

UJI TOKSISITAS EKSTRAK DARI KULIT BATANG *Aglaia glabrata* DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)

Karina Agust¹, Asep Supriadin², Mimin Kusmiyati³

^{1,2} Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Gunung Djati Bandung

³ Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Bandung

Abstrak

Tumbuhan *Aglaia glabrata* adalah spesies dari keluarga *Meliaceae*. Pada penelitian pertama ini akan dilakukan uji pendahuluan toksisitas terhadap ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol kulit batang *A. glabrata* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Kulit batang segar dikeringkan dan digerus kemudian ditimbang sebanyak 2,5 kg diekstraksi menggunakan metode maserasi, dengan pelarut metanol. Ekstrak metanol (344 g) dipartisi dengan *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol selanjutnya dilakukan uji toksisitas awal. Ekstrak *n*-heksana (21,7066 g) difraksinasi dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan sistem eluen gradien 10% selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dikelompokkan berdasarkan hasil KLT. Selanjutnya fraksi C (5,2214 g) difraksinasi kembali menggunakan Kromatografi kolom gravitasi (KKG). Hasil dari fraksinasi *n*-heksana yaitu fraksi C3 (1,0515 g) diuji fitokimia untuk mengetahui kandungan kimia yang selanjutnya diuji toksisitas. Data mortalitas *Artemia salina* dianalisis dengan analisis probit untuk mengetahui nilai *Lethal Concentration* (LC_{50}). Ekstrak dikatakan toksik apabila nilai $LC_{50} < 1000$ ppm. Hasil dari penelitian menunjukkan pada ekstrak *n*-heksana dan hasil fraksinasi dari kulit batang *A. glabrata* memiliki tingkat toksisitas terhadap *A. salina*. Nilai toksisitas ekstrak *n*-heksana yaitu dengan nilai LC_{50} 221,341 ppm, dan hasil fraksinasi C3 (5) dengan nilai LC_{50} 217,948 ppm dengan kandungan kimia yang terdapat pada kulit batang *A. glabrata* adalah golongan steroid, triterpenoid, dan flavonoid.

Kata kunci: *Aglaia glabrata*, *Artemia salina* Leach, *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), *Lethal Concentration* (LC_{50}).

Pendahuluan

Penduduk Indonesia banyak memanfaatkan potensi keanekaragaman tumbuh Indonesia untuk berbagai keperluan hidup sehari-hari. Hampir semua bagian dari tumbuh-tumbuhan, yaitu akar, batang, daun, biji, dan buah banyak digunakan oleh penduduk Indonesia. Misalnya sebagai bahan makanan, sebagai bahan untuk membuat

rumah dan yang menjadi pusat perhatian penduduk Indonesia saat ini adalah potensi tumbuhan sebagai obat alam yang aman dan murah, ini terkait dengan pemanfaatan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam tumbuhan Indonesia. Beberapa jenis senyawa metabolit sekunder dapat diketahui keberadaannya dengan menggunakan metode pendekatan

skrining fitokimia. Senyawa metabolit sekunder yang diduga memiliki bioaktivitas, dilakukan pengujian terlebih dahulu pada hewan uji larva *Artemia salina* dengan menerapkan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Metode ini digunakan untuk menemukan beberapa jenis senyawa baru yang memiliki efek farmakologi.^[1]

Di antara banyak keluarga tumbuhan yang hidup di Indonesia, salah satunya adalah keluarga Meliaceae merupakan tumbuhan yang paling sering diteliti, terkait dengan aktivitas senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam spesies pada keluarga tumbuhan ini. Genus *Aglaia* (*Meliaceae*) adalah genus terbesar dalam famili Meliaceae, dengan sekitar 120 spesies. Spesies *Aglaia* umumnya ditemui di hutan hujan tropis di Asia Tenggara, dengan selusin atau lebih spesies yang berbeda dan hidup bersama di Malaysia dan Indonesia. Banyak aktivitas dari senyawa metabolit sekunder yang dimiliki oleh tumbuhan pada genus ini, misalnya triterpen roxburghiadiol A dan B berhasil diisolasi dari ekstrak etanol buah *A. roxburghiana* dan memiliki aktivitas sebagai anti-inflamasi.^[2] Penelitian dari ekstrak etil asetat kulit batang spesies *A. smithii* dan didapatkan lima buah senyawa triterpenoid, dan dari kelima senyawa itu yang beraktivitas sitotoksik paling tinggi

terhadap sel murin P-388 adalah senyawa 3-epiokotillol dengan nilai LC_{50} sebesar 11 ($\mu\text{g/mL}$).^[3]

