

Aktivitas Antioksidan, Toksisitas, Kandungan Senyawa Fenol dan Flavonoid Total dari Daun Leilem (*Clerodendrum minahassae* Teijsm. & Binn)

Tiah Rachmatiah^{1*}, Juliana Jean Daud¹, Nina Artanti²

¹Fakultas Farmasi, Instritut Sains dan Teknologi Nasional, Jl. Moh Kahfi II, Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640, Indonesia.

²Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan, Banten 15314, Indonesia

*E-mail: tiahrachmatiah@yahoo.com

ABSTRAK

Clerodendrum minahassae (Lamiaceae) merupakan tumbuhan yang berasal dari Sulawesi Utara dan dikenal dengan nama leilem. Pada umumnya genus *Clerodendrum* mengandung senyawa antioksidan seperti senyawa-senyawa fenol dan flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan dan toksisitas serta kandungan senyawa fenol dan flavonoid total dari daun leilem. Ekstrak daun leilem dibuat secara maserasi dalam metanol yang selanjutnya difraksinasi dengan *n*-heksana dan etil asetat. Aktivitas antioksidan diuji dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan toksistas diuji terhadap larva *Artemia salina* dengan metode BSLT (*Brain Shrimp Lethality Test*). Kandungan fenol dan flavonoid dilakukan dengan metode kolorimetri. Hasil penelitian memperlihatkan ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun leilem memiliki aktivitas antioksidan lemah dengan nilai IC₅₀ 300,57 µg/ml dan 189,62 µg/ml, sementara itu toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* diperlihatkan oleh ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun leilem dengan nilai LC₅₀ berturut turut 190,58 µg/ml dan 147,36 µg/ml. Penentuan kadar fenol total dan flavonoid total dilakukan pada fraksi etil asetat dengan menggunakan standar asam galat untuk fenol total dan kuersetin untuk flavonoid total. Hasil penentuan menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun leilem mengandung fenol total 164,38 mg/g ekstrak dan flavonoid total 270,8 mg/g ekstrak.

Kata Kunci: antioksidan, *Clerodendrum*, fenol, flavonoid, toksisitas

Antioxidant Activity, Toxicity, Total Phenol and Flavonoid Content of Leilem (Clerodendrum minahassae Teijsm.& Binn) Leaves

ABSTRACT

Clerodendrum minahassae (Family Lamiaceae) is originally from North Sulawesi, with the local name leilem. The genus *Clerodendrum* generally contain antioxidant compounds such as phenols and flavonoids. This study was conducted to determine the antioxidant activity, toxicity and total phenol and flavonoid content of leilem leaves. Leilem leaves extract prepared by maceration in methanol, furthermore the methanol extract was fractionated with *n*-hexane and then ethyl acetate. Antioxidant activity was determined by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) free radical scavenging assay and the toxicity was tested on *Artemia salina* larvae by BSLT (*Brain Shrimp Lethality Test*) method. The total phenol and flavonoid content of ethyl acetate fraction were determined by a colorimetric method. The results expressed that the methanol extract and ethyl acetate fraction had weak antioxidant activity with IC₅₀ value 300.57 µg/ml and 189.62 µg/ml meanwhile the toxicity was shown by methanol extract and ethyl acetate fraction with LC₅₀ value respectively 190.58 µg/ml and 147.36 µg/ml. Determination of total phenolic and flavonoid content was performed on the ethyl acetate fraction with the gallic acid and quercetin as standard for total phenol and flavonoid content respectively. The determination showed that ethyl acetate fraction had total phenolic and flavonoid content 164.38 mg/g extract and 270.8 mg/g extract.

Keywords: antioxidant, *Clerodendrum*, flavonoid, phenol, toxicity

PENDAHULUAN

Di Indonesia angka kejadian penyakit degeneratif dari tahun ke tahun selalu mengalami peningkatan (Amila *et al.*, 2021). Timbulnya berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung koroner, diawali oleh terjadinya kerusakan sel akibat reaktivitas senyawa radikal bebas. Kemiripan sifat antara radikal bebas dan oksidan terletak pada agresivitas untuk menarik elektron di sekelilingnya. Berdasarkan sifat ini, radikal bebas dianggap sama dengan oksidan (Sayuti & Yenrina, 2015). Oleh karena itu, pemberian antioksidan merupakan hal penting untuk menetralkan radikal bebas sebelum terjadi kerusakan sel. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat mengikat radikal oksigen bebas dan mencegah radikal bebas merusak sel-sel sehat (Dontha, 2016). Antioksidan terbagi atas dua jenis, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan. Antioksidan alami bisa berasal dari buah-buahan dan tanaman, sedangkan antioksidan buatan dihasilkan dari sintesis suatu reaksi kimia. Antioksidan alami yang sering terdapat dalam tumbuhan adalah senyawa fenolat dan flavonoid (Rahmi, 2017).

