

# VARIATIONS OF EXTRACTION METHODS, PHYTOCHEMICAL SCREENING, AND TOXICITY TEST OF METHANOL *Eucheuma cottonii* EXTRACT (VARIASI METODE EKSTRAKSI, SKRINING FITOKIMIA DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK METANOL *Eucheuma cottonii*)

Riong Seulina Panjaitan<sup>1</sup>, and Maria Fortunata Meze

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta Utara, Indonesia

\*Correspondence: [\\_riongpanjaitan@yahoo.co.id](mailto:_riongpanjaitan@yahoo.co.id);

Received: November 15<sup>th</sup> 2023; Accepted: December 15<sup>th</sup> 2023; Published: December 30<sup>th</sup> 2023

**Abstract:** *Eucheuma cottonii* is a type of red makroalgae that changed its name to *Kappaphycus alvarezii* because the resulting carrageenan includes the kappa-carrageenan fraction. In this study, the extraction method used was conventional, namely maceration, and a modern extraction method, namely *ultrasound-assisted extraction* (UAE). The active compounds contained in the methanol extract of *Eucheuma cottonii* in the maceration extraction method are steroids. Whereas the *ultrasound-assisted extraction* method is: flavonoids, saponins, steroids, and triterpenoids. In this study, phytochemical screening was also carried out with color testing using a color reagent after which a toxicity test was carried out using the *Brine Shrimp Lethality Test method* (BSLT). The yield of the amendment value resulting from the maceration extraction method has the highest value on the third day, which is 20.0% while the highest amendment value of the extraction method UAE is at the time of 30 minutes with the yield value is 32.1%. The results of the calculation of the LC value of 50 methanol extracts from the macromakroalga *Eucheuma cottonii* which are very toxic to the larvae of *Artemia salina* Leach, namely 82,036 µg / mL from *ultrasound method assisted extraction* and is toxic to *Artemia salina* Leach larvae which are 253,294 µg / mL with maceration method using IBM SPSS application statistic 26, so it can be concluded that *eucheuma cottonii* methanol extract is highly toxic and toxic to the larvae of *Artemia salina* Leach and has the potential to be anticytotoxic.

**Keywords:** *Eucheuma cottonii*; phytochemical screening; BSLT

**Abstrak:** *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu jenis makroalga merah yang berubah nama menjadi *Kappaphycus alvarezii* karena karaginan yang dihasilkan termasuk fraksi kappa-karaginan. Pada penelitian ini metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi konvensional yakni maserasi dan metode ekstraksi modern yaitu *ultrasound assisted extraction* (UAE). Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* pada metode

ekstraksi maserasi adalah: steroid. Sedangkan pada metode ekstraksi *ultrasound assisted extraction* adalah: flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid. Pada penelitian ini juga dilakukan skrining fitokimia dengan pengujian warna yang menggunakan suatu pereaksi warna setelah itu dilakukan uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil nilai rendemen yang dihasilkan dari metode ekstraksi maserasi memiliki nilai tertinggi pada hari ketiga yakni 20,0 % sedangkan nilai rendemen tertinggi dari metode ekstraksi UAE yakni pada waktu ke 30 menit dengan nilai rendemennya adalah 32,1 %. Hasil perhitungan nilai LC50 ekstrak metanol dari makromakroalga *Eucheuma cottonii* yang bersifat sangat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach yaitu 82,036 µg/mL dari metode *ultrasound assisted extraction* dan bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach yaitu sebesar 253,294 µg/mL dengan metode maserasi menggunakan aplikasi SPSS IBM statistic 26, sehingga dapat disimpulkan ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* bersifat sangat toksik dan toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dan berpotensi sebagai antisitotoksik.

**Kata kunci:** *Eucheuma cottonii*; skrining fitokimia; BSLT

---

## 1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara di dunia yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar di lautan. Menurut Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia pada tahun 2020, Indonesia biasa dijuluki *marine mega-biodiversity*. Tingginya keanekaragaman hayati di Indonesia, terlihat dari berbagai macam ekosistem, seperti ekosistem laut. Salah satu contoh biota laut yang bernilai ekonomis di Indonesia adalah makromakroalga spesies *Eucheuma cottonii* yang paling banyak dibudidayakan di perairan Indonesia. *Eucheuma cottonii* merupakan jenis makromakroalga yang dimanfaatkan untuk kesehatan karena mengandung senyawa kimia yang mempunyai aktivitas biologis (zat bioaktif). Jenis makromakroalga ini banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku makanan dan bahan baku industri seperti industri kosmetik, dan farmasi (Anton, 2017).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini, adalah maserasi dan metode ekstraksi modern yaitu *ultrasound assisted extraction*. Adapun metode ekstraksi maserasi adalah sebuah metode ekstraksi padat-cair dimana bahan bioaktif dalam tanaman diekstraksi dengan merendam bahan tanaman dalam pelarut tertentu selama periode waktu tertentu (Njila, et al., 2017). Sedangkan, metode *ultrasound assisted extraction* (UAE) yang merupakan ekstraksi dengan memberikan gelombang ultrasonik pada bahan yang akan dilakukan ekstraksi (Chemat, et al., 2011). Setelah dilakukan metode ekstraksi dilanjutkan dengan uji skrining fitokimia dan uji toksisitas terhadap Larva *Artemia salina* Leach. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan pengujian warna yang menggunakan suatu pereaksi warna (Widyanti et al., 2009). Hal yang berperan penting dalam skrining fitokimia adalah pemilihan pelarut dan metode ekstraksi (Kristianti, et al., 2008).

