

Skrining Fitokimia Dan Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (*Catharanthus Roseus L.*) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Bslt)

Alfiani Prima Putri¹, M. Pandapotan Nasution²

^{1,2} Universitas Muslim Nusantara Al Washliyah, Medan

Corresponding Author:  mpnasution49@gmail.com

ABSTRACT

Tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus L.*) merupakan tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia. Tanaman ini tumbuh liar maupun dibudidayakan sebagai tanaman hias. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ekstrak etanol daun tapak dara dapat memiliki potensi sebagai senyawa antikanker dengan penentuan LC₅₀ dan juga senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada daun tapak dara. Pada penelitian ini dilakukan pengujian skrining fitokimia dan pengujian karakteristik daun tapak dara. Pengujian sitotoksitas ekstrak etanol daun tapak dara menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dilakukan dengan beberapa konsentrasi : 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm, 1000 ppm. Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa hasil skrining fitokimia daun tapak dara mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Hasil pengujian karakterisasi daun tapak dara pada kadar air 6,66 %, kadar sari larut air 38,23 %, kadar sari larut etanol 24,85 %, kadar abu total 6,29 %, dan kadar abu tidak larut asam 0,66 %. Hasil karakterisasi ini menunjukkan hasil yang sesuai dengan standarisasi dalam materia medika indonesia. Hasil pengujian dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) memberikan nilai LC₅₀: 305,1406 µg/ml, sehingga ekstrak etanol daun tapak dara bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker, karena senyawa uji dikatakan toksik jika harga LC₅₀ lebih kecil dari 1000 µg/mL.

Kata Kunci

Sitotoksitas, Daun Tapak Dara, BSLT, LC₅₀

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu Negara yang terletak di daerah tropis yang kaya akan keanekaragaman hayati. Hutan tropis Indonesia memiliki sekitar 30.000 spesies tumbuhan dan 1.845 spesies diantaranya telah diidentifikasi berkhasiat sebagai obat. Tumbuhan obat merupakan tumbuhan yang mengandung zat aktif pada salah satu bagian atau seluruh bagian tumbuhan yang dapat dimanfaatkan untuk mengobati penyakit tertentu. Bagian tumbuhan yang dapat dimanfaatkan meliputi daun, buah, bunga, biji, akar, rimpang, batang dan kulit kayu(Zuraida, 2018). Kanker merupakan penyakit yang tidak diketahui penyebabnya secara pasti, tetapi dipengaruhi oleh banyak faktor seperti merokok atau terkena paparan asap rokok, mengkonsumsi alkohol, obesitas, diet tidak sehat, kurang aktifitas fisik dan infeksi. Pengobatan terhadap

kanker dapat dilakukan melalui operasi, radiasi, atau dengan memberikan kemoterapi. Minat terhadap penggunaan obat tradisional khususnya untuk penyakit kanker akhir-akhir ini meningkat. Kecenderungan tersebut kemungkinan disebabkan adanya kekhawatiran akan efek samping yang ditimbulkan oleh obat-obatan modern dan juga dengan alasan obat tradisional mudah didapat dan harganya murah (Yulia. M et al., 2020).

Tanaman obat tradisional digunakan secara empiris oleh masyarakat dalam rangka menanggulangi masalah kesehatan baik dengan maksud pemeliharaan, pengobatan, maupun pemulihan kesehatan. Pengetahuan tentang tanaman berkhasiat obat berdasarkan pada pengalaman dan keterampilan yang secara turun temurun telah diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. *World Health Organization* (WHO) tahun 2002 memperkirakan bahwa 80% penduduk dunia masih mengandalkan dirinya pada pengobatan tradisional termasuk penggunaan obat yang berasal dari tanaman (Leonardy. C et al., 2019).

Tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) yang selama ini dianggap sebagai bunga liar dan murahan, kini mulai dilirik dan disukai banyak orang (Dewi U.K, 2009). Tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) adalah salah satu bahan alam yang telah banyak diteliti dan dilaporkan banyak memiliki khasiat dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit, antara lain sebagai antikanker, peluruh kencing, menurunkan tekanan darah dan penghenti perdarahan sedangkan akar tapak dara mengandung alkaloid, saponin, flavonoid dan tanin (Verrananda M.I et al., 2016). Ekstrak daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) diketahui memiliki kandungan senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan terpenoid. Pada penelitian selanjutnya (Purbosari P. P et al., 2018) melaporkan bahwa ekstrak daun tapak dara mengandung alkaloid, terpenoid, fenol, tannin, saponin, quinine dan sterol.

