

UJI TOKSISITAS DAN UJI FITOKIMIA SPONS *Haliclona* sp. ASAL PULAU LEMUKUTAN KABUPATEN BENGKAYANG KALIMANTAN BARAT

Muhammad Rizka Kurniawan^{1*}, Ajuk Sapar¹, Anthoni B. Aritonang¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura,
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak

*e-mail: muhammadrizkakurniawan@gmail.com

ABSTRAK

Spons Haliclona sp. diketahui memiliki kandungan metabolit sekunder dengan aktivitas sitotoksik yang tinggi sehingga berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai obat antikanker. Dalam penelitian ini, telah dilakukan uji toksisitas dan uji fitokimia terhadap ekstrak metanol spons Haliclona sp. asal Pulau Lemukutan Kabupaten Bengkayang Kalimantan Barat. Metode yang digunakan pada penelitian ini meliputi maserasi dengan pelarut metanol, uji fitokimia dan uji toksisitas. Uji toksisitas terhadap ekstrak metanol dilakukan dengan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Potensi ekstrak metanol spons sebagai antikanker dapat diketahui melalui tingkat toksisitasnya terhadap Artemia salina L. yang merupakan skrining pendahuluan menuju tahapan pengujian selanjutnya terhadap sel kanker yaitu sitotoksitas. Ekstrak metanol dari spons Haliclona sp. bersifat toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 70,1 ppm sehingga berpotensi dikembangkan dan diteliti lebih lanjut komponen aktifnya sebagai bahan baku obat antikanker.

Kata Kunci: antikanker, *Haliclona* sp., toksisitas

PENDAHULUAN

Spons termasuk dalam kelompok hewan invertebrata multiseluler yang hidup pada ekosistem terumbu karang. Terdapat kandungan metabolit sekunder pada spons sekitar 45% yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat hidupnya (Ratu, *et al.*, 2019). Faktor lingkungan seperti temperatur, kekeruhan dan salinitas mempengaruhi metabolisme dari spons sehingga metabolit sekunder yang dihasilkan menjadi berbeda-beda bagi tiap spons (Bergquist, 1978). Spons memiliki 6.000 spesies yang tersebar di seluruh dunia, sebesar 85% diantaranya merupakan kelas Demospongiae (Haris, 2013).

Spons kelas Demospongiae diketahui memiliki berbagai macam bioaktivitas salah satu diantaranya adalah antifungi. Sifat bioaktivitas ini dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder seperti terpen, steroid, alkaloid, fenolik asetenik dan lain-lain yang terdapat pada spons (Dhinakaran, *et al.*, 2012). Kandungan metabolit sekunder tersebut dapat dimanfaatkan pula sebagai *antifeedant*, antibakteri dan antimikroba (Assmann, *et al.*, 2001; Zubair, *et al.*, 2018; Ratu, *et al.*, 2019). Aktivitas sitotoksik dari steroid spons juga diketahui sangat kuat dan berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat antikanker (Swantara, *et al.*, 2017). Salah satu spesies spons kelas Demospongiae adalah *Haliclona* sp.

Indonesia menjadi penderita kanker terbanyak ke-8 di Asia Tenggara dengan angka kematian mencapai 622.548 orang dan prevalensi sebesar 1,79 per 1000 penduduk (Kemenkes RI, 2018). Sebanyak 43% kasus kanker dapat dicegah dan 30% lainnya dapat disembuhkan jika diobati dengan tepat (Sab'ngatun dan Hanifah, 2019). Salah satu alternatif pengobatan kanker ialah menggunakan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas sitotoksik yang tinggi seperti Theonellasterol K. Senyawa tersebut memiliki aktivitas sitotoksik yang signifikan terhadap garis sel kanker HCT-116, K562 dan leukemia *lymphoblastic* (Molt 4) (Guo, *et al.*, 2012).