Uji toksisitas dengan menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) ini dapat ditentukan dari jumlah kematian *Artemia salina* Leach akibat pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam. Hasil uji dinyatakan sebagai *Lethal Concentration 50*. Nilai *Lethal Concentration 50* (LC50) adalah konsentrasi senyawa atau ekstrak yang dapat mematikan larva udang *Artemia salina* Leach hingga 50% dibandingkan terhadap kontrol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan variasi metode ekstraksi terhadap % rendemen, kandungan fitokimia dan toksisitas dari ekstrak metanol *Eucheuma cottonii*.

## 2. Hasil

## 2.1 Nilai % Rendemen

Rendemen merupakan perbandingan antara hasil banyaknya metabolit yang didapatkan setelah proses ekstraksi dengan berat sampel yang digunakan. Menghitung nilai rendemen yang diperoleh dengan persentase bobot (b/b) antara ekstrak yang di hasilkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan (Madjid et al., 2020). Nilai rendemen yang dihasilkan dari kedua metode ekstraksi ditampilkan pada Tabel 1.

**Tabel 1:** Perbandingan Nilai Rendemen pada Metode UAE dan Metode Maserasi

Jenis Ekstraksi	Waktu (jam)	Ekstrak(g)	Rendemen(%)
<b>UAE</b>	0,16	3,5 g	11,6 %
	0,3	5,03 g	16,7 %
	0,5	9,65 g	32,1 %
<b>Maserasi</b>	24	3,46 g	11,5 %
	48	4,19 g	13,9 %
	72	6,01 g	20,0 %

## 2.2 Perbandingan Kandungan Fitokimia dari Metode Maserasi dan UAE

Berikut merupakan perbandingan senyawa metabolit sekunder yang teridentifikasi menggunakan metode UAE dan metode maserasi.

**Tabel 2.** Golongan Senyawa yang Teridentifikasi

Golongan Senyawa	Metode UAE	Metode Maserasi
Flavonoid	+	-
Alkaloid	-	-
Tanin	-	-
Saponin	+	-
Quinon	-	-
Steroid	+	+
Triterpenoid	+	-

Keterangan:

(+) = Positif terhadap golongan yang diuji

(-) = Negatif terhadap golongan yang diuji

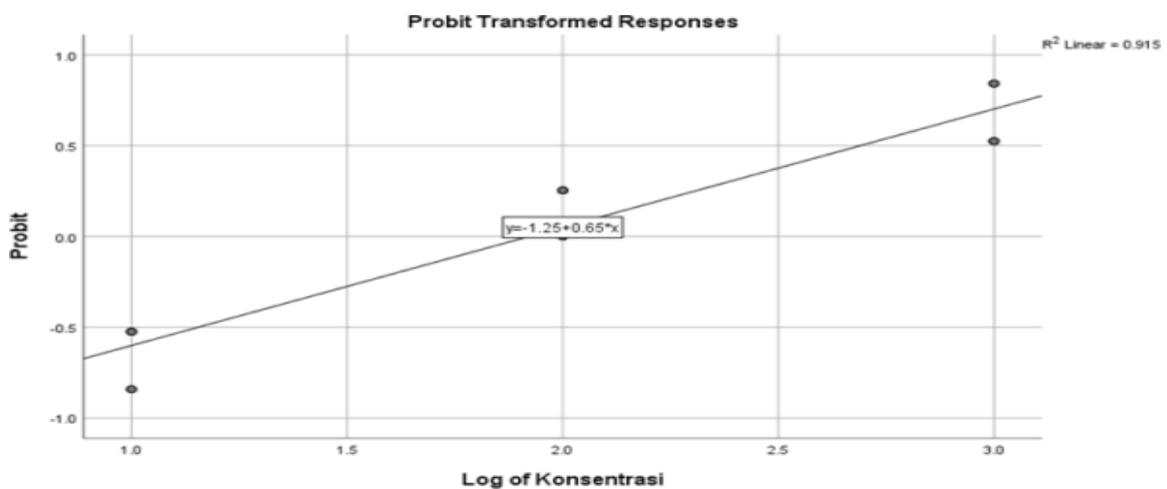
### 2.3 Perbandingan Nilai Toksisitas dari Metode Maserasi dan UAE

**Tabel 3.** Mortalitas Larva *Artemia salina* Leach terhadap ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* dengan metode maserasi.

