

**Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Fraksi N-Heksan dan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.)**Nunung Pratiwi¹, Dahlan^{1*}, Wa Ode Mulyana¹¹Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Universitas Halu Oleo(*) Corresponding author: dahlan.fkip@uho.ac.id**Abstract**

This study aims to determine the group of secondary metabolite contained in n-hexane fraction and ethyl acetate fraction ethanol extracts chinese ketepeng leaves and determine the level of toxicity n-hexane fraction and ethyl acetate fraction extracts chinese ketepeng leaves on Artemia salina L. Extraction using maceration technique, the secondary metabolite compounds was determined by phytochemical method, and toxicity testing on Artemia salina L. larvae by BSLT method. Larval mortality data were analyzed by probit analysis to determine the LC₅₀ value in each n-hexane fraction and ethyl acetate fraction. The results of phytochemical screening showed the presence the n-hexane fraction contains flavonoids and steroid compounds, while the ethyl acetate fraction contains steroid and tannin compounds. The results of toxicity testing showed that each fraction showed toxic activity against Artemia salina Leach larvae. The ethyl acetate fraction showed the highest toxic activity (LC₅₀ of 316,22 ppm), and the n-hexane fraction (LC₅₀ of 457,08 ppm).

Keywords: chinese ketepeng, phytochemicals, toxicity, BSLT**1. PENDAHULUAN**

Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai sumber obat tradisional adalah ketepeng cina (*Cassia alata* L.). Sampai saat ini masyarakat menggunakan ketepeng cina sebagai obat infeksi kulit yang disebabkan oleh jamur seperti kurap, panu, kutu air, sariawan dan lain-lain. Secara ilmiah, hal ini disebabkan zat kimia yang terkandung dalam tanaman tersebut memiliki efek antimikroba (Egra dkk., 2019). Tumbuhan ketepeng cina tersebar luas di daerah tropis yang memiliki sekitar 1.260 spesies. Di Indonesia tumbuhan ketepeng cina memiliki sebutan yang berbeda-beda yaitu ketepeng kebo (Jawa), ketepeng badak (Sunda), acon-aconan (Madura), sajamera (Halmahera), kupang-kupang (Ternate), tabankun (Tidore), daun kupang, daun kurapan dan gelinggang (Sumatra). Tumbuhan ketepeng cina ini dikenal sebagai pohon lilin, tanaman kurap dan semak lilin. Daun ketepeng sudah sangat jarang digunakan untuk kehidupan sehari-hari sehingga tanaman ini sering sekali dibasmi oleh masyarakat (Asmah dkk., 2020).

Perkembangan obat herbal terus dilakukan melalui pemanfaatan metabolit sekunder yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat. Masyarakat yang suka menggunakan bahan-bahan alami juga mendukung hal tersebut, karena efek sampingnya lebih rendah dibandingkan obat sintetik (Dewi, 2018). Tumbuhan menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat racun yang dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit manusia.

Daun ketepeng cina dapat digunakan sebagai obat tradisional karena adanya kandungan kimia yang terdapat di dalamnya seperti alkaloid, saponin, flavonoid, karbohidrat, glikosida, tanin, triterpenoid dan turunan antrakuinon. Ekstrak dari daun ketepeng cina dilakukan dengan beberapa pelarut dan dengan berbagai teknik yang dilakukan sehingga menunjukkan adanya aktivitas antimikroba. Fitokimia dari daun ketepeng cina ini dikenal karna sifat sitotoksiknya terhadap berbagai sel yaitu diantaranya sel kanker (Asmah dkk., 2020).

Pada penelitian Bahi (2014) dihasilkan ekstrak n-heksan daun ketepeng cina positif mengandung golongan senyawa steroid. Sedangkan pada penelitian Lathifah (2021) dihasilkan ekstrak metanol daun ketepeng cina positif mengandung golongan flavonoid, tanin, saponin, fenolik dan alkaloid. Pada penelitian (Ratu dan Eko, 2018) ekstrak etil asetat daun ketepeng cina mengandung senyawa flavonoid. Pada penelitian (Mawaddah dkk., 2020) ekstrak metanol daun ketepeng cina mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain triterpenoid, steroid dan kuinon.

Pada penelitian Seotjipto dkk. (2007) pada uji toksisitas ekstrak kasar bunga dan daun ketepeng cina terhadap larva *Artemia salina* leach menggunakan pelarut metanol. Pengujian toksisitas yang dilakukan oleh Seotjipto dkk. (2007) yaitu pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dengan konsentrasi pada fraksi n-heksan (0, 75, 150, 225, 300, 450) dan pada fraksi etil asetat (0, 200, 300, 400, 600, 800) dan dihasilkan bahwa fraksi n-heksan memiliki daya toksis yang lebih tinggi terhadap larva *Artemia salina* leach dibandingkan dengan fraksi etil asetat.

