

UJI BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT) EKSTRAK ETIL ASETAT SPONS *Calthropella* sp. ASAL ZONA INTERTIDAL PANTAI KRAKAL GUNUNG KIDUL YOGYAKARTA

Fitria Susilowati

Jurusan Farmasi UNIDA GONTOR
Pondok Modern Gontor Putri 1, Mantingan, Ngawi 63257

fitria@unida.gontor.ac.id

ABSTRAK

Salah satu jenis organisme laut yang berpotensi cukup besar dan berpeluang mengandung senyawa aktif adalah spons. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan menguji toksisitas ekstrak etil asetat spons *Calthropella* sp. asal zona intertidal Pantai Krakal, Gunungkidul. Isolasi dilakukan melalui metode maserasi dengan pelarut metanol:diklorometana 1:2 (v/v). Ekstrak diklorometana diuapkan dan dipartisi dengan etil asetat:air (3:2 v/v). Ekstrak etil asetat dipisah dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental. Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dilakukan untuk mengetahui potensi farmakologi ekstrak etil asetat. Isolasi menghasilkan ekstrak kental coklat kekuningan bermassa 217.5 mg. Hasil uji toksisitas ekstrak etil asetat menunjukkan potensi toksik ($LC_{50} = 105.38 \mu\text{g/mL}$).

Kata kunci : spons Indonesia, *Calthropella* sp., *Brine Shrimp Lethality Test*, uji toksisitas

ABSTRACT

Sponge is one of the most prolific sources in regard of their secondary metabolites as bioactive compounds. This study aimed to isolate and investigate the toxicity of ethyl acetate extract of sponge *Calthropella* sp. from intertidal zone of Krakal Beach, Gunungkidul. The isolation was done by maceration with methanol:dichloromethane (1:2) v/v. The dichloromethane extract was evaporated and then partitioned in ethyl acetate:water (3:2 v/v). The interesting layer of ethyl acetate was evaporated to yield a viscous extract. The toxicity test was assessed by *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). The isolation resulted 7 fractions of ethyl acetate: 71,1; 86,4; 69,3; 88,8; 78,7; 97,5; and 100,2 mg. BSLT showed the LC_{50} value of the ethyl acetate fractions on toxic and very toxic category.

Keywords : Indonesian sponge, *Ancorina* sp., BSLT, toxicity, bioactive compound

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara bahari dengan biodiversitas laut tertinggi di dunia, termasuk diantaranya adalah invertebrata laut. Invertebrata laut telah diketahui menjadi salah satu sumber senyawa metabolit sekunder yang sangat penting dan memiliki potensi yang besar di bidang medis, kosmetik, pangan, dan sebagainya. Sekitar 10.000 metabolit berhasil diisolasi dari berbagai organisme laut, diantaranya sekitar 37% berasal dari hasil

isolasi jenis spons, 21% dari coelenterata, 18% dari mikroorganisme, 9% dari jenis alga, dan sebagian kecil dari jenis moluska. Senyawa bahan alam ini banyak dimanfaatkan dalam bidang farmasi dan harganya sangat mahal dalam katalog hasil laboratorium (Pronzato dkk., 1999). Spons dari Indonesia dapat menjadi sumber eksplorasi senyawa bioaktif untuk mencukupi kebutuhan lokal akan obat.

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) diusulkan sebagai bioassay sederhana untuk memonitor adanya aktivitas farmakologis dari suatu ekstrak bahan alam. Metode ini memiliki beberapa kelebihan, yaitu, cepat, murah, sampel yang dibutuhkan relatif sedikit dan sederhana. Metode ini dapat dimanfaatkan sebagai bioassay pendahuluan sebelum dilanjutkan ke tahap uji yang lebih rumit untuk kegiatan farmakologis tertentu (McLaughlin dan Rogers, 1998). Dengan menggunakan metode BSLT ini juga akan diketahui batas keamanan penggunaannya untuk tujuan pengobatan (Carballo *et al.*, 2002).

