

Skrining Awal Ekstrak Etil Asetat Spons *Leucetta* sp. Sebagai Antikanker dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Ni Wayan Martiningsih

Jurusan Analis Kimia Fakultas MIPA Universitas Pendidikan Ganesha

email: marti_chem03@yahoo.co.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dan tingkat toksisitas ekstrak etil asetat spons *Leucetta* sp. terhadap larva *Artemia salina* Leach. Isolasi dilakukan dengan ekstraksi menggunakan pelarut metanol:diklorometana (1:1). Campuran metanol:diklorometana disaring, diuapkan dengan *rotary evaporator* dan kemudian dipartisi dengan etil asetat:air (3:2). Ekstrak kasar etil asetat dianalisis kandungan metabolit sekundernya dengan cara skrining fitokimia. Uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada konsentrasi 5, 10, 50, 100, 200 dan 500 ppm. Hasil skrining fitokimia menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT menunjukkan harga LC_{50} dari ekstrak kasar etil asetat spons *Leucetta* sp. adalah 104,47 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat spons *Leucetta* sp. memiliki potensi toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Kata-kata kunci: *Leucetta* sp., toksisitas, alkaloid, *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia dengan dua pertiga wilayahnya adalah lautan yang merupakan bagian dari perairan Indopasifik. Wilayah Indopasifik yang sebagian berpusat di Indonesia Timur dan Filipina merupakan pusat keanekaragaman biota laut terbesar di dunia. Sumber daya biota laut tersebut merupakan aset potensial yang dapat dimanfaatkan menjadi aneka produk, mulai dari produk makanan sampai produk farmasi (obat-obatan) (Suparno, 2005).

Meskipun Indonesia memiliki kekayaan biota laut melimpah, pemanfaatannya selama ini masih difokuskan pada ikan sebagai produk pangan. Padahal perairan Indonesia kaya akan biota yang beraneka ragam seperti jenis moluska, krustacea, spons, alga, annelida, arthropoda, echinodermata dan biota laut lainnya. Dewasa ini, mulai banyak dikembangkan penelitian dengan objek biota laut dan telah menghasilkan penemuan berbagai senyawa yang menarik secara biologis dan kimiawi yang berguna untuk keperluan farmakologi.

Spons sebagai salah satu sumber penemuan senyawa-senyawa baru dari laut telah diketahui memiliki kandungan senyawa bioaktif yang paling luas dan paling banyak mendapat perhatian para peneliti dibandingkan invertebrata laut lainnya yang telah diteliti. Spons merupakan biota sesil, sehingga tidak dapat menghindari serangan predator dengan berpindah tempat. Oleh karena itu, spons mempunyai mekanisme

pertahanan secara mekanis (spikula) dan secara kimiawi. Mekanisme pertahanan secara kimiawi dilakukan dengan cara menghasilkan senyawa bioaktif. Beberapa senyawa bioaktif ini bersifat antivirus, antijamur, antimikroba, antiinflamasi, antitumor, dan sitotoksik (Joseph dan Sujatha, 2011).

Kanker sebagai salah satu penyakit yang telah menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia maupun di Indonesia. Setiap tahun, 12 juta orang di seluruh dunia menderita kanker dan 7,6 juta di antaranya meninggal dunia karena kanker. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007, prevalensi tumor/kanker di Indonesia adalah 4,3 per 1000 penduduk dan kanker merupakan penyebab kematian nomor tujuh (Anonim, 2013). Badan Kesehatan Dunia (World Health Organization, WHO) dan Organisasi Pencegahan Kanker Dunia (UICC) memprediksi akan terjadi peningkatan lonjakan penderita kanker sebesar 300 persen di seluruh dunia pada tahun 2030. Jumlah tersebut 70 persennya berada di negara berkembang seperti Indonesia (Anonim, 2008). Masih belum adanya obat antikanker yang memuaskan mendorong dilakukannya penelitian terhadap bahan obat alam sebagai sumber bahan obat dalam upaya pengobatan kanker.

Spons merupakan sumber bahan baku yang potensial untuk menghasilkan senyawa bioaktif baru diantaranya senyawa sitotoksik sehingga spons dapat dijadikan bahan eksplorasi pencarian senyawa baru

antikanker (Belarbi dkk., 2003). Hasil penelitian terhadap senyawa bioaktif spons juga menunjukkan banyak metabolit sekunder spons yang berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker (Müller dkk., 2004a; Müller dkk., 2004b). Aktivitas antikanker didasarkan pada sifat sitotoksik suatu senyawa (Bhakuni dan Rawat, 2005). Sebagai skrining awal sifat sitotoksik tersebut, salah satunya dapat dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Oleh karena itu maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dan potensi toksisitas ekstrak etil asetat spons *Leucetta* sp. terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk melakukan penelitian lebih lanjut pada sel kanker.