Metode awal uji antikanker yaitu uji sitotoksitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker yang baru yang berasal dari tumbuhan. Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat. Suatu ekstrak dinyatakan bersifat sitotoksik menurut metode BSLT jika memiliki LC_{50} kurang dari 1000 μ g/mL. Hasil BSLT menunjukan hasil yang baik, maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa sitotoksik tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat alternatif antikanker (M. Hasanah, 2016).

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental. Sampel yang digunakan adalah daun tapak dara. Data yang dikumpulkan yaitu data kuantitatif dan kualitatif, diambil dari hasil pengumpulan sampel, pembuatan ekstrak, karakteristik simplisia, skrining fitokimia, dan uji sitotoksitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* terhadap larva udang *Artemia salina leach*.

Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah sampel ekstrak dan variasi konsentrasi larutan uji ekstrak etanol daun tapak dara. Variable terikat meliputi skrining fitokimia, karakteristik simplisia dan uji sitotoksitas.

Parameter Penelitian

Parameter penelitian meliputi makroskopik, mikroskopik, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut dalam asam, kadar sari larut dalam air, kadar sari yang larut dalam etanol, alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid, tannin, saponin, glikosida, dan nilai LC₅₀.

Pembuatan Simplisia

Sampel daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) dikumpulkan, kemudian disortasi basah dengan tujuan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan lainnya. Lalu dilakukan pencucian dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada sampel. Kemudian dilakukan perajangan dengan cara diiris tipis yang bertujuan untuk mempermudah saat proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Selanjutnya, dilakukan pengeringan dengan cara pengeringan buatan yaitu dimasukkan kedalam lemari pegering dengan suhu 40-50°C. Kemudian, dilakukan sortasi kering, tujuan sortasi untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Kemudian simplisia diserbukan dengan menggunakan *blender*, diayak dan ditimbang. Serbuk simplisia yang diperoleh disimpan dalam wadah yang tertutup rapat(RI, 1989).

Karakteristik Simplisia

Pemeriksaan Makroskopik Simplisia

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan cara memperhatikan bentuk, ukuran, warna, rasa dan bau terhadap simplisia daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.)(RI, 1995).

Pemeriksaan Mikroskopik Serbuk Simplisia

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun tapak dara (*Catharanthus roseus* (L) dengan cara serbuk simplisia ditaburkan di atas

objek *glass* yang telah ditetesi dengan kloral hidrat sebanyak 1 tetes dan ditutup dengan *deck glass*, kemudian diamati di bawah mikroskop.

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak daun tapak dara dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 10 bagian (500 g) serbuk simplisia di masukkan kedalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian etanol sebanyak 3750 ml dalam wadah tertutup rapat selama 5 hari terlindungi dari cahaya, sambil sering diaduk, lalu diperas sehingga didapat maserat I. Kemudian ampas yang diperoleh dibilas dengan 25 bagian etanol sebanyak 1250 ml (maserat II), maserat I dan II digabung Kemudian pindahkan kedalam bejana tertutup biarkan ditempat yang sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian enap tuangkan sehingga diperoleh hasil ekstrak cair, lalu dipekatkan dengan cara diuapkan pada *rotary evaporator* dengan suhu tidak lebih dari 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (RI, 1989).

Skrining Fitokimia

Pemeriksaan Alkaloid

Simplisia dan ekstrak daun tapak dara ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat dipakai untuk tes alkaloid sebagai berikut:

- a. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.
- b. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
- c. Filtrat sebanyak 3 tetes ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendorff, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan di atas.

Pemeriksaan Flavanoid

Sebanyak 10 g serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun tapak dara ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol lalu dikocok kemudian dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan alkohol.

Pemeriksaan Tanin

Sampel serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun tapak dara ditimbang sebanyak 0,5 g ditambah 10 mL aquades, dikocok dan disaring. Filtrat diencerkan dengan aquades sampai hampir tidak berwarna. Larutan diambil 2 mL ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin.

Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 g serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun tapak dara dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL aquades panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Penambahan 1 tetes larutan HCL 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Sampel serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun tapak dara ditimbang sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi liebermann-Burchard). Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoida dan terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid.

