



Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Ekstrak Sarang Lebah Madu (*Apis dorsata* Binghami)

Valensia Valeria Potu¹, Dintje F. Pendong², dan Mocosuli Yermia Semuel^{2*}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Manado

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Manado

Kampus Unima di Tondano, Sulawesi Utara 95618, Indonesia

*Korespondensi penulis, Mocosuli Yermia Semuel, e-mail: yermiamocosuli@unima.ac.id

Abstract

Apis dorsata Binghami is a honey bee endemic to the Wallacea Zone. *Apis dorsata Binghami* that has not been bred has a higher variety of feed sources than other honey bees. *Apis dorsata Binghami*'s nest is made of different types of nectar, propolis and pollen than *Apis mellifera*. Research has been carried out to determine the toxicity of *Apis dorsata Binghami* honeycomb extract based on the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) test. Fresh *Apis dorsata* nests were obtained from the Minahasa forest, North Sulawesi. After being air-dried, the honeycomb was extracted using the maceration method with a ratio of 1:2 (w/v) simplicia nest and solvent. Ethanol extracts were examined for their toxicities to shrimp larvae *Artemia salina* Leach. The test concentrations used were 10 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L and 1000 mg/L. Each concentration was carried out in three replications. The results showed that the LC₅₀ of the honeycomb ethanol extract was LC₅₀ 54,457 mg/L. Based on the LC₅₀, the honeycomb of *Apis dorsata Binghami* can be consumed directly by humans and contains bioactives that have medicinal potential.

Keywords: *Apis dorsata Binghami*, Toxicity, Honeycomb extract, BSLT

Abstrak

Apis dorsata Binghami merupakan lebah madu endemic Zona Wallacea. *Apis dorsata Binghami* yang belum dapat ditangkarkan memiliki variasi sumber pakan lebih tinggi dibandingkan lebah madu lainnya. Sarang *Apis dorsata Binghami* dibentuk dari berbagai jenis nektar, propolis dan polen dibandingkan *Apis mellifera*. Telah dilaksanakan penelitian yang bertujuan mengetahui toksisitas ekstrak sarang lebah madu *Apis dorsata Binghami* berdasarkan uji BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). Sarang *Apis dorsata* segar diperoleh dari hutan Minahasa, Sulawesi Utara. Sarang lebah setelah dikering anginkan, diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perbandingan simplisia sarang dan pelarut 1:6 (b/v). Ekstrak etanol were examined their toxicities to shrimp larvae *Artemia salina* Leach. Konsentrasi uji yang digunakan adalah 10 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L dan 1000 mg/L. Masing-masing konsentrasi dilakukan dalam tiga ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa LC₅₀ ekstrak etanol sarang lebah adalah LC₅₀ 54,457 mg/L. Berdasarkan LC₅₀, maka sarang lebah madu *Apis dorsata Binghami* dapat dikonsumsi secara langsung oleh manusia dan mengandung bioaktif yang berpotensi obat.

Kata-kata kunci: *Apis dorsata Binghami*, Toxicity, Honeycomb extract, BSLT

PENDAHULUAN

Lebah madu *Apis dorsata* berhabitat di hutan dan hanya berkembang di kawasan subtropis dan tropis Asia. *Apis dorsata* tersebar luas hampir di seluruh kepulauan di Indonesia, kecuali Maluku dan Papua. (Sakagami *et al.* 1980; Raffiudin dan Crozier 2007; Hepburn dan Radloff, 2011). Lebah madu *Apis dorsata Binghami* adalah lebah endemik Sulawesi yang

hidup secara alami di hutan yang luas dan belum dapat dibudidayakan, akan tetapi menghasilkan madu yang lebih banyak dibandingkan *Apis mellifera* lebah madu yang umumnya di budidayakan (Mokosuli, et. al. 2019; Mokosuli, 2013).

Sulawesi Utara, lebih khusus wilayah Minahasa, mempunyai macam-macam spesies tumbuhan yang endemik sebagai sumber nectar dan serbuk sari untuk pertumbuhan dan perkembangan lebah dan juga sebagai sumber makanan utama lebah *Apis dorsata* Binghami. Setiap tanaman mempunyai karakteristik metabolit sekunder yang termasuk di dalamnya yaitu proses dan komposisi serbuk sari dan nectar yang dibentuk kemudian menjadi bahan pakan lebah madu (Mokosuli, 2013).

