

Received : June 20<sup>th</sup>, 2022

Accepted : July 23<sup>th</sup>, 2022

Web Published ; July 30<sup>th</sup>, 2022

## Cytotoxicity Test of Cocoa Leaf Ethanol Extract (*Theobroma Cacao L.*) With Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method

Zulmai Rani<sup>a\*</sup>, Ridwanto<sup>a</sup>, Dikki Miswanda<sup>a</sup>, Rafita Yuniarti<sup>a</sup>, Ani Sutiani<sup>b</sup>, Ricky Andi Syahputra<sup>b</sup>, Reza Irma<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy, Universitas Muslim Nusantara Al Washliyah., Jalan Garu II Medan Amplas 20147, North Sumatera, Indonesia

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Universitas Negeri Medan, Jalan Willem Iskandar, Pasar V, Medan Estate, Medan 20221, North Sumatera, Indonesia

\*Email : [zulmairani@umnaw.ac.id](mailto:zulmairani@umnaw.ac.id)

### ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell division and the ability of these cells to invade other biological tissues, either by direct growth in adjacent tissues or by migration of cells to distant sites. The purpose of this study was to determine the class of secondary metabolites contained in the ethanol extract of cocoa leaves and their cytotoxicity by looking at the LC<sub>50</sub> value using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. This research includes phytochemical screening of ethanol extract and the BSLT method by looking at the number of deaths of *Artemia salina* leach larvae (LC<sub>50</sub>). The results of phytochemical screening tests showed that the cocoa leaves contained flavonoids, alkaloids, tannins, saponins, steroids, and glycosides. The cytotoxicity test with probit analysis showed an LC<sub>50</sub> value of 269,15 µg/mL, so it was concluded that the ethanol extract of cocoa leaves was toxic and had potential as an anticancer.

**Keywords:** *cocoa leaf, cytotoxicity, BSLT, LC50*

### I. Pendahuluan

Kanker adalah segolongan penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh<sup>1</sup>. Dalam perkembangan dibidang kesehatan telah ditemukan obat-obat antikanker dan dilakukan kemoterapi, namun obat antikanker yang telah ada umumnya selain memiliki khasiat antikanker, obat tersebut juga bersifat merusak sel-sel yang normal serta faktor biaya yang mahal juga menjadi kendala. Hal ini mendorong masyarakat

untuk melakukan pengobatan menggunakan bahan alam atau obat tradisional<sup>2</sup>.

Salah satu tanaman yang berpotensi adalah tanaman kakao<sup>1</sup>. Tanaman kakao di Indonesia (*Theobroma cacao L.*) merupakan tanaman perkebunan yang terus dibudidayakan hingga saat ini, karena tanaman kakao mempunyai nilai ekonomi yang tinggi yang dapat dijadikan sebagai sumber pendapatan perkebunan ataupun kelompok masyarakat<sup>3</sup>. Daun kakao berpotensi dikembangkan untuk pengobatan sebagai anti kanker karena kandungan senyawa fitokimianya. Ekstrak daun kakao mengandung golongan senyawa kimia alkaloid, flavonoid, fenolik dan saponin. ekstrak

daun coklat juga memiliki potensi sebagai antioksidan yang tinggi, dengan intensitas potensinya sebagai antioksidan ( $IC_{50}$ ) sebesar 42,11  $\mu\text{g/ml}^4$ . Peranan antioksidan sangat penting dalam meredam efek radikal bebas yang berkaitan erat dengan terjadinya penyakit degeneratif yang didasari oleh proses biokimia dalam tubuh. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengikat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon<sup>5</sup>.

