

Uji Antioksidan dan Sifat Toksisitas dari Ekstrak dan Fraksi Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) Limbah Hasil Penyulingan

Raihan Azril Zailani Freidah¹, Harry Steven Julius Koleangan¹, Dewa Gede Katja^{2*}

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado

*Email korespondensi: dgkatja@unsrat.ac.id

ABSTRAK

Aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak serta fraksi daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) dari limbah penyulingan minyak nilam dievaluasi untuk mengetahui potensi senyawa bioaktif yang masih tersisa. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% dan dilanjutkan fraksinasi menggunakan n-heksana, etil asetat, butanol, serta air. Total fenolik, flavonoid, dan tanin dianalisis melalui spektrofotometri, sementara aktivitas antioksidan diuji dengan metode DPPH dan toksisitas menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Hasilnya menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki kandungan fenolik (50,06 µg/mL), flavonoid (61,78 µg/mL), dan tanin (37,61 µg/mL) tertinggi dibandingkan dengan fraksi yang lain. Ekstrak dan semua fraksi yang diuji memperlihatkan aktivitas antioksidan dengan nilai paling besar ditunjukkan oleh frakse etil asetat. Uji toksisitas menunjukkan bahwa semua sampel bersifat toksik, dengan nilai LC₅₀ terendah pada fraksi etil asetat yaitu 233,82 µg/mL.

Kata Kunci: daun nilam, limbah penyulingan, antioksidan, BSLT

ABSTRACT

The antioxidant activity and toxicity of extracts and fractions from patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) leaves obtained from patchouli oil distillation waste were evaluated to determine the potential of remaining bioactive compounds. Extraction was carried out using the maceration method with 96% ethanol, followed by fractionation using n-hexane, ethyl acetate, butanol, and water. Total phenolic, flavonoid, and tannin contents were analyzed via spectrophotometry, while antioxidant activity was assessed using the DPPH method and toxicity was evaluated using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). The results indicated that the ethyl acetate fraction exhibited the highest phenolic (50.06 µg/mL), flavonoid (61.78 µg/mL), and tannin (37.61 µg/mL) contents compared to the other fractions. The extract and all tested fractions demonstrated antioxidant activity, with the highest value observed in the ethyl acetate fraction. Toxicity testing revealed that all samples were toxic, with the lowest LC₅₀ value found in the ethyl acetate fraction at 233.82 µg/mL.

Keywords: patchouli leaves, distillation waste, antioxidant, BSLT

PENDAHULUAN

Molekul dengan satu atau beberapa elektron tanpa pasangan dikenal sebagai radikal bebas. Karakteristik ini membuatnya sangat mudah bereaksi dan berpotensi merusak susunan sel tubuh. Keadaan ini menyebabkan stres oksidatif yang bisa memicu berbagai penyakit degeneratif, termasuk kanker. Agar dampak buruk radikal bebas berkurang, keberadaan antioksidan sangat diperlukan. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat memberikan elektron kepada radikal bebas, sehingga dapat menstabilkan molekul tersebut dan mengurangi kerusakan oksidatif yang berlangsung (Putri dan Mahfur, 2023).

Salah satu sumber antioksidan yang kuat dari tanaman Indonesia adalah daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth). Daun nilam terkenal mengandung banyak senyawa bioaktif seperti flavonoid, saponin, tanin, glikosida, terpenoid, dan steroid, yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan (Fadhilah dkk., 2023). Sepanjang waktu, daun nilam biasanya dimanfaatkan sebagai bahan dasar dalam pembuatan minyak atsiri. Namun, sisa daun dari proses penyulingan sering kali hanya dipandang sebagai limbah yang dapat mencemari lingkungan, meskipun masih memiliki komponen bioaktif yang bisa dimanfaatkan lebih lanjut.