Penelitian ini mencakup isolasi dan uji toksisitas untuk mengetahui potensi farmakologi spons-spons zona intertidal di Indonesia.

2. Tinjauan Teoritis

2.1. Spons Laut

Spons adalah hewan multiseluler paling primitif (metazoan) dan diperkirakan merupakan organisme multiseluler tertua di muka bumi. Menurut Hooper (2000), spons termasuk dalam filum Porifera yang artinya adalah hewan dengan tubuh berpori. Spons hidup dengan cara menetap pada suatu habitat pasir, batu-batuan, dan juga pada karang-karang mati di dalam laut. Hewan ini aktif menghisap dan menyaring air melalui seluruh permukaan tubuhnya untuk mendapatkan makanan. Pada umumnya spons mampu memompakan air rata-rata 10 kali volume tubuhnya dalam waktu 1 menit, sehingga hewan ini dikenal sebagai *filter feeder*.

Sebagai organisme laut tertua (lebih dari 600 miliar tahun), spons telah mampu bertahan dari perubahan-perubahan ekstrem yang terjadi di lautan. Hal ini mengindikasikan banyaknya senyawa metabolit sekunder yang telah dihasilkan spons yang mampu membantunya untuk bertahan hidup (Li, *et al.*, 1998). Penelitian beberapa dekade membuktikan bahwa ekstrak metabolit sekunder dari spons laut diketahui mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas seperti sitotoksik dan antitumor (Muniarsih dan Rachmaniar, 1999), antivirus, anti HIV, antiinflamasi, antifungi, antileukimia, serta penghambat aktivitas enzim.

Spons famili *Calthropellidae* seperti genus *Calthropella* merupakan spons yang hidup di perairan laut dalam. Spons jenis ini banyak ditemukan di Samudra Atlantik pada kedalaman (Xavier dan Soest, 2007). Spons *Calthropella sp.* selain ditemukan di perairan laut dalam juga ditemukan tumbuh di zona intertidal (pasang surut) Pantai Krakal, Gunungkidul dengan kondisi lingkungan berombak besar.

Perbedaan habitat lingkungan hidup antara spons *Calthropella sp.* yang tumbuh di perairan laut dalam dengan di zona intertidal, memungkinkan adanya perbedaan kandungan senyawa metabolit sekunder dari spons *Calthropella sp.* asal zona intertidal Pantai Krakal. Menurut Motomasa (1998) metabolit sekunder yang dihasilkan spons sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti tingginya kekuatan ionik pada air laut, intensitas cahaya yang kecil, rendahnya temperatur, dan tekanan.

2.1. Uji Toksisitas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Metode dengan menggunakan *Artemia salina* L. diusulkan sebagai *bioassay* sederhana untuk penelitian produk bahan alam. Meyer *et al.* (1982) meneliti ekstrak etanol dari 41 spesies Euphorbiaceae, tanaman ini dikenal mengandung senyawa beracun dari struktur yang beragam. Penelitian dilakukan untuk mengetahui korelasi antara toksisitas ekstrak terhadap *Artemia salina* L. dengan sitotoksitas ekstrak terhadap 9KB dan 9PS. Hasil menunjukkan 18 dari ekstrak Euphorbiaceae bersifat toksik, yaitu nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ dalam *bioassay Artemia salina* L. dari 24 spesies yang menunjukkan aktivitas terhadap 9PS ($LC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$), 14 yang beracun untuk larva udang. *Bioassay* dengan metode BSLT tidak spesifik untuk menunjukkan bioaktivitas sebagai antitumor, antikanker, dan tindakan fisiologis tertentu. Namun sejumlah besar (14 dari 24) dari ekstrak spesies dengan aktivitas sitotoksik terhadap 9PS bersifat toksik terhadap *A. salina* L. Sehingga dimungkinkan untuk memantau fraksinasi menggunakan prinsip BSLT ini.

