

Uji Sitotoksik Ekstrak Biji Salak (*Salacca Zalacca* (Gaert) Voss) dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

¹Naton Purwanto, ²Endah Rismawati, ³Esti R. Sadiyah

^{1,2,3}*Prodi Farmasi, Fakultas MIPA, Unisba, Jl. Tamansari No. 1 Bandung 40116*
e-mail: ¹naton.lake@gmail.com, ²endah.res@gmail.com, ³esti_sadiyah@ymail.com

Abstrak. Senyawa sitotoksik adalah suatu senyawa atau zat yang dapat merusak sel normal dan sel kanker, serta digunakan untuk menghambat pertumbuhan sel tumor malignan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktifitas sitotoksik yang dimiliki oleh biji dari tanaman salak (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss), serta menentukan golongan senyawa yang diduga menimbulkan aktifitas sitotoksik dari ekstrak terkuat. Adapun ekstrak biji salak diperoleh dengan menggunakan metode refluks secara bertingkat, dengan tiga pelarut berbeda, yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol. Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada pengujian sitotoksik dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) untuk ekstrak n-heksana dan etil asetat adalah 150, 175, 200, 225, 250 ppm, sedangkan untuk ekstrak etanol 70% yaitu 25, 50, 75, 100, 125 ppm. Nilai Lethal Concentration (LC₅₀) yang diperoleh dari masing-masing ekstrak yaitu 148,48 ppm untuk ekstrak n-heksana, 212,86 ppm untuk ekstrak etil asetat dan 80,73 ppm untuk ekstrak etanol. Berdasarkan hasil analisis kualitatif menggunakan metode kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak yang memiliki aktifitas sitotoksik terkuat, dapat diidentifikasi bahwa pada ekstrak tersebut terdapat senyawa golongan tanin, monoterpen/seskuiterpen, polifenolat dan alkaloid yang diduga memiliki aktifitas sitotoksik terhadap larva *Artemia salina*.

Kata Kunci : Sitotoksik, biji salak, *Artemia salina*, ekstraksi bertingkat, refluks, BSLT

A. Pendahuluan

Kanker merupakan penyakit yang tidak diketahui penyebabnya secara pasti, tetapi dipengaruhi oleh banyak faktor seperti merokok atau terkena paparan asap rokok, mengkonsumsi alkohol, sinar ultraviolet pada kulit, obesitas, diet tidak sehat, kurang aktifitas fisik dan infeksi yang berhubungan dengan kanker. Kanker dapat dicegah dengan mengurangi faktor risiko terjadinya kanker tersebut.

Obat tradisional merupakan obat-obatan yang berasal dari alam dan telah dikenal oleh masyarakat Indonesia sejak zaman dahulu. Selain digunakan secara turun-temurun di masyarakat, obat ini lebih murah dan mudah didapat. Namun diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap tanaman yang digunakan sebagai obat, karena masih banyak tanaman yang belum diketahui toksisitasnya (Hyeronimus, 2008 dalam Muaja dkk., 2013: 115-118).

Senyawa sitotoksik adalah suatu senyawa atau zat yang dapat merusak dan sel normal dan juga sel kanker, serta digunakan untuk menghambat pertumbuhan dari sel tumor malignan (Siregar & Amalia, 2004:336). Untuk mengetahui suatu tanaman memiliki potensi sebagai antitumor (Anderson, 1991:107-111) dan antikanker, maka perlu dilakukan penelitian awal. Salah satunya melalui uji sitotoksik menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Salak (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss) merupakan tanaman asli Indonesia yang buahnya sangat digemari oleh masyarakat. Salak juga diketahui memiliki banyak kandungan gizi yang baik untuk kesehatan (Schuilling & Moges; 1992: 281). Beberapa penelitian membuktikan bahwa kandungan ekstrak etanol buah dan kulit salak memiliki senyawa aktif berupa flavonoid, saponin dan tanin, serta alkaloid (Sahputra, 2014).

Hampir semua limbah biji salak, dibuang karena dianggap sudah tidak bermanfaat lagi. Akan tetapi, masyarakat di daerah Sumatra Utara dan Jawa mengolah biji salak dan mengkonsumsinya seperti minuman kopi. Pemanfaatan biji salak selama ini sangatlah kurang karena biji salak mempunyai tekstur yang keras dan tidak mudah hancur, sehingga untuk mengolah biji salak ini cukup sulit.

Penelitian ini bertujuan untuk, mengetahui potensi sitotoksik dari ekstrak biji salak dan untuk mengetahui golongan senyawa yang memiliki aktifitas sitotoksik dari ekstrak biji salak .