Selain aktivitas antioksidan dan antikankernya, sifat racun juga merupakan faktor krusial dalam penilaian potensi pengembangan obat antikanker. Senyawa beracun dapat merusak atau menghabisi sel, baik yang sehat maupun kanker, yang secara khusus ditujukan untuk menghalangi perkembangan dan penyebaran sel kanker. Uji sitotoksik biasanya dilakukan sebagai langkah pertama untuk mengevaluasi tingkat toksisitas suatu senyawa, di antaranya dengan mengamati tingkat kematian organisme uji sebagai respon terhadap eksposur zat tersebut (Sari *dkk.*, 2016). Dengan demikian, penggunaan daun nilam tidak hanya penting sebagai sumber antioksidan alami untuk mengurangi stres oksidatif, tetapi juga berpeluang dikembangkan sebagai agen sitotoksik yang dapat membantu dalam pencegahan maupun pengobatan kanker.

Berdasarkan kajian yang telah dilakukan, limbah daun nilam dari proses penyulingan minyak atsiri menunjukkan aktivitas antioksidan serta potensi sitotoksik pada ekstrak dan fraksi yang dihasilkan. Ini menunjukkan bahwa sisa daun nilam masih memiliki peluang untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai sumber senyawa aktif bio. Penelitian ini ditujukan untuk menentukan aktivitas antioksidan melalui uji aktivitas penangkal radikal bebas dan menentukan toksisitasnya melalui uji letalitas larva udang *Artemia salina*.

BAHAN DAN METODE

Daun nilam limbah hasil penyulingan diambil dari Kabupaten Minahasa Selatan, Sulawesi Utara. Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain aquades, AlCl_3 2%, aluminium foil, asam galat, etanol 96%, etil asetat, n-heksana, butanol, pereaksi folin cialcalteu 50%, Na_2CO_3 2%, larva *A. salina*, air laut buatan, ayakan 60 mesh, lampu led 50 watt, corong pisah, oven dan seperangkat alat gelas.

Preparasi sampel

Limbah padat daun nilam mula-mula dibersihkan dari kotoran dengan air mengalir, lalu dikeringkan di dalam oven pada temperatur konstan 50 °C. Bahan yang telah mengering sempurna kemudian dihaluskan memakai blender dan diayak lewat saringan 60 mesh untuk menghasilkan bubuk simplisia homogen.

Ekstraksi maserasi

Sebanyak 200 gram bubuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah gelap agar terlindung dari paparan cahaya langsung, kemudian direndam menggunakan 1000 mL etanol 96%. Wadah ditutup rapat selama 3 hari dan diaduk secara berkala setiap hari agar proses homogenisasi optimal. Setelah genap 3 hari, cairan ekstrak disaring. Filtrat yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50 °C dan kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 40–50 °C hingga didapatkan ekstrak kental etanol.

Partisi

Ekstrak kental sebanyak 5 gram dilarutkan ke dalam 100 mL akuades. Larutan tersebut dimasukkan ke corong pisah, ditambahkan 100 mL n-heksana, kemudian dikocok kuat hingga terbentuk pemisahan dua lapisan (fase n-heksana dan fase air). Fase n-heksana dipisahkan, dan proses ekstraksi cair-cair ini diulang beberapa kali hingga lapisan atas berwarna jernih. Sisa fase air selanjutnya dipartisi kembali dengan orientasi serupa menggunakan pelarut etil asetat, diikuti oleh pelarut butanol. Seluruh cairan fraksi (n-heksana, etil asetat, butanol, dan air) dikeringkan dengan *rotary vacuum evaporator* sampai didapatkan ekstrak fraksi murni.

Penentuan kandungan total fenolik

Sebanyak 0,1 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dicampur dengan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu 50%, lalu divortex selama 3 menit. Campuran lalu di tambah dengan 2 mL Laurtan Na_2CO_2 2% dan disimpan di tempat gelap selama 30 menit. Pengukuran nilai absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 750 nm menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Data kandungan fenolik dikonversikan ke dalam satuan ekuivalen asam galat $\mu\text{g/mL}$.

Penentuan kandungan total flavonoid

Sebanyak 1 mL sampel dengan 2 mL larutan AlCl_3 2% di dalam tabung reaksi kemudian divortex lalu didiamkan selama 30 menit masa inkubasi. Nilai absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang 415 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin dalam $\mu\text{g/mL}$ ekstrak dan fraksi.

