

UJI TOKSISITAS FRAKSI DAUN PEDADA (*SONNERATIA CASEOLARIS* L.) TEHADAP LARVA UDANG (*ARTEMIA SALINA* LEACH) DENGAN MENGUNAKAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)

Muh. Fitrah¹, Nurshalati Tahar², Husniar³

¹²³Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar

¹Email: muhfitrah@uin-alauddin.ac.id

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang Uji Toksisitas Fraksi Daun Pedada (*Sonneratia caseolaris* L.) Terhadap Larva Udang (*Artemia Salina* Leach) Dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek toksisitas dan identifikasi golongan senyawa dari fraksi aktif Daun Pedada (*Sonneratia caseolaris* L.) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* terhadap *Artemia salina* Leach. Penelitian diawali dengan pengambilan sampel, pengeringan sampel dan ekstraksi dengan maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, etanol dan air. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan *Rotary evaporator*. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diuji toksisitasnya dan diperoleh hasil ekstrak etanol memiliki tingkat toksik yang lebih besar dibandingkan ekstrak lainnya dengan nilai LC_{50} sebesar 28.18 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom sehingga diperoleh 12 fraksi. Masing-masing fraksi diuji toksisitasnya dan diperoleh hasil fraksi F11 yang memiliki tingkat toksik yang lebih besar di bandingkan fraksi lainnya dengan nilai LC_{50} sebesar 46.77 $\mu\text{g/ml}$. Hasil identifikasi fraksi F11 menunjukkan adanya golongan senyawasteroid, flavanoid dan fenolik.

Kata kunci : *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), Daun Pedada (*Sonneratia caseolaris* L.), Flavanoid, Steroid, dan Fenolik

1. Pendahuluan

Toksisitas adalah kemampuan suatu zat kimia dalam menimbulkan kerusakan pada organisme baik saat digunakan atau saat berada dalam lingkungan.^[1]

Uji toksisitas merupakan uji pendahuluan untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa. Prinsip uji toksisitas adalah bahwa komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah. Uji toksisitas dilakukan untuk memperkirakan resiko yang berkaitan dengan pemaparan zat kimia dalam kondisi khusus karena kita ketahui bahwa tidak ada satupun zat kimia yang dikatakan aman (bebas resiko) sepenuhnya, karena zat kimia akan bersifat toksik pada tingkat dosis tertentu.^[2]

Uji toksisitas digunakan untuk mengetahui pengaruh racun yang dihasilkan oleh dosis tunggal dari suatu campuran zat kimia pada hewan coba sebagai uji praskrining senyawa antikanker. Sebagai skrining awal senyawa antikanker, metode yang dapat dipergunakan adalah metode

Brine Shrimp lethality Test (BSLT) yaitu uji toksisitas senyawa terhadap larva udang *Artemia salina*. Metode ini telah dibuktikan memiliki kolerasi dengan adanya daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker. Selain itu metode ini mudah, murah, cepat dan cukup akurat. Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya LC_{50} selama 24 jam. Suatu ekstrak tanaman atau senyawa hasil isolasi dikatakan toksik jika memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$.^[3]

Salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan oleh masyarakat yaitu tumbuhan pedada (*Sonneratia caseolaris*). Secara tradisional masyarakat menggunakan daun pedada untuk mengobati luka, memar, keseleo, dan bengkak. Daun-daunnya yang dihaluskan juga dapat digunakan untuk mengobati cacar. Penggunaan kulit kayu pedada untuk merangsang nafsu makan anak-anak telah umum dikenal penduduk Makiyan di Maluku Utara dan hasilnya sangat efektif.

Tumbuhan yang digunakan sebagai obat dan terbukti secara empiris sebagai obat dapat dikembangkan menjadi obat

herbal terstandar. Namun, pengembangan obat tersebut harus dilengkapi dengan bukti dari data klinik dan nonklinik. Obat yang akan diuji secara nonklinik dan klinik memerlukan data uji toksisitas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menguji toksisitas daun pedada (*Sonneratia caseolaris*. L) dengan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Tes (BSLT).