Kelebihan uji bioaktivitas ini adalah mudah, cepat (24 jam setelah ekstrak diujikan dalam larva udang), murah, sampel yang dibutuhkan relatif sedikit (50 mg untuk ekstrak kering) dan prosedurnya sederhana (tidak ada teknik spesifik yang wajib dikerjakan). Senyawa aktif yang memiliki daya bioaktivitas tinggi diketahui berdasarkan nilai *Lethal Concentration* 50% (LC₅₀), yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat menyebabkan kematian hewan uji sampai 50%. Data mortalitas yang diperoleh kemudian diolah dengan analisis probit yang dirumuskan oleh Finney (1971) untuk menentukan nilai LC₅₀ pada derajat kepercayaan 95%.

Suatu senyawa dikategorikan sangat toksik jika memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 30 ppm, dikategorikan toksik jika memiliki nilai LC₅₀ 30-1000 ppm, dan dikategorikan tidak toksik jika memiliki harga LC₅₀ di atas 1000 ppm. Tingkat toksisitas tersebut juga dapat menunjukkan potensi aktivitasnya sebagai antikanker dimana semakin kecil nilai LC₅₀ maka semakin toksik suatu senyawa dan berpotensi sebagai antikanker (Meyer *et al.*, 1982).

3. Metodologi

3.1. Ekstraksi dan Partisi

Spons seberat 800 gram dipotong kecil-kecil kemudian dilakukan maserasi dengan pelarut metanol:diklorometana 1:2 (v/v) sebanyak masing-masing 200 mL selama 2 x 1 jam. Hasil maserasi yang diperoleh kemudian disaring menggunakan corong dan kapas dan dipisahkan antara ekstrak metanol dan ekstrak diklorometana. Ekstrak diklorometana diuapkan dengan evaporator pada suhu di bawah titik didihnya yaitu ± 35 °C sehingga diperoleh ekstrak kental diklorometana. Ekstrak kental diklorometana dimasukkan ke dalam corong pisah, dilakukan partisi dengan etil asetat:air (3:2), kemudian digojok perlahan, dan dibiarkan sampai diperoleh dua lapisan yaitu lapisan organik (etil asetat) dan lapisan air. Lapisan etil asetat diuapkan dengan evaporator pada suhu 77 °C hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat (ekstrak kasar).

3.2. Uji BSLT

3.2.1. Penetasan telur udang *Artemia salina* L.

Telur *Artemia salina* ditetaskan dalam wadah berukuran (30x10x15) cm yang terdiri dari 2 bagian yaitu bagian gelap dan bagian terang yang dipisahkan dengan sekat yang diberi lubang. Salah satu sisi wadah ditutup dengan *aluminium foil* agar cahaya tidak bisa masuk ke dalam wadah dan sisi lainnya dibiarkan tanpa ditutup dengan *aluminium foil*. Wadah penetasan dilengkapi dengan lampu sebagai sumber panas di bagian penetasan dan aerator sebagai sumber udara di bagian terang untuk larva hasil penetasan.

Telur *Artemia salina* sebanyak 1 sendok teh dimasukkan ke dalam wadah gelap. Bagian atas wadah gelap disinari dengan lampu bohlam sebagai sumber panas dan bagian terang diberi *aerator*. Telur akan menetas setelah kurang lebih 24 jam terhitung mulai telur ditaburkan. Larva yang digunakan untuk uji adalah larva yang berumur 48 jam mulai dari telur ditaburkan.

3.2.2. Penyiapan bahan uji dan kontrol

Larutan induk 2000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg ekstrak kasar etil dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL kemudian ditambahkan surfaktan DMSO 50 μ L. Kelarutan bahan uji masing-masing fraksi dalam surfaktan dipercepat dengan bantuan alat *vortex mixer*, selanjutnya ditambahkan dengan air laut, diputar lagi dengan *vortex mixer*, dipindahkan ke dalam labu ukur 5 mL dan diencerkan hingga tanda batas.

Larutan induk kontrol dibuat dengan cara memipet 50 μ L DMSO tanpa penambahan bahan uji. Selanjutnya ditambahkan air laut, dikocok, dan diencerkan sampai tanda batas.

