

Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Asoka (*Ixora coccinea L.*) dan Fraksi Pelarut Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Toxicity Test of Ethanol Extract and Solvent Fractions of Ashoka Leaves (*Ixora coccinea L.*) Using the Brine Shrimp Lethality Test Method

Agree Vanessa Tinting¹, Vanda Selvana Kamu^{*1}, Henry F. Aritonang¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi Manado

*Email korespondensi: vandakamu@unsrat.ac.id

ABSTRACT

This study aimed to determine the toxicity of asoka leaves (*Ixora coccinea L.*) by determining the LC₅₀ value as well as determining the total phenolic, flavonoid and tannin content of the ethanol extract and asoka leaf fraction. The result of the highest total phenolic content, namely ethanol extract, was obtained at 67,197 µg/mL while the lowest, namely the n-hexane fraction, was obtained at 3,717 µg /mL. The result of the highest total flavonoid content, namely the ethanol extract, was obtained at 39,022 µg /mL and the lowest, namely the ethyl acetate fraction, was obtained at 11,57 µg/mL. The result of the highest condensed tannin content was found in the ethanol extract with a value of 603,185 µg/mL while the lowest tannin content was found in the n-hexane fraction 93,556 µg/mL . The result of the LC₅₀ value in the Brine Shrimp Lethality test method toxicity test were successively obtained from the ethanol extract 92,7517 ppm, the n-hexane fraction 71,1237 ppm, the ethyl acetate fraction 331.5041 ppm and the water fraction 272,9965 ppm. so the toxicity test showed that the fraction n-hexane was very toxic. Based on this research, it can be concluded that the ethanol extract and asoka leaf fraction were toxic.

Keywords: *Ixora coccinea L.*, phenolics, flavonoids, tannins, toxicity, BSLT.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan toksisitas dari daun asoka (*Ixora coccinea L.*) dengan menentukan nilai LC₅₀ serta penentuan kandungan total fenolik, flavonoid dan tanin dari ekstrak etanol dan fraksi daun asoka. Hasil kandungan total fenolik tertinggi yaitu ekstrak etanol diperoleh 67,197 µg/mL. Sedangkan yang terendah yaitu fraksi n-heksana diperoleh 3,717 µg/mL. Kandungan total flavonoid tertinggi yaitu pada ekstrak etanol (39,022 µg/mL) dan yang terendah yaitu pada fraksi etil asetat (11,57 µg/mL). Hasil kandungan tanin terkondensasi paling tinggi adalah pada ekstrak etanol (603,185 µg/mL). sementara kandungan tanin terendah terdapat pada fraksi n-heksana 93,556 µg/mL. Hasil nilai LC₅₀ pada uji toksisitas metode Brine Shrimp Lethality test berturut-turut diperoleh ekstrak etanol 92,7517 ppm. fraksi n-heksana 71,1237 ppm. Fraksi etil asetat 331,5041 ppm. dan fraksi air 272,9965 ppm. Pengujian toksisitas menunjukkan bahwa fraksi n-heksana bersifat sangat toksik dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lainnya. Berdasarkan penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa fraksi dan ekstrak etanol daun asoka bersifat toksik.

Kata Kunci: *Ixora coccinea L.*, fenolik, flavonoid, tanin, toksisitas, BLST.

PENDAHULUAN

Tanaman asoka (*Ixora coccinea L.*) merupakan tanaman hias yang cukup populer di kalangan pecinta tanaman hias. Selain sebagai tanaman hias, bagian dari tumbuhan asoka seperti bungayanya dapat digunakan untuk mengobati nyeri haid, disentri, wasir, diabetes, diare. Selain itu, akar tanaman asoka juga dapat dijadikan sebagai pengganti teh herbal. Sementara untuk daun dan batang dimanfaatkan secara tradisional untuk mengobati diare, demam, sakit kepala, obat luka, dan tukak lambung (Jaiswal dkk., 2014).

Pengobatan tradisional kebanyakan menggunakan ramuan tumbuhan berupa akar, kulit kayu, kayu, daun, bunga atau biji. Penelitian seperti farmakologi, toksikologi, identifikasi dan isolasi zat kimia aktif yang terdapat pada tumbuhan diperlukan untuk agar pengobatan tradisional dapat

dipertanggungjawabkan. Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bawah terdapat kandungan kimia pada daun bunga asoka seperti senyawa golongan senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, triterpenoid / steroid, dan fenolik. (Atmaja, 2015). Selain itu, daun asoka juga memiliki aktivitas farmakologis seperti antiinflamasi (Ratnasooriya dkk., 2005), antioksidan (Saha dkk., 2008), dan antibakteri (Annapurna dkk., 2003). Namun masih ada beberapa aspek penelitian yang kurang pada tanaman bunga asoka terutama pada daun.

Dengan adanya senyawa bioaktif pada daun bunga asoka kita bisa dengan mudah menentukan apakah suatu ekstrak mempunyai efek toksik atau efek farmakologis lain yang bermanfaat untuk menentukan adanya efek toksik dan melihat keamanan suatu ekstrak perlu dilakukan pengujian toksisitas. Senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan berpotensi toksik pada dosis tinggi. Prinsip uji toksisitas adalah bahwa komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan bersifat obat jika diberikan pada dosis rendah. Dengan demikian, kemampuan zat-zat bioaktif membunuh organisme hewan dapat digunakan untuk menyeleksi ekstrak tumbuhan yang memiliki bioaktivitas dan juga memonitor fraksi yang bersifat bioaktif saat proses fraksinasi dan pemurnian (Marlinda, 2012).

