

Uji Toksisitas Ekstrak Daun Tapak Dara (*Catharantus roseus L.*) Menggunakan Metode BSLT Dengan Variasi Perbedaan Pelarut Ekstraksi

Vera Dewi^{1*)}, Akhmad Al-Bari², Titi Agni Hutahaen³

^{1,2,3}Program Studi Farmasi, Universitas Nahdlatul Ulama Sunan Giri

^{*)}E-mail: 1120180100@kelasonline.unugiri.ac.id

Info Artikel

Sejarah Artikel :

Diterima :

30 Des 2022

Disetujui :

08 Jan 2023

Dipublikasikan :

31 Jan 2023

Kata Kunci:

Toksisitas, Tapak Dara,
BSLT, pelarut

Keywords:

Toxicity, Tapak Dara,
BSLT, Solvent

Abstrak

Latar belakang: Tanaman *Catharantus roseus L.*, yang juga dikenal sebagai tapak dara, diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Namun, meskipun telah diakui, dosis yang efektif dan aman belum sepenuhnya dipahami. Oleh karena itu, dalam penggunaannya harus dilakukan dengan hati-hati karena kandungan alkaloid dalam tanaman ini dapat menyebabkan efek toksik. Meskipun alkaloid bertindak sebagai penangkal racun dalam tubuh, jika dikonsumsi dalam jumlah berlebihan, dapat menjadi beracun. Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan tingkat toksisitas antara ekstrak daun tapak dara yang diperoleh menggunakan pelarut etanol dan n-heksan. **Metode:** Uji toksisitas akut dilakukan pada larva *Artemia salina* Leach dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Potensi toksisitas suatu senyawa dapat diukur berdasarkan jumlah total kematian hewan uji dan kemudian dianalisis dengan menggunakan metode probit dalam software SPSS. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai LC_{50} ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan daun tapak dara adalah 154,886 ppm dan 66,949 ppm, masing-masing. **Simpulan:** Ekstrak n-heksan daun tapak dara lebih toksik daripada ekstrak etanol daun tapak dara.

Abstract

Background: *Catharantus roseus L.*, also known as Madagascar periwinkle, is known to possess antioxidant and antibacterial activity. However, although its benefits have been recognized, the effective and safe dosage has not been fully understood. Therefore, caution must be taken in its usage as the plant contains alkaloids that can cause toxic effects. While alkaloids act as counteracting agents to poisons in the body, excessive consumption can be poisonous. This study was conducted to compare the toxicity levels between extracts of *Catharantus roseus* leaves obtained using ethanol and n-hexane solvents. **Method:** Acute toxicity testing was carried out on *Artemia salina* Leach larvae using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method. The potential toxicity of a compound can be measured based on the total number of test animal deaths and then analyzed using the probit method in the SPSS software. **Results:** The results of the study showed that the LC_{50} values for the ethanol and n-hexane extracts of *Catharantus roseus* leaves were 154.886 ppm and 66.949 ppm, respectively. **Conclusion:** The n-hexane extract of *Catharantus roseus* leaves is more toxic than the ethanol extract.

PENDAHULUAN

Tapak dara (*Catharantus roseus L.*) merupakan tanaman yang umumnya digunakan sebagai tanaman hias di sekitar kita. Tanaman ini banyak ditemukan di Indonesia dan dapat tumbuh liar atau dibudidayakan sebagai tanaman hias. Tanaman tapak dara memiliki batang kayu dengan segmen dan bentuk yang bulat, sedangkan daunnya berbentuk seperti telur. Bunga tapak dara adalah bunga majemuk yang tumbuh dari ketiak daun, dan buahnya berbentuk silindris. Berbagai penelitian telah dilakukan

untuk meneliti kandungan dan manfaat dari tanaman tapak dara, termasuk efek anti-hiperglikemik, anti-diabetes, pengurangan stres oksidatif, dan efek antibakteri dari tanaman ini (Purbosari & Puspitasari, 2018).

Hasil analisis fitokimia dari ekstrak daun tapak dara menunjukkan bahwa kandungan dalam daun tapak dara terdiri berbagai macam metabolit sekunder seperti seperti alkaloid, terpenoid, fenol, tanin, saponin, kuinin, dan sterol (Kabesh et al., 2015). Vincristine dan vinblastine merupakan kandungan dari daun tapak dara yang tidak hanya memiliki efek antikanker, namun juga memiliki efek toksik yang bermanfaat untuk beberapa jenis penyakit (Dewi & Saraswati, 2009). Tidak hanya itu, vinca alkaloid dalam tapak dara juga berfungsi sebagai agen antimitotik yang berefek serupa kolchisin dalam replikasi kromosom (Amilin et al., 2022).

Untuk mengetahui apakah suatu tanaman memiliki senyawa sebagai agen antikanker, maka perlu diadakan penelitian awal dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini melibatkan penggunaan udang artemia sebagai organisme uji untuk menguji sitotoksitas senyawa yang terkandung dalam tanaman. Jika hasil uji diperoleh nilai LC_{50} maka ekstrak tersebut dapat digunakan sebagai skrining awal sitotoksik atau senyawa yang berpotensi sebagai agen antikanker. Jika nilai $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/ml}$, maka ekstrak dianggap memiliki toksisitas, sedangkan untuk senyawa murni dianggap memiliki toksisitas jika nilai $LC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ (Fajarningsih et al., 2006).

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi akan menghasilkan hasil senyawa yang terekstrak berbeda-beda (Firdiyani et al., 2015). Penggunaan pelarut non polar seperti aseton dalam ekstraksi kakao dapat menghasilkan nilai LC_{50} yang sangat tinggi yakni sebesar 24,69 ppm. Nilai tersebut adalah menunjukkan bahwa aktivitas senyawanya sangat toksik (Chusniasih & Tutik, 2020). Penelitian lain menggunakan pelarut fraksi etil asetat, fraksi metanol, dan asetat dalam ekstraksi buah tampoi menunjukkan bahwa Fraksi etil asetat dan fraksi metanol menunjukkan aktivitas toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 78,458 ppm dan 111,985 ppm. Pada kasus tersebut dapat dilihat bahwa penggunaan pelarut non polar diduga kuat dapat menyarikan metabolit sekunder yang terdapat dalam simplisia lebih cenderung ke senyawa-senyawa yang toksik (Ningdyah et al., 2015).

Seperti yang telah diketahui bahwa suatu sampel yang mengandung metabolit sekunder nilai $LC_{50} < 1000 \text{ ppm}$ dapat dianggap memiliki potensi sebagai antikanker, antibakteri, dan antijamur (Rachim et al., 2020). Oleh karena itu, metode BSLT dapat digunakan sebagai salah satu metode awal dalam menguji toksisitas dan aktivitas biologis potensial dari sampel-sampel tersebut. Keberadaan tingkat toksisitas dengan metode BSLT ini akan memberikan informasi bagi penelitian selanjutnya untuk mengembangkan ekstrak sebagai bahan antikanker termasuk dalam pengujian kandungan yang terdapat dalam tapak dara yang telah dilakukan dalam penelitian ini.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Dalam penelitian ini, bahan-bahan yang digunakan adalah akuades, Telur larva *Artemia salina* Leach, Garam dapur, Etanol dengan konsentrasi 95%, Etanol sebanyak 70%, Aluminium foil, Kertas pH universal, soda kue, serta bahan utamanya adalah daun tapak dara, kertas penyaring, tiga jenis pereaksi yaitu mayer, bouchardat, dan dragendorf, alkohol, asam klorida dengan konsentrasi 2N, Asam klorida pekat, Asam asetat anhidrat, pereaksi besi (III) klorida, Serbuk magnesium, Asam sulfat pekat, N-heksan, dan Etil asetat. Sedangkan alat yang digunakan meliputi Bohlam lampu dengan daya 40 watt, Toples berbahan kaca, Vial, Cawan porselin, Cawan petri, Pipet tetes, penangas air, Corong Buchner, Blender, Pengayak dengan ukuran mesh 60, Mikropipet merek Vitlab, Neraca analitik merek Ohaus, Botol plastik, Aerator, Kaca pembesar merek Joy Art MF60, Lampu UV, Chamber, dan Hair dryer.

Ekstraksi Daun Tapak Dara

Daun tapak dara diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:4 dan hasil ayak 60 mesh, selama tiga hari dengan pelarut etanol 96% yang sebelumnya telah diangin keringkan pada suhu 40°C. Serbuk halus daun dimasukkan ke dalam toples dan direndam selama tiga hari, dengan pengulangan tiga kali. Setelah itu, filtrat dan ampas dipisahkan dengan menggunakan kertas saring. Ampas direndam ulang dan dipisahkan kembali menggunakan kertas saring. Filtrat dari ketiga proses digabungkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk menghasilkan ekstrak yang kental. Ekstraksi kemudian diulangi dengan menggunakan pelarut yang berbeda yakni pelarut n-heksana.

Penyiapan Media Uji BSLT

Penetasan Larva

Penetasan *Artemia salina* Leach dilakukan dengan menyiapkan kotak yang dibagi menjadi 2 sekat dan diisi dengan air laut. Salah satu sisi kotak ditutup aluminium foil, lalu ditempatkan di bawah lampu UV selama 48 jam. Setelah larva udang berumur 48 jam dan menembus daerah terang, larva udang siap digunakan dalam pengujian

Penyiapan Larutan Kontrol dan Uji

Untuk larutan kontrol, larutan uji tidak ditambahkan ekstrak. Selanjutnya, 10 ml air laut buatan dan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dimasukkan ke dalam vial. Sedangkan, larutan induk dibuat dari 20mg ekstrak yang dilarutkan dalam 10 ml aquadest dengan kadar 2000 ppm/ml. Sampel uji disiapkan dengan konsentrasi 2000, 1000, 500, 100, 50, 20, 10, dan 0 ppm. Blanko dibuat dengan mencampur 9ml air laut dan 10 ekor larva udang tanpa larutan uji.

Pengujian Toksisitas

Pada pengujian, larutan uji dibuat dengan memipet ke dalam tabung vial 10 mL, kemudian ditambahkan air laut dan 10 ekor larva *Artemia Salina* yang berumur 2 hari. Kemudian ditambahkan air laut buatan hingga mencapai volume 5 mL. Setiap konsentrasi diulang 3 kali dan dibandingkan

dengan kontrol. Pengujian berlangsung selama 24 jam dan mortalitas larva *Artemia Salina* dihitung. Adapun rumus untuk menghitung toksisitas mengacu pada metode Abbott 1925 dalam Meyer et al. 1982 yang menyatakan bahwa apabila tidak ada larva yang mati pada kelompok kontrol, maka persentase kematian dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{akumulasi mati}}{\text{akumulasi mati} + \text{akumulasi hidup}} \times 100\%$$

Apabila pada kontrol terdapat larva yang mati, maka % kematian ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{jumlah larva uji mati} - \text{jumlah larva contoh mati}}{10 \text{ larva}} \times 100\%$$

Setelah diperoleh data % Mortalitas larva *A. salina* pada setiap konsentrasi uji, langkah selanjutnya adalah mencari nilai probit untuk setiap data menggunakan tabel probit. Kemudian nilai probit tersebut diregresikan secara linier untuk mendapatkan persamaan regresi yang akan digunakan untuk menghitung nilai LC₅₀ (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% dari populasi uji).

$$Y = a + bX$$

Ket.

Y = Nilai probit

a = Konsentrasi regresi

b = Slope/kemiringan regresi

X = Logaritma₁₀ konsentrasi uji

HASIL PENELITIAN

Hasil Ekstraksi Daun Tapak Dara

Penelitian dilakukan untuk mengekstrak senyawa-senyawa metabolit sekunder dari daun tapak dara menggunakan pelarut dengan polaritas yang berbeda. Pelarut n-heksana digunakan untuk mengekstrak senyawa-senyawa non-polar, sementara etanol digunakan untuk senyawa polar seperti tanin, glikosida, beberapa alkaloid, dan flavonoid.



Gambar 1. Hasil ekstraksi daun tapak dara dengan menggunakan pelarut etanol (kiri), n-heksana (kanan)

Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam 500gram serbuk daun tapak dara dalam pelarut dengan perbandingan 1:6 selama tiga hari dengan metode maserasi. Setelah itu, ekstrak cair etanol dan n-heksana dipekatkan dalam *rotary vacuum evaporator* pada suhu yang berbeda untuk mempercepat proses penguapan pelarut dan menghindari kerusakan senyawa akibat suhu yang terlalu tinggi. *Rotary evaporator* digunakan untuk memisahkan pelarut dari larutan dan menghasilkan ekstrak yang lebih pekat seperti yang terdapat pada Gambar 1. Hasil ekstrak menunjukkan bahwa dengan menggunakan pelarut polar didapatkan ekstrak yang lebih banyak dan lebih encer dibandingkan menggunakan pengekstrakan menggunakan pelarut non polar n-heksana. Hasil penghitungan rendemen ekstraksi yang didapatkan ditunjukkan pada tabel 1. Tabel tersebut menunjukkan bahwa rendemen ekstraksi jika menggunakan pelarut n-heksana lebih sedikit didapatkan yakni 1% dibandingkan dengan rendemen dari etanol mencapai 16,44%. Hal ini senada dengan penelitian yang dilakukan oleh anjaswati terhadap daun bit menghasilkan rendemen terbanyak pada ekstraksi menggunakan pelarut polar (Anjaswati et al., 2021).

Tabel 1. Rendemen hasil ekstraksi menggunakan pelarut berbeda

Pelarut pengekstrak	Bobot simplisia (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
Etanol	500	83,72	16,44
n-heksana	500	5	1

Uji Toksisitas Ekstrak Daun Tapak Dara

Uji BSLT dimulai dengan menetasakan telur *Artemia salina* di dalam air laut buatan. Ini bertujuan karena air laut buatan lebih mudah dibuat dan secara fisik larva *artemia* lebih mudah beradaptasi dengan kondisi optimal. Larva udang *Artemia salina* sangat sensitif terhadap senyawa sitotoksik, sehingga media penetasan harus dioptimalisasi sebelum melakukan uji toksisitas (Sembiring et al., 2016). Media penetasan ini didesain agar mendukung kelangsungan hidup larva selama 5 hari sebelum digunakan untuk uji.

Pada pengujian BSLT, telur *Artemia salina* ditetaskan dalam air laut buatan karena bahan yang mudah diperoleh. Selain itu, tingkat konsentrasi NaCl dalam larutan mudah diatur dan air laut buatan dapat mengurangi kontaminan terhadap larva udang. Untuk membuat media air laut buatan, dicampurkan 30 g/L NaCl dalam Aquadest. Media ini dapat mendukung kelangsungan hidup *Artemia salina* pada salinitas 20-30%, memungkinkan telur untuk menetas dengan inkubasi selama 16-24 jam, tergantung pada suhu. Larva yang digunakan adalah larva pasca-tetas 48 jam karena masih sensitif terhadap toksin dan cocok untuk percobaan. Larutan uji ekstrak dibuat dengan menimbang hingga 20 mg dalam 10 ml Aquadest untuk memberikan konsentrasi 2000 ppm, kemudian diencerkan untuk menghasilkan konsentrasi yang lebih rendah.

Dalam tahapan selanjutnya yaitu larutan di uji toksisitasnya dengan pembuatan konsentrasi 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 20, dan 10 ppm. Vial steril digunakan untuk menempatkan masing-masing konsentrasi uji, ditambahkan 9 ml air laut buatan, dan 10 ekor larva udang. Sebelum digunakan, vial uji

diuapkan sampai kering untuk menghindari pengaruh dari bahan lainnya. Setiap konsentrasi diuji dengan tiga kali pengujian, dan tiga kontrol yang hanya berisi air laut dan larva udang juga disiapkan. Setelah 24 jam, jumlah kematian larva diamati untuk menentukan hasil uji toksisitas.

Hasil pengujian toksisitas, larva yang telah mati bisa dikenali dengan tidak adanya gerakan dan posisinya yang berada di bagian bawah vial. Sementara itu, larva yang masih hidup bisa ditemukan di tengah vial dan terlihat bergerak serta berkumpul ketika diberikan cahaya. Untuk mengetahui jumlah larva yang mati, digunakan pengurangan jumlah awal larva yang digunakan. Jumlah larva yang mati pada setiap konsentrasi uji dicatat dan digunakan untuk menentukan nilai LC_{50} . Metode analisis probit dengan program SPSS 15.0 digunakan untuk menghitung LC_{50} . Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki sifat toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 154,886 ppm, sedangkan ekstrak n-heksan dari tapak dara memiliki nilai LC_{50} sebesar 66,949 ppm.