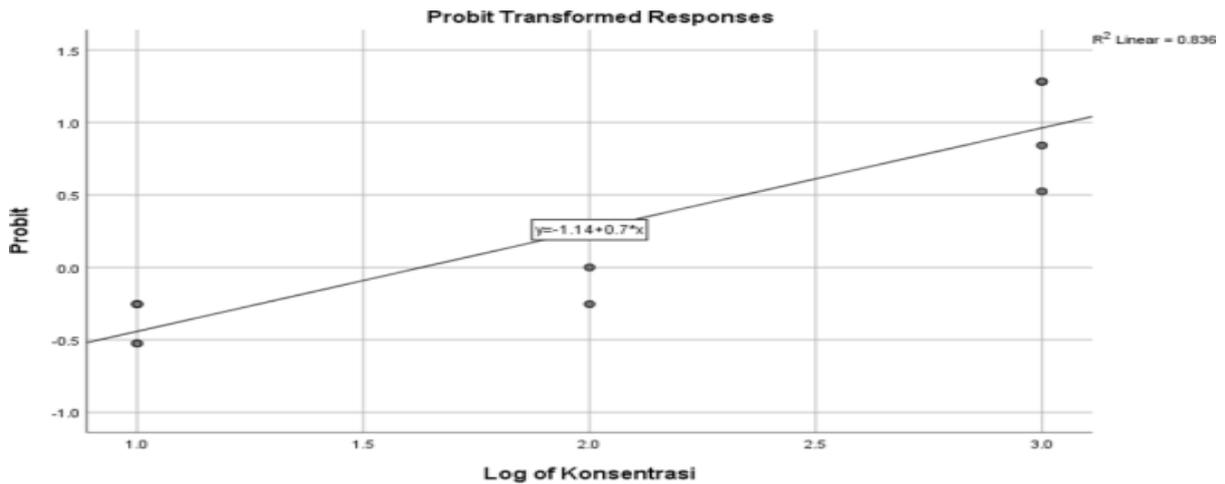
Pengulangan ke	Kematian Larva			
	1000 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	Control
1	6	5	2	0
2	6	7	3	0
3	8	6	4	0
4	7	4	2	0
5	8	6	4	0

**Tabel 4.** Mortalitas Larva *Artemia salina* Leach terhadap ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* dengan metode UAE

Pengulangan ke	Kematian Larva			
	1000 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	Control
1	9	6	4	0
2	8	5	4	0
3	9	6	3	0
4	9	4	4	0
5	9	6	4	0



**Gambar 1.** Probit Kematian dari Setiap Log Konsentrasi Ekstrak Metanol *Eucheuma cottonii* Metode *Ultrasound assisted extraction*



**Gambar 2.** Probit Kematian dari Setiap Log Konsentrasi Ekstrak Metanol *Eucheuma cottonii* Metode Maserasi

### 3. Pembahasan

#### 3.1 Perbandingan % Rendemen dan Kandungan Fitokimia dari Metode Maserasi dan UAE

Berdasarkan Tabel 1 dapat disimpulkan bahwa dengan variasi waktu yang tertera menunjukkan nilai rendemen yang diperoleh dari metode UAE dan Maserasi dikategorikan baik karena hasil > 10%. Efisien waktu dapat mempengaruhi berat ekstrak dan nilai rendemen yang dihasilkan. Nilai rendemen tertinggi pada metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* dalam waktu 30 menit yaitu 32,1 % dapat digunakan untuk uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach. Singkatnya waktu ekstraksi mengakibatkan pelarutan senyawa tidak optimum sehingga bahan belum terekstraksi secara efisien dan sebaliknya, semakin lama waktu ekstraksi maka akan menaikkan jumlah analit yang terekstrak karena kontak antara pelarut dengan zat terlarut akan semakin lama sehingga proses pelarutan senyawa fenolik akan terus berlangsung dan berhenti sampai pelarut jenuh (Yessica et al., 2019).

Pada penelitian (Fasya et al., 2018) rendemen ekstraksi makroalga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol diperoleh sebesar 15,59%. Hasil maserasi *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut metanol didapatkan rendemen sebesar 16,97% (Afif, et al., 2015). Dalam penelitian Andriani, et al (2015) melaporkan bahwa maserasi makroalga merah *Eucheuma cottonii* dari pantai Tanjung Sumenep, Madura menggunakan metanol mempunyai rendemen sebesar 20,7%. Menurut Mardaneni (2017) dalam penelitiannya bahwa hasil ekstrak metanol makroalga merah *Eucheuma cottonii* mempunyai rendemen sebesar 13,93%.

Metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) juga mempersingkat waktu proses dan mengoptimalkan penggunaan pelarut. Metode ini merupakan metode non-termal atau metode yang tidak menggunakan panas dalam proses ekstraksinya, prinsip kerjanya adalah dengan meningkatkan laju transfer massa serta memecahkan dinding sel dengan banyaknya microcavity (Dinardo, Subramanian & Singh, 2020; Liu et al, 2019). Penggunaan metode *ultrasonic* yang bersifat *non-destructive* dan *non-invasive* dapat menjaga kualitas produk yang dihasilkan (Mohammadpour et al, 2019). Kelebihan metode UAE dibandingkan metode lain seperti metode maserasi, adalah dapat mengeluarkan ekstrak dari matriks tanpa merusak struktur ekstrak (Dzah et al, 2020). Metode ini juga digunakan pada temperatur rendah sehingga dapat mencegah hilangnya atau menguapnya senyawa yang memiliki titik didih yang rendah. Penerapan metode UAE untuk makroalga laut (*marine makroalgae*) merupakan strategi yang efisien dan berkelanjutan karena dapat melakukan karakterisasi yang cukup mendalam (Carreira-Casais et al, 2021).

