Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) Terhadap Larva *Arthemia salina Leach* Dengan *Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)* (Toxicity of Ethanol Extract of Hibiscus Leaf (*Hibiscus tiliaceus* Linn) Against Larvae of *Artemia Salina Leach* Using *Brine Shrimp Lethality Test (BST)*)

Ivontia Is Iriyanti[1], Siwi Hastuti[2]
[1,2] Prodi Farmasi Poltekkes Bhakti Mulia Sukoharjo
Email: ivoenhm19@gmail.com ; siwihastutiapt@gmail.com

Abstract: *Cancer is one of the leading causes of death in the world. A wide variety of compounds have been developed to fight cancer, but most have side effects. Plant hibiscus (Hibiscus tiliaceus L.) is a plant that having pharmacological activity and has been shown empirically to have anticancer activity because it contains flavonoids, saponins and triterpenoids. This research aims to determine the potential toxicity to calculate LC50 hibiscus leaf ethanol extract against larvae shrimp (Arthemia salina L.) with Brine Shrimp Lethality Test method (BST). Hibiscus leaf ethanol extract obtained by remaserasi. Acute toxicity testing using a hibiscus leaf ethanol extract dose variation with 10 serial dilutions of the dose. The highest dose of 5000 µg/ml ofethanol extract of leaves of hibiscus plus 0.1 ml of DMSO and dilution with seawater. The number of dead larvae werecounted after 24 hours. Toxic effects of ethanol extract of hibiscus leaves indicated the death of shrimp larvae. This study showed a significant relationship between hibiscus leaf extract given by thedeath of the larvae. The results of the probit analysis showed* LC_{50} *price of ethanol extract of leaves of hibiscus is 358.415 µg/ml. Of ethanol extract of leaves of hibiscus on this study, shows the effect of acute toxicity to larvae of Artemia salina Leach according to the method BST. This is shown by the price of* LC_{50}*<1000 µg/ml l. So that the ethanol extract of leaves of hibiscus has the potential to be developed as a new anticancer drugs.*

Keywords: *Hibiscus tiliaceus, Artemia salina, toxicity, BST,* LC_{50}

Abstrak: Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia. Berbagai macam senyawa telah dikembangkan untuk melawan kanker, tetapi sebagian besar mempuyai efek samping. Daun waru (*Hibiscus tiliaceus L.*) merupakan tanaman memiliki aktivitas farmakologisdan telah terbukti secara empiris memiliki aktivitas sebagai antikanker karena mengandung flavonoid, saponin dan triterpenoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ketoksikan dengan menghitung LC_{50} ekstrak etanol daun waru terhadap larva udang (*Arthemia salina L.)* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test.* (BST). Ekstrak etanol daun waru diperoleh dengan remaserasi. Pengujian toksisitas akut ekstrak etanol daun waru menggunakan variasi dosis dengan 10 seri pengenceran dosis. Dosis tertinggi 5000 µg/ml ekstrak etanol daun waru ditambah 0,1 ml DMSO dan dilakukan pengenceran dengan air laut. Jumlah larva yang mati dihitung setelah 24 jam. Efek toksik ekstrak etanol daun waru ditunjukkan terhadap kematian larva udang.Penelitian ini menunjukkan adanya hubungan yang berartiantara ekstrak daun waru yang diberikan dengan kematian larva. Hasil dari analisis probit menunjukkan harga

LC $_{50}$ dari ekstrak etanol daun waru adalah358,415 µg/ml.Pemberian ekstrak etanol daun waru pada penelitian ini, menunjukkan efek toksisitas akut terhadap larva *Artemia salinaLeach* menurut metode BST. Hal ini ditunjukkan dengan harga LC 50 <1000 µg/ml. Sehingga ekstrak etanol daun waru mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker yang baru.

