

Analisis toksisitas dan potensi antikanker ekstrak metanol daun Majapahit (*Crescentia cujete*) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Fatimah Fatimah¹, Rahma Diyan Martha¹, dan Danar Danar²

¹STIKES Karya Putra Bangsa Tulungagung

Jl. Tulungagung-Blitar KM 4, Sumbergempol-Tulungagung Jawa Timur, Indonesia

²Universitas Negeri Malang

Jl. Semarang 5 Malang 65145 Jawa Timur, Indonesia

Email: fatimah@stikes-kartrasa.ac.id

Abstrak: Tanaman Majapahit (*Crescentia cujete*) merupakan salah satu tanaman di Indonesia yang diketahui memiliki senyawa fenolat, saponin, tanin, alkaloid, dan terpenoid. Beberapa jenis senyawa yang termasuk kedalam golongan fenol diketahui memiliki aktivitas antikanker. Pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui toksisitas ekstrak metanol daun Majapahit menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Pada uji toksisitas menggunakan metode BSLT digunakan lima konsentrasi ekstrak metanol daun Majapahit, yaitu; 500, 400, 300, 200, dan 100 ppm. Ekstrak tersebut kemudian di ujikan pada larva udang *Artemia salina* L. umur 48 jam. Pada tiap konsentrasi digunakan 10 ekor larva dengan tiga kali pengulangan. Data kematian larva tiap konsentrasi, kemudian di lakukan analiais probit untuk menentukan nilai LC50. Berdasarkan hasil analisis probit dari kematian larva udang pada tiap konsentrasi ekstrak, dapat diketahui bahwa nilai LC50 ekstrak metanol daun Majapahit adalah 642,877ppm. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa ekstrak bersifat toksik dan berpotensi dikembangkan sebagai antikanker karena memiliki nilai LC50 < 1000 ppm.

Kata kunci: tanaman Majapahit , *Crescentia cujete*, toksisitas, LC50

Analysis of toxicity and anti-cancer potential of Majapahit (*Crescentia cujete*) leaf methanol extract using *Brine Shrimp Lethality Test* method

Abstract: The Majapahit plant (*Crescentia cujete*) is one of the plants in Indonesia which is known to have phenolic compounds, saponins, tannins, alkaloids, and terpenoids. Several types of compounds belonging to the phenol group are known to have anticancer activity. The study aimed to determine the toxicity of the methanol extract of the leaves of Majapahit using the *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)* method. Toxicity test was done using five concentrations of Majapahit leaf methanol extract, there were 500, 400, 300, 200, and 100 ppm. The Majapahit extract was then tested on *Artemia salina* L. shrimp larvae aged 48 hours. At each concentration, ten larvae were used with three repetitions. Larvae mortality data for each concentration of the extract would be used to carried out probit analysis to determine the LC50 value. Based on the results of the probit analysis of the mortality of shrimp larvae at each extract concentration, it could be seen that the LC50 value of the Majapahit leaf methanol extract is 642.877ppm. So, it means that the extract is toxic and has the potential to be developed as an anticancer because it has an LC50 value of <1000 ppm.

Keywords: *Majapahit plant* , *Crescentia cujete* , toxicity, LC50

PENDAHULUAN

Tanaman introduksi yang tumbuh di Indonesia salah satunya adalah tanaman Majapahit (*Crecentia cujete*) yang merupakan asli Amerika tengah, yang sudah banyak tersebar di Asia dan Afrika (Smith & Dollear, 1947). Pemanfaatan tanaman ini di Indonesia sangat minim. Penelitian Ejelonu, Lasisi, Olaremu, dan Ejelonu (2011) yang meneliti ekstrak buah Majapahit, bertujuan untuk mengetahui komponen senyawa metabolit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa komponen metabolit yang terkandung dalam ekstrak buah majapahit adalah fenol, tanin, alkaloid, saponin, flavonoid, cardenolides, antrakuinon, dan phiobatanin. Beberapa senyawa metabolit, seperti saponin, flavanoid, tanin, dan fenolat diketahui mampu menghambat pertumbuhan sel kanker. Berdasarkan hal tersebut, tanaman dari bahan alam berpotensi sebagai penghasil senyawa antikanker salah satunya adalah tanaman majapahit. Tingkat toksisitas senyawa antikanker dari bahan alam rendah dibandingkan dengan kemoterapi dalam pengobatan kanker.