Penelitian ini dilakukan sebagai indikator awal dalam pengujian sitotoksik. Mayer mengemukakan juga bahwa salah satu metode awal untuk uji sitotoksik adalah *Brine Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk uji sitotoksitas/skrining senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman menggunakan larva *Artemia salina leach* sebagai hewan uji. Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Metode ini mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat<sup>6</sup>. Larva *Artemia salina* dianggap mewakili organisme zoologis untuk uji kematian secara *in vivo*. Uji BSLT dilakukan dengan mengamati tingkat kematian yang ditimbulkan setelah diberi ekstrak terhadap larva udang jenis *Artemia salina* setelah diinkubasi selama 1x24 jam. Hasil yang diperoleh kemudian dihitung sebagai nilai  $LC_{50}$  (*lethal concentration*) ekstrak, dimana konsentrasi ekstrak yang dapat menyebabkan kematian *Artemia salina* sebanyak 50%<sup>7</sup>. Berdasarkan uraian diatas dan berbagai aktivitas biologis senyawa yang dikandung oleh daun kakao mendorong penulis untuk melakukan penelitian lebih lanjut terhadap daun kakao sebagai bahan alam potensial untuk dikembangkan sebagai agen antikanker dengan menguji sitotoksitas dari ekstrak daun kakao menggunakan metode BSLT terhadap larva udang *Artemia salina leach*.

## II. Metodologi Penelitian

### 2.1. Bahan kimia, peralatan dan instrumentasi

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, lemari pengering, alumunium foil, mikroskop, blender, rotary evaporator, tanur, hot plate, cawang penguap, desikator, wadah maserasi, vial, bejana penetasan

telur *Artemia salina leach*, alat-alat gelas laboratorium.

Bahan-bahan yang digunakan produksi Merck® meliputi: asam asetat anhidrat, bismut nitrat, asam sulfat pekat, kloroform, toluen, raksa (II) klorida, timbal (II) asetat, besi (III) klorida, serbuk magnesium, kloral hidrat, natrium hidroksida, asam klorida pekat, iodium, alfa naftol, kalium iodida, asam nitrat dan tanaman daun kakao (*Theobroma cacao* L.), telur *Artemia salina leach*, garam laut, aquadest serta etanol 96%.

### 2.2. Prosedur penelitian

#### Pembuatan Ekstrak

Prosedur ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan cara menimbang 500 gram serbuk simplisia daun kakao (*Theobroma cacao* L.) dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangkan dengan 75 bagian (3750 ml) cairan penyari etanol 96% lalu dia diaduk-aduk sesekali. Setelah 5 hari campuran di serkai dan ampasnya diperas. Dicuci ampasnya dengan cairan penyari etanol 96% secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (5000 ml) maserat. Lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan di tempat sejuk terlindung dari cahaya selama 2 hari dan disaring. Maserat dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* pada temperatur tidak lebih dari 40°C dan diperoleh ekstrak kental<sup>8</sup>.

#### Karakterisasi Simplisia

Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi : pemeriksaan makroskopik simplisia, pemeriksaan mikroskopik serbuk simplisia, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam<sup>9</sup>.

#### Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid/steroid dan glikosida.

### Pengujian Sitotoksitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

#### Pembuatan Larutan Ekstrak

Larutan ekstrak etanol daun kakao (*Theobroma cacao* L.) dibuat menjadi 10 konsentrasi untuk terlebih dahulu digunakan sebagai orientasi, yaitu konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000  $\mu\text{g/ml}$ , dan 1 tabung digunakan untuk kontrol negatif, masing-masing dengan tiga kali pengulangan.

#### 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*<sup>10</sup>.

#### 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<sup>11</sup>.

#### Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Kakao

Disiapkan vial untuk tiap kelompok sesuai tingkat konsentrasi, masing-masing disediakan 5 vial dan replikasi sebanyak 3 kali. Vial diisi dengan sampel yang telah dilarutkan dengan air laut buatan sebanyak 10 ml. Sebanyak 10 ekor larva *Artemia* dimasukkan 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. Jumlah larva udang yang mati dalam tiap vial dihitung selama 24 jam. Tingkat toksisitas ditentukan dengan menghitung jumlah larva yang mati. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik observasi<sup>12</sup>.

#### 2.3 Analisis Data

Data hasil penelitian dihitung dengan menggunakan analisis probit menggunakan SPSS 20 for windows untuk mengetahui harga LC<sub>50</sub>, yaitu dengan menghitung tingkat kematian atau mortalitas secara regresi linier, yaitu dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dan jumlah total larva. Nilai LC<sub>50</sub> diperoleh dengan cara menarik garis pada nilai 50% dari sumbu mortalitas sampai memotong sumbu grafik. Perpotongan garis

ditarik ke garis konsentrasi dimana konsentrasi zat yang menyebabkan kematian 50% larva yang disebut LC<sub>50</sub>. Untuk menghitung LC<sub>50</sub> digunakan kurva yang menyatakan log konsentrasi sebagai sumbu X dan % mortalitas sebagai sumbu Y. Hasil LC<sub>50</sub> diperoleh dari perpotongan garis terhadap kedua sumbu tersebut<sup>13</sup>.

### III. Hasil dan Diskusi

#### 3.1. Analisis hasil karakterisasi

Penetapan karakterisasi suatu simplisia perlu dilakukan dengan tujuan untuk menjamin mutu dari suatu simplisia tersebut. Penetapan karakterisasi ini dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan dalam Materi Medika Indonesia. Hasil karakterisasi simplisia daun kakao dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil karakterisasi simplisia daun kakao (*Theobroma cacao* L.)

No	Parameter	Rata-rata	Persyaratan MMI (%)
1	Kadar air	7,33 %	< 10
2	Kadar sari larut air	7,86 %	≥ 7
3	Kadar sari larut etanol	4,97 %	≥ 3,5
4	Kadar abu total	3,92 %	≤ 8
5	Kadar abu tidak larut asam	0,49 %	≤ 1

Penetapan kadar air dilakukan untuk memberikan batasan maksimal atau rentang besarnya kandungan air. Pengaturan kadar air sesuai dengan standar bertujuan untuk menghindari pertumbuhan jamur yang cepat pada ekstrak. Hasil dari penetapan kadar air simplisia daun kakao ini diperoleh 7,33%, sehingga hal ini sesuai dengan yang di persyaratkan pada MMI yaitu <10% yang merupakan nilai maksimal yang diperbolehkan terkait dengan kemurnian dan kontaminasi yang mungkin terjadi. Pada pengujian kadar sari larut dalam air serbuk simplisia daun kakao didapatkan persentase kadar sebesar 7,86 %, sedangkan untuk pengujian kadar sari larut dalam etanol serbuk simplisia daun kakao di peroleh persentase kadarnya sebesar 4,97 %. Kadar sari larut dalam air dan etanol merupakan pengujian untuk penetapan jumlah kandungan senyawa yang dapat terlarut dalam air dan kandungan senyawa yang dapat terlarut dalam etanol. Prinsip dari ekstraksi didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur<sup>14</sup>.

Pada pengujian kadar abu total serbuk simplisia daun kakao didapatkan persentase kadar sebesar 3,92 % dan untuk pengujian kadar abu tidak larut asam didapatkan persentase kadarnya sebesar 0,49 %. Penetapan kadar abu total bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal dari proses awal hingga terbentuknya ekstrak, sedangkan penetapan kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk mengetahui besarnya tingkat pengotor yang tercampur pada serbuk saat preparasi simplisia. Prinsip kerjanya yaitu bahan di panaskan pada temperatur hingga senyawa organik dan turunannya terdekstruksi dan menguap hingga tersisa unsur mineral dan anorganik saja<sup>14</sup>.

Skrining fitokimia dilakukan untuk menguji ada tidaknya senyawa metabolit sekunder diantaranya seperti alkaloid, flavonoid, saponin, steroid/triterpenoid, tannin dan glikosida. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun kakao dapat dilihat pada tabel 2.

Hasil skrining menunjukkan bahwa serbuk simplisia dan ekstrak etanol daun kakao mengandung senyawa metabolit sekunder yang sama yaitu golongan alkaloid positif ditandai pada pereaksi mayer menunjukkan hasil positif karena terbentuk endapan menggumpal berwarna putih kemudian pada pereaksi dragendorff menunjukkan hasil yang positif karena terbentuk warna jingga dan pada pereaksi bouchardat juga menunjukkan hasil yang positif karena membentuk endapan coklat, flavonoid ditandai terjadi warna jingga pada lapisan amil alkohol, saponin ditandai dengan terbentuk busa, tanin ditandai dengan terjadi warna biru kehitaman, steroid ditandai dengan terjadi warna biru hijau dan glikosida ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna ungu.