Uji pendahuluan senyawa aktif pada ekstrak tanaman biasanya dilakukan dengan hewan uji. *Artemia salina* Leach sejenis udang - udangan primitif dapat dimanfaatkan sebagai hewan uji dalam penentuan ketoksikan suatu sari atau senyawa yang diwujudkan sebagai racun. Metode ini dikenal dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Makalalag, 2011). BSLT adalah metode umum untuk pengujian toksisitas akut karena senyawa-senyawa dengan bioaktivitas tertentu dapat bersifat toksik pada larva udang (Kristanti dkk., 2008) dan efek toksiknya dapat ditentukan dalam waktu singkat setelah pemberian dosis uji. Ekstrak uji bersifat toksik jika memiliki nilai *Lethal Concentration-50* (LC₅₀) kurang dari 1000 µg/mL. Biaya yang murah, cepat pengerjaannya, dan hasil yang dapat dipercaya membuat metode ini sering digunakan (Meyer dkk., 1982) Dalam penelitian ini selain uji toksisitas dilakukan juga perhitungan terhadap jumlah total fenolik dan turunannya pada ekstrak etanol dan fraksi n-heksan, etil asetat dan aquades.

BAHAN DAN METODE

Daun asoka diperoleh dari Kelurahan Bahu Kecamatan Malalayang, Bahan kimia meliputi etanol 96%, Akuades, N-heksan, HCL pekat Etil Asetat, Metanol diperoleh dari 7 wira, Manado. Sedangkan telur udang *A. salina*, pereaksi Folin-Ciocalteu, Na₂CO₃, vanillin, Garam tidak beryodium, Asam Galat, Katekin, Kuersetin, Aluminium Klorida, DMSO diperoleh dari Sigma Aldrich.

Preparasi sampel

Daun asoka dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Daun asoka dikeringkan secara alami dan terhindar dari panas matahari secara langsung dan kemudian daun yang telah kering dihancurkan hingga halus dengan blender dan diayak dengan ayakan 60 mesh sehingga diperoleh serbuk daun asoka.

Ekstraksi dan fraksinasi sampel

Serbuk halus daun asoka ditimbang sebanyak 250 g, diekstrak menggunakan etanol 96% dengan cara maserasi selama 3 x 24 jam, disaring, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian dimasukkan dalam oven bersuhu 40°C selama 3 hari. Ekstrak etanol difraksinasi dengan melarutkan 5 g ekstrak dalam 150 ml air suling, dicampurkan dengan 150 mL n-heksana dalam corong pisah, dikocok, dan didiamkan selama 15-30 menit. Fase n-heksana yang terbentuk kemudian dipisahkan. Pekerjaan diulang dengan menambahkan pelarut n-heksana hingga fase n-heksana tampak jernih. Fase air kemudian difraksinasi kembali menggunakan etil asetat sebagai pelarut. Pelarut dalam hasil fraksinasi diuapkan dengan *rotary evaporator* dan dipanaskan selama 2 hari dalam oven bersuhu 40°C dan diperoleh fraksi-fraksi n-heksana, etil asetat, dan air.

Penentuan kandungan total fenolik

Untuk menentukan kandungan total fenolik, diterapkan metode Folin-Ciocalteu (Conde dkk., 1997). Ekstrak etanol sebanyak 0.1 mL dan 500 µg/mL hasil fraksinasi dicampurkan dengan 0.1 mL

reagen Folin-Ciocalteu 50%, dan dihomogenkan dengan vortex. Selanjutnya ditambahkan 2 mL Na_2CO_3 2% dan kembali homogenkan. Campuran kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam ruangan gelap. Pengukuran absorbansi selanjutnya dikerjakan pada λ 750 nm.

Penentuan kandungan total flavonoid

Metode Meda (Rompas dkk., 2016) diterapkan untuk menentukan kandungan total flavonoid. Larutan ekstrak etanol sebanyak 2 mL serta 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fraksi-fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dicampurkan dengan 2 mL AlCl_3 2% yang sebelumnya dilarutkan dalam etanol. Campuran dihomogenkan menggunakan vortex dan selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada λ 415 nm. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin/kg ekstrak.

Penentuan kandungan tanin terkondensasi

Penentuan kandungan tanin dikerjakan mengikuti metode Julkunen-Tiito (1985). Larutan ekstrak etanol sebanyak 0,5 mL serta 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fraksi-fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dicampurkan dengan 1,5 mL vanilin-metanol 4% kemudian dihomogenkan selama 3 menit, dan ditambahkan 0,75 mL asam klorida pekat (37%). Setelah campuran diinkubasi selama 20 menit, absorbansi dibaca pada λ 500 nm. Kandungan tanin terkondensasi dinyatakan sebagai ekuivalen katekin dalam $\mu\text{g}/\text{mL}$ ekstrak.

Uji toksisitas

Untuk pengujian toksisitas (Sirait, 2001), digunakan 10 ekor larva udang *A. salina* Leach berumur 2 hari dan dicampurkan dengan 5 mL larutan uji dalam 3 kali pengulangan. Pengamatan dilakukan pada 6 jam pertama dengan selang waktu 1 jam dan dilanjutkan pada jam ke-12, ke-18, dan ke-24 jam. Jumlah kematian larva udang dihitung pada jam ke-6, 12, 18 dan 24. Penentuan nilai LC_{50} (Keostoni, 1985) dilakukan dengan cara mentransformasi data kematian (%) ke logaritma konsentrasi. Perhitungan kematian udang *A. salina* Leach ditentukan menggunakan persamaan:

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Jika terjadi kematian pada udang kontrol, maka persentase kematian udang dihitung dengan persamaan Abbot:

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\% \text{ kematian pada uji} - \% \text{ kematian pada kontrol}}{100 - \% \text{ kematian pada kontrol}} \times 100\%$$

Perhitungan LC_{50} dikerjakan menggunakan analisis probit dengan mentransformasi data mortalitas (%) ke dalam nilai probit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi sampel

Dalam penelitian ini digunakan sampel daun bunga asoka yang diambil dari Bahu Kecamatan Malalayang. Setelah diambil daun dipisahkan dari pengotornya seperti batang, bunga dan kotoran yang lain, kemudian setelah bersih di keringkan dengan cara diangin – anginkan selama 1 minggu lebih diruangan tertutup. Setelah kering dihaluskan dengan blender kemudian diayak menggunakan ayakan 60 mesh, lalu diperoleh bubuk halus daun asoka sebanyak 460 g.