Aglaia glabrata adalah salah satu spesies pada genus *Aglaia* yang belum diteliti baik kandungan kimia maupun aktivitas biologi belum ditemukan. Dengan demikian, peluang untuk ditemukannya bioaktivitas yang dimilikinya dapat berguna untuk pengembangan ilmu kimia organik bahan alam maupun di bidang kesehatan. Sehingga pada penelitian ini dilakukan pencarian toksisitas pada ekstrak kulit batang *A. glabrata*. Senyawa bioaktif merupakan senyawa metabolit sekunder yang dapat digunakan dalam bidang pengobatan.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah toksisitas kulit batang tumbuhan *A. glabrata* sehingga dapat ditindaklanjuti. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas ekstrak dari kulit batang *A. glabrata* terhadap *Artemia salina* Leach, serta untuk mengetahui golongan senyawa aktif apa yang terdapat dalam hasil fraksinasi kulit batang *A. glabrata* dengan menggunakan uji fitokimia.

1. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat yaitu tahap ekstraksi dan fraksinasi di Laboratorium Jurusan Kimia Fakultas

Sains dan Teknologi UIN Sunan Gunung Djati Bandung. Tahap toksisitas dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Padjajaran Bandung.

1.1 Bahan

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi, fraksinasi menggunakan kromatografi kolom (KCV dan KKG), dan kromatografi lapis tipis adalah pelarut-pelarut teknis yang sudah didestilasi (*n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol serta metanol) maupun pelarut organik berkualitas pro-analisis (p.a) (kloroform dan asam asetat). Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian kulit batang tumbuhan *A. glabrata* yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor Jawa Barat. Bahan ini dideterminasi di Herbarium Bogoriensis, Bogor, Jawa Barat. Bioindikator yang digunakan adalah larva udang (*A. salina*) yang dibiakkan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Padjajaran.

1.2 Metode percobaan

Metode penelitian ini menggunakan metode eksploratif dan eksperimental laboratoris. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif dan dianalisa probit LC_{50} 24 jam.

Serbuk kering kulit batang tumbuhan *Aglaia glabrata* (2,5 kg) dimaserasi dengan pelarut metanol hingga dan diulang

sebanyak tiga kali, kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* dan diperoleh ekstrak kental berwarna hijau (334 g). Seluruh ekstrak metanol ini dipartisi dengan metode ekstraksi bertingkat menggunakan tiga macam pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu *n*-heksana (non polar), etil asetat (semi polar) dan *n*-butanol (polar). Filtrat *n*-heksana, filtrat etil asetat, dan filtrat *n*-butanol yang diperoleh selanjutnya dievaporasi dengan *vacuum rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak kasar *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol. Ekstrak *n*-heksana difraksinasi melalui KCV dengan menggunakan eluen yang sama yaitu campuran *n*-heksana-etil asetat-metanol dengan tingkat kepolaran yang terus meningkat. Penggabungan fraksi-fraksi tersebut atas dasar analisis KLT menghasilkan delapan fraksi utama, yaitu fraksi A (1-3), B (4), fraksi C (5), fraksi D (6-7), fraksi E (9-11), fraksi F (12), fraksi G (13-15), dan fraksi H (16-21). fraksi C (5,2214 g) difraksinasi lagi melalui KKG sebanyak dua kali dengan KKG I perbandingan eluen *n*-heksana:etil asetat (3:2) sedangkan KKG II perbandingan eluen *n*-heksana:etil asetat: asam asetat (3:2:0,5) diperoleh delapan fraksi dan digabung menjadi empat fraksi gabungan, yaitu fraksi C1 (1-3), fraksi C2 (4), fraksi C3(5), dan fraksi C4 (6-8). Penggabungan

fraksi-fraksi atas dasar KLT, terdapat noda tunggal di fraksi C3 (5). Selanjutnya fraksi C3 (5) diuji fitokimia dan uji toksisitas.

