buatan yang terdiri atas 35 g garam noniodium dalam 1 L akuades, dengan pH dipertahankan pada kisaran 8–9 dan suhu 25–30°C untuk mendukung pertumbuhan optimal *Artemia salina*. Aerasi dilakukan secara kontinu untuk mempertahankan kadar oksigen terlarut sehingga proses penetasan berlangsung secara optimal. Telur *Artemia salina* kemudian diinkubasi selama 48 jam hingga menetas menjadi larva (nauplius). Larva berumur 48 jam dipilih sebagai organisme uji karena pada fase ini sistem pencernaan telah berkembang dengan baik sehingga lebih sensitif terhadap paparan senyawa toksik dibandingkan larva yang baru menetas (Sembiring et al., 2016).

Selama pengujian, larva dipaparkan pada berbagai konsentrasi infus daging buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) selama 24 jam, kemudian jumlah larva yang mati dihitung untuk menentukan nilai LC50, yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menyebabkan kematian 50% organisme uji. Nilai LC50 digunakan sebagai parameter untuk menilai tingkat toksisitas sekaligus sebagai indikator awal potensi sitotoksik suatu ekstrak. Semakin kecil nilai LC50, semakin tinggi aktivitas biologis dan potensi sitotoksik ekstrak tersebut, sehingga semakin besar peluangnya untuk dikembangkan sebagai kandidat senyawa antikanker (Naidu et al., 2014).

Uji Toksisitas Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test

Uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode bioassay yang paling banyak digunakan sebagai skrining awal untuk mengevaluasi potensi sitotoksik senyawa bahan alam. Metode ini memanfaatkan larva *Artemia salina* Leach sebagai organisme uji karena memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap berbagai senyawa bioaktif, prosedur yang sederhana, biaya yang relatif rendah, serta reproduksibilitas hasil yang baik. Selain itu, beberapa penelitian menunjukkan bahwa hasil uji BSLT memiliki korelasi positif dengan aktivitas sitotoksik pada berbagai kultur sel kanker, sehingga metode ini banyak digunakan sebagai tahap awal dalam penemuan kandidat senyawa antikanker berbasis bahan alam.

Pada penelitian ini, larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam digunakan sebagai organisme uji karena pada fase tersebut sistem pencernaan dan metabolisme larva telah berkembang dengan baik sehingga lebih sensitif terhadap paparan senyawa toksik dibandingkan larva yang baru menetas. Infus daging buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) diuji pada konsentrasi 100–1000 ppm dengan interval 100 ppm, masing-masing

menggunakan tiga kali replikasi dan 10 larva pada setiap replikasi. Pengamatan dilakukan selama 24 jam, kemudian jumlah larva yang mati dihitung untuk menentukan persentase mortalitas pada masing-masing konsentrasi.

Berdasarkan Tabel 2, terlihat bahwa peningkatan konsentrasi infus daging buah Majapahit diikuti dengan peningkatan jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach. Pada konsentrasi terendah (100 ppm) diperoleh rata-rata kematian sebesar 1,3 larva atau 13%, sedangkan pada konsentrasi tertinggi (1000 ppm) rata-rata kematian meningkat menjadi 7,3 larva atau 73%. Sementara itu, kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan adanya kematian larva (0%), yang mengindikasikan bahwa mortalitas yang terjadi semata-mata disebabkan oleh paparan infus daging buah Majapahit, bukan oleh faktor lingkungan maupun media pengujian. Pola peningkatan mortalitas tersebut menunjukkan adanya hubungan *dose-dependent*, yaitu semakin tinggi konsentrasi infus yang diberikan maka semakin besar efek toksik yang ditimbulkan terhadap organisme uji. Fenomena ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dalam infus buah Majapahit memiliki aktivitas biologis yang meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang *Artemia salina* Leach