Metode untuk mengetahui toksisitas suatu ekstrak dari bahan alam salah satunya yaitu dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)* (Sukardiman & Pratiwi, 2004). Metode ini menggunakan larva *A. salina* Leach untuk pengujiannya dan untuk mengetahui hasilnya dari banyaknya larva *A. salina* Leach yang mati. Kematian larva *A. salina* Leach dipengaruhi oleh pemberian ekstrak atau senyawa yang terkandung dalam ekstrak dalam konsentrasi tertentu (Silva, Nascimento, Batista, Agra, & Camara, 2007) selama 24 jam untuk menentukan nilai LC50 dan penentuan nilai LC50 menggunakan probit analisis. Hasil yang diperoleh dari analisis probit dapat diketahui jika kurang dari 1000 µg/mL dari setiap ekstrak atau zat yang diuji artinya memberikan informasi adanya aktivitas biologik (Anwar, Yulianti, Hakim, Fasya, Fauziyah, & Muti'ah, 2014). Pengujian ini merupakan salah satu skrining pendahuluan terhadap zat bioaktif yang diprediksi berkhasiat sebagai antikanker (Sunarni, Iskamto, & Suhartinah, 2003). Pada penelitian ini dilakukan pengujian fitokimia dari senyawa hasil ekstrak daun tanaman Majapahit dan uji toksisitas senyawa dengan menggunakan metode BSLT menggunakan larva udang *Aretemia salina* Leach.

METODE

Penelitian ini diawali dengan pembuatan ekstrak metanol daun Majapahit. Sampel daun Majapahit didapatkan dari halaman STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung. Ekstrak diperoleh dengan metode perendaman (maserasi) dengan pelarut metanol aquades 3:1 pada 100 gram sampel daun. Maserat kemudian disaring dan dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat tersebut dianalisis untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder secara fitokimia (Harborne, 1987).

Analisis fitokimia bertujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa: alkaloid, terpenoid, saponin, tanin, dan fenol. Analisis keberadaan alkaloid di dalam ekstrak dilakukan dengan menambahkan pereaksi *Mayer* pada filtrat ekstrak yang telah dicampur dengan 2,5 ml kloroform dan 2,5 ml amoniak. Hasil dinyatakan positif apabila muncul endapan putih. Analisis terpenoid dilakukan dengan mencampurkan ekstrak sebanyak 0,4 gram dengan asam asetat 20 tetes dan asam sulfat 2 tetes. Hasil positif ditandai dengan munculnya warna merah. Analisis fitokimia saponin dilakukan dengan cara mencampurkan ekstrak dengan aquades dan mengocoknya kuat-kuat. Hasil positif ditandai dengan munculnya buih. Analisis keberadaan tanin dilakukan dengan cara mencampurkan ekstrak dengan konsentrasi 2000 ppm dengan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl₃ dan hasil positif jika muncul warna hijau kehitaman. Analisis fitokimia

fenolik dilakukan dengan cara mencampurkan ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm sebanyak 1 ml dengan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1% hasil ditunjukkan dengan munculnya warna hijau atau biru kuat yang menunjukkan bahwa terdapat senyawa fenolik. Kemudian setelah dilakukan uji analisis fitokimia, ekstrak dilarutkan dengan DMSO 2%. Ekstrak tersebut digunakan untuk uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT menggunakan larva udang *Artemia salina* L. dengan usia 48 jam.