Hasil analisis probit statistika ditemukan bahwa ekstrak etanol dan n-heksan dari daun tapak dara memiliki sifat toksik pada konsentrasi 100 ppm hingga 2000 ppm. Sedangkan untuk mencapai tingkat kematian yang sesuai dengan LC_{50} , konsentrasi yang digunakan adalah 10 ppm hingga 100 ppm untuk ekstrak etanol, dan 10 ppm hingga 50 ppm untuk ekstrak n-heksan. Tabel 2 menunjukkan tingkat kematian larva udang yang dihasilkan oleh kedua ekstrak tersebut yakni menggunakan pelarut etanol dan n-heksana. Dari tabel dibawah dapat disimpulkan bahwa penggunaan pelarut n-heksan cenderung mengekstraks senyawa-senyawa nonpolar yang menyebabkan nilai LC_{50} menjadi lebih kecil. Hal ini berarti bahwa dengan dosis yang kecil pengekstrakan menggunakan n-heksana maka senyawa yang dihasilkan lebih cenderung memiliki karakteristik antikanker dibandingkan mengekstrak menggunakan pelarut polar.

Tabel 2. Rerata kematian larva udang dengan ekstrak etanol dan n-heksana daun tapak dara

Konsentrasi (ppm)	Ekstrak Etanol		Ekstrak n-heksana	
	Mortalitas	LC_{50}	Mortalitas	LC_{50}
2000	10		10	
1000	10		10	
500	8,6		10	
200	5,6		10	
100	7,3	154,886 ppm	6,3	66,949 ppm
50	3,3		4,6	
20	3,6		3	
10	2,3		1,6	
0	0		0	

SIMPULAN

Ekstrak etanol daun tapak dara memiliki tingkat toksisitas sebesar 154,886 ppm pada larva udang dengan metode BSLT, sementara ekstrak n-heksan daun tapak dara memiliki tingkat toksisitas sebesar 66,949 ppm. Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak n-heksan lebih toksik daripada ekstrak etanol pada daun tapak dara.

REFERENSI

- Amilin, A., Suhardjadinata, S., & Guntari, L. (2022). Pengaruh Perendaman Benih dalam Ekstrak Daun Tapak Dara terhadap Fenotipe Kedelai (*Glycine max* (L) Merrill). *Media Pertanian*, 7(2), 68–77.
- Anjaswati, D., Pratimasari, D., & Nirwana, A. P. (2021). Perbandingan Rendemen Ekstrak Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat, dan Air Daun Bit (*Beta vulgaris* L.) Menggunakan Fraksinasi Bertingkat. *Jurnal Farmasi (Journal of Pharmacy)*, 2(1), 32–37.
- Chusniasih, D., & Tutik, T. (2020). Uji Toksisitas Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Bslt) Dan Identifikasi Komponen Fitokimia Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 5(2), 192–201.
- Dewi, U. K., & Saraswati, T. R. (2009). Efek rebusan daun tapak dara pada dosis dan frekuensi yang berbeda terhadap kerusakan dan akumulasi glikogen pada hepar mencit (*Mus musculus*). *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(1), 1–5.
- Fajarningsih, N. D., Januar, H. I., Nursid, M., & Wikanta, T. (2006). Potensi antitumor ekstrak spons *Crella papilata* asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 1(1), 35–42.
- Firdiyani, F., Agustini, T. R., & Ma'ruf, W. F. (2015). Ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antioksidan alami *Spirulina platensis* segar dengan pelarut yang berbeda extraction of bioactive compounds as natural antioxidants from fresh *Spirulina platensis* using different solvents. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(1), 28–37.
- Kabesh, K., Senthilkumar, P., Ragunathan, R., & Kumar, R. R. (2015). Phytochemical analysis of *Catharanthus roseus* plant extract and its antimicrobial activity. *Int. J. Pure App. Biosci*, 3(2), 162–172.
- Ningdyah, A. W., Alimuddin, A. H., & Jayuska, A. (2015). Uji toksisitas dengan metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) terhadap hasil fraksinasi ekstrak kulit buah tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(1).
- Purbosari, P. P., & Puspitasari, E. D. (2018). Pengaruh ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) dan kolkisin terhadap perkecambahan biji cabai rawit hibrida (*Capsicum annum*). *Bioedukasi (Jurnal Pendidikan Biologi)*, 9(2), 181–187.
- Rachim, A. K., Husodo, S. B., & Arifudin, M. (2020). Uji Fitokimia Dan Bioaktivitas Daun Katuk Hutan (*Phyllanthus reticulatus* var. *Glaber*). *Jurnal Kehutanan Papuaasia*, 6(1), 47–61.
- Sembiring, S., Riyanto, A., Simanjuntak, W., Situmeang, R., & Sebayang, K. (2016). *Efek Penambahan Alumina Pada Karakteristik Mikrostruktur Dan Fisis Cordierite Dari Silika Amorph Sekam Padi*.