Kata Kunci**:** Hibiscus tiliaceus, Artemia salina, toksisitas, BST, LC_{50}

I. PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan penyebab kematian terbesar kedua setelah kardiovaskuler. Pengobatan konvensional yang umum dilakukan pada penyakit kanker antaranya dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi. Namun, terapi kanker secara pembedahan tidak dapat dilakukan khususnya pada sel kanker yang telah menyebar (metastasis), sementara penyembuhan dengan kemoterapi dan radioterapi memberikan hasil yang baik tetapi menimbulkan efek samping dan toksisitas yang besar, hal ini dikarenakan sel yang normal juga ikut mati sehingga pertumbuhan sel normal terganggu (Parmadi, 2000). Efek yang tidak diinginkan dari kemoterapi dan radioterapi ini, maka sebagian penderita membutuhkan alternatif lain dengan memanfaatkan bahan alam sebagai obat tradisional (Sukardiman dan Pratiwi, 2004).

Obat tradisional merupakan pilihan pengobatan yang kini makin diminati, terlebih lagi dengan kesadaran untuk kembali ke alam, bahkan dengan perkembangan yang kini ada makin mendapat perhatian bagi alternatif pelayanan kesehatan. Menurut penelitian terkini, obat-obat tradisional memang bermanfaat bagi kesehatan dan kini digencarkan penggunaannya karena lebih mudah dijangkau masyarakat, baik harga maupun ketersediaannya. Obat tradisional pada saat ini digunakan karena menurut banyak penelitian tidak terlalu banyak efek samping, karena masih bisa dicerna oleh tubuh. Indonesia merupakan Negara yang kaya akan berbagai tumbuhan. Penggunaan tumbuhan sebagai obat di Indonesia telah berlangsung sejak lama dan masyarakat menggunakannya secara turun temurun berdasarkan pengalaman, masih terbatas tradisional, belum banyak diketahui kandungan senyawa dan manfaat lainnya.

Banyak orang beranggapan penggunaan obat tradisional relatif lebih aman, namun bukan berarti obat tradisional tidak memiliki efek samping yang merugikan, bila penggunaannya kurang tepat. Agar penggunaannya optimal, perlu diketahui informasi yang memadai tentang kelebihan dan kelemahan serta kemungkinan penyalahgunaan obat tradisional (Ramadhani, 2009). Terdapat berbagai obat tradisional dari tanaman dan telah banyak diteliti kandungan kimia dan khasiatnya. Namun masih banyak tanaman yang belum diketahui kadar toksisitasnya, sehingga perlu diteliti lebih lanjut.

Tanaman yang telah banyak dikenal dan digunakan secara luas oleh masyarakat Indonesia adalah daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.). Daun waru mudah sekali ditemukan dan didapatkan hampir di seluruh Indonesia, terutama di sekitar pantai (DirjenPOM, 2001). Tulisan-tulisan ilmiah mengenai tanaman waru masih terbatas, terutama daunnya yang sangat bermanfaat untuk kesehatan. Inilah yang mengundang banyak penelitian mengenai daun waru mulai dari

kandungan kimia yang ada didalamnya sampai manfaat atau khasiat yang dapat diperoleh dari daun waru sendiri.

Waru merupakan tanaman menahun yang banyak tumbuh dan dikenal oleh masyarakat indonesia. Daun waru mengandung saponin, flavonoid dan polifenol, sedangkan akar waru mengandung saponin, flavonoid dan tanin (Dirjen POM, 2001) selain itu mengandung hibiskusin, hibiskus amida, asam vanilat, asam p-hidroksibenzoat, asam siringit, p-hidroksibenzaldehid, skopoletin, β-sitosterol, stigmasterol, β-stigmasteronon, hibiskolakton, hibiskon, hibiskokinon, lapakhol, gossipol, gossipetin, manosonon, hyperoside, kaemferol, kuersetin, gossipitin, *gossitrin*, para-kumarat, asam fumarat (Narender et al, 2009) dan triterpenoid (Sharma *et al*, 2010).