Uji BSLT diawali dengan melakukan uji pendahuluan untuk penentuan konsentrasi ekstrak yang aman bagi larva. Pembuatan sampel uji dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak yang telah dilarutkan dengan DMSO 2% kedalam air laut menjadi 5 konsentrasi, yaitu; 1000, 900, 800, 700, dan 600 ppm dengan volume akhir sebanyak 5 ml. Larva udang berusia 10 hari dimasukkan ke dalam tempat uji yang telah berisi ekstrak dengan berbagai konsentrasi. Setelah 24 jam kemudian, dilakukan penghitungan jumlah kematian larva udang. Setelah uji pendahuluan dapat diketahui bahwa ekstrak yang aman digunakan adalah di bawah 600 ppm. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan ekstrak dengan 5 konsentrasi ekstrak, yaitu; 500, 400, 300, 200, dan 100 ppm. Analisis data menggunakan analisis probit untuk menentukan nilai LC50 dan toksisitas ekstrak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini setelah proses maserasi dan didapatkan ekstrak kental daun Majapahit dilakukan analisis fitokimia. Hasil analisis fitokimia ekstrak Majapahit menunjukkan bahwa pada ekstrak metanol daun Majapahit terdapat senyawa alkaloid, tanin, saponin, fenolat, dan terpenoid.

Eksistensi alkaloid diketahui dengan munculnya endapan berwarna putih setelah dilakukan penambahan pereaksi meyer pada larutan. Endapan tersebut muncul akibat adanya reaksi antara alkaloid dengan potasium pada pereaksi *Mayer* (Salamah & Ningsih, 2017). Adanya kandungan senyawa tanin pada ekstrak ditandai dengan adanya warna hijau kehitaman, yang disebabkan karena tanin mengalami kondensasi (Rorong, Sudiarso, Prasetya, Mandang, & Suryanto, 2012). Pada ekstrak metanol daun Majapahit juga terdapat saponin yang diketahui dengan munculnya buih yang tetap bertahan selama 10 menit pada campuran ekstrak dengan aquades yang telah digojog (Cannel, 2000; Adusei, 2020). Pada ekstrak juga ditemukan adanya fenol yang ditandai dengan munculnya warna hijau. Kemunculan warna tersebut dikarenakan adanya reaksi hibridisasi antara Fe^{3+} dengan phenol (Manongko, Sangi, & Momuat, 2020). Selain itu, pada ekstrak muncul terpenoid yang memberikan hasil positif dengan warna merah kecoklatan setelah bereaksi dengan asam sulfat dan asam asetat (Ciulei, 1984; Astarina, Astuti, & Warditiani, 2013). Pada hasil reaksi tersebut tidak ditemui cincin berwarna biru kehijauan, sehingga tidak ditemukan adanya steroid pada ekstrak tersebut (Astarina dkk., 2013). Beberapa golongan senyawa yang terdeteksi pada uji fitokimia diketahui memiliki potensial sebagai antikanker. Anggota dari tanin yang terhidrolisis, salah satunya; tannic acid (gallotannin) diketahui mampu menekan beberapa protein yang berperan dalam persinyalan onkogen, menghambat VEGF/VEGFR, menghambat angiogenesis, dan menghambat proliferasi (Youness, Kamel, Elkasabgy, Shao, & Farag, 2021). Beberapa anggota dari saponin dan sapogenin juga diketahui memiliki aktivitas antikanker, antara lain: diosgenin, dioscin, polyphillin, oleandrin, polyphillin D, saikosaponin A, saikosaponin D, ginsenosides Rg3, ginsenosides Rh2, OSW-1($3\beta,16\beta,17\alpha$ -trihydroxycholest-5-en-22-one 16-O-(2-O-4-methoxybenzoyl- β -Dxylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-(2-O-acetyl- α -L-arabinopyranoside) dan Timosaponin AIII (TAIII) (Elekofehinti, Iwaloye, Olawale, & Ariyo, 2021). Aktivitas antikanker saponin di antaranya: menyebabkan *cell arrest*

sehingga pembelahan sel terhambat, menekan peradangan/inflamasi, memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker, menginduksi terjadinya apoptosis (Elekofehinti *et al.*, 2021).

