

Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) Ekstrak Daun Kelakai (*Stenochlaena palustris*)

Devi Anggraeni S.^{1,*} dan Erwin¹

¹Program Studi Kimia FMIPA Universitas Mulawarman

*Email: ipingdepi@gmail.com

Abstract Has conducted research with the title "Phytochemicals and Toxicity Test Test (Brine Shrimp Lethality Test) Leaf Extract Kelakai (*Stenochlaena palustris*). This study aims to determine the leaf extract kelakai (*Stenochlaena palustris*) had secondary metabolites and determine toxicity with LC50 values after addition of kelakai leaf extract (*Stenochlaena palustris*). The concentration required to kill shrimp larvae do the manufacture of crude extract, fraction of n-hexane and ethyl acetate fraction with some degree of concentration which is then inserted into the plate containing the larval shrimp, then counted the dead shrimp larvae. The test results of secondary metabolites kelakai leaf extracts showed that ethanol, n-hexane fraction and ethyl acetate containing alkaloids, steroids and flavonoids. The test results showed that kelakai leaf BSLT most active fraction is the fraction of ethyl acetate with LC50 values of 92.6451 ppm.

Keywords *phytochemicals, toxicity, LC50, artemia salina.*

Pendahuluan

Indonesia merupakan Negara yang memiliki banyak potensi keanekaragaman, baik habitat, maupun flora dan fauna yang dimilikinya. Keanekaragaman ini pula membuat Indonesia memiliki banyak keanekaragaman hayati terutama dalam tanaman herbal. Namun pada kenyataannya, pemanfaatan yang dilakukan saat ini masih belum optimal, karena sebagian besar kekayaan herbal Indonesia masih belum tergali dengan baik, sehingga banyak tanaman herbal yang belum dapat dimanfaatkan untuk pengembangan industri obat tradisional.

Pemanfaatan tanaman herbal untuk pengobatan tradisional telah menyatu dimasyarakat. Hal ini dikarenakan tanaman herbal memiliki beberapa keuntungan, salah satunya yaitu memiliki efek samping yang rendah apabila dibandingkan dengan obat yang terbuat dari bahan sintetik. Selain itu, tanaman herbal juga mudah di produksi, mudah diperoleh, dan murah dibandingkan dengan obat sintetik.

Pada penggunaan bahan baku obat baik terbuat secara alami maupun sintesis, bahan baku obat tersebut harus dilakukan uji toksistas terlebih dahulu, sehingga dalam penerapan bisa dinyatakan aman dan diketahui seberapa besar jumlah toksistas yang terkandung di dalam bahan obat tersebut. Uji toksistas merupakan salah satu uji aktivitas biologi terhadap ekstrak atau fraksi isolat tanaman dengan mengamati

respon kematian pada hewan percobaan. Hewan percobaan untuk uji toksistas biasanya menggunakan ikan, larva nyamuk dan larva udang. Kematian dari hewan percobaan dianggap sebagai respon terhadap pengaruh senyawa tertentu. Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Meyer, senyawa kimia yang mempunyai nilai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm dikatakan memiliki potensi toksik [1].

Hasil skrining fitokimia menjelaskan bahwa daun kelakai memiliki senyawa aktif seperti alkaloid dan steroid yang diduga berperan terkait dengan kulit. Selain diduga adanya flavonoid terkait dugaan keberadaan senyawa antioksidan seperti vitamin A dan C, informasi ilmiah lainnya adalah terdapatnya potongan metabolit primer (lemak, protein) dan metabolit sekunder (flavonoid, steroid dan alkaloid) didalam jaringan komponen tumbuhan kelakai [2].

Penelitian mengenai salah satu tumbuhan paku yaitu daun kelakai telah ada yang menguji mengenai antioksidan dari ekstrak metanol daun kelakai. Oleh karena itu penelitian ini untuk mengetahui ketoksistasian dari tumbuhan daun kelakai sebelum dilakukan uji lanjut dalam pengujian pembuatan bahan obat.