Rendamen ekstraksi dan fraksinasi

Rendemen dari 250 g serbuk daun asoka dengan 25000 mL larutan etanol 96 % dapat dilihat pada Tabel 1. Sebanyak 250 g serbuk daun asoka diekstrak dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi digunakan karena merupakan cara ekstraksi yang sederhana dengan cara merendam sampel dalam pelarut organik selama beberapa hari pada temperatur ruang. Maserasi juga dipilih karena baik untuk senyawa-senyawa yang tidak tahan panas (Dalimunthe dkk., 2016). Setelah sampel direndam

selama 3 x 24 jam dengan etanol 96 % filtrat yang didapatkan sebanyak 170 mL, berwarna hijau kehitaman. Sesudah filtrat diuapkan dan dikeringkan dalam oven dihasilkan ekstrak kering dengan bobot 46 g yang berwarna coklat kehitaman. Hasil ekstraksi dipengaruhi oleh perbandingan sampel dengan pelarut. Semakin besar perbandingan antara sampel dengan pelarut semakin besar hasil yang diperoleh (Khopkar, 2003). Kemudian ekstrak etanol yang diperoleh dipartisi dengan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda Hasil rendemen partisi dari 5 g ekstrak etanol dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak etanol dan fraksi daun asoka

Sample	Rendemen %
EE	18,4
FNH	10,02
FEA	5,60
FA	35,60

Keterangan: EE (serbuk daun asoka yang diekstraksi dengan etanol), FNH (serbuk daun asoka yang dipartisi dengan n-heksana), FEA (serbuk daun asoka yang dipartisi dengan etil asetat), FA (serbuk daun asoka yang dipartisi dengan air).

Dari Table 1 dapat dilihat bahwa nilai rendemen yang paling tinggi didapatkan dari fraksi aquades, kemudian diikuti oleh fraksi n-heksana dan etil asetat dengan nilai rendemen terendah. Hasil rendemen fraksi menunjukkan banyaknya jumlah senyawa kimia yang dapat terlarut berdasarkan polaritasnya. Dimana n-heksana bersifat non-polar akan melarutkan senyawa non-polar pada sampel, etil asetat bersifat semi polar akan melarutkan senyawa polar dan non-polar pada sampel, dan air bersifat polar akan melarutkan senyawa polar pada sampel. Berdasarkan data Tabel 1 dapat diduga bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun asoka kebanyakan merupakan senyawa polar.

Hasil fraksi yang dihasilkan memiliki warna dan bau khasnya masing-masing dimana pada fraksi aquades dihasilkan fraksi yang berwarna coklat kemerahan, fraksi etil asetat dihasilkan hijau kekuningan dan untuk fraksi n-heksana dihasilkan warna hijau kehitaman hal ini disebabkan karna ekstrak kering yang didapatkan pada maserasi berwarna coklat kehitaman yang sangat pekat dan gelap maka pada saat di fraksi warnanya terkonsentrat sehingga menghasilkan warna baru yang lebih terang. Selain itu karakteristik dari senyawa yang terkandung juga mempengaruhi warna dari setiap ekstrak.

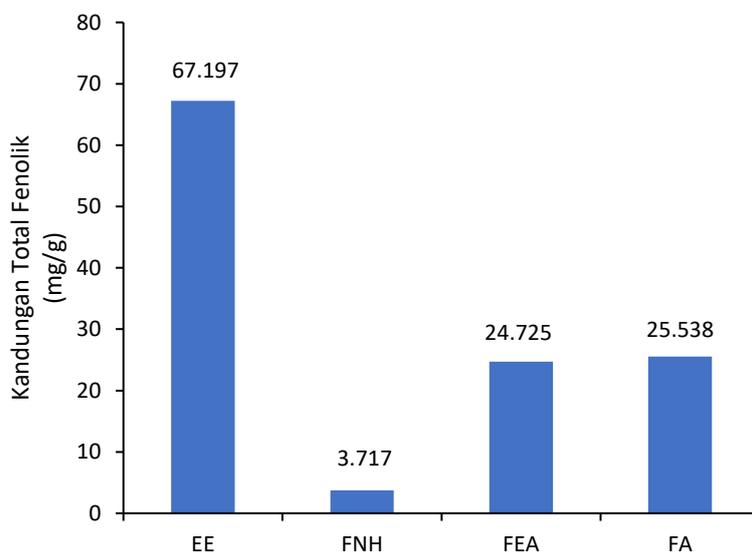
Penentuan kandungan total fenolik

Penentuan kandungan total fenolik dan flavonoid dilakukan untuk mengetahui potensi antioksidan dalam suatu ekstrak (Pratt & Hudson, 1990). Hal ini disebabkan karna sebagian besar antioksidan dalam bahan asal tanaman merupakan senyawa polifenol. karena adanya gugus hidroksil yang ada pada senyawa fenolik yang berfungsi sebagai penyumbang atom hidrogen ketika bereaksi dengan senyawa radikal sehingga fenolik dapat berperan aktif sebagai antioksidan. Hasil analisis kandungan total fenolik pada ekstrak etanol dan fraksi pelarut daun bunga asoka dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa kandungan fenolik daun asoka pada konsentrasi 500 µg/mL tertinggi terdapat pada ekstrak etanol daun asoka dengan nilai 67,197 µg/ml, kemudian diikuti fraksi air dengan nilai 25,538 µg/mL, yang tidak beda jauh dengan fraksi etil asetat 24,725 µg/mL dan diakhiri dengan fraksi n-heksana yang memiliki kandungan fenolik paling sedikit yaitu 3,717 µg/mL. data diatas menunjukkan bahwa senyawa fenolik pada daun bunga asoka lebih mudah larut dalam pelarut yang bersifat polar hal ini dibuktikan pada nilai tertinggi kandungan total fenolik terdapat pada pelarut yang bersifat polar, tingginya kandungan senyawa total fenolik pada fraksi pelarut polar karena pelarut polar yang dapat melarutkan senyawa fenolik (Gumolung, 2018).