Tumbuhan yang banyak digunakan sebagai obat tradisional dan mengandung senyawa fenol dan flavonoid salah satunya adalah genus *Clerodendrum* (Shrivastava & Patel, 2007). Jenis tumbuhan dari genus tersebut yang dijumpai di Indonesia diantaranya adalah *Clerodendrum minahassae*. Tumbuhan ini berasal dari daerah Minahasa, Sulawesi Utara yang dikenal dengan nama leilem. Daun leilem dimanfaatkan oleh masyarakat Minahasa biasanya sebagai campuran masakan daging atau ikan (Situmorang *et al.*, 2016). Secara tradisional, daun leilem digunakan untuk mengobati sakit perut, *trichinosis*, dan penyakit paru-paru (Kairupan *et al.*, 2019). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak metanol daun leilem mampu meredam radikal DPPH antara 64,83 – 70,12 % dengan kadar fenol total antara 3,38 – 4,21 mg/g (Adam *et al.*, 2013). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak etanol mampu meredam radikal DPPH dengan IC_{50} 565,45 μ g/mL dan mengandung fenol total 139,88 mg/g dan flavonoid total 34,46 mg/g (Kairupan *et al.*, 2019). Secara umum, pengujian antioksidan secara *in vitro* menggunakan perangkap radikal bebas yang relatif mudah untuk dilakukan. Di antara metode penangkapan radikal bebas (*free radical scavenging methods*), yang sering digunakan adalah metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Metode ini sederhana, cepat dan lebih murah daripada metode lainnya (Dontha, 2016).

Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun leilem dan hasil fraksinasinya dalam etil asetat terhadap radikal DPPH serta penetapan kandungan fenol total dan flavonoid total secara spektrofotometri UV-Vis. Pada penelitian ini juga dilakukan pengujian toksisitas ekstrak terhadap larva udang *Artemia salina* dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Letahlity Test*). BSLT merupakan metode yang banyak digunakan sebagai langkah awal pencarian senyawa antikanker baru. Hasil uji toksisitas dengan

metode tersebut telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa anti kanker (Noviardi *et al.*, 2019).

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan. Daun leilem segar (*Clerodendrum minahassae*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Bolaang Mongondow, Sulawesi Utara. Determinasi daun leilem dilakukan di Herbarium Bogoriense, bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Cibinong, Jawa Barat. Bahan lain yang digunakan adalah DPPH (Sigma), asam galat (Sigma), Na_2CO_3 (Merck), quercetin (Sigma-Aldrich), $NaNO_2$ (Merck), $AlCl_3$ (Merck), NaOH (Merck), Metanol (Merck), *Folin-Ciocalteau*, air laut, etil asetat (teknis), *n*-heksana (teknis), telur udang (*Artemia salina* Leach) yang diperoleh secara komersil.

Alat. Timbangan analitik (Kern), *blender* (Philips), mikropipet (Eppendorf), corong pisah, alat penguap berputar vakum (Buchi), spektrofotometer UV-Vis (Cary 60), Vial + tutup, kotak penetasan telur udang, lampu 18 Watt.

Pembuatan Serbuk Daun Leilem. Daun leilem yang telah dicuci bersih dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan *blender*. Serbuk lalu diayak dan disimpan dalam wadah yang bersih dan tertutup rapat.

Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Leilem. Ekstraksi dilakukan secara maserasi 250 g serbuk daun leilem dalam metanol selama 24 jam, kemudian disaring. Filtrat diuapkan dengan menggunakan penguap putar vakum. Ampas sisa ekstraksi dimaserasi kembali, proses ini dilakukan 2 kali, ekstrak yang dihasilkan dicampur dengan hasil ekstraksi sebelumnya, kemudian diuapkan di atas penangas air.

Penapisan Fitokimia Serbuk Daun Leilem

a. Identifikasi golongan alkaloid. Sebanyak 2 g serbuk daun leilem ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air, lalu dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. 2 ml filtrat dipindahkan ke dalam 2 tabung reaksi. Tabung reaksi pertama ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat dan tabung reaksi kedua ditambahkan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan berwarna coklat kehitaman pada penambahan Bouchardat dan endapan berwarna putih kekuningan pada penambahan Mayer, menandakan adanya alkaloid (Depkes RI, 1995).

b. Identifikasi golongan flavonoid. Sebanyak 2 g serbuk daun leilem dilarutkan direndam dalam aquadest kemudian disaring dan dipindahkan kedalam gelas piala. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan larutan natrium nitrit 5% sebanyak 150 μ l dikocok sampai homogen, kemudian ditambahkan 150 μ l alumunium klorida 10%, didiamkan sebentar, lalu

ditambahkan dengan 2 ml natrium hidroksida 1 M, warna larutan merah menunjukkan adanya flavonoid (Zou & Wei, 2004).

- c. **Identifikasi golongan steroid/triterpenoid.** Sebanyak 2 g serbuk daun leilem dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam, kemudian disaring dan diuapkan hingga kering. Setelah diuapkan sampai kering ditambahkan 0,5 ml anhidrida asetat dan 0,5 ml kloroform lalu larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang kering. Melalui dinding tabung diteteskan 1 ml sampai 2 ml H₂SO₄ pekat (*Liebermann-Burchard*). Terbentuknya cincin merah kecoklatan atau ungu pada perbatasan ke dua larutan dengan warna hijau atau ungu pada bagian atas larutan menunjukkan adanya steroid atau triterpenoid (Depkes RI, 1987).
- d. **Identifikasi golongan tanin.** Sebanyak 2 g serbuk daun leilem dilarutkan dalam 50 ml aquadest lalu dididihkan selama 15 menit, setelah itu dinginkan, disaring, kemudian ditambahkan 2 tetes FeCl₃ 1%. Terbentuknya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menandakan adanya senyawa tanin (Depkes RI, 1987).

Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Leilem dengan *n*-Heksana dan Etil Asetat. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan corong pisah, pertama ekstrak ditimbang 2 g lalu ditambahkan 5 ml metanol dan 25 ml aquades, setelah larut dimasukkan ke dalam corong pisah dan dikocok dengan 30 ml *n*-heksana kemudian didiamkan sampai terjadi dua lapisan fase air (lapisan bawah) dan fase *n*-heksana (lapisan atas). Fase *n*-heksana dipisahkan dan ditampung pada wadah terpisah. Fase air dimasukkan ke dalam corong pisah kembali selanjutnya dikocok dengan 30 ml etil asetat, kemudian didiamkan sampai terbentuk dua lapisan fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas), selanjutnya fase etil asetat dipisahkan dan ditampung dalam wadah terpisah. Proses pengocokan dalam fraksinasi dilakukan 3 kali masing masing dengan 30 ml pelarut. Fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air/metanol, selanjutnya diuapkan sampai kental.

Orientasi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi Ekstrak Daun Leilem. Larutan induk dibuat dalam konsentrasi 1.000 µg/ml dengan cara melarutkan lebih kurang 4,0 mg ekstrak metanol dan hasil fraksinasi dalam 4 ml metanol, kemudian dilakukan pengenceran larutan induk dari konsentrasi 1.000 µg/ml menjadi 400 µg/ml. Larutan DPPH dibuat dengan cara melarutkan 3,942 mg DPPH kedalam 10 ml metanol, selanjutnya 500 µl larutan DPPH ditambahkan ke dalam setiap tabung reaksi yang berisi larutan sampel. Kontrol negatif dibuat dengan cara menambahkan 500 µl larutan DPPH ke dalam tabung reaksi yang sudah diisi 2 ml metanol. Selanjutnya larutan didiamkan selama 30 menit, serapan dari setiap larutan diukur pada panjang gelombang 515 nm (Yen & Chen, 1995).

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH. Pengujian ini dilakukan pada

ekstrak metanol dan fraksi etil asetat. Larutan induk dibuat dalam konsentrasi 1000 µg/ml dibuat dengan cara melarutkan lebih kurang 4,0 mg ekstrak dalam 4 ml methanol, kemudian dari larutan induk dibuat larutan dengan konsentrasi 10, 50, 100, dan 200 µg/ml. Dengan cara yang sama, dibuat larutan kontrol positif (*Kuersetin*) dengan konsentrasi 1, 5, 10, dan 20 µg/ml. Larutan DPPH dibuat dengan cara melarutkan 3,942 mg DPPH kedalam 10 ml metanol. Selanjutnya 500 µl larutan DPPH ditambahkan kedalam setiap tabung reaksi yang berisi larutan ekstrak dan kontrol positif. Untuk kontrol negatif dibuat dengan cara menambahkan 500 µl larutan DPPH kedalam tabung yang sudah diisi 2 ml metanol. Sebelum diukur serapannya larutan didiamkan terlebih dahulu selama 30 menit. Serapan dari setiap larutan diukur pada panjang gelombang 515 nm dan dihitung nilai % inhibisinya. Selanjutnya dibuat grafik % inhibisi terhadap konsentrasi, kemudian dihitung nilai IC₅₀ (Yen & Chen, 1995).

Penentuan Kandungan Flavonoid Total Fraksi Etil Asetat Daun Leilem. Pada penentuan kandungan senyawa flavonoid, pertama dilakukan pembuatan larutan induk standar *kuersetin* dengan konsentrasi 1000 µg/ml dengan cara lebih kurang 5,0 mg serbuk *kuersetin* dilarutkan dalam 0,5 ml metanol lalu ditambahkan aquades sampai 5 ml, kemudian dari larutan induk tersebut, dibuat larutan dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml. Pembuatan larutan ekstrak fraksi etil asetat daun leilem dengan cara melarutkan lebih kurang 4 mg fraksi etil asetat dan 4 ml metanol (konsentrasi 1000 µg/ml), kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 50 µg/ml. Selanjutnya kedalam tiap tabung ditambahkan 2 ml aquades, 150 µl NaNO₂, setelah 6 menit ditambahkan 150 µl aluminium klorida 10% dan dihomogenkan menggunakan alat *vortex* kemudian didiamkan selama 6 menit, lalu ditambahkan 2 ml NaOH 1 M. dan aquades hingga volume 5 ml. Campuran kemudian dihomogenkan dengan alat *vortex*, dibiarkan 15 menit dan diukur serapannya pada λ 510 nm. Selanjutnya kurva standar *kuersetin* dibuat, kemudian kandungan flavonoid total dihitung dengan persamaan regresi linier (Zou & Wei, 2004).