2. Metode Penelitian

2.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons *Leucetta* sp. yang diambil dari Perairan Pulau Menjangan Bali Barat, metanol, diklorometana, etil asetat, aquades, asam klorida, asam sulfat 50%, pereaksi besi (III) klorida, pereaksi Dragendorff, pereaksi Meyer, pereaksi Wagner, dan pereaksi Liebermann-Buchard, telur *Artemia salina* Leach (*Premium extra brine shrimp eggs, Seagull International, The Great Salt Lake, USA*), air laut.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, timbangan analitik, *rotary evaporator*, wadah penetas telur, *vortex*, lampu penerang, aerator, pipet mikro, *yellow tip*, *ependorf*.

2.2 Identifikasi jenis spons

Identifikasi jenis spons dilakukan di Laboratorium Sistematika Hewan, Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta.

2.3 Ekstraksi spons

Spons seberat 90 gram dipotong kecil-kecil, dimaserasi dengan pelarut metanol:diklorometana 1:1 (v/v) kemudian disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, dipartisi dengan etil asetat:air (3:2). Lapisan etil asetat diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat. Ekstrak etil asetat ini kemudian diuji toksisitasnya dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan diuji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawanya.

2.4 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Sampel yang akan diuji toksisitasnya terhadap larva *A.salina* dikerjakan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut.

2.4.1 Penyiapan Sampel dan Kontrol untuk Uji

Ekstrak yang akan diuji dibuat dalam konsentrasi 10, 50, 100, 200 dan 500 ppm dan dilarutkan dengan dimetilsulfoksida (DMSO). Kontrol percobaan yang hanya berisi pelarut DMSO tanpa sampel uji dibuat untuk mengontrol dan mengoreksi adanya kemungkinan efek yang timbul karena pelarut.

2.4.2 Penetasan Telur *A.salina*

Telur *A.salina* ditetaskan dalam wadah penetas dengan menggunakan air laut sebagai media. Wadah penetasan dilengkapi dengan lampu sebagai sumber cahaya dan diberi aerator sebagai sumber udara. Wadah yang digunakan untuk penetasan dibagi menjadi dua kompartemen yaitu bagian gelap dan bagian terang dengan sekat yang telah diberi lubang-lubang. Telur yang telah didiamkan 1 jam dimasukkan pada wadah bagian yang gelap dan akan menetas setelah lebih kurang 24 jam terhitung mulai telur ditaburkan. Larva yang digunakan untuk uji adalah larva setelah berumur 48 jam.

2.4.3 Uji dengan Metode BSLT

Masing-masing flakon yang berisi sampel ditambahkan 2 mL air laut dan 10 ekor *A.salina*, kemudian air laut ditambahkan hingga volume mencapai 5 mL. Pengambilan ekor *A.salina* dilakukan secara acak. Flakon-flakon tersebut diletakkan di bawah lampu penerangan selama 24 jam dan kemudian dihitung jumlah larva *A.salina* yang mati. Jumlah larva yang mati dihitung setelah 24 jam. Larva dikategorikan mati bila sudah tidak bergerak lagi.

2.5 Skrining Fitokimia

Untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dilakukan dengan uji fitokimia dengan pereaksi pendeteksi senyawa. Pemeriksaan senyawa alkaloid dilakukan dengan pereaksi Dragendorff, Meyer dan Wagner. Reaksi positif jika terbentuk endapan jingga dengan pereaksi Dragendorff, endapan coklat dengan pereaksi Wagner dan endapan putih dengan pereaksi Meyer (Harborne (1987) dan Robinson (1991).

Pemeriksaan senyawa flavonoid dilakukan dengan penambahan beberapa tetes HCl pekat dan 2-3 potong logam Mg.

Reaksinya disebut positif jika memberikan warna orange-merah.

Uji senyawa triterpenoid dan steroid dilakukan dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru untuk steroid dan merah-ungu untuk triterpenoid. Uji triterpenoid juga bisa dilakukan dengan penambahan H₂SO₄ 50%, dimana reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu (Harborne (1987) dan Robinson (1991)).

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan mengamati ada tidaknya busa pada larutan sampel uji yang stabil dalam waktu 10 menit dan tidak hilang pada penambahan asam klorida 2N.

Uji senyawa golongan tanin dilakukan dengan penambahan larutan FeCl₃ 1%. Adanya tanin ditandai dengan terbentuknya endapan biru hingga hitam kehijauan (Feigl, 1960).

2.6 Analisis Data

Efek toksik diperoleh dari pengamatan dengan menghitung persen kematian (mortalitas) larva *A.salina* pada tiap konsentrasi. Jumlah *A.salina* yang mati dalam tiap vial selama 24 jam dihitung. Persen kematian diperoleh dari perkalian rasio dengan 100%, yaitu larva yang mati dibagi jumlah larva awal dikali 100% untuk tiap replikasi, lalu dibandingkan dengan kontrol dan dilakukan analisis hasil sehingga diperoleh harga LC₅₀.

Dari persen kematian, dicari angka/ nilai probit tiap kelompok hewan uji melalui tabel, menentukan log konsentrasi tiap kelompok kemudian dibuat grafik dengan persamaan garis lurus hubungan antara nilai probit vs log konsentrasi, $y = bx + a$. y adalah angka probit dan x adalah log konsentrasi, kemudian ditarik garis dari harga probit 5 (= 50% kematian) menuju sumbu x , didapatkan log konsentrasi. Log konsentrasi diantilogkan untuk mendapatkan harga LC₅₀ atau LC₅₀ dapat juga dihitung dari persamaan garis lurus tersebut dengan memasukkan nilai 5 (probit dari 50% kematian hewan uji) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi. LC₅₀ dihitung dan diperoleh dari antilog nilai x tersebut (Priyanto, 2009).

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etil asetat dinyatakan dengan nilai positif (terdapat senyawa) dan negatif (tidak terdapat senyawa). Hasil ini kemudian dianalisa secara deskriptif.

3. Pembahasan Hasil

Spons yang digunakan sebagai bahan penelitian ini mempunyai bentuk tubular, struktur seperti kisi-kisi jendela dengan oskula tubular, tekstur kukuh dan lapisan ruang-ruang rongga tubuh tersusun iregular. Klasifikasi taksonominya dilakukan berdasarkan ciri-ciri fisiknya. Gambar spons yang dijadikan bahan penelitian ditunjukkan pada Gambar 1 yang diberi lingkaran putih. Klasifikasi taksonomi spons tersebut adalah Kingdom: Animalia; Filum: Porifera; Kelas: Calcarea; Subkelas: Calcinea; Ordo: Clathrinida; Familia: Leucettidae de Laubenfels, 1936; Genus: *Leucetta* Haeckel, 1872.



Gambar 1. Spons *Leucetta* sp. di dalam laut

Ekstrak etil asetat yang diperoleh dalam penelitian ini berwarna kuning kecoklatan seberat 0,89 gram kemudian diuji toksisitasnya dengan metode BSLT dan uji fitokimia. Hasil uji BSLT ekstrak etil asetat spons *Leucetta* sp. disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1: Hasil Uji BSLT Ekstrak Etil Asetat Spons *Leucetta* sp.

Sampel Uji	Konsentrasi (Hg/mL)	Jumlah <i>A.salina</i> yang mati	Kematian <i>A.salina</i> (%)
Ekstrak Etil Asetat	5	0	0
	10	2	7
	50	10	33
	100	13	43
	200	21	70
	500	30	100
Kontrol		0	0

Hasil uji ekstrak etil asetat terhadap larva *A.salina* menunjukkan bahwa persentase kematian *A.salina* semakin meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak. Berdasarkan nilai persen kematian yang diperoleh dari Tabel 1 kemudian masing-masing dicari nilai probitnya dan dianalisis dengan menggunakan analisis regresi linier sehingga diperoleh persamaan regresi adalah $y = 1,475x - 2,022$ dengan $r = 0,982$. Parameter y menunjukkan angka probit dan

parameter x menunjukkan log konsentrasi ekstrak etil asetat. Setelah dilakukan perhitungan dengan memasukkan nilai y sebesar 5 ke persamaan $y = 1,475x - 2,022$ maka diperoleh nilai x sebesar 2,019. Nilai LC50 merupakan antilog dari nilai x , yaitu 104,47.

Kategori toksisitas bahan berdasarkan nilai LC50 dibagi menjadi tiga kategori, yaitu sangat toksik dengan nilai LC50 < 30 ppm, toksik dengan nilai LC50 30-1000 ppm dan tidak toksik dengan nilai LC50 > 1000 ppm. Berdasarkan kategori tersebut, ekstrak etil asetat spons *Leucetta* sp. termasuk kategori toksik.

Uji toksisitas dengan metode BSLT ini merupakan langkah awal untuk mengetahui suatu senyawa memiliki potensi atau tidak sebagai antikanker. Carballo dkk. (2002) telah melakukan dua metode uji aktivitas sitotoksik terhadap spons, gorgonian, tunikata dan ascidian, hasilnya menunjukkan bahwa uji kematian *Artemia salina* dan sel kanker (*lung carcinoma A-549* dan *colon carcinoma HT-29*) mempunyai hubungan positif dan konsisten. Penggunaan kedua metode tersebut secara bersamaan disarankan untuk pengujian aktivitas pada isolasi senyawa alam laut. Ghisalberty (2008) menyatakan uji BSLT merupakan uji cepat dalam memprediksi aktivitas sitotoksik suatu senyawa/ekstrak dan terdapat hubungan yang positif antara toksisitas BSLT dan sifat sitotoksik suatu senyawa dengan beberapa macam sel kanker (9 KB *cell line (human nasopharyngeal carcinoma)* dan *P388 cell line (in vivo murine leukimia)*).

Hasil uji fitokimia terhadap ekstrak etil asetat spons *Leucetta* sp. disajikan pada Tabel 2. Uji fitokimia dengan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan berwarna jingga, dengan pereaksi Wagner menghasilkan endapan berwarna coklat dan dengan pereaksi Meyer menghasilkan endapan putih sehingga diduga ekstrak etil asetat mengandung alkaloid.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Spons *Leucetta* sp.

No	Uji Fitokimia	Pereaksi	Warna	Hasil
1	Flavonoid	HCl pekat + Mg	Kuning muda	-
2	Alkaloid	Dragendorff	Endapan jingga	+
		Wagner	Endapan coklat	+
		Meyer	Endapan putih	+

3	Saponin	Air panas + HCl	Tidak terbentuk busa	-
4	Tri-terpenoid/ Steroid	Liebermann-Burchard	tidak ada perubahan	-
		H ₂ SO ₄ 50%	tidak ada perubahan	-
5	Tarin	FeCl ₃ 1%	Tidak ada perubahan	-

4. Simpulan dan Saran/Rekomendasi

Ekstrak etil asetat spons *Leucetta* sp. bersifat toksik dengan harga LC50 sebesar 104,47 ppm dan mengandung alkaloid.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa aktif yang bersifat toksik dari spons *Leucetta* sp.

5. Pustaka

- Anonim. (2008). The World Health Report 2008 : Primary Health Care Now More Than Ever, World Health Organization. Switzerland.
- Anonim. (2013). Panduan Memperingati Hari Kanker Sedunia di Indonesia Tahun 2013. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
- Belarbi, E.H., Gómez, A.C., Chisti, Y., Camacho, F.G., Grima, E.M. (2003). Producing Drugs from Marine Sponges. *Biotechnol. Adv.*, 21,7, 585-598.
- Bhakuni, D.S. dan Rawat, D.S. (2005). Bioactive Marine Natural Products. Springer. New Delhi.
- Carballo, J.L., Hernández, Z.L.I., Pérez, P. dan Grávalos, M.D.G. (2002). A Comparison between two Brine Shrimp Assay to Detect Bioactive in Marine Natural Product. *BMC Biotechnology*. 2, 17, 1-5.
- Feigl, F. (1960). Spot Test in Organic Analysis. Translate by Ralph E. Oesper. Sixth English Edition.
- Ghisalberty, E.L. (2008). Detection and Isolation of Bioactive Natural Products dalam Bioactive Natural Product: Detection, Isolation and Structural Determination. SEMNAS MIPA III UNDIKSHA.
- Colegate, S.M. and Molyneux, R.J. (eds). 2nd edition. CRC Press. New York.

- Joseph, B. dan Sujatha, S. (2011). Pharmacologically Important Natural Product from Marine Sponges, *J. Nat. Prod.* 4, 5-12.
- Müller, W.E.G., Batel, R., Schröder, H.C and Müller, I.M. (2004a). Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part I- the History, Sustainable Exploitation of Biodiversity (Sponges and Invertebrates) in the Adriatic Sea in Rovinj (Croatia). *Evid. Based Complement. Altern.Med.* 1: 71-82.
- Müller, W.E.G, Schröder, H.C., Wiens, M., Ottstadt, S.P., Batel, R. and Müller, I.M. (2004b). Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part II-the Benefits: Approaches for a Sustainable Exploitation of Biodiversity (Secondary Metabolites and Biomaterials from Sponges), *Evid. Based Complement. Altern.Med.* 1, 2, 133-144.
- Priyanto. (2009). Toksikologi: mekanisme, terapi antidotum, dan penilaian resiko. Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi. Jakarta.
- Suparno, (2005). Kajian Bioaktif Spons (Porifera: Demospongiae) suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia dalam Bidang Farmasi. Publisher. Bogor