

## Uji Toksisitas Daun Ketepeng (*Cassia Alata* L.), Kulit Buah Pisang Ambon (*Musa Paradisiaca* L. Var *Sapientum*) Dan Kulit Rimpang Kencur (*Kaempferia Galanga* Linn.) Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Antonius Padua Ratu<sup>1\*</sup>, Eko Mugiyanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Prodi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farnasi Bogor

<sup>2</sup> Prodi S1 Farmasi, STIKES Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan

\*Email: antoniuspaduaratu@sttif.ac.id.

### Abstrak

#### Keywords:

*Artemia salina*

Leach; BLST; LC<sub>50</sub>

*Senyawa antikanker dapat dilakukan skrining dengan metode BSLT. Metode ini merupakan metode awal dan salah satu cara yang cepat serta murah untuk penapisan toksisitas dari ekstrak tanaman dengan menggunakan hewan laut yaitu larva udang Artemia salina Leach. Berdasarkan alasan tersebut, maka uji ini sangat tepat digunakan dalam mengawali penelitian bahan alam. Penelitian ini dilakukan untuk skrining toksisitas daun ketepeng, kulit buah pisang ambon dan kulit rimpang kencur dengan metode BSLT sebagai uji awal untuk mengetahui bioaktivitas. Selain BSLT, juga dilakukan penapisan fitokimia. Hasil penelitian dengan metode BSLT dari ekstrak etil asetat daun ketepeng, kulit buah pisang ambon, dan kulit rimpang kencur menunjukkan LC<sub>50</sub> masing-masing sebesar 59,14 ppm, 146,78 ppm, dan kurang dari 10 ppm. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun ketepeng hanya terdapat flavonoid, ekstrak etil asetat kulit buah pisang ambon terdapat flavonoid dan terpenoid; dan kulit rimpang kencur terdapat alkaloid dan terpenoid. Ekstrak etil asetat kulit rimpang kencur menunjukkan aktivitas tertinggi dan potensial sebagai antikanker, maka perlu dilakukan isolasi dan identifikasi sehingga diperoleh senyawa aktif. Anticancer compounds can be screened by the BSLT method. This method is an early method and one of the quickest and cheapest ways to screen the toxicity of plant extract using marine animals shrimp larvae Artemia salina Leach. Based on these reasons, this research was very appropriate to use in initiating the research of natural materials. This research was conducted for toxicity screening of ketepeng leaf, banana peel and kencur rhizome skin by BSLT method as preliminary test to know bioactivity. Besides BSLT, phytochemical screening is also performed. The result of BSLT method from the extract of ethyl acetate of ketepeng leaf, banana peel, and kencur rhizome skin showed LC<sub>50</sub> of 59.14 ppm, 146.78 ppm and less than 10 ppm, respectively. The results of phytochemical screening showed that the extract of ethyl acetate of ketepeng leaf contained only flavonoid, ethyl acetate extract of banana peel contained flavonoid and terpenoid; and kencur rhizome skin contain alkaloid and terpenoid. The ethyl acetate extract of the skin of kencur rhizome skin shows the highest activity and potential as anticancer, it is necessary to isolate and identify so that the active compound is obtained.*

## 1. PENDAHULUAN

Penemuan obat efektif dari derivat tanaman merupakan hal utama yang penting bagi ilmuwan untuk pengobatan infeksi dan kanker (Hemanth et al., 2014). Banyak sumber senyawa penuntun dari berbagai jenis tanaman telah diperkenalkan. Senyawa kemoterapi, termasuk *taxol* dari *Taxus brevifolia* L., *camptothecin* dari *Camptotheca acuminata*, alkaloid *vinca* dari *Catharanthus roseus*, dan *podophyllotoxin* dari *Podophyllum peltatum* L. (Zare et al, 2013; Nirmala et al., 2011). Kenaikan resistensi terhadap antibiotik membuat penemuan sumber baru senyawa antimikroba sangat mendesak (Jayaraman et al., 2008). Skrining ekstrak tumbuhan secara sistemik untuk anti kankernya dan antibakteri sudah mulai ditemukan produk baru alami dengan potensi aktivitas melawan sel ganas dan bakteri multi resistan.

*Brine Shrimp Assay* telah banyak digunakan dalam 30 tahun terakhir untuk uji toksisitas berbagai macam hasil dari tanaman. Spesies yang paling banyak digunakan adalah *Artemia salina*. Spesies ini diperkirakan digunakan lebih dari 90% pengujian dimana *Artemia* digunakan sebagai organisme uji eksperimental (Campbell et al., 1994). Michael et al. (1956) mengusulkan pengembangan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan kemudian metode ini diadaptasi oleh Meyer et al., (1982).

Hewan laut yaitu larva udang *Artemia salina* Leach digunakan dalam metode BSLT, karena metode ini merupakan salah satu cara yang cepat dan murah untuk *skrining* toksisitas dari ekstrak tanaman (Mayer et al., 1982). Keuntungan pengujian toksisitas dengan metode BSLT ini memiliki spektrum aktivitas farmakologi yang luas, secara prosedural sederhana, cepat dan tidak membutuhkan biaya yang besar, serta memberikan hasil dapat dipercaya. Secara metode, pengujian berdasarkan bahwa senyawa bioaktif dari tumbuhan mempunyai sifat toksik dan dapat larva *Artemia salina* Leach. dan dapat digunakan sebagai uji skrining awal untuk uji aktivitas antikanker (Mayer et al., 1982). Berdasarkan alasan-alasan tersebut, maka pengujian dengan metode BSLT sangat tepat digunakan dalam mengawali penelitian bahan alam (Mayer et al., 1982, Alam, 2002).

Penelitian ini dilakukan untuk *skrining* toksisitas daun ketepeng, kulit buah pisang ambon dan kulit rimpang kencur menggunakan metode BSLT terhadap larva udang *Artemia salina* Leach sebagai uji awal untuk mengetahui senyawa bioaktif dari simplisia diatas.

## 2. METODE

Pengujian pada penelitian ini secara eksperimen dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Mayer et al., 1982).

### 2.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun ketepeng, kulit buah pisang ambon, kulit rimpang kencur; etil asetat; akuades; DMSO; NaCl; larva udang *Artemia salina* Leach

### 2.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, *rotary vacuum evaporator* dan peralatan gelas.

### 2.3. Pembuatan Ekstrak

Pada penelitian ini, proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi tiga simplisia pelarut etil asetat. Filtrat yang diperoleh diuapkan dan dipekatkan untuk dihitung rendemennya.

### 2.4. Skrining Fitokimia

Pengujian fitokimia ekstrak etil asetat yang diperoleh, selanjutnya dilakukan *skrining* fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawanya. Pengujian yang dilakukan meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, dan uji terpenoid

### 2.5. Penyiapan Larva *Artemia salina* Leach

Sebelum dilakukan pengujian, telur udang ditetaskan selama 2 hari dengan bejana untuk penetasan telur udang yang sudah disiapkan. Sebanyak 2,5 mg telur direndam dalam wadah yang berisi air laut sebanyak 250 mL dibawah cahaya lampu 25 watt dan

dilengkapi dengan aerator untuk siap dilakukan penetasan. Setelah 24 jam telur tersebut menetas dan menjadi larva. Setelah berumur  $\pm$  48 jam, larva *Artemia salina* Leach adalah kondisi yang baik digunakan untuk uji BSLT dan telah siap digunakan sebagai hewan pengujian toksisitas. Jika melebihi 48 jam dikhawatirkan akan terjadi kematian *Artemia salina* Leach yang bukan disebabkan toksisitas ekstrak tetapi oleh persediaan makanan yang habis. Larva udang dipipet ke dalam beaker/vial yang berisi air laut.

#### **2.6. Pembuatan Sampel Uji**

Larutan uji untuk BSLT dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm dan 0 ppm (kontrol). Larutan stok, ekstrak kental dibuat dengan menimbang sebanyak 20 mg, kemudian ditambahkan 1 ml DMSO dan dilarutkan kedalam air laut sebanyak sampai 10 mL, hingga diperoleh konsentrasi larutan induk 2000 ppm. Larutan induk ini, selanjutnya dibuat lagi konsentrasi 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm dan 0 ppm.

#### **2.7. Pelaksanaan Uji Toksisitas**

Pengujian toksisitas dilakukan pada masing-masing ekstrak sampel. Wadah untuk pengujian disiapkan untuk masing-masing konsentrasi ekstrak. Pengujian toksisitas ekstrak menggunakan 3 wadah dan 1 wadah sebagai kontrol. Selanjutnya pada setiap konsentrasi ekstrak dimasukkan 20 ekor larva *Artemia salina* Leach. Selama 24 jam dilakukan pengamatan terhadap kematian larva. Pada setiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali dan kontrol sebagai pembanding negatif. Penilaian kematian larva udang dengan kriteria standar yaitu jika tidak menunjukkan adanya pergerakan selama pengamatan. Setelah pengamatan selama 24 jam dilakukan, maka langkah selanjutnya adalah menghitung jumlah larva yang mati.

#### **2.8. Analisis Data**

Analisis data dilakukan secara statistik untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub> melalui persamaan regresi linier sederhana (sumbu x bentuk logaritma konsentrasi, sedangkan sumbu y adalah % mortalitas) dengan bantuan program Microsoft Excel 2010.

### **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **3.1. Rendemen Ekstrak**

Hasil maserasi simplisia ekstrak daun ketepeng, kulit buah pisang ambon dan kulit rimpang kencur dengan pelarut etil asetat diperoleh rendemen sebesar 14,4%, 16,6% dan 1,8%. Pemilihan pelarut tersebut bertujuan untuk memperoleh senyawa non polar, semipolar dan polar. Pemilihan maserasi bertujuan untuk memperoleh senyawa yang tidak rusak oleh pemanasan.

#### **3.2. Skrining Fitokimia**

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun ketepeng memiliki kandungan komponen senyawa flavonoid; ekstrak etil asetat kulit buah pisang ambon memiliki kandungan komponen senyawa terpenoid dan flavonoid; dan ekstrak etil asetat kulit rimpang kencur memiliki kandungan komponen senyawa alkaloid dan terpenoid. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Veerachari *et al.* (2012), menunjukkan adanya komponen senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat daun ketepeng. Penelitian yang juga dilakukan oleh Rao *et al.* (2012) yang menunjukkan adanya komponen senyawa terpenoid dan flavonoid pada buah pisang. Serta penelitian yang dilakukan oleh Levita *et al.* (2015) yang menunjukkan adanya komponen senyawa terpenoid pada rimpang kencur.

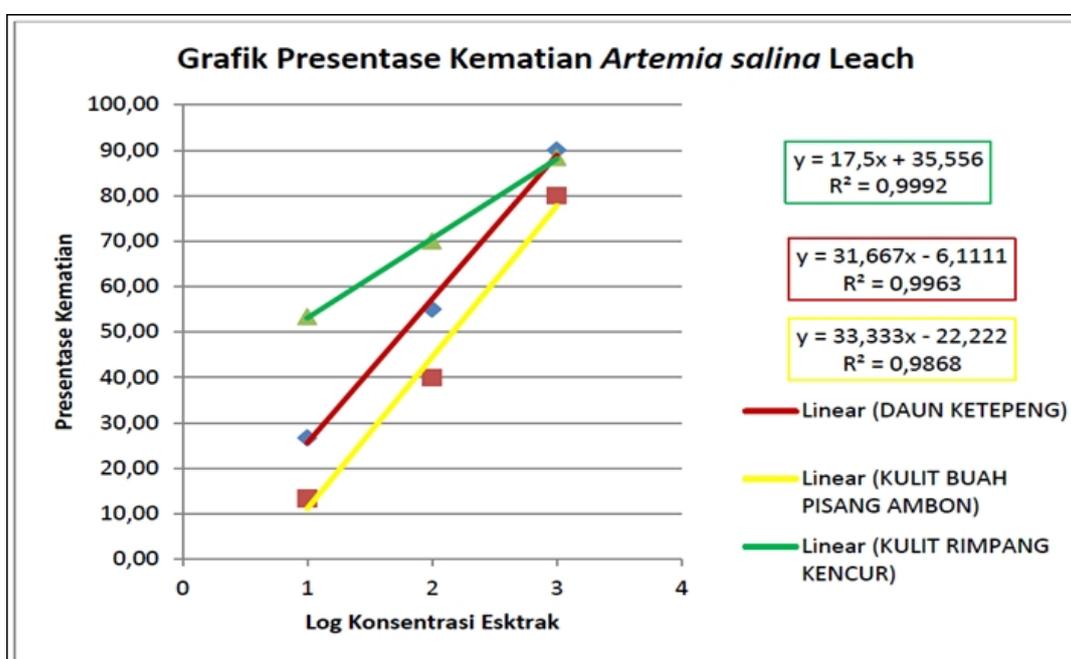
Hal ini terjadi karena pelarut etil asetat bersifat semi polar yang dapat menarik sebagian komponen senyawa polar dan semi seperti flavonoid, tanin dan saponin serta dapat menarik alkaloid dan terpenoid yang kurang polar. Hasil uji skrining fitokimia ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia

Kandungan senyawa	Daun ketepeng	Kulit buah pisang ambon	Kulit rimpang kencur
Alkaloida	-	-	+
Flavonoida	+	+	-
Terpenoid	-	+	+
Saponin	-	-	-

### 3.3. Pengujian BSLT

*The brine shrimp lethality test* (BSLT) adalah sebuah metode skrining sederhana untuk pengukurannya toksisitas senyawa radikal bebas (Middleton et al., 2005). Pengujian aktivitas BSLT dengan menggunakan perhitungan *Lethal Concentration 50* (LC<sub>50</sub>). Hasil pengujian aktivitas ekstrak terhadap kematian *Artemia salina* ditunjukkan pada Gambar 1 dan Tabel 2.



Gambar 1. Presentase Kematian *Artemia salina* L.

Pada penelitian ini, hasil BSLT menunjukkan bahwa metabolit sekunder dalam ekstrak daun ketepeng, kulit buah pisang ambon dan kulit rimpang kencur terbukti secara signifikan mempengaruhi tingkat perkembangan larva udang *Artemia salina* L. setelah masa inkubasi 24 jam dengan toksisitas yang sangat tinggi.

Toksistas metabolit sekunder tanaman berkaitan dengan kemampuan pertahanan diri tanaman tersebut terhadap predator seperti serangga, mikroorganisma, hewan ataupun tanaman predator lainnya. Mekanisme pertahanan diri tersebut kemungkinan dengan jalan melindungi organ target maupun dengan jalan menginhibisi proses pembelahan sel yang telah terkena mikroba patogen.

Hasil BSLT juga diketahui merupakan suatu metode penapisan untuk pencarian senyawa antikanker dari tanaman. Semakin tinggi tingkat toksisitas metabolit sekunder tanaman, dengan nilai LC<sub>50</sub> yang semakin kecil, maka semakin potensial tanaman tersebut untuk digunakan dalam pengobatan antikanker.

Hasil penelitian dengan metode BSLT dari ekstrak etil asetat daun ketepeng, kulit buah pisang ambon, dan kulit rimpang kencur menunjukkan LC<sub>50</sub> masing-masing sebesar 59,14 ppm, 146,78 ppm, dan kurang dari 10 ppm. Menurut penelitian lain yang

dilakukan oleh Mentor et al., 2014 menunjukkan bahwa ekstrak metanol tanaman ketepeng mempunyai LC<sub>50</sub> sebesar 7,74 ppm. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Rampe dan Tombuku 2015 menunjukna bahwa ekstrak etanol jantung pisang kepok sebesar 806,8 ppm. Penelitian yang dilakukan oleh Bagya et al., 2011 menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang kencur sebesar 684 ppm.

Dengan sangat kecilnya nilai LC<sub>50</sub> ekstrak uji, dibawah 100 µg/ml, maka aktivitas biologi ekstrak uji sebagai suatu antikanker berpotensi sangat tinggi. Nilai LC<sub>50</sub> lebih rendah dari 1000 µg/ml dianggap mempunyai kominen senyawa bioaktif (Mayer et al., 1982). BSLT juga menunjukkan efek antijamur, efek pestisida, efek teratogenik, toksisitas terhadap lingkungan dan banyak lagi (Asaduzzaman et al, 2015).

Tabel 2. Hasil uji aktivitas ekstrak terhadap kematian *Artemia salina* L.

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Mati	Hidup	% Kematian	LC <sub>50</sub> (ppm)
Daun Ketepeng	0	1,33	18,67		59,14
	10	6,67	13,33	26,67	
	100	12,33	7,67	55,00	
	1000	19,33	0,67	90,00	
Kulit Buah Pisang Ambon	0	1,67	18,33		146,78
	10	4,33	15,67	13,33	
	100	9,67	9,33	40,00	
	1000	17,67	2,33	80,00	
Kulit Rimpang Kencur	0	1,33	17,67		< 10
	10	12,00	8,00	53,33	
	100	15,33	4,67	70,00	
	1000	19,00	1,00	88,33	

Satuan standar yang digunakan adalah LC<sub>50</sub> untuk menentukan kematian oleh ekstrak sebanyak 50%. Pada penelitian ini ekstrak kulit rimpang kencur mempunyai nilai IC<sub>50</sub> terkecil yaitu kurang dari 10 ppm.