Penentuan kandungan total tanin

Sebanyak 0,5 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian di tambahkan 1,5 mL vainilin methanol 4% dan divortex. Lalu tambahkan 0,75 mL HCl (37%). Setelah itu campuran diinkubasi selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada Panjang gelombang 500 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat.

Penentuan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH

Prosedur pengujian aktivitas penangkal radikal bebas (APRB) dilakukan dengan mencampurkan 0,5 mL sampel ke dalam 3 mL larutan DPPH, kemudian di-vortex selama 2 menit. Efisiensi penetralan radikal bebas ditandai dengan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning. Setelah inkubasi selama 30 menit, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm (pengukuran dilakukan tepat sebelum masa inkubasi berakhir). Nilai APRB selanjutnya ditentukan melalui persentase penurunan intensitas warna DPPH menggunakan rumus:

$$APRB (\%) = \left(1 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100$$

Uji Toksisitas

Penetasan larva *A. Salina*

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan ke dalam botol penetasan, kemudian ditambahkan 5 gram telur *A. salina*. Setelah diaerasi, telur akan menetas dalam waktu 48 jam dan siap dipakai sebagai target untuk pengujian toksisitas (Zulkifli dkk., 2018).

Preparasi larutan uji

Sebanyak 150 mg fraksi ekstrak etanol, n-heksana, etil asetat, butanol, dan air dilarutkan dalam 0,1 L air laut buatan untuk memperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1500 $\mu\text{g/mL}$ untuk setiap fraksi dan kemudian dicampurkan menjadi beberapa konsentrasi yaitu 400 $\mu\text{g/mL}$, 600 $\mu\text{g/mL}$, 800 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 1200 $\mu\text{g/mL}$ di dalam air laut buatan. Kontrol (0 $\mu\text{g/mL}$) dibuat tanpa menambahkan fraksi.

Uji Toksisitas

Setiap larutan uji dipipet 10 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 10 larva udang yang berusia 2 hari. Setiap larutan uji dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan dibandingkan dengan kontrol. Pengamatan berlangsung selama 24 jam atas kematian larva, jumlah larva yang meninggal dihitung setiap 6 jam (Sirait, 2001). Perhitungan angka kematian udang *A. Salina* dilakukan dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Tujuannya adalah untuk memperoleh senyawa bioaktif yang terkandung dalam serbuk daun nilam limbah sisa dari proses penyulingan dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilaksanakan selama 3 hari dengan proses homogenisasi dilakukan sekali per hari. Hasil rendeman ekstrak yang diperoleh ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak daun nilam hasil penyulingan

Sampel	Serbuk sampel (g)	Ekstrak (g)	Rendemen (%)	Rata-rata Rendemen (%)
EE 1	200	3,426	1,713	1,56
EE 2	200	2,798	1,399	

Keterangan : Serbuk daun nilam yang diekstraksi dengan pelarut etanol untuk ulangan 1 (EE 1), dan untuk ulangan 2 (EE 2).

Sebagaimana disajikan pada Tabel 1, rerata persentase rendemen ekstrak yang diperoleh dari limbah penyulingan daun nilam melalui dua tahap ekstraksi adalah sebesar 1,56%. Nilai rendemen ini berkorelasi dengan konsentrasi senyawa aktif dalam sampel; secara teoretis, peningkatan rendemen mengindikasikan akumulasi senyawa aktif yang lebih tinggi (Hasnaeni dkk., 2019).

Partisi

Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dipartisi secara cair-cair menggunakan empat jenis pelarut berbeda. Perolehan rendemen dari masing-masing fraksi disajikan pada Tabel 2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa rendemen tertinggi dicapai oleh fraksi butanol (FB) sebesar 27,96%, yang mengindikasikan dominasi senyawa semipolar pada ekstrak daun nilam limbah penyulingan. Sebaliknya, fraksi FA menunjukkan nilai rendemen terendah, yakni 12,93%, yang merefleksikan jumlah senyawa terlarut yang paling sedikit pada pelarut tersebut.

