

UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI EKSTRAK SPONS *Haliclona fascigera* TERHADAP LARVA *Artemia salina* L.

Kadek Dewi Wirmandiyanti^{1*}, Manuntun Manurung¹, I Made Dira Swantara¹
¹Program Magister Kimia Terapan, Universitas Udayana, Bali
*Email : dwirmandiyanti@gmail.com

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas ekstrak spons *Haliclona fascigera* terhadap larva *Artemia salina* L dan mengetahui senyawa yang terkandung dalam isolat toksik ekstrak spons. Hasil penelitian menunjukkan fraksi kloroform memiliki toksisitas paling tinggi dengan LC₅₀ 63,10 ppm. Ekstrak kloroform selanjutnya dipisahkan dengan menggunakan eluen kloroform : etil asetat (8:2) dan diperoleh 5 fraksi. Berdasarkan hasil uji toksisitas terhadap kelima fraksi tersebut menunjukkan fraksi 5 (F₅) mempunyai toksisitas paling tinggi dengan LC₅₀ 89,13 ppm. Identifikasi isolate toksik F₅ dengan GCMS menunjukkan senyawa yang terkandung adalah 2-decenal, 3-eicosene, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanon, dibutil-1,2-benzendikarboksilat, asam heksadekanoat, 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide dan dioktil-1,2-benzendikarboksilat.

Kata kunci: *Haliclona fascigera*, uji toksisitas, ekstrak kloroform

ABSTRACT: The main purpose of this research is to determine the toxicity of sponge *Haliclona fascigera* against larvae of *Artemia salina* and determine the compounds contained in the toxic isolates of sponge. The results showed chloroform fraction had the highest toxicity with LC₅₀ of 63.10 ppm. Chloroform extracts were then separated by using eluent chloroform: ethyl acetate (8:2) and obtained five fractions. Based on the results of toxicity tests of the fifth fraction indicates the fraction 5 (F₅) has the highest toxicity with LC₅₀ of 89.13 ppm. Identification of toxic isolates F₅ with GCMS show contained compound is 2-decenal, 3-eicosene, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanon, dibutyl-1,2-benzendikarboksilat, heksadekanoat acid, 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide and dioctyl-1,2-benzendikarboksilat.

Keywords: *Haliclona fascigera*, toxicity test, chloroform extract

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab utama kematian diseluruh dunia. Menurut data WHO, dari 58 juta kematian di seluruh dunia dalam tahun 2005, tercatat 7.6 juta (13%) diantaranya disebabkan oleh kanker [1]. Terapi kanker yang ada saat ini masih belum efektif. Tidak semua pasien dan atau jenis kanker responsive terhadap obat-obat kanker (*chemotherapeutic agents*) Selain itu, banyak

obat-obat kanker yang menimbulkan efek samping dan juga efek resisten [2]. Oleh karena itu maka pencarian sumber-sumber baru untuk menghasilkan senyawa antikanker terus dilakukan antara lain dari senyawa bioaktif yang dihasilkan organisme laut termasuk spons [3].

Spons mengandung senyawa aktif yang persentase keaktifannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang

dihasilkan oleh tumbuhan darat [4]. Senyawa bioaktif yang dihasilkan spons laut merupakan sumber senyawa-senyawa baru yang memiliki aktivitas farmakologis yaitu sifat toksik sehingga dapat digunakan untuk membunuh sel kanker [2].

Sejumlah metabolit pada spons yang mempunyai bioaktivitas telah diisolasi dan diidentifikasi. Senyawa *discodermolide* merupakan metabolit dari spons *Discodermia dissoluta* yang aktif sebagai antikanker. Halichondrin B yang diisolasi dari spons *Halichondria okadai* terbukti aktif melawan leukemia [5]. Dari spons *Stylissa flabeliformis*, berhasil diisolasi senyawa jaspamida yang berpotensi sebagai antikanker [6]. Dua senyawa alkaloid yang diisolasi dari spons *Petrosia sp.* bersifat toksik terhadap sel myeloma sehingga berpotensi sebagai obat antikanker [2]. Berdasarkan penelitian dari Fajarningsih *et al* (2006) dikatakan bahwa Spons *Crella papilata* memiliki potensi sebagai antitumor [7].

Saat ini sudah dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui sifat toksik ekstrak etanol dan ekstrak diklorometan dari spons *Haliclona fascigera* tersebut menggunakan larva *Artemia salina* Leach. Dari hasil uji tersebut diperoleh nilai LC_{50} ekstrak etanol dan diklorometan masing-masing 15,85 ppm dan 446,68 ppm. Selanjutnya diisolasi dan diidentifikasi senyawa toksik yang terkandung dalam ekstrak etanol spons *Haliclona fascigera*.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spons *Haliclona fascigera* yang diperoleh dari Perairan Nusa Penida. larva *Artemia salina* L. yang digunakan saat uji toksisitas. Bahan-bahan kimia yang dalam

derajat p.a dan teknis yang telah didestilasi antara lain etanol, n-heksana, etilasetat, kloroform, silika gel GF₂₅₄, silika gel 60, DMSO, kalsium klorida anhidrat (CaCl₂).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : seperangkat alat gelas, penguap putar vakum, seperangkat alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), seperangkat alat kromatografi kolom, seperangkat alat Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (GC-MS), lampu UV 254 dan 366 nm, kertas saring, pipet mikro, timbangan elektronik, oven, dan blender.

2.2 Metode

2.2.1 Ekstraksi dan Partisi

Spons *Haliclona fascigera* sebanyak 3000 gram diekstraksi secara maserasi dengan etanol sampai terendam. Setiap 24 jam filtratnya disaring dan ampasnya dimaserasi lagi dengan etanol. Ekstraksi dilakukan sampai diperkirakan semua metabolit terekstrak. Semua filtrat etanol diuapkan menggunakan penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*) sampai menghasilkan ekstrak kasar (*crude extract*) etanol. Sebanyak kira-kira 20 gram crude ekstrak etanol dilarutkan dalam campuran air – etanol (7:3) sampai semua larut. Ekstrak air etanol ini selanjutnya dipartisi dengan menggunakan n-heksan (5 x 50 mL). Ekstrak n-heksan (EH) dikumpulkan. Ekstrak air yang mengandung etanol diuapkan etanolnya sampai bebas etanol lalu dipartisi dengan menggunakan kloroform (5x50mL). Kemudian ekstrak kloroform (EK) dan ekstrak air (EA) dikumpulkan. Ketiga ekstrak (EH, EK, dan EA) diuapkan menggunakan penguap putar vakum sehingga diperoleh ekstrak kental EP, EK dan EA. Ketiga ekstrak ini selanjutnya diuji toksisitasnya.

2.2.2 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Uji toksisitas dengan larva *A. salina* Leach mengikuti metode Meyer (1982) [8]. Media untuk larva dibuat dengan menyaring air laut secukupnya. Air laut dimasukkan dalam akuarium yang dibagi menjadi dua bagian, yaitu satu bagian dibuat gelap dengan cara ditutup dengan kertas hitam dan bagian yang lain dibiarkan terbuka. Telur *A. salina* 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 etanol. Larutan diambil sebanyak 500 μ L, 50 μ L, dan 5 μ L, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan pelarutnya diuapkan. Setelah kering, maka ke dalam masing-masing tabung reaksi tadi dimasuki 50 μ L dimetilsulfoksida, 1 mL air laut, dan 10 ekor larva. Kemudian ditambah air laut sampai volumenya 5 mL sehingga dicapai konsentrasi ekstrak 1000 ppm, 100 ppm, dan 10 ppm. Konsentrasi 0 ppm juga dibuat sebagai kontrol tanpa penambahan ekstrak. Masing-masing tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil yang berlubang kecil-kecil. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap kematian larva *Artemia salina*. Jumlah larva yang mati dicatat, kemudian dilakukan analisis data untuk mencari konsentrasi kematian (LC_{50}). Ekstrak yang paling toksik selanjutnya dipisahkan dan dimurnikan.

2.2.3 Pemisahan

Pemisahan dengan teknik kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel 60 (70-230 mesh ASTM) dan fasa geraknya menggunakan eluen campuran kloroform : etil asetat (8:2). Sebanyak kurang lebih 1,5 gram sampel dilarutkan dalam eluen kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan hati-hati sambil kran dibuka dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Eluen secara

terus-menerus dialirkan ke dalam kolom sampai terjadi pemisahan. Setiap 3 mL eluat ditampung dalam satu botol penampung. Elusi dihentikan setelah diperkirakan semua komponen keluar dari kolom. Setiap botol eluat dilihat pola nodanya pada plat kromatografi lapis tipis. Eluat yang memiliki pola pemisahan noda yang sama digabungkan sehingga diperoleh beberapa fraksi. Fraksi-fraksi yang diperoleh diuji toksisitasnya. Fraksi yang paling toksik akan diidentifikasi senyawanya.

3. HASIL dan PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi dan Partisi

Spons *Haliclona fascigera* sebanyak 3000 gram diekstraksi secara maserasi dengan etanol sampai terendam. Setiap 24 jam filtratnya disaring dan ampasnya dimaserasi lagi dengan etanol. Ekstraksi dilakukan sampai diperkirakan semua metabolit terekstrak. Semua filtrat etanol diuapkan menggunakan penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*) sampai menghasilkan ekstrak kasar (*crude extract*) etanol.

Ekstrak kasar etanol sebanyak 20 gram dilarutkan dalam etanol:air (3:7), lalu dipartisi dengan 5 x 50 mL n-heksan. Lapisan n-heksan dipisahkan dan dievaporasi, sehingga menghasilkan ekstrak n-heksan (EH) sebanyak 1,53 gram. Residunya (ekstrak etanol-air) diuapkan etanolnya sampai etanolnya habis, lalu dipartisi dengan kloroform (5 x 50mL). Lapisan kloroformnya dipisahkan lalu diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kloroform (EK) sebanyak 1,65 gram. Ekstrak airnya diuapkan sehingga diperoleh ekstrak air (EA) sebanyak 15,48 gram. Ketiga ekstrak (EH, EK dan EA) diuji toksisitasnya terhadap larva *Artemia Salina*, diperoleh hasil seperti Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Spons *Haliclona fascigera* Terhadap Larva *Artemia salina* L.

No	C (ppm)	larva mati			% kematian	LC ₅₀ (ppm)
		I	II	III		
Ekstrak n-heksan						
1	0	0	0	0	0	398,11
2	10	1	2	0	4,62	
3	100	2	4	3	25,53	
4	1000	5	6	5	66,67	
Ekstrak kloroform						
1	0	0	0	0	0	63,10
2	10	1	3	2	15,22	
3	100	4	6	6	58,97	
4	1000	9	9	10	96,23	
Ekstrak air						
1	0	0	0	0	0	199,53
2	10	2	2	1	8,62	
3	100	4	5	3	37,78	
4	1000	5	8	7	78,72	

Dari hasil perhitungan uji toksisitas menunjukkan bahwa ekstrak kloroform bersifat paling toksik yaitu memiliki nilai LC₅₀ sebesar 63,10 ppm, sedangkan ekstrak air dan n-heksan masing-masing memiliki nilai LC₅₀ sebesar 199,53 ppm dan 398,11 ppm. Hasil uji toksisitas ekstrak kloroform yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak n-heksan dan ekstrak air menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang memiliki toksisitas tinggi pada spons *Haliclona fascigera* memiliki sifat semipolar. Selanjutnya terhadap ekstrak kloroform dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom.

3.2 Pemisahan dan Pemurnian

Pada proses kromatografi kolom, fase diam yang digunakan adalah silica gel 60 sebanyak 24 gram, fase gerak yang digunakan adalah campuran pelarut kloroform : etilasetat (8 : 2), sedangkan sampel (ekstrak kloroform) yang digunakan sebanyak 1,15 gram. Eluat ditampung setiap 3 mL sehingga dihasilkan 162 botol eluat.

Setelah dilakukan pendeteksian noda dengan KLT maka berdasarkan kesamaan pola nodanya diperoleh lima fraksi yaitu F₁-F₅ dengan berat berturut-turut F₁ = 0,54 gram, F₅ = 0,12 gram, F₃ = 0,07 gram, F₄ = 0,02 gram dan F₅ = 0,32 gram.

Selanjutnya kelima fraksi tersebut diuji toksisitasnya, ditunjukkan pada Tabel 2

Tabel 2. Hasil Uji Toksisitas F₅ Terhadap Larva *Artemia salina* Leach

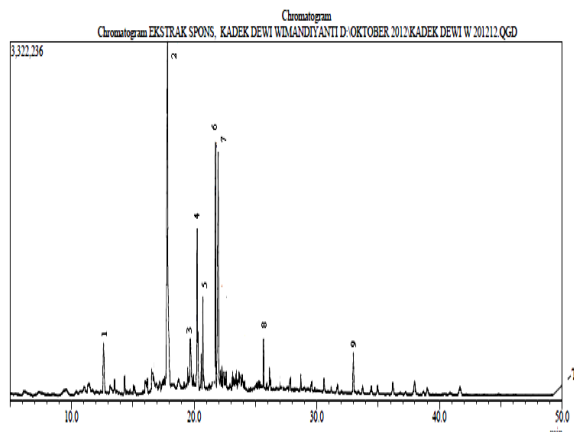
Fraksi	C (ppm)	larva mati			% kematian	LC ₅₀ (ppm)
		I	II	III		
1	0	0	0	0	0	141,25
	10	2	2	0	8,00	
	100	4	3	4	42,86	
	1000	10	10	9	97,78	
2	0	0	0	0	0	251,19
	10	1	2	1	6,67	
	100	3	5	5	36,17	
	1000	6	4	7	72,34	
3	0	0	0	0	0	281,84
	10	0	3	1	6,56	
	100	3	4	3	31,11	
	1000	7	7	5	75,00	
5	0	0	0	0	0	89,13
	10	2	1	0	6,52	
	100	6	4	5	52,94	
	1000	10	9	10	97,92	

Dari hasil pengujian menunjukkan Fraksi 5 memiliki toksisitas paling tinggi dibandingkan fraksi lainnya, yaitu sebesar 89,13 ppm, hal ini berarti fraksi 5 dapat membunuh 50% larva *Artemia salina* L pada konsentrasi tersebut. Berdasarkan harga R_f yang dimiliki oleh fraksi 5 yaitu 0,31 atau paling lama tertahan dalam fasa diamnya maka dapat diindikasikan memiliki sifat paling polar dibandingkan fraksi 1-4. Fraksi 5 selanjutnya diidentifikasi dengan GCMS.

3.3 Identifikasi isolat toksik (F5)

Identifikasi isolat toksik dilakukan dengan Kromatografi Gas-Spektroskopi

Massa (GC-MS). Hasil kromatografi gas-spektroskopi massa isolat toksik F₅ spons *Haliclona fascigera* memperlihatkan adanya 9 puncak yang mengindikasikan adanya 9 senyawa seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram F₅ ekstrak kloroform spons *Haliclona fascigera*

Selanjutnya masing-masing puncak diidentifikasi dengan spektrometer massa. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan spektrum massa dengan senyawa-senyawa yang sudah diketahui dan terprogram dalam *database* GC-MS. Dari 9 puncak yang diperoleh, hanya 7 puncak saja yang dapat dianalisis yaitu puncak 1, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9. Sedangkan puncak 2 dan 3 tidak dapat dianalisis atau tidak sesuai dengan *database* Hasil analisis spektrum massa berdasarkan *database* NIST62 dan WILLEY229.

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan diketahui senyawa turunan asam benzendikarboksilat (asam phtalat) memiliki sifat toksik seperti yang dipaparkan oleh Chairman *et al* (2012) [9] menyatakan senyawa Bis (etil heksil) phtalat yang diisolasi dari *Streptomyces bangladeshiensis* menunjukkan aktivitas antimikroba, selain itu senyawa 2-etil heksil phtalat yang diisolasi dari *Alchornea cordifolia* memiliki aktivitas inflamasi. Sudha dan Masilamani (2012) [10]

Tabel 3 Senyawa yang diduga dari Puncak F₅ Ekstrak Spons *Haliclona fascigera*

Peak	M ⁺	t _r (menit)	% area	Senyawa yang diduga
1	154	12,61	5,09	2-decenal
2	-	17,836	40,67	-
3	-	19,683	5,50	-
4	280	20,253	7,19	3-eicosene
5	268	20,719	3,80	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone
6	278	21,744	11,95	dibutil-1,2-benzendikarboksilat (dibutil phtalat)
7	256	21,825	20,56	asam heksadekanoat
8	324	25,656	2,36	4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide
9	296	32,978	2,88	dioktil-1,2-benzendikarboksilat (dioktil phtalat)

menyatakan bahwa senyawa bis 2-metilpropilbenzendikarboksilat dan isooktil phtalat yang diisolasi dari *Streptomyces avidinii* strain SU4 memiliki aktivitas antikanker. Yoke *et al* (2012) [11] mengisolasi dinonil-1,2-benzendikarboksilat dari *Clinachantus nutans* Lidau yang memiliki efektivitas antioksidan dan antiproliferasi. Rizwan *et al* (2012) [12] mengisolasi mono (2- etil heksil)-1,2-benzendikarboksilat dari *Agave attenuate* dikatakan memiliki aktivitas antimikroba. Berdasarkan ulasan di atas, dapat diduga bahwa senyawa dibutil-1,2-benzendikarboksilat dan dioktil-1,2-benzendikarboksilat yang diisolasi dari spons *Haliclona fascigera* memiliki sifat toksik.

4. KESIMPULAN

- 1) Isolat F₅ dari ekstrak spons *Haliclona fascigera* memiliki sifat toksik terhadap larva *Artemia Salina* Leach dengan nilai LC₅₀ sebesar 89,13 ppm.

- 2) Senyawa yang teridentifikasi dalam Isolat toksik (F5) dari ekstrak spons *Haliclona fascigera* adalah 2-decenal, 3-eicosene, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone, dibutil-1,2-benzendikarboksilat (dibutil phtalat), asam heksadekanoat, 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide dan dioktil-1,2-benzendikarboksilat (dioktil phtalat).
- 3) Senyawa yang diduga memiliki sifat toksik adalah dibutil-1,2-benzendikarboksilat (dibutil phtalat) dan dioktil-1,2-benzendikarboksilat (dioktil phtalat).

5. UCAPAN TERIMA KASIH

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

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Moeljopawiro, S., M.R. Anggelia, D. Ayuningtyas, B. Widaryanti, Y. Sari, dan I.M. Budi. 2007. *Pengaruh Sari Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.) Terhadap Sel Kanker Payudara dan Usus Besar*. *Jurnal Berkala Ilmiah Biologi* 6(2): 121 – 130.
- [2] Astuti P., G. Alam, Hartati W, D. Sari dan S. Wahyuono. 2005. *Uji sitotoksik senyawa alkaloid dari spons Petrosia sp: potensial pengembangan sebagai Antikanker*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 16 (1), 58 – 62, 2005
- [3] Setyowati E.P, U.A. Jenie, Sudarsono, B. Kardono, R. Rahmat dan E. Meiyanto. 2007. *Isolasi senyawa sitotoksik spons Kaliapsis*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 18(4), 183 – 189, 2007
- [4] Murniasih T, dan Rachmaniar R. 1999. *Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu*. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98*. Jakarta 14 – 15 Oktober 1998: 151-158. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jakarta, 1999.
- [5] Faulkner, D. J., 1994, *Marine Natural Product*, Vol 10, p.497.
- [6] Wahyuono, S., 2003. *Mencari Obat Antikanker dari Spons Perairan Indonesia*. <http://www.pikiran-rakyat.com>, 23 mei 2003.
- [7] Fajarningsih N.D, Hedi Indra Januar, Muhammad Nursid dan Thamrin Wikanta. 2006. *Potensi Antitumor Ekstrak Spons *Crella papilata* Asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu*. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* Vol. 1 No. 1, Juni 2006
- [8] Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., dan Mc Laughlin, J.L., 1982., *Brine Shrimp : a convenient general bioassay foe active plant constituent.*, *Planta Medica* 45 : 31-34
- [9] Chairman K, R.Singh AJA, Alagumuthu G. 2012. *Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges*. *Asian Pac J Trop* 2(2): 234-238.
- [10] Sudha dan Masilamani S.. 2012. *Characterization of Cytotoxic Compound from Marine Sediment Derived Actinomycete *Streptomyces avidinii* strain SU4*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(10): 770-773
- [11] Yoke K.Y, J.J. Tan, S.S. Teh, S.H. Mah, Gwendoline C.L, H.S Chiong dan Z. Ahmad. 2012. *Clinacanthus nutans Extracts are Antioxidant with Anti-proliferative Effect on Cultured Human Cancer Cell Lines*. Department of Biomedical Science. Universitas Putra Malaysia
- [12] Rizwan K., M. Zubair, N. Rasool, M. Riaz, M. Zia-Ul-Haq, dan V. de Feo. 2012. *“Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*,” International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 5, pp. 6440-6451,