Persamaan regresi kurva standar asam galat yang diperoleh, yaitu $y = 0.0205x + 0.1398$, digunakan untuk menghitung kandungan total fenolik yang dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat (GAE, *Gallic Acid Equivalent*). Asam galat dipakai sebagai standar untuk menentukan total fenolik karena senyawa ini adalah fenol alami stabil. Reaksi asam galat dengan reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan perubahan warna menjadi kuning yang menunjukkan bahwa pada sampel tersebut mengandung fenol (Ahmad dkk., 2015). Selama reaksi terjadi, gugus-gugus hidroksil pada senyawa

fenolik bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu dan terbentuk kompleks berwarna biru molybdenumtungsten. Reaksi yang terjadi adalah reaksi reduksi-oksidasi (Tahir dkk., 2016). Selanjutnya, penambahan Na_2CO_3 dilakukan untuk membentuk suasana basa agar dapat menghasilkan larutan berwarna biru yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 750 nm. Demikian hal ini terjadi pada ekstrak sampel daun asoka yang mana sampel berubah menjadi berwarna biru pada saat ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu dan Na_2CO_3 . Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik, semakin pekat warna biru yang muncul (Kusriani & Zahra, 2015).



Gambar 1. Kandungan total fenolik daun asoka. Singkatan sama seperti pada Tabel 1.

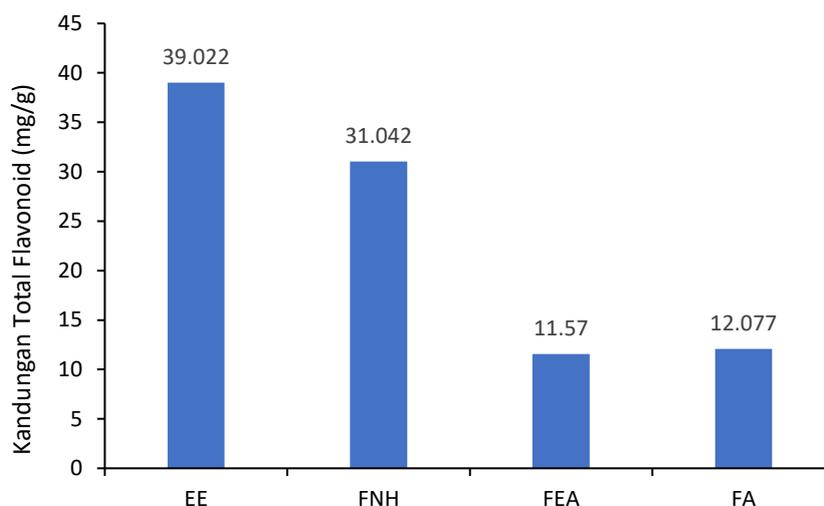
Penentuan kandungan total flavonoid

Senyawa flavonoid dapat ditemukan dalam bentuk pewarna alami seperti merah, kuning dan ungu. Warna dimunculkan oleh sistem konjugasi elektron dalam senyawa aromatik zat tersebut. Flavonoid yang adalah sub bagian dari fenolik (Engka., 2017) dapat memiliki sifat-sifat bioaktif dan memiliki manfaat sebagai antibakteri, antiinflamasi, antialergi, antivirus, antioksidan, antikanker, pelindung struktur sel, antioksidan (Ahmad dkk., 2015). Senyawa ini dapat ditemukan di akar, batang, daun, buah, dan kulit luar batang tumbuhan. Kandungan total flavonoid dalam ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun bunga asoka ditunjukkan pada Gambar 2.

Analisis kandungan total flavonoid dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kandungan flavonoid yang terkandung dalam daun bunga asoka. Gambar 2 memperlihatkan bahwa ekstrak etanol memiliki nilai kandungan total flavonoid tertinggi, diikuti oleh fraksi n-heksana, fraksi aquades, dan fraksi etil asetat. Tingginya kandungan flavonoid pada ekstrak etanol menunjukkan bahwa flavonoid pada daun bunga asoka banyak yang larut dalam pelarut yang bersifat polar, Menurut Gazali dkk., (2019) Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang bersifat polar yang dapat larut dalam pelarut polar juga etanol. kemudian kandungan senyawa flavonoid yang larut pada pelarut nonpolar fraksi n-heksana juga tergolong cukup banyak dengan nilai 31,042 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini terjadi karena terdapat beberapa jenis flavonoid yang dapat larut dalam pelarut nonpolar seperti aglikon polimetoksi atau isoflavon yang gugus gula atau bentuk glikosidanya sudah terlepas sehingga hanya dapat larut dalam pelarut non polar yaitu n-heksana (Markham, 1998).

Kandungan total flavonoid diperoleh dari persamaan regresi kurva standar kuersetin, Konsentrasi kurva baku standar kuersetin menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi, semakin besar konsentrasi larutan baku standar kuersetin maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang dihasilkan pada pengukuran absorbansi, pemilihan kuersetin sebagai standar dikarenakan kuersetin merupakan senyawa golongan flavonoid akan membentuk kompleks jika bereaksi dengan AlCl_3 (Haeria & Andi, 2016). Penambahan AlCl_3 dapat membentuk kompleks asam yang stabil pada flavon atau flavonol (Robinson, 1995) sehingga akan terjadinya pergeseran panjang

gelombang ke arah visible (tampak) yang ditandai dengan larutan menghasilkan warna yang lebih kuning.