Berdasarkan uraian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak dan senyawa dari ketepeng cina memiliki bioaktivitas yang beragam, akan tetapi belum ada informasi kandungan metabolit serta toksisitas dari ekstrak etanol daun tumbuhan ketepeng cina. Sehingga dilakukan analisis untuk mengetahui aktivitas toksik pada ekstrak daun ketepeng cina dengan menggunakan pelarut etanol dan dilakukan uji toksisitas pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat dengan konsentrasi yang berbeda melalui penelitian dengan judul “Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Fraksi n-Heksan dan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata*. L.)”

2. METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah saringan, gunting, corong pisah, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet volume, pipet tetes, filler, gelas ukur, gelas kimia, batang pengaduk, spatula, botol timbang, labu takar, rotaryevaporator, mikropipet, neraca analitik, corong kaca, tabung uji (vial), lampu pijar 60 watt, aerator dan kaca pembesar (lup).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun *Cassia alata* L., etanol 96%, n-heksan, asam asetat anhidrat, etil asetat, kloroform, serbuk Mg, HCl 0,1, FeCl₃ 10%, H₂SO₄ (p), H₂SO₄ 2N, pereaksi Mayer, Pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, larutan gelatin 1%, plat KLT dan air laut.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Penyiapan Sampel

Daun ketepeng cina yang telah dikumpulkan dan dibersihkan dengan cara dibilas dengan air, kemudian dikering pada suhu kamar. Sampel kering kemudian dihaluskan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk daun ketepeng cina.

2.2.2 Pembuatan Ekstrak

Serbuk daun ketepeng cina ditimbang sebanyak 500 gram. Serbuk dimaserasi dengan pelarut etanol 96%, ekstraksi maserasi serbuk tanaman dilakukan dalam wadah tertutup selama 3 x 24 jam dengan sesekali pengadukan dengan pergantian pelarut setiap 1x24 jam. Filtrat hasil maserasi dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak etanol daun ketepeng cina.

2.2.3 Partisi Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan metode partisi menggunakan beberapa pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, dimulai dari pelarut nonpolar sampai ke pelarut polar (n-heksan, etil asetat dan etanol).

Sebanyak 8 gram ekstrak etanol encer daun ketepeng cina dimasukkan dalam corong pisah, lalu dipartisi dengan pelarut n-heksan sebanyak 5 mL. Ekstrak dikocok sampai homogen, lalu didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Setelah itu lapisan n-heksan dan lapisan etanol dipisahkan dalam dua wadah yang berbeda. Lapisan n-heksan ditampung dan lapisan etanol dimasukkan lagi ke dalam corong pisah dan ditambahkan lagi dengan pelarut n-heksan yang baru dengan volume yang sama. Proses partisi dilakukan beberapa kali pengulangan hingga tidak ada lagi komponen yang terekstrak ke dalam lapisan n-heksan. Lapisan n-heksan yang telah ditampung diuapkan dengan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak n-heksan kental.

Lapisan etanol yang telah dipisahkan dipartisi dengan pelarut etil asetat sebanyak 5 mL, lalu dikocok dan didiamkan beberapa saat. Setelah dikocok dan didiamkan beberapa kali, ekstrak terbentuk dua lapisan. Setelah itu, lapisan etil asetat dan lapisan etanol dipisahkan dalam dua wadah yang berbeda. Lapisan etil asetat ditampung dan lapisan etanol dimasukkan lagi ke dalam corong pisah dan ditambahkan lagi dengan pelarut etil asetat yang baru dengan volume yang sama. Prosedur yang dilakukan sama dengan pada lapisan n-heksan, sehingga diperoleh ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol. Ekstrak n-heksan dan ekstrak etil asetat yang diperoleh dari daun ketepeng cina kemudian diuji fitokimia dan toksisitas.

2.2.4 Pembuatan Pereaksi Uji Metabolit Sekunder

Pereaksi Mayer

Pereaksi Mayer dapat dibuat dengan cara menambahkan 5 gram kalium iodida dalam 10 ml aquadest, kemudian ditambahkan larutan 1,36 gram merkuri (II) klorida dalam 60 ml air suling. Larutan kemudian dikocok dan ditambahkan aquadest sampai 100ml (Illing dkk., 2017).

Pereaksi Dragendorf

Pereaksi Dragendorf dibuat dengan cara sebanyak 8 gram bismut nitrat dilarutkan dalam 20 ml HNO₃, kemudian dicampur dengan larutan kalium iodida sebanyak 27,2 gr dalam 50 ml air suling. Campuran dibiarkan sampai memisah secara sempurna. Ambil larutan jernih dan diencerkan dengan air secukupnya hingga 100 ml.

