

## TOKSISITAS ISOLAT DARI EKSTRAK METANOL SPONS *Clathria* (*Thalysias*) sp TERHADAP LARVA *Artemia salina* L.

Putu Lakustini Cahyaningrum<sup>1\*</sup>, I Made Dira Swantara<sup>1,2</sup>, I Gede Mahardika<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Kimia Terapan Universitas Udayana, Denpasar, Bali-Indonesia

<sup>2</sup>Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia

<sup>3</sup>Fakultas Peternakan Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia

\*email : nining\_unhi@yahoo.co.id

**ABSTRAK :** Telah dilakukan uji toksisitas dari ekstrak metanol spons *Clathria* (*Thalysias*) sp dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva *Artemia salina* L. Ekstrak metanol spons *Clathria* (*Thalysias*) sp dipartisi dengan pelarut n-heksana, kloroform dan air. Partisi dari 19,31 gram ekstrak metanol menghasilkan ekstrak n-heksan sebanyak 1,93 gram, ekstrak kloroform sebanyak 2,48 gram, dan ekstrak air sebanyak 12,17 gram. Hasil uji toksisitas menunjukkan ekstrak kloroform memiliki toksisitas paling tinggi dengan LC<sub>50</sub> 64,57 ppm. Selanjutnya Ekstrak kloroform dipisahkan dengan kromatografi kolom silika gel menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (8:2), diperoleh 4 fraksi yaitu F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub>, F<sub>C</sub>, dan F<sub>D</sub>. Fraksi B (F<sub>B</sub>) memberikan nilai toksisitas paling tinggi dengan nilai LC<sub>50</sub> 72,44 ppm. Identifikasi isolat F<sub>B</sub> dilakukan dengan uji fitokimia yang menunjukkan adanya senyawa steroid.

**Kata Kunci :** Spons *Clathria* (*Thalysias*) sp, ekstrak metanol, uji toksisitas

**ABSTRACT :** Toxicity tests have been conducted of the methanol extract of the sponge *Clathria* (*Thalysias*) sp with methods *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) using larvae of *Artemia salina* L. Methanol extract of the sponge *Clathria* (*Thalysias*) sp was partitioned with n-hexane, chloroform and water. Partitioning of 19.31 grams of methanol extract with n-hexane yielded as much as 1.93 grams, 2.48 grams of total chloroform extract, and as much as 12.17 grams of water extract. The toxicity test showed that chloroform extract had the highest toxicity with LC<sub>50</sub> of 64.57 ppm. Furthermore chloroform extract was separated by silica gel column chromatography using n-hexane eluent: ethyl acetate (8: 2), obtained 4 fractions which were F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub>, F<sub>C</sub>, and F<sub>D</sub>. Fraction B (F<sub>B</sub>) provides the highest value of toxicity LC<sub>50</sub> value of 72.44 ppm. Identification of isolates F<sub>B</sub> conducted by phytochemical test that indicates that the presence of steroid compounds.

**Keywords :** *Clathria* (*Thalysias*) sp sponge, methanol extract, toxicity test

### 1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara maritim terbesar dengan dua pertiga bagian wilayahnya berupa lautan sehingga memiliki sumber daya alam hayati laut yang sangat melimpah [1]. Hal ini menjadikan Indonesia sebagai salah satu negara dengan kekayaan keanekaragaman (biodiversity) hayati laut tertinggi di dunia [2]. Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut dalam pencarian metabolit sekunder

senyawa bioaktif baru, salah satunya adalah spons. spons merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai kandungan beberapa senyawa dengan persentase bioaktifnya lebih besar dibanding dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat [3]

Spons menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang tinggi serta memiliki kemampuan untuk mensintesis bermacam-

macam komponen organik seperti polyketida, alkaloid, peptida dan terpene [4]. Komponen organik tersebut dapat digunakan sebagai bahan baku obat-obatan [5]. Oleh karena itu saat ini mulai banyak dilakukan penelitian tentang bahan obat yang berasal dari spons laut, salah satunya adalah spons jenis *Clathria (Thalysias)* sp.