Uji fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dengan:

a. Pengujian senyawa alkaloid

Sejumlah sampel ditambahkan 10 mL kloroform-amoniak, lalu disaring ke dalam tabung reaksi. Filtrat ditambahkan dengan beberapa tetes H_2SO_4 2 M dan dikocok sehingga terpisah dua lapisan. Lapisan asam yang terdapat di bagian atas dipipet ke dalam tabung reaksi lain, lalu ditambahkan pereaksi Meyer (5 g KI dilarutkan dalam 90 mL air dan ditambahkan perlahan-lahan $HgCl_2$ sambil diaduk dan diencerkan sampai volume 100 mL) dan Dragendorff (campuran $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ dalam asam nitrat dan larutan KI). Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih dengan glasial dan H_2SO_4 pekat. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Steroid memberikan warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau violet.^[6]

1.3 Uji toksisitas terhadap *A. salina*

Uji Toksisitas (BSLT) dilakukan untuk mengetahui potensi toksik LC_{50} ekstrak kasar kulit batang *A. glabrata* sebelum dan

pereaksi Meyer dan endapan jingga sampai merah coklat dengan pereaksi Dragendorff.^[4]

b. Pengujian senyawa flavonoid

Sejumlah sampel ditambahkan air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan sedikit serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah, kuning atau jingga.^[5]

c. Pengujian senyawa saponin

Sejumlah sampel ditambahkan air panas, kemudian ditambahkan aquades, dikocok. Uji positif ditunjukkan oleh terbentuknya busa permanen ± 15 menit.^[4]

d. Pengujian senyawa triterpenoid dan steroid

Sejumlah sampel diekstraksi dengan kloroform. Fraksi yang larut dalam kloroform ditambahkan CH_3COOH sesudah fraksinasi terhadap larva *A. salina*. Uji ini menggunakan enam perlakuan konsentrasi yaitu : 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm. Setiap vial diisi dengan 10 ekor larva *A. salina* dan dimasukkan ekstrak sebelum dan sesudah fraksinasi sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan, dengan dua kali ulangan. Pengamatan dilakukan selama 24 jam. Mortalitas larva *Artemia*

salina yang didapat dari uji toksisitas kemudian dianalisis probit untuk mengetahui nilai LC_{50} 24 jam.

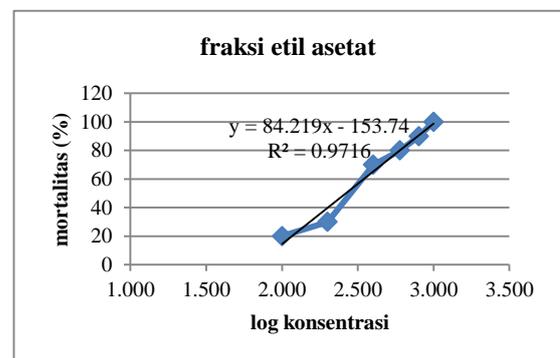
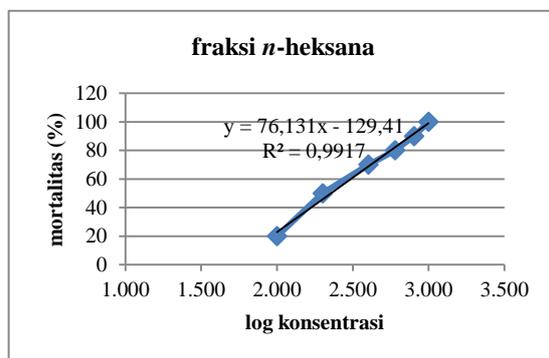
2. HASIL DAN PEMBAHASAN

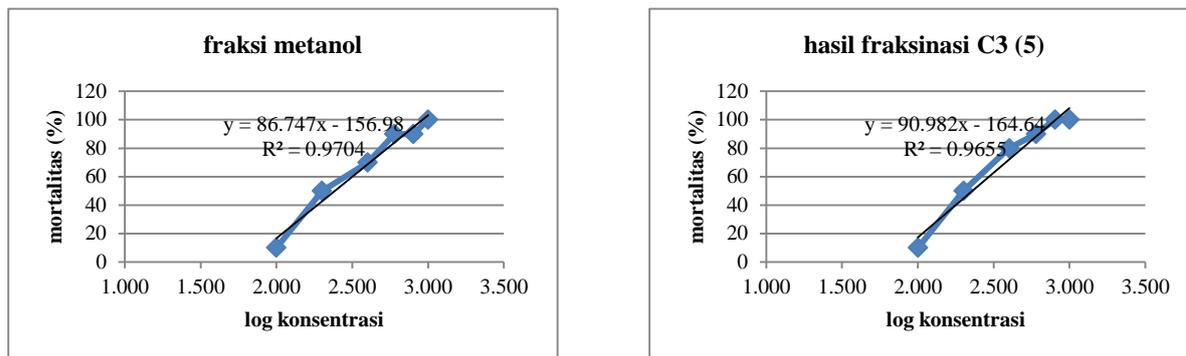
2.1 Uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach.

