

IDENTIFIKASI DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL SPONS *Hyrtios erecta* TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* L.

Rr. Anisa Hernindya^{1*}, I Made Dira Swantara^{1,2}, Ni Made Suaniti^{1,2}

¹Magister Kimia Terapan, Pascasarjana Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Indonesia

²Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Denpasar, Telp (0361)703137, Indonesia

*anisahernindya@hotmail.com

ABSTRAK: Spons merupakan biota laut paling dominan dalam filum Porifera yang memiliki potensi biologis sebagai antikanker. Telah dilakukan identifikasi dan uji toksisitas pada ekstrak etanol Spons *H. erecta* menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dengan bioindikator larva udang *Artemia salina* Leach. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat toksisitas ekstrak etanol Spons *H. erecta* sebagai antikanker. Partisi dari 10,8 gram ekstrak etanol menggunakan n-heksan, kloroform, dan air kemudian diuapkan menghasilkan ekstrak n-heksan sebanyak 3,13 gram, ekstrak kloroform sebanyak 1,63 gram, dan ekstrak air sebanyak 9,25 gram. Hasil uji toksisitas menunjukkan ekstrak n-heksan memiliki toksisitas paling tinggi dengan nilai LC_{50} 316,22 ppm. Selanjutnya dilakukan pemisahan dan pemurnian dengan kromatografi kolom menggunakan eluen n-heksan: kloroform (2:8) sehingga menghasilkan empat fraksi yaitu F_A , F_B , F_C , dan F_D . Uji toksisitas pada semua fraksi menunjukkan bahwa fraksi C (F_C) adalah yang paling toksik dengan LC_{50} 50,11 ppm dan berdasarkan uji fitokimia diduga merupakan gabungan senyawa alkaloid, steroid dan polifenol.

Kata kunci: Spons *Hyrtios erecta*, uji toksisitas, *Artemia salina* Leach.

ABSTRACT: Sponges are the most dominant marine life in the phylum Porifera which have biological activities as anticancer. Identification and the toxicity test of ethanol extract of *H. erecta* sponges using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) with bio-indicators of *Artemia salina* Leach has been conducted. The purpose of this study was to determine the level of toxicity of the ethanol extract of *H. erecta* sponges as anticancer. Partition of 10,8 grams of ethanol extract using n-hexane, chloroform, and water followed by evaporation leaved n-hexane extracts, chloroform extract, and water extract of 3,13 grams, 1,63 grams, and 9,25 grams, respectively. The results of toxicity tests showed that n-hexane extract has the highest toxicity with LC_{50} value of 316,22 ppm. The n-hexane extract were then separated by column chromatography using n-hexane: chloroform (2:8) as eluent and 4 fractions (F_A , F_B , F_C , and F_D) were obtained. The toxicity tests of all the fractions showed that fraction C (F_C) was the most toxic with LC_{50} 50,11 ppm. Based on the phytochemical tests the active compounds were suspected to be a combination of alkaloid, steroid and polyphenols.

Keywords: *H. Erecta* sponge, toxicity test, *Artemia salina* Leach.

1. PENDAHULUAN

Indonesia sebagai salah satu negara dengan kekayaan keanekaragaman hayati laut tertinggi di dunia dan juga didukung kenyataan bahwa laut Indonesia memiliki hamparan terumbu karang terluas di dunia, yaitu 51.020 km² atau sekitar 17,95% dari luas seluruh terumbu karang di dunia dan kedudukannya merupakan pusat segitiga

terumbu karang dunia [3]. Diperkirakan lebih dari 35.000 spesies biota laut memiliki potensi sebagai penghasil bahan obat-obatan, sementara yang dimanfaatkan baru sekitar 5.000 spesies [1].

Spons laut merupakan hewan yang paling dominan dalam filum Porifera. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh spons laut memiliki golongan senyawa

kimia antara lain alkaloid, terpenoid, fenol, peptida, steroid dan poliketida [7]. Oleh karena itu saat ini mulai banyak dilakukan penelitian tentang bahan obat yang berasal dari spons laut, salah satunya adalah spons jenis *Hyrtios erecta*.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengidentifikasi aktivitas biologis yang dimiliki oleh spons dari jenis *Hyrtios erecta* (*H. erecta*). Dua alkaloid baru yaitu hyrtiosins A dan B telah diisolasi dari *H. erecta*. Penelitian menyebutkan bahwa *H. erecta* mengandung beberapa senyawa aktif, seperti spongistatin yang merupakan senyawa antikanker, *15-oxopupehonol* yaitu sebagai penghambat sel kanker dan malaria, sesterpen 1 yang menghambat sel leukemia, dan *dipupehedion* sebagai penghambat sel kanker [5].

