

KAJIAN TOKSISITAS DARI TUBUH BUAH *Ganoderma lucidum* DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST)

ROSS NURUL ROHMAH, NUNIEK INA RATNANINGTYAS, ARI ASNANI

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Jalan dr. Suparno 63 Purwokerto 53122

ABSTRACT

Ganoderma lucidum is polyporus fungi from Basidiomycetes which can be used as traditional medicines. Toxicity test with Brine Shrimp Lethality Test (BST) method using *Artemia salina* was conducted to find out toxic effect of *G. lucidum*. An extract would have toxic effect if the LC₅₀ < 1000 µg/ml. The aims of this experiment were to know about the toxicity level from *G. lucidum* with Brine Shrimp Lethality Test (BST) method and determined the concentration of fruiting body extract of *G. lucidum* which had the best toxicity effect in LC₅₀. There were two extraction methods used in this experiment, first one stage extraction and then multilevel extraction with hexane, ethyl acetate, and ethanol. Each solvent was made in 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, and 125 ppm. This process was repeated for three times. This experiment used *G. lucidum* extract which was tested to *A. salina* and secunder compound metabolit test from the most toxic *G. lucidum* was done with phytochemical analysis. The result indicated that fruiting body extract from *G. lucidum* could kill *A. salina* because all extract was positively contained alkaloid and terpenoid but negatively contained flavonoid. Fruiting body extract from *G. lucidum* which had lowest LC₅₀ was ethyl asetat extract with one stage extraction in concentration 53,70 ppm and highest LC₅₀ was ethanol extract with multilevel extraction in concentration 501,18 ppm.

KEY WORDS: Brine Shrimp Lethality Test (BST), *Ganoderma lucidum*, LC50, Toxicity

Penulis korespondensi: ANISA KARTIKA SARI | email: yozzroses@gmail.com

PENDAHULUAN

Ganoderma lucidum merupakan jamur poliporus dari kelas Basidiomycetes yang dikenal dengan nama Reishi atau Lingzi di negara Cina dan Jepang. Makromorfologi *G. lucidum* berbentuk setengah lingkaran dan berwarna merah kecoklatan dengan tepi merah kehitaman, membentuk zona konsentris, dan bagian bawah terdapat pori-pori tempat keluarnya spora. Permukaan atasnya halus dan berkilat, memiliki tangkai yang berwarna seperti tudungnya (Suryanto *et al.*, 2005).

Tubuh buah *G. lucidum* mengandung lemak, protein, germanium organik, polisakarida, dan adenosin. Jamur ini juga mengandung komponen antitumor berbobot molekul rendah, seperti flavonoid, tanin, alkaloid, terpenoid, dan steroid (Mizuno, 1997). Beberapa senyawa aktif dari *G. lucidum* yang telah diketahui memiliki aktivitas biologi adalah golongan polisakarida dan terpenoid yang dapat memberikan toksisitas dan efek antikanker. Kemampuan tersebut menjadikan *G. lucidum* diindikasikan untuk pengobatan kanker (Widodo, 2006).

Brine shrimp lethality test (BST) adalah salah satu metode yang digunakan untuk melacak senyawa bioaktif yang terdapat di dalam bahan alam menggunakan larva *Artemia salina*. Larva udang ini digunakan sebagai hewan uji pada metode BST dikarenakan pertumbuhan pada fase *nauplius* identik dengan pertumbuhan sel kanker yaitu mitosis (Kresnamurti *et al.*, 2008). Keuntungan penggunaan metode BST ini adalah waktu yang dibutuhkan cepat, biaya murah, pengerjaan sederhana, tidak perlu aseptik, tidak ada peralatan khusus, sampel sedikit, dan hasilnya dapat dipercaya sebelum dilanjutkan pada uji klinis (Meyer *et al.*, 1982). *A. salina*

merupakan organisme sejenis udang-udangan yang berukuran kecil dan dikenal dengan nama *brine shrimp*. *Brine shrimp* hidup di kadar garam yang tinggi (15-300 per mil), 25°C-30°C, dan pH 7,3-8,4 (Djariyah, 1995). Larva *A. salina* telah digunakan sebagai uji bioaktivitas dan terdapat korelasi positif antara uji toksisitas udang laut (*Brine Shrimp Toxicity*) dengan potensi suatu senyawa sebagai antikanker.

Uji toksisitas dilakukan dengan mengamati kematian hewan percobaan yang dianggap sebagai pengaruh ekstrak kasar yang diuji. Uji toksisitas dimaksudkan untuk memaparkan adanya efek toksik dan untuk meneliti batas keamanan dalam kaitannya dengan penggunaan senyawa yang ada dalam ekstrak tersebut. Sifat toksisitas diketahui berdasarkan jumlah kematian larva akibat pemberian ekstrak *G. lucidum* yang mengandung senyawa antikanker. Menurut Meyer *et al.* (1982), suatu ekstrak bersifat toksik terhadap *A. salina* apabila mempunyai harga LC₅₀-nya < 1000 µg/ml.

Metode ekstraksi yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak tubuh buah *G. lucidum* yaitu dengan menggunakan metode maserasi. Metode ini merupakan metode ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut organik pada temperatur ruangan dan terlindung dari cahaya. Pemilihan pelarut harus berdasarkan polaritas dari senyawa yang akan diisolasi. Senyawa polar akan lebih mudah larut dalam pelarut polar dan senyawa non polar akan lebih mudah larut dalam pelarut non polar. Derajat polaritas tergantung pada konstanta dielektrik. Makin besar konstanta dielektrik makin polar pelarut tersebut Sudarmadji *et al.*, (1989) dalam Putranto (2010).

METODE

Perlakuan yang dicobakan dengan menggunakan 3 jenis pelarut, yaitu heksana, etil asetat dan etanol. Ekstraksi dilakukan dengan 2 jenis metode yaitu bertahap dan bertingkat. Masing-masing larutan dibuat dalam 4 konsentrasi yaitu 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm dan 125 ppm yang diulang sebanyak 3 kali.

Serbuk tubuh buah *Ganoderma lucidum* diekstraksi menggunakan metode ekstraksi bertahap dan bertingkat, hingga didapatkan ekstrak kental tanpa pelarut. Kemudian dilakukan uji toksitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Tahap pertama yang dilakukan yaitu menetasan telur *Artemia salina* menggunakan air laut. Telur udang akan menetas menjadi udang-udang kecil yang disebut *nauplii* setelah dua hari.

Hasil ekstraksi tubuh buah *G. lucidum* masing-masing diambil 50 mg dan ditambahkan 2 tetes pereaksi tween 80 dilarutkan dalam 5 ml air laut, sehingga diperoleh larutan induk 10000 ppm. Larutan induk dari tiap ekstrak diambil 0,5 ml; 0,25 ml; 0,125 ml; dan 0,0625 ml menggunakan mikropipet dan diulang sebanyak 3 kali. Kemudian ekstrak diencerkan menggunakan air laut menjadi 5 ml dengan konsentrasi akhir ekstrak 1000, 500, 250, dan 125 ppm.

Masing-masing vial diisi 10 ekor larva udang dengan air laut secukupnya, diberi 2 tetes larutan ragi (3 mg/ml air laut) sebagai nutrisi kemudian diberi sampel uji dengan volume tertentu dan diencerkan dengan air laut hingga 5 ml. Tabung uji dan kontrol diinkubasi dalam keadaan terbuka dan mendapat cahaya selama 24 jam. Jumlah larva udang yang masih hidup untuk tiap-tiap konsentrasi dihitung dan dicatat untuk menentukan persentase kematian udang dan menghitung nilai LC₅₀. Bila dalam larutan kontrol terdapat larva udang yang mati, maka jumlah larva udang yang hidup dalam larutan kontrol dikurangi jumlah larva udang yang hidup dalam larutan uji. Persentase kematian larva udang dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$= \frac{\Sigma \text{larva hidup kontrol} - \Sigma \text{larva hidup perlakuan}}{\Sigma \text{larva hidup kontrol}} \times 100\%$$

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan analisis probit untuk menentukan harga LC₅₀. Bila masing-masing ekstrak yang diuji memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm, maka ekstrak tersebut bersifat toksik.