Pereaksi Wagner

Pereaksi Wagner dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 1,27 g iodine dan 2 g KI dalam 100 mL aquades (Illing dkk., 2017).

Pereaksi Lieberman-Burchard

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml kemudian disaring.

2.2.5 Uji Fitokimia

Uji Flavonoid

Sebanyak 0,1 gram sampel ditambahkan 10 mL etanol. Lalu itambahkan pada sampel berupa serbuk Magnesium sebanyak 0,1 g dan diberikan 3 tetes HCl pekat. Sampel dikocok dan diamati perubahan yang terjadi, terbentuknya warna merah, jingga atau kuning pada larutan menunjukkan adanya flavonoid (Lumawo dan Syahril, 2018).

Uji Alkaloid

Sebanyak 0,25 gram fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi etanol daun ketepeng cina, masing-masing ditambahkan 5 mL kloroform ammoniakal (4,5 : 0,5) kemudian ditambahkan 5 mL larutan asam sulfat 2 N. Larutan tersebut dimasukan dalam corong pisah dan dikocok kuat-kuat, kemudian didiamkan sampai terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan kloroform dan asam sulfat. Lapisan asam sulfat diambil dan dibagi dalam tiga tabung reaksi. Masing-masing tabung diuji dengan pereaksi Mayer, Dragendorf, dan Wagner:

- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih/kuning.
- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorf menghasilkan endapan merah bata.
- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner menghasilkan endapan coklat-hitam (Jaafar, dkk., 2007). Apabila terdapat endapan paling sedikit dengan 2 atau 3 dari pengujian di atas, maka sampel dinyatakan positif mengandung alkaloid.

Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel dicampur dengan 10 ml aquades dan dikocok sampai homogen, kemudian didiamkan selama 2-3 menit lalu didinginkan (Triwahyono dan Nurul, 2020). Kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl pekat. Uji positif adanya senyawa saponin jika terbentuk busa yang stabil ± 7 menit (Jaafar dkk., 2007).

Uji Tanin

Sebanyak 1 gram besi (III) klorida dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml kemudian disaring. Uji tannin dilakukan dengan cara 0,5 gram sampel ditambahkan 2 mL etanol. Ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1% menggunakan pipet tetes pada tabung reaksi. Hasil yang diperoleh adalah terbentuknya warna hijau kehitaman yang menandakan bahwa sampel mengandung senyawa tanin (Badaring dkk., 2020).

Uji Steroid

Sebanyak 0,5 gram sampel ditambahkan dengan 10 mL etanol, kemudian di tambahkan 10 tetes pereaksi Liebermann- Uji positif steroid menghasilkan warna hijau atau biru dan terpenoid menghasilkan warna merah atau violet (Jaafar dkk., 2007).

2.2.6 Uji Toksisitas

Penyiapan Larva Uji (*A. Salina Leach*)

Sebelum dilakukan pengujian, telur udang ditetaskan selama 2 hari dengan bejana untuk penetasan telur udang yang sudah disiapkan. Sebanyak 2,5 mg telur direndam dalam wadah yang berisi air laut sebanyak 250 mL dibawah cahaya lampu 25 watt dandilengkapi dengan aerator untuk siap dilakukan penetasan. Setelah 24 jam telur tersebut menetas dan menjadi larva. Setelah berumur ± 48 jam, larva *Artemia salina* Leach adalah kondisi yang baik digunakan untuk uji BSLT dan telah siap digunakan

sebagai hewan pengujian toksisitas. Jika melebihi 48 jam dikhawatirkan akan terjadi kematian *Artemia salina* Leach yang bukan disebabkan toksisitas ekstrak tetapi oleh persediaan makanan yang habis. Larva udang dipipet ke dalam vial yang berisi air laut. dilengkapi dengan aerator untuk siap dilakukan penetasan.

Pelaksanaan Uji Toksisitas

Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100, 250, 300, 450, 500 ppm untuk fraksi heksana dan untuk fraksi etil asetat adalah 75, 150, 225, 300, 450 ppm. Perlakuan kontrol (n-heksan, etil asetat) dilakukan dengan cara memipet sebanyak 500 μ L larutan konsentrasi ditambahkan dengan 5 mL air laut. Ke dalam masing-masing larutan uji dengan konsentrasi yang telah ditentukan dimasukkan 10 ekor larva *A. salina* Leach. Wadah-wadah disimpan di tempat yang diberi penerangan cahaya lampu 60 watt. Pengamatandilakukan setelah 24 jam waktu kontak dan dihitung jumlah larva *A. salina* Leach yang mati.

Penentuan presentase kematian larva dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{kematian} = \frac{\Sigma \text{larva Uji Artemia salina Leach yang mati} - \Sigma \text{larva kontrol yang mati}}{\text{Jumlah Larva Uji}} \times 100\%$$

Perhitungan Nilai LC₅₀

Data larva *A. salina* Leach yang mati setelah 24 jam untuk tiap konsentrasi larutan uji dan kontrol dihitung dan ditabulasi, selanjutnya data dianalisis probit untuk menentukan nilai LC₅₀ dihitung dengan regresi linear $y = ax + b$.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

Hasil ekstrak etanol dan hasil fraksinasi ekstrak etanol daun ketepeng cina dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Massa dan Rendemen Fraksi n-Heksan dan Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

Sampel	Ekstrak Etanol Kasar	Fraksi n-Heksan	Fraksi Etil Asetat
Massa ekstrak (gram)	19	6,15	3,05
Rendemen (%)	3,8	32,37	16,06

Berdasarkan pada Tabel 1 diperoleh ekstrak etanol sebanyak 19 gram dengan rendemen sebanyak 3,8%. Pada fraksi n-heksan diperoleh 6,15 gram ekstrak dengan rendemen sebanyak 32,37% dan pada fraksi etil asetat diperoleh 3,05 gram ekstrak dengan rendemen sebanyak 16,06%. Ekstrak etanol daun ketepeng cina diperoleh sebanyak 19 gram dengan metode maserasi. Pada penelitian ini digunakan pelarut etanol, dikarenakan etanol bersifat universal yang dapat menarik senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut polar hingga non polar (Synder dkk., 1997 dalam Padmasari, 2013). Hasil rendemen yang diperoleh, yaitu sebesar 3,8%. Penetapan rendemen bertujuan untuk mengetahui jumlah kira-kira simplisia yang dibutuhkan untuk pembuatan sejumlah tertentu ekstrak kental (Kartikasari dkk., 2014).

Fraksinasi ekstrak daun ketepeng cina dilakukan dengan menggunakan pelarut non polar, yaitu n-heksan dan diperoleh ekstrak kering sebanyak 6,15 gram. Fraksinasi berikutnya dengan pelarut semi polar, yaitu etil asetat yang diperoleh ekstrak sebanyak 3,05 gram. Fraksinasi bertingkat (polar, semi polar dan non polar) akan mempengaruhi profil kandungan kimia pada masing-masing fraksi (Hikmah, 2012). Berdasarkan perbedaan profil kandungan kimia tersebut, dimungkinkan adanya pengaruh terhadap aktivitas toksik atau tidaknya daun ketepeng cina.

3.2 Uji Fitokimia Fraksi n-Heksan dan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

Hasil analisis kandungan senyawa metabolit sekunder fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun ketepeng cina dapat dilihat pada Tabel 2. Fitokimia merupakan tahap pendahuluan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu sampel uji. Golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi dapat diketahui secara kualitatif dengan melihat perubahan warna, pengendapan atau terbentuknya busa pada sampel uji ketika ditambahkan dengan pereaksi yang sesuai.

Hasil uji fitokimia pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat pada ekstrak daun ketepeng cina menunjukkan bahwa fraksi n-heksan ekstrak daun ketepeng cina mengandung senyawa golongan flavonoid dan steroid. Pada fraksi etil asetat ekstrak daun ketepeng cina mengandung golongan senyawa steroid dan tanin.

Tabel 2. Kandungan Metabolit Sekunder Fraksi n-Heksan dan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

Metabolit Sekunder	Fraksi n-Heksan	Fraksi Etil Asetat
Alkaloid	Dragendorf	+
	Wagner	-
	Mayer	-
Flavonoid	+	-
Steroid	+	+
Saponin	-	-
Tanin	-	+

Pengujian alkaloid dilakukan tiga kali pengujian menggunakan pereaksi Meyer, Wagner dan Dragendorff. Pada fraksi etil asetat tidak mengandung senyawa alkaloid yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan pada pereaksi Meyer, Wagner dan Dragendorf. Sedangkan pada fraksi n-heksan hanya positif pada pereaksi Dragendorff akan tetapi hal tersebut tidak dapat dinyatakan bahwa fraksi n-heksan positif mengandung senyawa alkaloid. Hasil positif untuk pengujian alkaloid minimal ditunjukkan oleh reaksi pembentukan endapan pada dua reagen dari tiga reagen yang dipergunakan dalam pengujian (Prayoga dkk., 2019). Sehingga pada pengujian alkaloid pada kedua fraksi dinyatakan negatif alkaloid. Pada alkaloid terdapat gugus penanda yang berupa nitrogen, nitrogen pada senyawa alkaloid memiliki sifat yang palsu yang dimiliki oleh protein sehingga pada pengujian alkaloid dilakukan sebanyak tiga kali. Menurut Endarini (2016) garam alkaloid berbeda sifatnya dengan alkaloid bebas dalam bentuk basa. Alkaloid dalam bentuk basa biasanya tidak larut dalam air tetapi mudah larut dalam pelarut organik (seperti benzena, eter, kloroform) sementara dalam bentuk garamnya, alkaloid mudah larut dalam pelarut polar. Menurut Simerame (2014), alkaloid mengandung nitrogen sebagai bagian dari sistem sikliknya serta mengandung substituen yang bervariasi seperti gugus amina, amida, fenol dan metoksi sehingga bersifat semi polar.

Fraksi etil asetat daun ketepeng cina tidak mengandung senyawa flavonoid yang ditandai dengan tidak terjadi perubahan warna larutan ekstrak menjadi merah. Sedangkan pada fraksi n-heksan positif mengandung senyawa flavonoid yang ditandai dengan terjadinya perubahan larutan menjadi warna merah. Hal ini diperkuat pada laporan (Mojab dkk., 2010) yang menyatakan bahwa positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah. Adaya flavonoid pada fraksi n-heksan didukung pada penelitian Syahputra dkk (2022) dan lathifa (2021). Warna merah ini terbentuk karena flavonoid bereaksi dengan magnesium dan asam klorida pekat (Sangi dkk., 2019). Pengujian flavonoid menggunakan serbuk logam Mg dan HCl berfungsi mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid dan membentuk garam flavilium yang berwarna merah atau jingga (Achmad, 1986 dalam Khotimah, 2016).

Pengujian steroid menunjukkan hasil positif ditunjukkan pada golongan steroid dengan terbentuknya warna hijau setelah penambahan asam asetat anhidrida dan asam sulfat pekat pada perlakuan fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat. Hal ini dikarenakan kedua pelarut tersebut memiliki kepolaran dan sifat yang sesuai dengan golongan senyawa steroid dikarenakan steroid adalah senyawa turunan lipid yang tidak terhidrolisis (Iling dkk., 2017). Penambahan asam asetat anhidrida dalam uji Liebermann-Burchard berfungsi untuk menyerap air dan membantu pengoksidasian asam oleh asam sulfat, karena reaksi pengoksidasian asam tersebut tidak akan berlangsung jika masih terkandung air didalam senyawa yang direaksikan (Prayoga dkk., 2019).

Uji tanin menunjukkan positif pada fraksi etil asetat yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman. Umumnya senyawa tanin akan larut dalam pelarut polar. Tanin memiliki sifat kelarutan yang mudah larut dalam air, larutan alkohol, larutan aseton, larutan 1:1 dalam gliserol hangat, praktis tidak larut dalam petroleum, kloroform dan eter (Reynold, 1996). Simaremare (2014) mengemukakan bahwa gugus hidroksil pada senyawa tanin akan bereaksi dengan reagen FeCl₃ 1% sehingga dapat terjadinya perubahan warna ekstrak menjadi hijau kehitaman. makromolekul dari senyawa polifenol yang bersifat polar. Umumnya senyawa tanin akan larut dalam pelarut polar.

Adanya tanin pada fraksi etil asetat diduga karena dua kemungkinan. Kemungkinan yang pertama adalah proses pemisahan yang kurang tepat (saat partisi), dimana saat mengeluarkan lapisan etanol dari corong pisah, lapisan etanol masih menempel pada dinding mulut corong pisah bagian bawah sehingga saat mengeluarkan lapisan etil asetat, lapisan etanol yang masih menempel terikut bersama lapisan n-heksan. Kemungkinan yang kedua adalah salah satu dari gugus samping dan tanin adalah alkil, sehingga kepolaran dan tanin tergeser menjadi nonpolar. Menurut Hasan dkk. (2017) pelarut etil asetat mampu menarik senyawa tanin dalam daun ketepeng cina, diduga gugus hidroksil pada senyawa tanin mampu berikatan dengan gugus metoksil atau gugus hidroksil pada pelarut etil asetat.

Uji saponin dinyatakan negatif pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat. Saponin bersifat polar karena mempunyai ikatan glikosida, sehingga saponin akan tertarik ke pelarut polar yaitu etanol, bukan ke pelarut non polar (n-heksan) dan semi polar (etil asetat). Inilah yang menyebabkan fraksi n-heksan dan etil asetat tidak mengandung saponin.