Senyawa bioaktif yang akan digunakan sebagai produk farmasi untuk antikanker harus diuji bioaktivitasnya terlebih dahulu. Salah satu metode uji sitotoksitas adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang dapat digunakan untuk praskrining terhadap senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antikanker [6] dan [8]. Bioindikator yang digunakan uji toksisitas tersebut adalah larva udang *Artemia salina* Leach. Toksisitas yang tinggi dari senyawa uji sangat berkorelasi dengan aktivitas senyawa sebagai antikanker [4].

Pada uji pendahuluan telah dilakukan uji toksisitas ekstrak etanol dan diklorometana (DCM) spons *H. erecta* terhadap larva *Artemia salina* L. Berdasarkan uji toksisitas tersebut diperoleh nilai LC_{50} ekstrak etanol dan DCM berturut-turut adalah 25,11 ppm (toksik) dan 1000 ppm (tidak toksik). Dengan demikian, pada penelitian ini dilakukan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach pada isolat yang difraksinasi dari ekstrak etanol spons *Hyrtios erecta*.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons *H. erecta*, larva (*Artemia salina* Leach), metanol teknis, metanol p.a, etanol p.a, diklorometana teknis, n-heksan teknis, n-heksan p.a, etilasetat teknis, etil asetat p.a, silika gel GF₂₅₄, silika gel 60, DMSO, 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 adalah seperangkat alat gelas, neraca analitik, blender, pisau, penguap putar vakum, lampu UV, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, desikator, tabung reaksi, plat tetes, bak kaca/akuarium, plastik hitam, pipet tetes, dan pipet mikro dengan berbagai ukuran.

2.2 Metode

Ekstraksi dan Fraksinasi

Spons *H. erecta* diperoleh dari perairan Raja Ampat, Papua yang tumbuh di dasar laut dengan kedalaman 8 meter dari permukaan. Sebanyak 500 gram spons *H. erecta* dicuci bersih, dihaluskan dengan blender dan direndam dengan etanol selama 4x24 jam. Filtrat dikumpulkan dan dievaporasi sehingga didapat ekstrak pekatnya. Sebanyak 10,8 gram ekstrak etanol dilarutkan dalam campuran etanol dan air (3:7), dipartisi dengan n-heksan dan kloroform, kemudian dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak pekat n-heksan sebanyak 3,13 g, ekstrak pekat kloroform 1,63 g, dan ekstrak pekat air 9,25 g.

Ketiga ekstrak diuji toksisitasnya terhadap larva *Artemia salina* L. Fraksi yang paling toksik dilanjutkan untuk dipisahkan dan dimurnikan.

Pemisahan dan Pemurnian

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

Uji Toksisitas terhadap Larva *A. salina*

Uji toksisitas dengan larva *A. salina* Leach mengikuti metode Meyer (1982). 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.

Seberat 20 mg ekstrak dilarutkan dengan 2 mL pelarut. 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 ditambahkan 50 μ L dimetilsulfoksida, 1 mL air laut, dan 10 ekor larva udang. Kemudian ditambahkan 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}).

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 [2], 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 H₂O 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 FeCl₃ 1%, reaksi positif apabila terjadi perubahan warna menjadi ungu, biru atau hitam yang kuat.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 10,8 g ekstrak kental etanol dilarutkan dengan etanol : air (3:7) sebanyak 200 mL, kemudian dipartisi dengan n-heksan berulang-ulang 5 x 50 ml. Fraksi n-heksan dipisahkan dan dievaporasi sehingga menghasilkan 3,13 g ekstrak n-heksana yang berwarna kuning pekat. Ekstrak etanol-air diuapkan etanolnya, kemudian dipartisi dengan kloroform sebanyak 5x50 ml dan dipisahkan sehingga menghasilkan ekstrak

1,63 gram kloroform dan 9,25 gram ekstrak air. Berdasarkan berat ekstrak dapat dilihat bahwa senyawa yang terkandung lebih banyak terikat pada pelarut polar. Ekstrak pekat n-heksan, kloroform, dan air kemudian diuji toksisitasnya terhadap larva *Artemia salina* L. Nilai uji toksisitas menunjukkan ekstrak n-heksan, kloroform, dan air tergolong toksik ($LC_{50} < 1000$ ppm) dan ekstrak n-heksan memiliki toksisitas paling tinggi dengan nilai LC_{50} 316,22 ppm. Ekstrak n-

heksan selanjutnya dipisahkan dan dimurnikan dengan kromatografi kolom. Nilai toksisitas ketiga fraksi ini cenderung menurun jika dibandingkan dengan ekstrak etanol, hal ini disebabkan senyawa-senyawa toksik yang terkandung di masing-masing fraksi bekerja sinergis sehingga ekstrak etanol yang belum difraksinasi memiliki toksisitas lebih tinggi. Hasil uji toksisitas ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Toksisitas ekstrak n-heksan, kloroform, dan air spons *H. erecta* terhadap Larva *Artemia salina* L.

Fraksi	C (ppm)	Larva yang mati			% Mortalitas	LC_{50} (ppm)
		1	2	3		
n-heksan	0	0	0	0	0	316,22
	10	0	0	0	0	
	100	3	2	1	17	
	1000	9	7	9	83	
Kloroform	0	0	0	0	0	501,18
	10	0	0	0	0	
	100	3	3	4	22	
	1000	4	5	4	62	
Air	0	0	0	0	0	446,68
	10	0	0	0	0	
	100	3	3	1	17	
	1000	8	8	3	70	

Pemisahan dan Pemurnian

Proses kromatografi kolom ini menggunakan kolom dengan panjang 40 cm, diameter 2 cm. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 sebanyak 70 gram, fase gerak yang digunakan adalah campuran pelarut n-heksan dan kloroform (2:8), sedangkan sampel ekstrak n-heksan yang digunakan sebanyak 1,12 gram.

Eluat ditampung setiap 3 mL dan dihasilkan 177 botol eluat. Semua eluat dideteksi pola nodanya pada kromatografi lapis tipis. Eluat dengan pola noda yang sama digabungkan sehingga menghasilkan

empat fraksi F_A , F_B , F_C , dan F_D . Namun hanya 3 fraksi yang bisa dilanjutkan untuk diuji toksisitasnya yaitu F_A , F_C , dan F_D . Fraksi B tidak dapat dilanjutkan karena jumlahnya tidak mencukupi untuk pengujian selanjutnya. Hasil uji toksisitas ditunjukkan pada Tabel 2.

Dari ketiga fraksi yang diuji, fraksi C memiliki toksisitas paling tinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 50,11 ppm. Fraksi C selanjutnya diidentifikasi kandungan senyawanya dengan uji fitokimia.

Tabel 2. Hasil Uji Toksisitas Fraksi Hasil Kromatografi Kolom terhadap Larva *Artemia salina* L.

Fraksi	C (ppm)	Larva yang mati			% Mortalitas	LC ₅₀ (ppm)
		1	2	3		
F _A	0	0	0	0	0	794,32
	10	0	0	0	0	
	100	3	2	1	7	
	1000	5	5	4	55	
F _C	0	0	0	0	0	50,11
	10	3	3	2	20	
	100	5	5	4	62	
	1000	9	10	10	100	
F _D	0	0	0	0	0	630,95
	10	0	0	0	0	
	100	3	3	1	13	
	1000	6	5	5	58	

Identifikasi Isolat Spons (F_C) dengan Uji Fitokimia

Fraksi C spons *H. erecta* diidentifikasi senyawanya secara fitokimia. Hasil uji

fitokimia menunjukkan bahwa fraksi C mengandung senyawa golongan alkaloid, steroid, dan polifenol. Hasil skrining fitokimia disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji Fitokimia untuk Fraksi C

Uji Fitokimia	Perubahan Warna	Kesimpulan
Alkaloid		
Pereaksi Dragendorff	Endapan Merah	Positif Alkaloid
Flavonoid		
NaOH 10%	Tidak ada perubahan	Negatif Flavonoid
H ₂ SO ₄ 50%	Tidak ada Perubahan	Negatif Flavonoid
Triterpenoid/Steroid		
Libermann- Burchard	Hijau	Positif Steroid
Polifenol		
FeCl ₃ 1%	Hitam	Positif Polifenol
Saponin		
Uji busa + HCl 2%	Tidak ada perubahan	Negatif Saponin

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Isolat F_C yang diperoleh dari kromatografi kolom fraksi n-heksan, ekstrak etanol spons *H. erecta* bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* L. dengan nilai LC_{50} 50,11 ppm.
2. Hasil uji fitokimia Isolat F_C diduga mengandung senyawa alkaloid, steroid, dan polifenol.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada dosen-dosen penguji diantaranya Dra. Ni Made Puspawati, M.Phil. PhD., Prof. Dr. Ir. I Gede Mahardika, M.S. dan Dr. Drs. Manuntun Manurung, M.S. serta semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Dahuri, R. 2003. Keanekaragaman Hayati Laut, Aset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- [2] Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerbit ITB, Bandung.
- [3] Maraskuranto, E. 2010. Kajian Bioprospeksi Spons Laut Asal Taman Nasional Kepulauan Wakatobi Dan Implikasi Pengelolaannya. Institut Pertanian Bogor.
- [4] Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughlin, J.L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Lant Constituents. *Planta Medica*, 45 : 31-34.
- [5] Pettit, G. R. 1996. *J. Nat. Prod.*, 59, 812-821.
- [6] Sukardiman, Rahman A, Pratiwi FN. 2004. Uji Praskrining Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph.
- [7] Thakur, NL., dan Muller, WEG. 2004. Biotechnological Potential of Marine Sponges. *Current Science*: 10 June 2004
- [8] Widyastuti, S. 2008. "Uji Toksisitas Ekstrak Daun Iprih (*Ficus Glabella* Blume) Terhadap *Artemia salina* Leach Dan Profil Kromatografi Lapis Tipis". (Skripsi). Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah.