

## The Toxicity Test of Ethanol Extract of Leaves *Averrhoa bilimbi* L. Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Sitti Rahimah, Fadillah Maryam BA, Bertha Ayu Limbong

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar, Jl. Perintis Kemerdekaan Km 13.7 Daya, Sulawesi Selatan, 90242, Indonesia

### Artikel info

Diterima : 23 Maret 2019  
Direvisi : 14 Juni 2019  
Disetujui : 10 Juli 2019

### Keyword

*Averrhoa bilimbi* L.  
Toxicity test  
Brine shrimp lethality test

### ABSTRACT

Brine shrimp lethality test (BSLT) is one of the initial screening methods for testing cytotoxic. Previous studies have scientifically proven that leaves of *Averrhoa bilimbi* L. have antioxidant and empirically used as anticancer. The aim of this study is to determine the toxicity effects ethanol extracts of *A. bilimbi* against shrimp (*Artemia salina* L.) using the BSLT method. Testing was done using several variations of concentration, 10; 250; 500; 750; and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Based on observations and analysis of data obtained that the ethanol extract of *A. bilimbi* leaves gives a moderate toxic effect with  $\text{LC}_{50}$  value of  $367.28 \pm 33.81 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

## Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test

### ABSTRAK

### Kata kunci

*Averrhoa bilimbi* L.  
Uji toksisitas  
Brine shrimp lethality test

*Brine shrimp lethality test* (BSLT) merupakan salah satu metode skrining awal pengujian senyawa sitotoksik. Penelitian sebelumnya telah membuktikan secara ilmiah bahwa daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki efek antioksidan sehingga menjadi dasar tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui efek toksisitas ekstrak etanol *A. bilimbi* terhadap larva udang (*Artemia salina* L.) dengan menggunakan metode BSLT. Pengujian dilakukan dengan pada beberapa variasi konsentrasi yaitu 10; 250; 500; 750; dan 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Berdasarkan hasil pengamatan dan analisis data yang diperoleh bahwa ekstrak etanol daun *A. bilimbi* mempunyai efek toksik sedang dengan nilai  $\text{LC}_{50}$   $367,28 \pm 33,81 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

### Koresponden author

Sitti Rahimah  
Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar, Jl. Perintis Kemerdekaan Km 13.7 Daya, Sulawesi Selatan, 90242, Indonesia  
Email: st.rahima07@gmail.com

## PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang tidak diketahui penyebabnya secara pasti, tetapi dipengaruhi oleh banyak faktor seperti merokok/terkena paparan asap rokok, mengonsumsi alkohol, paparan sinar ultraviolet (UV) pada kulit, obesitas dan diet tidak sehat, kurang aktivitas fisik, dan infeksi yang berhubungan dengan kanker. Kanker dapat dicegah dengan mengurangi faktor risiko terjadinya kanker tersebut. Dalam perkembangan di bidang kesehatan telah ditemukan obat-obat anti kanker dan dilakukan kemoterapi, namun faktor biaya yang mahal menjadi kendala. Hal ini mendorong masyarakat untuk melakukan pengobatan menggunakan bahan alam atau obat tradisional (Arter *et al.*, 2013).

Metode pengujian *brine shrimp lethality test* BSLT dengan menggunakan larva udang (*Artemia salina* L.) dianggap memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa anti kanker, suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai  $LC_{50}$  (konsentrasi yang mampu membunuh 50% larva kurang dari 1000  $\mu\text{g/mL}$  setelah waktu kontak 24 jam (Meyer *et al.*, 1982). Metode ini merupakan salah satu metode untuk skrining tanaman obat yang berpotensi sebagai anti kanker karena lebih murah, singkat, mudah dikembangkan serta tidak ada aturan etika dalam penggunaan bahan uji (Arimbi, 2015). Senyawa toksik yang ada pada ekstrak dapat masuk melalui bagian mulut larva udang dan diabsorpsi masuk ke dalam saluran pencernaan. Setelah proses absorpsi dilanjutkan dengan proses distribusi, senyawa toksik di dalam tubuh larva udang akan menyebabkan kerusakan reaksi metabolisme. Struktur anatomi tubuh larva udang pada tahap naupli masih sangat sederhana, yaitu terdiri dari lapisan kulit, mulut, antena, saluran pencernaan atau digesti yang masih sederhana (Arimbi, 2015).

Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan salah satu jenis tanaman yang dikenal oleh masyarakat dan digunakan sebagai salah satu sumber pengobatan tradisional. Daun *A. bilimbi* mengandung senyawa flavonoid, fenol, alkaloid, tanin, dan kumarin (Valsan dan Raphael, 2016). Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, anti radang, anti alergi, dan anti kanker (Ahmad *et al.*, 2015). Peranan antioksidan sangat penting dalam meredam efek radikal bebas yang berkaitan erat dengan terjadinya penyakit degeneratif yang didasari oleh proses biokimia dalam tubuh (Juniarti, 2009). Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Redha, 2010).

Penelitian yang dilakukan oleh Hasim *et al.* (2019) menunjukkan hasil uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun *A. bilimbi* berbeda secara signifikan dengan rata-rata nilai  $IC_{50}$  asam askorbat. Radikal bebas dalam tubuh terbentuk secara alami selama proses metabolisme. Pembentukan senyawa radikal bebas dalam tubuh yang tidak terkontrol atau melebihi batas akan menyebabkan kerusakan oksidasi sel yang mengarah terhadap risiko terkena penyakit seperti

arteriosklerosis, gagal jantung, kanker dan alzheimer (Landete, 2013).

Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan penelitian uji toksisitas dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun *A. bilimbi* menggunakan metode BSLT terhadap larva udang.

## METODE KERJA

### Material

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air laut, akuades, asam sulfat pekat, asam asetat, DMSO, etanol 70%, eter,  $\text{FeCl}_3$ , HCl, NaCl 10 %, pereaksi Dragendorf, pereaksi Wagner, pereaksi Mayer, serbuk magnesium dan suspensi ragi 1%.

### Pengelolaan sampel

Sampel penelitian berupa daun *A. bilimbi* dikumpulkan dan disortasi basah. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan air mengalir dan dikeringkan dengan menggunakan lemari pengering simplisia. Selanjutnya disortasi kering untuk memisahkan kotoran yang ikut selama pengeringan lalu diayak untuk memperoleh ukuran yang lebih kecil kemudian diekstraksi dengan etanol 70%.

### Pembuatan ekstrak

Sebanyak 200 g simplisia kering diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan penyari etanol 70% hingga simplisia terendam kemudian diaduk secara berskala. Didiamkan di tempat yang terlindung dari cahaya sinar matahari selama 3x24 jam. Hasil yang diperoleh dipisahkan antara residu dan filtrat. Residu diremaserasi dengan penyari yang sama hingga cairan berwarna bening. Filtrat dikumpulkan kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental.

### Skrining fitokimia

Uji skrining fitokimia ekstrak etanol daun *A. bilimbi* dapat dilihat pada Tabel 1.

### Pengujian BSLT

#### Penyiapan larva udang

Langkah awal yang dilakukan dalam penyiapan larva udang yaitu merendam telur *Artemia salina* sebanyak 50 mg dalam wadah kaca dengan air laut sebanyak 2 L. Alat penetas dilengkapi dengan lampu sebagai sumber cahaya dan diberi aerator yang berfungsi sebagai penyuplai oksigen dan menjaga agar telur tidak mengendap. Setelah 24 jam telur yang menetas dan menjadi larva siap untuk digunakan dalam pengujian setelah umur 48 jam.

#### Pembuatan konsentrasi sampel dan kontrol

Ekstrak etanol daun *A. bilimbi* ditimbang sebanyak 200 mg dan ditambahkan dengan air laut sebanyak 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 2000  $\mu\text{g/mL}$  sebagai larutan stok. Masing-masing ekstrak diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 1000, 750, 500, 250, dan 10  $\mu\text{g/mL}$ .

### Pelaksanaan pengujian

Pengujian sampel dilakukan dengan cara memasukkan masing-masing konsentrasi ekstrak ke dalam vial yang berbeda-beda. Selanjutnya sepuluh ekor larva udang umur 48 jam dipilih secara acak, dimasukkan ke dalam vial yang berisi air laut 10 mL

Tabel 1 Uji skrining fitokimia

Identifikasi senyawa	Pereaksi	Literatur
Flavonoid	2 g magnesium + 3 tetes HCl pekat	Warna merah jingga
Saponin	2 tetes HCl 2 N	Terbentuk buih stabil selama kurang lebih 10 menit
Tanin	5 tetes HCl 10% + 3 tetes larutan FeCl <sub>3</sub>	Warna Hijau atau biru kehitaman
Steroid atau terpenoid	2 tetes eter + 2 tetes asetat anhidrat + 1 tetes asam sulfat pekat	Terbentuk endapan oranye, merah atau kuning berarti positif terpenoid dan apabila terbentuk warna hijau positif steroid
Alkaloid	Pereaksi Dargendorf	Endapan hijau gelap
	Preaksi Wagner	Endapan hitam
	Pereaksi Mayer	Endapan hijau gelap

menggunakan pipet tetes, dan ditambahkan tiga tetes suspensi ragi 1% sebagai makanan. Perlakuan yang sama dilakukan pada vial berisi kontrol (larva udang tanpa ekstrak).

Vial uji didiadakan pada suhu kamar selama 24 jam. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali setiap perlakuan (triplo). Setelah 24 jam larva udang yang hidup ataupun mati dihitung dengan bantuan kaca pembesar. Persen kematian larva udang dihitung dengan menggunakan rumus :

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan dihitung dengan menggunakan analisis probit untuk mendapatkan nilai LC<sub>50</sub>. Data persentase kematian larva dibuat persamaan regresi linear:  $Y = b x a$

Dengan menggunakan metode analisis pada Microsoft Office Excel® dengan membuat persamaan garis lurus yang menghubungkan antara nilai log konsentrasi dengan nilai probit % mortalitas. Setelah mendapatkan persamaannya, maka masukkan nilai y sebagai nilai dari 50% kematian hewan uji yang akan menghasilkan nilai x sebagai log konsentrasi. Anti log x merupakan nilai LC<sub>50</sub>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan sampel uji dari daun *A. bilimbi* yang diekstraksi menggunakan metode maserasi. Proses ekstraksi dengan teknik maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruang. Keuntungan cara ini mudah dan tidak perlu pemanasan

sehingga kecil kemungkinan bahan alam menjadi rusak atau terurai. Pemilihan pelarut berdasarkan kelarutan dan polaritasnya memudahkan pemisahan bahan alam dalam sampel. Pengerjaan metode maserasi yang lama dan keadaan diam selama maserasi memungkinkan banyak senyawa yang akan terekstraksi (Istiqomah, 2013).

Proses maserasi dilakukan dengan menggunakan penyari etanol 70% pada simplisia *A. bilimbi* hingga diperoleh ekstrak 20 g dan didapatkan persen rendamen sebesar 10%.

Berdasarkan Tabel 2, terlihat bahwa hasil skrining fitokimia menunjukkan hasil positif pada flavonoid, saponin, tanin, steroid sedangkan pada uji alkaloid menunjukkan hasil negatif. Pengujian bebas etanol dilakukan pada ekstrak. Tidak terdapat bau ester menandakan ekstrak terbebas dari etanol sehingga dapat digunakan untuk tahap pengujian toksisitas selanjutnya.

Uji toksisitas ekstrak etanol daun *A. bilimbi* dilakukan dengan dengan metode BSLT. Metode ini dilakukan dengan cara mengamati kematian larva udang. Daur hidup pertumbuhan larva terdiri atas 3 tahap yaitu kista, napuli dan dewasa. Telur larva yang sudah berbentuk bulat akan menetas dalam waktu kurang lebih 48 jam dan akan berenang disebut napuli. Tahap napuli adalah tahap yang digunakan sebagai larva uji untuk uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT (Mioara, 2011).

Tabel 2 Hasil skrining fitokimia

Pereaksi	Indikator	Hasil	Ket
Flavonoid	Warna merah jingga	Warna merah jingga	+
Saponin	Terbentuk buih stabil selama ± 10 menit	Terbentuk buih stabil selama ± 10 menit	+
Tanin	Warna hijau atau biru kehitaman	Warna hijau atau biru kehitaman	+
Steroid atau terpenoid	Terbentuk endapan oranye, merah atau kuning berarti positif terpenoid dan apabila terbentuk warna hijau positif steroid	terbentuk warna hijau positif steroid	+
Alkaloid	Endapan merah atau jingga	Endapan hijau gelap	-
	Endapan coklat	Endapan hitam	-
	Endapan putih	Endapan hijau gelap	-

Tabel 3 Data hasil pengamatan kematian larva setelah 24 jam perlakuan

Sampel uji ( $\mu\text{g/mL}$ )	Jumlah larva udang yang mati			Total	% mortalitas	LC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	1	2	3			
Kontrol	-	0	0	0	0%	
Ekstrak etanol <i>A. bilimbi</i>	10	0	0	0	0%	367,28
	250	3	2	5	33,3%	
	500	5	9	5	63,3%	
	750	9	7	8	80%	
	1000	9	9	10	93,3%	

Pengujian ini menggunakan air laut alami sebagai media uji. Air laut yang digunakan adalah air laut yang berasal dari Selat Makassar. Kontrol negatif yang digunakan hanya berupa air laut dan larva udang serta suspensi ragi tanpa penambahan ekstrak.