Penentuan Kandungan Fenol Total Fraksi Etil Asetat Daun Leilem. Penentuan kandungan senyawa fenol menggunakan asam galat sebagai larutan standar dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml. Larutan ekstrak fraksi etil asetat daun Leilem dibuat dengan cara melarutkan 4 mg ekstrak ke dalam 4 ml metanol (konsentrasi 1.000 µg/ml), kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 50 µg/ml. Selanjutnya dalam tiap tabung ditambahkan 7 ml aquades dan 0,5 ml *Folin-Ciocalteu* dan dikocok lalu didiamkan selama 8 menit. Setelah itu ditambahkan 1,5 ml Na₂CO₃ 20% dan dikocok sampai homogen. Campuran kemudian didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar, kemudian serapan diukur pada panjang gelombang 765 nm. Selanjutnya kurva standar asam

galat dibuat, kemudian kandungan fenol total dihitung dengan persamaan regresi linier (Singleton *et al.*, 1999).

Uji Toksisitas Ekstrak Metanol dan Fraksi Etil Asetat terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach.

Pengujian dilakukan dengan metode BSLT (Meyer *et al.*, 1982). Pembuatan larutan induk ekstrak dengan konsentrasi 10.000 µg/ml dilakukan dengan cara melarutkan 50 mg ekstrak dalam 5 ml pelarut yang sesuai. Selanjutnya sebanyak 5 µl, 50 µl dan 500 µl larutan induk dipipet ke dalam vial yang telah ditara 5,0 ml (untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 10, 100, dan 1.000 µg/ml) kemudian larutan dalam vial diuapkan dengan *hair dryer* sampai kering, lalu ditambahkan kurang lebih 3 ml air laut ke dalam masing-masing vial dan dimasukkan 10 ekor larva udang ke dalamnya, setelah itu ditambahkan kembali air laut hingga volume 5 ml lalu dihomogenkan. Larutan dalam vial yang telah berisi larva udang tersebut dibiarkan selama 24 jam di bawah sinar lampu 18 Watt, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan yang masih hidup. Tingkat kematian atau mortalitas larva udang dihitung dengan rumus:

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{Akumulasi mati}}{\text{Akumulasi mati} + \text{Akumulasi hidup}} \times 100 \%$$

Perhitungan nilai LC₅₀ menggunakan persamaan regresi linier $y = bx + a$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan Fitokimia Serbuk daun Leilem

Hasil penapisan fitokimia serbuk daun leilem memperlihatkan bahwa daun leilem mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid dan tanin. Adanya kandungan alkaloid, flavonoid dan steroid dalam daun leilem sesuai dengan hasil yang dilaporkan peneliti sebelumnya yang dilakukan pada ekstrak etanol daun leilem (Utami *et al.*, 2018; Kairupan *et al.*, 2019). Hal ini menunjukkan bahwa umumnya ketiga senyawa tersebut dapat tersari dalam pelarut etanol dari daunnya, dengan demikian kemungkinan dapat pula tersari dalam pelarut metanol karena sifat dan kepolaran metanol dan etanol yang hampir sama.

Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Leilem dengan *n*-Heksana dan Etil Asetat

Pemilihan jenis pelarut yang sesuai merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Pelarut yang

digunakan adalah jenis pelarut yang dapat mengekstraksi sebagian besar senyawa yang diinginkan dalam simplisia tanpa melarutkan substansi lain. Metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar dan non-polar (Pane, 2013). Seperti halnya etanol, metanol juga lebih mudah menembus membran sel untuk menarik material dalam sel tanaman (Tiwari *et al.*, 2011). Oleh karena itu, fraksinasi perlu dilakukan dengan menggunakan pelarut non-polar (*n*-heksana) dan pelarut semi-polar (etil asetat) untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya.

Orientasi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi Ekstrak Daun Leilem

Orientasi ini dilakukan untuk mengetahui ekstrak mana yang mempunyai aktivitas yang tinggi dalam meredam radikal DPPH dengan cara melihat serapannya. Hasil orientasi aktivitas antioksidan dapat dilihat pada **Tabel 1**.

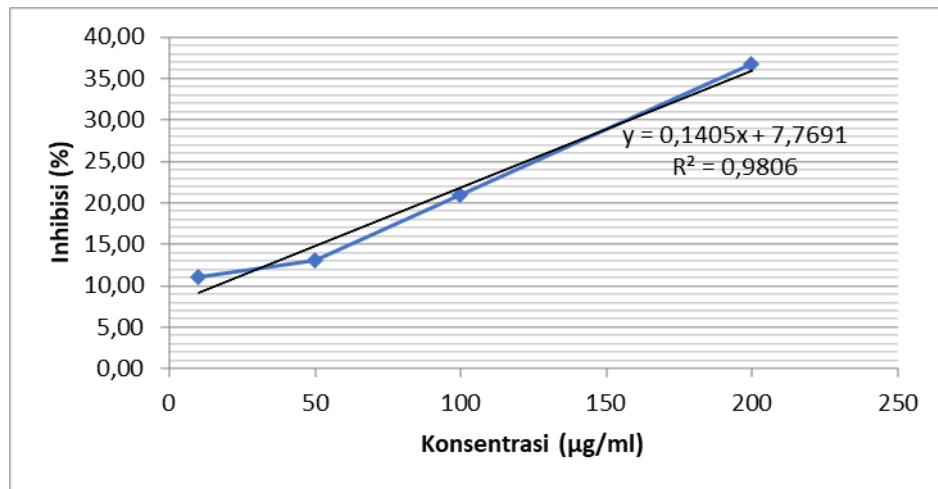
Tabel 1. Aktivitas antioksidan ekstrak metanol dan hasil fraksinasi ekstrak metanol