Pemeriksaan Glikosida

Simplisia dan ekstrak daun tapak dara masing-masing ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian disari dengan 30 mL campuran 7 ml bagian etanol 96% dan 3 bagian aqua des ditambah dengan 10 mL HCl 2 N. Direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL aquades dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 mL campuran 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dilakukan berulang sebanyak tiga kali. Kumpulan sari air diuapkan pada temperatur tidak lebih dari 50°C. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL metanol. Kemudian diambil 0,1 mL larutan percobaan dimasukkan kedalam tabung reaksi, diuapkan di penangas air. Pada sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes pereaksi molish. Kemudian secara perlahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, jika terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya glikosida.

Uji Sitotoksitas Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test

Pembuatan Air Laut Buatan

Air laut buatan dibuat dengan cara melarutkan 38 gram garam tanpa iodium dalam 1 liter air, lalu diaduk sampai homogen. Kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman*(Djamil R. 2009).

Penetasan Larva *Artemia salina* Leach

Penetasan telur dilakukan dalam wadah bening yang berisi media air laut buatan. Wadah yang digunakan dibagi menjadi dua bagian oleh sekat berlubang, yaitu bagian gelap dan bagian terang. Sekat berlubang menjadi jalan untuk larva yang telah menetas untuk bergerak secara alamiah ke arah terang. Kemudian pada bagian gelap dimasukkan satu sendok teh telur. Pada wadah bagian gelap ditutup dengan *alumunium foil* atau lakban hitam. Pada wadah bagian terang diberi penerangan dengan cahaya lampu agar suhu penetasan 25-30°C tetap terjaga. Telur udang dibiarkan terendam selama 48 jam sampai telur menetas. Telur akan menetas dalam waktu 24-36 jam dan akan bergerak secara alamiah menuju daerah terang sehingga larva udang terpisahkan dari bagian telur atau kulit telur. Larva yang telah aktif bergerak siap digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian(S. Fadli et al., 2019).

Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara

Ekstrak etanol daun tapak dara dibuat larutan induk nya 2000 ppm dengan menimbang 0,2 g ekstrak lalu dilarutkan dengan 100 mL air laut. Kemudian diencerkan menjadi 10 konsetrasi untuk terlebih dahulu digunakan sebagai orientasi, yaitu konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μ g/mL, dan 1 tabung digunakan untuk kontrol negatif, masing-masing dengan tiga kali pengulangan.

Vial disiapkan untuk tiap-tiap tingkat konsentrasi, masing-masing disediakan 10 vial dan replikasi sebanyak 3 kali. Vial diisi dengan sampel yang telah dilarutkan dengan air laut buatan sebanyak 10 mL. Sebanyak 10 ekor larva *Artemia* dimasukkan ke dalam masing-masing vial yang telah berisi senyawa uji. Kontrol negatif (blanko) diberi perlakuan yang sama seperti larutan uji tetapi tidak ditambahkan dengan ekstrak. Jumlah larva udang yang mati dalam tiap vial dihitung selama 24 jam. Tingkat toksitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik(Supriningrum.R et al., 2017).

Analisis Data

Pengaruh ekstrak etanol terhadap larva *Artemia salina* Leach dilakukan dengan perhitungan analisis probit. Perhitungan dilakukan dengan membandingkan antara larva mati terhadap jumlah keseluruhan, sehingga diperoleh persen kematian dilihat dalam nilai tabel probit. Dari data tersebut akan diketahui nilai probit dimasukkan kedalam persamaan regresi, sehingga dapat nilai LC₅₀.

Persamaan Regresi:

$$y = ax + b$$

$LC_{50} = \text{arc log } x$

Keterangan :

x : Log Konsentrasi

a : Intercept (garis potong)

y : Nilai Probit

b : Slope (kemiringan dari garis regresi linear)

Data hasil penelitian uji toksisitas diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan kurva. Data dari uji toksisitas tersebut akan dianalisis dengan analisis probit serta menggunakan *Microsoft Office Excel* untuk mencari regresi linier dengan hubungan antara nilai probit dengan log konsentrasi. Nilai LC_{50} dapat dihitung dengan memasukkan nilai 5 (probit 50% kematian hewan uji) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi. Antilog nilai x tersebut merupakan nilai LC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Identifikasi Tumbuhan

Tanaman daun tapak dara yang digunakan dalam penelitian ini di determinasi di Herbarium Medanese Universitas Sumatera Utara, Medan. Hasil determinasi tanaman dari Herbarium Medanese diketahui bahwa jenis tanaman adalah famili *Apocynaceae* genus *Catharanthus* dengan spesies *Catharanthus roseus* L.