Metodologi

Alat

Alat-alat yang digunakan ialah blender, seperangkat alat gelas laboratorium, seperangkat alat maserasi ekstrak daun

kelakai, *rotary evaporator*, corong pisah, pipet tetes, erlenmeyer 25 mL, Lampu, tiang statif, botol semprot, rak tabung, tabung reaksi, tanki biakan larva udang, pipet mikro, timbangan neraca dan vial.

Bahan

Daun kelakai (*Stenochlaena Palustris*), etanol, *n*-heksana, etil asetat, kertas saring, H₂SO₄ 2M, HCl pekat, CHCl₃, CH₃COOH anhidrat, H₂SO₄ pekat, FeCl₃ 1%, serbuk Mg, reagen dragendorff, DMSO, air laut, aluminium foil, kertas saring dan telur udang.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi Daun Kelakai

Simplisia kering yang dihaluskan diekstraksi dengan maserasi ke dalam wadah kaca, kemudian direndam dengan pelarut etanol. Ekstraksi dilakukan hingga ekstrak tidak berwarna lagi, kemudian dilanjutkan dengan proses penyaringan. Dilakukan penguapan pelarut etanol ekstrak daun kelakai menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak total daun yang kemudian difraksinasi berdasarkan perbedaan kepolaran pelarut-pelarut organik. Dilakukan fraksinasi ekstrak total daun kelakai dengan *n*-heksana (1:1) sehingga diperoleh 2 fraksi yaitu etanol dan fraksi *n*-heksana. Fraksi *n*-heksana dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan disebut sebagai ekstrak fraksi *n*-heksana. Selanjutnya fraksi etanol difraksinasi dengan penambahan etil asetat. Dari fraksinasi kedua diperoleh 2 fraksi, yaitu fraksi etil asetat dan fraksi etanol. Kemudian kedua fraksi tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan hasilnya masing-masing disebut sebagai ekstrak fraksi etil asetat dan ekstrak fraksi etanol. Pada ekstrak kasar etanol daun kelakai, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui jenis senyawa kimia metabolit sekunder yang dikandung setiap fraksi dan ekstrak total. Selanjutnya dilakukan uji Fitokimia dan uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Uji Metabolit Sekunder

Uji Alkaloid, Ekstrak kasar daun kelakai dan fraksi-fraksinya ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff (campuran Bi(NO₃)₂·5H₂O dalam asam nitrat dan larutan KI). Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga sampai merah coklat dengan pereaksi Dragendorff [3].

Uji Terpenoid dan Steroid (Uji Lieberman Burchard), Ekstrak kasar daun kelakai dan fraksi-fraksinya ditambahkan CHCl₃ lalu ditambah 3 tetes pereaksi Lieberman-Burchard (CH₃COOH unhidrat: H₂SO₄ pekat = 19:1). Uji positif triterpenoid memberikan warna merah atau ungu dan uji positif steroid memberikan warna hijau atau biru [4].

Uji Fenolik, Ekstrak kasar kelakai dan fraksi-fraksinya ditambahkan air panas lalu ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Uji positif ditunjukkan oleh terbentuknya larutan berwarna hijau, merah, ungu atau biru sampai hitam pekat [4].

Uji Flavonoid, Ekstrak kasar kelakai dan fraksi-fraksinya dilarutkan dengan air panas lalu ditambah 2 mg serbuk Mg dan 3 tetes HCl pekat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga [4].

Uji Saponin, Ekstrak kasar daun kelakai dan fraksi-fraksinya ditambahkan sedikit air panas lalu dikocok kuat-kuat, jika timbul busa ditambah 1 tetes HCl pekat. Ekstrak positif mengandung saponin jika timbul busa dengan ketinggian 1-3 cm yang bertahan selama 15 menit [4].

