

SKRINING FITOKIMIA DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL DAUN BROTOWALI (*Tinospora crispa* (L.) Hook F. & T) DENGAN METODE *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Yoma Seivia F. Tarukbua¹⁾, Edwin De Queljoe¹⁾, Widdhi Bodhi²⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

Brotowali provides many benefits, one of which is to kill cancer cells. Research on natural substances suspected of potentially as medicinal as well as empirically has been used by society as a drug begins with pre-clinical test. This study aims to determine the active compound contained in the brotowali leaf and determine the LC₅₀ value of Artemia salina Leach larvae after giving ethanol extract of brotowali leaves. Phytochemical screening included alkaloid, flavonoid, tannin, and saponin tests based on the Harborne method and toxicity test of brotowali leaf extract using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). The results showed that brotowali leaves had alkaloid, flavonoid, tannin, and saponin compounds, and had Lethality Concentration (LC₅₀) value of 62.75 µg / mL.

Keywords: *Brotowali leaves, phytochemical scheme, toxicity, BLST, LC₅₀.*

ABSTRAK

Brotowali memberikan banyak manfaat, salah satunya yaitu dapat mematikan sel kanker. Penelitian bahan alam yang diduga berpotensi sebagai obat maupun secara empiris telah digunakan masyarakat sebagai obat diawali dengan uji pre-klinis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terkandung dalam daun brotowali dan menentukan nilai LC₅₀ larva *Artemia salina* Leach setelah pemberian ekstrak etanol daun brotowali. Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin yang berdasar pada metode Harborne dan uji toksisitas ekstrak kental daun brotowali menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil penelitian menunjukkan daun brotowali mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, serta saponin, dan memiliki nilai toksisitas *Lethality Concentration* (LC₅₀) sebesar 62,75 µg/mL.

Kata kunci : Daun brotowali, skrinning fitokimia, toksisitas, BLST, LC₅₀.

PENDAHULUAN

Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook F. & T) yang dikenal sebagai tanaman obat yang berasal dari Asia Tenggara. Di Indonesia brotowali banyak ditemukan di Pulau Jawa, Bali, dan Ambon. Tanaman ini dapat ditemui tumbuh liar di hutan atau ladang. Penyebarannya terutama di daerah berkawasan tropis. Brotowali justru menyukai tempat yang agak panas (Muhlisah dan Ir. Fauziah, 2007).

Tercatat ada beberapa efek farmakologis dari brotowali sehingga dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Brotowali dapat memberikan efek farmakologis, yaitu analgesik, anti-inflamasi, antikoagulan, tonikum, antiperiodikum, dan diuretikum (Kresnady, 2003).

Penelitian bahan alam yang diduga berpotensi sebagai obat maupun secara empiris telah digunakan masyarakat sebagai obat, diawali dengan uji pre-klinis. Metode uji toksisitas dapat dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo*. Salah satu metode toksisitas *in vitro* yang sering digunakan adalah metode *Brine Shrimp Letality Test* (BSLT) (Franky *et al.*, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terkandung di dalam daun brotowali dan mengetahui berapa besar nilai toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach melalui uji BSLT sehingga diharapkan dapat dikembangkan sebagai obat antikanker.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2018- Juni 2018 di Laboratorium Farmakologi Program Studi Farmasi Universitas Sam Ratulangi Manado.

Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test-Only Control Group Design*. Perlakuan dengan pemberian ekstrak daun brotowali terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ayakan mesh 200, mixer, batang pengaduk, gelas ukur (*Pyrex*), Erlenmeyer (*Pyrex*), tabung reaksi (*Pyrex*), pipet tetes, pot gel, corong, ayakan *mesh* 200, pisau, timbangan analitik (aeADAM[®]), mixer (*Philips*), sudip, beker gelas (*Pyrex*), hot plate (NESCO[®]Lab), cawan petri (*Pyrex*), *aluminium foil*, kertas saring whatman 42, kertas lebel, spritus, *Rotary evaporator*, Labu takar (*Pyrex*), oven, rak tabung reaksi, Pot salep, Toples, Lampu.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ialah daun brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook F. & T), aquades, FeCl₃, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf, pereaksi wagner, amonia, asam klorida, serbuk magnesium, asam sulfat, Etanol 96 %, kloroform, telur larva udang *Artemia Salina* Leach, garam non yodium.

Pengambilan dan Persiapan sampel

Bahan yang digunakan sebagai sampel ialah daun brotowali yang diambil di desa Amurang, Minahasa Selatan, Sulawesi

Utara. Selanjutnya sampel dibersihkan dan dikering anginkan hingga sampel kering. Setelah kering sampel diblender hingga sampel menjadi halus lalu diayak dengan mesh 200.