Hasil Pengumpulan Sampel Tumbuhan

Tumbuhan tapak dara diperoleh dari daerah Kabupaten Indragiri Hilir, Provinsi Riau. Proses pengumpulan daun tapak dara dilakukan secara purposive sampling, yaitu tanpa membandingkan dengan tumbuhan yang sama dari daerah lain.

Hasil Pengelolaan Daun Tapak Dara(*Catharanthus roseus* L.)

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.). Sampel daun tapak dara yang telah dikumpulkan didapatkan bobotnya sebanyak 6000 gram, setelah dilakukan pengeringan dengan suhu 50°C maka diperoleh bobot simplisia sebanyak 656 gram untuk hasil % susut pengeringan (loss on drying) didapatkan sebesar 89%. Susut pengeringan adalah persentase senyawa yang hilang selama proses pemanasan.

Hasil Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia

Penetapan karakteristik suatu simplisi perlu dilakukan dengan tujuan untuk menjamin mutu dari suatu simplisia tersebut. Penetapan karakteristik ini dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan dalam Materi Medika Indonesia.

Pada uji karakteristik daun tapak dara dilakukan dengan beberapa pengujian, yaitu antara lain uji makroskopik dan mikroskopik. Uji makroskopik dilakukan pada bagian tanaman yang di teliti. Pengujian makroskopik pada daun tapak dara bertujuan untuk mencari kekhususan morfologi, yaitu bentuk, warna, rasa serta bau dari daun tapak dara.

Tabel 1.**Pengamatan Makroskopik Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.)**

No	Parameter Organoleptis	Keterangan
1.	Bentuk	Memiliki bentuk bulat telur pertulangan menyirip, dengan panjang keseluruhan 7,5 cm dan lebar 2,5 cm.
2.	Warna	Berwarna Hijau
3.	Rasa	Pahit
4.	Bau	Khas

Pengamatan mikroskopik dilakukan pada serbuk simplisia daun tapak dara, tujuan dari pengamatan mikroskopik adalah untuk menetukan fragmen pengenal dalam bentuk sel atau jaringan tumbuhan. Hasil mikroskopik serbuk daun tapak dara di peroleh adanya rambut penutup dan stomata tipe anomositik.

Tabel 2.**Hasil Karakterisasi Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.)**

No	Karakteristik	MMI(%)	Hasil (%)
1.	Kadar Air	<10 %	6,66%
2.	Kadar Sari Larut Air	> 6%	38,23%
3.	Kadar Sari Larut Etanol	> 2,5%	24,85%
4.	Kadar Abu Total	< 11,5%	6,29%
5.	Kadar Abu Tidak Larut Asam	< 1%	0,66%

Berdasarkan Tabel diatas pemeriksaan kadar air pada serbuk simplisia dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung didalam simplisia. Persyaratan kadar air simplisia umumnya tidak lebih dari 10% karena jika kadar air melebihi 10% akan mudah ditumbuhui kapang dan bakteri (Depkes RI, 1995). Hasil pemeriksaan karakterisasi kadar air simplisia yang diperoleh adalah 6,66%.

Penetapan kadar sari dilakukan terhadap dua pelarut, yaitu dalam air dan etanol. Hasil pemeriksaan karakterisasi serbuk simplisia diperoleh kadar sari yang larut dalam air adalah 38,23% sedangkan kadar sari yang larut dalam etanol adalah 24,85%. Kadar sari larut dalam air dan etanol merupakan pengujian untuk

penetapan jumlah kandungan senyawa yang dapat terlarut dalam air (kadar sari larut air) dan kandungan senyawa yang dapat terlarut dalam etanol (kadar sari larut etanol). Prinsip dari ekstraksi didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur (Handayani dkk, 2017). Pada penentuan kadar sari larut air, simplisia terlebih dahulu dimerasi selama ± 24 jam dengan air, sedangkan pada penentuan kadar sari larut etanol, simplisia terlebih dahulu dimerasi selama ± 24 jam dengan etanol (96%). Hal ini bertujuan agar zat aktif yang ada pada simplisia dapat terekstraksi dan tertarik oleh pelarut tersebut. Pada penentuan kadar sari larut air, adanya penambahan kloroform yang bertujuan sebagai zat antimikroba atau sebagai pengawet. Karena apabila pada saat maserasi hanya air saja, mungkin ekstraknya akan rusak karena air merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroba atau dikhawatirkan terjadi proses hidrolisis yang akan merusak ekstrak sehingga menurunkan mutu dan kualitas dari ekstrak yang dihasilkan. Sementara pada penentuan kadar sari larut etanol tidak ada penambahan kloroform, karena etanol sudah memiliki sifat antibakteri jadi tidak perlu ditambahkan kloroform.