Senyawa bioaktif yang akan digunakan sebagai produk farmasi untuk antikanker harus diuji bioaktivitasnya terlebih dahulu. Salah satu metode uji sitotoksitas adalah Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) yang dapat digunakan untuk praskrining terhadap senyawa- senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antikanker^[4] dan^[5]. Bioindikator yang digunakan uji toksisitas tersebut adalah larva udang *Artemia salina* Leach. Toksisitas yang tinggi dari senyawa uji sangat berkorelasi dengan aktivitas senyawa sebagai antikanker.^[6]

2. Metode Penelitian

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah chamber, erlenmeyer ®(Pyrex), gelas ukur ®(Pyrex), hot plat ®(Cimareg), lampu UV 254 dan 366 nm, mikropipet ®(Socorex), penangas air ®(Memmert), pipa kapiler, rotavapor ®(Heidolph), seperangkat alat uji BSLT, seperangkat alat kromatografi kolom, timbangan analitik ®(Kern), timbangan kasar ®(O'Hauss), vortex ®(VM-300) dan wadah maserasi.

Bahan-bahan yang digunakan adalah air laut, *aquadest*, daun pedada (*Sonneratia caseolaris* L.), *etanol* 96%, *etil asetat*, H_2SO_4 10%, larva udang (*Artemia salina* Leach), lempeng *silica* gel F_{254} , *n-heksan*, pereaksi $AlCl_3$ 5%, pereaksi dragendorf, pereaksi $FeCl_3$ 5%, pereaksi KOH, pereaksi *Lieberman-Bouchard*, selit, serum sulfat, *silica* gel 60 GF₂₅₄.

b. Ekstraksi

Simplisia daun Pedada (*Sonneratia caseolaris* L.) diperoleh dari Jl. Sukawati, Kab. Paros, Sulawesi Selatan. Serbuk yang telah kering ditimbang sebanyak 600 guntuk di maserasi bertingkat

menggunakan 4 pelarut yaitu *n-heksan*, *etil asetat*, *etanol* 96% dan air. Penyarian dilakukan sebanyak 3 kali. Hasil maserasi dirotavapor hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh ditimbang untuk dihitung rendamen.

c. Penyiapan Larva Uji

Kista *Artemia salina* direndam dalam *aquades* (± 1 jam), lalu ditiriskan. Kemudian kista ditetaskan dalam wadah kerucut dilengkapi dengan aerator dan lampu penerangan selama 24 jam. Setelah larva menetas kemudian dipindahkan ke wadah 2 bilik (gelap-terang) dengan sekat berlubang-lubang yang berisi air laut. Bilik penetasan diberi kondisi gelap sedangkan bilik satunya dilengkapi dengan lampu sebagai sumber cahaya dan diberi aerator yang berfungsi sebagai oksigen dan menjaga agar kista tidak mengendap. Larva yang baik akan berenang menuju ruang yang terang karena bersifat fototropik. Larva udang akan siap untuk digunakan dalam pengujian setelah berumur 48 jam.

d. Penyiapan Sampel Uji

Ekstrak daun Pedada (ekstrak *n-heksan*, *etil asetat*, *etanol* 90% dan ekstrak air) ditimbang masing-masing sebanyak 30 mg. Kemudian ekstrak tersebut dilarutkan dalam pelarut sesuai dengan jenis ekstrak sebanyak 3 ml sehingga diperoleh konsentrasi 10000 $\mu g/ml$ sebagai larutan stok. Untuk membuat konsentrasi 10 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$ dan 1000 $\mu g/ml$, maka dari larutan stok tersebut dipipet ke dalam vial masing-masing 5 μl , 50 μl , dan 500 μl menggunakan mikropipet, kemudian pelarutnya diuapkan.

e. Uji Toksisitas

Konsentrasi larutan uji yaitu 1000 ppm, 100 ppm dan 10 ppm, masing-masing dibuat dalam 3 vial. Sebagai kontrol negatif digunakan pelarut saja. Selanjutnya vial diisi air laut 1 ml, lalu sepuluh ekor *Artemia salina* Leach. umur 48 jam yang sehat (bergerak aktif) dipilih secara acak, dimasukkan ke dalam vial yang berisi sampel yang bebas pelarut, kemudian ditambahkan air laut sampai 5 ml. Setelah 24 jam dihitung jumlah larva

yang hidup pada masing-masing vial. Kemudian dihitung % kematian larva, data-data yang diperoleh dianalisis dengan analisis probit untuk menentukan LC₅₀.

f. Kromatografi Kolom

Ekstrak etanol 90% ditimbang sebanyak 15 gram, kemudian difraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom. Kolom kromatografi disiapkan dengan membuat bubuk silika yang dimasukkan ke dalam kolom kromatografi secara perlahan-lahan. Ekstrak dilarutkan dengan pelarutnya lalu dihomogenkan dengan selit kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Kemudian dibuat sistem fase gerak dengan gradien kepolaran yang semakin meningkat yaitu berturut-turut heksan : etil asetat {(10:1), (7:1), (5:1), (3:1), (1:1)}, kloroform, kloroform:metanol {(10:1), (5:1), (3:1), (1:1)}, metanol. Penggantian gradient fase gerak dilakukan ketika fase gerak gradien sebelumnya telah habis digunakan untuk mengaliri kolom.

Fraaksi-fraaksi hasil pengoloman ditampung dan diuapkan. Seluruh fraksi yang diperoleh diidentifikasi menggunakan KLT. Fraksi yang mempunyai kemiripan bercak digabungkan. Kemudian dilakukan uji toksisitas.

g. Identifikasi Golongan Senyawa Kimia

Fraksi F11 ditotolkan pada lempeng KLT kemudian dielusi dengan eluen kloroform:metanol (10:1). Kromatogramnya diamati di bawah UV

254 dan 366 nm kemudian disemprot dengan menggunakan pereaksi penampak noda antara lain sebagai berikut :

1) *Alkaloid*

Pereaksi yang digunakan yaitu Dragendorf, jika sampel positif mengandung alkaloid, maka timbul warna jingga dengan latar belakang kuning.

2) *Steroid*

Pereaksi yang digunakan Liebermann-Burchard.

Kromatogram terlebih dahulu dipanaskan, kemudian diamati di lampu UV 366 nm, munculnya noda berfluoresensi coklat atau biru menunjukkan adanya triterpen, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

3) *Flavanoid*

Pereaksi yang digunakan yaitu *Aluminium Klorida* diamati di lampu UV 366 nm, jika sampel mengandung senyawa flavanoid maka noda akan berfluoresensi kuning.

4) *Fenol*

Pereaksi yang digunakan Besi (III) Klorida, jika sampel positif mengandung fenol akan dihasilkan warna hijau atau biru.

5) *Khumarin*

Pereaksi yang digunakan KOH etanolik, jika sampel positif mengandung senyawa khumarin akan dihasilkan warna merah terang.

3. Hasil Dan Pembahasan

Tabel 1. Hasil Ekstraksi

No.	Sampel	Berat Sampel	Pelarut	Berat Ekstrak	% Rendemen
1.	Daun Pedada	600 gram	N-heksan	8,3 gram	1,38%
			Etil Asetat	19,05 gram	3,17%
			Etanol 96%	24 gram	4%
			Air	4,15 gram	0,69%
	Total		-	55,5 gram	9,25%

Tabel 2. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* Ekstrak Daun Pedada (*Sonneratia caseolaris*)

Ekstrak	Kematian larva (%) Konsentrasi (µg/ml)			NilaiProbit			LC ₅₀ (µg/ml)	Persamaan Regresi	R ²
	1000	100	10	1000	100	10			
Heksan	43%	37%	23%	4,82	4,6 7	4,26	3.019	y = 0,28x + 4,0233	0,933
Etil Asetat	37%	27%	23%	4,67	4,3 9	4,26	53.703	y = 0,205x + 4,03	0,9573
Etanol	67%	60%	43%	5,44	5,2 5	4,82	28,18	y = 0,31x + 4,55	0,9524
Air	63%	57%	23%	5,33	5,1 8	4,26	138,03	y = 0,535x + 3,8533	0,8528

Tabel 3. Fraksinasi

No	Fraksi	Vial	Berat (gram)
1	F1	1-15	130 mg
2	F2	16-32	90 mg
3	F3	33-73	100 mg
4	F4	74-83	70 mg
5	F5	90-116	120 mg
6	F6	117-134	100 mg
7	F7	135-193	390 mg
8	F8	194-208	80 mg
9	F9	209-219	80 mg
10	F10	220-239	400 mg
11	F11	240-285	650 mg
12	F12	286-365	650 mg

Tabel 4. *Brine Shrimp Lethality Test* Fraksi Daun Pedada (*Sonneratia caseolaris*)

Fraksi	Kematian larva (%) Konsentrasi (µg/ml)			NilaiProbit			LC ₅₀ (µg/ml)	Persamaan Regresi	R ²
	1000	100	10	1000	100	10			
F1	77%	33%	23%	5,74	4,56	4,26	154,88	y= 0,74x + 3,3733	0,8946
F2	67%	43%	27%	5,44	4,82	4,16	200,44	y=0,64x + 3,5267	0,9997
F3	63%	40%	17%	5,33	4,75	4,05	281,83	y= 0,64x + 3,43	0,9971
F4	70%	53%	13%	5,52	5,08	4,36	162,18	y= 0,825x + 3,1733	0,9323
F5	60%	50%	10%	5,25	5	3,72	74,13	y= 0,765x + 3,1267	0,8688
F6	73%	50%	17%	5,61	5	4,05	138,03	y= 0,78x + 3,3267	0,9844
F7	83%	57%	23%	5,95	5,18	4,20	74,13	y= 0,875x + 3,36	0,9952
F8	70%	27%	7%	5,52	4,39	3,52	333,65	y= x + 2,4767	0,9944
F9	77%	63%	13%	5,74	5,33	3,87	104,71	y= 0,935x + 3,11	0,9049
F10	80%	53%	17%	5,84	5,08	4,05	102,32	y= 0,895x + 3,2	0,9925
F11	90%	67%	23%	6,28	5,44	4,26	46,77	y= 1,01x + 3,3067	0,9906
F12	73%	33%	13%	5,61	4,56	3,87	229,08	y= 0,87x + 2,94	0,9859

Serbuk daun pedada (*Sonneratia caseolaris* L.) yang telah kering ditimbang sebanyak 600 g untuk di maserasi bertingkat menggunakan 4 pelarut yaitu n-heksan, etil asetat, etanol 96% dan air. Berdasarkan pada Tabel 1. Hasil ekstraksi daun pedada (*Sonneratia caseolaris*), ekstrak dari daun pedada yang diperoleh masing-masing yaitu ekstrak n-heksan sebanyak 8.3 gram dengan persen rendemen 1.38%, ekstrak etil asetat sebanyak 19.05 gram dengan persen rendemen 3.17%, ekstrak etanol 96% sebanyak 24 gram dengan persen rendemen 4%, ekstrak air sebanyak 4.15 gram dengan persen rendemen 0.69%. Kemudian hasil ekstraksi dilakukan uji toksisitas.

Berdasarkan pada Tabel 2. Hasil uji toksisitas ekstrak daun pedada (*Sonneratia caseolaris*) dengan menggunakan metode BSLT, hasil dari uji BSLT pada ekstrak n-heksan diperoleh nilai LC_{50} yaitu 3.019 $\mu\text{g/ml}$, pada ekstrak etil asetat diperoleh nilai $LC_{50} = 53.703 \mu\text{g/ml}$, pada ekstrak etanol 96% diperoleh nilai $LC_{50} = 28.18 \mu\text{g/ml}$, pada ekstrak air diperoleh nilai $LC_{50} = 138.03 \mu\text{g/ml}$. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% dan ekstrak air memiliki aktivitas toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach karena memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$, sedangkan ekstrak n-heksan dan etil asetat tidak memiliki aktivitas toksik terhadap larva udang karena $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$. Ekstrak yang mempunyai toksistas yang paling tinggi yaitu ekstrak etanol 96%, selanjutnya difraksinasi menggunakan kromatografi kolom.

Berdasarkan pada tabel 3. Hasil fraksinasi ekstrak etanol daun pedada (*Seonneratia caseolaris*), diperoleh 12 fraksi yaitu fraksi F1 (vial ke 1-15), fraksi F2 (vial ke 16-32), fraksi F3 (vial ke 33-73), fraksi F4 (vial ke 74-83), fraksi F5 (vial ke 90-116), fraksi F6 (vial ke 117-134), fraksi F7 (vial ke 135-193), fraksi F8 (vial ke 194-208), fraksi F9 (vial ke 209-219), fraksi F10 (vial ke 220-239), fraksi F11 (vial ke 240-285) dan fraksi F12 (vial ke 286-365). Semua fraksi yang telah digabungkan kemudian diuji aktivitas toksik terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach) dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ dan 1000 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efek toksik hasil fraksinasi.

Berdasarkan pada Tabel 4. Hasil uji toksisitas fraksi ekstrak etanol daun pedada (*Sonneratia caseolaris*) dengan menggunakan metode BSLT, fraksi F1 memiliki nilai $LC_{50} = 154,88 \mu\text{g/ml}$, fraksi F2 memiliki nilai $LC_{50} = 200,44 \mu\text{g/ml}$, fraksi F3 memiliki nilai $LC_{50} = 281,83 \mu\text{g/ml}$, fraksi F4 memiliki nilai $LC_{50} = 162,18 \mu\text{g/ml}$, fraksi F5 memiliki nilai $LC_{50} = 74,13 \mu\text{g/ml}$, fraksi F6 memiliki nilai $LC_{50} = 138,03 \mu\text{g/ml}$, fraksi F7 memiliki nilai $LC_{50} = 74,13 \mu\text{g/ml}$, fraksi F8 memiliki nilai $LC_{50} = 333,65 \mu\text{g/ml}$, fraksi F9 memiliki nilai $LC_{50} = 104,71 \mu\text{g/ml}$, fraksi F10 memiliki nilai $LC_{50} = 102,32 \mu\text{g/ml}$, fraksi F11 memiliki nilai $LC_{50} = 46,77 \mu\text{g/ml}$, dan fraksi F12 memiliki nilai $LC_{50} = 229,08 \mu\text{g/ml}$. Hasil pengamatan tersebut menunjukkan bahwa fraksi F11 memiliki efek toksik yang paling besar terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Berdasarkan pada Tabel 5. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia daun pedada (*Sonneratia caseolaris*), pada uji menggunakan H_2SO_4 menunjukkan 4 noda. Pada uji menggunakan preaksi Dragendorf hasilnya negatif karena tidak terdapat noda berwarna jingga dengan latar kuning, sedangkan pereaksi Liebermann-Burchard memberikan hasil positif dengan adanya noda berwarna hijau kebiruan menunjukkan adanya komponen kimia golongan steroid. Pada uji menggunakan pereaksi FeCl_3 5% hasilnya positif dengan adanya noda berwarna hitam dan memberikan hasil positif terhadap pereaksi AlCl_3 dengan adanya noda berwarna kuning yang menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid. Pada uji menggunakan pereaksi KOH hasilnya negatif karena noda tidak berwarna merah.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan :

- Ekstrak etanol daun pedada (*Sonneratia caseolaris*) memiliki aktivitas toksik yang lebih besar dengan nilai $LC_{50} 28,18 \mu\text{g/ml}$

dibandingkan dengan ekstrak n-heksan dengan nilai LC_{50} 3.019 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak etil asetat dengan nilai LC_{50} 53.703 $\mu\text{g/ml}$, dan ekstrak air dengan nilai LC_{50} 138,03 $\mu\text{g/ml}$.

- b. Fraksi F11 dari hasil fraksinasi daun pedada (*Sonneratia caseolaris* L.) lebih toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} 46,77 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan fraksi lainnya.
- c. Hasil identifikasi golongan senyawa daun pedada mengandung senyawa steroid, flavonoid dan fenolik.

5. Daftar Pustaka

- [1] Priyanto. *Toksikologi: Mekanisme, Terapi Antidotum dan Penilaian Resiko Lembaga Studi Dan Konsultasi Farmakologi Indonesia LESKONFI*, 2009.
- [2] Lu, Frank C. *Toksikologi Dasar*. Jakarta: UI-Press, 2006.
- [3] Oratmangun, Sandriani A. dkk. *Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) terhadap *Artemia salina* dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker*. Jurnal Ilmiah Farmasi Pharmacon. Vol.3 No.3. ISSN 2302-2493, 2014.
- [4] Sukardiman, Rahman A, Pratiwi FN. 2004. Uji Praskrining Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.
- [5] Widyastuti, S. 2008. "Uji Toksisitas Ekstrak Daun Iprih (*Ficus Glabella* Blume) Terhadap *Artemia salina* Leach Dan Profil Kromatografi Lapis Tipis". (Skripsi). Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah.
- [6] Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughlin, J.L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Lant Constituents. *Planta Medica*, 45 : 31-34.