Fenol/asam fenolat merupakan golongan senyawa besar memiliki beberapa anggota yang termasuk di dalamnya yang berpotensi sebagai antikanker, antara lain; asam galat, *p-coumaric acid*, *ferulic acid*, *vanillic acid*, flavonoid (Elansary *et al.*, 2019). Senyawa golongan terpenoid juga memiliki beberapa anggota yang memiliki potensi sebagai antikanker, antara lain: Limonene, Alisol B, Pachymic acid, Cantharidin, Tanshinone IIA, Lycopene, Andrographolide, Oridonin, Pseudolaric acid B, Celastro, Cucurbitacin, Artemisinin, dan Triptolide (Huang *et al.*, 2012). Aktivitas antikanker terpenoid, salah satunya dengan menginduksi terjadinya apoptosis (Huang *et al.*, 2012). Berdasarkan senyawa yang terdeteksi pada ekstrak daun Majapahit diketahui memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker. Setelah dilakukan uji fitokimia, ekstrak dilakukan uji toksisitas dengan metode BSLT dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* L. berusia 48 jam.

Pada uji BSLT ekstrak metanol daun Majapahit (*Crescentia cujete*) dilakukan uji pendahuluan (Tabel 1) untuk penentuan konsentrasi yang aman bagi larva udang (memiliki jumlah kematian rendah).

Tabel 1. Hasil uji pendahuluan ekstrak metanol daun Majapahit

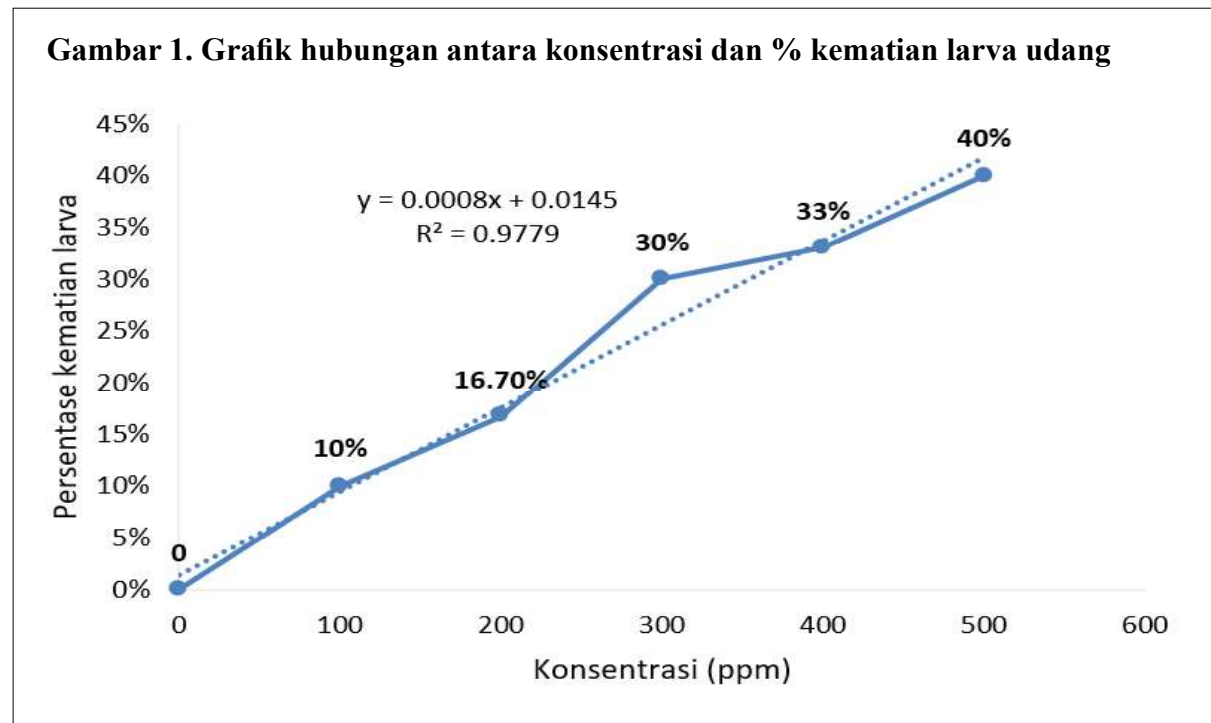
Jumlah replikasi	Jumlah kematian larva tiap konsentrasi				
	1000 ppm	900 ppm	800 ppm	700 ppm	600 ppm
I	10	10	10	5	5
II	10	10	10	5	5
III	10	10	10	3	5
Total kematian	30	30	30	17	15
Rata-rata	10	10	10	5,67	5
Persentase kematian (%)	100	100	100	56,7	50