Kematian pada larva udang disebabkan karena perubahan gradien konsentrasi yang drastis antara di dalam dan di luar sel sehingga menyebabkan senyawa toksik mampu menyebar dengan baik ke tubuh larva udang. Efek kerusakan metabolisme yang ditimbulkan terjadi secara cepat dapat dideteksi dalam waktu 24 jam, hingga menyebabkan 50% kematian larva udang (Dwijayanti, 2015).

Mekanisme kematian larva diperkirakan berhubungan dengan fungsi senyawa flavonoid yang menghambat daya makan larva. Selain dari itu, menurut Woo et al., (2013), mekanisme flavonoid sebagai anti kanker ada beberapa teori. Flavonoid sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis sel pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi ini diawali dengan dilepasnya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Efek lainnya adalah flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor/kanker yang salah satunya dengan menghambat aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran sel ke inti. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan keganasan sel kanker. Flavonoid juga berfungsi untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi.

Hasil penelitian dan data yang diperoleh berdasarkan hasil perhitungan dengan metode analisis probit nilai LC<sub>50</sub> dari ekstrak etanol daun *A. bilimbi* sebesar 367,28 $\pm$ 33,81  $\mu\text{g/mL}$  maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *A. bilimbi* memberikan efek toksik sedang karena Menurut Nguta et al. (2012) suatu ekstrak dikatakan toksik sedang jika LC<sub>50</sub> berada dalam rentang 100-500  $\mu\text{g/mL}$ .

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan dan analisis data yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *A. bilimbi* memberikan efek toksik sedang dengan nilai LC<sub>50</sub> 367,28 $\pm$ 33,81  $\mu\text{g/mL}$ .

## REFERENSI

- Arter DM, Harry SJK, Max RJR. Uji toksisitas dengan metode BSLT dan analisis kandungan fitokimia ekstrak daun soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan metode soxhletasi. Jurnal MIPA Unsrat. 2013;2(2);115-118.
- Ahmad AR, Juwita, Ratulangi SAD, Malik A. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak metanol buah dan daun patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.SM). Pharmaceutical Sciences and Research. 2015;2(1);1-10.
- Arimbi WN, Andi HA, Afghani J. Uji toksisitas dengan metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) terhadap hasil fraksinasi ekstrak kulit buah tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). Jurnal Kimia Khatulistiwa. 2015;4(1);75-83.
- Cahyadi R. Uji toksisitas akut ekstrak etanol buah pare (*Momordica charantina* L.) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). 2018. Skripsi. Universitas Diponegoro: Semarang.
- Dwijayanti E, Andi HA, Muhammad AW. Skrining fitokimia dan uji aktivitas sitotoksik pada kulit batang tampoi (*Baccaurea macrocarpa*) terhadap *Artemia Salina* Leach dengan Metode BSLT. Jurnal Kimia Khatulistiwa. 2015;4(1);6-10.
- Hasim, Yupi YA, Dimas A, Didah NF. Ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antioksidan dan anti inflamasi. Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan. 2019;8(3);86-93.
- Istiqomah. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap kadar piperin buah cabe jawa (*Piperis Retrofracti* Fructus). 2013. Skripsi. Universitas Islam Negeri Jakarta. Jakarta.
- Juniarti, Delvi O, Yuhernita. Kandungan senyawa kimia, uji toksisitas (*brine shrimp lethality test*) dan antioksidan (1,1-diphenyl-2- pikrilhidrazyl) dari ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* L.). Journal Makara Sains. 2009;13(1);50-54.
- Landete JM. Dietary intake of natural antioxidants: Vitamins and polyphenols. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2013;53(7);706-721.
- Mioara D. *Artemia salina*. Research Journal Balneo. 2011;2(4);119-122.
- Meyer BN, Ferrigini NR, Putnam JE, Jacobsen L, Nicholas DE, McLaughlin JL. Brine shrimp a convenient

- general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982;45:31-34.
- Nguta JM, Mbaria JM, Gakayu DWP, Gathumbi K, Kabasa JD, Kiama SG. Evaluation of acute toxicity of crude plant extracts from Kenyan Biodiversity using brine shrimp, *Artemia salina* Leach (Artemidae). 2012;3:30-34.
- Redha A. Flavonoid: struktur, sifat antioksidatif dan peranannya dalam sistem biologis. *Jurnal Belian*. 2010;9(2):196-202.
- Valsan A, Raphael RK. Pharmacognostic profile of *Averrhoa bilimbi* Linn. leaves. *South Indian Journal of Biological Science*. 2016;2(1):75-80.
- Woo HD, Kim J. Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2013;7:1011-1019.