Beberapa penelitian tentang potensi metabolit sekunder yang dimiliki spons asal perairan di Indonesia antara lain spons *Aaptos sp* dari kelas Demospongiae yang hidup di sekitar Taman Laut Bunaken telah dibuktikan mengandung senyawa golongan alkaloid naftiridin yang dilaporkan mempunyai aktivitas sitotoksik, antiviral dan antioksidan [6]. Setyowati *et al* (2007) melaporkan telah berhasil mengisolasi senyawa bersifat sitotoksik terhadap sel tumor myeloma dari spons *kaliapsis sp* asal pulau menjangan Bali Barat [7]. Senyawa *Microcionamides A* dan *Microcionamides B* yang merupakan senyawa golongan peptida dari spons *Clathria (Thalysias) abietina* menunjukkan sitotoksitas yang signifikan terhadap sel tumor payudara [8]. Dari perairan Indonesia telah diisolasi suatu senyawa aktif katirimin dari spons *Clathria basilana* yang aktivitas farmakologinya sebagai antimikroba [9].

Semakin banyaknya kasus kematian akibat penyakit kanker menyebabkan terus dikembangkannya obat yang dapat menghambat pertumbuhan dan penyebaran sel kanker dalam tubuh. Hal ini menyebabkan kebutuhan obat baru antikanker semakin mendesak, karena obat-obatan yang dipakai selama ini disamping harganya mahal juga selektivitasnya masih rendah [9] sehingga mendorong banyak orang untuk beralih ke pengobatan dengan menggunakan bahan-bahan yang berasal dari alam dengan tujuan mendapatkan khasiat yang lebih besar dan efek toksik yang seminimal mungkin [10].

Dalam penelitian ini sebagai skrining awal senyawa antikanker maka metode yang

dapat dipergunakan adalah metode Brine Shrimp lethality Test (BSLT) yaitu uji toksisitas senyawa terhadap larva udang *Artemia salina* L. Hasil uji BSLT merupakan salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Metode ini telah dibuktikan memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker. Selain itu, metode ini mudah, murah, cepat dan cukup akurat. Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya LC<sub>50</sub> selama 24 jam [11]

Pada uji pendahuluan telah dilakukan uji toksisitas ekstrak metanol dan etanol spons *Clathria (Thalysias)* sp terhadap larva *Artemia salina* L. Berdasarkan uji pendahuluan tersebut diperoleh bahwa ekstrak metanol dan etanol spons *Clathria (Thalysias) sp* memiliki nilai toksisitas dengan LC<sub>50</sub> masing-masing sebesar 30,19 ppm dan 42,66 ppm. Dari skrining awal senyawa antikanker dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menyatakan adanya dugaan bahwa spons *Clathria (Thalysias) sp* memiliki potensi sebagai senyawa antikanker. Dengan demikian, pada penelitian ini dilakukan uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach pada isolat yang difraksinasi dari ekstrak metanol spons *Clathria (Thalysias)* sp.

## 2. PERCOBAAN

### 2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons *Clathria (Thalysias) sp* yang diperoleh dari perairan Sanur, Bali. Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, pembersihan, dan pemotongan bahan. Bahan biologi sebagai uji toksisitas adalah larva *Artemia salina* L., sedangkan bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini

adalah dalam derajat p.a dan teknis yang telah didestilasi seperti : metanol, n-heksana, etilasetat, kloroform, akuades, silika gel

GF<sub>254</sub>, silika gel 60, Dimetil Sulfoksida (DMSO), kalsium klorida anhidrat (CaCl<sub>2</sub>), asam asetat anhidrat, NaOH 10%, asam sulfat

pekat, asam klorida pekat, kalium iodida, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, dan besi (III) klorida.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, neraca analitik, blender, pisau, penguap putar vakum, lampu UV, seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom, desikator, bak kaca/akuarium, plastik hitam, pipet tetes, tabung reaksi, pipet mikro dengan berbagai ukuran dan kertas saring,