B. Landasan Teori

Senyawa sitotoksik adalah suatu senyawa atau zat yang dapat merusak dan sel normal dan juga sel kanker, serta digunakan untuk menghambat pertumbuhan dari sel tumor malignan. Istilah dari toksisitas juga dapat juga digunakan untuk zat-zat yang bersifat genotoksik, mutagenik, onkogenik, teratogenik, dan zat-zat yang bersifat berbahaya lainnya (Siregar & Amalia, 2004:336).

Brine Shrimp Lethality Test merupakan salah satu metode skrining untuk menentukan toksisitas suatu bahan. Uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian larva *A. salina* Leach. karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam pada konsentrasi yang diberikan (McLaughlin dkk., 1998; Silva dkk., 2007).

Selain itu metode BSLT ini memiliki keuntungan saat waktu pelaksanaan yang cepat, biaya selektif yang murah, praktis, tidak memerlukan teknik yang aseptis, sempel yang relatif sedikit, dan hasil ujinya berkorelasi baik dengan beberapa metode uji sitotoksik (Bawa,2009: 117-124; Meyer,1982: 31-34).

Pengujian BSLT sering digunakan dalam proses pencarian senyawa bioaktif hayati karena adanya korelasi positif antara sitotoksik dengan uji BSLT tersebut.

Pengujian ini merupakan tahap awal untuk mengetahui apakah senyawa tersebut berpotensi atau tidak sebagai antikanker yang selanjutnya dapat dilakukan uji sitotoksik menggunakan biakan sel kanker.

Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya nilai LC50 selama 24 jam. Data tersebut dianalisis menggunakan probit analisis untuk mengetahui nilai LC50. Nilai LC50 merupakan nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% kematian jumlah hewan uji setelah perlakuan 24 jam.

Selain itu metode BSLT ini memiliki keuntungan saat waktu pelaksanaan yang cepat, biaya selektif yang murah, praktis, tidak memerlukan teknik yang aseptis, sempel yang relatif sedikit, dan hasil ujinya berkorelasi baik dengan beberapa metode uji sitotoksik (Bawa,2009: 117-124; Meyer,1982: 31-34).

Artemia salina Leach. atau sering disebut *brine shrimp* adalah sejenis udang-udangan primitif yang sudah dikenal cukup lama dan oleh Linnaeus pada tahun 1778 yang diberi nama *Cancer salinus*, kemudian oleh Leach diubah menjadi *A. salina* pada tahun 1819. *A. salina* merupakan salah satu komponen penyusun ekosistem laut yang keberadaan sangat penting untuk perputaran energi dalam rantai makanan, selain itu *A.salina* Leach. juga dapat digunakan dalam uji laboratorium untuk mendeteksi toksisitas suatu senyawa dari ekstrak tumbuhan (Kanwar, 2007).

A.salina dapat diperjualbelikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista. Kista ini berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna kecoklatan dengan diameter berkisar 200-300 mikron. Kista yang berkualitas baik akan menetas sekitar 18-24 jam apabila diinkubasi air yang bersalinitas 5-70 permil

Ekstraksi adalah penarikan bahan aktif dari jaringan tumbuhan dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2000: 9).

Pada penelitian kali ini metode ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi cara panas yaitu refluks. Prinsip dari refluks ini sendiri yaitu penarikan komponen kimia yang dilakukan dengan cara sampel dimasukkan ke dalam labu alas bulat bersama-sama dengan cairan penyari lalu dipanaskan, uap- uap cairan penyari terkondensasi pada kondensor bola menjadi molekul-molekul cairan penyari yang akan turun kembali menuju labu alas bulat, akan menyari kembali sampel yang berada pada labu alas bulat, demikian seterusnya berlangsung secara berkesinambungan sampai penyarian sempurna, penggantian pelarut dilakukan sebanyak 3 kali setiap 3-4 jam. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan.

Keuntungan dari metode ini adalah digunakan untuk mengekstraksi sampel-sampel yang mempunyai tekstur kasar dan tahan pemanasan langsung. Dilain pihak kerugiannya adalah membutuhkan volume total pelarut yang besar dan sejumlah manipulasi dari operator

Kromatografi digunakan sebagai untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya. Kromatografi juga merupakan pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa murninya dan mengetahui kuantitasnya. Kromatografi juga merupakan analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya. KLT dapat digunakan untuk memisahkan senyawa – senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti lipida – lipida dan hidrokarbon yang sukar dikerjakan dengan kromatografi kertas. KLT juga dapat berguna untuk mencari eluen untuk kromatografi kolom, analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, identifikasi senyawa secara kromatografi, dan isolasi senyawa murni skala kecil. Nilai R_f untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai R_f dari senyawa standar. Nilai R_f dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal.