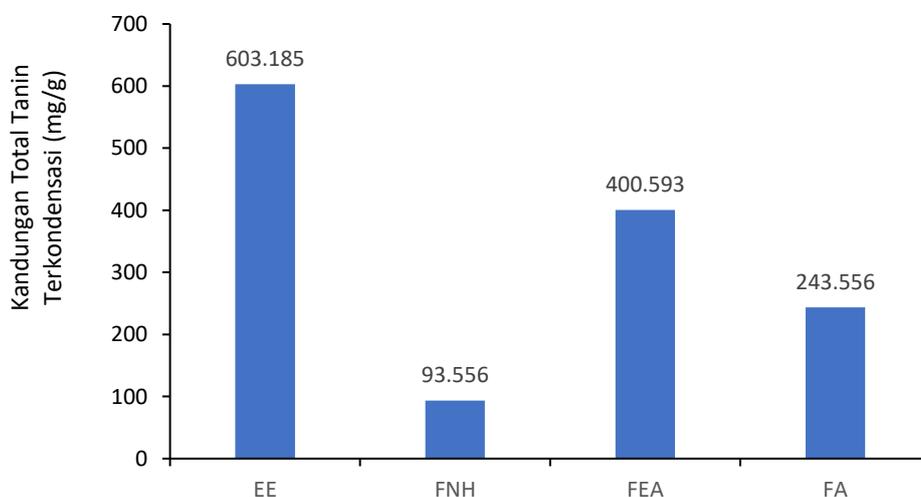


Gambar 2. Kandungan total flavonoid daun asoka. Singkatan sama seperti pada Tabel 1.

Kandungan total flavonoid diperoleh dari persamaan regresi kurva standar kuersetin, Konsentrasi kurva baku standar kuersetin menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi, semakin besar konsentrasi larutan baku standar kuersetin maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang dihasilkan pada pengukuran absorbansi, pemilihan kuersetin sebagai standar dikarenakan kuersetin merupakan senyawa golongan flavonoid akan membentuk kompleks jika bereaksi dengan $AlCl_3$ (Haeria & Andi, 2016). Penambahan $AlCl_3$ dapat membentuk kompleks asam yang stabil pada flavon atau flavonol (Robinson, 1995) sehingga akan terjadinya pergeseran panjang gelombang ke arah visible (tampak) yang ditandai dengan larutan menghasilkan warna yang lebih kuning.

Penentuan kandungan tanin terkondensasi

Untuk menentukan kandungan tanin terkondensasi digunakan metode uji vanillin HCl. Dalam asam, vanillin terprotonasi, terbentuk karbokation, dan kemudian bereaksi dengan flavonoid. Senyawa antara yang terbentuk mengalami reaksi dehidrasi dan terbentuk senyawa berwarna merah atau ungu (Salunkhe dkk., 1990). Sama seperti pengujian flavonoid Pengujian tanin terkondensasi dilakukan untuk mendukung hasil pengujian fenolik karena tanin dan flavonoid merupakan salah satu senyawa fenolik.



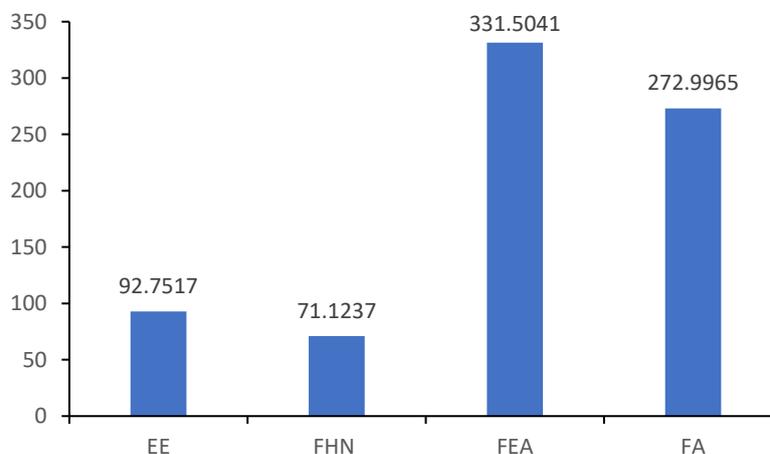
Gambar 3. Kandungan tanin terkondansasi daun asoka. Singkatan sama seperti pada Tabel 1.

Hasil analisis kandungan total fenolik pada ekstrak etanol dan fraksi pelarut daun bunga asoka dapat dilihat pada Gambar 3. Data pada Gambar 3 menunjukkan kandungan tanin terkondensasi tertinggi terdapat dalam ekstrak etanol sama seperti pada uji fenolik dan flavonoid dibandingkan pada fraksi kandungan tertinggi terdapat dalam ekstrak etanol hal ini disebabkan kandungan senyawa yang ada pada ekstrak telah terpisah pada saat dilakukan fraksinasi sesuai dengan kepolaran pelarutnya masing-masing. Selain itu fraksi etil asetat memiliki nilai tertinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya di mana pelarut semipolar mampu menarik senyawa polar maupun non polar. Pelarut non-polar n-heksana dan pelarut polar air hanya mampu menarik senyawa sesuai dengan kepolaran yang sama (Sari dkk., 2022). Tanin sangat mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, dan air (Amelia, 2015). Hal ini terlihat pada hasil penentuan total tanin dalam daun bunga asoka di mana fraksi polar memiliki nilai total tanin terkondensasi yang paling tinggi sedangkan fraksi nonpolar memiliki total tanin terkondensasi yang lebih kecil.

Uji Toksisitas (*Brine shrimp lethality test*)

Konsentrasi yang diuji dalam penelitian ini untuk ekstrak etanol dan fraksi daun asoka adalah 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm. Penelitian ini juga dibuat konsentrasi 0 ppm sebagai kontrol, tanpa penambahan ekstrak. Data hasil pengujian toksisitas dilakukan analisis probit kemudian diolah menggunakan Microsoft Excel untuk mencari regresi linear berdasarkan grafik garis. Dari grafik tersebut didapatkan persamaan $y=ax + b$ dan nilai R^2 .