Tabel 2. Rendemen fraksinasi daun nilam

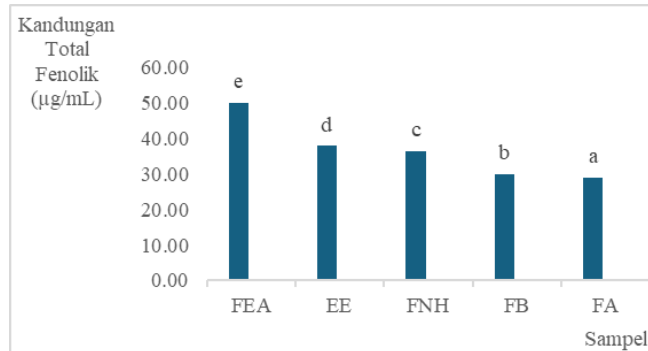
Fraksi	Rendemen (%)
Fraksi <i>n</i> -heksana (FNH)	15,56
Fraksi etil asetat (FEA)	25,72
Fraksi butanol (FB)	27,96
Fraksi air (FA)	12,93

Kandungan total fenolik

Penentuan kadar fenolik total dilakukan berbasis metode kolorimetri Folin-Ciocalteu dengan penambahan natrium karbonat Na_2CO_3 untuk mengondisikan suasana basa. Pada lingkungan alkalis ini, reduksi reagen Folin-Ciocalteu oleh gugus hidroksil dari senyawa fenolik akan membentuk kompleks molybdenum-tungstat yang memicu perubahan warna larutan menjadi biru. Intensitas warna biru yang terbentuk berbanding lurus dengan konsentrasi ion fenolat yang dihasilkan; semakin pekat degradasi warnanya, maka semakin tinggi konsentrasi fenolik total di dalam sampel. Nilai parameter ini kemudian diekspresikan dalam bentuk kesetaraan terhadap asam galat. Pemilihan asam galat sebagai standar acuan didasarkan pada kemampuan afinitasnya yang tinggi dalam membentuk kompleks warna dengan pereaksi Folin-Ciocalteu, sehingga meningkatkan sensitivitas analisis dan mempertajam absorbansi warna yang dihasilkan. Karakteristik asam galat yang memicu terbentuknya warna biru pekat saat bereaksi dengan reagen tersebut sejalan dengan studi literatur oleh Rondonuwu dkk. (2017). Profil sebaran kandungan fenolik total dari ekstrak maupun fraksi biomassa sisa distilasi daun nilam ini secara detail disajikan pada Gambar 1.

Melalui representasi data pada Gambar 1, fraksi etil asetat (FEA) mendominasi akumulasi fenolik total dengan kadar tertinggi mencapai 50,06 $\mu\text{g/mL}$. Distribusi kandungan fenolik pada kelompok uji lainnya secara bergradasi diikuti oleh ekstrak etanol sebesar 37,87 $\mu\text{g/mL}$, fraksi *n*-heksana sejumlah 36,31 $\mu\text{g/mL}$, serta fraksi butanol dan fraksi air yang masing-masing mencatatkan nilai sebesar 29,90 $\mu\text{g/mL}$ dan 29,05 $\mu\text{g/mL}$. Besarnya kadar yang terakumulasi pada FEA memberikan petunjuk kuat bahwa mayoritas komponen fenolik yang terkandung di dalam biomassa sisa distilasi daun nilam ini dihuni oleh senyawa dengan tingkat polaritas moderat (semipolar hingga agak polar). Etil asetat, sebagai representasi pelarut semipolar, memiliki afinitas yang baik untuk mengikat senyawa fenolik yang mengandalkan kombinasi gugus fungsional polar sekaligus nonpolar pada kerangka strukturnya. Karakteristik ini menjadikannya jauh lebih selektif dan efisien dalam mengisolasi metabolit fenolik spesifik apabila disandingkan dengan sistem pelarut yang bersifat polar murni (Rondonuwu

dkk., 2017). Di samping itu, FEA memfasilitasi kelarutan sebagian senyawa fenolik yang memiliki hambatan sterik atau kelarutan rendah dalam media polar seperti air atau metanol, namun di waktu yang sama juga memiliki sifat hidrofobik yang menyebabkannya tidak dapat larut dalam fase nonpolar (Hamdillah, 2022).

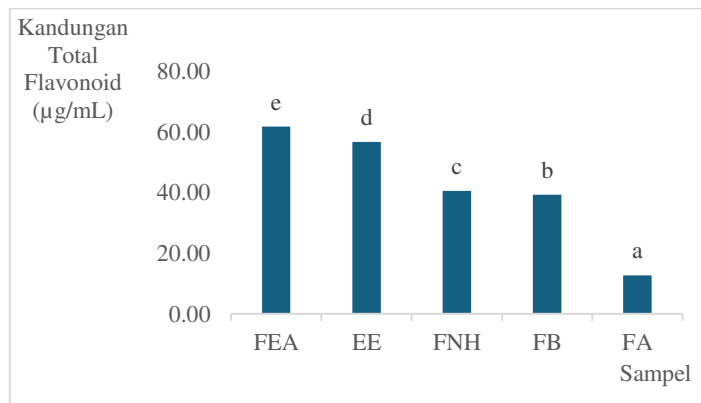


Gambar 1. Profil kandungan total fenolik ekstrak dan fraksi daun nilam sisa penyulingan

Kandungan total flavonoid

Kuantifikasi kandungan flavonoid total diaplikasikan lewat teknik kolorimetri dengan mereaksikan sampel bersama agen pengompleks aluminium klorida. Landasan mekanistik dari analisis ini bertumpu pada interaksi spesifik antara ion Al^{3+} dengan situs-situs aktif pada struktur flavonoid, meliputi gugus hidroksil di cincin A, gugus karbonil (keton) di cincin C, serta orientasi gugus orto-hidroksil yang terletak pada cincin B. Sinergi koordinasi ini memicu pembentukan senyawa kompleks yang memancarkan warna kuning. Densitas atau ketajaman warna kuning yang timbul memiliki korelasi linier dengan konsentrasi flavonoid di dalam sediaan; dengan demikian, peningkatan kepekatan kromofor kuning menandakan melimpahnya konsentrasi total flavonoid yang terdeteksi (Rambi dkk., 2016).

Distribusi data kuantitatif mengenai kadar flavonoid total dari ekstrak hingga setiap fraksi biomassa sisa penyulingan daun nilam terdokumentasi pada Gambar 2.

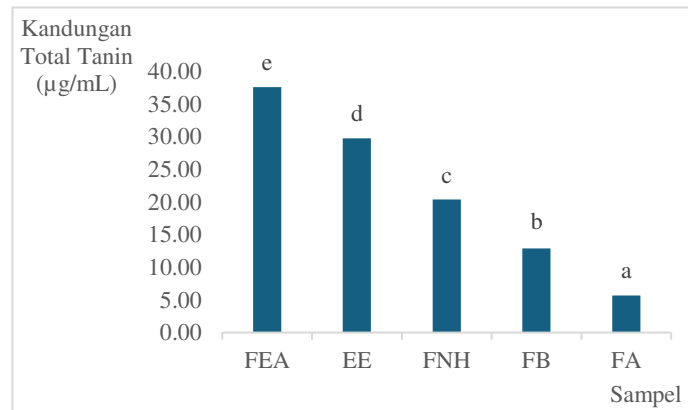


Gambar 2. Profil kandungan total flavonoid ekstrak dan fraksi daun nilam sisa penyulingan

Merujuk pada data yang disajikan dalam Gambar 2, FEA mengindikasikan akumulasi flavonoid total paling tinggi dengan kadar mencapai 61,78 µg/mL. Distribusi konsentrasi flavonoid pada kelompok sampel lainnya secara berturut-turut diisi oleh ekstrak etanol (56,79 µg/mL), fraksi butanol (40,63 µg/mL), fraksi n-heksana (39,30 µg/mL), serta nilai paling minimal terdokumentasi pada fraksi air yakni sebesar 12,71 µg/mL. Kuantitas yang dominan ini memberikan indikasi kuat bahwa konstituen fenolik yang teridentifikasi dalam pengujian didominasi oleh kelompok flavonoid berjenis flavonol, yang di alam lazimnya dijumpai dalam bentuk konjugat glikosida (Arifin, 2018). Kelompok senyawa dengan karakteristik arsitektur molekul tersebut memiliki afinitas kelarutan yang sangat baik di dalam fase pelarut semipolar seperti etil asetat, karena memiliki kemampuan penetrasi yang optimal dalam mengisolasi metabolit sekunder turunan fenol maupun flavonoid.

Kandungan total tanin

Kuantifikasi kadar tanin dikerjakan dengan mengadopsi prosedur Julkunen-Tiitto (1985). Tahap awal dimulai dengan memipet 0,5 mL sediaan sampel ke dalam tabung reaksi, lalu direaksikan bersama 1,5 mL larutan vanilin-metanol 4% dan dihomogenkan menggunakan alat penggojog elektrik (*vortex*). Langkah berikutnya adalah memperkenalkan 0,75 mL asam klorida pekat (HCl 37%) ke dalam campuran tersebut. Sistem larutan selanjutnya melewati masa inkubasi selama 20 menit pada kondisi konstan, sebelum akhirnya nilai absorbansinya dipindai melalui instrumen spektrofotometer pada panjang gelombang λ 500 nm. Akumulasi tanin terkondensasi yang terdeteksi kemudian diekspresikan sebagai nilai kesetaraan terhadap asam galat dengan satuan $\mu\text{g/mL}$ ekstrak. Adapun profil distribusi kandungan tanin dari ekstrak maupun fraksi biomassa sisa distilasi daun nilam ini tersaji secara visual pada Gambar 3.



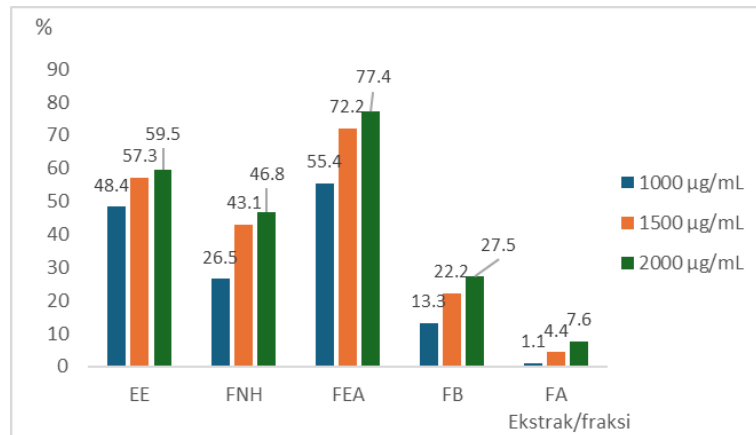
Gambar 3. Profil kandungan total tanin pada ekstrak ekstrak dan fraksi daun nilam sisa penyulingan

Merujuk pada pemetaan data di Gambar 3, fraksi etil asetat (FEA) mencatatkan akumulasi tanin total paling dominan dengan konsentrasi mencapai $37,61 \mu\text{g/mL}$. Kelimpahan senyawa tanin pada fase pelarut lainnya secara bergradasi diikuti oleh fraksi n-heksana sebesar $29,74 \mu\text{g/mL}$, fraksi butanol sejumlah $20,38 \mu\text{g/mL}$, fraksi air sebanyak $12,87 \mu\text{g/mL}$, serta kuantitas paling minimal dijumpai pada ekstrak etanol yaitu hanya sebesar $5,70 \mu\text{g/mL}$. Analisis kuantitatif ini menerapkan metode vanilin-HCl, yang mekanisme kimianya bertumpu pada proses protonasi molekul vanilin di dalam lingkungan asam kuat. Proses tersebut akan menstimulasi pembentukan intermediet berupa karbokation reaktif, yang kemudian menyerang inti flavonoid. Senyawa antara yang terkonstruksi dari reaksi tersebut selanjutnya mengalami eliminasi molekul air (dehidrasi) hingga menghasilkan produk akhir berupa kromofor berwarna merah keunguan (Salunkhe dkk., 1990).