Dengan bercak – bercak warna pada masing – masing cuplikan untuk membandingkan harga R_fnya dan mengetahui senyawa apa yang terdapat didalam cuplikan (Stahl, 1985:3-17).

C. Metode Penelitian

Bahan yang digunakan adalah Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian biji dari tanaman salak (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss) yang diambil dari perkebunan di Desa Cijambu Kabupaten Sumedang, dan hewan uji yang digunakan adalah *Artemia salina* Leach.

Bahan kimia yang digunakan terdiri atas amil alkohol, aquadest, asam klorida, besi (III) klorida, dimetil sulfoksida (DMSO), etanol, etil asetat, natrium klorida, n-heksan, kalium klorida, kloroform, larutan gelatin 1%, natrium sulfat anhidrat, asam asetat anhidrat dengan asam sulfat pekat (20:1), asam sulfat 10% dalam etanol, bismuth subnitrat, kalium iodida, raksa (II) klorida, preaksi vanillin 10% dalam asam sulfat, dan serbuk magnesium, formaldehid 37% dan asam asetat grasial (3:1), flouro glusinol, kloral hidrat, butanol, natrium klorida, ragi.

Alat alat yang digunakan terdiri atas bejana KLT, *rotary evaporator vakum*, *waterbath*, timbangan analitik, tanur, oven, seperangkat alat refluks, tangkrus, tabung reaksi, pipet volume, pipet tetes, pinset, *beaker glass*, labu erlenmeyer, akuarium, vial, *aerator*, labu ukur, selang *aerator*.

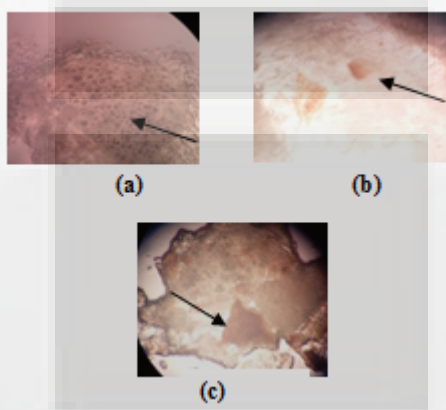
Pada tahap peroses uji sitotoksik dengan BSLT diawali dengan pengumpulan bahan, pembuatan simplisia, karakterisasi simplisia, ekstraksi menggunakan tiga pelarut yang berbeda, karakterisasi ekstrak, pengujian sitotoksik, dan pemantauan ekstrak terpilih dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

D. Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil determinasi yang diperoleh dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah *Salacca zalacca* (Gaert.) Voss.

Hasil pemeriksaan makroskopik terhadap 10 sampel yang digunakan menunjukkan biji salak berbentuk bulat lonjong, berwarna coklat kehitaman, tekstur sangat keras, tidak berbau dan tidak berasa. Biji salak ini memiliki lebar berkisar antara 1,65 – 2,15 cm, dan panjang 1,76 – 2,75 cm.

Hasil dari pengujian mikroskopik dalam serbuk biji salak ditemukan adanya jaringan parenkim, sel batu dan sel minyak.



Gambar D.1. Hasil pengujian mikroskopik dengan menggunakan reagen flourogusinol - HCl dan kloralhidrat dengan perbesaran 10x10. a. Kelenjar minyak, b. Jaringan parenkim, c. Sel batu

Adapun hasil penapisan fitokimia ditunjukkan pada **Tabel D.1**.

Tabel D.1 Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Biji Salak (*Salacca edulis* Reinw)

Senyawa	Simplisia	Ekstrak n-heksan	Ekstrak etil asetat	Ekstrak etanol
Flavonoid	-	-	-	-
Saponin	-	-	-	-
Tanin	+	-	+	+
Quinon	+	-	+	+
Monoterpen dan Sesquiterpen	+	+	+	+
Terpenoid dan steroid	-	-	-	-
Alkaloid	+	-	+	+
polifenolat	+	-	+	+

Keterangan:

(+) = Terdeteksi

(-) = Tidak terdeteksi

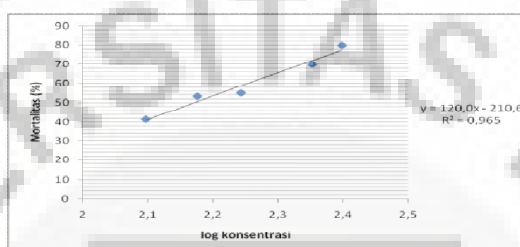
Keseragaman kandungan pada simplisia dan ketiga jenis ekstrak biji salak ditunjukkan dengan teridentifikasinya senyawa golongan alkaloid, tanin, kuinon, monoterpen/sesquiterpen dan polifenolat. Adapun hasil penapisan pada ekstrak n-heksana hanya dapat mendeteksi keberadaan senyawa monoterpen/sesquiterpen.