Berdasarkan informasi tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang spons *Haliclona* sp. asal Pulau Lemukutan Kabupaten Bengkayang Kalimantan Barat serta menguji tingkat toksisitasnya terhadap *Artemia salina* L. sebagai skrining awal menuju uji sel kanker. Hasil yang diharapkan dalam penelitian ini ialah sifat toksik yang tinggi dari spons *Haliclona* sp. sehingga dapat dikembangkan menuju penentuan *lead compound* untuk bahan aktif obat antikanker.

Selain itu, penelitian ini juga diharapkan dapat memperkaya wawasan bagi pembaca khususnya peneliti produk bahan alam laut.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas standar, lampu, pompa air akuarium dan *rotary evaporator*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah air laut, akuades (H_2O), asam asetat glasial (CH_3COOH), asam sulfat pekat (H_2SO_4), aseton (CH_3COCH_3), besi (III) klorida ($FeCl_3$), bismut karbonat ($(BiO)_2CO_3$), etil asetat ($CH_3COOC_2H_5$), iodin (I_2), kalium iodida (KI), kertas saring Whatman, merkuri (II) klorida ($HgCl_2$), metanol (CH_3OH), natrium iodida (NaI), telur udang *Artemia salina* L. dan tween 80.

Prosedur Kerja

Pengambilan dan ekstraksi sampel

Teknik pengambilan sampel spons *Haliclona* sp. didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Rezeki, *et al.* (2009) yakni dengan cara *Self-Contained Underwater Breathing Apparatus* (SCUBA) *diving* di Pulau Lemukutan Kabupaten Bengkayang Kalimantan Barat. Sebanyak 300 g sampel spons yang telah diambil kemudian dibersihkan dari pengotor, ditimbang, dipotong-potong kecil dan dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Maserat yang diperoleh didekantasi dan disaring dengan kertas saring Whatman. Filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* kemudian ditimbang (El-Damhougy, *et al.*, 2017).

Uji fitokimia

a. Uji Lieberman-Burchard

Pengujian ini dilakukan dengan menambahkan sampel dengan 10 tetes asam asetat glasial dan 2 tetes asam sulfat pekat. Larutan dikocok secara perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit (Harborne, 1987).

b. Uji Mayer

Pengujian dimulai dengan melarutkan 1,36 g merkuri (II) klorida dalam 60 mL akuades (Mayer A). Sebanyak 5 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 mL akuades (Mayer B). Kedua larutan tersebut kemudian dicampur dan ditepatkan hingga 100 mL dengan akuades lalu ditambahkan pada sampel (Singh, *et al.*, 2012).

c. Uji Wagner

Sampel ditambahkan pada reagen Wagner yang dibuat dengan melarutkan 1,27 g iodin terhadap larutan 2 g kalium iodida dalam 5 mL akuades, lalu ditambahkan dengan akuades hingga 100 mL (Singh, *et al.*, 2012).

d. Uji Dragendorf

Sebanyak 14 g natrium iodida dan dididihkan dengan 5,2 g bismut karbonat dalam 50 mL asam asetat glasial selama beberapa menit. Larutan dibiarkan semalaman dan disaring endapan yang terbentuk. Filtrat berwarna merah kecoklatan ditambahkan 160 mL etil asetat dan 1 mL akuades (larutan stok). Kemudian diambil 10 mL larutan stok dan ditambahkan dengan 20 mL asam asetat glasial serta dilarutkan dalam 100 mL akuades. Reagen yang telah dibuat lalu ditambahkan pada sampel (Singh, *et al.*, 2012).

e. Uji $FeCl_3$

Pengujian dimulai dengan menambahkan sampel dengan 2 tetes larutan besi (III) klorida 10% kemudian mengamati perubahan warna yang terjadi (Singh, *et al.*, 2012).