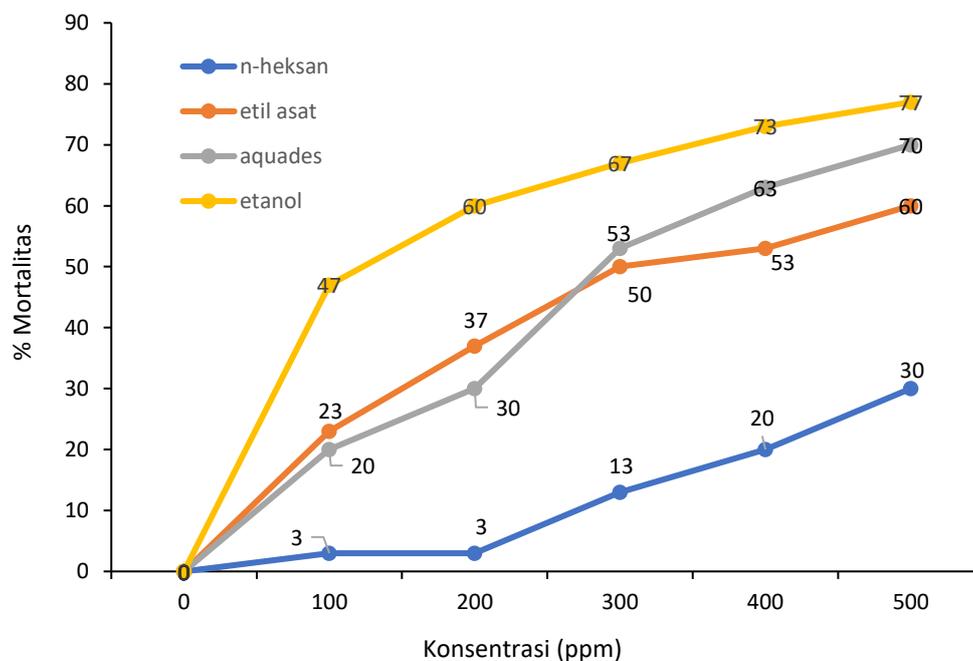
Berdasarkan nilai toksisitas dalam senyawa dari tumbuhan jika $LC_{50} \leq 30$ ppm maka bersifat sangat toksik, ketika konsentrasi ekstrak $31 \text{ ppm} \leq LC_{50} \leq 1000$ ppm bersifat toksik jika $LC_{50} > 1000$ ppm maka bersifat tidak toksik selain itu, menurut McLaughlin dkk., (1991) 30-200 ppm berpotensi sebagai antibakteri sedangkan 200-1000 ppm berpotensi sebagai pestisida. Berdasarkan Gambar 4 menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi daun asoka bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* L. di mana fraksi n-heksana memiliki sifat toksik tertinggi dengan nilai LC_{50} 71.1237 ppm, ekstrak etanol nilai LC_{50} 92.7517 ppm, Fraksi air nilai LC_{50} 272.9965 ppm, dan fraksi etil asetat dengan nilai LC_{50} 331.504 ppm berdasarkan tingkat toksisitas ekstrak etanol, fraksi air dan fraksi etil asetat juga tergolong toksik. Ekstrak yang memiliki sifat toksik saat diuji dengan menggunakan metode BSLT dan dapat menyebabkan kematian 50 % larva artemia dalam waktu 24 jam pada konsentrasi $LC_{50} < 1000$ ppm adalah petunjuk bahwa sampel memiliki potensi sebagai antibakteri, antikanker, antijamur, dan sebagainya (Mayer, 1982). Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa-senyawa flavonoid, fenolik, dan tanin (Muaja, 2013) yang berfungsi menghambat kemampuan larva untuk makan (antifedant). Menurut Cahyadi (2009) cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah sebagai racun perut, sehingga senyawa-senyawa tersebut mengganggu alat pencernaan jika masuk ke dalam tubuh larva. Selain itu, senyawa-senyawa tersebut mampu mengganggu fungsi reseptor perasa di daerah mulut larva sehingga larva gagal mendapatkan rangsangan rasa dan tidak mampu mengenali makanannya dan pada gilirannya menyebabkan larva mati kelaparan.



Gambar 4. Nilai LC_{50} uji toksisitas daun asoka. Singkatan sama seperti pada Tabel 1.

Senyawa flavonoid dan tanin mempunyai mekanisme efek antikanker masing-masing. Menurut Woo dkk., (2013) Kandungan senyawa fenolik, flavonoid dan tanin dalam sel dapat merusak membran sel. Senyawa-senyawa fenolik, flavonoid, dan tanin memiliki gugus -OH yang dapat berikatan dengan protein membran sel dan menghentikan transpor aktif ion-ion Na^+ dan K^+ , dan selanjutnya mengakibatkan tidak terkendalinya pemasukan ion-ion Na^+ dan K^+ dalam sel, pecahnya membran sel dan kematian sel (Scheuer, 1994). Tanin mampu mengendapkan protein karena memiliki gugus fungsi yang dapat membentuk kompleks dengan molekul protein sehingga tanin dianggap merugikan (Makkar, 1993).

Tingkat kematian larva juga berkaitan dengan konsentrasi ekstrak, tidak hanya disebabkan oleh komponen kimia ekstrak. Tingkat kematian larva terhadap konsentrasi ekstrak berbanding lurus. Hubungan konsentrasi ekstrak dan persentase kematian larva udang dapat dilihat pada Gambar 5. Gambar 5 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka semakin tinggi juga persentase kematian larva yang ada. Hasil ini bersesuaian dengan pernyataan Lu (2006) bahwa jika zat kimia diaplikasikan dalam dosis makin besar maka gejala-gejala yang muncul semakin meningkat. Mortalitas larva udang pada ekstrak etanol mencapai 77 %. Dalam ekstrak etanol terdapat lebih banyak senyawa polar, semipolar, dan non polar yang bekerja secara sinergis sehingga memiliki kemampuan toksisitas yang tinggi dibandingkan dengan fraksi yang sudah dipisahkan senyawa-senyawanya berdasarkan tingkat kepolarannya. Diperkirakan perbedaan jenis dan kadar metabolit sekunder yang terekstraksi tersebut sebanding dengan toksisitasnya. (Sartinah, 2020).