#### 4. KESIMPULAN

Ekstrak etil asetat kulit rimpang kencur menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> kurang dari 10 ppm yang dianggap mempunyai potensi antikanker. Untuk perlu dilakukan studi lanjut untuk mengetahui komponen senyawa aktif.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ketua STTIF Bogor yang memberikan fasilitas untuk kelancaran dalam penelitian ini.

#### REFERENSI

- Alam, G. (2002) *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) sebagai bioassay dalam isolasi senyawa bioaktif dari bahan alam. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 6(2):432-435.
- Asaduzzaman, M. Rana, MS. Hasan, SMR. Hossain, MM. Das, N. (2015). Cytotoxic (Brine Shrimp Lethality Bioassay) and Antioxidant Investigation *Barringtonia acutangula* (L). *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 6(8):1179-1185.
- Bagya, SK. S. Rajashree, PV. Gnana, K. (2011). Preliminary Anticancer Screening and Standardization of some Indigenous Medicinal Plants using Cell-biology and Molecular Biotechnology Based Models. *Res J. Med. Plant*. 5(6) : 728-737.

- Campbell, DL. Lawton, LA. Beattie, KA. Codd, GA. (1994). Comparative Assessment of the Specificity of the Brine Shrimp and Microtox Assays to Hepatotoxic (Microcystin-LR-Containing) Cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*. 9:71-77.
- Hemanth, KM. Dhiman, V. Choudhary, R. Chikara, A. (2014). Anticancer activity of hydro alcoholic extracts from *Paris polyphylla* rhizomes against human A549 lung cancer cell lines using MTT assay. *Inter. Res. J. Pharm.* 5: 290-294.
- Jayaraman, S. Manoharan. MS. Ilanchezian, (2008). S. Invitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Trop. J. Pharm. Res.* 7: 1143-1149.
- Levita, J. Wijaya, LK. Celcilia, S. Mutakin, M. (2015). Inhibitory Activity of *Kaempferia galanga* and *Hibiscus sabdariffa* on the Rate of PGH<sub>2</sub> Formation. *Journal of Applied Sciences*. 15(7):1032-1036.
- Mentor, R. Hamidi, B, Jovanova, T. Panovska, K. (2014). Review paper Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*. 60 (1) : 9 – 18.
- Meyer, BN. Ferrigni, NR. Putnam, JE. Jacobsen, LB. Nichols, DE. McLaughlin, JL. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45(5):314.
- Michael, AS. Thompson, CG. Abramovitz, M. (1965). *Artemia salina* as a test-organism for bioassay. *Science*. 123 : 464.
- Middleton, P. Stewart, F. Al-Qahtani, S. Egan, P. O'Rourke, C. Abdulrahman, A. (2005). Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iran. J. Pharm. Res.* 2: 81-86.
- Nirmala, MJ. Samundeeswari, A. Sankar, PD. (2011). Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Res Plant Biol.* 1: 10-4.
- Rampe, M. Tombuku, JL. Pengujian Fitokimia dan Toksisitas Ekstrak Etanol Jantung Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* Linn.) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Jurnal Sainsmat.* 4(2): 136-147.
- Rao, NM. Prasad, SHKR. Jyothirmavi, N. (2012). Efficacy of Ripened and Unripened Fruit Extract of *Musa X Paradisiaca* L. (Bontha Cultivar) Against Human Pathogens. *Int J Pharm Pharm Sc.* 2012; 4(1) 455-460.
- Veerachari, U. Bopaiah, AK. (2012). Phytochemical Investigation of The Ethanol, Methanol and Ethyl Acetate Leaf Extracts of six *Cassia* Species. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* 3(2): 260-270.
- Zare, SF. Valiyari, S. Azadmehr, A. Hajiaghaee, R. Bandehagh, A. Baradaran, B. (2013). Cytotoxic activities of *Ferulago angulata* extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *J. Med. Plants Res.* 7: 677-682.