## 2.2 Prosedur Kerja

### 2.2.1 Ekstraksi dan Partisi

Spons *Clathria (Thalysias) sp* sebanyak 2800 gram diekstraksi secara maserasi dengan metanol sampai terendam. Setiap 24 jam filtratnya disaring dan ampasnya dimaserasi lagi dengan metanol. Ekstraksi dilakukan sampai diperkirakan semua metabolit terekstrak. Semua filtrat metanol diuapkan menggunakan penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*) sampai menghasilkan ekstrak kasar (*crude extract*) metanol. Sebanyak 19,31 gram crude ekstrak metanol dilarutkan dalam air sebanyak 5 x 50 mL sampai semua ekstrak larut. Ekstrak air ini dipartisi dengan n-heksana (5 x 50 mL). Ekstrak n-heksana (EH) dikumpulkan dan residunya (ekstrak air) dipartisi kembali dengan kloroform (5 x 50 mL). Kemudian ekstrak kloroform (EK) dan ekstrak air (EA) dikumpulkan. Ketiga ekstrak (EH, EK, dan EA) diuapkan menggunakan penguap putar vakum sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksana (EH), ekstrak kental kloroform (EK), dan ekstrak kental air (EA). Ketiga ekstrak ini selanjutnya diuji toksisitasnya.

### 2.2.2 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Uji toksisitas dengan larva *Artemia salina* L., mengikuti metode Meyer [11]. Media untuk larva dibuat dengan menyaring air laut secukupnya. Air laut dimasukkan dalam akuarium yang dibagi menjadi dua bagian, yaitu satu bagian dibuat gelap dalam akuarium yang dibagi menjadi dua bagian, yaitu satu bagian dibuat gelap

dengan cara ditutup menggunakan kertas hitam dan bagian yang lain dibiarkan terbuka. Telur *Artemia salina* L., diletakkan secukupnya pada bagian yang gelap dan dibiarkan selama 48 jam sehingga telur menetas dan siap digunakan untuk pengujian.

Seberat 20 mg ekstrak dilarutkan dengan 2 mL pelarut. Larutan diambil sebanyak 500  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, dan 5  $\mu$ L. selanjutnya masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan pelarutnya diuapkan. Setelah pelarutnya menguap, maka ke dalam masing-masing tabung reaksi tadi ditambah 50  $\mu$ L dimetilsulfoksida (DMSO), 1 mL air laut, dan 10 ekor larva udang. Kemudian ditambah air laut sampai volumenya 5 mL sehingga dicapai konsentrasi ekstrak 1000 ppm, 100 ppm, dan 10 ppm. Masing-masing konsentrasi diulang sebanyak 3 kali. Konsentrasi 0 ppm juga dibuat sebagai kontrol tanpa penambahan ekstrak. Masing-masing tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil yang dilubangi kecil-kecil.

Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap kematian larva *Artemia salina* L.. Jumlah larva yang mati dicatat, kemudian dilakukan analisis data untuk mencari konsentrasi kematian ( $LC_{50}$ ). Ketiga ekstrak diatas diuji toksisitasnya. Ekstrak yang memperlihatkan toksisitas paling tinggi selanjutnya dipisahkan dan dimurnikan

### 2.2.3 Pemisahan dan Pemurnian

Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kromatografi kolom dengan menggunakan fasa diam silika gel 60 (70-230 mesh ASTM). Eluen yang digunakan pada kromatografi kolom adalah n-heksan : etil asetat (8:2). Kemudian isolat hasil kolom diuji toksisitasnya terhadap larva *Artemia salina* L. Fraksi yang paling toksik diidentifikasi kandungan kimianya dengan uji fitokimia.

dengan cara ditutup menggunakan kertas hitam dan bagian yang lain dibiarkan

terbuka. Telur *Artemia salina* L., diletakkan secukupnya pada bagian yang gelap dan dibiarkan selama 48 jam sehingga telur menetas dan siap digunakan untuk pengujian.

