

## Toxicity Test of Softcoral *Lobophytum* sp Against *Artemia salina* Shrimp, L Using the Brine Shrimp Lethality Method

(Uji Toksisitas Softcoral *Lobophytum* sp Terhadap Udang *Artemia salina*, L Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality)

Nickson J. Kawung<sup>1)</sup>, Rizald M. Rompas<sup>1)</sup>, Billy T. Wagey<sup>1)</sup>, Adolfina Sumangando<sup>2)</sup>, Hindang Kaempe<sup>2)</sup>, Sonny Untu<sup>3)</sup> Royke R. Palandi<sup>3)</sup>

1. Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK, UNSRAT Manado
2. Program Studi Biologi, FMIPA, UKIT Tomohon
3. Program Studi Farmasi, FMIPA, UKIT Tomohon

Penulis Korespondensi: Nickson Kawung; kawungnickson@yahoo.com

### ABSTRACT

Marine biota resources as a potential asset that can be used into various products including pharmaceutical products because they were a natural ingredient that very rich in biologically active compounds with a unique structure. Softcoral *Lobophytum* is one of the marine biota that has the secondary metabolites which can be useful in pharmacology field. The purpose of this study is to test the toxicity of the soft coral extract of *Lobophytum* sp as an anti-cancer biopotential. This research is using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method, with laboratory experiments. Softcoral samples were taken from Bunaken Island that using purposive sampling method. The test concentrations using 10, 100, 500 and 1000 ppm. The analysis toxicity using probit analysis for minitab program. The results showed that the increasing of concentration was followed by the increasing of the mortality number of the animal testing. The results of probit analysis obtained an LC<sub>50</sub> value of 9.98 ppm. These results indicate that the bioactive substance of softcoral *Lobophytum* sp has the potential as an anti-cancer compound.

Keywords: Soft coral, *Lobophytum* sp, anti cancer, *Artemia salina*

### ABSTRAK

Sumber daya biota laut merupakan aset potensial yang dapat digunakan menjadi aneka produk termasuk di antaranya produk farmasi karena merupakan bahan alam yang sangat kaya senyawa aktif biologi dengan struktur yang unik. Softcoral *Lobophytum* salah satu biota laut yang memiliki metabolit sekunder yang dapat bermanfaat dalam bidang farmakologi. **Tujuan dari penelitian ini** bertujuan untuk menguji toksisitas ekstrak karang lunak *Lobophytum* sp sebagai biopotensi antikanker. Metode penelitian digunakan yaitu metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), dengan percobaan laboratorium. Sampel softcoral diambil dari pulau Bunaken, pengambilan sampel menggunakan metode *purposive sampling*. Konsentrasi uji menggunakan 10, 100, 500 dan 1000 ppm. Analisis Toksisitas menggunakan analisis probit dengan menggunakan program minitab. Hasil yang diperoleh menunjukkan setiap kenaikan konsentrasi diikuti dengan kenaikan jumlah mortalitas hewan uji. Hasil analisis probit diperoleh nilai LC<sub>50</sub> 9.98 mg/l. Hasil ini menunjukkan bahwa substansi bioaktif dari softcoral *Lobophytum* sp berpotensi sebagai senyawa antikanker.

Kata kunci. Karang lunak, *Lobophytum* sp, anti kanker, *Artemia salina*

### PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu golongan penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (invasi) atau dengan

migrasi sel ke tempat yang jauh (metastasis). Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut disebabkan kerusakan DNA, sehingga terjadi mutasi di gen vital yang mengontrol pembelahan sel. Mutasi-mutasi tersebut sering diakibatkan agen kimia maupun fisik yang disebut karsinogen. Terjadi sel kanker karena adanya perubahan susunan genetik atau mutasi gen sehingga ekspresi dari gen

tersebut berubah menjadi tidak normal (Kresno, 2002). Data *Global action against cancer* (2005) kematian akibat kanker dapat mencapai angka 45% dari tahun 2007 hingga 2030, yaitu sekitar 7,9 juta jiwa menjadi 11,5 juta jiwa. Di Indonesia, secara umum kanker merupakan penyebab kematian kedua dari kelompok penyakit non infeksi; tumor ganas menduduki peringkat ke-4 penyebab kematian secara nasional (Yan et al., 2010).