Penetapan kadar abu total serbuk simplisia daun tapak dara didapatkan persentase kadar sebesar 6,29% dan untuk pengujian kadar abu tidak larut asam didapatkan persentase kadarnya sebesar 0,66%. Penetapan kadar abu total bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal dari proses awal hingga terbentuknya ekstrak, sedangkan penetapan kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk mengetahui besarnya tingkat pengotor yang tercampur pada serbuk saat preparasi simplisia. Prinsip kerjanya yaitu bahan di panaskan pada temperatur hingga senyawa organik dan turunannya terdekstruksi dan menguap hingga tersisa unsur mineral dan anorganik saja.

Hasil Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.)

Ekstraksi simplisia daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) dilakukan secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96 % sebanyak 5 liter dari 500 g simplisia daun tapak dara kemudian diuapkan dengan alat *rotary evaporator* dan dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 114,24 gram.

Hasil Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk menguji ada tidaknya senyawa metabolit sekunder diantaranya seperti alkaloid, flavonoid, saponin, steroid/triterpenoid, tanin dan glikosida.

Tabel 3.

Hasil Skrining Fitokimia Serbuk dan Ekstrak Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.)

No	Parameter	Hasil	
		Simplisia	Ekstrak
1.	Alkaloid	+	+
2.	Flavonoid	+	+
3.	Tanin	+	+
4.	Saponin	+	+
5.	Steroid/Triterpenoid	+	+
6.	Glikosida	-	-

Keterangan:

(+) Positif : Mengandung golongan senyawa

(-) Negatif : Tidak mengandung golongan senyawa

Pada tabel diatas menunjukkan bahwa dari hasil skrining fitokimia, terdapat golongan senyawa kimia metabolit sekunder yang sama di dalam serbuk simplisia dan ekstrak daun tapak dara yaitu golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid.

Pada pemeriksaan alkaloid terdapat 3 pengujian yaitu pengujian dengan pereaksi mayer, dragendorf dan bouchardat. Pada pengujian pertama dengan pereaksi mayer menunjukkan hasil yang positif karena terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning. Kemudian pengujian kedua dengan preaksi dragendorf menunjukkan hasil yang positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat. Pada pengujian ketiga dengan pereaksi bouchardat juga menunjukkan hasil yang positif karena membentuk endapan jingga. Dari hasil yang di dapatkan di atas dapat disimpulkan bahwa sampel positif mengandung alkaloid. Hal ini sesuai dengan persyaratan yang tertera pada MMI bahwasanya alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau kekeruhan sedikitnya 2 reaksi dari 3 percobaan. Prinsip pengujian alkaloid pada dasarnya adalah pengendapan alkaloid dengan logam-logam berat. Endapan yang terbentuk karena adanya kompleks antara ion logam dari reagen dengan senyawa alkaloid. Penambahan HCl 2N di maksudkan untuk menarik senyawa alkaloid dalam ekstrak karena alkaloid bersifat basa maka dengan penambahan asam seperti HCl akan terbentuk garam, sehingga alkaloid akan terpisah komponen-komponen lain dari sel tumbuhan yang ikut terekstrak dengan mendistribusikannya ke fase asam.

Hasil Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L.) Dengan Metode BS LT

Sitotoksitas adalah kemampuan suatu senyawa mempengaruhi sel sedangkan senyawa sitotoksik merupakan senyawa yang dapat digunakan sebagai zat antikanker dan memiliki kemampuan untuk menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker. Uji sitotoksik terhadap larva udang

Artemia salina Leach atau *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan uji pendahuluan dalam upaya pencarian senyawa antikanker dengan penentuan nilai LC₅₀ setelah pemaparan larutan ekstrak selama 24 jam (Meyer, 1982). Penentuan LC₅₀ merupakan kadar atau konsentrasi suatu zat, yang dapat menyebabkan 50 % kematian pada hewan percobaan dari suatu kelompok spesies setelah hewan percobaan tersebut terpapar dalam waktu tertentu.