Ekstraksi Daun Brotowali

Ekstraksi bahan aktif dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Serbuk daun brotowali ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam baker glass, kemudian ditambahkan pelarut hingga volume akhir mencapai 500 mL dengan perbandingan 1 : 5 (w/v) selama lima hari. Hasil maserasi kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 42 sehingga dihasilkan filtrat dan residu. Perendaman dilakukan 1 kali remaserasi. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40⁰ C hingga diperoleh ekstrak kental berupa pasta.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin yang berdasar pada metode Harborne.

Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL kloroform secukupnya dan 10 mL amonia lalu ditambahkan 10 tetes H₂SO₄. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga membentuk 2 lapisan. Lapisan H₂SO₄ dipindahkan dalam 3 tabung reaksi dengan volume masing-masing 2,5 mL. Ketiga larutan diuji dengan pereaksi Meyer, Dragendorff dan Wagner.

Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL etanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg.

Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air panas, kemudian ditetesi menggunakan besi (III) klorida.

Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL akuades kemudian dikocok kuat selama kurang lebih 1 menit. Selanjutnya didiamkan selama 10 menit dan diamati buih atau busa yang terbentuk.

Penyiapan Larva *Artemia salina* Leach

Penyiapan telur *Artemia salina* dilakukan dengan cara merendam sebanyak 30 mg telur *Artemia salina* dalam wadah berisi air laut buatan dibawah cahaya lampu 25 watt. Telur *Artemia salina* akan menetas dan menjadi larva setelah 24 jam.

Larva *Artemia salina* yang baik digunakan untuk uji BSLT yaitu yang berumur 48 jam sebab jika lebih dari 48 jam dikhawatirkan kematian *Artemia salina* bukan disebabkan toksisitas melainkan terbatasnya persediaan makanan.

Pembuatan Konsentrasi Sampel Uji

Konsentrasi Larutan uji BSLT adalah 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/ml, dan 0 µg/mL (sebagai kontrol negatif). Untuk pembuatan larutan stok ekstrak kental etanol 96% ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan kedalam air laut sebanyak 50 mL, hingga diperoleh konsentrasi larutan stok 1000 µg/ml.

1. Larutan konsentrasi 1000 µg/mL adalah larutan stok 50 mL.
2. Larutan konsentrasi 500 µg/mL dibuat dengan cara diambil 25 mL larutan stok dan ditambahkan air laut sampai batas 50 mL.
3. Larutan konsentrasi 250 µg/mL dibuat dengan cara diambil 25 mL larutan 500 µg/mL dan ditambahkan air laut sampai batas 50 mL.
4. Larutan konsentrasi 100 µg/mL dibuat dengan cara diambil 20 mL larutan 250 µg/mL dan ditambahkan air laut sampai batas 50 mL.
5. Larutan konsentrasi 10 µg/mL dibuat dengan cara diambil 5 mL larutan 100 µg/mL dan ditambahkan air laut sampai batas 50 mL.
6. Larutan (kontrol negatif) dibuat dengan cara diambil 50 mL air laut.

Pelaksanaan Uji Toksisitas

Pada uji toksisitas masing-masing konsentrasi dilakukan 3 pengulangan dengan tiap kelompok memiliki 10 ekor larva *Artemia salina*. Disiapkan wadah untuk pengujian pada masing-masing konsentrasi ekstrak sampel membutuhkan 3 wadah dan 1 wadah sebagai kontrol. Selanjutnya, pada tiap konsentrasi larutan dimasukkan 10 ekor

larva *Artemia salina*. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva *Artemia salina*, dimana setiap konsentrasi dilakukan 3 pengulangan dan dibandingkan dengan kontrol. Kriteria standar untuk menilai kematian larva *Artemia salina* yaitu bila larva tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik observasi.

Analisis Data

Data hasil penelitian akan diolah dan disajikan dalam bentuk table dan grafik. Data dari uji toksisitas akan dianalisis dengan analisis regresi linier menggunakan *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) 23 untuk menentukan nilai LC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan Simplisia

Daun Brotowali yang digunakan, diperoleh dari pekarangan penduduk desa Amurang, kabupaten Minahasa. Dalam penelitian ini daun yang digunakan adalah daun pucuk, muda hingga daun tua.

Sebelum dijadikan simplisia, daun brotowali melewati tahap sortasi, pencucian dan pengeringan. Tujuan dilakukan sortasi adalah untuk memisahkan antara daun dan tangkai. Pencucian dilakukan menggunakan air yang mengalir untuk memisahkan kotoran dan partikel-partikel yang menempel pada daun. Pengeringan dilakukan dengan cara dikering-anginkan pada suhu kamar agar kadar air dalam daun berkurang sehingga daun tidak mengalami pembusukan.

Setelah daun kering, daun dihaluskan menggunakan blender dan di ayak dengan menggunakan ayakan mesh 200 agar

diperoleh serbuk yang homogen. Serbuk yang dihasilkan sebesar 100 gr.

Ekstraksi

Serbuk kering diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol selama 5 hari dan dilakukan remaserasi selama 2 hari. Maserasi sampel dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96% karena sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar, dan non polar serta dapat bertindak sebagai pelarut dan pengawet sehingga zat yang diinginkan dapat terekstraksi serta tahan lama dan tidak mudah ditumbuhi jamur.

Alasan pemilihan metode maserasi karena mempunyai banyak keuntungan dibandingkan metode lainnya. Keuntungan utamanya yaitu, prosedur dan peralatan yang

sederhana, metode ekstraksi maserasi tidak dipanaskan sehingga bahan alami tidak terurai. Ekstraksi dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi. Saat proses maserasi akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna (Heinrich, 2004 ; Harborne, 1987).

Skrining Fitokimia

Pengujian fitokimia menggunakan metode Harborne (1987) dengan pengujian 4 senyawa kimia yaitu alkaloid, flavonoid, tannin, saponin. Hasil skrining fitokimia ekstrak kental daun brotowali dapat dilihat pada Tabel 1.

Uji senyawa		Perubahan positif	Perubahan terjadi	Hasil Pengujian
Alkaloid	Meyer	Endapan putih Merah jingga cokelat	Hijau keruh	-
	Dragendroff		Merah jingga	+
	Wagner		cokelat	+
Flavonoid		Merah coklat	Merah coklat	+
Tanin		Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	+
Saponin		Terbentuk buih atau busa selama 10 menit	Terbentuk buih atau busa selama 10 menit	+

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Daun Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook F. & T)

Skrining fitokimia dilakukan untuk memberikan gambaran golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman. Uji yang dilakukan menunjukkan hasil positif pada semua pengujian yaitu alkaloid, flavonoid, tannin, dan saponin.

Pada uji alkaloid, tanaman brotowali menunjukkan hasil positif pada pereaksi Dragendroff dan Wagner, namun negatif pada pereaksi Meyer. Pereaksi meyer yang positif menunjukkan adanya endapan putih pada tabung reaksi, namun dalam penelitian, ekstrak kental daun brotowali menunjukkan

warna hujau keruh. Tanaman dikatakan mengandung alkaloid jika reaksi positif yang terbentuk jika sekurang-kurangnya terdapat endapan dengan menggunakan dua golongan larutan percobaan yang digunakan sehingga dalam penelitian ini daun brotowali positif mengandung alkaloid. Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun brotowali dapat memberikan efek farmakologi pada manusia sehingga dapat dilakukan untuk penelitian lebih lanjut (Depkes RI, 1995).

Robinson dalam Sangi *et al.* (2012), menyatakan bahwa penambahan serbuk magnesium dan asam klorida pada flavonoid akan menyebabkan tereduksinya senyawa flavonoid yang ada sehingga menimbulkan reaksi warna merah yang merupakan ciri adanya flavonoid pada sampel.

Pengujian tanin dilakukan dengan penambahan besi (III) klorida yang bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada tannin. Fungsi besi (III) klorida adalah menghidrolisis golongan tannin sehingga akan menghasilkan perubahan warna biru kehitaman dan hijau kehitaman (Sangi *et al.*, 2012).

Menurut Robinson (1995) senyawa yang memiliki gugus polar dan non polar bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air dapat membentuk misel. Pada struktur misel, gugus polar menghadap

ke luar sedangkan gugus non polarnya menghadap ke dalam, keadaan inilah yang tampak seperti busa.

Uji toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethaly Test* (BSLT)

Uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethaly Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach dengan menentukan nilai LC₅₀ pada aktifitas senyawa yang terkandung dalam tanaman.

Pengujian dilakukan terhadap ekstrak etanol 96% dengan menggunakan air laut buatan dengan cara melarutkan 20 gr garam non yodium ke dalam 1 liter akuades. Setelah 48 jam perendaman, telur menetas dan menghasilkan larva *Artemia salina* Leach yang siap digunakan dalam pengujian. Pengujian dilakukan dengan menggunakan air laut buatan dikarenakan, saat penelitian berlangsung telur tidak dapat menetas pada air laut asli setelah 3 hari perendaman telur lalu dilakukan penggantian dengan air laut buatan kemudian larva menetas (Sangi *et al.*, 2006).