Sumber daya biota laut merupakan aset potensial yang dapat digunakan menjadi aneka produk termasuk di antaranya produk farmasi karena merupakan bahan alam yang sangat kaya senyawa bioaktif dengan struktur yang unik. Beberapa di antaranya mempunyai aktivitas antihipertensi dan antitumor, dan ada juga yang mempunyai aktivitas sebagai stimulan kekebalan dan penghambat enzim tertentu. Selama 30 tahun terakhir, lebih dari 7000 senyawa aktif berhasil diisolasi dari biota laut dan digunakan sebagai rujukan dalam pengembangan obat baru (Fajarningsih dkk., 2006).

Diantara organisme yang hidup di laut, karang lunak termasuk organisme penghasil komponen bioaktif terbesar. Karang lunak merupakan sumber yang kaya akan senyawa kimia, seperti terpenoid, steroid, steroid glykosida, racun lipoid dan bahan bioaktif (Januar, dkk., 2016; Tursh, et.al., 1995). Karang lunak menghasilkan beberapa dari golongan senyawa hasil metabolit sekunder, seperti alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, fenol, saponin, dan peptide, (Elyakov dan Stonik 2003; Huei et.al., 2012). Karang lunak *Lobophytum sp* memiliki senyawa bioaktif tersebut. Secara kuantitatif penelitian terhadap senyawa bioaktif dari biota laut menemukan adanya keterkaitan dari bioaktivitas dan produksi senyawa bioaktif dengan kondisi kualitas lingkungan tempat biota itu hidup, (Kresno. 2002). Tujuan penelitian ini adalah melihat biopotensi senyawa bioaktif dari karang lunak *Lobophytum sp* sebagai bahan aktif antikanker dengan menggunakan metode BSLT terhadap Larva udang *Artemia salina*.

## METODE PENELITIAN

### Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (AND) oven (Memert), alumunium foil (Bagus), gelas ukur (Pyrex), pisau, erlemeyer (Pyrex), gelas kimia (Pyrex), rotary vacuum evaporator (IKA), kromatografi kolom, freeze drayer, kertas saring (Macherey-Nage), corong biasa (Pyrex), lampu pijar 40 watt (Phillips), aerator, toples.

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah karang lunak *Lobophytum sp*, telur *Artemia salina* Leach, air laut steril, etanol p.a. (E. Merck).

### Prosedur Penelitian

Penelitian ini bersifat experimental laboratorium dengan wadah dan media terkontrol tapi masing-masing perlakuan tidak berhubungan, karena itu analisis yang digunakan dari data yang diperoleh adalah analisis probit dengan melihat konsentrasi yang memiliki LC<sub>50</sub>.

### Pengambilan dan Penyimpanan

#### Sampel

Sampel karang lunak *lobophytum sp* diambil dari perairan Pulau Bunaken Sulawesi Utara pada kedalaman 5-10 meter dari atas permukaan laut. kemudian dimasukkan dalam botol sampel dan ditambahkan 500 ml etanol dan dibawah ke Laboratorium Balai Besar Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Jakarta.

#### Ekstraksi Sampel

Sampel di maserasi dengan etanol selama 24 jam, kemudian di saring menggunakan kertas whatman dengan bantuan mesin vacuum. Selanjutnya ekstrak di pekatkan dengan rotary evaporator pada suhu dingin dengan tekanan 20 psi. Ekstrak dikeringkan dengan menggunakan freeze dryer selama 12 jam kemudian ekstrak kering ini dilarutkan dengan diklorometan pemisahan metabolit sekunder dengan kolom kromatografi menggunakan silica gel. Ekstrak metabolit sekunder dipekatkan dengan rotary evaporator. Ekstrak pekat yang diperoleh dikeringkan dengan freeze

riyer selama 15 jam sampai ekstrak berbentuk Kristal. Selanjutnya ekstrak tersebut di timbang dengan timbangan analitik.

#### Pembuatan Senyawa Uji

Pembuatan larutan uji mengikuti rumus pengenceran  $M1V1=M2V2$ . Larutan uji di buat konsentrasi stok 10.000 ppm, dengan cara menimbang 10 mg ekstrak sampel kemudian dilarutkan dengan dimetilsulfat (DMSO) 1000  $\mu$ l, selanjutnya dibuat pengenceran konsentrasi larutan uji 10, 100, 500 dan 1000 ppm dengan mengikuti rumus pengenceran diatas.