Uji Toksisitas *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Dalam persiapan larutan sampel 1 mg ekstrak total, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat masing-masing dilarutkan dalam 100 mL DMSO sambil diaduk. Diencerkan dengan 150 µL akuades sehingga volume total menjadi 250 µL. Selanjutnya, diambil 200 µL larutan ini lalu diencerkan dengan 600 µL sehingga volume total menjadi 800 µL dan konsentrasi menjadi:

$$\frac{\frac{200\mu\text{L}}{250\mu\text{L}} \times 2\text{mg}}{800\mu\text{L}} = \frac{1,6\text{mg}}{800\mu\text{L}} = 2\mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Larutan kontrol dibuat sama dengan prosedur diatas tanpa penggunaan sampel. Penetasan larva udang ditetaskan dalam 100 mL air laut. Selanjutnya diberi pencahayaan TL agar menetes sempurna. Setelah 24 jam telur udang menetas dan siap untuk diujicobakan. Pengujian toksisitas. Disiapkan 2 plat mikro standar masing-masing untuk plat uji dan plat kontrol. Pada baris 1 dan 2 masing-masing tiga kolom dimasukkan 100 µL larutan sampel pada plat uji dan 100 µL larutan kontrol pada plat kontrol. Larutan baris 2 diencerkan dengan 100 µL akuades dan diaduk. Kemudian dipipet kembali 100 µL dimasukkan kedalam baris 3 diencerkan kembali 100 µL akuades sambil diaduk dan

seterusnya dengan cara yang sama sampai baris terakhir. Sehingga konsentrasi larutan untuk masing-masing baris sebagai berikut, baris 1 = 1000 ppm, baris 2 = 50% dari baris 1, baris 3 = 50% dari baris kedua dan seterusnya. Selanjutnya larutan sampel pada plat uji dan larutan kontrol ditambah 100 μ L air laut yang mengandung 8-15 larva udang, kemudian dibiarkan selama 24 jam. Dihitung jumlah rata-rata larva udang yang mati dan hidup untuk setiap baris dari plat uji. Analisa harga LC_{50} senyawa ditentukan dengan menggunakan analisis probit [3].

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi Daun Kelakai

Berat kering serbuk daun yang dihasilkan dari tumbuhan kelakai (*Stenolachlaena Palustris*) halus yang digunakan dalam penelitian ini adalah seberat 512 gr.

Tabel 1. Berat dari Ekstrak Kasar dan Masing-Masing Fraksi

No.	Jenis Ekstrak	Berat (gram)
1.	Ekstrak kasar etanol	31
2.	Ekstrak Fraksi <i>n</i> -heksana	7
3.	Ekstrak Fraksi etilasetat	5

Sampel yang telah terkumpul dicuci bersih yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang berupa debu, jamur dan cendawan yang terdapat pada sampel. Sampel yang sudah dicuci bersih sampel dikering anginkan dan penghindaran dari cahaya matahari langsung yang bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terkandung didalam sampel, mencegah kerja enzim dan hilangnya metabolit sekunder pada sampel yang disebabkan oleh peningkatan suhu (menguap) ataupun reaksi yang terjadi karena sinar UV dari matahari. Setelah itu sampel yang sudah kering dipotong-potong dan dihaluskan, penghalusan sampel daun kelakai bertujuan untuk memaksimalkan interaksi etanol (pelarut) dengan sampel daun kelakai sehingga diharapkan keseluruhan metabolit sekunder dapat terekstrak, setelah sampel dihaluskan kemudian sampel yang telah halus ditimbang. Proses penghalusan ukuran sampel tidak boleh terlalu halus karena apabila sampel tersebut berbentuk serbuk yang sangat halus akan mempersulit penyaringan karena butir-butir halus membentuk suatu suspensi yang sangat sulit