Tabel 2 menunjukkan bahwa larva udang yang mati sebanyak 50% dari populasi awal terdapat pada konsentrasi 600 ppm. Oleh karena itu, pada uji BST ini digunakan konsentrasi di bawah konsentrasi 600 ppm. Pada penelitian, digunakan 5 konsentrasi (Tabel 3), yaitu: 500, 400, 300, 200, dan 100 ppm.

Tabel 2. Hasil uji BSLT ekstrak metanol daun Majapahit

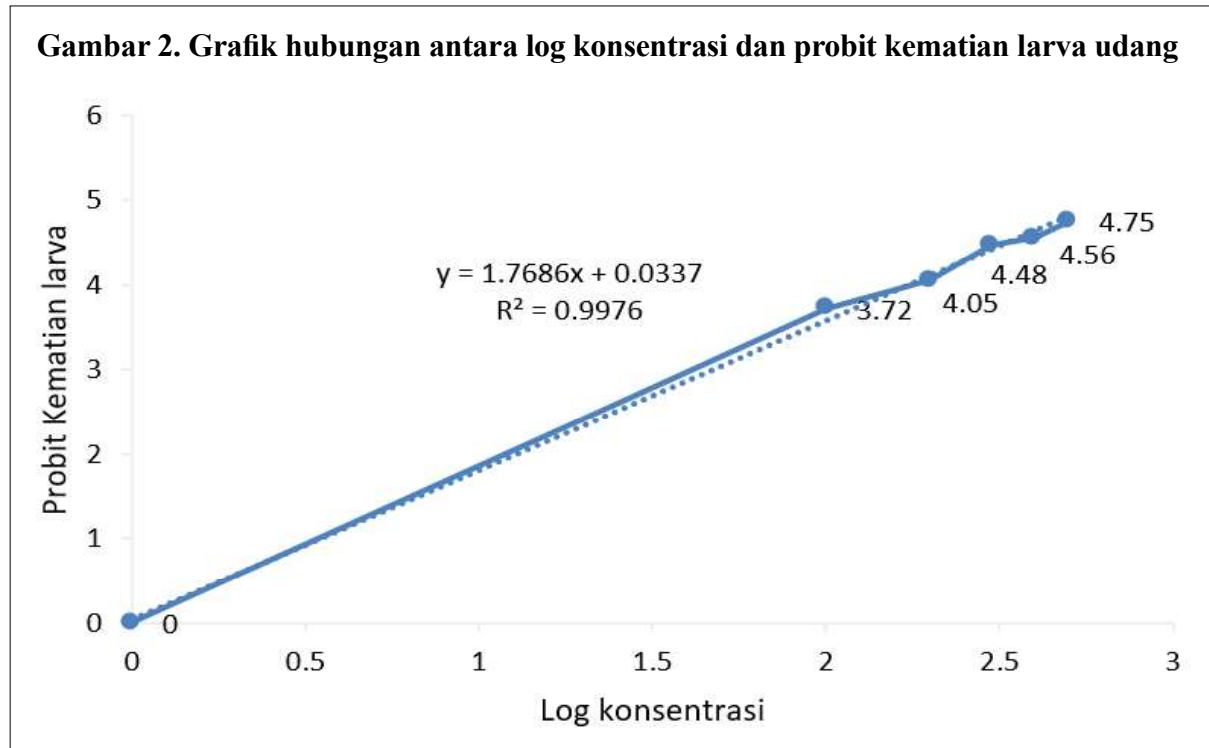
Jumlah replikasi	Jumlah kematian larva tiap konsentrasi				
	500 ppm	400 ppm	300 ppm	200 ppm	100 ppm
I	5	3	3	1	0
II	4	3	3	2	1
III	3	4	3	2	2
Total kematian	12	10	9	5	3
Rata-rata	4	3,3	3	1,67	1
Persentase kematian (%)	40	33,3	30	16,7	10