#### Penetasan Telur *Artemia Salina*

Penetasan telur *Artemia salina* di lakukan pada wadah kaca seperti toples ukuran sedang dilengkapi dengan alat aerasi (Aerator) dengan menggunakan media air garam. Caranya 1 gram telur *Artemia salina* dimasukan kedalam wadah yang telah diberi air garam. Selama penetasan diberi penerangan dengan cahaya lampu pijar/neon 40-60 watt agar suhu penetasan 26°-31°C tetap terjaga.

Setelah telur menetas menjadi larva nauplius dibiarkan selama 48 jam dibawah pencahayaan lampu agar menetas sempurna. Setelah itu nauplius yang sudah berumur 48 jam siap untuk dijadikan bioindikator dalam uji toksisitas akut.

#### Uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach

Pengujian Toksisitas mengikuti metode (Carbarllo et al., 2002), dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metoda ini biasa digunakan untuk uji pendahuluan dalam penapisan aktivitas farmakologis produk bahan alam dan juga dilakukan sebagai tahap pendahuluan dalam penapisan bahan-bahan yang diduga memiliki sifat antitumor atau antikanker sebelum dilanjutkan kepada uji *in vitro* menggunakan sel lestari tumor (Carbarllo et al., 2002),

Metode BSLT dipilih karena mudah dilakukan, sederhana dan biayanya lebih murah bila dibandingkan dengan uji toksisitas metode lain, namun uji tersebut memberikan hasil yang cukup signifikan. Dalam uji ini digunakan larva *Artemia salina* sebagai hewan uji. Mula-mula telur

*A. salina* ditetaskan di dalam air laut steril di bawah lampu TL 20 watt. Setelah 48 jam telur menetas menjadi nauplii instar III/IV dan siap digunakan sebagai hewan uji. Larva *A. salina* dimasukkan ke dalam vial yang telah berisi larutan sampel ekstrak karang lunak *Lobophytum* sp dengan 2 kali ulangan. Semua vial diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam di bawah penerangan lampu TL 20 watt. Konsentrasi larutan uji dari 10,100,500, dan 1000 ppm, dalam volume 500 ml air laut dan masing-masing perlakuan di ulang 2x.

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan melihat jumlah *Artemia salina* yang mati pada tiap konsentrasi. Penentuan nilai  $LC_{50}$  dalam  $\mu$ g/mL atau ppm dilakukan menggunakan analisis probit dengan program MINITAB versi 13.2 dengan selang kepercayaan 95 %). Untuk mendapatkan data persen mortalitas hewan uji maka menggunakan rumus:

*Persen Mortalitas*

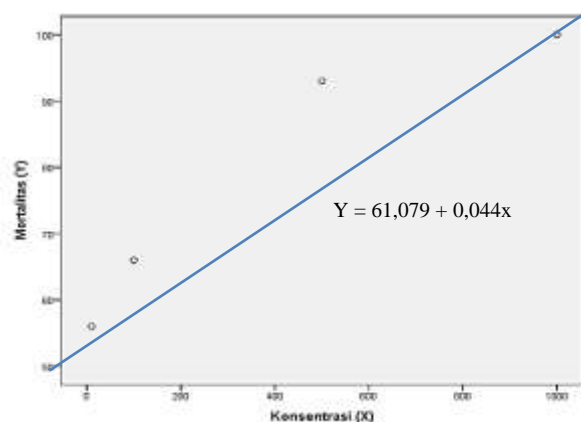
$$= \frac{\text{Jumlah rata - rata hewan yang mati}}{\text{Jumlah hewan percobaan}} 100\%$$

Pembuatan Media Air pertumbuhan *Artemia salina* L. Air media yang menjadi tempat pertumbuhan *artemia salina* mengandung salinitas 35 ‰.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstrak yang diperoleh dari karang lunak *Lobophytum* sp 1260 gram berat basa adalah 30,4 gram. Aktivitas toksisitas dari ekstrak *Lobophytum* sp dengan konsentrasi yang berbeda terhadap larva udang *Artemia salina*, L. diperoleh data yang berbeda untuk setiap konsentrasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa setiap kenaikan konsentrasi senyawa uji diikuti dengan kematian hewan uji. Hal ini sesuai dengan hasil analisis regresi dimana setiap kenaikan konsentrasi diikuti dengan ketambahan mortalitas *Artemia salina* sebagai hewan uji. Hasil analisis diperoleh  $R^2 = 884$  atau 88,4% konsentrasi uji berpengaruh terhadap kematian *Artemia*

*salina*. Kurva analisis regresi ditunjukkan pada Gambar dibawah ini.