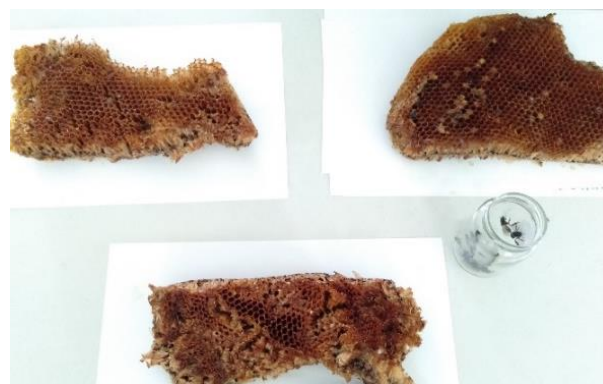
Lebah madu menghasilkan beberapa produk yang berguna bagi kehidupan manusia. Produk-produk yang alami dihasilkan oleh lebah madu antara lain yaitu madu, royal jelly, malam atau lilin lebah, pollen, perekat (propolis), racun lebah. Produk-produk tersebut diolah dengan sebaik mungkin sehingga menjadi obat untuk berbagai macam penyakit, bahan industri farmasi dan sebagainya (Mokosuli, et. al. 2017). Ekstrak sarang lebah madu mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid dan triterpoid berdasarkan hasil analisis fitokimia (Mokosuli et.al. 2019).

Penelitian sebelumnya, ekstrak sarang lebah madu hutan *Apis dorsata* Binghami dapat digunakan sebagai sumber bioaktif antihiperlipidemia yang sudah dilakukan uji *in vivo* terhadap tikus sebagai hewan uji (Mokosuli et. al. 2019). Walaupun demikian, uji toksisitas ekstrak sarang *Apis dorsata* Binghami dari Minahasa belum pernah dilaporkan. Uji toksisitas metode BSLT dapat digunakan secara luas sebagai bioassay awal untuk menguji potensi bioaktif suatu ekstrak bahan alam. Uji BSLT digunakan sebagai uji awal untuk screening antikanker, antioksidan dan antihiperlipidemia (Tanvir et. al. 2018; Yusop et. al. 2019; Carballo et al. 2002).

METODE PENELITIAN

Sampel

Pengambilan sampel Sarang lebah madu *Apis dorsata* Binghami ini diperoleh dari dataran perkebunan Desa Wulurmaat, Kec. Modoinding, Kab. Minahasa Selatan, Sulawesi Utara. Pengambilan sarang lebah dilakukan pada sore hari pukul 05.00 Wita. Sarang diletakkan pada kotak sampel, selanjutnya dibawa ke laboratorium.



Gambar 1. Sampel sarang Lebah madu *Apis dorsata* Binghami



Gambar 2. Lokasi pengambilan sampel sarang lebah *A. dorsata* Binghami di perkebunan Desa Wulurmaatus, Kec. Modoinde, Minahasa Selatan. (Sumber : Google Maps.)

Metode Ekstraksi dan Maserasi

Ekstraksi sarang lebah dilakukan dengan metode maserasi (Harborne, 1996, Mokusuli, 2008). Sarang lebah *Apis dorsata* Binghami ditimbang sebanyak 100 gr dihaluskan menggunakan blender kemudian tuang kedalam dua toples yang berbeda masing-masing toples diberi 50 gr dan campurkan dengan ethanol 70% masing-masing toples diberi 300 ml. Selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu kamar, setiap 6 jam digoyang menggunakan orbital Shaker selama 30 menit. Penyaringan filtrat dilakukan dengan menggunakan kertas saring Whatman. Filtrat hasil ekstraksi selanjutnya diupakan pelarut menggunakan rotary evaporator Heidolp, pada suhu 54⁰C dan 55 rpm. Hasil penguapan pelarutnya selanjutnya disebut ekstrak etanol sarang lebah *Apis dorsata* Binghami.

Uji Toksisitas Metode BSLT

BSLT digunakan sebagai bioassay pendahuluan dalam menilai toksisitas ekstrak tumbuhan, fungi, logam, substansi toksin dari pestisida dan sianobakteria (Carballo et al. 2002, Mokusuli, 2008). Penelitian ini akan digunakan 4 taraf perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali, sehingga total unit perlakuan adalah 12. Setiap unit percobaan diberi ekstrak sarang lebah madu hutan *Apis dorsata* Binghami. Penelitian terdiri atas tahap ekstraksi sarang lebah, uji BSLT dan analisis data penelitian.

Ekstrak etanol sarang *Apis dorsata* digunakan untuk uji toksisitas. Uji BSLT dilakukan menurut metode McLaughlin et. al. 1998 yang dimodifikasi. Ekstrak sarang lebah dibuat dalam sebaran konsentrasi uji 10 ppm, 100 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm. Setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Perlakuan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan masih hidup pada tiap vial uji (Meyer et al., 1982; Juniarti dkk, 2009; McLaughlin et. al., 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak Sarang Lebah Madu *Apis dorsata* Binghami

Sarang lebah setelah dihaluskan berwarna kuning kecoklatan, beraroma cengkih. Sarang lebah yang dihaluskan dengan menggunakan blender, telah dibersihkan dari larva.

Aroma cengkih disebabkan karena lokasi sarang tersebut berdekatan dengan perkebunan cengkih, sekitar 700 – 1000 m. Filtrat hasil maserasi sarang lebah dengan etanol 70 % selama 2 x 24 jam, berwarna kuning kecoklatan. Setelah pelarut diuapkan dengan Rotary Evaporator Buchi, diperoleh ekstrak kasar sarang lebah *Apis dorsata* Binghami dari Minahasa selatan hitam kecoklatan dengan bobot 50 gr. Ekstrak kasar beraroma khas sarang lebah, beraroma madu dan cengkih.



Gambar 3. Ekstrak kasar sarang lebah hasil rotary evaporator

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

Larva *Artemia salina* Leach yang digunakan ditetaskan selama 2 x 24 jam menggunakan air yang diberikan garam laut. Penetasan *Artemia salina* Leach menggunakan aerator untuk mensuplai oksigen pada larva yang akan menetas. Setelah 2x24 jam telah dihasilkan larva yang menetas. Larva berenang dalam air menuju cahaya dan ke permukaan wadah penetasan. Larva *Artemia* berwarna orange dan bergerak aktif ke sumber cahaya. Selanjutnya larva sehat ditandai dengan pergerakan yang maksimal (motil) digunakan sebagai subjek uji toksisitas.

Rata rata mortalitas tertinggi ditunjukkan pada perlakuan ekstrak konsentrasi 1000 ppm. Sedangkan rata rata mortalitas terendah ditunjukkan pada perlakuan konsentrasi ekstrak 10 ppm. Walaupun demikian rata rata mortalitas konsentrasi 10 ppm dan 100 ppm tidak berbeda secara signifikan (Lampiran 1).

Penyebab kematian larva *Artemia Salina* Leach karena adanya perubahan gradient konsentrasi yang drastis antara di dalam dan diluar sel sehingga menyebabkan senyawa menjadi toksik dan dapat menyebar dengan baik ke tubuh larva udang. Efek kerusakan metabolisme yang ditimbulkan terjadi secara cepat dan dapat dideteksi dalam waktu yang singkat selama 24 jam, hingga menyebabkan 50% kematian larva udang (Dwijayanti, 2015).

Larva udang diketahui memiliki kulit yang tipis sehingga peka terhadap lingkungannya. Zat atau senyawa asing yang ada dilingkungan akan berdifusi ke dalam tubuh sehingga mempengaruhi sel-selnya. Apabila senyawa yang masuk ke dalam sel bersifat toksik maka akan mematikan larva udang tersebut. Menurut Carballo et. al. 2002, suatu ekstrak bahan alam berpotensi sebagai obat apabila memiliki LC50 menurut uji BSLT kurang dari 1000 mg/L.

Menurut Meyer et. al. 1982 terdapat sebaran toksisitas berdasarkan nilai LC₅₀ untuk 10 ppm < bersifat sangat kuat, 10 ppm – 100 ppm bersifat kuat, 100 ppm – 500 ppm bersifat sedang dan 500 ppm – 1000 ppm bersifat lemah.

Hasil uji BSLT ekstrak sarang lebah dengan nilai LC₅₀ 54,457 mg/L relative masih dapat dikonsumsi langsung manusia. Perbandingan LC₅₀ BSLT dengan dosis pada manusia adalah 1 / 1000. Sehingga LC₅₀ ekstrak sarang lebah yang diperoleh termasuk kategori tidak toksik pada manusia dan dapat dikonsumsi secara langsung (Lampiran 2).

Semakin besar nilai LC₅₀ maka tingkat ketoksitasnya semakin kecil begitu juga sebaliknya semakin kecil nilai LC₅₀ maka semakin besar toksisitasnya (Meyer et al, 1982). Suatu ekstrak dinyatakan aktif dan bersifat toksik jika menyebabkan kematian hingga 50% hewan uji pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm. Kematian larva *Artemia saliana* L. disebabkan karena senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik, senyawa toksik dapat masuk melalui bagian mulut larva udang dan diabsorpsi masuk ke dalam saluran pencernaan dan terjadi proses kerusakan reaksi metabolisme pada larva udang. (Raineri, 1981)

KESIMPULAN

Hasil analisis uji toksisitas ekstrak sarang lebah *Apis dorsata* Binghami memiliki LC₅₀ 54,457. Berdasarkan nilai LC₅₀, maka sarang lebah madu hutan *Apis dorsata* Binghami dapat dikonsumsi langsung oleh manusia dan mengandung bioaktif berpotensi obat.

DAFTAR PUSTAKA

- Almatsier, S. 2006. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta (ID): PT Gramedia Pustaka Utama.
- Bankova VS, de Castro SL, & Marcuccic MC. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
- Carballo et al. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* (2):1472-6750
- Dwijayanti E., Andi H.A., Muhammad A.W. 2015. Skrinning Fitokimia Dan Uji Aktifitas Sitotoksik Pada Kulit Batang Tampoi (*Baccauren macrocarpa*) Terhadap *Artemia salina* Leach Dengan Metode BSLT. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 2015: 4(1): 6-10.
- Dyer FC. 1985. Nocturnal orientation by the asian honey bee, *Apis dorsata*. *Animal Behavior*. 33:769-774
- Fransk NR, Pratt SC, Mallon EB, Britton NF, Sumpter DJT. 2002. Information flow, opinion polling and collective intelligence in house-hunting social insects. *PTRSL*. 357: 1567-1583.
- Hadisoesilo S, Kuntadi. 2007. Kearifan Tradisional dalam Budidaya Lebah Hutan (*Apis dorsata*). Departemen Kehutanan. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan dan Konservasi Alam. Bogor. ISBN : 978-979-3145-38-9.
http://www.fordamof.org/files/Kearifan_Lokal_dalam_Budidaya_Lebah_Hutan-file_compres.pdf
- Hussain A, Zia M, Mirza B. 2006. Cytotoxic and antitumor potential of *Fagonia cretica* L. *Turk J Biol* 31:19-24.
- Hegazi AG. 1998. Propolis an overview. *J Bee Informed*, 5, 22-28.
- Kahono S, Nakamura K, Amir M. 1999. Seasonal migration and colony behavior of the tropical honeybee *Apis dorsata* F. (Hymenoptera: Apidae). *Treubia*. 31(3)283-297.

- Kaunang, E. N. S., & Mocosuli, Y. S. (2017). Botanical and phytochemical constituents of several medicinal plants from mount Klabat north Minahasa.
- Kumazawa S, Hamasaka T, & Nakayama T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origin. *Food Chemistry*, 84, 329-339.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy L, & Jimenez L. 2004. Polyphenols food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, 727-47.
- Mc Laughlin JL et al, 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug information journal*, vol 32, pp 513-524.
- Mead D. 2013. A guide to some bees and wasps of Indonesia. *Sulang Language Data and Working Papers: Topics in Lexicography*, no. 11. Sulawesi Language Alliance. <http://sulang.org/>.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay For Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.
- Mocosuli YS, Pelealu J, Tulung M, Mandey LC. Pharmacological Bioactivity Honey Bee Venom *Apis nigrocincta* Smith and *A. dorsata* Binghami Endemic to North Sulawesi. *International Journal of Science and Engineering Investigations*. 2013; 2(18):25-33
- Mocosuli, YS. 2008. Aktivitas Antioksidan dan Antikanker Ekstrak Kulit Buah Batang Langsung (*Lansium Domesticum* L.). [Tesis]. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Qa\
- Mocosuli Y.S, Mege, R. A., Versya, G., & Rompas, C. (2019). The antihyperlipidemic activity of *Apis dorsata* Binghami nesting extract in atherogenic diet-induced hyperlipidemic rats. *International Journal of Botany Studies*, 4(4), 174-178.
- Mocosuli Y.S, Kaunang, E. S. N., & Manopo, J. S. (2019). The bioactive contents and antioxidant activity of honey bee nest extract of *Apis dorsata* Binghami from the North Sulawesi. *Molekul*, 14(2), 92-102.
- Mocosuli, Y. S. (2019). The bioactive contents and antioxidant activity of honey bee nest extract of *Apis dorsata* Binghami from the North Sulawesi. *Jurnal MOlekul*.
- Nazzi, F. (2016). The hexagonal shape of the honeycomb cells depends on the construction behavior of bees. *Sci Rep*. 2016; 6: 28341.
- Neupane KR, Woyke J, Poudel SM. 2013. Nesting site-preference and behavior of giant honey bee *Apis dorsata*. Paper presented on Apimondia, 29 September-4 October 2013, Kyiv, Ukraine and published on abstract and working procedure Apimondia, 2013.
- 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*). Universitas Tanjungpura
- Nur, dkk. 2014. Estimasi bobot larva melalui Panjang dan lebar larva lebah hutan *Apis dorsata*.
- Oldroyd BP, Nanork P. 2009. Conservation of asian honeybees. *Apidologie*. 40: 296-312.
- Putri, Z. S., Wati, R. R., Widyanto, R. M., Rahmi, Y., & Proborini, W. D. (2020). Pengaruh Tepung Kulit Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca* L.) terhadap Aktivitas Antioksidan dan Sitotoksitas pada Sel Kanker Payudara T-47D. *JURNAL AIAZHAR INDONESIA SERI SAINS DAN TEKNOLOGI*, 5(3), 166. <https://doi.org/10.36722/sst.v5i3.380>
- Purbowati, I. S. M., Syamsu, K., Warsiki, E., & Rukmini, H. S. (2015). Evaluasi toksisitas, aktivitas antibakteri dan antioksidan komponen bioaktif rosela dengan variasi jenis pelarut. *Journal of Agroindustrial Technology*, 25(2).
- Rachman, Sitti Rahimah; MARYAM, Fadillah; Limbong, Bertha Ayu. The Toxicity Test of Ethanol Ekstrak of Leaves Averhoa bilimbi L. Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Methode on shrimp larvae (*Artemia salina* Leach). **Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences**, [S.l.], v. 4, n. 1, mar. 2020. ISSN 2580-328X.
- Raineri, M. 1981. Histochemical Localization of Chitin In Larva of *Artemia salina* L. *Journal of Zoology* 48 (2): 139-141.

- Rasyid, M. I., Yuliani, H., & Angraeni, L. (2020). Toxicity Test LC50 of Pineung Nyen Teusalee Seeds (*Areca catechu*) Extract by Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Methode. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 515, 12052.
- Ruttner F. 1988. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. New York (US). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sakagami FS, Matsumara T, Ito K. 1980. *Apis laboriosa* in Himalaya, the little known world largest honeybee (Hymenoptera:Apidae). *Insect Matsum*. 19:47-77.
- Seeley TD. 1985. *Honeybee Ecology A Study of Adaptation in Social Life*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey, United Kingdom
- Starr CK, Schmidt PJ, Schmidt JO. 1987. Nest site-preferences of the giant honey bee, *Apis dorsata* (Hymenoptera: Apidae), in Borneo. *Pan Pasific Entomol*. 63(1):37-42.
- Tanvir, E. M., Sakib Hossen, M., Mahfuza Shapla, U., Mondal, M., Afroz, R., Mandal, M., ... & Hua Gan, S. (2018). Antioxidant, brine shrimp lethality and analgesic properties of propolis from Bangladesh. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5), e12596.
- Yusop, S. A. T. W., Sukairi, A. H., Sabri, W. M. A. W., & Asaruddin, M. R. (2019). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of propolis from Beladin, Sarawak stingless bees *Trigona itama* extract. *Materials Today: Proceedings*, 19, 1752-1760.
- Vitalia, N., Najib, A., & Ahmad, A. R. (2016). uji toksisitas ekstrak daun pletekan (*ruellia tuberosa* l.) dengan menggunakan metode brine shrimp lethality test (bslt). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 3(1), 124–129.