Daun waru digunakan untuk pengobatan demam, obat bisul dan obat amandel. Selain itu berkhasiat sebagai antiradang, antitoksik, peluruh dahak, dan peluruh kencing (Dirjen POM, 2001). Ekstrak metanol bunga dan daun waru telah diteliti, memiliki aktivitas antioksidan (Kumar *et al*, 2008). Ekstrak metanol, petroleum eter, dan kloroform dari daun waru diketahui memiliki, aktivitas antiinflamasi (Narender *et al*, 2009). Ekstrak etanol daun waru juga memiliki aktivitas pertumbuhan rambut (Rakhmawati, 2006). Akarnya pun telah diteliti memiliki aktivitas antitumor (Sunilson *et al*, 2008). Chen *et al* (2006) melakukan isolasi beberapa senyawa yang ada di kulit batang waru yaitu skopoletin baru (habiscusin), amida baru (hibiscusamide) bersama 11 senyawa lain dari uji sitotoksik senyawa-senyawa tersebut terdapat tiga seyawa yang mempunyai aktivitas antikanker sangat baik terhadap sel P-388 dan sel HT-29 secara in vitro dengan nilai LC_{50}< 4< µg/ml.

Daun waru mengandung triterpenoid, saponin, flavonoid dan polifenol (Dirjen POM, 2001). Senyawa yang diduga memiliki aktivitas antikanker ini harus diujikan terlebih dahulu pada hewan percobaan. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan toksisitas senyawa adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan larva udang *(Artemia salina Leach)* sebagai hewan uji. *Artemia* ini merupakan organisme sederhana, mudah berkembang biak dan menetas dalam kondisi normal laboratorium (Kanwar, 2007). Metode ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Senyawa dari suatu tanaman dapat dikatakan berpotensi sebagai antikanker apabila senyawa tersebut memiliki sifat toksik terhadap sel (sitotoksik). Hasil uji toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksis senyawa anti kanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat (Rahman *et al*., 2006).

Penelitian yang dilakukan meliputi uji toksisitas dari ekstrak etanol daun waru menggunakan metode BST. Bentuk ekstrak dipilih dengan harapan akan didapatkan kandungan senyawa aktif yang ada dalam daun waru. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan bahan informasi tentang potensi toksisitas pada ekstrak etanol daun waru sebagai salah satu tanaman yang telah dikenal secara luas oleh masyarakat.

Daun waru mengandung triterpenoid, saponin, flavonoid dan polifenol (Dirjen POM, 2001). Senyawa yang diduga memiliki aktivitas antikanker ini harus diujikan terlebih dahulu pada hewan percobaan. Salah satu metode yang

digunakan untuk menentukan toksisitas senyawa adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan menggunakan larva udang *(Artemia salina Leach)* sebagai hewan uji. *Artemia* ini merupakan organisme sederhana, mudah berkembang biak dan menetas dalam kondisi normal laboratorium (Kanwar, 2007). Metode ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Senyawa dari suatu tanaman dapat dikatakan berpotensi sebagai antikanker apabila senyawa tersebut memiliki sifat toksik terhadap sel (sitotoksik). Hasil uji toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksis senyawa anti kanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat (Rahman *et al*., 2006).

Penelitian yang dilakukan meliputi uji toksisitas dari ekstrak etanol daun waru menggunakan metode BST. Bentuk ekstrak dipilih dengan harapan akan didapatkan kandungan senyawa aktif yang ada dalam daun waru. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan bahan informasi tentang potensi toksisitas pada ekstrak etanol daun waru sebagai salah satu tanaman yang telah dikenal secara luas oleh masyarakat.

II. METODE PENELITIAN

Penyarian. Serbuk daun waru ditimbang 200 gram lalu dimasukkan kedalam backerglas ditambah etanol 96% (1:5). Campuran ini kemudian diaduk-aduk supaya tercampur rata selama 6 jam dan didiamkan selama 18 jam.. Setelah 18 jam campuran ini kemudian disaring dengan kain flannel untuk didapat filtrat. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan di atas *water bath* untuk menghilangkan pelarutnya sehingga didapatkan ekstrak kental.

Penetasan Telur. Penetasan telur *Artemia salina* dilakukan dengan cara air lautdisaring sehinggadidapat air laut yang jernih, lalu dimasukkan dalam botol aqua 500 ml. Telur A*temia salina* ditaburkan secukupnya diatas air laut tersebut dan dibiarkan dalam keadaan terbuka Setelah 48 jam telur akan menetas menjadi larva udang yang disebut nauphlii. Nauphlii tersebut siap digunakan untuk penelitian.

Pembuatan Larutan Uji. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dibuat larutan stok konsentrasi 5% atau dosis 50 mg/ml, yaitu dengan cara mencampur 500 mg ekstrak kental ditambah DMSO sebanyak 0,1 ml ditambah air laut sampai volume 10 ml dengan labu takar. Larutan uji dibuat dari larutan stok dipipet 1 ml dilakukan pengenceran dengan penambahan air laut sampai 10 ml dikocok sebagai larutan P1. Larutan P1 sebanyak 5 ml dipipet dan ditambahkan air larut sampai 10 ml dikocok sebagai larutan P2. Begitu seterusnya dilakukan pengenceran sampai 10 kali.

Uji Toksisitas. Uji pendahuluan dilakukan pada dosis tertinggi pada dosis 10 mg/ml. selain itu dilakukan uji kelarutan 500 mg ekstrak daun waru dalam 0,1 ml DMSO. Larutan uji dibuat dari larutan stok dipipet 1 ml dilakukan pengenceran dengan penambahan air laut sampai 10 ml dikocok sebagai larutan A. Larutan P1 sebanyak 5 ml dipipet dan ditambahkan air larut sampai 10 ml dikocok sebagai larutan P2. Begitu seterusnya dilakukan pengenceran sampai 10 kali.

Pengujian toksisitas terhadap larva udang dilakukan pada masing masing larutan yang telah dibuat dimasukkan 10 ekor larva udang. Vial dibiarkan terbuka pada suhu kamar dan setelah 24 jam jumlah larva udang yang mati dihitung. Laru-

 ISSN 2443-1249 *(Print) 2355-1313 (On Line) - ijmsbm.org*

tan kontrol dibuat tanpa penambahan larutan ekstrak, DMSO sebanyak 0,1 ml dilarutkan dengan air laut ad 5 ml kedalam vial dimasukkan 10 ekor larva udang.

Perhitungan larva udang yang mati harus dilakukan dengan teliti menggunakan bantuan pipet. Kriteria mati bagi larva udang bila tidak menunjukkan gerakan sama sekali selama pengamatan, bila masih ada sedikit gerakan maka dianggap masih hidup.

III. HASIL

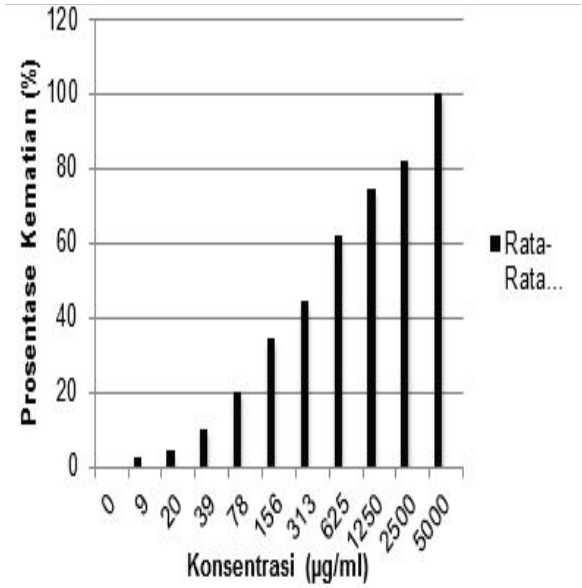
Pada remaserasi dengan etanol 96%, rendemen yang diperoleh sebesar 3,12% b/b. Organolepis ekstrak etanol daun waru berwarna hijau kehitaman, bentuk ekstrak kental berminyak dan bau harum.