Saponin sebagai glikosida terhidrolisis oleh H₂O dengan katalis asam (H⁺). Ester mempunyai gugus karbonil yang mempunyai satu pasang elektron bebas pada oksigen yang digunakan untuk membentuk ikatan sigma dengan hidrogen (H⁺). Ketika membentuk ikatan sigma antara oksigen dan hidrogen (OH), maka oksigen akan bermuatan positif sehingga menarik elektron dari ikatan π yang masih berikatan dengan karbon sehingga membentuk ikatan sigma. Hal ini menyebabkan karbon bermuatan positif sehingga masuklah air sebagai nukleofilik. Oksigen dari air yang menyumbangkan elektronnya kepada karbon positif menyebabkan oksigen pada air bermuatan positif. Kemudian, terjadi geseran 1,2 untuk melepaskan glukosa sehingga karbon kekurangan elektron. Kemudian, terbentuk C karbonil yang menarik elektron dari oksigen dan melepaskan H⁺ sehingga terbentuk ikatan π antara karbon dan oksigen. Sehingga diperoleh hasil akhir aglikon dengan gugus fungsi asam karbosilat dan glukosa dengan gugus fungsi alkohol.

3.3 Uji Toksisitas Fraksi n-Heksan dan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Daun Ketepeng Cina

Uji toksistas fraksi n-heksan dan etil asetat daun ketepeng cina dilakukan dengan menggunakan metode BSLT. Presentase kematian larva *A. salina* Leach setelah pemberian ekstrak n-heksan dan etil asetat daun ketepeng cina dapat dilihat pada Tabel 3

Tabel 3. Persentase Kematian Larva dengan Berbagai Konsentrasi

	Konsentrasi(ppm)	%Kematian Larva
Fraksi n-Heksan	500	50,00%
	450	50,00%
	350	43,33%
	250	40,00%
	100	30,00%
Fraksi Etil Asetat	450	50,00%
	300	46,66%
	225	43,33%
	150	36,66%
	75	16,66%

Tabel 3 di atas menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin tinggi juga tingkat kematian larva, sehingga tingkat kematian larva dipengaruhi oleh peningkatan konsentrasi ekstrak. Hal ini diperkuat oleh Meyer dkk. (1982) dan Putri dkk. (2012) yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka sifat toksiknya akan semakin tinggi. Presentase kematian larva *A. salina* Leach untuk kelompok kontrol yaitu 0%, sehingga dapat disimpulkan bahwa kematian larva *A. salina* Leach tidak dipengaruhi oleh pelarut n-heksan dan etil asetat melainkan dari ekstrak daun ketepeng cina. Surbakti dkk., (2018) juga menyatakan bahwa suatu ekstrak dikatakan toksik jika Suatu ekstrak tanaman dikatakan toksik jika nilai LC₅₀ <1000 ppm dan tidak bersifat toksik jika memiliki nilai LC₅₀ >1000 ppm. Maukar dkk. (2013) melaporkan bahwa semakin kecil nilai LC50, maka ekstrak tersebut semakin bersifat toksik. Dapat diketahui bahwa masing-masing konsentrasi ekstrak digunakan untuk memperlihatkan pengaruh yang berbeda. Perbedaan konsentrasi bahan uji menyebabkan tingkat toksisitas yang berbeda terhadap larva, yang ditunjukkan dengan kematian (mortalitas) (Jelita dkk., 2020). Nilai LC₅₀ fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun ketepeng cina dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai LC₅₀ Fraksi n-Heksan dan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

Tumbuhan	Fraksi	LC ₅₀
<i>Cassia alata</i> L.	n-Heksan	457,08 ppm
	Etil Asetat	316,22 ppm

Tabel 4 menunjukkan bahwa fraksi n-heksan dan etil asetat daun ketepeng cina bersifat toksik terhadap larva *A. salina* Leach dan berpotensi sebagai anti kanker dengan nilai LC₅₀ fraksi n-heksan 457,08 ppm dan fraksi etil asetat 316,22 ppm. Hal ini diperkuat oleh Meyer dkk. (1982), yang menyatakan bahwa ekstrak yang bersifat toksik saat diuji dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dapat menyebabkan kematian 50% larva *A. salina* Leach dalam waktu 48 jam pada konsentrasi LC₅₀<1000 ppm menandakan bahwa sampel memiliki potensi sebagai antikanker, antibakteri, antijamur dan sebagainya. Hal ini juga diperkuat oleh Rossiana (2012). Yang menyatakan bahwa terdapat tiga macam kategori nilai LC₅₀ (µg/ml) berdasarkan tingkat toksisitasnya, yaitu: sangat toksik <30; toksik 30-1.000; tidak toksik >1.000. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi n-heksan dan etil asetat daun ketepeng cina bersifat toksik terhadap larva *A. salina* Leach disebabkan adanya kandungan senyawa alkaloid, steroid, flavonoid dan tanin.