3.2.3. Uji toksisitas dengan metode BSLT

Larutan induk setiap fraksi dipipet ke dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL masing-masing sebanyak 750; 375; 187.5; 75; 37.5; 18.75 μ L kemudian masing-masing tabung ditambahkan

dengan 10 ekor larva *Artemia salina* berumur 48 jam yang dipipet dari wadah penetasan, selanjutnya diencerkan dengan air laut hingga tanda batas 1,5 mL sehingga diperoleh variasi konsentrasi sebesar 1000; 500; 250; 100; 50 and 25 ($\mu\text{g/mL}$). Kontrol dipilih pada konsentrasi yang paling besar yaitu 1000 ppm. Larutan induk kontrol dipipet sebanyak 750 μL ke dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL kemudian ditambahkan larva *Artemia salina* sebanyak 10 ekor dan diencerkan dengan air laut hingga 1,5 mL. Masing-masing variasi konsentrasi larutan uji dan kontrol dibuat dalam 3 kali pengulangan.

Tabung *Eppendorf* berisi sampel uji diamati di bawah lampu penerangan dan jumlah larva *Artemia salina* yang mati dihitung setelah 24 jam. Larva yang mati ditandai dengan tidak bergerak lagi, agar bisa terlihat jelas perhitungan dibantu dengan lup (kaca pembesar).

3.2.4. Analisis toksisitas

Sifat toksisitas dianalisis dengan menghitung % mortalitas larva *Artemia salina* pada setiap konsentrasi setelah 24 jam. Persentase kematian (% mortalitas) untuk setiap variasi konsentrasi yang diujikan dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah total larva awal}} \times 100\%$$

Apabila pada kontrol terdapat larva *Artemia salina* yang mati, maka % mortalitas dihitung dengan rumus Abbott (Meyer *et al.*, 1982):

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{(\text{larva mati pada uji} - \text{larva mati pada kontrol})}{\text{jumlah larva awal pada uji}} \times 100\%$$

Data persentase kematian pada larva *Artemia salina* yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analisis probit. Persentase mortalitas ditransformasikan untuk memperoleh nilai probit. Penentuan LC_{50} dilakukan dengan menggunakan analisis probit SPSS 19.0. Penggunaan program SPSS dalam analisis probit ini sangat membantu dalam

menentukan nilai LC_{50} secara lebih akurat dan cepat. Data yang *in put* berupa konsentrasi (kadar), persen kematian (respon) dan 100 (subjek). Selanjutnya data *out put* berupa nilai konsentrasi pada setiap nilai probit. Nilai LC_{50} ditentukan dari *out put* konsentrasi saat nilai probit sebesar 0,500 (50%), yaitu konsentrasi yang menyebabkan 50% hewan uji mati.

4. Hasil dan Pembahasan

4.1. Ekstraksi dan Partisi

Hasil ekstraksi diperoleh dua lapisan yang saling tidak bercampur yaitu bagian atas yang merupakan ekstrak polar dalam pelarut metanol dengan warna coklat kehitaman bagian bawah yang merupakan ekstrak non polar dalam pelarut diklorometana dengan warna coklat kekuningan. Ekstrak diklorometana selanjutnya dilakukan evaporasi dan hasilnya berupa ekstrak kental berwarna coklat kekuningan.

Ekstrak kental diklorometana selanjutnya dilakukan partisi cair-cair menggunakan pelarut etil asetat:air. Senyawa yang bersifat polar dan garam yang masih tersisa pada ekstrak kental diklorometana diharapkan akan larut dalam air. Hasil partisi ekstrak etil asetat selanjutnya dilakukan evaporasi dan dihasilkan ekstrak kasar etil asetat berwarna coklat kekuningan sebanyak 217,5 mg.

4.2. Hasil uji toksisitas ekstrak kasar spons

Calthropella sp.

