

PENENTUAN KANDUNGAN METABOLIT SEKUNDER, FENOLIK TOTAL, UJI ANTIOKSIDAN, DAN TOKSISITAS DARI EKSTRAK DAUN ULIN (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn)

Adlis Santoni¹, Suryati suryati¹, Yayan Rabbani Kurniawan*¹

¹Natural Materials Organic Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Andalas University, Padang, West Sumatra, Indonesia, 25163

*alamat email korespondensi : yayanrabbanikurniawan22@gmail.com

Abstract

Leaf (Eusideroxylon zwageri Teijsm. & Binn) is traditional Indonesian medicine plants. The aim of this research is to carry out phytochemical tests, antioxidant activity, toxicity, and phenolic total. Maceration has been done by using hexane, ethyl acetate, and methanol as solvent. Phytochemical test results of fresh E.zwageri leaf samples extracted using methanol contain alkaloid, steroid, flavonoid, terpenoid, and phenolic. Antioxidant activity with DPPH method (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazil) from the highest (IC₅₀) value to the lowest are hexane extract with weak activity (IC₅₀) 368.56 mg/L, ethyl acetate extract with moderate activity (IC₅₀) 115.41 mg/L, methanol extract with very strong activity (IC₅₀) 10.96 mg/L. This result is correlated with the total phenolic yield, the higher the (IC₅₀) value, the lower the total phenolic value, methanol extract had the highest value of 162,95 mg GAE/Gram, followed by ethyl acetate extract of 96.70 mg GAE/Gram and hexane with a value of 19.85 mg GAE/Gram. Toxicity test results using the (BSLT) method from the lowest to the highest value (LC₅₀) were hexane extract with very strong toxicity (LC₅₀) 82.28 mg/L, methanol extract with weak toxicity (LC₅₀) 696.63 mg/L and ethyl acetate with weak toxicity (LC₅₀) 812.46 mg/L.

Keywords: Daun (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn), Antioxidants, Total Phenolic, Toxicity

Abstrak

Daun (Eusideroxylon zwageri Teijsm. & Binn) merupakan tanaman obat tradisional Indonesia. Tujuan penelitian ini untuk melakukan uji fitokimia, aktivitas antioksidan, toksisitas, dan total fenolat. Maserasi dilakukan dengan pelarut heksana, etil asetat, dan metanol. Hasil uji fitokimia sampel daun E.zwageri segar yang diekstraksi menggunakan metanol mengandung alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, dan fenolat. Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) dari nilai IC₅₀ yang paling tinggi ke rendah adalah ekstrak heksana dengan antioksidan lemah (IC₅₀) 368,56 mg/L, ekstrak etil asetat dengan antioksidan sedang (IC₅₀) 115,41 mg/L, ekstrak metanol dengan antioksidan sangat kuat (IC₅₀) 10,96 mg/L. Hasil ini berkorelasi dengan hasil total fenolat, semakin tinggi nilai (IC₅₀) maka akan semakin rendah nilai total fenolat,

ekstrak metanol memiliki total fenolat paling tinggi 162,95 mg GAE/Gram diikuti ekstrak etil asetat 96,70 mg GAE/Gram dan ekstrak heksana dengan 19,85 mg GAE/Gram. Hasil uji toksisitas menggunakan metode (BSLT) dari nilai (LC₅₀) yang paling rendah ke tinggi adalah ekstrak heksana (LC₅₀) 82,28 mg/L dengan toksisitas yang sangat kuat, ekstrak metanol (LC₅₀) 696,63 mg/L dengan toksistas lemah dan etil asetat (LC₅₀) 812,46 mg/L dengan toksisitas lemah

Kata Kunci: Daun (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn), Antioksidan, Total Fenolat, Toksisitas

I. PENDAHULUAN

Penuaan dini dapat disebabkan oleh radikal bebas [1],[2]. Radikal bebas di produksi dari metabolisme tubuh dan juga dapat berasal dari pola hidup yang tidak sehat seperti, konsumsi makanan, pencemaran lingkungan, merokok, air yang tercemar logam, paparan sinar UV, kelebihan obat-obatan [3]–[5]. Dalam fisiologi normal, kadar radikal bebas dikontrol oleh beberapa enzim seperti, katalase, glu-tathione peroksidase, dan superoksida. Ketika jumlah radikal bebas lebih tinggi dari jumlah enzim endogen maka akan menyebabkan stres oksidatif sehingga dapat menimbulkan berbagai penyakit, salah satunya kanker [6].

Kanker muncul akibat kadar radikal bebas berlebihan yang berinteraksi dengan DNA sehingga menyebabkan terjadinya mutasi pada basa-basa DNA yang mendorong terbentuknya zat karsinogenik selaku aspek utama pemicu kanker. Berdasarkan laporan data dari *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) tahun 2020 terjadi

peningkatan kasus pengidap kanker didunia sebanyak 19,3 juta jiwa dan jumlah kasus yang meninggal sebanyak 9,9 juta jiwa [7]. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengobatan dengan mencari langkah preventif dalam menangkal radikal bebas dan menghambat perkembangan kanker.

Antioksidan merupakan salah satu solusi yang dapat menghambat stres oksidatif dan kerusakan. Banyak orang mengonsumsi antioksidan dalam bentuk bahan tambahan makanan komersial yang diproduksi secara sintetis dan mengandung bahan pengawet dalam jumlah tinggi [8]. Tetapi, antioksidan sintetis yaitu butyl hidroksi touluen, butil hidroksi anisol, dan tert-butil hidroksi quinon telah dilaporkan menghasilkan racun atau bertindak sebagai agen karsinogenik [9]. Sebaliknya, tumbuhan rempah-rempah kaya akan senyawa antioksidan dapat meminimalisir efek tidak baik yang ditimbulkan terhadap tubuh. Oleh karena itu, kebutuhan akan antioksidan alami meningkat, sehingga identifikasi konstituen antioksidan

dalam bahan tumbuhan dapat menjadi alternatif sumber antioksidan alami [6]. Aktivitas sitotoksik adalah salah satu cara untuk dapat merusak sel kanker. Banyak senyawa metabolit sekunder yang terdapat dibahan alam mengandung zat aktif yang bersifat toksik terhadap sel-sel tertentu, atau dapat dikatakan memiliki aktivitas biologis sebagai antikanker [10].

Tumbuhan kelompok *family Lauraceae* telah terbukti menunjukkan aktivitas antioksidan dan sitotoksik yang luar biasa di laboratorium. Setiap bagian tumbuhan seperti biji, duan, buah, akar, dan kulit batang dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan dan sitotoksik terhadap sel kanker karena sifat biologisnya. Secara tradisional, tanaman dan produk herbal sering dimanfaatkan sebagai langkah pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit [11],[12]. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada tumbuhan seperti alkaloid, steroid, fenolik, flavonoid dan terpenoid memiliki berbagai bioaktivitas, sehingga tumbuhan sering digunakan sebagai obat tradisional dalam pertahanan melawan radikal bebas dan sebagai upaya pengobatan kanker [13].

Ulin atau *iron wood (Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn) termasuk kedalam *family Lauraceae* merupakan tumbuhan tingkat tinggi yang tumbuh di dataran rendah. Semua bagian tumbuhan dimanfaatkan oleh

masyarakat, terutama bagian daun digunakan sebagai obat tradisional diantaranya untuk sakit perut, antipiretik, demam, masalah ginekologi, penguat badan, perawatan setelah melahirkan, kontra racun, dan alergi [14],[15]. Tumbuhan ini memiliki bioaktivitas seperti antidiabetes [16], antibakteri [15], [17]–[19]. Namun, beberapa penelitian yang telah dilakukan pada bagian daun *E.zwageri* tidak ada bukti farmakologis dan kimia secara ilmiah dari bagian daun *E.zwageri* atas dugaan toksisitas, aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolat terhadap ekstrak dengan tingkat kepolaran yang berbeda menggunakan maserasi bertingkat. Sehingga, tujuan penelitian ini adalah untuk menyiapkan ekstrak daun *E.zwageri* dengan berbagai polaritas menggunakan pelarut heksana bersifat non polar, etil asetat bersifat semi polar, metanol bersifat polar sehingga senyawa akan terekstrak sesuai dengan kepolaran dan untuk mengevaluasi kandungan metabolit sekunder, aktivitas antioksidan, toksisitas serta total fenolat menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), metode (BSLT) *Brine Shrimp Lethality Test*, dan metode folin-ciocalteu.

II. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan dan Alat

Bahan kimia yang digunakan etil asetat, heksana, metanol, 1,1–difenil-2-pikrilhidrazil

(DPPH), pereaksi Mayer dan Dragendroff, pereaksi Liebermann Burchad, Serbuk Mg dan HCl, Besi (III) Klorida, NaOH 1%, asam askorbat, telur *Artemia salina*, DMSO, air laut, reagen Folin-Ciocalteau, sodium karbonat, asam galat, aquades.

Alat yang dibutuhkan yaitu seperangkat peralatan distilasi, timbangan analitik, oven, peralatan gelas kimia, botol maserasi dan vial, spektrofotometer UV-Vis, plat tetes, aluminium voil, kaca arloji, rotary evaporator, pipet mikro.

2.2 Preparasi dan Ekstraksi Sampel

Tumbuhan *E.zwageri* diambil di Desa Selat, Kabupaten Batanghari, Provinsi Jambi. *E.zwageri* dari bagian daun, kulit batang, dan buah digunakan untuk identifikasi taksonomi di Herbarium, Universitas Andalas, Padang. Tumbuhan ini diambil serta dibersihkan menggunakan air. Sampel daun *E.zwageri* dipotong dan digunakan untuk tahapan selanjutnya. Proses ekstraksi yang digunakan adalah maserasi bertingkat. Sebanyak 500 g sampel dari daun *E.zwageri* diekstraksi secara bertahap menggunakan 3 jenis pelarut (heksana, etil asetat dan metanol). Maserasi pertama dilakukan dengan heksana. Proses maserasi dilakukan selama 3 hari, setiap harinya sampel tersebut dikocok, kemudian disaring. Filtrat di *rotary* evaporator sampai dihasilkan ekstrak heksana. Selanjutnya

dilakukan remaserasi sampai semua komponen non polar terekstrak. Kemudian dengan prosedur yang sama dilakukan remaserasi pada residu menggunakan pelarut etil asetat dan metanol. Ekstrak yang telah didapatkan (ekstrak heksana, etil asetat, dan metanol) yang diperoleh ditimbang dan digunakan untuk pengerjaan selanjutnya.

2.3 Uji Fitokimia

Sebanyak 2 gram ekstrak metanol, heksana, sampel segar, dan etil asetat dilarutkan dengan 50 mL didalam botol vial, kemudian disaring, selanjutnya filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi 5 mL (1:1) kloroform dan akuades, dikocok dan terbentuk dua lapisan. Lapisan bawah (lapisan kloroform) untuk uji steroid dan terpenoid. Lapisan atas merupakan (lapisan air) untuk uji saponin, flavonoid dan fenolik.

2.3.1 Uji Flavonoid

Sebanyak 1 mL lapisan air ditambahkan beberapa butir serbuk magnesium dan asam klorida pekat. Positif flavonoid jika wuncul warna merah.

2.3.2 Uji Fenolik

Sebanyak 1 mL lapisan air ditambahkan larutan FeCl_3 . Positif fenolik jika menghasilkan warna ungu tua atau biru.

2.3.3 Uji Saponin

Lapisan air 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dikocok, selanjutnya dua tetes asam klorida pekat ditambahkan kedalam tabung reaksi, positif saponin apabila tidak hilang busa selama 5 menit.

2.3.4 Uji Terpenoid dan Steroid

Plat tetes ditetaskan lapisan kloroform sebanyak 3 tetes dan ditambahkan pereaksi Liebermann Burchad. Positif tepenoid jika menghasilkan warna merah ungu atau merah dan positif steroid jika memberikan warna hijau biru atau hijau.

2.3.5 Uji Alkaloid

Daun E.zwageri dalam lumpang yang telah berisi 10 mL kloroform digerus. Selanjutnya ditambahkan 10 mL campuran kloroform ammonia. Kemudian disaring, filtrat yang diperoleh ditambahkan dua tetes H₂SO₄ 2 N serta dikocok. Terbentuk dua lapisan. Lapisan asam (atas) dipipet kedalam dua tabung reaksi. Tabung rekasi pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff, positif alkaloid jika terbentuk endapan orange dan pereaksi Mayer dimasukkan ke tabung reaksi kedua, positif alkaloid terbentuk endapan putih.

2.3.6 Uji Kumarin

Ekstrak metanol dielusi dengan etil asetat 100% pada plat KLT. Kemudian dilakukan

pengamatan noda dengan lampu UV panjang gelombang 365 nm (flourisensi biru). Selanjutnya NaOH 1% disemprotkan pada klat KLT dan amati noda pada lampu UV. Positif kumarin jika menunjukkan flourisensi warna biru yang semakin terang [20].

2.4. Uji Aktivitas Antioksidan

menggunakan metode DPPH

Sebanyak 2 mL dari kontrol positif (asam askorbat konsentrasi 2-10 mg/L) dan setiap larutan uji ekstrak heksana (31,25; 62,5; 125; 250; dan 500 mg/L), ekstrak etil asetat (12,5; 25; 50; 100; dan 200 mg/L), ekstrak metanol (1,5625; 3,125; 6,25; 12,5 dan 25 mg/L) dicampurkan dengan 3 mL DPPH 0,1 mM. Selanjutnya inkubasi selama 30 menit di tempat gelap dan diukur absorbannya pada panjang gelombang 517 nm. Sebanyak 3 mL larutan DPPH yang ditambah dengan 2 mL metanol digunakan sebagai kontrol. Pengujian dilakukan duplo.

Nilai % inhibisi dihitung berdasarkan absorbansi yang didapatkan dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_k - A}{A_k} \times 100 \%$$

Keterangan: A = absorbansi larutan uji

A_k = absorbansi kontrol

Berdasarkan nilai % inhibisi yang diperoleh, dihitung IC₅₀ dari persamaan regresi yang didapatkan dari kurva dengan sumbu x adalah

konsentrasi larutan uji dan sumbu y adalah % inhibisi [21].

2.5 Uji Toksisitas menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test

Uji toksisitas ekstrak daun *E.zwageri* pada variasi kepolaran dengan menggunakan menggunakan Metode BSLT.

2.5.1 Pembenihan Udang

Wadah pembiakan Larva udang *Artemia salina* terbagi atas 2 bagian, bagian gelap dan terang. Air laut dimasukkan pada wadah pembiakan tersebut dan sisi gelap ditambahkan telur udang. Larva udang menetas selama 48 jam dalam wadah pembiakan.

2.5.2 Penentuan Uji Toksisitas

Sebanyak 5 mL larutan dari masing-masing ekstrak, heksana (10; 20; 40; 80; 160 dan 320 mg/L), etil asetat (400; 500; 600; 700 dan 800 mg/L), metanol (400; 500; 600; 700 dan 800 mg/L) dimasukan kedalam vial dan pelarutnya diuapkan. Kemudian, ditambahkan 2 mL air laut dan 50 μ L DMSO. Kontrol yaitu air laut dan DMSO dilakukan hal yang sama. larutan uji dan kontrol ditambahkan 10 ekor larva udang. Kemudian ditambah air laut hingga volume 5 mL. Setelah 24 jam jumlah larva yang mati dihitung, pengujian dilakukan triplo. Nilai LC50 diperoleh dari persamaan

regresi yang diplotkan antara nilai probit dan log konsentrasi [22].

2.6 Uji Total Fenolat menggunakan Metode Follin-Ciocalteu

Sebanyak 0,5 mL asam galat (10-100) mg/L dan masing-masing ekstrak daun *E.zwageri* 500 mg/L ditambahkan ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen Follin-Ciocalteu dan diinkubasi 5 menit. Selanjutnya, 1 mL natrium karbonat 20% ditambahkan dan diencerkan sampai tanda batas dengan akuades. Kemudian diinkubasi larutan uji selama 2 jam. Selanjutnya diukur absorbansi pada $\lambda = 765$ nm. Kurva standar asam galat di dapatkan dari plot sumbu x adalah konsentrasi dan y adalah absorbansi. Selanjutnya nilai Galic Acid Equivalent (GAE) masing-masing ekstrak didapatkan berdasarkan persamaan regresi hasil kurva larutan asam galat [23].

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil Herbarium Sampel

Sampel berhasil teridentifikasi berdasarkan surat dari Laboratorium Herbarium, Universitas Andalas, nomor 311/K-ID/ANDA/IX/2020 ditetapkan sampel tersebut termasuk kelompok *family Lauraceae* dengan species *Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn.

3.2 Ekstraksi Daun *E.zwageri*

Metode ekstraksi yang dilakukan adalah maserasi, proses ini lebih diminati dan lebih aman karena tidak akan terjadi dekomposisi senyawa jika senyawa tidak tahan terhadap panas [24]. Maserasi yang digunakan bertingkat dari pelarut yang bersifat non polar

sampai polar dimulai dari heksana, etil asetat, dan metanol, sehingga akan terekstrak sesuai kepolarannya. Heksana mengekstrak golongan nonpolar, etil asetat akan mengekstrak golongan semi polar kemudian metanol mengekstrak senyawa dari nonpolar sampai polar.

Tabel 1. Jumlah ekstrak daun *E.zwageri*

Sampel (gram)	Ekstrak	Jumlah Ekstrak (gram)	Kadar Ekstrak (%)
500	Heksana	14,00	3,11
	Etil Asetat	21,65	4,81
	Metanol	109,10	24,24

Berdasarkan tabel diatas diperoleh 3,11% ekstrak heksana, 4,81% ekstrak etil asetat dan 24,24% gram ekstrak metanol. Ekstrak metanol menghasilkan persentase kadar yang paling tinggi, kemudian diikuti ekstrak etil asetat dan ekstrak heksana. Berdasarkan hasil tersebut daun *E.zwageri* memiliki kandungan senyawa yang bersifat polar lebih banyak dibandingkan dengan golongan senyawa non-polar dan semi polar, hasil ini mengindikasikan banyak golongan senyawa flavonoid dan fenolat.

3.3. Hasil Uji fitokimia

Uji fitokimia termasuk uji kualitatif yang bertujuan menentukan jenis senyawa apa saja

yang ada di dalam suatu tumbuhan. Uji tersebut dilakukan pada sampel segar, ekstrak heksana, etil asetat dan metanol. Hasil uji fitokimia tertera pada Tabel 2.

Daun *E.zwageri* berdasarkan tabel 2 mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, fenolik, dan steroid sehingga tumbuhan ini mempunyai aktivitas biologis berupa aktivitas antioksidan karena mengandung senyawa alkloid, fenolik, flavonoid serta toksisitas karena mengandung senyawa golongan terpenoid, alkaloid, dan flavonoid.

Tabel 2. Hasil uji fitokimia

Metabolit Sekunder	Pereaksi	Pengamatan	Sampel Segar	Ekstrak		
				Heksana	Etil asetat	Metanol
Kumarin	NaOH 1%	Fluoresensi	+	-	-	+
Fenolik	FeCl ₃	Hijau-biru	+	-	+	+
Steroid	Liebermann - Burchard	Hijau	+	+	+	+
Saponin	HCl pekat	Busa	-	-	-	-
Terpenoid	Liebermann - Burchard	Merah	+	+	+	+
Flavonoid	HCl + bubuk Mg	Orange-merah	-	-	-	-
Alkaloid	Dragendrof	Endapan orange	+	+	+	-

Keterangan: (-) tidak mengandung
(+) mengandung

3.4 Aktivitas Antioksidan Daun *E.Zwageri*

Penentuan aktivitas antioksidan terhadap ekstrak heksana, etil asetat dan metanol dengan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri. Nilai absorban yang didapatkan dikonversi menjadi nilai IC₅₀ untuk mengetahui aktivitas antioksidan. Nilai IC₅₀ didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji untuk menangkal radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka aktivitas penangkal radikal bebas semakin kuat dan menunjukkan semakin kuat aktivitas antioksidannya [25]

Tabel 3. Nilai IC₅₀ untuk setiap ekstrak *E.zwageri* dan kontrol positif

Ekstrak	IC ₅₀ (mg/L)
Metanol	10,96
Etil Asetat	115,41
Heksana	368,56
Kontrol positif (asam askorbat)	6,56

Berdasarkan Tabel 3, ekstrak metanol memiliki nilai IC₅₀ yang sangat kecil dibanding dengan ekstrak etil asetat dan heksana tetapi jauh lebih besar dari kontrol positif asam askorbat. Berikut klasifikasi tingkat aktivitas antioksidan berdasarkan nilai

(IC₅₀) jika, nilai (IC₅₀) 200-500 mg/L ekstrak tersebut dianggap sangat lemah aktivitas antioksidannya, (IC₅₀) 151-200 mg/L mempunyai aktivitas antioksidan lemah, (IC₅₀) 101-150 mg/L mempunyai aktivitas antioksidan sedang, (IC₅₀) 50-100 mg/L mempunyai aktivitas kuat, dan (IC₅₀) < 50 mg/L ekstrak tersebut mempunyai aktivitas antioksidan sangat kuat [26]. Hasil diatas menunjukkan ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC₅₀ 10,96 mg/L. Diikuti ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan sedang dengan nilai IC₅₀ 115,41 mg/L, dan ekstrak heksana memiliki aktivitas antioksidan sangat lemah dengan nilai IC₅₀ 368,56 mg/L. Jika dilihat dari penelitian sebelumnya mengenai aktivitas antioksidan kulit batang *E.zwageri* menggunakan metode DPPH, aktivitas antioksidan bagian daun lebih kuat dibanding dengan bagian kulit batang dengan nilai IC₅₀ 10,96 mg/L dan 44,90 mg/L [16].

Hasil penentuan aktivitas antioksidan dari setiap ekstrak dapat dihubungkan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder dari setiap ekstrak. Ekstrak metanol daun *E.zwageri* memiliki aktivitas sangat kuat dengan kandungan senyawa fenolik, alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan alkaloid. Aktivitas antioksidan kuat pada ekstrak metanol karena mengandung senyawa golongan fenolik dan polifenol (flavonoid).

Golongan senyawa tersebut dapat banyak mendonorkan atom hidrogennya untuk menetralkan radikal DPPH. Sementara, ekstrak etil asetat memiliki aktivitas sedang, hal itu disebabkan ekstrak etil asetat hanya mengandung senyawa golongan fenolik tetapi tidak terdapat golongan senyawa flavonoid sehingga kurang kemampuannya untuk menangkal radikal bebas dibandingkan ekstrak metanol. Ekstrak heksana aktivitas antioksidannya sangat lemah, karena ekstrak heksana berdasarkan uji fitokimia mengandung senyawa terpenoid dan steroid yang mana senyawa tersebut merupakan golongan senyawa yang minim gugus fungsi dan tidak memiliki cincin aromatis pada kerangka struktur senyawanya. Senyawa antioksidan paling populer pada tumbuhan adalah golongan polifenol, polifenol terbagi atas dua kelompok yaitu asam fenolat (asam hidroksibenzoat dan hidroksinamat) dan flavonoid, jika suatu tumbuhan mengandung senyawa tersebut maka tumbuhan tersebut berpotensi memiliki aktivitas antioksidan yang kuat [27].

3.5 Toksisitas Ekstrak Daun *E.zwageri*

Senyawa sitotoksik yang terdapat dibahan alam mengandung zat aktif yang bersifat toksik terhadap sel-sel tertentu, atau dapat dikatakan memiliki aktivitas biologis sebagai antikanker [28]. Metode (BSLT) sering

digunakan dalam penelitian awal atau sebagai uji praskrining dalam mencari sumber senyawa yang berpotensi dalam penghambatan pertumbuhan sel kanker. Kelebihan dari metode ini antara lain tidak memerlukan teknis yang aseptis, biaya bahan murah, waktu penerapan yang cepat,

memerlukan sampel yang relatif sedikit, dan praktis. Berdasarkan penelitian sebelumnya menunjukkan adanya korelasi antara hasil uji BSLT dengan daya sitotoksik senyawa antikanker terhadap metode MTT pada sel MCF-7, H460, dan MOLT-4 [10].

Tabel 4. Toksisitas daun *E.zwageri* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Ekstrak	Konsentrasi (mg/L)	Kematian Larva (ekor)			Angka Kematian (%)	Log Konsentrasi	AngkaP robit	LC ₅₀ (mg/L)
		I	II	III				
Heksana	10	0	1	1	7	1	3,52	82,28
	20	2	1	1	13	1,30	3,87	
	40	3	2	4	30	1,60	4,48	
	80	4	5	4	47	1,90	4,92	
	160	9	7	6	73	2,20	5,61	
	320	8	8	9	83	2,51	5,95	
Etil Asetat	400	2	1	1	13	2,60	3,87	812,46
	500	2	2	3	23	2,60	4,23	
	600	4	4	3	37	2,70	4,67	
	700	5	3	4	40	2,84	4,75	
	800	5	5	4	47	2,90	4,92	
Metanol	400	3	2	2	23	2,48	4,26	696,63
	500	3	4	3	30	2,60	4,48	
	600	5	5	2	40	2,70	4,75	
	700	6	3	5	47	2,84	4,92	
	800	7	6	4	57	2,90	5,18	
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	

Keterangan : Jumlah Larva udang tiap vial 10 ekor

Berdasarkan tabel diatas, semakin tinggi konsentrasi larutan uji yang digunakan pada setiap ekstrak akan meningkatkan kematian larva udang. Parameter hasil uji toksisitas

dengan metode (BSLT) adalah LC₅₀ yang merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh 50% *Artemia salina*, jika nilai LC₅₀ semakin kecil maka ekstrak tersebut

dapat dikatakan semakin toksik terhadap hewan uji sebab dengan konsentrasi rendah telah bias membunuh 50% *Artemia salina* [29]. Berikut klasifikasi tingkat toksisitas berdasarkan nilai (LC_{50}) jika, ekstrak (LC_{50}) 0-100 mg/L toksik sangat kuat, ekstrak (LC_{50}) 100- 500 mg/L bersifat toksik sedang, (LC_{50}) 500-1000 mg/L bersifat toksik lemah, dan ekstrak dengan (LC_{50}) > 1000 mg/L tidak bersifat toksik [30].

Berdasarkan Nilai LC_{50} yang didapatkan, ekstrak heksana bersifat sangat toksik terhadap udang *artemia salina* dibandingkan dengan ekstrak metanol dan etil asetat memiliki tingkat toksik yang sangat lemah dengan nilai LC_{50} berturut-turut 82,28; 696,63; dan 812,46 mg/L. Hasil tersebut menunjukkan ekstrak heksana memiliki tingkat toksik yang lebih baik dibandingkan ekstrak lain karena diindikasikan ekstrak heksana mengandung potensi senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik.

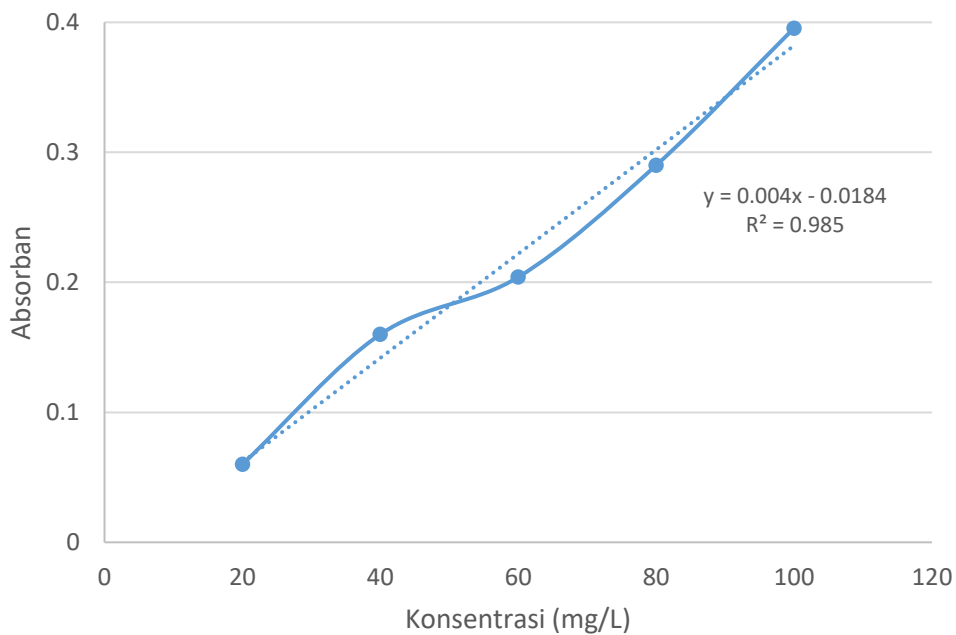
Tingginya tingkat toksik suatu ekstrak disebabkan oleh adanya golongan senyawa alkaloid, terpenoid, tannin, dan steroid. Hal tersebut berkorelasi dengan hasil yang telah didapatkan. Ekstrak heksana dan metanol memiliki kandungan senyawa steroid, alkaloid, dan terpenoid sedangkan ekstrak etil asetat hanya mengandung senyawa steroid dan terpenoid. Sehingga ekstrak etil asetat memiliki tingkat toksisitas paling rendah jika

dibandingkan dengan ekstrak heksana dan metanol. Selanjutnya, ekstrak heksana menghasilkan aktivitas toksisitas yang sangat kuat dari pada ekstrak metanol meskipun kedua ekstrak sama-sama memiliki senyawa steroid, alkaloid, dan terpenoid. Hasil tersebut berbeda dapat diindikasikan bahwa ekstrak heksana lebih banyak mengandung senyawa metabolit sekunder yang aktif baik secara kuantitatif dan kualitatif dibanding pada ekstrak metanol [31].

Pengujian kontrol yang terdiri dari air laut dan DMSO tidak mengakibatkan kematian terhadap larva udang *artemia salina*. Hasil tersebut menandakan bahwa kematian larva udang hanya dipengaruhi oleh ekstrak yang ditambahkan. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menggunakan beberapa pelarut yaitu DMSO, Tween 20, etanol, dan metanol. Hasilnya menunjukkan DMSO memiliki sifat toksik paling rendah, sehingga lebih aman untuk digunakan dalam pengujian. Selanjutnya sampel yang tidak larut sempurna dalam DMSO harus ditambahkan air laut, hal ini disebabkan karena adanya sampel yang tidak bisa larut dengan DMSO. Pada pelarutan ini, DMSO memiliki sifat hidrofobik dan hidrofilik dan air laut bersifat polar bereaksi dengan cara menurunkan tegangan permukaan [32].

3.6 Hasil Total Fenolat Ekstrak Daun *E.zwageri* dan Hubungan dengan Antioksidan.

Hasil kandungan total fenolat ekstrak daun *E.zwageri* didapatkan dari kurva larutan standar asam galat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva standar asam galat

Berdasarkan Gambar 1 didapatkan nilai $y = 0,004x - 0,0184$ dengan koefisien determinasi $R = 0,985$. Hasil ini menjelaskan bahwa 98,5 % absorban dipengaruhi oleh konsentrasi asam galat. Selanjutnya, nilai kandungan total

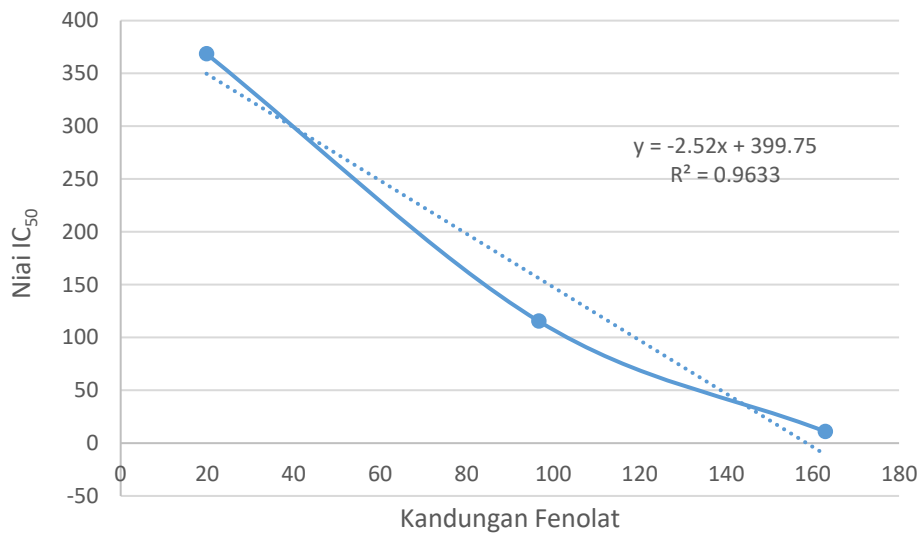
fenolat setiap ekstrak daun *E.zwageri* ditentukan menggunakan persamaan regresi tersebut. Kadar total fenolat tertera pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji kandungan total fenolat

	Ekstrak	Konsentrasi (mg/L)	Absorban Rata-rata	mg GAE/ Gram ekstrak
1.	Heksana	500	0,0065	19,85
2.	Etil asetat	500	0,0755	96,70
3.	Metanol	500	0,3075	162,95

Berdasarkan Tabel 5, dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol memiliki kandungan total fenolat yang tinggi diikuti oleh ekstrak etil asetat dan ekstrak heksana. Ekstrak metanol dapat menarik senyawa yang sebagian besar merupakan golongan fenolik pada daun *E.zwageri*, sehingga kandungan

total fenolat tertinggi terkandung pada ekstrak metanol dan berkorelasi dengan kelarutan komponen daun dalam pelarut yang sama juga mengikuti urutan yang sama. Hubungan kandungan total fenolat dan aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai IC_{50} dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan antara nilai IC_{50} terhadap kandungan total fenolat

Kandungan total fenolat ekstrak tumbuhan ini menunjukkan sebuah hubungan konsentrasi-respons pada aktivitas antioksidan untuk DPPH dimana peningkatan kandungan fenolik ekstrak, aktivitas antioksidan juga meningkat. Dalam hal ini, aktivitas antioksidan ekstrak dinyatakan dengan IC_{50} . Korelasi ini ditunjukkan pada Gambar 2 yang menyatakan korelasi total fenolat dan aktivitas

antioksidan (IC_{50}) ekstrak dengan persamaan regresi $y = - 2,52x + 399,75$ ($R^2 = 0,9633$). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa korelasi antar kandungan total fenolat dari ekstrak dengan aktivitas antioksidan DPPH dimana peningkatan konsentrasi menyebabkan meningkat juga aktivitas penangkalan radikal bebas [33]. Uji dengan metode DPPH mengungkapkan adanya

korelasi positif antara kandungan fenolat dan aktivitas penangkal radikal bebas di mana dinyatakan bahwa (IC_{50}) semakin kecil dengan meningkatkan kandungan total fenolat. Seperti diketahui bahwa semakin tinggi aktivitas antioksidan maka akan semakin rendah nilai (IC_{50}) [34].

KESIMPULAN

Sampel segar daun *E.zwageri* memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder berupa fenolik, flavonoid, steroid, terpenoid dan alkaloid. Pengujian antioksidan dengan metode DPPH menghasilkan, ekstrak heksana ($IC_{50} = 368,56$ mg/L) sangat lemah, ekstrak etil asetat sedang ($IC_{50}=115,419$ mg/L) dan ekstrak metanol bersifat antioksidan sangat kuat ($IC_{50}= 10,96$ mg/L). Hasil tersebut berkorelasi positif terhadap uji total fenolat ketiga ekstrak yang mana ekstrak metanol memiliki kandungan total fenolat yang tinggi diikuti ekstrak etil asetat dan metanol dengan nilai mg GAE/ Gram ekstrak berturut-turut 162,95; 96,70; 19,85. Selanjutnya dalam uji toksisitas dengan menggunakan metode (BSLT), ekstrak heksana memiliki toksisitas yang sangat kuat, sementara ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat bersifat lemah dengan nilai LC_{50} berturut-turut 82,28; 696,63; 812,46 mg/L, yang mana dari ketiga ekstrak tersebut ekstrak heksana lebih toksik dari ekstrak etil asetat dan metanol.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] S. Venkatesan *et al.*, "In-situ and ex-situ Phycoremediation Competence of Innate *Scenedesmus* sp . on Polluted Thirumanimuthar River Water," *Research square*, 9(35), 839–852, 2020.
- [2] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, and L. Periyasamy, "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases," *Indian J. Clin. Biochem.*, 30(1), 11–26, 2015.
- [3] A. Mandic, S. Djilas, J. Canadanovic-Brunet, G. Cetkovic, and J. Vulic, "Antioxidant activity of white grape seed extracts on DPPH radicals," *Acta Period. Technol.*, 40(1), 53–61, 2009.
- [4] M. Narayanan *et al.*, "Production and characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized by *E. Coli* Isolated from sludge soil," *Mater. Today Proc.*, 33(2020), 3646–3653, 2020.
- [5] D. MF, "Cigarette Smoke Causes Changes in Liver and Spleen of Mice Newborn Exposed During Pregnancy," *J. Cytol. Histol.*, 4(1), 3–8, 2013.
- [6] J. Akter, M. A. Hossain, K. Takara, M. Z. Islam, and D. X. Hou, "Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp): Isolation of active compounds," *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.*, 215(9), 9–17, 2019.
- [7] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185

- Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, 71(3), 209–249, 2021.
- [8] D. Shasha, “Reversed Phase HPLC-UV Quantitation of BHA, BHT and TBHQ in Food Items Sold in Bindura Supermarkets, Zimbabwe,” *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.*, 4(5), 578–584, 2014.
- [9] H. GRICE, “Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract,” *Food Chem Toxicol*, 24, 1127–1130, 1986.
- [10] H. Niksic *et al.*, “Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines,” *Sci. Rep.*, 11(1), 1–9, 2021.
- [11] D. Thi Phuong Lien, “Effects of Extraction Process on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Soybean,” *J. Food Nutr. Sci.*, 3(1), 33-38, 2015.
- [12] N. R. Farnsworth, O. Akerele, A. S. Bingel, D. D. Soejarto, and Z. Guo, “Medicinal plants in therapy,” *Bull. World Health Organ.*, 63(6), 965–981, 1985.
- [13] L. R. A. Al-Mqbal and M. A. Hossain, “Cytotoxic and antimicrobial potential of different varieties of ripe banana used traditionally to treat ulcers,” *Toxicol. Reports*, 6(9), 1086–1090, 2019,.
- [14] K. Herawan Timotius and I. Rahayu, “Qualitative Analysis of Eusideroxylon Zwageri Teijsm and Binn Seed By Gc-MS and Lc-MS,” *Int. J. Adv. Res.*, 8(5), 878–884, 2020.
- [15] Y. Mariani, F. Yusro, and E. Wardenaar, “Aktivitas Ekstrak Metanol Daun Ulin (Eusideroxylon Zwageri Teijsm & Binn) Terhadap Empat Jenis Bakteri Patogen,” *J. Biol. Trop.*, 20(1), 94-101, 2020.
- [16] I. W. Kusuma, Rahmini, R. Ramadhan, N. Rahmawati, R. A. Suwasono, and N. M. Sari, “Phytochemicals and Antidiabetic Activity of Eusideroxylon zwageri Stem Bark Collected from East Kalimantan, Indonesia,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 144(1), 1–8, 2018.
- [17] A. Ajizah, T. Thihana, and M. Mirhanuddin, “Potensi Ekstrak Kayu Ulin (Eusideroxylon zwageri) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara in Vitro,” *Bioscientiae*, 4(1), 37–42, 2007.
- [18] H. Wila, F. Yusro, and Y. Mariani, “Skrining Fitokimia Dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Batang (Eusideroxylon zwageri) terhadap *Escherichia Coli* dan *Salmonella Typhi*,” 8(1), 38–49, 2018.
- [19] H. Darussalam, “Uji Sensitivitas Ekstrak Kayu Ulin (Eusideroxylon zwageri tet b) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus Aureus* SECARA IN VITRO,” *Mahakam Med. Lab. Technol. J.*, 1(2), 21–30, 2017.
- [20] A. Itam, A. Wulandari, M. M. Rahman, and N. Ferdinal, “Preliminary phytochemical screening, total phenolic content, antioxidant and cytotoxic activities of *Alstonia scholaris* R. Br leaves and stem bark extracts,” *J. Pharm. Sci. Res.*, 10(3), 518–522, 2018.

- [21] A. M. Abdulsattar and M. A. Hossain, "Antibacterial and antioxidant potential of *Tetraena simplex* extracts of various polarities," *Toxicol. Reports*, 7(7), 925–929, 2020.
- [22] A. Bujor *et al.*, "Metabolite profiling, arginase inhibition and vasorelaxant activity of *Cornus mas*, *Sorbus aucuparia* and *Viburnum opulus* fruit extracts," *Food Chem. Toxicol.*, 133(5), 1–10, 2019.
- [23] M. Z. Alam, M. S. R. Alhebsi, S. Ghnimi, and A. Kamal-Eldin, "Inability of total antioxidant activity assays to accurately assess the phenolic compounds of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.)," *NFS J.*, 22,(12), 32–40, 2021.
- [24] A. K. Jha and N. Sit, "Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, 119(12), 579–591, 2022.
- [25] F. J. Sami and S. Rahimah, "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) dengan Metode (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin) -6-asam sulfonat)," *J. Fitofarmaka Indones.*, 2(2), 107–110, 2015.
- [26] Molyneux P, "The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Anti-oxidant Activity," *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 26(5), 211–219, 2004.
- [27] M. Olszowy, "What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?," *Plant Physiol. Biochem.*, 144(9), 135–143, 2019.
- [28] A. A. El-Gamal *et al.*, "Prenylated flavonoids from *Commiphora opobalsamum* stem bark," *Phytochemistry*, 141(2017), 80–85, 2017.
- [29] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, and J. L. McLaughlin, "Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents," *Planta Med.*, 45(1), 31–34, 1982.
- [30] C. Clarkson *et al.*, "In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa," *J. Ethnopharmacol.*, 92(2), 177–191, 2004.
- [31] E. Setiawati, S. Bahri, and A. R. Razak, "Ekstraksi Glukomanan Dari Umbi Porang (*Amorphophallus paeniifolius* (Dennst.) Nicolson)," *Kovalen*, 3(3), 234, 2017.
- [32] S. Geethaa, P. J. Thavamany, S. P. Chiew, and O. M. Thong, "Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test," *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 4(4), 179–182, 2013.
- [33] S. Sen, B. De, N. Devanna, and R. Chakraborty, "Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant," *Chin. J. Nat. Med.*, 11(2), 149–157, 2013.
- [34] C. M. Nyein, K. M. Mya, M. Thida, and K. N. Chan, "Detection of antioxidant and cytotoxic activities of *Tectona hamiltoniana* and *Terminalia chebula*," *J. Pharm. Sci. Res.*, 9(10), 1750–1754, 2017.