Uji toksisitas

Metode pengujian berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rohmah, *et al.* (2014) yang diawali dengan merendam telur udang *Artemia salina* L. dalam 1 L air laut yang telah disaring

dan diberi penerangan serta diaerasi selama 48 jam. Kemudian dibuat larutan induk 5000 ppm dengan menimbang 50 mg ekstrak kental yang ditambahkan 3 tetes tween 80 dan dilarutkan dalam 10 mL akuades. Larutan induk tersebut lalu diencerkan menjadi 1000; 100 dan 10 ppm dengan air laut, masing-masing konsentrasi dilakukan triplo serta larutan blanko. Selanjutnya, disiapkan wadah pengujian yang masing-masing diisi dengan larutan stok dan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. serta dilakukan juga pada larutan blanko. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan menghitung jumlah larva yang mati dan ditentukan nilai LC₅₀-nya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan dan Ekstraksi Sampel

Lokasi pengambilan sampel spons *Haliclona* sp. berada di Pulau Lemukutan Kabupaten Bengkayang Kalimantan Barat, yang dilakukan secara SCUBA *diving* pada kedalaman 4-5 m. Sampel spons *Haliclona* sp. yang diambil memiliki berat bersih sebesar 283,2869 g (Gambar 1.). Kemudian sampel dimaserasi untuk memperoleh komponen senyawa organik yang terdapat pada sampel baik secara kualitatif ataupun secara kuantitatif. Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel selama 24 jam menggunakan pelarut metanol secara berulang hingga diperoleh filtrat yang bening (Tiwari, *et al.*, 2011).



Gambar 1. Sampel spons *Haliclona* sp.

Pengulangan proses maserasi dilakukan untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekunder secara maksimal yang terkandung pada sampel. Hal ini ditandai dengan perubahan warna ekstrak yang semula pekat hingga menjadi bening. Maserat yang dihasilkan oleh *Haliclona* sp. menggunakan pelarut metanol yakni 4,73 L. Kemudian maserat tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental sampel sebanyak 16,6814 g dengan rendemen sebesar 5,8885%.

Uji Fitokimia

Ekstrak kental dari sampel yang telah diperoleh dari hasil maserasi spons dilakukan uji fitokimia untuk mengidentifikasi kandungan kelompok metabolit sekunder seperti terpenoid, steroid, alkaloid dan tanin. Reaksi bernilai positif untuk terpenoid apabila terjadi perubahan warna menjadi merah atau ungu, sedangkan steroid menghasilkan warna biru atau hijau, kedua golongan senyawa tersebut diuji menggunakan reagen Lieberman-Burchard. Golongan alkaloid diidentifikasi melalui hasil uji menggunakan reagen Mayer yang membentuk endapan putih, reagen Wagner terjadi endapan coklat dan reagen Dragendorf terbentuk endapan merah jingga. Pengujian dengan FeCl₃ akan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru kehitaman yang mengindikasikan adanya golongan senyawa tanin (Mondong, *et al.*, 2015). Hasil pengujian ekstrak sampel spons kelas Demospongiae dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 1. Uji fitokimia ekstrak metanol spons *Haliclona* sp.

Sampel	Terpenoid	Steroid	Alkaloid	Tanin
<i>Haliclona</i> sp.	-	+	++	-

Berdasarkan data pada Tabel 1., dapat diketahui bahwa ekstrak metanol spons *Haliclona* sp. memiliki kandungan steroid dan alkaloid. Hal tersebut dikarenakan sampel mengalami perubahan warna yang semula coklat kehitaman menjadi hijau muda ketika bereaksi dengan reagen Lieberman-Burchard. Kandungan senyawa golongan alkaloid teridentifikasi melalui terbentuknya endapan pada uji Mayer, Wagner dan Dragendorf.

Uji Toksisitas

Toksisitas ekstrak metanol spons *Haliclona* sp. diuji menggunakan metode BSLT. Pengujian berlangsung dengan mengamati tingkat kematian hewan percobaan yang dipaparkan terhadap sampel. Hewan yang digunakan ialah larva udang *Artemia salina* L. yang memiliki pertumbuhan pada fase *nauplius* identik dengan mitosis pada sel kanker. Metode BSLT bersifat cepat, murah dan mudah dikerjakan serta hanya membutuhkan sedikit sampel (Rohmah, *et al.*, 2014).