**Tabel 2** Hasil Skrining Fitokimia Simplisia Dan Ekstrak Etanol Daun Kakao

No	Parameter	Hasil	
		Simplisia	Ekstrak
1	Alkaloid	+	+
2	Falvonoid	+	+
3	Tanin	+	+
4	Saponin	+	+
5	Steroid	+	+
6	Glikosida	+	+

Keterangan : (+) memberikan reaksi  
(-) tidak memberikan reaksi

Aktivitas senyawa antikanker pada ekstrak daun kakao, salah satunya dipengaruhi oleh adanya

senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid, merupakan golongan polifenol yang diketahui bersifat sebagai antioksidan dikarenakan gugus hidroksil yang terikat pada struktur<sup>4</sup>. Pengujian pada daun kakao menunjukkan positif mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid dan glikosida. Dari hasil skrining fitokimia, mengandung senyawa flavonoid yang dapat menangkap radikal bebas untuk menghambat kerusakan sel. Kandungan flavonoid yang tinggi berkontribusi pada efek antioksidan, peningkatan imun, dan sifat antikanker<sup>7</sup>.

### 3.2 Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji sitotoksitas ini dilakukan dengan metode BSLT menggunakan *Artemia salina leach* sebagai hewan uji karena lebih mudah dalam pengerjaannya, harganya murah, cepat mendapatkan hasilnya. *Artemia salina* yang digunakan pada pengujian sitotoksitas adalah *Artemia salina* yang berada pada tahap *naupli* atau tahap larva. Larva yang digunakan adalah larva yang berumur 48 jam karena larva berada dalam keadaan paling peka pada umur 48 jam. Hal ini disebabkan karena pada umur 48 jam organ-organ pada *Artemia salina* sudah terbentuk lengkap. Dengan terbentuknya mulut, *Artemia salina* dapat meminum ALB (air laut buatan) yang sudah diberi ekstrak daun kakao dengan berbagai konsentrasi, sehingga kematian *Artemia salina* benar-benar disebabkan karena ekstrak daun kakao dalam berbagai konsentrasi tersebut<sup>15</sup>.

Larutan ekstrak etanol daun kakao dibuat menjadi 10 konsentrasi untuk terlebih dahulu digunakan sebagai orientasi, yaitu konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 dan 1000 µg/mL dengan ditambah kontrol negatif yang hanya berisi air garam dan larva udang. Penambahan kontrol negatif dilakukan untuk mengetahui pengaruh air garam maupun faktor lain terhadap kematian larva, sehingga kematian larva dapat dipastikan karena efek dari ekstrak yang ditambahkan. Uji BSLT ini dilakukan masing-masing sebanyak 3 kali pengulangan (triplo) untuk memperoleh keakuratan data dan mengurangi kesalahan dalam proses penelitian. Pengamatan dilakukan 24 jam setelah perlakuan konsentrasi ekstrak. Perhitungan kematian larva dilakukan dengan cara mengamati pergerakan larva selama

beberapa detik. Kematian larva dihitung jika tidak ada pergerakan larva selama beberapa detik<sup>12</sup>.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh kematian larva berbeda-beda pada

masing-masing konsentrasi. Untuk hasil uji pendahuluan pada uji sitotoksitas daun kakao dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3** Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Kakao

No	Konsentrasi (µg/mL)	Perlakuan 1		Perlakuan 2		Perlakuan 3		Rata-rata % Mortalitas
		Larva mati	% Mortalitas	Larva mati	% Mortalitas	Larva mati	% Mortalitas	
1	Blanko	0	0	0	0	0	0	0
2	100	3	30	2	20	2	20	23,33 %
3	200	3	30	4	40	4	40	36,66 %
4	300	4	40	4	40	5	50	43,33 %
5	400	6	60	5	50	6	60	56,66 %
6	500	8	80	8	80	5	50	70 %
7	600	8	80	7	70	7	70	73,33 %
8	700	9	90	8	80	8	80	83,33 %
9	800	9	90	9	90	9	90	90 %
10	900	10	100	10	100	9	90	96,66 %
11	1000	10	100	10	100	10	100	100,00%

**Tabel 4.** Hasil Pengujian Sitotoksitas Ekstrak Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.)

No	Konsentrasi (µg/mL)	Perlakuan 1		Perlakuan 2		Perlakuan 3		Rata-rata % Mortalitas
		Larva mati	% Mortalitas	Larva mati	% Mortalitas	Larva mati	% Mortalitas	
1	Blanko	0	0	0	0	0	0	0
2	100	3	30	2	20	2	20	23,33 %
3	200	3	30	5	50	4	40	40 %
4	300	4	40	4	40	6	60	46,66 %
5	400	6	60	5	50	7	70	60 %
6	500	8	80	8	80	5	50	70 %
7	600	8	80	6	60	9	90	76,66 %
8	700	9	90	8	80	8	80	83,33 %

Konsentrasi yang digunakan untuk sitotoksitas yaitu persentase kematian larva antara 20-80% karena dengan persentase kematian tersebut sudah dapat memberikan kurva yang lebih linier, sehingga LC<sub>50</sub> yang didapatkan pada uji BSLT ini dapat menggambarkan hasil yang sebenarnya.

Berdasarkan tabel 4 didapatkan persentase kematian larva pada rentang 20-80% yaitu pada konsentrasi 100-700 µg/mL. Untuk hasil pengujian sitotoksitas daun kakao dapat dilihat pada tabel 4.

Berdasarkan data tersebut jumlah larva tiap perlakuan adalah 10 ekor dengan 3 kali perlakuan, sehingga totalnya 30 ekor. Tabel 4.4 dapat diketahui persentase mortalitas dari konsentrasi

yang rendah 100 µg/mL ke konsentrasi yang paling tinggi terdapat pada konsentrasi 700 µg/mL mempunyai persentase yaitu sebesar 20-80%. Sedangkan pada blanko tidak memberikan mortalitas terhadap larva. Hal ini sesuai dengan teori, bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin banyak jumlah larva yang mati. Selain itu dari persentase kematian larva tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak akan menghasilkan jumlah kematian larva yang semakin tinggi pula<sup>12</sup>.

Cara kerja senyawa toksik yang menyebabkan kematian larva *artemia* adalah dengan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Senyawa toksik ini dapat mengganggu

alat pencernaan dan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal inilah yang menyebabkan kegagalan larva mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya dan menyebabkan kematian larva<sup>16</sup>.

Mekanisme kematian larva diperkirakan berhubungan dengan fungsi senyawa flavonoid dan alkaloid. Flavonoid dan alkaloid memiliki mekanisme sebagai antikanker karena flavonoid yang menghambat daya makan larva. Selain dari itu, mekanisme flavonoid sebagai anti kanker ada beberapa teori. 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<sup>5</sup>.

Alkaloid yang berasal dari tumbuhan memiliki mekanisme sitotoksik yaitu berperan sebagai tubulin inhibitor. Pada proses siklus sel alkaloid berikatan dengan tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus. Terikatnya tubulin pada alkaloid mengakibatkan polimerisasi protein menjadi mikrotubulus akan terhambat sehingga pembentukan spindle mitotik akan terhambat pula dan siklus sel akan terhenti pada metafase. Karena tidak dapat melakukan pembelahan sel, sel tersebut kemudian akan mengalami apoptosis<sup>17</sup>.

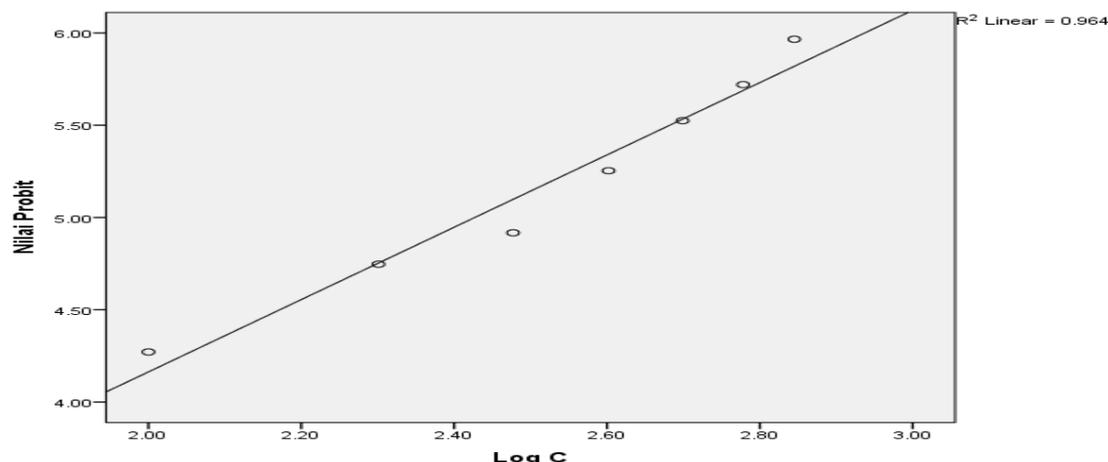
Data yang diperoleh pada tabel 4.4 tersebut, kemudian dianalisis dengan menggunakan tabel analisis probit untuk mendapat nilai  $LC_{50}$ . *Lethal concentration 50* ( $LC_{50}$ ) adalah besarnya konsentrasi yang dapat membunuh hewan

percobaan sebanyak 50% dari keseluruhannya. Nilai  $LC_{50}$  dapat dihitung dengan persamaan regresi garis lurus tersebut dengan memasukkan nilai (probit 50% kematian hewan uji) sebagai  $y$  sehingga dihasilkan  $x$  sebagai nilai log konsentrasi. Antilog nilai  $x$  tersebut merupakan nilai  $LC_{50}$ . Parameter yang ditunjukkan untuk mengetahui adanya aktivitas biologis pada suatu senyawa terhadap hewan uji ialah dengan menghitung jumlah larva yang mati karena pengaruh pemberian senyawa dengan konsentrasi yang telah ditentukan (Agustini, 2013). Setelah dilakukan analisis probit dapat diketahui grafik persamaan garis lurus  $Y = 1,9629 X + 0,2363$ . Sedangkan koefesien korelasi yang didapatkan yakni  $R^2 = 0,964$  yang berarti sebesar 96,4% perubahan nilai probit dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak.

Hal ini menunjukkan meningkatnya konsentrasi ekstrak diikuti meningkatnya nilai probit (respon kematian larva) (Dahlan, 2018). Berdasarkan nilai  $R^2$  yang didapatkan tersebut dapat dikatakan bahwa tingkat hubungan yang dihasilkan tergolong sangat kuat.

Grafik menunjukkan log konsentrasi terhadap nilai probit yang didapat dari persentase kematian larva. Kemudian dimasukkan nilai  $Y$  yaitu nilai probit 50% hewan ujidan didapatkan nilai  $X = 2,43$  maka nilai  $LC_{50}$  antilog 2,43 yaitu 269,15  $\mu\text{g/mL}$ .

Suatu senyawa bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker pada uji BSLT jika memiliki nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ . Hasil  $LC_{50}$  yang didapat lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/mL}$  yaitu 269,15  $\mu\text{g/mL}$ . Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun kakao bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker<sup>6</sup>.



Gambar 4.1 Grafik Regresi Linier Konsentrasi Ekstrak Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Nilai Probit

#### IV. Kesimpulan

Golongan senyawa yang terkandung didalam daun kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan metode skrining fitokimia yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan glikosida. Berdasarkan hasil uji sitotoksitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki daya sitotoksitas dengan nilai  $LC_{50}$  269,15  $\mu$ g/mL.

#### Referensi

- Nurani, L, H. (2012, May). Uji Sitotoksitas dan Anti Proliferatif Sel Kanker Payudara *t47d* dan *Sel Vero Biji Nigella Sativa*. Yogyakarta. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2 (1). Hal.17-29.
- Muaja, A.D., Koleangan, H.S.J., dan Runtuwene, M.R.J. (2013, Juli). Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Seyogik (*Saurauia Bracteosa* DC) Dengan Metode Soxhletasi. Manado. *Jurnal Mipa Unsrat Online*, 2(2). Hal.115-118.
- Masro'atun., Sari, D, N, R., dan Hasanah, A, U. (2017). Efektivitas Ekstrak Daun Kakao Terhadap *Phytophthora palmivora* effectiveness of Kakao Leaf Extracts to *Phytophthora palmivora*. Jember. *Jurnal Biologi dan Pembelajaran Biologi*, 2(1). Hal. 50-60
- Hasanah, M. (2016, Feb). Analisis Golongan Senyawa Kimia dan Uji Potensi Antioksidan dari Ekstrak Daun Cokelat (*Theobroma cacao* L.) Hasil Ekstraksi Maserasi. Palembang. *Jurnal Ilmiah Bakti Farmasi*, 1 (2).Hal.43-48.
- Rahimah, S., Maryam, F., dan Limbong, A, B. (2019, May). The Toxicity Test of Ethanol Extract of Leaves *Averrhoa bilimbi* L. Using *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Makassar. *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*.4 (1). Hal.10-14.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughlin, J.L. (1982, May). *Brine Shrimp*: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of medicinal Planta Medica*, 45(5). Hal.31-34.
- Chusniasih, B, dan Tutik. (2020, Oct). Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (bslt) dan Identifikasi Komponen Fitokimia Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). Lampung. *Jurnal Analytical and Environmental Chemistry*, 2 (2). Hal. 192-201
- Departemen Kesehatan RI. (1979, Juli 1). *Materia Medika Indonesia*, jilid III. Jakarta: Depkes RI. Hal. 155-159.
- Departemen Kesehatan RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI. Hal. 3-12.
- Djamil, R., dan Anelia, T. (2009, Sep). Penapisan Fitokimia, Uji BSLT Dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Beberapa Spesies *Papilionaceae*. Jakarta Selatan. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7(2).Hal.13-15.
- Fadli., Suhaimi., dan Muhammad, I. (2019, Apr). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*)(Wight) Walp.) Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Pontianak. *Open Jornal*

- Systems STF Muhammadiyah*, 4(1). Hal.17-21.
12. Supriningrum, R., Sapri., Pranamala, V. A. (2016, Nov). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Akar KB (*Coptosapelta tomentosa* Valeton ex K.Heyne) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Samarinda. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 2(2). Hal.161-165.
  13. Agustini, N.W.S. (2013). Aktivitas Antioksidan Dan Uji Toksisitas Hayati Pigmen Fikobili Protein dari Ekstrak Spirulina Platensis. Bogor. *Journal Bioteknologi*, 9(1).Hal. 107-110.
  14. Handayani, S., Komar, R. W., dan Insanu, M. (2018, Feb). Penapisan Fitokimia Dan Karakterisasi Simplisia Daun Jambu Mawar (*Syzygium jambos* Alston). *Journal Farmasi*, 5(3). Hal.174-180.
  15. Panjaitan, B.R. (2011, Juli). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxia Cortex*) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality (BSLT). Yogyakarta. *Skripsi*. Hal. 42.
  16. Sondakh, M.R. (2017). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Spons Laut (*Calyspongia aerizusa*) terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test. Manado.*Jurnal e-Biomedik (eBm)*, 6 (2). Hal.1-4.
  17. Nuraini., Asriani, I., dan Iin, N. (2015, Jul). Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker Dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*). *Al Kimia*. Makassar: UIN Alauddin. 3(2): 15-27.