Gambar 5. Grafik hubungan konsentrasi dan persentase kematian larva pada ekstrak dan fraksi

Sementara pada fraksi n-heksana selain karena terdapat kandungan senyawa bioaktif flavonoid yang tinggi, sifat dari pelarut n-heksana itu sendiri juga mempengaruhi Tingkat ketoksikan dimana pelarut n-heksana memiliki sifat non polar yang sulit larut pada larutan polar maka saat didiamkan selama 24 jam akan terbentuk dua lapisan. Menurut Kapojos, 2022, dikarenakan sampel yang mempunyai perbandingan dengan tubuh larva udang sehingga tidak bisa menyeimbangi air laut sehingga dapat menyebabkan larva udang sulit untuk menyerap udara dan mencerna atau mengenali makanan yang masuk. hal ini menyebabkan aktivitas toksik n-heksana lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi-fraksi yang lain.

KESIMPULAN

Hasil pengujian toksisitas pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air pada daun asoka bersifat toksik terhadap larva udang dimana dapat menyebabkan 50% kematian pada larva udang. Hasil pengujian toksisitas menunjukkan bahwa LC_{50} pada fraksi n-heksana memiliki sifat toksik tertinggi dengan nilai LC_{50} 71.1237 ppm, kemudian diikuti oleh ekstrak etanol dengan nilai LC_{50} 92.7517 ppm, Fraksi air nilai LC_{50} 272.9965 ppm, dan fraksi etil asetat dengan nilai LC_{50} 331.504 ppm. Pada hasil pengujian total fenolik ekstrak etanol dan fraksi daun asoka total fenolik tertinggi terdapat pada ekstrak etanol dengan nilai 67,197 $\mu\text{g/ml}$. Hasil yang sama juga diperoleh pada pengujian total flavonoid ekstrak etanol memiliki kandungan flavonoid tertinggi yaitu 39.022 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak semntara kandungan tanin terkondensasi tertinggi juga diperoleh pada ekstrak etanol 603.185 $\mu\text{g/ml}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A.R., Juwita, Ratulangi, S.A.D., & Malik, A. 2015. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak metanol buah dan daun patikala (*Etilingera elatior* (Jack). *Pharm Sci Res.* 2(1), 1-10.
- Amelia, F.R. 2015. Penentuan jenis tanin dan penetapan kadar tanin dari buah bungur muda (*Lagerstreomia speciosa* Pers.) secara spektrofotometri dan Permanganometri. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya.* 4(2) ; 1- 20.
- Annapurna, J., Amarnath, P.V.S., Kumar, D.A., Ramakrishna, S.V., & Raghavan, K.V. 2003. Antimicrobial activity of *Ixora coccinea* leaves. *Fitoterapia.* 74(3), 291-293.
- Atmaja, Alexandra Victoria. 2015. Uji aktivitas larvasida ekstrak etanol daun soka (*Ixora javanica* (blume) dc) terhadap larva *Aedes aegypti*. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN.* 4(1).
- Cahyadi, R. 2009. *Uji toksisitas akut ekstrak etanol buah pare (Momordica charantia L.) terhadap larva artemia salina leach dengan metode brine shrimp lethality test (Bst)*. Dissertation, Medical Faculty.
- Dalimunthe, C. I., Sembiring, Y. R. V., Andriyanto, M., Hs Siregar, T., Darwis, H. S., & Barus, D. A. (2016). Identifikasih Dan Uji Metabolit Sekunder Bangun Bangun (*Coleus Ambonicus*) Terhadap Penyakit Jamuyr Akar Putih (*Rigidoporus Microporus*) Dillaboratorium. *Jurnal Penelitian Karet.* 34(2), 189–200.
- Dangeubun, E.J., Katja, D.G., & Kumanaung, M. 2022. Sifat Toksisitas Dan Kemampuan Penghambatan Enzim A-Amilase Dari Ekstrak Biji Buah Matoa (*Pometia Pinnata* J. R & G. Forst). *Chemistry Progress.* 15(1).
- De la Rosa, L.A., J.O., Moreno-Escamilla, J., Rodrigo-Garcia, and E. AlvarezParrilla. 2019. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. Ciudad Juarez, Mexico.
- Depkes. 2012. Riset Kesehatan Dasar Tahun. Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Engka, T. 2017. Penentuan Kandungan Total Fenolik, Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan dari Kuso Mafola (*Drynaria quercifolia* L.). *Pharmac.* 6(1).
- Fikarini Hadi, P., Wahjuningrum, D.A., & Cahyani, F. 2015. Uji toksisitas tanin dari kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) terhadap sel fibroblas BHK-21. *Jurnal Conservative Dentistry.* 5(1), 6-11.
- Gazali, M., Nufus, H., Nurjanah, N., & Zuriat, Z. 2019. The exploration potency of bioactive compounds of leaves extract nipah (*Nypa fruticans* Wurmb) from The Coast of West Aceh as antioxidant. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia.* 22(1), 155-163.
- Gumolung, D. 2018. Analisis kandungan total fenolik pada jonjot buah labu kuning (*Cucurbita moschata*). *Fullerene Journal of Chemistry.* 3(1), 1-4.
- Haeria, H., & Andi, T. U. 2016. Penentuan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Science,* (1), 57-61.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Institut Teknologi Bandung Press, Bandung.
- Indrayani, L., Soetjipto, H., & Sihasale, L. 2006. *Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak*