Penentuan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH

Evaluasi kapasitas antioksidan pada sampel ekstrak serta fraksi biomassa sisa distilasi daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) diaplikasikan melalui pengujian radikal bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Skema pengujian ini dikerjakan dengan menginteraksikan larutan stok DPPH secara langsung dengan variasi konsentrasi sediaan uji. Adapun representasi grafis serta visualisasi data mengenai aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH pada seluruh kelompok sampel tersebut terdokumentasi secara detail pada Gambar 4.

Melalui pengujian menggunakan metode DPPH, kapasitas antioksidan dari sediaan ekstrak maupun fraksi biomassa sisa distilasi daun nilam terkonfirmasi mengalami peningkatan yang berbanding lurus dengan penambahan tingkat konsentrasi. Fraksi etil asetat (FEA) memperlihatkan performa penangkalan radikal paling kuat di seluruh tingkatan konsentrasi dengan rentang persentase inhibisi sebesar 55,4–77,4%, yang kemudian diikuti oleh ekstrak etanol (EE) pada kisaran 48,4–59,5%.

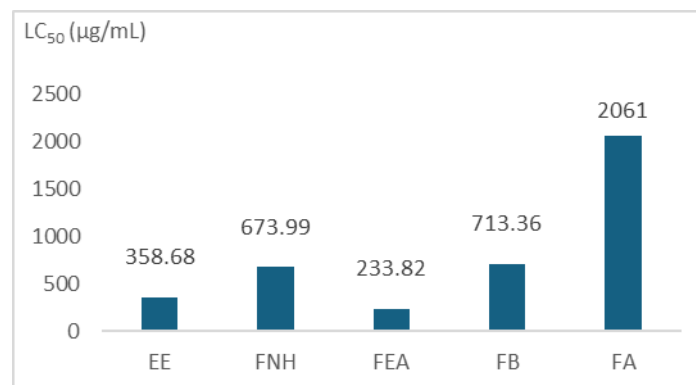


Gambar 4. Profil aktivitas penangkal radikal bebas DPPH ekstrak dan fraksi daun nilam sisa penyulingan

Di sisi lain, fraksi n-heksana (FNH) beserta fraksi butanol (FB) mencatatkan aktivitas peredaman yang moderat, sementara kemampuan paling lemah dijumpai pada fraksi air (FA). Tingginya aktivitas penangkapan radikal pada FEA disinyalir dipengaruhi oleh kelimpahan konstituen semipolar, khususnya senyawa golongan fenolik dan flavonoid. Capaian nilai inhibisi FEA yang sukses menembus angka di atas 50% mengindikasikan potensinya yang prospektif sebagai agen antioksidan primer. Dalam mekanisme kerjanya, antioksidan primer ini bertindak mendonorkan atom hidrogen guna meredam sifat reaktif molekul radikal bebas, sebuah fenomena biologi-kimia yang ditandai secara visual oleh pudarnya intensitas warna ungu pada larutan DPPH (Suryanto, 2018).

Toksisitas

Evaluasi karakteristik toksisitas akut diterapkan lewat metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada seluruh kelompok fraksi. Pengujian ini melibatkan pemaparan organisme uji pada seri konsentrasi sampel yang meliputi 1200 µg/mL, 1000 µg/mL, 800 µg/mL, 600 µg/mL, dan 400 µg/mL, serta menyediakan konsentrasi 0 µg/mL yang diposisikan sebagai kontrol negatif (tanpa intervensi ekstrak maupun fraksi). Durasi pemantauan dan perekaman data mortalitas larva udang dilangsungkan total selama 24 jam, dengan interval pengamatan berkala yang dijadwalkan pada jam ke-6, jam ke-12, jam ke-18, serta jam ke-24.