Uji sitotoksitas ini dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menggunakan *Artemia salina leach* sebagai hewan uji. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan uji pendahuluan/praskrining aktivitas biologis yang sederhana untuk menentukan toksitas suatu senyawa atau ekstrak secara akut menggunakan hewan coba larva udang (*Artemia salina naupli*). Parameter yang ditunjukkan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologi pada suatu senyawa pada *Artemia salina Leach* adalah jumlah kematian larva udang karena pengaruh pemberian senyawa dengan dosis yang telah ditentukan.

Keuntungan dari metode BSLT antara lain penggerjaan yang cepat dan mudah, hanya membutuhkan waktu pengamatan selama 24 jam, cepat mendapatkan hasilnya, murah dalam pembayarannya., merupakan metode yang sederhana, dan hanya dibutuhkan sampel yang sedikit, selain itu dalam pelaksanaannya tidak membutuhkan keahlian khusus.

Hal pertama yang dilakukan sebelum pengujian sitotoksik adalah mengembangbiakan Larva udang dengan cara menetasan kista *Artemia salina* yang dilakukan kurang lebih selama 48 jam. Setelah 48 jam larva udang dipindahkan dalam wadah tiap-tiap konsentrasi, Berdasarkan morfologinya larva *Artemia salina Leach* yang berumur 48 jam sudah mulai mempunyai mulut dan saluran pencernaan serta cadangan makanannya sudah mulai habis sehingga larva mulai mencari makan. *Artemia salina* yang berumur 48 jam sensitif terhadap suatu zat yang dimasukkan, berbeda dengan larva berumur 24 jam yang belum mempunyai saluran pencernaan sehingga ekstrak tidak dapat diabsorbsi oleh larva. Oleh karena itu, penelitian ini digunakan hewan percobaan larva *Artemia salina* yang berumur 48jam .

Daun tapak dara yang sudah melalui proses ekstraksi dengan pelarut etanol 96 % siap digunakan untuk pengujian BSLT. Larutan induk dari ekstrak daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) dibuat 2000 ppm yaitu dengan menimbang 0,2 g ekstrak daun tapak dara dengan 100 ml air laut. Kemudian larutan induk yg telah dibuat diencerkan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 1000 ppm, 900 ppm, 800 ppm, 700 ppm, 600 ppm, 500 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm, dan 100 ppm, yang akan digunakan untuk uji orientasi konsentrasi terlebih dahulu. Selain itu dibuat pula kontrol negatif berupa air laut dan larva udang tanpa penambahan ekstrak. Hal ini dilakukan untuk mengetahui

pengaruh air laut maupun faktor lain terhadap kematian larva. Sehingga dapat dipastikan bahwa kematian larva hanyalah akibat dari penambahan ekstrak yang dilakukan. Percobaan ini dilakukan dengan 3 kali replikasi/pengulangan (*triplo*) dengan tujuan untuk memperoleh keakuratan data dan mengurangi kesalahan dalam proses penelitian.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh kematian larva berbeda-beda pada masing-masing konsentrasi. Untuk hasil uji pendahuluan pada uji sitotoksitas daun tapak dara dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 4.

**Uji Pendahuluan Sitotoksitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara
(*Catharanthus roseus* L.)**

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Jumlah larva yang mati			Total	Rata-rata kematian larva	% Mortalitas
		P1	P2	P3			
1	Blanko	0	0	0	0	0	0%
2	100	2	3	2	7	2,33	23,3%
3	200	3	3	4	10	3,33	33,3%
4	300	5	4	3	12	4	40%
5	400	6	5	5	16	5,33	53,3%
6	500	7	6	7	20	6,67	66,7%
7	600	8	6	7	21	7	70%
8	700	9	8	8	25	8,33	83,3%
9	800	9	9	9	27	9	90%
10	900	10	10	10	30	10	100%
11	1000	10	10	10	30	10	100%

Setelah 24 jam, larva yang hidup dihitung, dikatakan hidup jika larva masih bergerak aktif, sekecil apapun gerakan tersebut. Kriteria standar untuk mengukur kematian larva udang yaitu apabila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama 10 detik pengamatan.

Konsentrasi yang digunakan untuk sitotoksitas yaitu persentase kematian larva antara 20-80% karena dengan persentase kematian tersebut dapatkan kurva yang berbentuk garis lurus sehingga penentuan LC₅₀ pada uji BSLT ini dapat menggabarkan hasil yang lebih tepat. Berdasarkan tabel didapatkan persentase kematian larva pada rentang 20 - 80% yaitu pada konsentrasi 100 - 700 $\mu\text{g/mL}$. Untuk hasil pengujian sitotoksitas daun tapak dara dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 5.