Berdasarkan Tabel 4 menunjukkan bahwa seluruh fraksi memiliki aktivitas toksik terhadap larva *A. salina* Leach. Hal ini diperkuat pada penelitian Soetjipto dkk. (2007), Mawaddah dkk. (2020), dan Ratu dan Eko (2018). Dapat dilihat dari Tabel 4 nampak bahwa fraksi n-heksan memiliki nilai LC₅₀ yaitu 457,08 ppm. Aktivitas toksik fraksi n-heksan yang lebih dipengaruhi oleh senyawa metabolit sekunder yang telah diuji pada penelitian ini yaitu flavonoid dan steroid yang berpotensi sebagai penyebab kematian larva *A. salina* Leach. Senyawa-senyawa tersebut dapat bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut yang akan mengganggu alat pencernaan larva apabila senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva. Selain itu, senyawa ini juga 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 (Lenny, 2006; Nguyen dan Widodo, 1999).

Fraksi etil asetat memiliki nilai LC₅₀ yaitu 316,22 ppm, aktivitas toksik fraksi etil asetat yang lebih dipengaruhi oleh senyawa metabolit sekunder yang telah diuji pada penelitian ini yaitu golongan tanin dan juga steroid sangat menentukan aktivitas toksik ekstrak etanol daun ketepeng cina. Komponen tanin yang terkandung pada ekstrak etanol daun ketepeng cina dapat menghambat kerja enzim protease yang berperan dalam mengkatalisis protein menjadi asam amino yang diperlukan untuk pertumbuhan larva. Hal ini diperkuat oleh Cahya dkk. (2022), bahwa tanin merupakan senyawa yang bersifat toksik dengan cara mengikat enzim. Kaihen dkk. (2011), juga melaporkan bahwa tanin yang mengikat enzim akan menyebabkan kerja dari enzim menjadi terhambat sehingga proses metabolisme sel terganggu dan berdampak pada kematian larva. Hopkins dan Honer (2004), juga menyatakan bahwa tanin dapat menekan konsumsi makan, tingkat pertumbuhan dan kemampuan bertahan serta mempercepat kematian larva.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksan ekstrak etanol daun ketepeng cina mengandung senyawa metabolit sekunder golongan steroid dan flavonoid, sedangkan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun ketepeng cina mengandung golongan tanin dan steroid. Semua fraksi dari ekstrak etanol daun ketepeng cina menunjukkan aktivitas toksik, dimana fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas toksik paling tinggi dengan LC₅₀ sebesar 316,22 ppm, dibandingkan dengan fraksi n-heksan dengan LC₅₀ sebesar 457,08 ppm.

REFERENSI

- Asmah, N., Halimatussakdiah, Ulil, A. 2020. Analisa Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) dari Bireum Bayeun, Aceh Timur. *Jurnal Kimia Sains dan Terapan*. 2(2). 7-10.
- Badaring, D. R., Sari, P. M. Sa., Satrina, N., Wirda, W., Sintiya, A. R. L. 2020. Uji Ekstrak Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Indonesian Journal of Fundamental Sciences*. 6(1). 16-26.

- Bahi, M., Radilla, M., Endang, L. 2014. Bioassay on *n*-Hexane Extract of Leaves *Cassia alata* against *Candida albicans*, *Jurnal Natural*. 14(1). 5- 10.
- Cahya, N.R.D., Widy, S.A., dan Hamsidar, H. 2022. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Kulit Terong Ungu (*Solanum melongena* L.) menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research (JSSCR)*. 4(1). 202-210.
- Egra, S., Mardiana¹, Ana, K., Kartina, Aditya, M., Harlinda, K. 2019. Uji Potensi Ekstrak Daun Tanaman Ketepeng (*Cassia Alata* L) Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Ralstonia Solanacearum* Dan *Streptococcus Sobrinus*. *Jurnal Hutan Tropis*. 3(1). 25-31.
- Hasan, M. M., Hossain, A., Shamim, A., dan Rahman, M. M. 2017. Phytochemical and pharmacological evaluation of ethanolic extract of *Lepisanthes rubiginosa* L. leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–11.
- Illing, I., W. Safitri, dan Erfiana. 2017. Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengen. *Jurnal Dinamika*. 08. No.1 : 66-84.
- Jaafar, F.M., Osman, C. P., Ismail, N. H., Awang, K. 2007. Analysis Of Essential Oils Of Leaves, Stems, Flowers And Rhizomes Of *Etlingera Elatior* (Jack) R. M. S. Smith. *The Malaysian Jurnal Of Analytical Sciences*. 11 (1), 269-273.
- Jelita. S. F., Gita. W. S., Michele. F., Ade. Z., Sandra. M. 2020. Uji Toksisitas Infusa *Acalypha Siamensis* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*. *Farmaka*. 18(1). 14-22.
- Kaihen, M., Vika, L., dan Maria N. 2011. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Sirih terhadap Mortalitas Larva *Anopheles sp.* dan *Culex*. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan MOLUCCA MEDICA*. 4(1). 88-105.
- Lathifah. Q. A., Dora Dayu. R. T., Eka. P. 2021. Daya Antibakteri Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Klebsiella pneumoni*. *Jurnal Analisis Kesehatan*. 10(1): 29-34.
- Lestari, P.P., Kusri, D. dan Anam, K. 2014. Anthocyanin Identification of Methanol HCl Extract Active Fraction in Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) and Its Potential as Xanthine Oxidase Inhibitor. *Jurnal Sains dan Matematika*, 22(3):72-78.
- Lumowa, S. V. T., Syahril, B. 2018. Uji FitoKimia Kulit Pisang Kepok (*Musa Paradisiacal.*) Bahan Alam Sebagai Pestisida Nabati Berpotensi Menekan Serangan Serangga Hama Tanaman Umur Pendek. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 1(9). 465-469.
- Mahmudah, R., Nasyruddin. A., Ayu. P., Muhammad, A. H., Rahmat, I. 2018. Uji Efektifitas Ekstrak Etanol Pada Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) Terhadap Mikroba Penyebab Sariawan (Stomatitis Aphthosa). *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*. 4(1). 39-52.
- Maukar, M.A., Max. R.J.R., dan Julius P. 2013. Analisis Kandungan Fitokimia dari Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Daun Soyogik (*Sauraula bracteosa* DC) dengan Menggunakan Metode Maserasi. *Jurnal Ilmiah Sains*. 13(2). 98-101.
- Mojab, F., Kamalinejad, M., Ghaderi, N., dan Vahidipour, H. R. 2010. Phytochemical Screening of Some Species of Iranian Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2), 77–82.
- Mutmainnah, N., Heru, F.T., dan Pandu, L. B. 2015. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol 70% Daun Karamuting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk.) terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus. *Jurnal Cerebellum*. 1(4).
- Najoan, J. J., Max, J. R., Runtuwene, Defny, S. W. 2016. Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Tiga (*Allophylus Cobbe* L.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 5(1). 266-274.
- Ningdyah. A. W., Andi. H. A., Afghani. J. 2015. Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *JKK*. 4(1). 75-83.
- Nugraheni, T. P., Yayuk, M., Trisdian, H. J. 2019. Evaluasi Mutu Fisik Tablet Hisap Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia Alata* L.) Dengan Bahan Pengikat CMC–NA. *Indonesia Jurnal Farmasi*. 4(1). 10-15.
- Nuralifah, Parawansah, dan Hasniana, N. 2021. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air dan Ekstrak etanol Daun Kecapiring (*Gardenia jasminoides Ellis*) terhadap Larva *Artenia salina* Leach dengan Metode *Brine Shrimp lethality Test* (BSLT). *Indonesia Journal of Pharmaceutical Education*. 1(2). 7-12.
- Prayoga. D. G. E., Komang. A. N., Ni Nyoman. P. 2019. Identifikasi Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Daun Pepe (*Gymnema reticulatum* br.) Pada Berbagai Jenis Pelarut. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 8(2): 111-121.
- Ratu. A. P., Eko. M. 2018. Uji Toksisitas Daun Ketepeng (*Cassia Alata* L.), Kulit Buah Pisang Ambon (*Musa Paradisiaca* L. Var *Sapientum*) Dan Kulit Rimpang Kencur (*Kaempferia Galanga* Linn.) Dengan

- Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). University Research Colloquium. STIKES PKU Muhammadiyah Surakarta:189-194.
- Safitri, E. R., Rohama, Putri, V. D. 2020. Skrining Fitokimia serta Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Ketepeng Cina (*Senna alata* (L) Roxb) dengan Metode DPPH. *Journal Of Pharmaceutical Care and Science*. 1(1). 10-18.
- Simaremare, E. . 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *Pharmacy*, 11(01), 98–107.
- Soetjipto. H., A.Ign. Kristijanto, Rica. S. A. 2007. Toksisitas Ekstrak Kasar Bunga dan Daun Ketepeng Cina (*Senna alata* L. Roxb.) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Biota*. 12 (2): 78-82.
- Surbakti, P.A.A., Edwin, D.Q., dan Widdhi, B. 2018. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Androdera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 7(3). ISSN: 2302-2493.
- Syahputra, F. E., Anita, D. S., Desy, A. I. P. 2022. Penentuan Kadar fFavonoid Ekstrak Etanol Fraksi N-Heksan, Fraksi Etil Asetat Dan Fraksi Air Daun Ketepeng Cina (*Cassia Alata*Ll.) Ditinjau Dari Lama Waktu Ekstraksi. *Jurnal Farmasindo Politeknik Indonusa Surakarta*. 6(1). 1-10.
- Triwahyuono, D. A., Nurul, H. 2020. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Mahoni (*Swietenia Mahagoni Jacq.*). *UNESA Journal of Chemistry*. 9(1). 54-57.