Uji ada tidaknya kandungan kimia secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan uji warna. Uji Alkaloid dilakukan dengan cara 2 ml sampel dilarutkan dalam 2 ml HCl 2%, dipanaskan 5 menit pada suhu 70°C dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditetesi pereaksi Dragendorff sebanyak 2-3 tetes. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga. Uji Flavonoid dilakukan dengan cara 2 ml sampel dilarutkan dalam 2 ml metanol, kemudian ditambah serbuk Mg dan 5 tetes HCl pekat. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga. Uji Terpenoid dilakukan dengan cara 2 ml sampel ditambah dengan 1 ml pereaksi Lieberman-Burchard. Adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan data primer berupa jumlah larva *A. salina* yang masih hidup pada tiap vial setelah diinkubasi selama 24 jam pada konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm dan 125 ppm, terlihat bahwa semakin tinggi

konsentrasi ekstrak semakin banyak larva yang mati, sedangkan pada vial kontrol tidak ditemukan larva yang mati.

Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa persentase kematian *A. salina* pada perlakuan ekstrak bertahap dan bertingkat etanol, etil asetat dan heksana semakin tinggi pada konsentrasi yang tinggi pula yaitu pada konsentrasi 125 ppm. Sesuai dengan pernyataan Chowdhury *et al.*, (2005) bahwa rata-rata persentase mortalitas akan meningkat sesuai dengan meningkatnya konsentrasi setiap sampel dan hampir semua komponen bioaktif bersifat toksik pada dosis tinggi.

Nilai LC₅₀ didapatkan berdasarkan perhitungan analisis probit dimana persentase kematian larva dikonversikan ke dalam tabel probit, kemudian dihitung *slope* (a) dan intersep (b) sehingga didapatkan persamaan garis (Mursyidi, 1985). Dari keseluruhan hasil uji toksitas metode bertahap dan bertingkat ekstrak etanol, etil asetat dan heksana didapatkan hasil bahwa LC₅₀ berada dibawah 1000 ppm dan diatas 30 ppm, sehingga ekstrak tersebut dapat dianggap toksik.

Menurut Sumantri (1996), semakin tinggi LC₅₀ yang dihasilkan, maka semakin rendahnya toksitas dan semakin rendah LC₅₀ mencerminkan tingginya tingkat toksitas tersebut dapat diartikan sebagai potensi aktivitasnya sebagai antikanker, karena semakin rendah harga LC₅₀ maka senyawa tersebut semakin toksik dan semakin berpotensi sebagai antikanker. Menurut Meyer *et al* (1982), suatu ekstrak dianggap sangat toksik apabila memiliki nilai LC₅₀ dibawah 30 ppm, dianggap toksik pada LC₅₀ 30-1000 ppm dan dianggap tidak toksik bila nilai LC₅₀ diatas 1000 ppm.

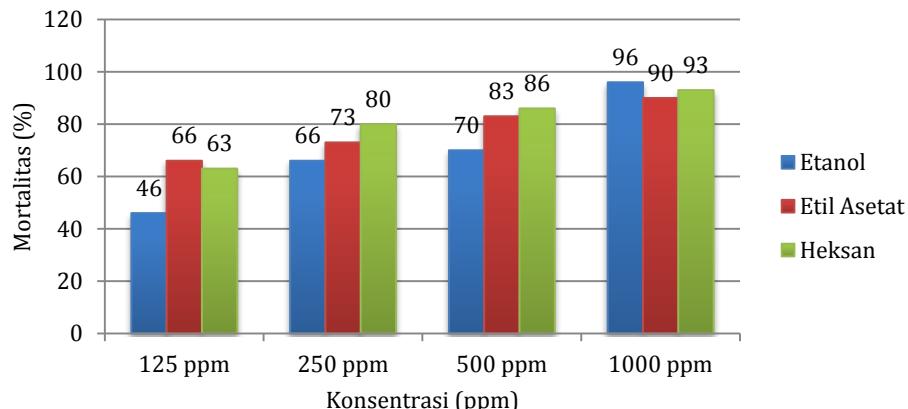
Berdasarkan hasil uji fitokimia ekstrak tubuh buah *G. lucidum* dengan metode bertingkat atau bertahap, ternyata menunjukkan hasil negatif flavonoid, namun positif mengandung alkaloid dan terpenoid.

Tabel 1. Uji toksitas ekstrak tubuh buah *G. lucidum* dengan berbagai pelarut dan metode ekstraksi

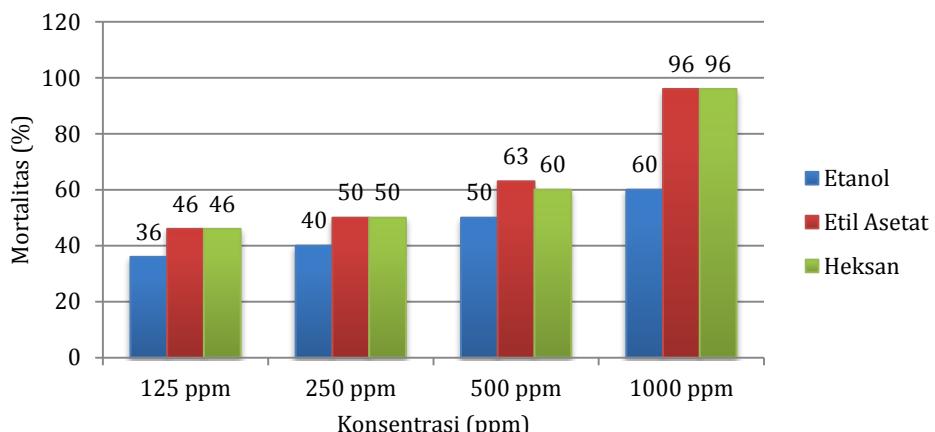
Metode	Ekstrak	Nilai LC ₅₀
Bertingkat	Etanol	501,18 ppm
	Etil Asetat	194,98 ppm
	Heksana	190,54 ppm
Bertahap	Etanol	162,18 ppm
	Etil Asetat	53,70 ppm
	Heksana	63,09 ppm

Tabel 2. Hasil uji metabolit sekunder ekstrak tubuh buah *G. lucidum* dengan uji warna

Metode	Ekstrak	Flavonoid	Alkaloid	Terpenoid
Bertingkat	Etanol	-	+	+
	Etil Asetat	-	+	+
	Heksana	-	+	+
Bertahap	Etanol	-	+	+
	Etil Asetat	-	+	+
	Heksana	-	+	+



Gambar 1. Histogram pengaruh ekstrak *G.lucidum* (ekstraksi bertahap) terhadap persentase mortalitas *A.salina*



Gambar 2. Histogram pengaruh ekstrak *G.lucidum* (ekstraksi bertingkat) terhadap persentase mortalitas *A.salina*

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak tubuh buah *G.lucidum* mampu mematikan larva *A.salina*.
2. LC_{50} ekstrak tubuh buah *G.lucidum* yang terkecil adalah ekstrak etil asetat dengan metode bertahap yaitu pada konsentrasi 53,70 ppm dan LC_{50} tertinggi adalah ekstrak etanol metode bertingkat yaitu pada konsentrasi 501,18 ppm.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami ucapan kepada Riset Unggulan DIPA Unsoed 2011 yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chowdhury NS, Karim MdR, Rana MdS. 2005. In Vitro Studies on Toxicology Property of The Root and Stem Bark Extracts of *Oroxylum indicum*. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences. 4: 1-4.
- Djarijah AS. 1995. Pakan Ikan Alami. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Kresnamurti A, Tutuk B, Gracesania V. 2008. Perbandingan Uji Sitotoksik Asam Anakardat Dan Asam Anarkardat Jenuh dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test. Jurnal Obat Bahan Alam. VII(1): 98-107.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen LB, Michols DE, Laughlin JL. 1982. Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for active plant constituent. *Planta Medica*. 45: 31-34.
- Studies on bioactive substances and medical effect of reishi (*Ganoderma lucidum*) [Internet]. 1997. Mizuno T. tersedia di: <http://www.canited.com/reishi97d-1.htm>.
- Mursyidi A. 1985. Statistika Farmasi dan Biologi. Bandung: Ghalia Indonesia.
- Putranto HA. 2010. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi [skripsi]. Universitas Jenderal Soedirman-Purwokerto.
- Sumantri, Martono E. 1996. Daya Insektisida dari Senyawa 5-etyl karbamil-2, 2-dimetil-1, 3 benzodioksol. Prosiding tamu ilmiah lustrum X dan reuni V; Yogyakarta. Universitas Gajah Mada: Fakultas Farmasi.
- Suryanto D, Andriani S, Nurtjahja K. 2005. Keragaman Genetik *Ganoderma* spp. dari Beberapa Tempat di Sumatera Utara. *Jurnal Ilmiah Pertanian KULTURA*. 40:2.
- Widodo AN. 2006. Toksisitas Ekstrak *Ganoderma Lucidum* Terhadap Hepar Dengan Melihat Kadar Enzim Gamma Glutamyl Transferase Tikus Wistar [skripsi]. Universitas Diponegoro-Semarang.