Setelah larva berumur 48 jam, larva dipindahkan pada wadah dan diberikan perlakuan dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 100, 10 $\mu\text{g/mL}$ dan konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$ sebagai kontrol dan diulang sebanyak tiga kali.

Tabel 2. Persentase Kematian Larva Udang *Artemia Salina* Leach

Pengujian	Kontrol Negatif	Jumlah Kematian Setiap Konsentrasi				
		10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
1	0	3	10	10	10	10
2	0	5	9	10	10	10
3	0	6	7	10	10	10
Total mati	0	14	26	30	30	30
Rata- rata	0	4,6	8,6	10	10	10
Presentase Kematian	0	46%	86%	100%	100%	100%

Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa presentase larva mati tertinggi ada pada konsentrasi 1000, 500, 250 $\mu\text{g/mL}$ dan presentase terendah pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ dan diperoleh hasil LC_{50} sebesar 62.75 $\mu\text{g/mL}$ dengan menggunakan analisis probit pada perhitungan SPSS 23. Hasil ini menyatakan bahwa ekstrak etanol daun brotowali bersifat toksik sesuai dengan tingkat toksisitas menurut Meyer *et al.* (1982), yaitu :

Tabel 3. Tingkat toksisitas menurut Meyer.

Kategori	LC_{50} (ppm)
Sangat toksik	<30
Toksik	30 - 1000
Tidak toksik	>1000

Menurut Meyer *et al.* (1982) suatu senyawa uji dikatakan bersifat toksik dan berpotensi sebagai kandidat antikanker pada pengujian Brine Shrimp Lethality Test (BST) jika memiliki nilai LC_{50} lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Kematian hewan uji *Artemia salina* disebabkan adanya senyawa yang masuk ke

dalam tubuh hewan uji melalui difusi dan transport aktif. Kemudian senyawa tersebut akan menyebabkan terjadinya kerusakan pada permeabilitas membran sehingga dapat mengacaukan transport ion dan menyebabkan penurunan produksi ATP dan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut *Artemia salina*. Dalam hal ini, senyawa - senyawa tersebut menghambat daya makan dengan cara bertindak sebagai racun perut atau stomach poisoning, yaitu sebuah interaksi penyerangan yang dapat membunuh suatu hewan uji dengan menyerang sistem pencernaan. Senyawa-senyawa tersebut masuk melalui saluran pencernaan dan menyebabkan alat pencernaan menjadi terganggu (Connell dan Miller, 1995 ; Nguyen *et al.*, 1999).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa metabolit sekunder yang terkandung dalam Ekstrak etanol daun brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook F. & T) yaitu Alkaloid, Flavonoid, Tanin dan Saponin, dan ekstrak etanol daun brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook F. & T) memiliki nilai LC_{50} sebesar 62, 75 $\mu\text{g/mL}$.

SARAN

Diharapkan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa sitotoksik tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat alternatif antikanker mengingat bahwa daun brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook F. & T) bersifat toksik.

DAFTAR PUSTAKA

- Connel, D.W., dan Gregory J. Miller. 1995. *Kimia Dan Ekotoksikologi Pencemaran*. UI-Press. Jakarta
- Depkes RI. 1995. *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Franky., Roslizawaty., Pertiwi, D. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Sarang Semut Lokal Aceh (*Mymercodia sp.*) Dengan Metode Bslt Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Medika Veterinari*. **8(1)** : 60-62.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia. Terbitan II*. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro. ITB, Bandung
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. 2004. *Fundamental of Pharmacognosy and Phytotherapi*. Hungary, Elsevier
- Kresnady, B. 2003. *Khasiat dan Manfaat Brotowali*. PT Argomedia Pustaka, Jakarta.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putman, J. E., Jacobsen, L. B., Nicols, D. E., and McLaughlin, J. L. 1982. *Brine Shrimp : A Comvenient general Bioassay For Active Plant Constituents*. Plant Medica.
- Muhlisah, dan Ir. Fauziah. 2007. *Tanaman Obat Keluarga (TOGA)*. Jakarta, PT. Seri Agri Sehat.
- Nguyen H.H, Widodo S. Momordica L. 1999. In: Medicinal and Poisinous Plant Research of South-East Asia 12. De Padua L. S. N. Bunyaphatsana and R. H. M. J. Lemmens (eds.). *Pudoc Scientific Publisher*. Wageningen, the Netherland. p.353-359.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padnawinata. ITB, bandung.
- Sangi, M. S., L. I. Momuat & M. Kumaunang. 2012. Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arenga pinnata*). *J. Ilmiah S*. **12**: 128-134.