

Cytotoxicity Test of Ethanol Extract of Herb Sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore) Against *Artemia Salina* Leach Shrimp Larvae Using the BSLT Method

Sanya Tanika Tambupolon,
Ridwanto Ridwanto*

Program Studi Sarjana Farmasi,
Fakultas Farmasi, Universitas
Muslim Nusantara Al-Washliyah,
Medan, Sumatera Utara,
Indonesia.

*email: ridwanto@umnaw.ac.id

Keywords:

BSLT
Sintrong
Sitotoksitas

Received: December 2023

Accepted: December 2023

Published: December 2023

Abstract

Cancer is a disease that arises as a result of an error in the division system at the cell level resulting in abnormal cell growth with a continuous, uncontrolled growth rate that can change shape and spread to other organs or is called metastasis. One of the plants that has the potential as an anticancer is the herb sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore). The purpose of this study was to determine the class of secondary metabolites contained in the powder and ethanol extract of the herb sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (benth.) S. Moore) and its cytotoxicity by looking at the LC₅₀ value using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. Cytotoxicity testing was carried out using the BSLT method with *Artemia salina* Leach shrimp larvae as test animals with concentrations of 100-1000 µg/mL, with negative control without added extract. The LC₅₀ value was analyzed using a straight line regression equation by entering data on the probit value and the logarithm of the concentration. The secondary metabolite compounds contained in sintrong herb (*Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore) using the phytochemical screening method are flavonoids, alkaloids, tannins, saponins and steroids. Based on the results of the toxicity test using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method, the LC₅₀ value = 295.3800 µg/mL showed that the sintrong herb extract is toxic and has the potential as an anticancer. The test compound is said to be toxic if the LC₅₀ value is <1000 µg/mL.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan potensi kekayaan alam serta flora dan fauna yang melimpah, khususnya potensi sebagai tanaman obat (1). Berdasarkan World Conservation Monitoring Center dilaporkan bahwa wilayah Indonesia memiliki beragam jenis tanaman obat dengan jumlah tanaman yang mencapai 2,518 tanaman, yang mana beberapa tanaman obat berpotensi dalam pengembangan obat antikanker diakibatkan senyawa-senyawa metabolit yang terkandung dalam tanaman (2).

Salah satu tanaman yang digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional adalah sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore). Sintrong selain dikonsumsi oleh masyarakat sebagai lalapan juga digunakan dalam pengobatan untuk mengatasi gangguan pencernaan, antelmintik, antiinflamasi, antidiabetes, antimalaria, dan pembersih luka. Kandungan kimia yang terdapat dalam sintrong adalah tanin, flavonoid, steroid, alkaloid (3).

Kanker adalah penyakit yang timbul akibat kesalahan sistem pembelahan ditingkat sel sehingga

terjadi pertumbuhan sel yang abnormal dengan tingkat pertumbuhan yang terus menerus, tidak terkontrol, dapat berubah bentuk serta menyebar ke organ lainnya atau disebut metastase (4). Kanker dapat dipengaruhi oleh banyak faktor seperti merokok atau terkena paparan asap rokok, mengkonsumsi alkohol, sinar ultraviolet pada kulit, obesitas, diet tidak sehat, kurang aktifitas fisik dan infeksi yang berhubungan dengan kanker. Uji yang dilakukan untuk mengetahui potensi antikanker adalah uji sitotoksitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (5).

BSLT merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk mengidentifikasi beberapa senyawa antikanker yang terkandung dari flora dan fauna di alam. Metode ini memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Metode ini juga mudah dikerjakan dan juga cukup akurat (6). Suatu ekstrak dinyatakan bersifat toksik menurut metode BSLT jika memiliki nilai LC₅₀ ≤ 1000 µg/ml (7). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol herba sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore) dan untuk

mengetahui adanya daya sitotoksitas ekstrak etanol herba sintrong dengan melihat nilai LC_{50} yang diujikan menggunakan metode BSLT.

METODE

Preparasi Sampel

Sampel diambil dari desa Sumbul, Kabupaten Dairi, Provinsi Sumatera Utara. Herba sintrong yang telah dicabut, dicuci bersih kemudian dikeringkan di lemari pengering selama 5 hari. Setelah kering herba sintrong dihaluskan dengan blender sampai berbentuk serbuk lalu diayak (8).

Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Sintrong

Pembuatan ekstrak herba sintrong dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 350 gr serbuk herba sintrong dimasukkan kedalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian etanol sebanyak 2625 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 96% sebanyak 875 ml, dipindahkan kedalam bejana tertutup (maserat I dan maserat II) biarkan ditempat yang sejuk terlindungi dari cahaya matahari selama 2 hari, kemudian enap tuangkan atau disaring sehingga diperoleh hasil maserat (9). Kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu tidak lebih dari 50C hingga diperoleh ekstrak kental (10).

Karakterisasi Simplisia

Pemeriksaan karakterisasi simplisia seperti pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam (11).

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa metabolit sekunder diantaranya alkaloid, flavonoid, saponin, steroid/triterpenoid, tanin dan glikosida (12).

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 Whatman No. 1 (13).

Penetasan Telur *Artemia salina* Leach

Penetasan telur dilakukan dalam wadah bening dengan menggunakan media air laut. 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. Wadah diisi dengan satu liter air laut buatan. Kemudian pada bagian gelap dimasukkan satu sendok telur. Pada wadah bagian gelap ditutup dengan aluminium 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 (14).

Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol Herba Sintrong

Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 2000 ppm. Dari larutan uji 2000 ppm, selanjutnya dibuat lagi larutan dengan konsentrasi 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 ppm dengan cara pengenceran. Untuk kontrol (0 ppm) dilakukan tanpa penambahan ekstrak.

Uji Sitotoksitas

Disiapkan vial untuk tiap kelompok sesuai tingkat konsentrasi, masing-masing disediakan 5 vial dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Vial diisi dengan sampel dan ditambahkan air laut buatan sebanyak 10 ml. Sepuluh ekor larva *Artemia salina* dipindahkan 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. Vial-vial tersebut diletakkan di bawah penerangan. Jumlah larva udang yang mati dalam tiap vial dihitung selama 24 jam dengan cara manual. Tingkat sitotoksitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati (15). Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila

larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik observasi (16).

Analisis Data

Pengaruh ekstrak herba sintrong terhadap *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.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil karakterisasi simplisia dapat dilihat pada Tabel 1. Menunjukkan bahwa hasil karakterisasi simplisia pada herba sintrong memenuhi syarat dalam Farmakope Herbal Indonesia (FHI).

Tabel 1. Hasil Karakterisasi Simplisia Herba Sintrong

No	Parameter	Hasil Pemeriksaan	Syarat MMI 1995
1.	Kadar Air	6%	<10%
2.	Kadar Sari Larut Air	13,89%	>11,4%
3.	Kadar Sari Larut Etanol	16,64%	>15,4%
4.	Kadar Abu Total	11,20%	<12,3%
5.	Kadar Abu Tidak Larut Asam	1,17%	< 3,1%

Berdasarkan hasil pemeriksaan karakterisasi simplisia pada Tabel I, kadar sari dilakukan untuk melihat jumlah kandungan senyawa yang dapat larut pada pelarut polar dan non polar (17). Untuk kadar sari larut etanol didapatkan 16,64% dan kadar sari larut air didapatkan 13,89%. Pemeriksaan kadar abu gunanya untuk melihat kandungan mineral dari simplisia. Untuk kadar abu didapatkan 11,20% dan kadar abu tidak larut asam didapatkan 1,17%. Kadar air dilakukan untuk melihat jumlah air

yang terkandung dalam simplisia dan hasil untuk kadar air didapatkan 6%. Dari hasil penetapan karakterisasi simplisia menunjukkan hasilnya memenuhi persyaratan dan terjamin mutunya berdasarkan *Materia Medika Indonesia* (MMI).

Hasil Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia pada serbuk simplisia dan ekstrak etanol herba sintrong dapat dilihat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Skrining Fitokimia Serbuk Simplisia dan Ekstrak

No	Pemeriksaan	Hasil Serbuk	Hasil Ekstrak
1	Alkaloid	+	+
2	Flavonoid	+	+
3	Saponin	+	+
4	Tanin	+	+
5	Steroid/Triterpenoid	+	+
6	Glikosida	-	-

Keterangan :

(+) : mengandung senyawa metabolit sekunder

(-) : tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

Berdasarkan hasil pemeriksaan skrining fitokimia herba sintrong mengandung senyawa metabolit alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan steroida.

Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksik terhadap larva udang *artemia salina* dengan metode BSLT merupakan

uji pendahuluan dalam upaya pencarian senyawa antikanker dengan penentuan nilai LC₅₀ setelah pemaparan larutan ekstrak selama 24 jam. Untuk hasil pengujian sitotoksitas ekstrak etanol herba sintrong dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengujian Sitotoksitas

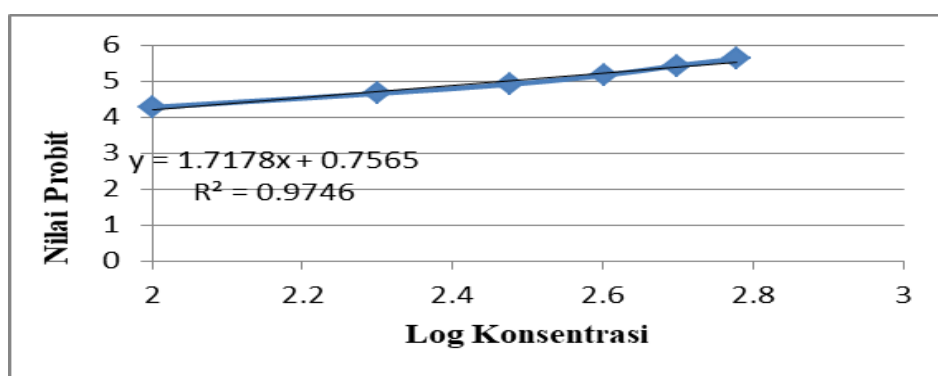
No.	Konsentrasi (µg/mL)	% Mortalitas	Log Konsentrasi	Nilai Probit
1	100	23,3%	2,0000	4,271
2	200	36,6%	2,3010	4,657
3	300	46,6%	2,4771	4,914
4	400	56,6%	2,6021	5,166
5	500	66,6%	2,6990	5,428
6	600	73,3%	2,7782	5,621

Berdasarkan data pada diatas dapat diketahui persentase mortalitas dari konsentrasi yang rendah 100 µg/mL ke konsentrasi yang paling tinggi yaitu pada konsentrasi 600 µg/mL mempunyai persentase yaitu sebesar 20-80%. Sedangkan pada blanko tidak memberikan mortalitas terhadap larva udang. Hal ini sesuai dengan teori, bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin banyak jumlah larva yang mati. Selain itu persentase kematian larva udang ini dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak akan menghasilkan jumlah kematian larva udang yang semakin tinggi pula (18).

Mekanisme kematian larva *Artemia salina* Leach berhubungan dengan fungsi senyawa alkaloid dan flavonoid yang terkandung dalam herba sintrong yang menghambat daya makan larva (*antifedant*). Cara kerja alkaloid dan flavonoid adalah dengan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk kedalam 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 (19).

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 ke sel 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.

Data yang diperoleh pada Tabel 3. Kemudian dianalisis dengan menggunakan tabel analisis probit untuk mendapatkan nilai LC₅₀. Setekah dilakukan analisis probit dapat diketahui grafik persamaan garis lurus $Y = 1,7178 X + 0,7565$ sebagai berikut.



Gambar 1. Kurva Regresi Linier Antara Log Konsentrasi Ekstrak Etanol Herba Sintrong 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 $x = 2,4704$. Maka nilai LC_{50} antilog 2,4704 adalah 295,3800 $\mu\text{g/mL}$. Antilog nilai x tersebut merupakan nilai LC_{50} . Parameter yang ditunjukkan untuk mengetahui adanya aktivitas biologi pada senyawa terhadap hewan uji adalah dengan menghitung jumlah larva yang mati karena pengaruh pemberian senyawa dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

Hasil LC_{50} yang didapat lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ yaitu 295,3800 $\mu\text{g/mL}$. sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak herba sintrong dikategorikan toksik dan ekstrak herba sintrong memiliki kandungan aktif senyawa toksik yang berpotensi sebagai antikanker, yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Nilai LC_{50} yang diperoleh mencerminkan toksisitas bahan terhadap hewan uji. Semakin besar harga LC_{50} berarti toksisitasnya semakin kecil dan jika semakin kecil harga LC_{50} maka semakin besar toksisitasnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa herba sintrong mengandung golongan senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan steroid. Berdasarkan hasil uji sitotoksitas menggunakan metode BSLT diperoleh hasil nilai LC_{50} 295,38 $\mu\text{g/mL}$ yang menunjukkan bahwa ekstrak herba sintrong memiliki daya sebagai sitotoksitas dan termasuk dalam kategori toksik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Syahputra RA, Sutiani A, Silitonga PM, Rani Z, Kudadiri A. Extraction and phytochemical screening of ethanol extract and simplicia of moringa leaf (*Moringa oleifera* Lam.) from sidikalang, north sumatera. *International Journal of Science, Technology & Management*. 2021;2(6):2072-6.
2. Mawardi AL, Sarjani TM, Pandia ERS. Uji Potensi Antikanker Ekstrak Tiga Spesies Tanaman *Sansevieria* Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*. 2021;18(1):1-8.
3. Maharani W, Lukmayani Y, Syafnir L. Studi Literatur Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid yang Berpotensi sebagai Antioksidan pada Daun Sintrong (*Crassocephalum Crepidioides* (Benth.) S. Moore). *Prosiding Farmasi*. 2020;6(2):532-8.
4. Sepvina NI, Ridwanto R, Rani Z. Uji Toksisitas Kitosan Cangkang Kerang Bulu (*Anadara antiquata*) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2022;7(2):380-9.
5. Rani Z, Ridwanto R, Miswanda D, Yuniarti R, Sutiani A, Syahputra RA, et al. Cytotoxicity Test of Cocoa Leaf Ethanol Extract (*Theobroma Cacao* L.) With Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. *Indonesian Journal of Chemical Science and Technology (IJCST)*. 2022;5(2):80-7.
6. Ridwanto R, Pratiwi A, Rani Z. Isolation and Toxicity Test of Chitosan from Green Mussels (*Perna viridis* L.) With Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 2023;5(5):759-65.
7. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DEJ, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*. 1982;45(05):31-4.
8. Ningtias A, Rani Z. Simplicia Characteristics and Phytochemical Screening of Buni Fruit (*Antidesma bunius* L. Spreng). *Indonesian Journal of Science and Pharmacy*. 2023;1(1):1-7.
9. Robiatun RR, Pangondian A, Paramitha R, Rani Z, Gultom ED. Formulation And Evaluation Of Hand Sanitizer Gel From Clove Flower Extract (*Eugenia aromatica* L.). *International Journal of Science, Technology & Management*. 2022 Mar 26;3(2):484-91.
10. Ningtias A, Rani Z, Ridwanto. Formulasi Sediaan Pewarna Pipi dalam Bentuk Padat dengan Menggunakan Ekstrak Buah Buni (*Antidesma bunius* (L.) Spreng). *INSOLOGI: Jurnal Sains dan Teknologi*. 2022 Aug 29;1(4):448-60.
11. Nurmazela V, Ridwanto R, Rani Z. Antioxidant Activity Test of Barangan Banana Hump's Ethanol Extract (*Musa Paradisiaca* (L.)) with DPPH (1, 1 Diphenyl-2-

- Picrylhydrazyl) Method. International Journal of Science, Technology & Management. 2022;3(5):1478-83.
12. Rambe R, Rani Z, Thomas NA. Uji Efektivitas Mukolitik Ekstrak Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb). Journal Syifa Sciences and Clinical Research. 2021;3(2):71-7.
 13. Djamil R, Anelia T. Penapisan fitokimia, uji BSLT, dan uji antioksidan ekstrak metanol beberapa spesies Papilionaceae. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2009;7(2):65-71.
 14. Fadli A, Drastinawati D, Alexander O, Huda F. Pengaruh rasio massa kitin/naoh dan waktu reaksi terhadap karakteristik kitosan yang disintesis dari limbah industri udang kering. Jurnal sains materi Indonesia. 2018;18(2):61.
 15. Supriningrum R, Sapri S, Pranamala VA. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Akar KB (*Coptosapelta tomentosa* Valetton ex K. Heyne) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Jurnal ilmiah manuntung. 2016;2(2):161-5.
 16. Nasution FAU, Ridwanto R, Rani Z. Uji sitotoksitas ekstrak etanol daun sirih cina (*Peperomia pellucida* [L.] Kunth) dengan metode brine Shrimp lethality test. Journal of Pharmaceutical and Sciences. 2023;1927-34.
 17. Pulungan AF, Ridwanto R, Dalimunthe GI, Rani Z, Dona R, Syahputra RA, et al. Phytochemical Screening And Antioxidant Activity Testing Of Porang (*Amorphophallus Muelleri* Blume) Leaf Ethanol Extract From Kuta Buluh Region, North Sumatera. International Journal of Health and Pharmaceutical (IJHP). 2022;3(1):1-7.
 18. Saragih DS, Ridwanto R, Daulay AS, Miswanda D, Nasution HM. Toxicity Test of Windu Shrimp (*Penaeus monodon*) Skin Chitosan With Brine Shrimp Lethality Test Method. Indonesian Journal of Chemical Science and Technology (IJCST). 2022;5(2):88-93.
 19. Aprilyanie I, Handayani V, Syarif RA. Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Buah Tanaman Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC.) Dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Makassar Natural Product Journal (MNPJ). 2023;1(1):1-9.