Sedangkan metode maserasi memiliki kekurangan yaitu membutuhkan waktu yang relatif lama dan membutuhkan jumlah pelarut yang banyak. Proses penyarian pada metode maserasi tidak sempurna karena zat aktifnya hanya mampu terekstraksi sebesar 50% saja.

Hal ini didukung oleh penelitian Srijanto (2010) menyatakan bahwa semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan, waktu kontak antara sampel dan pelarut semakin lama sehingga jumlah senyawa yang terekstraksi semakin banyak. Kelarutan zat aktif yang diekstrak akan bertambah besar dengan bertambah tingginya suhu. Akan tetapi, suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada bahan yang sedang diproses (Margaretta et al., 2011). Adanya golongan senyawa steroid dalam ekstrak kasar *Eucheuma cottonii* ditandai dengan warna hijau. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Badroes (2017), Mardaneni (2017), Ningsih, dkk., (2015) dan Kholidiyah, dkk., (2013) bahwa pada ekstrak makroalga merah *Eucheuma cottonii* menunjukkan adanya senyawa steroid.

Pada penelitian Sharo, et al (2013) menemukan senyawa steroid dalam ekstrak makroalga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan eluen n- heksana. Andriani, et al (2015) melaporkan adanya senyawa steroid pada ekstrak metanol makroalga merah *Eucheuma cottonii* dari pantai Tanjung, Madura. Penelitian Afif, et al (2015) menyatakan bahwa mendapatkan senyawa steroid dengan ekstraksi *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut metanol yang dipartisi dengan pelarut 1-butanol. Baderos (2017) melaporkan adanya senyawa steroid hasil ekstraksi metanol yang dihidrolisi menggunakan petroleum eter. Dalam penelitian Mardaneni (2017) menemukan senyawa steroid hasil ekstraksi *Eucheuma cottonii* menggunakan metanol yang dipartisi dengan etil asetat. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung *Eucheuma cottonii* adalah steroid (Fasya et al., 2018) Senyawa steroid tersebut memiliki toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach (Fasya et al., 2019).

Ekstrak *Eucheuma cottonii* yang menggunakan metode UAE mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, steroid, saponin, dan triterpenoid sedangkan ketika menggunakan metode maserasi yaitu steroid, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung adalah flavonoid, steroid, saponin, dan triterpenoid. Penelitian yang dilakukan oleh Purbosari et al menjelaskan bahwa kandungan *Eucheuma cottonii* adalah fenol  $4.60 \pm 0.06$  mg/GAE g, LC50 sebanyak  $221.71 \pm 5.74$  µg/mL, flavonoid sebanyak 24,48% dan saponin 0,22%. Penelitian Nurjanah et al menunjukkan bahwa komponen bioaktif pada *Eucheuma cottonii* adalah flavonoid, fenol hidrokuinon, dan triterpenoid. Berdasarkan perbandingan tersebut maka dapat disimpulkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang dikandung pada ekstrak *Eucheuma cottonii*.

### 3.2 Toksisitas Ekstrak Metanol *Eucheuma cottonii*

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu metode yang dapat dipercaya dan murah yang memiliki kemampuan untuk menentukan toksisitas dari suatu bahan ekstrak yang diperoleh dari tanaman dengan rentan waktu 24 jam setelah pemberian dosis. Dimana hasil yang di dapat dari metode BSLT memiliki tingkat kepercayaan 95% (Siemuri et al., 2012) dengan menggunakan *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji coba.

Apabila suatu ekstrak dari tanaman mempunyai sifat toksik berdasarkan harga LC50 dengan menggunakan metode BSLT, dengan demikian tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat antikanker. Hal ini disebabkan karena terdapat hubungan antara sitotoksik dan BSLT pada ekstrak tanaman yang diteliti (Carballo et al., 2002).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan saat ini menunjukkan jika ekstrak *Eucheuma cottonii* menggunakan metode *maserasi dan Ultrasound Assisted Extraction* mempunyai kemampuan membunuh

larva udang *Artemia salina* Leach dengan konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 1000, 100, dan 10 µg/mL. Dimana Larva udang *Artemia Salina* Leach yang digunakan dalam masing- masing vial yang berbeda konsentrasi sebanyak 10 ekor larva udang *Artemia Salina* Leach kemudian setiap konsentrasi yang ada dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali selanjutnya diamati selama 24 jam. Pada larutan kontrol yang digunakan tidak diberi ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* karena akan di jadikan pembanding dengan larutan yang telah diberi ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* untuk membuktikan bahwa larva udang *Artemia salina* Leach yang mati di dalam vial bukan karena kelaparan, melainkan karena ada senyawa aktif yang berasal dari ekstrak tersebut.

Dari data yang diperoleh berdasarkan pengamatan selama 24 jam menunjukkan respon kematian tertinggi terjadi pada konsentrasi 1000 µg/mL. Berdasarkan pada Tabel 3 dan Tabel 4 dapat dilihat bahwa setiap konsentrasi yang berbeda dapat menunjukkan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva udang *Artemia salina* Leach, yang mempengaruhi kematian dari larva udang *Artemia salina* yaitu kandungan senyawa bioaktif yang terdapat dalam sampel yang diujikan. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi jumlah kematian larva (Millati, 2016). Berdasarkan hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Ningdyah *et al.*, (2015), dimana tingkat konsentrasi yang tinggi akan meningkatkan tingkat mortalitas larva *artemia salina* Leach, maka terdapat korelasi antara tingkat konsentrasi dengan tingkat mortalitas larva *Artemia salina* Leach.