dipisahkan dengan hasil penyaringan yang akan mengakibatkan hasil penyaringan tersebut tidak murni lagi tetapi tercampur dengan partikel-partikel halus sehingga dapat menyulitkan proses penyarian metabolit sekunder yang terkandung didalam sampel. Dengan penyerbukan yang terlalu halus menyebabkan bayak dinding sel yang pecah, sehingga zat yang tidak diinginkan ikut ke dalam hasil penyarian (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986). Setelah sampel halus dimaserasi dengan etanol didalam boto gelap yang tertutup rapat agar etanol yang digunakan sebagai pelarut tidak menguap ke udara. Maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik, pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah etanol yang ditempatkan pada suhu ruangan. Proses maserasi dilakukan pada suhu kamar sambil beberapa kali dikocok. Pada proses perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam sel dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang terkandung didalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstrak senyawa akan sempurna karena perendaman dapat diatur [5]. Maserasi memiliki beberapa keuntungan yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan tidak menggunakan pemanasan karena pemanasan dapat merusak metabolit sekunder yang terkandung didalam sampel. Proses maserasi dilakukan 3 kali hingga warna dari filtratnya menjadi agak bening. Pelarut yang digunakan adalah etanol karena etanol dapat lebih cepat efektif, kapang dan jamur sulit tumbuh dalam etanol, absorpsinya baik, etanol dapat berampur dengan air pada segala perbandingan dan panas yang diperlukan untuk pemekatannya lebih sedikit. Setelah proses maserasi selesai, dilakukan penyaringan dan filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C [4]. Hingga diperoleh ekstrak kental etanol. Pada proses ini penggunaan temperatur dapat dihindari dengan memanfaatkan adanya pompa vakum dengan pengaliran air sehingga dalam alat akan terjadi pengurangan tekanan dan pelarut akan menguap pada temperatur di bawah titik didihnya. Penggunaan kondisi vakum bertujuan untuk menghindari tergedegrasinya senyawa metabolit sekunder selama proses pemekatan atau pengurangan pelarut karena tidak menggunakan panas [5]. Selanjutnya

ekstrak kasar etanol difraksinasi berdasarkan pada perbedaan kepolaran pelarut-pelarut organik. Kemudian ekstrak kasar etanol yang telah bebas etanol dilarutkan kembali dengan etanol lalu difraksinasi dengan *n*-heksana dengan perbandingan 2:1 (v/v) terlebih dahulu yang bertujuan agar seluruh senyawa metabolit sekunder yang bersifat nonpolar akan terlarut atau tertarik ke dalam pelarut *n*-heksana. Fraksinasi dengan *n*-heksana dilakukan berulang-ulang hingga larutan hasil fraksinasi menjadi bening dari warna larutan semula. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan corong pisah sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan ekstrak etanol. Selanjutnya dilanjutkan fraksinasi ekstrak etanol dengan etil asetat. Fraksinasi dengan etil asetat ini juga dilakukan berulang kali hingga larutan hasil fraksinasi menjadi bening. Tujuan dilakukan fraksinasi berulang kali yaitu senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalam ekstrak etanol terpisah dan terlarut kedalam masing-masing pelarutnya. Diperoleh fraksi etil asetat, setelah itu kedua fraksi tersebut diuapkan ke dalam sloki yang sudah diketahui berat kosongnya lalu ditutup dengan aluminium foil dengan diberi lubang-lubang kecil setelah itu dimasukkan kedalam desikator dan ditunggu hingga sampel kering. Setelah kering ditimbang ekstrak yang didapat. Dari hasil fraksinasi diperoleh dua ekstrak yaitu ekstrak fraksi *n*-heksana dan ekstrak fraksi etil asetat.

Uji Analisis Fitokimia

Berdasarkan hasil uji fitokimia terhadap ekstrak kasar etanol, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat daun tumbuhan kelakai (*Stenolachlaena Palutris*) diketahui kandungan jenis senyawa metabolit sekunder senyawa sekundernya.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia dari Ekstrak Kasar Masing-Masing Fraksi Daun Tumbuhan Kelakai (*Stenolachlaena Palutris*)

Jenis Senyawa	Jenis ekstrak		
	Ekstrak kasar Etanol	Fraksi <i>n</i> -heksana	Fraksi Etil Asetat
Alkaloid	+	+	+
Saponin	-	-	-
Steroid	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Fenolik	-	-	-

Keterangan : + = Mengandung senyawa metabolit sekunder
 - = Tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

Daun Kelakai pada ekstrak kasar, ekstrak fraksi *n*-heksana dan ekstrak fraksi etil asetat daun tumbuhan kelakai (*Stenolachlaena Palutris*) mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, steroid dan flavonoid.