Ekstrak	Serapan
Metanol	1,3538
Fraksi <i>n</i> -heksana	1,3742
Fraksi etil asetat	0,3552
Fraksi air/metanol akhir	1,1618
Blanko	1,8563

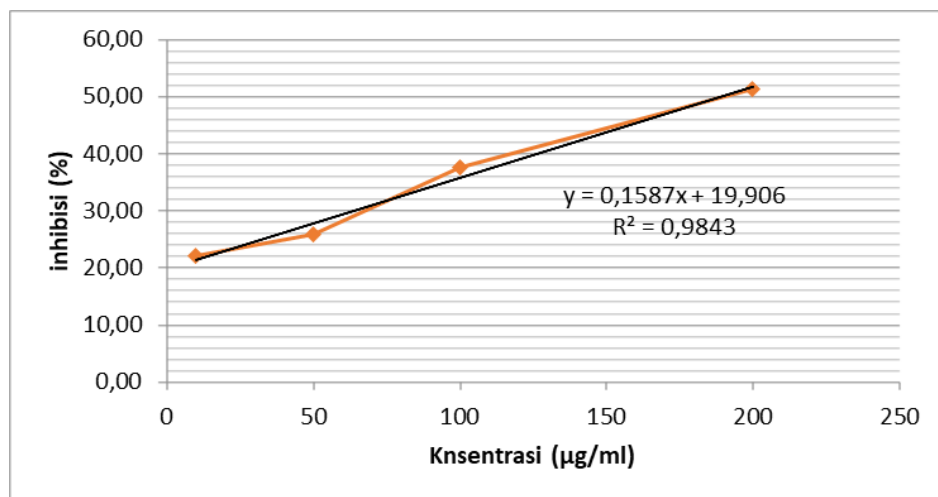
Hasil orientasi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling aktif dalam meredam radikal bebas DPPH karena memberikan serapan yang paling rendah yaitu 0,3552 dibandingkan dengan blanko dan fraksi lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa dalam fraksi etil asetat mengandung paling banyak senyawa yang dapat meredam radikal bebas DPPH yang menyebabkan konsentrasi DPPH menurun, sehingga memberikan serapan yang paling rendah. Pengujian selanjutnya dilakukan hanya pada fraksi etil asetat dan ekstrak metanol daun leilem.

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dan Fraksi Etil Asetat dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH

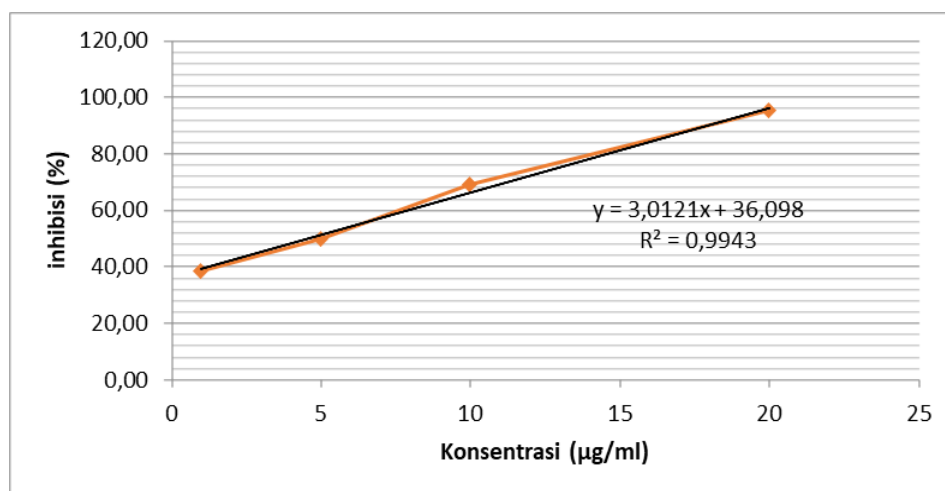
Hasil perhitungan % inhibisi dan IC₅₀ dari larutan ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan kontrol positif kuersetin disajikan pada **Tabel 2**. Grafik % inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak metanol dapat dilihat pada **Gambar 1**, fraksi etil asetat **Gambar 2**, dan kontrol positif kuersetin **Gambar 3**.