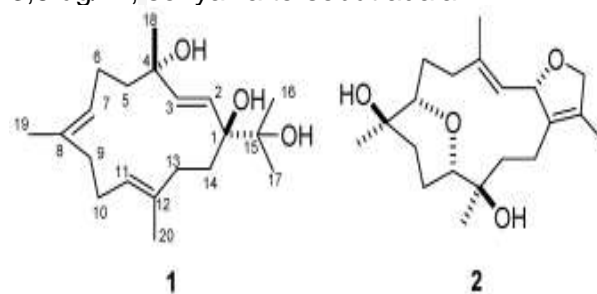
Kurva analisis regresi pengaruh konsentrasi terhadap kematian *Artemia salina*,L

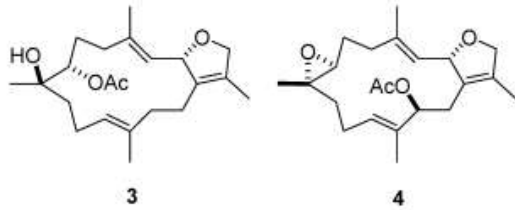
Senyawa bioaktif yang diduga memiliki aktivitas anti kanker terlebih dahulu dilakukan pengujian aktivitas dengan cara uji toksisitas. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mendapatkan data kemampuan aktivitas membunuh sel pada dosis yang kecil sehingga diperoleh data lethal konsentrasi atau lethal dosis. Pengujian toksisitas merupakan suatu metode awal dalam mengevaluasi kasiat dari senyawa uji. Pengujian toksisitas merupakan uji untuk mengetahui pada konsentrasi berapa suatu senyawa atau zat dapat menyebabkan keracunan atau kematian sehingga diketahui jumlah penggunaan konsentrasi yang baik. Tingkat konsentrasi yang dapat menyebabkan keracunan atau kematian ditentukan dengan letal konsentrasi 50 (LC<sub>50</sub>). Berdasarkan data toksisitas akan di ketahui apakah suatu senyawa memiliki efek farmakologis, seperti antitumor dan kanker.

Umumnya data uji toksisitas dinyatakan dalam LC<sub>50</sub> atau IC<sub>50</sub>. Bila nilai konsentrasi LC<sub>50</sub> kecil, artinya dalam konsentrasi minimum sudah dapat membunuh 50 % hewan uji maka senyawa aktif tersebut dapat dikatakan berpotensi atau berkhasiat sebagai antikanker

Suatu zat dinyatakan mempunyai potensi aktifitas sitotoksik jika nilai LC<sub>50</sub>

konsentrasi < 1000 ppm untuk ekstrak dan pada konsentrasi ≤ 30 ppm untuk suatu senyawa (Meyer et al., 1982). Selanjutnya makin kecil nilai IC<sub>50</sub> senyawa tersebut makin toksik sebaliknya makin besar nilai IC<sub>50</sub> senyawa tersebut makin kurang toksisitasnya, (Nursid, dkk., 2009). Kriteria National Cancer Institut (NCI) suatu ekstrak dikategorikan aktif apabila nilai toksisitasnya (IC<sub>50</sub>) < 20 µg/ml (Manuputty,1998). Tingkat kematian larva *Artemia salina* Leach tersebut akan memberikan makna terhadap potensi aktivitas sitotoksik. Meskipun uji toksisitas ini belum spesifik untuk antikanker, namun hasil uji senyawa antikanker menunjukan korelasi terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach (Manuputty,1998). Hasil pengujian toksisitas ekstrak karang lunak *Lobophytum* sp yang diambil dari perairan Pulau Bunaken terhadap larva *Artemia salina* L dengan metode BSLT dengan konsentrasi yang berbeda memberikan mortalitas hewan uji yang berbeda, dimana makin tinggi konsentrasi uji kematian jumlah hewan uji meningkat, mulai dari konsentrasi 10 ppm sampai 1000 ppm. Hasil analisis probit diperoleh nilai LC<sub>50</sub> 9,98 mg/l data ini cukup kecil, sehingga dapat dikatakan bahwa karang lunak *Lobophytum* sp asal pulau Bunaken mengandung senyawa bioaktif yang bersifat antikanker. Hasil uji MTT memperlihatkan bahwa *Lobophytum* B memiliki efek sitotoksik yang paling baik dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 27,86 ppm, (Fajarningsih et al., 2006). Karang lunak *Lobophytum pauciflorum* mengandung senyawa cembranoid, (Shang, et.al., 2013). Empat senyawa yang menunjukkan sitotoksitas terhadap A-549 (kanker paru-paru manusia) garis sel dengan ED<sub>50</sub> yaitu 3,6 ug/ml, senyawa tersebut adalah