Uji Toksisitas (BSLT)

Pengujian toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode BSLT (*brine shrimp lethality test*) dengan larva udang *Artemia salina* Leach. Metode BSLT dipilih dengan berbagai alasan. Alasan pertama, metode ini merupakan metode penapisan farmakologi awal yang mudah dan relative tidak mahal. Kedua, metode ini merupakan metode yang telah teruji hasilnya dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengamati toksisitas suatu senyawa di dalam ekstrak kasar dan yang keempat metode ini sering dikaitkan sebagai metode penapisan untuk penyarian senyawa antikanker dari tanaman. Larva udang memiliki kulit yang tipis dan peka terhadap lingkungannya. Zat atau senyawa asing yang ada di lingkungannya akan terserap kedalam tubuh dengan cara difusi dan langsung mempengaruhi kehidupan larva udang tersebut. Larva udang yang sensitif ini akan mati apabila zat atau senyawa asing tersebut bersifat toksik (Meyer et al., 1982). BSLT pada penelitian ini menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. sebanyak 8-15 ekor pada setiap kolom uji yang ditambahkan ekstrak tanaman dari masing-masing pelarut. Percobaan dilakukan secara triplo dengan konsentrasi ekstrak 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 dan 7,8 ppm. Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan analisis probit SAS terhadap ekstrak kasar, fraksi *n*-heksana dan etil asetat dari daun tumbuhan kelakai (*Stenolachlaena Palutris*) diperoleh nilai LC₅₀ (*Lethal Concentration 50%*).

Tabel 3. Nilai LC₅₀ Uji Mortalitas Larva Udang

Jenis Ekstrak	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak Kasar	760.099
Ekstrak <i>n</i> -heksana	463.2861
Ekstrak etil asetat	92.6451

Berdasarkan studi yang dilakukan Meyer, senyawa kimia dikatakan berpotensi aktif bila mempunyai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm. Untuk hasil uji BSLT pada Tabel 4.3 dari ekstrak kasar diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 760.009 ppm, fraksi *n*-heksana diperoleh

LC₅₀ sebesar 463.2861 dan fraksi etil asetat diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 92.6451 ppm. Nilai ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut, ekstrak sampel mampu membunuh larva udang sampai 50% populasi.

Kesimpulan

Kandungan metabolit sekunder yang terkandung didalam sampel yaitu daun kelakai (*Stenochlaena palutris*) yaitu senyawa alkaloid, steroid dan flavonoid

Berdasarkan hasil uji LC₅₀ mortalitas larva udang (BSLT) didapatkan nilai LC₅₀ masing-masing ekstrak.. pada ekstrak etanol nilai LC₅₀ didapatkan 760.099 ppm, fraksi n-heksana didapatkan 463.2861 ppm dan pada fraksi etil asetat diperoleh 92.6451 ppm dimana fraksi etil asetat memiliki toksisitas yang paling tinggi.

Referensi

- [1] Dewi, N.A. 2011. *Potensi Ekstrak Daun Rambutan (Naphelium lappaceum L.) sebagai pembasmi larva nyamuk Culex pipiens*. Skripsi. Samarinda: Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman.
- [2] Maharani. 2005. *Studi Potensi Kelakai (Stenochlaena palutris) Sebagai pangan Fungsional*. PKM Penelitian, Fakultas Pertanian UNLAM, Banjarbaru.
- [3] Robinson, T.1995. *Kandungan Kimia Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB
- [4] Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB.
- [5] Darwis, D. 2000. *“Uji kandungan Fitokimia Metabolit Sekunder*. Padang.