Uji toksisitas. Efek yang ditimbulkan karena pemberian ekstrak etanol daun waru adalah kematian larva udang. Rata-rata kematian larva udang pada setiap perlakuan disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Waru Terhadap Larva *Artemiasalina Leach*.

Dosis (µg/ml)	Jumlah Kematian (Ekor)	Rata-Rata± SEM
5000	100	10±0
2500	82	8,2±0,179
1250	74	7,4±0,131
625	62	6,2±0,148
313	44	4,4±0,159
156	34	3,4±0,206
78	20	2±0
39	10	1±0,667
20	4	0,4±1,291
9	2	0,2±2,108
0	0	0±0

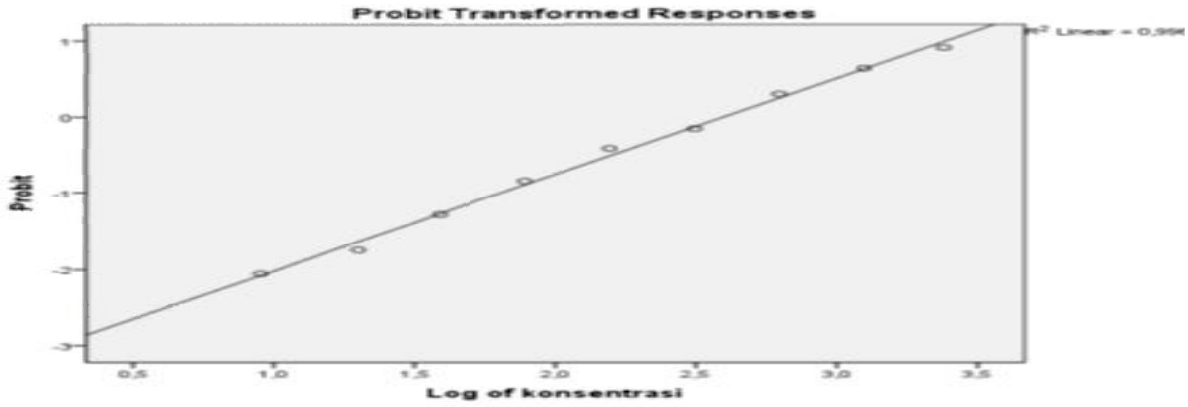
Jumlah larva tiap perlakuan uji dengan 10 kali replikasi adalah 100. Jumlah total larva udang yang digunakan adalah 1000 ekor. Jumlah kematian larva diperoleh dengan menjumlahkan larva yang mati pada setiap konsentrasi. Hasil uji toksisitas berupa jumlah kematian larva udang kemudian dibuat persentase kematian larva dari masing-masing kelompok perlakuan yang ditunjukkan dalam Gambar 1.



Tabel 7. Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Waru Terhadap Kematian Larva Udang

IV. PEMBAHASAN

Ekstrak Ekstrak etanol daun waru memiliki prosentase kematian pada dosis 0 µg/ml, 9 µg/ml, 20 µg/ml, 39 µg/ml, 78 µg/ml, 156 µg/ml, 313 µg/ml, 625 µg/ml, 1250 µg/ml, dan 5000 µg/ml terhadap larva udang berturut turut adalah 0%, 2%, 4%, 10%, 20%, 34%, 44%, 62%, 74%, 82%, 100%. Gambar 1 menunjukkan bahwa semakin besar nilai konsentrasi ekstrak, mortalitas pada *Artemia salina* juga semakin besar. Hal ini sesuai dengan Harborne (1994), yang menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka



Gambar 2. Grafik probit ekstrak etanol daun waru terhadap kematian larva

Data dianalisis dengan menggunakan probit dengan melakukan transformasi data konsentrasi ke bentuk logaritma seperti yang disajikan pada gambar 3. Dengan bantuan program *SPSS versi 18.0 for windows* menunjukkan harga LC_{50} sebesar 356,703 µg/ml. Suatu ekstrak menunjukkan aktivitas ketoksikan dalam BSLT jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi kurang dari 1000 µg/ml (Ramadhani, 2009). Berdasarkan pernyataan tersebut ekstrak etanol daun waru bersifat toksik terhadap larva udang, sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan alam untuk antikaknker.

V. SIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol daun waru menunjukkan harga LC_{50} adalah 356,703 µg/ml yang didapat dari hasil analisa probit, sehingga dapat disimpulkan ekstrak daun waru menunjukkan potensi toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach yang ditunjukkan dengan harga LC_{50} kurang dari 1000 µg/ml menurut metode BST

DAFTAR PUSTAKA

Chen, J.J., Huang,S., Duh, C.Y., Chen, I.S., Wang, T.C., and Fang, H.Y. 2006. A New Cytotoxic Amide From The Stem Wood Of *Hibiscus tiliaceus*, *J Plenta med* 72(10) : 935-8.

Direktorat Jendral Pengawas Obat dan Makanan. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (1) Jilid 2*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

Harborne, J.B. 1994. *Metode Fitokimia*.ITB. Bandung

Kanwar, A.S. 2007.*Brine Shrimp* (*Artemia salina*) - a Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays.*Journal of Chinese Clinical Medicine* 2(4):236-240.

Kumar, S., Kuma, D., and Prakash, O. 2008. Evaluation of Antioxidant Potential, Phenolic and Flavonoid Contents of *Hibiscus tiliaceus J. of Enviromental* Flowers. *Electronic J. of Enviromental, Agricultural and Food Chemistry* 7(4):2863-2871.

Narender, Kumar, S., Kumar, D., and Kumar, V. 2009. Antinociceptive And Anti Inflammatory Activity Of *Hibiscus tiliaceus* Leaves. *International J. Of Pharmacognosy And Phytochemical Research* 1(1) : 15-17.

Parmadi, A. 2000. Skrining Fitokimia Tanaman yang Mempunyai Daya Sitotoksik Terbesar Terhadap *Artemia salina Leach* dari Beberapa Tanaman Suku Compositae. *Skripsi*. Surabaya : Universitas Surabaya.

Rahman, A.S., Arslan, I., Saha, R., Talukder, N., Khaleques , S., and Ali, A. 2006. Bioactivity Guided Cytotoxic Activity of Clitoria Ternatea Utilizing *Brine Shrimp Lethality* Bioassay. *Bangladesh J Physiol Pharmacol* 22(1/2) : 18-21.

Rakhmawati, R. 2006. Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Bioaktif Daun Laban (*Vitex pubescens* Vahl.) Asal Kawasan Hutan Kalimantan Barat. *Tesis*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

Ramadhani, A.N. 2009. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) Terhadap Larva *Artemia salina Leach* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). *Laporan Akhir Penelitian Karya Tulis Ilmiah*. Semarang : Universitas Diponegoro

Sharma, M.C., Sharma, S., and Kohli, D.V. 2010. Phytochemical And Anti-Ulcer Investigations Of 95% Ethanolic-Benzene Chloroform Leaf Extract Of *Hibiscus tiliaceus* Linn. In albino Rat Model. *Annals Of Biological Research* 1(1): 15-20.

Sukardiman, R., dan Pratiwi, N.F. 2004. Uji Praskrining Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia* cf. *planiloba* Steph. Dengan Metode Uji Kematian Larva Udang dan Profil Densitometri Ekstrak Aktif. *Majalah Farmasi Airlangga* 4(3): 97 –100.

Sunilson, A.J., Mohan, S., Mohamed, M.A., Thomas, J., and Kumari, A.G. 2008. Antitumour Activity of *Hibiscus tiliaceus* Linn Roots.*Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutis*7(1): 123-125.