Gambar Struktur senyawa cembranoid dari softsoral *Lobophytum* sp (Shih-Tseng Lin et.al, 2011)

kemungkinan dari ke empat senyawa tersebut terdapat dalam Karang Lunak *Lobophytum* asal Pulau Bunaken,

sehingga ekstrak karang lunak tersebut memiliki aktivitas toksisitas bagi hewan uji tersebut.

### KESIMPULAN

Hasil uji toksisitas ekstrak karang lunak *Lobophytum* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach diperoleh nilai  $LC_{50}$  sebesar 9.98 ppm sehingga dapat dikatakan ekstrak karang lunak *Lobophytum* sp bersifat toksik dan dapat dikembangkan sebagai bahan baku obat anti kanker.

### DAFTAR PUSTAKA

- Carballo, J.L., Z. L. Hernández-Inda, P. Pérez. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products, BMC Biotechnol 2, 17. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-17>
- Elyakov G.B, V. A. Stonik. 2003. Marine bioorganic chemistry as the base of marine biotechnology. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 52(1):1-19
- Fajarningsih N D, H.I Januar, M. Nursid, T Wikanta. 2006. Potensi antitumor ekstrak spons *Crella papilata* asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.
- Huei, J. S., Y.J Tseng, Ch.Y. Huang, Zh.H. Wen, Ch.F. D. Horng Sheu. 2012. Cytotoxic and anti-inflammatory diterpenoids from the Dongsha Atoll soft coral *Sinularia flexibilis*. Elsilver. Tetrahedron
- Januar, H.I., N. P. Zamani. D. Soedarma dan E. Chasanah. 2016. Changes in soft coral *Sarcophyton* sp. Abundance and cytotoxicity at volcanic CO<sub>2</sub> seeps in Indonesia. AIMS Environmental Science, 3(2): 239-248.
- Kresno S.B. 2002. Angiogenesis dan Metastasis dalam Onkologi., Bagian Patologi Klinik FKUI, Jakarta.
- Manuputty. 1998. Beberapa Karang lunak (Alcyonacea) Penghasil Substansi Bioaktif.
- Meyer BN, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E Nicholas, J.L. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica 45:31-34.
- Nursid M, N. Dewi Fajarningsih, Th. Wikanta. 2009. Isolation of Cytotoxic Compound from *Nephthea* sp. Soft Coral. Jurnal of Biotechnology Research in Tropical Rdeion, Vol. 2, No. 1, Apr. 2009 (Special Edition) ISSN: 1979-9756. Research Center for Marine and Fisheries Product Processing and Biotechnology, Agency of Marine and Fisheries Research, Jalan KS. Tubun Petamburan VI Jakarta
- Shang-Kwei Wang, Mu-Keng Hsieh and Chang-Yih Duh. 2013. New Diterpenoids from Soft Coral *Sarcophyton ehrenbergi*. Jur. Mar. Drugs, 11: 4318-4327. <https://doi.org/10.3390/md11114318>
- Shih-Tseng Lin, Shang-Kwei Wang, and Chang-Yih Duh. 2011. Cembranoids from the Dongsha Atoll Soft Coral *Lobophytum crassum*. Jur. Mar Drugs, 9(12): 2705–2716.
- Tursch, B., J.C. Braekman, D. Daloze dan M. Kaisin. 1995. Terpenoid dari Coelenterata. In Scheurer, P.J.(ed.). Produk Alami Lautan dari

- Segi Kimia dan Biologi. Jilid II. Penerjemah: Koensoemardiyah. IKIP Semarang Press, Semarang. 387 pp.
- Yan P, Deng Z, van Ofwegen L, Proksch P, W. Lin. 2010. Lobophytanes H-N, Biscembranoids from the Chinese soft coral *Lobophytum pauciflorum*, 58 (12):1591-5
- WHO. 2014. Epidemiology/Etiology/Cancer Prevention Global battle against cancer won't be won with treatment alone. Effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis