

SKRINING FITOKIMIA DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK AKAR JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)

Arum Dwi Okvianingsih^{1*}, Rohama¹, Fakhrudin Razy²

^{1*}Program Studi Sarjana Farmasi, Universitas Sari Mulia, Indonesia

¹Program Studi Sarjana Farmasi, Universitas Sari Mulia, Indonesia

²Program Studi Sarjana Hukum, Universitas Sari Mulia, Indonesia

*Korespondensi: arumdn99@gmail.com

Diterima: 29 November 2022

Disetujui: 18 Mei 2023

Dipublikasikan: 04 Juni 2023

ABSTRAK. Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah salah satu sumber senyawa bioaktif yang berasal dari Wilayah Tumbang Kunyi provinsi Kalimantan Tengah yang berpotensi sebagai antikanker. Mengetahui aktivitas toksisitas dan mengetahui senyawa apa saja yang terkandung dalam ekstrak akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Simplisia akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3x24 jam menggunakan metode maserasi, kemudian filtrat disaring dan dikentalkan menggunakan mesin *Rotary Evaporator*. Ekstrak yang didapat diidentifikasi senyawa metabolit sekunder dengan metode pereaksi warna dan dilakukan uji toksisitas terhadap larva *Artemia Salina Leach* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan analisis data menggunakan Analisis Probit. Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, alkaloid dan tanin serta memiliki efek toksik terhadap larva *Artemia salina* L yang ditandai dengan $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ yaitu sebesar 194,45 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etanol akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, alkaloid dan tanin serta memiliki efek toksik terhadap larva *Artemia Salina* L.

Kata kunci: *Artemia Salina Leach*, BSLT, Akar, Jeruk nipis, *Citrus aurantifolia*

ABSTRACT. Lime (*Citrus aurantifolia*) is one of the sources of bioactive compounds originating from the Tumbang Kunyi region, Central Kalimantan province, which may have anticancer properties. Objective to determine the activity of toxicity and to know what compounds are contained in the root extract of lime (*Citrus aurantifolia*). lime root simplicia (*Citrus aurantifolia*) was extracted using 96% ethanol as a solvent for 3x24 hours using the maceration method, then filtered and thickened using a *Rotary Evaporator*. The extract obtained was an identification of secondary metabolites and a toxicity test was carried out on *Artemia Salina Leach* using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method and data analysis using Probit Analysis. The results of this study showed that lime root extract (*Citrus aurantifolia*) contains secondary metabolites in the form of flavonoids, alkaloids and tannins and has a toxic effect on *artemia salina leach* which is indicated by $LC_{50} < 1000 \text{ g/mL}$ which is 194.45 g/mL . The ethanolic extract of lime root (*Citrus aurantifolia*) contains secondary metabolites in the form of flavonoids, alkaloids and tanins and has a toxic effect on *Artemia Salina* L larvae.

Keywords: *Artemia Salina Leach*, BSLT, Root, Lime

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit akibat perubahan fungsi dan struktur sel sehingga menyebabkan proses abnormalitas pada pembelahan sel (Kelvin dan Tyson, 2011). Pembelahan sel kanker dipicu berbagai faktor yang menyebabkan perubahan ekspresi gen sehingga timbul gangguan proliferasi yang tidak terkontrol,

berinvasi dan metastase ke jaringan dan organ lain (Kurniasari dkk., 2017). Indonesia merupakan negara yang memiliki aneka ragam hayati yang memiliki manfaat sebagai obat-obatan tradisional. Di Indonesia pengobatan tradisional menjadi pilihan pengobatan yang saat ini banyak diminati yang disebabkan kesadaran untuk kembali ke alam

(*back to nature*) karena relatif aman dan murah (Surbakti dkk, 2018).

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah tanaman poliembrionik yang ditanam di berbagai negara. Tanaman ini banyak terdapat di Indonesia karena iklimnya yang tropis. Jeruk nipis adalah salah satu tanaman yang banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia baik sebagai bumbu masakan ataupun secara empirik digunakan sebagai obat batuk, meluruhkan dahak, influenza dan jerawat (Lauma, Pangemanan, & Hutagalung, 2015).

Secara empiris, masyarakat menggunakan buah jeruk nipis sebagai pencegahan kanker dengan cara mengambil air perasannya. Pada dasarnya buah jeruk nipis ini merupakan buah yang musiman, maka dari itu peneliti ingin mencari alternatif lain yaitu pada bagian akar tanaman jeruk nipis. Berdasarkan uraian tersebut dapat dilihat bahwa jeruk nipis memiliki potensi menghambat pertumbuhan sel kanker, akan tetapi pada bagian lain pada tanaman ini belum pernah dilaporkan. Maka dari itu calon peneliti ingin melakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas ekstrak akar jeruk nipis dengan metode BSLT (*Brine shrimp lethality test*) karena kemungkinan akar jeruk nipis juga memiliki aktivitas dan efek toksisitas seperti pada penelitian sebelumnya.

Metode *Brine shrimp lethality test* (BSLT) merupakan uji pendahuluan aktivitas biologis yang cukup sederhana untuk menentukan toksisitas senyawa atau ekstrak secara akut. Metode ini memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker, sehingga sering dilakukan untuk skrining awal senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antikanker. Metode ini juga mudah dikerjakan, tidak membutuhkan teknik aseptik dan cepat dalam pengerjaannya. Hasil uji dari metode ini dapat dihitung sebagai LC50 (*Lethal Concentration*) ekstrak uji yang berarti jumlah dosis atau konsentrasi ekstrak dapat menyebabkan kematian larva udang sebanyak 50% (Widyasari, et al. 2018). Prinsip dari metode BSLT (*Brine shrimp lethality test*) ini yaitu berdasarkan pada tingkat mortalitas larva udang *Artemia Salina Leach* terhadap ekstrak uji. Ekstrak uji dapat

dikatakan toksik apabila nilai LC₅₀ kurang dari 1000 µg/mL.

ALAT DAN BAHAN

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung reaksi, timbangan analitik, alat maserasi, kertas saring, *water bath*, *Rotary Evaporator*, gelas beker, gelas ukur, cawan petri, vial dan seperangkat alat penetasan udang *Artemia salina* L.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), etanol 96%, telur larva *Artemia salina* L, NaCl, NaHCO₃, aquadest, asam asetat, pereaksi dragendorff, liebermen-burchad, FeCl₃ dan H₂SO₄.

METODE

Penyiapan bahan

Tumbuhan akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diperoleh dari Wilayah Tumbang Kunyi, Kalimantan Tengah.

Pembuatan ekstrak

300 gr serbuk akar jeruk nipis di maserasi dengan etanol 96%. Ekstrak di evaporasi dengan mesin *Rotary Evaporator* dengan suhu <60°C sampai terbentuk ekstrak kental.

Skrining fitokimia

Flavonoid

2 ml ekstrak cair ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. (Mustikasari & Ariyani, 2010).

Alkaloid

Cara 1 : 2 ml ekstrak cair ditambahkan pereaksi Dragendorff sebanyak 2 tetes.

Cara 2 : 2 ml ekstrak cair ditambahkan 2 tetes HCl pekat dan 2 tetes pereaksi mayer (Mustikasari & Ariyani, 2010).

Triterpenoid dan steroid

2 ml ekstrak cair ditambahkan HCl pekat 2 tetes dan H₂SO₄ pekat 2 tetes (Muzuka, 2018).

Tanin

2 ml ekstrak cair panaskan kemudian tambahkan 3 tetes FeCl₃ (Muzuka, 2018).

Pembuatan air laut buatan

Timbang 15 g NaCl larutkan dengan 1 liter aquadest. Tambahkan NaHCO₃ sedikit demi sedikit. Adik hingga homogen. Lalu ukur pH nya dalam rentang 8-9 menggunakan Ph meter (Radji et al., 2008).

Penetasan telur larva udang

Siapkan aquarium khusus BSLT yang memiliki bagian gelap dan bagian terang yang dipisahkan oleh sekat berlubang. Aquarium ditambahkan air laut buatan sebanyak 500 ml dengan penerangan lampu 40-60 watt. Aquarium dipasangkan aerator dan ditempatkan pada suhu 25°C-31°C sedangkan pada bagian gelap ditutup dengan penutup aquarium yang telah diberi lakban hitam. Telur artemia yang telah ditimbang sebanyak 100 mg kemudian direndam pada aquadest selama 1 jam lalu ditiriskan. Selanjutnya telur artemia dimasukkan kedalam bagian gelap dan dibiarkan menetas selama 48 jam. (Widyasari et al., 2018).

Pembuatan konsentrasi ekstrak yang akan diuji

Ekstrak yang akan diuji dibuat kontrol negatif dan larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/ml yaitu 100 mg ekstrak dilarutkan dengan 100 ml air laut buatan. Dari larutan induk ini dibuat konsentrasi 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml dan 100 µg/ml dengan cara pengenceran air laut buatan hingga 5 ml (Widyasari et al., 2018).

Uji toksisitas dengan metode BSLT

Siapkan vial untuk masing-masing konsentrasi larutan uji sebanyak 5 vial dan sebanyak 5 vial untuk larutan kontrol. Setiap kelompok uji terdiri dari 10 ekor larva *Artemia salina* L dengan replikasi sebanyak 3 kali. Kelompok 1 (kontrol) diberikan air laut sebanyak 5 ml. Kelompok 2 diberikan larutan uji ekstrak dengan konsentrasi 100 µg/ml. Kelompok 3 diberikan larutan uji dengan konsentrasi 250 µg/ml. Kelompok 4 diberikan larutan uji dengan konsentrasi 500 µg/ml. Kelompok 5 diberikan larutan uji dengan konsentrasi 750 µg/ml. Masing-masing vial diletakan dibawah penerangan lampu 40-60 watt. Pengamatan dilakukan selama 24 jam kematian larva *Artemia salina* L dibandingkan dengan kelompok kontrol. Larva *Artemia salina* L yang mati dapat diamati pergerakannya

menggunakan kaca pembesar. Jumlah larva yang mati dihitung dengan mengurangi jumlah larva total pada tiap konsentrasi dengan larva yang masih hidup (Widyasari et al., 2018)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan ekstrak

Penelitian ini menggunakan serbuk simplisia sebanyak 300 gram, kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 96%. Ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 15,60 gram. Adapun perhitungan rendemen ekstrak akar jeruk nipis (*Citrus Aurantifolia*) adalah sebagai berikut :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{berat sampel awal}} \times 100\%$$

$$\% \text{Rendemen} = \frac{15,60 \text{ gr}}{300 \text{ gr}} \times 100\% = 5,2 \%$$

Identifikasi metabolit sekunder

Hasil identifikasi metabolit sekunder pada ekstrak etanol akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dapat dilihat dalam tabel sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil identifikasi metabolit sekunder

Metabolit sekunder	Pereaksi	Perubahan warna	Hasil
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl Pekat	Jingga kemerahan	+
Alkaloid	Dragendof	Endapan jingga	+
	HCl Pekat + Mayer	Endapan putih	+
Terpenoid	HCl Pekat + H ₂ SO ₄ Pekat	Merah atau ungu	-
Steroid		Hijau kebiruan	-
Tanin	Air panas + FeCl ₃	Coklat kehijauan atau biru kehitaman	+

Dapat dilihat dari tabel diatas bahwa uji flavonoid pada ekstrak akar jeruk nipis mendapatkan hasil positif karena terbentuknya warna jingga kemerahan. Pada uji alkaloid pun juga mendapatkan hasil positif yang ditandai dengan adanya endapan jingga dan putih. Pada uji terpenoid dan steroid mendapatkan hasil negatif karena tidak terbentuknya warna merah atau ungu kebiruan dan hijau kebiruan, dapat dinyatakan bahwa ekstrak tidak memiliki kandungan senyawa terpenoid dan steroid. Dan pada uji tanin didapatkan hasil positif karena terbentuknya warna biru kehitaman.