- Daun Pencut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Journal of Science*. 12, 57-61.
- Jurut, A.M., dan S.A. Santoso. 2019. Uji toksisitas rebusan daun sukun (*Artocarpus altilis*) menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp 29 Lethality Test*). [Karya Tulis Ilmiah]. Akademi Farmasi Putera Indonesia Malang.
- Kapojos, L.V., Fatimah, F., & Kamu, V. S. 2023. Uji toksisitas, kolesterol, dan aktivitas antioksidan minyak ulat sagu (*Rhynchophorus ferrugineus*) sebelum dan sesudah pengolahan. *Chemistry Progress*, 16(2), 133-140 .
- Koestoni, T. 1985. Analisis Probit, Kelompok Peneliti Hama. Balai Penelitian Hortikultura. Lembang.
- Khopkar S.M. 2003. Konsep Dasar Kimia Analitik. Terjemahan dari Basic Concepts of Analytical Chemistry oleh Saptoraharjo. UI-Press, Jakarta.
- Kristanti, A.N. 2008. Buku Ajar Fitokimia. Universitas Airlangga Press, Surabaya.
- Kusriani, R.H., & Zahra, S.A. 2015. Skrining fitokimia dan penetapan kadar senyawa fenolik total ekstrak rimpang lengkuas merah dan rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.). *Prosiding SNaPP: Kesehatan (Kedokteran, Kebidanan, Keperawatan, Farmasi, Psikologi)*. 1(1), 295-302.
- Lu, F.C. 1995. *Toksikologi Dasar: Organ, Sasaran, dan Penilaian Resiko*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Makkar, H. P. S. 1993. Antinutritional Factor in Food for Livestock in Animal Producing in Developing Country. British Society of Animal Production. England.
- Markham, K.R. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavanoid. Terjemahan Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Marlinda. 2012. Analisis senyawa metabolit sekunder dan uji toksisitas ekstrak etanol bijibuah alpukat (*Persea americana* Mill.). *Jurnal Mipa UNSRAT online*. 1(1), 24 -28.
- Makalalag, A. 2011. Skrining fitokimia dan uji toksisitas akut ekstrak etanol daun turi (*Sesbania Gandiflora Pers*). (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UNSRAT, Manado.
- Meyer, H.N. 1982. Brine shrimp lethality test. *Journal Med. Plant Research*. 1(45), 31-34.
- Miller AL. 1996. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev* 1, 103-111.
- Muaja, A.D., Koleangan, H.S., & Runtuwene, M.R. 2013. Uji toksisitas dengan metode BSLT dan analisis kandungan fitokimia ekstrak daun soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan metode soxhletasi. *Jurnal MIPA*. 2(2), 115-118.
- Pérez-Jiménez, J. & Torres, J.L. 2011. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(24), 12713-12724.
- Pratt, D.E and Hudson, B.J.F. 1990. Food Antioxidant. Elsevier. London
- Priyanto, 2009. *Toksikologi Mekanisme, Terapi Antidotum, dan Penilaian Resiko*. Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi Indonesia (LESKONFI), Jakarta.
- Purwokusuma, W., 2007. *Artemia salina (Brine shrimp)*.
- Ratnasooriya, W.D., Deraniyagala, S.A., Galhena, G., Liyanage, S.S.P., Bathige, S.D.N.K., & Jayakody, J.R.A. C. 2005. Anti-inflammatory activity of the aqueous leaf extract of ixora coccinea. *Pharmaceutical Biology*. 43(2), 147-152.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. ITB, Bandung.
- Rukmana Rahmat. 2003. Soka. Kanisius, Yogyakarta.
- Saha, M.R., Alam, M.A., Akter, R., & Jahangir, R. 200). In vitro free radicalscavenging activity of *Ixora coccinea* L. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 3(2), 90-96.
- Salunkhe, D.K.; Chavan J.K., Kadam S.S. 1990. *Dietary Tannins Consequences and Remedies*. CRC Press, Boca Raton.
- Sari, A.K., Rizki, M.I., Auliani, S., & Khirunnisa, A. 2022. Penetapan kadar flavonoid total dan nilai sun protection factor (spf) fraksi ekstrak etanol daun cempedak (*Artocarpus Integer*), *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 7(4), 759-768.
- Sartinah, A., Ihsan, S., Kasmawati, H., Andriyani, R., Adjeng, A.N.T., & Arba, M. 2020. Radical scavenging assay and determination Flavonoid and Phenolic total of extract and Fractions of

- Raghu bark (*Dracontomelon dao* (Blanco) Merr). *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 13(5), 2335-2339.
- Scheuer, J.S. 1994. *Produk Alami Lautan*. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Simangunsong, G. 2018. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) terhadap *Arthemisia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). [Karya Tulis ilmiah]. Farmasi. Politeknik Kesehatan Kemenkes Medan.
- Sirait, M. 2001. *Pengembangan Obat Bahan Alam*. Edisi ke-4. Perhimpunan Peneliti Bahan Obat, Jakarta.
- Su, D., Zhang, R., Hou, F., Zhang, M., Guo, J., Huang, F., Deng, Y., & Wei, Z. 2014. Comparison of the free and bound phenolic profiles and cellular antioxidant activities of litchi pulp extracts from different solvents. *Biomedcentral Complementary & Alternative Medicine*. 14, 1-10.
- Suryanto, E. 2018. *Kimia Antioksidan*. Patra Media Grafindo, Bandung.
- Syaepudin, A.P. 2010. *Magnoliopsida "Bunga Asoka"*. IAIN Syekh Nurjati Cirebon.
- Tahir, M., Cahya, A., & Widiastuti, H. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan Buah Semangka (*Citrullus Lanatus*) Dengan Metode Frap. *As-Syifaa*. 8(1), 31-38.
- Patra, A. K., & Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *J. Phytochemistry*. 71, 1198-1222.
- Woo, H. D., & Kim, J. 2013. Dietary Flavonoid Intake and Risk of Stomach and Colorectal Cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 7, 1011-1019.
- Wulandari, A., Bahri, S., & Mappiratu, M. 2018. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol sabut kelapa (*Cocos nucifera* Linn) pada berbagai tingkat ketuaan. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*. 4(3), 276-284.