Hasil yang terkandung ekstrak kental yang diperoleh, dapat dihitung rendemen ekstrak untuk ekstrak n-heksana sebesar 0,249%, etil asetat sebesar 0,929 %, dan ekstrak etanol 70% sebesar 8,82%.

Tabel D.2. Hasil Perhitungan Uji BSLT Ekstrak n-Heksana pada larva *Artemia salina*

konsentrasi (ppm)	Jumlah artemia mati per vital						Rata rata	Log konsentrasi	% Mortalitas
	1	2	3	4	5	6			
125	4	3	2	5	6	6	4,1428571	2,096910013	41,42857143
150	5	5	8	5	4	5	5,3333333	2,176091259	53,33333333
175	5	5	6	5	6	6	5,5	2,243038049	55
225	8	8	7	7	5	7	7	2,352182518	70
250	7	8	8	8	9	8	8	2,397940009	80

Dari data persentase tersebut, dapat dibuat grafik yang menunjukkan hubungan antara persentase mortalitas dengan konsentrasi ekstrak yang larut dalam n-heksana seperti pada grafik **Gambar D.2.**



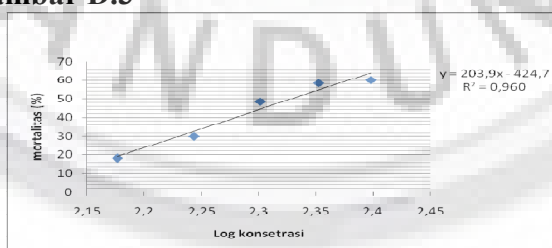
Gambar D.2. Hubungan persentase mortalitas dengan konsentrasi ekstrak n-Heksana

Dari data persamaan mortalitas n-heksana didapatkan nilai LC_{50} dari ekstrak n-heksana yaitu sebesar 148,46 ppm. Untuk ekstrak etilasetat dapat dilihat pada **Tabel D.3.**

Tabel D.3. Hasil Perhitungan Uji BSLT Ekstrak etil asetat pada *Artemia salina*

konsentrasi (ppm)	jumlah artemia mati per vital						rata rata	log konsentrasi	% Mortalitas
	1	2	3	4	5	6			
150	1	2	1	2	3	2	1,8333333	2,176091259	18,33333333
175	4	2	3	3	3	3	3	2,243038049	30
200	4	6	4	5	5	5	4,8333333	2,301029996	48,33333333
225	6	7	6	5	5	6	5,8333333	2,352182518	58,33333333
250	6	5	7	5	7	6	6	2,397940009	60

Dari data persentase tersebut, dapat dibuat grafik yang menunjukkan hubungan antara persentase mortalitas dengan konsentrasi ekstrak yang larut dalam etil asetat seperti pada grafik **Gambar D.3**



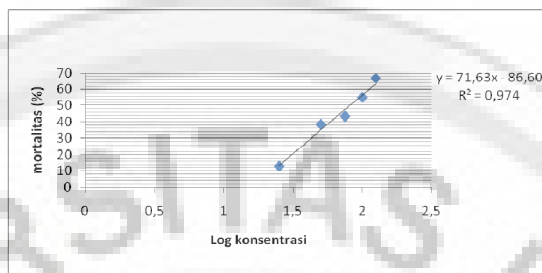
Gambar D.3. Hubungan persentase mortalitas dengan konsentrasi ekstrak etil asetat

Untuk ekstrak etil asetat, didapatkan nilai LC_{50} dari ekstrak etil asetat sebesar 212,86 ppm.

Tabel D.4. Hasil Perhitungan Uji BSLT Ekstrak etanol pada *Artemia salina* L

konsentrasi (ppm)	Jumlah artemia awal perial						rata-rata	log konsentrasi	% Mortalitas
	1	2	3	4	5	6			
25	1	2	0	2	2	1	1,33333333	1,39794009	13,33333333
50	4	4	5	3	3	4	3,83333333	1,69897004	38,33333333
75	4	5	4	5	4	4	4,33333333	1,875061263	43,33333333
100	6	7	6	5	4	5	5,5	2	55
125	6	7	6	8	7	6	6,66666667	2,096910013	66,66666667

Dari data persentase tersebut, dapat dibuat grafik yang menunjukkan hubungan antara persentase mortalitas dengan konsentrasi ekstrak yang larut dalam etanol seperti pada grafik **Gambar D.4.**