Gambar 5. Profil LC₅₀ ekstrak dan fraksi daun nilam sisa penyulingan

Berdasarkan data pada Gambar 5, dapat diketahui bahwa ekstrak dan fraksi daun nilam limbah hasil penyulingan menunjukkan aktivitas toksik. Fraksi etil asetat tercatat memiliki toksisitas paling tinggi dengan nilai LC₅₀ 233,82 µg/mL, diikuti oleh ekstrak etanol 358,68 µg/mL, fraksi n-heksana 673,99 µg/mL, fraksi butanol 713,36 µg/mL, dan fraksi air 2061 µg/mL. Rendahnya nilai LC₅₀ fraksi etil asetat menunjukkan potensi kuat senyawa dalam menginduksi mortalitas larva yang berkaitan dengan keberadaan senyawa metabolit sekunder seperti fenolik, flavonid dan tanin (Muaja, 2013).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa biomassa sisa distilasi daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth) masih menunjukkan kapasitas peredaman radikal bebas dengan kapasitas paling tinggi ditunjukkan oleh fraksi etil asetat. Di lain pihak, pengujian toksisitas menggunakan metode BSLT mengonfirmasi bahwa seluruh sampel uji memiliki sifat toksisitas yang aktif, di mana FEA bertindak sebagai fase paling poten karena memiliki konsentrasi letal terkecil LC_{50} 233,82 $\mu\text{g/mL}$. Fenomena empiris ini menegaskan sebuah indikasi penting bahwa produk samping penyulingan daun nilam masih menyimpan kelimpahan metabolit sekunder bioaktif yang sangat prospektif untuk dieksplorasi dan dikembangkan pada penelitian farmasetikal lanjutan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, B., dan Ibrahim, S. 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*. **6(1)**: 21–29.
- Fadhilah, N., Wa, O.Y. dan La, O.B. 2023. Formulasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Krim Antiaging Minyak Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) Menggunakan Metode ABTS. *Jurnal Pharmacia Mandala Waluya*, **2(5)**, 236-250..
- Hasnaeni, Wisdawati, dan Usman, S. 2019. Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen dan Kadar Ekstrak Tanaman Kayu Beta-Beta (*Lunasia amara Blanco*). *Jurnal Farmasi Galenika*. **5(2)**: 175-182
- Julkunen-Tiitto, R. 1985. Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **33(2)**: 213-217.
- Muaja, A. D., Harry, S. K., & Max, R. R. (2013). Uji toksisitas dengan metode BSLT dan analisis kandungan fitokimia ekstrak daun soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan metode soxhletasi. *Jurnal MIPA*, **2(2)**: 115-118.
- Putri, I. A. dan Mahfur 2023. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Batang Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) dengan Metode DPPH.
- Rambi, G. A., Kamu, V. S., dan Runtuwene, M. R. 2016. Uji fitokimia dan antioksidan dari daun yantan (*Blumea chinensis* DC). *Jurnal MIPA*, **5(1)**, 32-35.
- Rondonuwu, S.D.J., Suryanto, E., Sudewi, S. 2017. Kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan dari fraksi pelarut sagu baruk (*Arenga microcharpa*). *Chemistry Progress*. **10(1)**: 29-32.
- Salunkhe, D. K., Chavan, J. K., Kadam, S. S., & Reddy, N. R. 1990. *Storage processing and nutritional quality of fruits and vegetables. Volume I: Fresh fruits and vegetables*. CRC Press.
- Sari, E. R., Arsa, N., dan Lita, S. 2016. Skrining Senyawa Sitotoksik dari Ekstrak Daun, Bunga, Buah, Batang dan Akar pada Tumbuhan Senduduk (*Melastoma malabathricum*. L) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Bioassay. *Scientia*. **6(1)**: 66-72.
- Sirait, B. M. 2001. Potensi Bioaktif Tumbuhan Kasai, Tabat Barito, Bratawali, Bangle, dan Sambung Nyawa: Penapisan Fitokimia dan Toksisitas Fraksi Aktif.[Skripsi]. *FMIPA IPB, Bogor*.
- Suryanto, E. 2018. Kimia Antioksidan. CV. Patra Media Grafindo, Bandung.