**Hasil Pengujian Sitotoksitas Ekstrak Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara
(*Catharanthus roseus* L.)**

No	Konsentrasi (µg/mL)	% Mortalitas	Log Konsentrasi	Nilai Probit
1.	100	23,3%	2,0000	4,2710
2.	200	33,3%	2,3010	4,5684
3.	300	40%	2,4771	4,7467
4.	400	53,5%	2,6020	5,0828
5.	500	66,7%	2,6989	5,4316
6.	600	70%	2,7781	5,5244
7.	700	83,3%	2,8450	5,9661

Berdasarkan data tersebut dapat diketahui persentase mortalitas dari konsentrasi yang rendah 100 µg/mL ke konsentrasi yang paling tinggi terdapat pada konsentrasi 700 µg/mL mempunyai persentase yaitu sebesar 20-80%. Sedangkan pada blanko tidak memberikan mortalitas terhadap larva. Hal ini sesuai dengan teori, bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin banyak jumlah larva yang mati. Selain itu dari persentase kematian larva tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak akan menghasilkan jumlah kematian larva yang semakin tinggi pula.

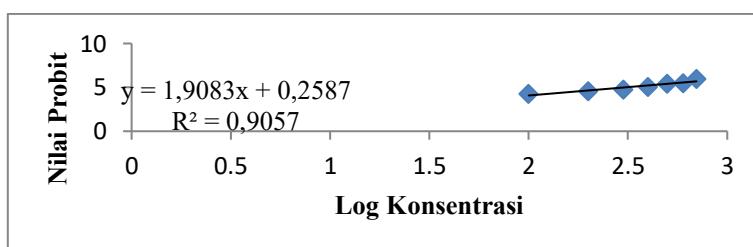
Mekanisme kematian larva *Artemia salina* Leach berhubungan dengan fungsi senyawa alkaloid dan flavonoid menghambat daya makan larva (antifedant). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Senyawa ini akan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya dan akibatnya larva mati kelaparan .

Flavonoid juga menghambat pertumbuhan larva dengan cara menghambat sinyal ke inti sel dengan menyerang protein kinase sehingga menghambat proliferase sel kanker dan menghambat pertumbuhan suatu keganasan dengan menyerang reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tersebut berperan dalam meningkatkan pertumbuhan keganasan sel kanker. Senyawa golongan flavonoid dapat menginduksi fragmentasi DNA yang mengakibatkan DNA menjadi rusak, kerusakan DNA mengakibatkan munculnya peningkatan protein proapoptosis sehingga terjadi proses apoptosis sel yang mengakibatkan kematian sel, dan proses pertumbuhan sel dapat terhalang dan mengakibatkan kematian sel(Mappasomba.M et al., 2019). Sedangkan untuk senyawa saponin

bekerja dengan cara mengikat oksigen yang terdapat dalam air sehingga kadar oksigen dalam air menurun dan larva *Artemia salina* leach dapat mengalami kematian karena kekurangan oksigen(Nuralifah et al., 2018).

Data yang diperoleh pada tabel 4.5 tersebut, kemudian dianalisis dengan menggunakan tabel analisis probit untuk mendapat nilai LC₅₀. Analisis probit dilakukan untuk mengetahui tingkat konsentrasi bahan yaitu ekstrak etanol daun tapak dara terhadap respon sampel (persentase kematian sel)(Naritasari.F et al., 2010).

Setelah dilakukan analisis probit dapat diketahui grafik persamaan garis lurus $Y = 1,9083x - 0,2587$ sebagai berikut :



Gambar 1.

Kurva Regresi Linier Antara Log Hubungan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara dengan Nilai Probit

Kurva diatas menunjukkan log konsentrasi terhadap nilai probit yang didapat dari persentase kematian larva. Kemudian dimasukkan nilai Y yaitu nilai probit 50% hewan uji dan didapatkan nilai X = 2,4845. Maka nilai LC₅₀ antilog 2,4845 adalah 305,1406 μ g/mL Antilog nilai x tersebut merupakan nilai LC₅₀. Parameter yang ditunjukkan untuk mengetahui adanya aktivitas biologi pada senyawa terhadap hewan uji ialah dengan menghitung jumlah larva yang mati karena pengaruh pemberian senyawa dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

Hasil LC₅₀ yang didapat lebih kecil dari 1000 μ g/mL yaitu 305,1406 μ g/mL. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun tapak dara di kategorikan toksik dan ekstrak memiliki kandungan aktif senyawa sitotoksik yang berpotensi sebagai antikanker,yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Nilai LC₅₀ yang diperoleh mencerminkan toksisitas bahan terhadap hewan uji. Semakin besar harga LC₅₀ berarti toksisitasnya semakin kecil dan sebaliknya semakin kecil harga LC₅₀ maka semakin besar toksisitasnya.