Larva *A. salina* yang digunakan dalam pengujian toksisitas adalah larva yang berumur 48 jam. Hal tersebut dikarenakan pada larva yang berumur 48 jam telah terbentuk sempurna mulut dan saluran cernanya, serta memiliki peningkatan ketahanan tubuh (Nuralifah, Jabbar, Parawansah, & Iko, 2018). Senyawa atau ekstrak bekerja dengan bertindak sebagai racun perut (*stomach poisoning*), sehingga saat senyawa tersebut masuk ke tubuh larva, maka alat pencernaannya akan terganggu. Senyawa atau ekstrak juga menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva, yang mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa, sehingga larva tidak mampu mengenali makanannya dan larva akhirnya mati kelaparan (Panjaitan *et al.*, 2021)

Pada penelitian ini digunakan analisis probit agar didapatkan kurva berbentuk garis lurus sehingga penentuan nilai LC50 lebih tepat. Dalam analisis probit didapatkan kurva berbentuk garis lurus karena konsentrasi sampel ditransformasikan menjadi logaritma konsentrasi sebagai variabel tetap (nilai x) dan persentase kematian larva ditransformasikan menjadi nilai probit sebagai variabel tergantung (nilai y) untuk mengetahui toksisitas ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* dengan memiliki dengan tingkat kepercayaan 95%. Dari pernyataan Ningdyah dkk (2015), yaitu tingkat konsentrasi tinggi akan meningkatkan tingkat mortalitas larva *artemia salina* leach, maka terdapat korelasi antara tingkat konsentrasi dengan tingkat mortalitas larva *Artemia salina* Leach.

Penentuan tingkat kematian pada uji sitotoksitas yaitu dengan menghitung nilai LC50. Nilai LC50 merupakan besarnya konsentrasi suatu senyawa yang terkandung didalam ekstrak yang dapat menimbulkan penghambatan atau hingga kematian pada kehidupan. Menurut Hanny (2016), jika nilai LC50 lebih rendah dari 1000 ppm maka senyawa yang terkandung dapat dinyatakan sebagai senyawa bioaktif, dan sebaliknya apabila nilai LC50 yang didapatkan lebih dari 1000 ppm maka senyawa yang terkandung didalam ekstrak adalah senyawa bukan bioaktif.

Berdasarkan perhitungan analisa probit yang pertama metode *ultrasound assisted extraction* seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1 setelah dianalisa menggunakan IBM SPSS Statistik 26 hasilnya menunjukkan nilai LC50 < 1000. Hasil yang menunjukkan nilai LC50 yaitu sebesar 82,036 µg/mL, dengan persamaan  $y = 1,25 + 0,65x$  dan koefisien korelasinya pada grafik diperoleh sebesar R2 sebesar 0.915

(91,5%). Selanjutnya seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2 untuk mengetahui toksisitas berasal dari metode maserasi yang menunjukkan nilai LC50 sebesar 253.294 µg/mL, dengan persamaan  $y = 1.14 + 0,71x$  dengan koefisien korelasinya berdasarkan grafik sebesar 0,836 (83,6%). Kandungan senyawa dalam ekstrak metanol yang berpotensi dalam uji toksisitas ini dapat diketahui berdasarkan hasil uji fitokimia. Cara kerja senyawa metabolit sekunder saponin adalah dengan cara mengikat oksigen dalam air, hal ini disebabkan saponin mengandung glikosida dalam tanaman yang sifatnya menyerupai sabun dan larut dalam air dan dapat mengikat oksigen yang terlarut dalam air sehingga kadar oksigen di dalam air menurun dan dapat mematikan larva *Artemia salina* Leach karena kekurangan oksigen. Senyawa metabolit sekunder flavonoid dapat menurunkan aktivitas enzim pencernaan dan penyerapan makanan dan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut sehingga larva *Artemia salina* Leach menjadi kelaparan dan mati (Yunita EA. 2009). Pada manusia, senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik pada kadar tertentu, dapat mengakibatkan gangguan pada sistem metabolisme tubuh dimana senyawa aktif tersebut dapat menjadi inhibitor pada enzim sehingga mengganggu proses replikasi DNA.

#### 4. Alat, Bahan dan Metode

##### Alat

Peralatan yang digunakan adalah *hand gloves*, masker, neraca analitik, Laminar Air Flow (Innotech), rotary evaporator (Eyela), penangas air (Memmert), Erlenmeyer (Duran) 500 mL, beaker glass (Iwaki) 500 mL, gelas ukur (Pyrex) 10 mL, botol vial 10 mL, corong gelas, cawan porselen, spatel, sudip, kertas perkamen, batang pengaduk kaca, kertas saring, blender (Philips), botol kaca cokelat, stopwatch, kaca pembesar, lampu 25 watt, pipet tetes, aquarium, aerator dan alat sonikator (Branson 1510).