Pendugaan nilai toksisitas terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach diukur dengan nilai LC_{50} . LC_{50} yaitu suatu konsentrasi atau dosis yang dapat menyebabkan kematian 50% hewan yang diuji. Penentuan LC_{50} dihitung dengan analisis probit menggunakan program *software EPA probit analysis version 16*. Nilai LC_{50} tersebut dihitung untuk jumlah total larva udang yang mati pada waktu 24 jam setelah pemaparan. Dari analisis regresi antara log konsentrasi dan mortalitas (%) larva udang diketahui nilai LC_{50} dari masing-masing

ekstrak. Hasil analisis yang dilakukan menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara log konsentrasi dengan mortalitas larva udang. Nilai koefisien determinasi (R^2) dari persamaan regresi yang dihasilkan berkisar antara 0,9465-0,9917. Hal itu menunjukkan bahwa lebih dari 94% variasi tingkat mortalitas larva udang dapat diterangkan dengan adanya perubahan log konsentrasi.

Hasil BSLT merupakan penelitian awal untuk pemisahan senyawa yang berpotensi memiliki sifat toksisitas. Pada tahap awal maka dilakukan uji toksisitas ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol serta hasil fraksinasi. Grafik analisis regresi terlihat pada Gambar 1. Tingkat mortalitas larva udang pada berbagai konsentrasi sampel dan nilai LC_{50} tersaji pada Tabel 1.





Gambar 1. Grafik analisis regresi log konsentrasi dengan tingkat mortalitas *A. salina*

Tabel 1. Tingkat mortalitas larva udang pada berbagai konsentrasi sampel dan nilai LC_{50}

No	Esktrak fraksi	Mortalitas (%)						LC_{50} (ppm)
		100 ppm	200 ppm	400 ppm	600 ppm	800 ppm	1000 ppm	
1	n-heksana	20	50	70	80	90	100	221,3
2	etil asetat	20	30	70	80	90	100	224,3
3	metanol	10	50	70	90	100	100	236,8
4	Hasil fraksinasi C3 (5)	10	50	80	90	100	100	217,9

Ekstrak *n*-heksana merupakan ekstrak yang paling aktif dibandingkan ekstrak etil asetat dan metanol, hal itu ditunjukkan

dengan nilai koefisien determinasi (R^2) 0,9917 dengan tingkat kematian sebesar 99% pada konsentrasi 1.000 ppm dan nilai

LC_{50} terendah yaitu 221,3 ppm, di mana Meyer (1982) menyatakan bahwa senyawa kimia memiliki potensi bioaktivitas bila mempunyai LC_{50} relatif kecil atau kurang dari 1.000 ppm, semakin kecil nilai LC_{50} menunjukkan bahwa senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak tersebut semakin kuat. Hasil BSLT ekstrak hasil fraksinasi C3 (5) memberikan nilai LC_{50} sebesar 217,9 ppm. Ini membuktikan bahwa ekstrak dari kulit batang *A. glabrata* memiliki toksisitas aktif terhadap *A. salina*.

2.2 Uji fitokimia pada ekstrak fraksi C3 (5)

Analisis fitokimia merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui keberadaan senyawa kimia spesifik seperti alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, dan triterpenoid. Uji ini sangat bermanfaat untuk memberikan informasi senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan. Analisis ini merupakan tahapan awal dalam isolasi senyawa bahan alam selanjutnya. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak kulit batang *A. glabrata*

No	Sampel uji	Metabolit sekunder				
		Alkaloid	Flavonoid	Saponin	Steroid	Triterpenoid
1	fraksi <i>n</i> -heksana	-	+	+	+	+
2	fraksi C3 (5)	-	+	-	+	+

Terbentuknya endapan pada uji Mayer, dan Dragendorff berarti dalam ekstrak terdapat alkaloid. Tujuan penambahan H_2SO_4 adalah karena alkaloid bersifat basa sehingga biasanya diekstrak dengan pelarut yang mengandung asam.^[7] Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff juga ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Hasil uji sampel tidak menunjukkan

adanya endapan, yang berarti ekstrak tidak mengandung senyawa alkaloid.