Berdasarkan data pada Tabel 2 dapat diketahui bahwa kematian larva semakin besar dengan tingginya konsentrasi pada ekstrak. Berdasarkan konsentrasi ekstrak dan persentase kematian larva udang dapat ditentukan grafik hubungan antara keduanya dan dapat digunakan untuk mencari regresi linier berdasarkan grafik yang didapatkan. Hasil dari grafik (Gambar 1), akan didapatkan persamaan $y=mx+b$ beserta nilai *R square* (R^2).



Berdasarkan grafik pada Gambar 1 dapat diketahui nilai R^2 adalah sebesar 0,9779. Nilai R^2 digunakan untuk mengetahui signifikansi variabel x dalam hal ini adalah konsentrasi ekstrak dalam mempengaruhi variabel y , dalam hal ini adalah persentase kematian larva udang. Nilai R^2 sebesar 0,9779 atau sama dengan 97,79%, sehingga dapat diartikan bahwa variabel y dipengaruhi oleh variabel x . Analisis nilai LC_{50} -24 jam dapat diketahui dengan analisis probit (metode Hubbert). Analisis probit dapat diketahui dari grafik hubungan (Gambar 2) antara nilai logaritmik nilai probit persentase kematian hewan dan uji konsentrasi dengan persamaan linier $y=mx+b$. Nilai LC_{50} didapatkan dari *antilog* m , m adalah logaritmik konsentrasi bahan uji, pada $y = 5$, yakni probit 50% hewan uji.

Berdasarkan grafik pada Gambar 2 dapat diketahui nilai R^2 adalah sebesar 0,9976 yang berarti bahwa pengaruh log konsentrasi dengan probit kematian larva adalah sebesar 99,76%. Pada grafik tersebut juga didapatkan persamaan $y=1,7686x+0,0337$. Persamaan tersebut dapat digunakan untuk menentukan nilai LC_{50} , dengan memasukkan $y=5$ ke dalam persamaan tersebut, sehingga $5=1,7686x+0,0337$. Dari hasil perhitungan tersebut didapatkan nilai x sebesar 2,808, sehingga nilai *antilog* x adalah 642,6877 ppm. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak untuk dapat membunuh 50% dari populasi sampel larva udang adalah sebesar 642,877 ppm. Pada hasil penghitungan LC_{50} yang didapatkan dari analisis probit memiliki perbedaan dengan hasil pengujian pada uji pendahuluan. Hal



ini dapat dipengaruhi karena jumlah sampel yang digunakan dan banyak replikasi pada pengujian.

Berdasarkan hasil dari nilai LC50 tersebut juga dapat diketahui bahwa, ekstrak metanol daun Majapahit bersifat toksik terhadap larva udang, karena memiliki nilai LC50 < 1000 ppm (Meyer *et al.*, 1982). Oleh karena itu, ekstrak metanol daun Majapahit untuk dapat dikembangkan lebih jauh potensinya sebagai antikanker.

SIMPULAN

Ekstrak metanol daun Majapahit diketahui berpotensi dikembangkan untuk sumber antikanker. Hal tersebut ditandai dengan hasil uji toksisitas ekstrak yang memiliki nilai LC50 < 1000 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Adusei, S. (2020). Bioactive compounds and antioxidant evaluation of methanolic extract of *Hibiscus sabdarifa*. *IPTEK The Journal of Technology and Science*, 31(2), 139-147.
- Anwar, S., Yulianti, E., Hakim, A., Fasya, A. G., Fauziyah, B., & Muti'ah, R. (2014). Uji toksisitas ekstrak akuades (Suhu kamar) dan akuades panas (70°C) daun kelor (*Moringa oleifera* Lank.) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach). *ALCHEMY*, 3(1), 84-92.
- Astarina, N. W. G., Astuti., K. W., & Warditiani., N. K. (2013). Skrining fitokimia ekstrak metanol rimpang bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4), 1-6.
- Cannel, R. (2000). *Methods in biotechnology. Natural products isolation*. Human Press.
- Ciulei, J. (1984). *Metodology for analysis of vegetables and drugs*. UNIDO.

- Ejelonu, B. C., Lasisi, A. A., Olaremu, A. G., & Ejelonu, O. C. (2011). The chemical constituents of calabash (*Crescentia cujete*). *African Journal of Biotechnology*, 10(84), 19631-19636.
- Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., Al-Mana, F. A., Mahmoud, E. A., El-Abedin, T. K. A., Mattar, M. A., Ekiert, H. (2019). Phenolic compounds of *Catalpa speciosa*, *Taxus cuspidata*, and *Magnolia acuminata* have antioxidant and anticancer activity. *Molecules*, 24, 412-426.
- Elekofehinti, O. O., Iwaloye, O., Olawale, F., & Ariyo, E. O. (2021). Saponins in cancer treatment: Current progress and future prospects. *Pathophysiology*, 28, 250-272.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tanaman*. ITB.
- Huang, M., Lu, J. J., Huang, M. Q., Bao, J. L., Chen, X. P., & Wang, Y. T. (2012). Terpenoids: Natural products for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(12), 1801-1818.
- Manongko, P. S., Sangi, M. S., & Momuat., L. I. (2020). Uji senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan tanaman patah tulang (*Euphorbia tirucalli L.*). *Jurnal Mipa*, 9(2), 64-69.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- Rorong, J. A., Sudiarmo, Prasetya, B., Mandang, J. A., & Suryanto, E. (2012). Phytochemical analysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) of agricultural waste as biosensitizer for ferri photoreduction. *Agrivita*, 34(2), 152-160.
- Salamah, N., & Ningsih, D. S. (2017). Total alkaloid content in various fractions of *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl. (Jembirit) leaves. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 259, 1-6.
- Silva, T. M. S., Nascimento, R. J. B., Batista, M. M., Agra, M. F., & Camara, C. A. (2007). Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 35-38.
- Smith, B. A., & Dollear, F. G. (1947). Oil from calabash seed, *Crescentia cujete L.* *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 24(2), 52-54.
- Sukardiman, A. R., & 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), 90-100.
- Sunarni, Iskanto dan Suhartinah. (2003). Uji toksisitas dan antiinfeksi ekstrak etanol buah *Brucea sumatrana* Roxb. terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. dan *Staphylococcus aureus*. *Biosmart*, 5(4): 65-67.
- Youness, R. A., Kamel, R., Elkasabgy, N. A., Shao, P., & Farag, M. A. (2021). Recent advances in tannic acid (Gallotannin) anticancer activities and drug delivery systems for efficacy improvement: A comprehensive review. *Molecules*, 26, 1486-1501.