##### Bahan

Bahan yang digunakan adalah makromakroalga merah *Eucheuma cottonii*, pelarut metanol (p.a) (Merck), Aquadest (Merck), telur *Artemia salina* Leach, ragi dan garam tanpa yodium.

#### Metode Kerja

##### 4.1 Preparasi Sampel

Makromakroalga *Eucheuma cottonii* segar dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringanginkan dalam suhu kamar selama 7 hari. Setelah kering makromakroalga merah dihaluskan dengan cara diblender, kemudian diayak dengan ayakan 40 mesh hingga memperoleh bubuk.

##### 4.2 Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Sebanyak 30 gram bubuk *Eucheuma cottonii* dilarutkan dengan metanol 300 mL didiamkan dalam suhu kamar dengan variasi waktu 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Filtrat disaring dengan masing-masing variasi waktu kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator hingga mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung nilai rendemennya.

##### 4.3 Ekstraksi dengan Metode UAE

Sebanyak 30 gram bubuk *Eucheuma cottonii* dilarutkan dengan pelarut metanol 300 mL dengan variasi waktu 10 menit, 20 menit, dan 30 menit dengan menggunakan gelombang ultrasonic 42 kHz  $\pm 0,6$  % pada suhu 40°C. Filtrat disaring dengan masing-masing variasi waktu kemudian dipekatkan

dengan *rotary evaporator* hingga mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung nilai rendemennya.

#### 4.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia untuk mengidentifikasi jenis senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan reagen. Tabel 5 menunjukkan prosedur uji fitokimia pada masing-masing senyawa metabolit sekunder.

**Tabel 5.** Uji Fitokimia dan Reagen yang digunakan

Jenis Metabolit Sekunder	Uji Fitokimia
Tannin	Ekstrak metanol <i>Eucheuma cottonii</i> sebanyak 1 mL dan dipanaskan selama beberapa menit. Kemudian ditambahkan FeCl <sub>3</sub> 1% beberapa tetes. Terbentuknya warna coklat kehijauan atau ungu kehitaman menunjukkan adanya tanin.
Alkaloid	Ekstrak metanol <i>Eucheuma cottonii</i> ditimbang 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL HCl 1 %, setelah itu disaring filtrat dan dibagi menjadi dua. Kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Filtrat 1 dengan ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, sedangkan filtrate 2 dengan ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Meyer (Mufadal, 2015).
Steroid	Ekstrak metanol <i>Eucheuma cottonii</i> dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform.. Kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan ditambahkan 1 – 2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung. Jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya golongan senyawasteroid (Mardaneni 2017).
Flavonoid	Ekstrak metanol <i>Eucheuma cottonii</i> dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Kemudian ditambah logam Mg dan 0,5 mL HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk, menunjukkan adanya flavonoid.
Triterpenoid	Uji fitokimia senyawa triterpenoid dilakukan dengan dimasukkan ekstrak metanol <i>Eucheuma cottonii</i> sebanyak 2 mL kedalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambahkan dengan 1-2 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid (Anam, 2015).
Quinon	Ekstrak metanol <i>Eucheuma cottonii</i> seberat 0,5 g dimasukkan ke dalam 10 mL air panas, kemudian dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit dan dilakukan penyaringan. Selanjutnya ditambahkan NaOH sebanyak 3 tetes. Jika dihasilkan endapan berwarna merah, maka kuinon positif (Solihah et al., 2012).
Saponin	Metode foam: sebanyak 100 mg sampel dilarutkan ke dalam 50 mL pelarutnya, kemudian diambil 2 mL dan dikocok dengan 2 mL air. Jika busa bertahan 10 menit, menunjukkan hasil positif saponin (Tiwari et al., 2011).

#### 4.5 Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Persiapan uji toksisitas dilakukan dari penetasan telur *Artemia salina* Leach lalu dilanjutkan dengan uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test*. Data kematian larva *Artemia salina* Leach kemudian diolah menggunakan analisis probit dengan bantuan perangkat lunak SPSS IBM Statistic Versi 26.

Pada penelitian ini, menggunakan sampel ekstrak metanol maserasi dan *ultrasound assisted extraction Eucheuma cottonii* dengan pembagian masing-masing konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 10, 100, dan 1000 µg/mL. Dalam proses penelitian ini, penetasan telur menjadi larva udang menggunakan lampu 25 watt supaya larva dapat bergerak ke tempat yang terang karena larva bersifat fototaksis.

Selanjutnya ditimbang ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* lalu dilarutkan dengan air laut buatan berdasarkan konsentrasi yang bervariasi. Kemudian sampel dipipet sebanyak 5 mL dengan menggunakan pipet volume, setelah dipipet dimasukkan ke dalam vial. Berikutnya, masukan larva sebanyak sepuluh ekor yang telah berusia dua hari atau kurang lebih 48 jam ke dalam masing-masing vial dan diberikan satu tetes ragi sebagai makanan bagi larva udang *Artemia salina* Leach lalu diinkubasi selama 24 jam (Putra *et al.*, 2019). Pada penelitian ini menggunakan larva yang berumur 48 jam, dikarenakan memiliki saluran pencernaan yang sudah terbentuk sempurna sehingga peka terhadap suatu zat yang dimasukkan (Panjaitan, 2011).