Uji toksisitas

Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui aktivitas yang terdapat pada ekstrak akar jeruk nipis (*Citrus Aurantifolia*) terhadap larva *Artemia Salina Leach* menggunakan metode BSLT. Tujuan

penelitian ini untuk menentukan efek toksik dari ekstrak setelah pemberian dosis pada hewan uji. Hasil kematian larva *Artemia Salina Leach* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil kematian larva setelah 24 jam

Replikasi	Ppm	Log (ppm)	Probit	Mortalitas	% Mortalitas	Total larva
1	100	2,000	4,23	11	22%	50
2		2,000	4,23	11	22%	50
3		2,000	4,23	11	22%	50
1	250	2,398	5,47	34	68%	50
2		2,398	5,58	36	72%	50
3		2,398	5,47	34	68%	50
1	500	2,699	5,77	39	78%	50
2		2,699	5,77	39	78%	50
3		2,699	5,77	39	78%	50
1	750	2,875	6,28	45	90%	50
2		2,875	6,28	45	90%	50
3		2,875	6,28	45	90%	50

Berdasarkan konsentrasi larutan uji yang digunakan dapat dilihat pada tabel 4.3 diperoleh hasil bahwa konsentrasi 750 ppm menyebabkan rata-rata kematian larva tertinggi sedangkan pada konsentrasi 100 ppm menyebabkan kematian terendah. Pada kelompok kontrol didapatkan ada kematian larva . konsentrasi pada tiap vial yang berbeda memiliki jumlah kematian larva yang

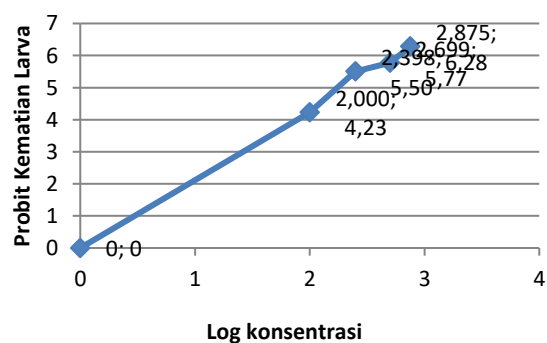
beragam. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi sangat berpengaruh terhadap kematian larva uji. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin tinggi juga jumlah kematian larva yang dapat dilihat pada gambar 4.1. Hal ini sesuai dengan teori yang menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin tinggi pula efek toksik yang dihasilkan.

Tabel 3. Rata-rata hasil kematian larva setelah 24 jam

Konsentrasi (%)	Ppm	Log (ppm)	Probit	Mortalitas	% Mortalitas	Total larva
0	0	0	0	0	0%	50
0,01	100	2,000	4,23	11	22%	50
0,025	250	2,398	5,50	34,7	69%	50
0,05	500	2,699	5,77	39	78%	50
0,075	750	2,875	6,28	45	90%	50

Setelah didapatkan data kematian larva dilakukan analisis yaitu analisis probit dengan *Ms. Excel* untuk mendapatkan nilai LC₅₀. LC₅₀ (*Lethal concentration 50%*) sendiri memiliki 3 kategori yaitu > 1000 ppm dinyatakan tidak toksik, 30-1000 ppm dinyatakan toksik dan < 30 ppm dinyatakan sangat toksik (McLoughlin,1998).

Berikut ini adalah grafik perbandingan antara nilai probit dan log konsentrasi.



Gambar 4.1 grafik hubungan antara log konsentrasi dengan nilai probit terhadap kematian larva

Perhitungan LC_{50} menggunakan persamaan $y=bx+a$, yaitu :

$$5 = 2,18739x + (-0,00653)$$

$$x = 2,2888146$$

$$LC_{50} = \text{antilog}(x)$$

$$LC_{50} = 194,45 \text{ ppm}$$

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut dapat dinyatakan bahwa ekstrak etanol akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki efek toksik terhadap larva *Artemia Salina Leach* dengan nilai LC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/ml}$ yaitu sebesar 194,45 $\mu\text{g/ml}$.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tentang identifikasi senyawa metabolit sekunder ekstrak akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) positif mengandung Flavonoid, alkaloid dan tanin. Hasil pengujian toksisitas dengan metode BSLT mendapatkan nilai $LC_{50} = 194,45 \mu\text{g/ml}$ yang berarti ekstrak akar jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki aktivitas toksik terhadap larva *Artemia Salina Leach*.

REFERENSI

- Arifin, B., Ibrahim, S., & others. (2018). Struktur, bioaktivitas dan antioksidan flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21–29.
- De Leo, F. and Del Bosco, F.S. (2005). Citrus Flavonoids as Bioactive Compounds: Role, Bioavailability, Socio-Economic Impact and Biotechnological Approach For Their Modification, 9th ICABR International Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years Later, Ravello, Italy.
- Depkes, R. I. (2000). Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat, Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan. *Departemen Kesehatan Republik Indonesia*. Jakarta: *Departemen Kesehatan Republik Indonesia*.
- Gunawan, D., & Mulyani, S. (2004). Ilmu obat alam (farmakognosi). *Penebar Swadaya*, Jakarta, 81, 83.
- Ita Susanti, E. (2020). *Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Kayu Bajakah (Spatholobus Littoralis Hassk) Terhadap Artemia Salina Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Bslt)*. Universitas Sari Mulia, Banjarmasin
- Kelvin, J. F., & Tyson, L. B. (2011). 100 Tanya Jawab Mengenai Gejala Kanker dan Efek Samping Pengobatan Kanker. *Jakarta: PT. Indeks*.
- Kurniasari, F. N., Harti, L. B., Ariestiningsih, A. D., Wardhani, S. O., & Nugroho, S. (2017). *Buku Ajar Gizi dan Kanker*. Universitas Brawijaya Press
- Lauma, S. W. (2014). Uji efektifitas perasan air jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* s) terhadap pertumbuhan bakteri staphylococcus aureus secara in vitro. *Pharmacoon*, 4(4).
- McLaughlin, J.L and Roger, L.L., (1998). *The Use of Medical Assays To Evaluate Botanicals*, *J. Drugs Information*. 32, 513-524.
- Muaja, A. D., Koleangan, H. S. J., & Runtuwene, M. R. J. (2013). Uji toksisitas dengan metode BSLT dan analisis kandungan fitokimia ekstrak daun soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan metode soxhletasi. *Jurnal MIPA*, 2(2), 115–118.
- Mustikasari, K., & Ariyani, D. (2010). Skrining fitokimia ekstrak metanol biji Kalangkala (*Litsea angulata*). *Jurnal Ilmiah Berkala Sains Dan Terapan Kimia*, 4(2), 131–136.
- Pambudi, A., Syaefudin, S., Noriko, N., Azhari, R., & Azura, P. R. (2015). Identifikasi Bioaktif Golongan Flavonoid Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.). *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains Dan Teknologi*, 2(3), 178–187.
- Panggabean, M. G. L. (1984). Teknik penetasan dan pemanenan *Artemia salina*. *Oseana*. Jakarta: IX (2), 1–4.
- Pratiwi, D., Suswati, I., & Abdullah, M. (2013). Efek anti bakteri ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus Aurantifolia*) terhadap *Salmonella Typhi* secara in vitro. *Saintika Medika*, 9(2), 110–115
- Sakka, L. (2018). Identifikasi Senyawa Alkaloid, Flavonoid, Saponin, Dan Tanin Pada Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Di Kabupaten Bone Kecamatan Lamuru Menggunakan Metode Infusa. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Diagnosis*, 12(6), 670–674
- Surbakti, P. A. A. (2018). Skrining fitokimia dan uji toksisitas ekstrak etanol daun binahong (*Androdera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Pharmacoon*, 7(3).
- Widyasari, R., Yuspitari, D., Wildaniah, W., & Wahida, R. C. (2018). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Kulit Buah Jeruk Sambal (*Citrus microcarpa* Bunge) Terhadap Larva *Artemia salina* L. Dengan Metode Brine

Shrimp Lethality Test (BSLT). *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 3(1), 51–58

Widyastuti, S. (2008). *Uji Toksisitas Ekstrak Daun Iprih (Ficus glabella Blume) terhadap Artemia salina Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.