Dari kedua ekstrak menunjukkan adanya flavonoid dalam sampel yang ditunjukkan hasil campuran berwarna kuning. Hal ini disebabkan karena reduksi dengan Mg dan HCl pekat ini menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol dan xanton.^[8] Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan

membentuk buih dalam air yang terhidrolisi menjadi glukosa dan senyawa lainnya.^[9] Hasil uji sampel hanya fraksi *n*-heksana yang menunjukkan adanya saponin.

Senyawa triterpenoid/steroid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna. Penambahan kloroform dilakukan untuk melarutkan senyawaan ini karena triterpenoid/steroid larut dalam kloroform. Asam asetat anhidrat digunakan untuk membentuk turunan asetil setelah di dalam kloroform. Jika dalam larutan uji terdapat molekul air maka asam asetat anhidrat akan berubah menjadi asam asetat sebelum reaksi berjalan dan turunan asetil tidak akan terbentuk. Hasil uji pada sampel menunjukkan adanya senyawa triterpenoid maupun senyawa steroid hal ini ditunjukkan perubahan warna menjadi hijau kecoklatan. Berdasarkan hasil dari uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana dan fraksi C3 (5) kulit batang *A. glabrata* mengandung 3 jenis senyawa metabolit sekunder dari 5 komponen yang diuji dengan metode skrining fitokimia, diantaranya golongan flavonoid, golongan steroid dan golongan triterpenoid.

3. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil penelitian LC_{50} ekstrak kulit batang *A. glabrata* berturut-turut metanol, etil asetat, dan *n*-heksana masing-masing memiliki nilai 236,8 ppm, 224,3 ppm, dan 221,3 ppm. Terlihat bahwa yang memiliki nilai LC_{50} yang paling rendah yaitu ekstrak *n*-heksana sebesar 221,3 ppm memiliki sifat paling toksik terhadap *A. salina*.
2. Hasil fraksinasi yaitu ekstrak fraksi C3 (5) mempunyai nilai LC_{50} sebesar 217,9 ppm yang memiliki sifat paling toksik terhadap *A. salina*.

B. Saran

1. Perlu dilakukan tahapan isolasi senyawa terhadap hasil fraksinasi ekstrak *n*-heksana kulit batang *A. glabrata*.
2. Pengujian bioaktivitas lain sebagai pembanding sifat toksisitas terhadap BSLT.

4. DAFTAR PUSTAKA

1. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., & McLaughlin, J.L.,. 1982. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Plant Medica*. 31-34.
2. Janaki, S., Vijayasekaran, V., Viswanathan, S., & Balakrishna, K. 1999. Anti-inflammatory Activity of *Aglaia roxburghiana* var. *beddomei* Extract and Triterpenes Roxburghiadiol A and B. *J. Ethnopharmacol.* **67(1)**: 45-51.
3. Harneti, D., R.Tjokronegoro., A.Safari., U.Supratman., X-M Loong., M.R.Mukhtar., K.Mohammad., K.Awang & Hideo Hayashi. 2012. Cytotoxic triterpenoids from the bark of *Aglaia smithii* (Meliaceae). *Phytochemistry*. 5: 496-499.
4. Darwis, D. 2000. *Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati. Makalah Workshop Pengembangan Sumberdaya Manusia dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati*. Padang : FMIPA UNAND.
5. Sutisna, I. 2000. *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Triterpenoid Lanostana dari Kulit Kayu Danglo (Macaranga javanic Muell. Arg)*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
6. Kadarisman, I. 2000. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Kimia Bioaktif dari Rimpang Bangle (Zingiber cassumunar Roxb.)*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
7. Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. diterjemahkan dari: *Phytochemical methods* oleh Padmawinata K, Soedira I. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung.
8. Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: ITB.
9. Rusdi. 1990. *Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Padang : Pusat Penelitian Universitas Andalas.