Seberat 20 mg ekstrak dilarutkan dengan 2 mL pelarut. Larutan diambil sebanyak 500  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, dan 5  $\mu$ L. selanjutnya masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan pelarutnya diuapkan. Setelah pelarutnya menguap, maka ke dalam masing-masing tabung reaksi tadi ditambah 50  $\mu$ L dimetilsulfoksida (DMSO), 1 mL air laut, dan 10 ekor larva udang. Kemudian ditambah air laut sampai volumenya 5 mL sehingga dicapai konsentrasi ekstrak 1000 ppm, 100 ppm, dan 10 ppm. Masing-masing konsentrasi diulang sebanyak 3 kali. Konsentrasi 0 ppm juga dibuat sebagai kontrol tanpa penambahan ekstrak. Masing-masing tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil yang dilubangi kecil-kecil.

Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap kematian larva *Artemia salina* L,. Jumlah larva yang mati dicatat, kemudian dilakukan analisis data untuk mencari konsentrasi kematian ( $LC_{50}$ ). Ketiga ekstrak diatas diuji toksisitasnya. Ekstrak yang memperlihatkan toksisitas paling tinggi selanjutnya dipisahkan dan dimurnikan

#### 2.2.4 Identifikasi Isolat Toksik dengan Uji Fitokimia

Identifikasi senyawa pada isolat toksik relatif murni dilakukan dengan uji golongan senyawa kimia (uji fitokimia). Uji fitokimia dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi pendeteksi golongan senyawa [12], meliputi :

##### a. Flavonoid

- Tes dengan NaOH 10%

0,02 g sampel + beberapa tetes pereaksi NaOH 10%, reaksi positif apabila terjadi perubahan warna menjadi coklat.

##### b. Alkaloid

- Tes Dragendorff

0,02 g sampel + HCl 0,1 N + beberapa tetes pereaksi Dragendorff, reaksi positif apabila terdapat endapan warna merah.

##### c. Triterpenoid dan Steroid

- Tes Liebermann-Burchard

0,02 g sampel + pereaksi Liebermann-Burchard, reaksi positif apabila terjadi perubahan warna menjadi ungu-merah-coklat untuk triterpenoid dan warna biru-hijau untuk steroid.

##### d. Saponin

0,02 g sampel + 10 mL H<sub>2</sub>O panas, reaksi positif bila terbentuk busa stabil kira-kira 10 detik setelah dikocok kuat-kuat dan tidak hilang bila ditambahkan asam klorida encer.

##### e. Polifenol

0,02 g sampel + beberapa tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1%, reaksi positif apabila terjadi perubahan warna menjadi ungu, biru atau hitam yang kuat.

### 3. HASIL dan PEMBAHASAN

#### 3.1 Ekstraksi dan Partisi

Hasil ekstraksi metabolit diperoleh ekstrak kental metanol sebanyak 20,63 gram yang berwarna coklat kehitaman. Selanjutnya ekstrak metanol diuji toksisitasnya dan diperoleh nilai  $LC_{50}$  sebesar 30,19 ppm. Ekstrak metanol tersebut dipartisi dengan 3 pelarut yaitu n-heksana, kloroform dan air.

Hasil partisi ekstrak kasar methanol diperoleh ekstrak n-heksana (EH) sebanyak 1,93 gram yang berwarna kuning pekat, ekstrak kloroform (EK) sebanyak 2,48 gram yang berwarna coklat kehitaman dan menghasilkan 12,17 gram ekstrak air (EA) yang berwarna coklat muda. Selanjutnya ketiga ekstrak diatas(EH, EK dan EA) diuji toksisitasnya terhadap larva *Artemia salina* L, diperoleh hasil seperti pada Tabel 1.

### 3.2 Pemisahan dan Pemurnian

Proses pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel 60 sebanyak 70 gram yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu 100° C selama 2 jam. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan : etil asetat (8:2). Pemisahan dengan kromatografi kolom menghasilkan empat fraksi F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub>, F<sub>C</sub>, dan F<sub>D</sub>. Pada uji toksisitas terhadap larva *Artemia Salina* L menunjukkan Fraksi B memiliki nilai toksisitas paling tinggi dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 72,44 ppm. Hasil uji toksisitas ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 1.** Hasil Uji Toksisitas Masing Masing Ekstrak (n-heksan, kloroform, dan air) Terhadap Larva *Artemia salina* L.

Sampel	Nilai LC <sub>50</sub> (ppm)
Ekstrak n-heksan	173,78
Ekstrak Kloroform	64,57
Ekstrak Air	234,42

**Tabel 2.** Hasil Uji Toksisitas Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Terhadap Larva *Artemia Salina* L.

Fraksi	Nilai LC <sub>50</sub> (ppm)
F <sub>A</sub>	186,21
F <sub>B</sub>	72,44
F <sub>C</sub>	165,96
F <sub>D</sub>	524,81

Fraksi B selanjutnya diidentifikasi kandungan senyawanya dengan uji fitokimia.

### 3.3 Identifikasi Isolat Spons (F<sub>B</sub>) dengan Uji fitokimia

Fraksi B spons *Clathria (Thalysias)* diidentifikasi senyawanya secara fitokimia.

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa fraksi C mengandung senyawa golongan steroid. Hasil skrining fitokimia disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Uji Fitokimia Untuk Fraksi F<sub>B</sub>

Uji Fitokimia	Perubahan Warna	Kesimpulan
Alkaloid	Tidak ada perubahan	Negatif
	Tidak ada perubahan	Negatif
Flavonoid	Tidak ada perubahan	Negatif
	Tidak ada perubahan	Negatif
Triterpenoid / steroid	Hijau	Positif steroid
Polifenol	Tidak ada perubahan	Negatif
Saponin	Busa hilang setelah penambahan HCl encer	Negatif

## 4. KESIMPULAN

1. Isolat (F<sub>B</sub>) dari fraksi kloroform ekstrak metanol spons *Clathria (Thalysias)* sp bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* L. dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 72,44 ppm.
2. Hasil uji fitokimia Isolat FB diduga mengandung senyawa steroid.

## 5. UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Asro, M.,Yusnaini., dan Halili.2013. Pertumbuhan Spons (*Stylotella aurantium*) yang ditransplantasi pada berbagai Kedalaman. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. Vol 01 No.01: 133-144 ISSN : 2303-3959
- [2] Dahuri, R. 2003. *Keanekaragaman Hayati Laut*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.

- [3] Murniasih, T dan Rachmaniar, R. 1999. Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia* 1998. Jakarta 14-15 Oktober 1998: 151-158. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jakarta.
- [4] Sjorgen, M. 2006. Antifouling Activity of Synthesized Peptide Analogs of the Sponge Metabolite Baretin. *Peptides* 27 ( 9 ): 2058-2064.
- [5] Amir, I. Dan Budiyanto, A.1996. Mengenal Spons Laut (*Demospongiae*) Secara Umum. *Oceana*,21,(2),15-31.
- [6] Widjhati, R.A., Supriono dan Subiantoro. 2004. Pengembangan senyawa bioaktif dari biota laut (review kegiatan penelitian biota laut di BPPT). *Makalah dalam orum Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Indonesia*. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Jakarta, 25 Maret 2004. P. 89-95
- [7] Setyowati, E., 2007. Isolasi Senyawa Sitotoksik Spons Kaliapsis. *Majalah Farmasi Indonesia* ,Volume 18(4) :183-189.
- [8] Davis, R.A., Mangalindan,G.C., Bojo,Z.P., Antemano,R.R., Rodriquez, N.O., Concepcion, G.P., Samsai, S.C., Guzman, D., Cruz.,L.J., Tasdemir, M.K.A., Feng, X., Carter, T.G and Ireland, C.M. 2004. Microcionamides A and B, bioactive peptides from the philippine sponge *Clathria* (*Thalysias*) *Abietina*. *Journal Organic Chemistry*, 69 (12) : 4170-4176
- [9] Soediro, I., 1998. Produk Alam Hayati dan Prospek Pemanfaatannya di Bidang Kesehatan dan Kosmetika. *Proseeding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia*, Jakarta.
- [10] Edianto, D. 2006. *Kanker Serviks*. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirahardjo: Jakarta.
- [11] Meyer, B.N, Ferrigni, N.R, and McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active plant Constituents. *Journal of Planta Medical Research*, Volume 45, pp.31-34.
- [12] Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerbit ITB, Bandung.