KESIMPULAN

Golongan senyawa yang terkandung di dalam daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) dengan metode skrining fitokimia yaitu alkaloid,

flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Berdasarkan hasil uji sitotoksitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun tapak dara (*Catharanthus roseus* L.) memiliki daya sitotoksitas dengan nilai $LC_{50} = 305,1406 \mu\text{g}/\text{mL}$ dan termasuk dalam kategori toksik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, peneliti ingin mengucapkan terima kasih kepada Ayahanda Arifin dan Ibunda Masni serta keluarga tercinta. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. apt. M. Pandapotan Nasution, MPS selaku pembimbing. Terima kasih kepada seluruh dosen serta staff Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah dan seluruh teman - teman Fakultas Farmasi stambuk 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Dewi U.K, Saraswati. T. 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.
- Djamil R., Tria. A. 2009. "Penapisan Fitokimia, Uji BS LT, Dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Beberapa Spesies Papilionaceae."*Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 7 (2):65-71.
- Fadli, Suhaimi et al. 2019. "Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium Polyanthum* (Wight) Walp .) Dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Acute Toxicity Test Of Ethanol Extract Of Salam Leaf (*Syzygium Polyanthum* (Wight) Walp .) With BSLT Method."*Jurnal Medical Sains* 4 (1):35-42.
- Leonardy. C, Nurmainah et al. 2019. "Karakterisasi Dan Skrining Fitokimia Infusa Kulit Buah Nanas (*Ananas Comosus* (L.)Merr.) Pada Variasi Usia Kematangan Buah."*Jurnal Untan* 1-15.
- M.Hasanah. 2016. "Analisis Golongan Senyawa Kimia Dan Uji Potensi Antioksidan Dari Ekstrak Daun Cokelat (*Theobroma Cacao* L .)." *Hasil Ekstraksi Maserasi* 2:43-48.
- Mappasomba.M, Wirasmanto et al. 2019. "Penapisan Fitokimia Dan Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Beberapa Tanaman Obat Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach."*Jurnal Farmasi, Sains, Dan Kesehatan* 5(Septembe):30-34.
- Meyer, Putnam McLaughlin. 1982. *Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*.*Plant Medica*.
- Naritasari.F, Hendri. S. et al. 2010. "Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Etanol

- Bonggol Nanas (Ananas Comosus (L .) Merr) Terhadap Apoptosis Karsinoma Sel Skuamosa Lidah Manusia." *Majalah Obat Tradisional* 15(1):16-25.
- Nuralifah, Jabar et al. 2018. "Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Notika (Archboldiodendron Calosercium (Kobuski) Terhadap Larva Artemia Salina Leach Dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)." *Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo* 1-5.
- Purbosari P. P, Puspitasari et al. 2018. "Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Tapak Dara (Catharanthus Roseus L.) Dan Kolkisin Terhadap Perkecambahan Biji Cabai Rawit Hibrida (Capsicum Annum)." *Bioedukasi Jurnal Pendidikan Biologi* 15(1):733-36.
- RI, Depkes. 1989a. *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- RI, Depkes. 1989b. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- RI, Depkes. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Supriningrum.R, Sapri. S. et al. 2017. "Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Akar Kb (Coptosapelta Tomentosa Valeton Ex K.Heyne) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)." *Jurnal Ilmiah Manuntung* 2 (2):161.
- Verrananda M.I, Fitriani. V et al. 2016. "Identifikasi Metabolit Sekunder Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Tapak Dara (Catharanthus Roseus)." 162-167.
- Yulia. M, Anggraini. R. et al. 2020. "Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Metanol Buah Ketumbar (Coriandrum Sativum Linn) Terhadap Artemia Salina Leach Dengan Uji Bslt (Brine Shrimp Lethality Test)." *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia* 2(3):137-146.
- Zuraida, Z. 2018. "Analisis Toksisitas Beberapa Tumbuhan Hutan Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)." *Jurnal Penelitian Hasil Hutan* 36 (3):239-246.