#### 5. Kesimpulan

Berdasarkan data hasil yang diperoleh dari penelitian ini didapatkan kesimpulan yaitu :

1. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak methanol maserasi *Eucheuma cottonii* adalah: Steroid. Sedangkan pada metode ekstraksi *ultrasound assisted extraction* adalah: Flavonoid, Saponin, Steroid, Triterpenoid
2. Nilai rendemen yang dihasilkan dari metode ekstraksi maserasi memiliki nilai tertinggi pada hari ketiga yakni 20,0 % sedangkan nilai rendemen tertinggi dari metode ekstraksi UAE yakni pada waktu ke 30 menit dengan nilai rendemennya adalah 32,1%.
3. Hasil nilai LC50 ekstrak metanol dari makromakroalga *Eucheuma cottonii* yang bersifat sangat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach yaitu 82,036 µg/mL dari metode *ultrasound assisted extraction* dan bersifat toksik sebesar 253.294 µg/mL dengan metode maserasi.

#### Daftar Pustaka

1. Fasya, A. G.; Tyas, A. P.; Mubarokah, F. A.; Ningsih, R.; Madjid, A. D. R. Variasi Diameter Kolom dan Rasio Sampel-Silika pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Alchemy*, 6(2), 57. (2018). <https://doi.org/10.18860/a.v6i2.7015>
2. Wardhani, D. H.; Sari, D. K.; & Prasetyaningrum, A. Ultrasonic-Assisted Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds From *Eucheuma cottonii*. *Reaktor*, 14(4). (2014). <https://doi.org/10.14710/reaktor.14.4.291-297>
3. Anam, K.; 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid Dari Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Dan Analisisnya Menggunakan Spektrofotometer UV-VIS dan FTIR. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang; Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Mardaneni, I. 2017. Pemisahan Dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo-Banyuwangi Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis LC/MS. *Skripsi*. Malang; Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

5. Octavia, D.R. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol Daun Binahong (*Anredera Corfolia (Tenore) Steen*) dengan metode DPPH(2,2-difenil-1- pikrihidrasil). Skripsi Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhamadiyah
6. Harli, S.A. 2016. Uji Toksisitas Fraksi Ekstrak Etanol Daun Pedang-Pedang (*Sansevieria trifasciata Prain*) terhadap Larva Udang (*Artemia salina Leach*) dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)[skripsi]. Makassar (ID): UIN Alauddin Makassar.
7. Fasya, A. G.; Baderos, A.; Madjid, A. D. R.; Amalia, S.; & Megawati, D.S.; Variasi Diameter Kolom dan Rasio Sampel-Silika pada Isolasi Steroiddan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Alchemy*, 6(2), 57. (2019) "Isolation, Identification, and Bioactivity of Steroids Compounds from Red Algae *Eucheuma cottonii* Petroleum Ether Fraction," in AIP Conference Proceedings, vol. 2120, no.1.
8. Dzah, C. S.; Duan, Y.; Zhang, H.; Wen, C.; Zhang, J.; Chen, G.; Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547.
9. Nuralifah.; Jabbar, A.; Parawansah.; Iko, R. A. Uji toksisitas akut ekstrak etanol daun notika (Archboldiodendron calosercium (Kobuski)) terhadap larva *Artemia salina Leach* dengan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Pharmauho: Jurnal Farmasi, Sains, dan Kesehatan*, 4(1), 1-5. (2018). doi: 10.33772/pharmauho.v4i1.4618
10. Sari, W. K. P.; Suharyanto, S. Kandungan Pigmen dan Potensi Antioksidan Beberapa Jenis Makroalga dari Pantai Gunungkidul, Yogyakarta. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 16(1), 33–42. (2021). <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v16i1.674>
11. Marzouk, M.M. (2016). Flavonoid Constituents And Cytotoxic Activity Of *Erucaria Hispanica* (L.) Druce Growing Wild In Egypt. *Arabian Journal Of Chemistry*, 9, 411–415
12. Mufadal, 2015. Isolasi Senyawa Alkaloid Dari Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Serta Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Vis Dan FTIR. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
13. Sharo, N. M.; Ningsih, R.; Hanapi, A.; Nasichuddin, A. Uji TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA EKSTRAK ALGA MERAH (*Eucheuma cottonii*) TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* LEACH. *Alchemy*, 2(3). (2013). <https://doi.org/10.18860/al.v0i0.2892>
14. Solihah, M. A.; Rosli, W. W. I.; Nurhanan, A. R. (2012). Phytochemicals screening and total phenolic content of Malaysian Zea mays hair extracts. *International Food Research Journal*, 19(4), 1533–1538.
15. Tiwari, P.; Kumar, B.; Kaur, M.; Kaur, G. and Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106.
16. Hamidi, M.R.; Jovanova, B.; Panovska, T.K. 2014. Toxicological Evaluation of The Plant Products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 2014, Vol 60 (1): 9-18.
17. Gazali, M.; Nurjanah, N.; Zamani, N. P. Eksplorasi Senyawa Bioaktif Alga Cokelat *Sargassum* sp. Agardh sebagai Antioksidan dari Pesisir Barat Aceh. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1), 167. (2018). <https://doi.org/10.17844/jphpi.v21i1.21543>
18. Arwan, B. Uji Toksisitas Fraksi Ekstrak Etanol 70% Akar Parang Roman (*Boehmeria virgata* (Forst) Guill.) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach) Dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).\ (2017). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
19. Aqiila, G.R.; Taufiqurrahman, Irham.; Wydimala, Erida. 2017. Uji Efektifitas Ekstrak Etanol Daun *Ramania* (*Bouea macrophylla* Griffith) terhadap Mortalitas Larva *Artemia salina* Leach. *Dentino (Jur. Ked. Gigi)* September 2017 Vol. 2 (2): 170-176
20. Marzouk, M.M. (2016). Flavonoid Constituents And Cytotoxic Activity Of *Erucaria Hispanica* (L.) Druce Growing Wild In Egypt. *Arabian Journal Of Chemistry*, 9, 411–415
21. Pasaribu, S. (2017). Bab I Pendahuluan ÷ Embellishment Penerapan ا ي ا Sebagai Unsur Dekoratif Pada Busana Modestwear, d(2017), 1–15.
22. Madjid, A. D. R.; Rahmawati, D. A.; Fasya, A. G. (2020). Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Alchemy*, 8(1), 35–40. <https://doi.org/10.18860/al.v8i1.10040>

23. Ardhanay, S. D.; Puspitasari, Y.; Meydawati, Y.; Novaryati, S. (2019). Jurnal Sains dan Kesehatan. Jurnal Sains Dan Kesehatan, 2(2), 122–128.
24. Andriani, Z.; Fasya, A.G.; Hanapi, A. 2015. Antibacterial Activity of the Red Algae (*Eucheuma cottonii*) Extract from Tanjung Coast, Sumenep Madura. *ALCHEMY*, 4(2): 93-100.
25. Algaebase. 2019. [www.algaebase.com](http://www.algaebase.com). Diakses pada April 2019.
26. Andriani, Z.; Fasya, A.G.; Hanapi, A. 2015. *Antibacterial Activity of the Red Algae of the Red Algae (Eucheuma cottonii) Extract from Tanjung Coast, Sumenep Madura*. *ALCHEMY*, 4(2):93-100
27. Afif, Sholeh,; Fasya, A.G.;Ningsih, R. 2015. *Extraction Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (Eucheuma cottonii) from Sumenep Madura*. *ALCHEMY*, 4(2): 101-106
28. Baderos, A. 2017. Pemisahan Dan Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Perairan Wongsorejo- Banyuwangi Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan LC/MS. *Skripsi*.Malang; Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
29. Noviyanti. 2016. Pengaruh kepolaran pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun jambu brazil batu (*Psidium guineense* L.) dengan metode DPPH. *Jurnal Farmako Bahari*. 7(1) : 29 – 35.
30. Yunita, E.A., Nanik, H.S., dan W.H. Jafron. 2009. Pengaruh Ekstrak Daun Teklan (*Eupatorium riparium*) Terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva *Aedes aegypti*. *Jurnal Bioma*. 11 (1)
31. Panjaitan, R. S., & Natalia, L. (2021). Ekstraksi Polisakarida Sulfat dari *Sargassum polycystum* dengan Metode Microwave Assisted Extraction dan Uji Toksisitasnya. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 16(1), 23–32. <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v16i1.692>
32. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. Areview. Ultrasonics Sonochemistry*, 34,540560. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.06.035>
33. Putra, Renanda. B.D.S, Hertika, Asus, MS, Fadjar, M, Wicaksono, S. Hakim, GA. & Saputra, F. 2022. Acute Toxicity of Cinnamaldehyde in Profile Hematology and Gill Histology of Zebrafish. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 26(4), 623-635.
34. Ningdyah, AW., Alimuddin AH., Jayuska A. (2015) Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *JKK*. Vol.4(1), Hal. 75-83. Universitas Tanjungpura. ISSN 2303-1077
35. Carballo JL, Hernandez Inda ZL, Perez P, Graraloz MD. (2002). *Comparison Bertween Two Brine Shrimp Assays to Detec in Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Product*. *BMC Biotechnology*. Vol. 2: 1472-6570.
36. 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, 1–5.
37. Millati, N., Rahmawati, L. M., Iyani, R., Hanapi, A., Ningsih, R., Yuliani, D., & Megawati, D. S. (2020). Isolation and bioactivity of steroids isolates from petroleum ether fraction of *Chlorella* sp. *AIP Conference Proceedings*, 2243(June).
38. Singh, N. K., Garabadu, D., Sharma, P., Shrivastava, S. K., & Mishra, P. 2018. Antiallergy and anti-tussive activity of *Clitoria ternatea* L. in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, pp. 15–26.
39. Kristiani, J., Zain, S., Nurjanah, S., Widyasanti, A., & Putri, S. H. 2016. Pengaruh Lama Ekstraksi terhadap Rendemen dan Mutu Minyak Bunga Melati Putih menggunakan Metode Ekstraksi Pelarut Menguap (Solvent Extraction). *Jurnal Teknotan*, 10(2), pp. 34–43.
40. Liu M, Li XQ, Weber C, Lee CY, Brown J, Liu RH. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem*. 50:2926– 2930.