Gambar 1. Grafik % inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak metanol daun leilem



Gambar 2. Grafik % inhibisi terhadap konsentrasi fraksi etil asetat daun leilem



Gambar 3. Grafik % inhibisi terhadap konsentrasi kuersetin

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak daun leilem terhadap DPPH

Larutan uji	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) (x)	% Inhibisi (y)	Persamaan regresi linier	Nilai IC_{50}
Kuersetin (Kontrol positif)	1	38,62%	$Y = 3,012x + 36,09$ $R^2 = 0,9943$	4,61 $\mu\text{g/ml}$
	5	49,94%		
	10	68,98%		
	20	95,29%		
Ekstrak metanol daun Leilem	10	11,02%	$y = 0.1405x + 7.7691$ $R^2 = 0,9806$	300,57 $\mu\text{g/ml}$
	50	13,09%		
	100	20,87%		
	200	36,68%		
Fraksi Etil asetat daun Leilem	10	22,14%	$y = 0.1587x + 19.906$ $R^2 = 0,9843$	189,62 $\mu\text{g/ml}$
	50	25,80%		
	100	37,61%		
	200	51,21%		

Pada orientasi aktivitas antioksidan memperlihatkan serapan yang lebih rendah pada ekstrak metanol dan fraksi etil asetat dari daun leilem dibandingkan dengan blanko (**Tabel 1**). Aktivitas antioksidan ekstrak daun leilem disebabkan oleh kandungan polifenol dan flavonoid yang dapat dilihat dan diketahui dari penurunan nilai absorbansi radikal DPPH pada berbagai konsentrasi ekstrak dan peningkatan persentase inhibisi yang dihasilkan. Secara visual, aktivitas antioksidan juga dapat diamati dengan terjadinya perubahan warna ungu DPPH menjadi kuning setelah pendiaman 30 menit yang disebabkan reaksi dengan antioksidan, dimana antioksidan menyumbangkan satu elektronnya ke DPPH sehingga terjadi peredaman radikal DPPH (Marjoni *et al.*, 2018; Yuhernita & Juniarti, 2011). Kemampuan ekstrak dalam mereduksi 50% radikal bebas dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Semakin kecil nilai IC_{50} semakin tinggi kemampuan ekstrak untuk meredakan radikal bebas atau semakin tinggi aktivitasnya sebagai antioksidan. Hasil perhitungan nilai IC_{50} menggunakan persamaan regresi linier memberikan nilai 300,57 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan fraksi etil asetat adalah 189,62 $\mu\text{g/ml}$. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa fraksi etil asetat memberikan nilai IC_{50} yang lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak metanol hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat lebih kuat sebagai peredam radikal bebas dibanding dengan ekstrak metanol. Suatu bahan yang memiliki $\text{IC}_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ merupakan antioksidan sangat kuat, 50-100 $\mu\text{g/ml}$ merupakan antioksidan kuat, 101-150 $\mu\text{g/ml}$ merupakan antioksidan sedang, dan merupakan antioksidan lemah jika memiliki $\text{IC}_{50} > 150 \mu\text{g/ml}$ (Fidrianny *et al.*, 2014). Berdasarkan katagori tersebut maka fraksi etil asetat dan ekstrak metanol daun leilem dapat dinyatakan mempunyai aktivitas antioksidan yang lemah.

Penentuan Kandungan Flavonoid Total Fraksi Etil Asetat Daun Leilem

Senyawa flavonoid termasuk dalam kelompok antioksidan alami (Sayuti & Yenrina, 2015). Antioksidan alami seperti flavonoid dan senyawa fenolik lainnya dapat diperoleh dari tumbuhan. Hasil penapisan fitokimia daun leilem dari beberapa penelitian menunjukkan adanya kandungan flavonoid dalam daun

leilem, oleh karena itu perlu ditentukan kadarnya. Penentuan kadar flavonoid dilakukan dengan metode kolorimetri menggunakan pereaksi AlCl_3 , NaNO_2 , NaOH dan kuersetin sebagai standar, diukur pada λ 510 nm. Metode ini didasari pada reaksi ion Alumunium dengan flavonoid pada media alkali yang akan membentuk kelat berwarna merah (Zhu *et al.*, 2010). Perhitungan kadar dilakukan menggunakan persamaan linear dari kurva standar kuersetin. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai kuersetin equivalen dalam mg/g ekstrak. Hasil penentuan diperoleh kandungan flavonoid total dalam fraksi etil asetat 270,8 mg/g. Kandungan flavonoid ini berperan dalam aktivitas antioksidan dari ekstrak. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan berasal dari kemampuannya mentransfer sebuah elektron ke senyawa radikal bebas dan juga membentuk kompleks dengan logam (Yuhernita & Juniarti, 2011). Ion-ion logam seperti Cu dan Fe, dapat mengkatalisis reaksi yang akhirnya memproduksi radikal bebas (Sayuti & Yenrina, 2015).

Penentuan Kandungan Fenol Total Fraksi Etil Asetat Daun Leilem

Penentuan kadar fenol total dilakukan secara kolorimetri menggunakan peraksi Folin-Ciocalteu berdasarkan pada kekuatan reduksi gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik termasuk fenol sederhana dapat bereaksi dengan pereaksi tersebut. Adanya gugus hidroksi fenolik dalam senyawa fenol dapat mereduksi fosfomolibdat-fosfotungstat dan mengubahnya menjadi kompleks molibdenum biru. Makin kuat warna biru yang terbentuk menandakan makin besar kandungan fenol dalam bahan uji (Marjoni *et al.*, 2018). Pengukuran serapan dilakukan pada λ 765 nm dan sebagai standar digunakan asam galat. Asam galat (Asam 3,4,5-trihidroksibenzoat) merupakan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan kuat. Kandungan fenol total dinyatakan sebagai *galic acid* equivalen dalam mg/g ekstrak. Hasil penentuan diperoleh kandungan fenol total dalam fraksi etil asetat 164,38 mg/g. Kandungan fenol total dalam fraksi etil asetat terdiri dari senyawa fenolik yang mempunyai kemampuan untuk menyumbangkan hidrogen, maka aktivitas antioksidan senyawa fenolik dapat dihasilkan

pada reaksi netralisasi radikal bebas (Yuhernita & Juniarti, 2011).

Tabel 3. Hasil penentuan kandungan flavonoid dan fenol total fraksi etil asetat daun leilem

Penentuan	Konsentrasi (µg/ml)	Serapan	Kandungan (mg/g)
Flavonoid total	50	0,1139	270,8
Fenol total	50	0,6335	164,38

Pada **Tabel 3** terlihat kandungan flavonoid total lebih besar daripada fenol total dalam fraksi etil asetat

daun leilem. Hal ini disebabkan sifat semi-polar etil asetat mampu menyari flavonoid bebas dan turunannya yang bersifat semi-polar, sementara itu senyawa fenol tidak semua tersari dalam etil asetat, karena senyawa fenolik yang lebih polar masih tertinggal pada fraksi air/metanol.

Uji Toksisitas Ekstrak Metanol dan Fraksi Etil Asetat secara BSLT

Hasil uji BSLT ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun leilem dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil uji BSLT ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun leilem

Ekstrak	K (µg/ml)	Log K	JA	M	H	AM	AH	AT	Mortalitas (%)	LC ₅₀ (µg/ml)
Metanol	1000	3	30	18	12	36	12	48	75	190,58
	100	2	30	10	20	18	32	50	36	
	10	1	30	8	22	8	54	62	12,9	
Fraksi etil asetat	1000	3	30	22	8	39	8	47	82,9	147,36
	100	2	30	12	18	17	26	43	39,5	
	10	1	30	5	25	5	51	56	8,9	

Keterangan: K: Konsentrasi (µg/ml), Log K: Konsentrasi, JA: Jumlah larva *A. salina*, M: Mati, H: Hidup, AM: akumulasi mati, AH: akumulasi hidup

Uji toksisitas secara BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) ini dilakukan untuk mendukung hasil uji antioksidan pada ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun leilem. Uji ini merupakan metode yang paling sederhana sebagai langkah awal untuk menentukan sifat toksisitas dari suatu bahan. Senyawa bioaktif hampir selalu toksik pada dosis tinggi, oleh karena itu daya bunuh *in vivo* dari senyawa terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk menapis ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas. Salah satu organisme yang sesuai untuk hewan uji adalah *brine shrimp* (udang laut) (Juniarti et al, 2009). Pengujian ini menggunakan larva udang *Artemia salina* karena sangat sensitif terhadap senyawa toksik disebabkan oleh kulitnya yang sangat tipis dan selnya masih sederhana (Noviardi et al, 2019). Adanya korelasi positif antara metode BSLT dengan uji sitotoksik menggunakan kultur sel kanker, maka metode ini sering dimanfaatkan untuk penapisan senyawa antikanker (Santoni et al., 2015). Tingkat toksisitas dari pengujian ini dinyatakan dengan LC₅₀, yaitu konsentrasi senyawa yang dapat menyebabkan kematian 50% larva udang. Hasil pengujian BSLT pada ekstrak metanol memberikan nilai IC₅₀ 190,58 µg/ml dan 147,36 µg/ml untuk fraksi etil asetat. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai LC₅₀ < 1000 ppm untuk ekstrak dan < 30 ppm untuk suatu senyawa (Juniarti et al, 2009). Suatu hasil penelitian menunjukkan adanya korelasi positif antara uji toksisitas metode BSLT dengan uji sitotoksitas menggunakan kultur sel kanker, dimana

50% spesies yang aktif dalam BSLT juga aktif dalam uji sitotoksik sebagai antikanker (Carballo et al., 2002). Dengan demikian ekstrak metanol dan fraksi etil asetat daun leilem bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* dan berpotensi sebagai antikanker.

Hasil penelitian daun leilem (*Clerodendrum minahassae*) ini memperlihatkan bahwa serbuk daun leilem mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid dan tanin. Fraksinasi ekstrak metanol dengan *n*-heksana dan etil asetat telah memisahkan senyawa aktif antioksidan dan senyawa toksik ke dalam fraksi etil asetat seperti flavonoid, senyawa fenolik dan alkaloid. Kandungan flavonoid total dan fenolik total dalam fraksi etil asetat memberikan hasil yang cukup besar. Demikian pula dengan hasil pengujian aktivitas penangkapan radikal DPPH dan toksisitas terhadap larva *Artemia salina* fraksi etil asetat lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak metanol. Flavonoid, senyawa fenolik dan alkaloid diketahui memiliki aktivitas peredaman radikal bebas (Yuhernita & Juniarti, 2011). Flavonoid dan tanin pada kadar tertentu dapat berperan dalam menghambat pertumbuhan larva dalam proses kematian larva dan dapat berperan sebagai antikanker. Selain itu flavonoid bersifat antioksidan yang dapat menimbulkan proses apoptosis pada sel kanker serta menghambat aktivitas protein kinase pada sel tumor maupun kanker (Noviardi et al, 2019). Dengan demikian aktivitas antioksidan dan toksisitas dari ekstrak metanol dan fraksi

etil asetat daun leilem disebabkan oleh kandungan flavonoid, senyawa fenolik, alkaloid dan tanin.

KESIMPULAN

Ekstrak metanol dan fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun leilem (*Clerodendrum minahassae*) bersifat antioksidan lemah terhadap DPPH dengan nilai IC₅₀ sebesar 300,57 µg/ml dan 189,62 µg/ml. Ekstrak metanol dan fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun leilem (*Clerodendrum minahassae*) bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC₅₀ berturut turut 190,58 µg/ml dan 147,36 µg/ml. Kandungan fenol total dari fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun leilem (*Clerodendrum minahassae*) adalah 164,38 mg/g ekstrak, dan kandungan flavonoid total adalah 270,8 mg/g ekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, C., Djarkasi, G.S.S., Ludong, M.M., & Langi. (2013). Determining Total Phenol and Antioxidant Activity Extracts of Leaf Leilem (*Clerodendrum minahassae*). *Cocos*, 2(3), 1-5.
- Amila., Sembiring, E., Aryani, N. (2021). Deteksi Dini Dan Pencegahan Penyakit Degeneratif Pada Masyarakat Wilayah Mutiara Home Care. *Jurnal Kreativitas Pengabdian Kepada Masyarakat (Pkm)*, 4(1), 102-112.
- Carballo, J.L., Hernández-Inda, Z.L., Pérez, P., & García-Grávalos, M.D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2, 17.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). (1987). *Analisis Obat Tradisional*. Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta.
- Dontha, S. (2016). A Review On Antioxidant Methods. *Asian J Pharm Clin Res*, 9, Suppl. 2, 14-32.
- Fidrianny, I., Alvina, A., & Sukrasno. (2014). Antioxidant Capacities From Different Polarities Extracts of Three Kinds Ginger using DPPH, Frap Assays and Correlation with Phenolic, Flavonoid, Carotenoid Content. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(7), 521-525.
- Juniarti., Osmeli, D., & Yuhernita. (2009). Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) Dan Antioksidan (1,1-Diphenyl-2-Pikrilhidrazyl) Dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus Precatorius* L.). *Makara, Sains*, 13(1), 50-54.
- Kairupan, C.F., Mantiri, F.R., & Rumende, R.R.H. (2019). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Ethanol Extract of Leilem (*Clerodendrum minahassae* Teijsm. & Binn.) as an Antihyperlipidemic and Antiatherosclerotic Agent. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 217 (2019) 012016, 1-7. doi:10.1088/1755-1315/217/1/012016
- Marjoni, M.R., Nofita, D., Rahmi, N., Saifullah, & Najla, N.A. (2018). Phenolics compounds, flavonoids, and antioxidant activity methanol extract of arum manis leaves (*Mangifera indica* L. var. Arumanis). *International Journal of Green Pharmacy*, 12(3), S651-S656.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, J.B., Nicholsand, D.E., & Mc Laughlin, J.L. (1982). Brine shrimp; a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34
- Noviardi, H., Yuningtyas, S., Tri, D.A., & Ben, A. (2019). Toksisitas kombinasi ekstrak etanol 70% daun petai china (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) dan kulit jengkol (*Archidendron jiringa* (Jack) I.C.Nielsen) dengan metode Brine Shrimp Lethality Test. *Riset Informasi Kesehatan*, 8(1), 9-15. DOI: 10.30644/rik.v7i1.216
- Pane, E.R. (2013). Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Metanol Kulit Pisang Raja (*Musa paradisiaca* Sapientum). *Valensi*, 3(2), 76-81
- Rahmi, H. (2017). Review: Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Sumber Buah-buahan di Indonesia. *Jurnal Agrotek Indonesia*. 2(1), 34-38.
- Santoni, A., Sabariah., & Efdi, M. (2015). Isolasi dan elusidasi struktur senyawa triterpenoid dari kulit batang mangga ambacang. *Jurnal Riset Kimia*, 9(1), 1-8.
- Sayuti, K. & Yenrina, R. (2015). *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Padang. Andalas University Press.
- Shrivastava, N. & Patel, T. (2007). *Clerodendrum* and Heathcare: An Overview. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 142-150.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods of Enzymology*, 299,152-78.
- Situmorang, H.R.R., Waworuntu, O., & Mintjelungan, C. (2016). Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Daun Leilem (*Clerodendrum Minahassae* L.) terhadap Bakteri *Streptococcus Mutan*. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT*, 5(4), 69-76.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 95-106.
- Utami, Y.P., Irmawati, D., & Rasyid, A. (2018). Isolasi Dan Karakterisasi Ekstrak Etanol Daun Leilem (*Clerodendrum Minahassae* Teijsm Dan Binn.) Dengan Metode Spektrofotometri. *Pharmacy Medical Journal*, 1(2), 82-92.
- Yen, G-C. & Chen, H-Y. (1995). Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32.
- Yuhernita & Juniarti. (2011). Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Metanol Daun

Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara, Sains*, 15(1), 48-52.

- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., & Xia, Y. 2010. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Anal. Methods*, 3, 90-97.
- Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D. (2004). Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. In Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5032-5039.