Uji toksisitas dilakukan pada ekstrak etil asetat spons *Calthropella* sp. untuk mengetahui potensi farmakologi ekstrak kasar etil asetat. Uji toksisitas ekstrak etil asetat spons dilakukan dengan menghitung persen kematian larva *Artemia salina* pada tiap konsentrasi lalu dibandingkan dengan kontrol dan dilakukan analisis hasil sehingga diperoleh nilai LC_{50} . Hasil uji BSLT ekstrak etil asetat spons *Calthropella* sp. disajikan pada Tabel 1.

Seperti yang terlihat pada Tabel 1 bahwa ekstrak etil asetat spons *Calthropella* sp. menunjukkan aktivitas larvasidal (kemampuan membunuh larva) yang baik. Variasi konsentrasi ekstrak etil asetat memperlihatkan pengaruh yang berbeda terhadap kematian

larva *A. salina* Leach. Persen kematian larva berbanding lurus dengan konsentrasi ekstrak etil asetat. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin tinggi pula persen kematian larva.

Tabel 1. Hasil uji toksisitas ekstrak etil asetat

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Log Konsentrasi.	Jumlah Larva Hidup Setelah 24 jam			Kematian (%)
		1	2	3	
1000	3,00	1	0	4	75,00
500	2,69	5	2	6	56,67
250	2,39	5	4	5	53,33
100	2,00	6	3	6	50,00
50	1,69	5	7	4	46,67
25	1,39	8	6	7	30,00

Tingkat toksisitas ditunjukkan oleh harga LC_{50} yang mengindikasikan konsentrasi dari suatu zat yang menyebabkan 50% kematian hewan uji. Nilai LC_{50} diperoleh dari analisis probit menggunakan SPSS 22. Nilai LC_{50} ekstrak etil asetat spons *Calthropella* sp. adalah 105,38 $\mu\text{g/mL}$. Meyer *et al.* (1982) melaporkan bahwa suatu ekstrak menunjukkan aktivitas ketoksikan dalam uji toksisitas jika nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan pernyataan tersebut maka ekstrak etil asetat spons *Calthropella* sp. bersifat toksik.

Dengan demikian ekstrak kasar etil asetat ini diduga mengandung senyawa-senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas farmakologi.

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa etil asetat spons *Calthropella* sp. dari zona intertidal Pantai Krakal memiliki toksisitas yang tinggi.

Daftar Pustaka

- Carballo, J. L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., and Garcia-Gravalos, M.D., 2002, Methodology Article: A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect In Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Products, *BMC Biotechnology*, 2, 1-5.
- Finney, D.J., 1971, *Probit analysis*, 2nd edition. Cambridge University Press.
- Hooper, J.N.A., and Soest, R.W.M., 2002, *Systema Porivera: A Guide to Clasification of Sponges*, Vol.1, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- Li, C.W., Chen, J.Y., and Hua, T.E., 1998, Precambrian Sponges with Cellular Structures, *Science*, 279, 879–882.
- McLaughlin, J.L., and Rogers, L.L., 1998, The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, *Drug. Inf. J.* 32, 513-524.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E, and McLaughlin, J.L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta Medica*, 45(05), 31-34.
- Murniasih, T., 2003, Metabolit Sekunder dari Spons sebagai Bahan Obat-Obatan, *Oseana*, 28(3), 27-33.
- Motomasa, K., 1998, Search for Biologically Active Substances from Marine Sponges., *Prosiding Seminar Bioteknologi I*, Puslit Oseanologi LIPI, Jakarta.
- Pronzato R., Bavestrello G., Cerrano C., Magnino G., Manconi R., Pantelis J., Sara, dan Sidri M., 1999, Sponge Farming in the Mediterranean Sea: New Perspectives, *Memoir of the Queensland Museum*, 44, 485-491.
- Xavier, J.R., and Soest, R.W.M., 2007, Demosponge Fauna Of Ormonde And Gettysburg Seamounts (Gorringe Bank, Northeast Atlantic): Diversity And Zoogeographical Affinities, *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 87, 1643–1653.