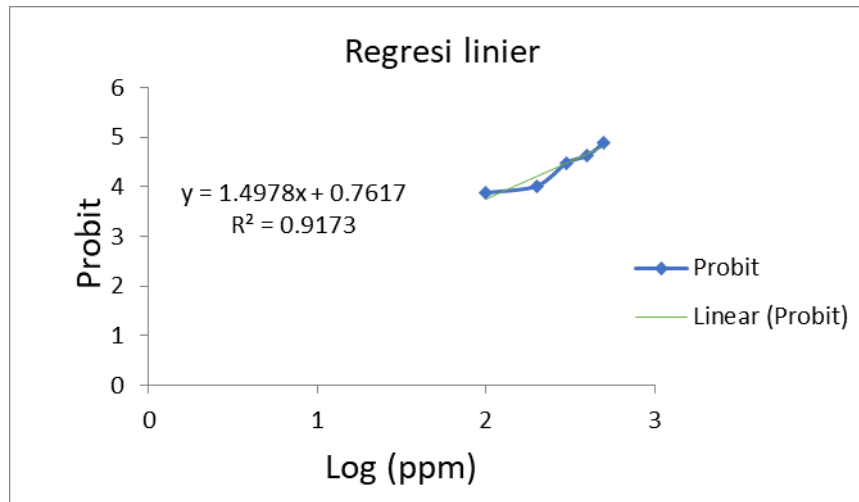
Konsentrasi (ppm)	R ₁	R ₂	R ₃	Kematian Total	Rata-rata Kematian	% Kematian
100	1	1	2	4	1,3	13%
200	1	3	1	5	1,6	16%
300	3	3	3	9	3	30%
400	4	4	3	11	3,6	36%
500	5	5	4	14	4,5	45%
600	6	5	6	17	5,6	56%
700	7	5	6	18	6	60%
800	8	6	5	19	6,3	63%
900	7	7	6	20	6,6	66%
1000	9	8	5	22	7,3	73%

K (-) 0 0 0 0 0 0

Persentase kematian larva selanjutnya dikonversi menjadi nilai probit untuk memperoleh hubungan linear antara logaritma konsentrasi dengan respons biologis. Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa nilai probit meningkat secara bertahap dari 3,87 pada konsentrasi 100 ppm menjadi 5,61 pada konsentrasi 1000 ppm. Peningkatan nilai probit tersebut mengindikasikan bahwa respons toksik yang dihasilkan infus daging buah Majapahit berlangsung secara konsisten terhadap peningkatan konsentrasi sampel. Analisis probit merupakan pendekatan statistik yang umum digunakan dalam penentuan nilai LC50 karena mampu menggambarkan hubungan antara dosis dan respons biologis secara lebih akurat dibandingkan menggunakan persentase mortalitas secara langsung.

Tabel 3. Tabel Nilai Probit Ekstrak Infus Daging Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)

Konsentrasi (ppm)	Log 10 (konsentrasi)	Masalah	% Kematian	Kematian	Total Hewan Uji
100	2	3.87	13%	4	30
200	2.301	4.01	16%	5	30
300	2.477	4.48	30%	9	30
400	2.602	4.64	36%	11	30
500	2.698	4.90	46%	14	30
600	2.778	5,15	56%	17	30
700	2.845	5,25	60%	18	30
800	2.903	5,33	63%	19	30
900	2.954	5,41	66%	20	30
1000	3	5,61	73%	22	30



Gambar 3. Bagan Regresi Linier Ekstrak Infusa Buah Majapahit (*Crescentia cujete*)

Nilai LC_{50} dihitung menggunakan analisis regresi linear berdasarkan hubungan antara log konsentrasi (X) dan nilai probit (Y) dengan persamaan $Y = 1,4978X + 0,7617$. Penentuan LC_{50} dilakukan dengan mensubstitusikan nilai probit sebesar 5 yang merepresentasikan kematian 50% larva *Artemia salina* Leach ke dalam persamaan regresi tersebut sehingga diperoleh nilai LC_{50} sebesar 675,46 ppm. Nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9173 menunjukkan bahwa model regresi memiliki tingkat kecocokan yang sangat baik, di mana sekitar 91,73% variasi mortalitas larva dapat dijelaskan oleh peningkatan konsentrasi infus. Nilai R^2 yang mendekati satu mengindikasikan adanya hubungan linear yang kuat antara konsentrasi sampel dengan tingkat kematian larva, sehingga analisis regresi yang digunakan memiliki reliabilitas yang tinggi dalam menentukan nilai LC_{50} . Pendekatan analisis probit menggunakan regresi linear merupakan metode yang umum digunakan dalam penentuan toksisitas akut pada uji BSLT maupun bioassay bahan alam (Hamidi et al., 2014) (Sarah et al., 2017).

Menurut klasifikasi (Meyer et al., 1982), ekstrak bahan alam dengan nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm dikategorikan memiliki aktivitas toksik dan layak digunakan sebagai skrining awal senyawa antikanker. Nilai LC_{50} sebesar 675,46 ppm yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa infus daging buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach. Hasil tersebut sejalan dengan berbagai penelitian yang melaporkan bahwa ekstrak tumbuhan dengan nilai LC_{50} di bawah 1000 ppm umumnya

menunjukkan aktivitas biologis yang baik dan memiliki korelasi positif terhadap aktivitas sitotoksik pada kultur sel kanker, sehingga metode BSLT banyak digunakan sebagai skrining awal dalam eksplorasi kandidat antikanker berbasis bahan alam (Hamidi et al., 2014) (Moshi et al., 2020).

Aktivitas sitotoksik tersebut diduga berkaitan erat dengan kandungan metabolit sekunder yang berhasil diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS. Analisis menunjukkan bahwa infus daging buah Majapahit mengandung senyawa flavonoid dominan berupa hesperidin dan kaempferol-3-*O*-rhamnoside. Hesperidin telah dilaporkan memiliki aktivitas antikanker melalui berbagai mekanisme molekuler, antara lain menghambat jalur pensinyalan PI3K/Akt, MAPK, dan NF- κ B, menghambat angiogenesis dan metastasis, menginduksi *cell cycle arrest*, serta meningkatkan apoptosis pada berbagai jenis sel kanker (Garg et al., 2021) (Devi et al., 2023). Selain itu, hesperidin juga diketahui mampu menurunkan stres oksidatif yang berperan dalam perkembangan kanker sehingga berpotensi sebagai agen kemopreventif.

Keberadaan kaempferol-3-*O*-rhamnoside juga diduga berkontribusi terhadap aktivitas sitotoksik infus buah Majapahit. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa turunan kaempferol mampu meningkatkan ekspresi protein proapoptosis (Bax), mengaktifasi kaspase-3 dan kaspase-9, menurunkan ekspresi protein antiapoptosis (Bcl-2), serta menghambat proliferasi sel kanker melalui regulasi siklus sel pada fase G1 maupun G2/M (Imran et al., 2019; Calderón-Montaña et al., 2023). Sinergisme berbagai senyawa flavonoid tersebut diduga menjadi faktor utama yang menyebabkan meningkatnya aktivitas sitotoksik infus daging buah Majapahit terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Hasil penelitian ini juga konsisten dengan penelitian sebelumnya pada kulit batang *Crescentia cujete* yang melaporkan nilai LC₅₀ sebesar 324,339 ppm serta mengidentifikasi senyawa utama berupa kaempferol-3-*O*-rhamnoside, hesperidin, rutin, dan asam galat menggunakan LC-MS. Perbedaan nilai LC₅₀ dibandingkan penelitian ini diduga dipengaruhi oleh perbedaan bagian tanaman yang digunakan, metode ekstraksi, jenis pelarut, serta komposisi metabolit sekunder yang dihasilkan, karena distribusi senyawa bioaktif pada setiap bagian tanaman umumnya tidak seragam.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa infus buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) memiliki aktivitas sitotoksik yang cukup kuat berdasarkan nilai LC₅₀ sebesar 675,46 ppm. Temuan tersebut didukung oleh keberadaan flavonoid bioaktif yang diketahui memiliki berbagai mekanisme antikanker, sehingga

memperkuat potensi buah Majapahit sebagai sumber kandidat senyawa antikanker berbasis bahan alam. Namun demikian, metode BSLT masih merupakan skrining toksisitas awal sehingga diperlukan penelitian lanjutan berupa uji sitotoksik pada berbagai lini sel kanker (*in vitro*), isolasi senyawa aktif, studi mekanisme molekuler, serta uji praklinis (*in vivo*) untuk memastikan efektivitas dan keamanan penggunaannya sebagai kandidat obat antikanker.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mencapai tujuan yang telah ditetapkan, yaitu mengidentifikasi profil metabolit sekunder pada infundasi daging buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) menggunakan metode *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) serta mengevaluasi potensi sitotoksiknya melalui metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil analisis LC-MS/MS menunjukkan adanya berbagai senyawa bioaktif yang didominasi oleh golongan flavonoid, di antaranya *hesperidin* dan *kaempferol-3-O-rhamnoside*, yang diketahui memiliki potensi aktivitas antikanker. Uji BSLT menghasilkan nilai LC₅₀ sebesar 675,46 ppm, yang menunjukkan bahwa infundasi daging buah Majapahit memiliki aktivitas sitotoksik dan berpotensi sebagai sumber senyawa antikanker berbasis bahan alam. Hasil penelitian ini memberikan informasi ilmiah mengenai potensi farmakologi tanaman Majapahit serta mendukung pemanfaatan sumber daya hayati lokal sebagai kandidat bahan baku fitofarmaka. Oleh karena itu, penelitian lanjutan perlu dilakukan melalui uji sitotoksik terhadap berbagai lini sel kanker (*in vitro*), isolasi dan karakterisasi senyawa aktif, pengujian mekanisme molekuler, serta uji keamanan dan efektivitas *in vivo* untuk mengonfirmasi potensi pengembangannya sebagai kandidat obat antikanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung atas dukungan fasilitas dan kesempatan dalam pelaksanaan penelitian ini, kepada Tim Research dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung atas bimbingan dan kerja sama selama proses penelitian, serta kepada Pemerintah dan masyarakat Desa Wates, Kecamatan Sumbergempol, Kabupaten Tulungagung atas dukungan dan partisipasinya sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.
- Azzahra, P., Munir, P. A., & Rizaldi, T. (2018). Pengaruh suhu dan volume air pada destilasi penyulingan minyak atsiri tipe uap dan air pada tanaman sirih hijau (*Piper betle* L.). *Jurnal Rekayasa Pangan Dan Pertanian*, 6(4), 1–72. <https://journal.uhamka.ac.id/index.php/bioeduscience/article/view/8095>
- Bhardwaj, P., Sharma, A., Singh, B., & Nagpal, A. K. (2023). LC–MS-based Metabolomics in Medicinal Plant Research: Recent Advances and Future Perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 229, 115339. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115339>
- Depkes. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2023). Hesperidin in cancer prevention and therapy: Current evidence and molecular targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 163, 114853. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114853>
- Ejelonu, O. C., Elekofehinti, O. O., & Adanlawo, I. G. (2011). Tannins, flavonoids and saponins as bioactive constituents of *Crescentia cujete* fruit. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15), 3290–3296.
- Fatimah, S., Rahman, N., & Nurjanah, S. (2022). Toxicity screening of medicinal plant extracts using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Pharmaciana*, 12(2), 197–206.
- Firjatillah, N., Widowati, L., & Pratama, R. (2020). Distribution of secondary metabolites in medicinal plants and their pharmacological activities. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 10(2), 91–102.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D., & Singla, A. K. (2021). Hesperidin: A promising flavonoid in cancer therapy. *Phytotherapy Research*, 35(11), 6087–6114. <https://doi.org/10.1002/ptr.7203>
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., & Panovska, T. K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(1), 9–18. <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>
- Himawan, T. (2010). Aplikasi Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS) dalam analisis metabolit sekunder tanaman. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(2), 98–106.
- Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Gondal, T. A., Saeed, F., Imran, A., Shahbaz, M., Tsouh Fokou, P. V., Umair Arshad, M., Khan, H., Guerreiro, S. G., Martins, N., & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential.

- International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2427.
<https://doi.org/10.3390/ijms20102427>
- Marzouk, M. M. (2016). Flavonoids as promising therapeutic agents against cancer and cardiovascular diseases. *Medicinal Chemistry Research*, 25(7), 1365–1381.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(5), 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Moshi, M. J., Innocent, E., & Nondo, R. S. O. (2020). Brine shrimp toxicity evaluation of medicinal plant extracts used in traditional medicine. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 9(1), 1–8.
- Naidu, J. R., Ismail, R., & Sasidharan, S. (2014). Acute toxicity and Brine Shrimp Lethality Test of medicinal plant extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–7.
- Parwata, I. M. O. A. (2014). Kanker dan mekanisme molekuler terjadinya kanker. *Jurnal Kimia*, 8(1), 1–11.
- Podolak, I., Galanty, A., & Sobolewska, D. (n.d.). Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9(3), 425–474. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9183-z>
- Qinghu, W., Gan, R. Y., Li, H. B., & Corke, H. (2016). Flavonoids: Biological activities and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(Suppl. 1), S139–S155. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1030069>
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(12), 2821–2831. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.004>
- Reskiningsih, R. (2014). Uji toksisitas akut ekstrak tanaman menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 11(1), 45–51.
- Sarah, Q. S., Anny, F. C., & Misbahuddin, M. (2017). Brine shrimp lethality assay. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 186–189. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.32796>
- Sembiring, E. N., Elya, B., & Sauriasari, R. (2016). Toxicity evaluation of medicinal plants using Brine Shrimp Lethality Test. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 41(2), 286–290.
- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Butnariu, M., Rotariu, L. S., Sytar, O., Sestito, S., Rapposelli, S., Akram, M., Iqbal, M., Krishna, A., & Cho, W. C. (2022). Chasing the Effects of Tannins on Human Health: A Review. *Molecules*, 27(11), 3571. <https://doi.org/10.3390/molecules27113571>
- Widyaningrum, H. (2011). *Kitab tanaman obat Nusantara*. MedPress.
- Yuhernita, Y., Juniarti, J., & Kurniawati, A. (2011). Potensi keanekaragaman hayati Indonesia sebagai sumber obat alami. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 7(3), 147–154.