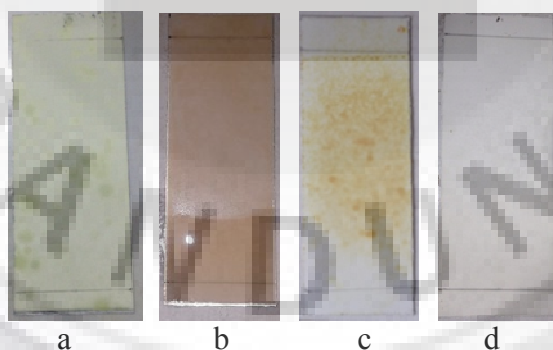


Gambar D.4. Hubungan Persentase Mortalitas dengan Konsentrasin Ekstrak etanol

Nilai LC_{50} yang diperoleh untuk ekstrak etanol adalah sebesar 80,73 ppm. Berdasarkan nilai tersebut di ketahui bahwa ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol juga memiliki potensi untuk menghasilkan efek toksik terhadap *A. salina* pada pengujian tahap awal senyawa sitotoksik dengan metode BLST, karena memiliki LC_{50} lebih rendah dari 1000 ppm.

Senyawa yang diperkirakan memberikan sifat toksik dari ekstrak etanol adalah senyawa golongan tanin, monoterpen/seskuiterpen, polifenolat dan alkaloid.

Pemantauan ekstrak etanol sebagai ekstrak terpilih dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan menggunakan berbagai penampak bercak dapat dilihat pada **Gambar.D.5**



Gambar D.5. Hasil Pemantauan KLT untuk identifikasi menggunakan berbagai penampak bercak. Fase diam plat GF_{254} dan fase gerak butanol :as.asetat grasiyal:air (4:1:5). Pemantauan menggunakan penampak bercak a. folin cioucalte, b. $FeCl_3$ 1%, c. Dragendroff, d. bercak vanillin 5% dalam H_2SO

Melalui hasil analisis kualitatif tersebut dapat dipastikan keberadaan senyawa golongan tanin, monoterpen/seskuiterpen, polifenolat dan alkaloid yang diduga memiliki aktifitas sitotoksik terhadap larva *A.salina*.

E. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari masing-masing ekstrak yaitu ekstrak n-heksana, etil asetat dan etanol berpotensi memiliki aktifitas sitotoksik pada tahap awal penelitian dengan menggunakan metode BLST. Dari ketiga ekstrak biji salak yang diuji, ekstrak etanol yang memiliki aktifitas senyawa yang paling tinggi terhadap larva *Artemia Salina* Leach dengan nilai LC50 yang dihasilkan sebesar 80,728 ppm. Adapun golongan senyawa yang diduga berperan untuk aktifitas sitotoksik adalah tanin, monoterpen/seskuiterpen, polifenolat dan alkaloid, yang teridentifikasi dari hasil penapisan fitokimia dan profil KLT.

Daftar Pustaka

- Anderson, J.E, Goetz,C.M, McLaughlin,J.L. and Suffnes,M. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*. 2: 107-111.
- Bawa, G. (2009). Isolasi dan identifikasi golongan senyawa toksik dari daging buah pare (*Momodica charantia* L.) *Jurnal Kimia*.3(2)
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat 3 – 5*. Jakarta : Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan
- Kanwar, A.S. (2007). Brine Shrimp (*Artemia salina*) a Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *Chinese Clinical Medicine* 2 (4): 35-42.
- McLaughlin,J.L. (1991). Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two simple bioassay for Higher Plant Screening and Fractination. *Methods in Plants Biochemistry* 6 (1): 1-30
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughin, J.L., (1982), Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent, *Planta Medica*. 45:31-34.
- Muaja, A.D, Harry S. J. Koleangan, Max R. J. Runtuwene.(2013) Uji Sitotoksik Dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogi (*Saurauia bracteosa* DC) Dengan Metode Soxhletasi.
- Sahputra, Fahrizan Manda. (2008). *Potensi Ekstrak Kulit dan Daging Buah Salak sebagai Antidiabetes* [Skripsi]. FMIPA Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Silva, T.M., Nascimento, R.J., Batista, M.B., Agra, M.F., dan Camara, C.A. 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *solanum* from northeastern brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* (17) Hal: 35-38
- Siregar,C.J.P, Amalia, L. (2004) *Farmasi Rumah Sakit: Teori dan Penerapan, Buku Kedokteran EGC*, Jakarta, Indonesia.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi Dan Mikroskopi*, Diterjemahkan Oleh: Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro. Bandung:Institut Teknologi Bandung