Pengujian BSLT diawali dengan menetasakan telur *Artemia salina* L. dalam air laut dengan salinitas 32‰ dan indeks bias 1024 yang diberi penerangan serta diaerasi selama 48 jam. Kemudian sebanyak 50 mg ekstrak spons kelas Demospongiae ditambahkan 3 tetes tween 80 untuk meningkatkan kelarutan sampel dan ditepatkan hingga 10 mL dengan akuades. Larutan tersebut disimpan sebagai larutan induk (5000 ppm) yang kemudian diencerkan dengan air laut menjadi 1000, 100 dan 10 ppm serta dilakukan triplo. Selain itu, disiapkan juga larutan blanko sebagai larutan control dengan konsentrasi yang sama.

Setelah 48 jam, *Artemia salina* L. telah tumbuh menjadi dewasa dan siap untuk menjadi bahan uji. Selanjutnya 10 ekor udang *Artemia salina* L. dikontakkan dengan setiap konsentrasi sampel, begitu juga dengan blanko. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan menghitung jumlah udang yang mati. Hasil pengamatan ditampilkan pada tabel berikut:

Tabel 2. Hasil uji BSLT pada ekstrak spons kelas Demospongiae

Sampel	% kematian larva udang - % kematian control			LC ₅₀
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	
<i>Haliclona</i> sp.	14	57	93	70,1

Hasil yang terdapat pada Tabel 2. kemudian dilakukan analisis probit untuk menentukan nilai LC₅₀ dari masing-masing sampel. Makin tinggi nilai LC₅₀ maka makin rendah tingkat toksisitasnya dan begitu pula sebaliknya. Hal ini dikarenakan LC₅₀ (*Lethal Concentration 50*) menunjukkan konsentrasi sampel yang dapat membunuh setengah (50%) dari jumlah total hewan uji (Ilyas, *et al.*, 2015). Menurut Meyer, *et al.* (1982), suatu ekstrak bersifat sangat toksik bila memiliki nilai LC₅₀ < 30 ppm, jika nilai LC₅₀-nya 30-1000 ppm maka dinilai bersifat toksik dan bersifat tidak toksik ketika nilai LC₅₀ > 1000 ppm.

Berdasarkan hasil analisis probit, nilai LC₅₀ dari ekstrak spons *Haliclona* sp. sebesar 70,1 ppm. Sehingga dapat diketahui bahwa sampel bersifat toksik yang diperkirakan karena adanya kandungan senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid dan steroid. Kandungan tersebut dapat bertindak sebagai racun perut bagi udang *Artemia salina* L. yang mengganggu alat pencernaannya. Selain itu, senyawa tersebut dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut sehingga udang mati kelaparan yang disebabkan oleh ketidakmampuan untuk mengenali makanannya (Dapas, *et al.*, 2014). Oleh karena sifat dari ekstrak metanol dari spons *Haliclona* sp., maka spesies spons tersebut berpotensi dikembangkan untuk penelusuran kandungan metabolit sekundernya menjadi bahan baku obat antikanker.

SIMPULAN

Ekstrak metanol spons *Haliclona* sp. dari kelas Demospongiae asal Pulau Lemukutan Kabupaten Bengkayang Kalimantan Barat menunjukkan potensi sebagai antikanker dengan nilai toksisitas LC₅₀ sebesar 70,1 ppm. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol spons *Haliclona* sp. mengandung kelompok senyawa alkaloid dan steroid.

DAFTAR PUSTAKA

- Assmann M., van Soest R.W.M. and Köck M., 2001, New Antifeedant Bromopyrrole Alkaloid from the Caribbean Sponge *Stylissa caribica*, *J. Nat. Prod.*, 64:1345-1347.
- Bergquist P.R., 1978, *Sponges*, Hutchinson and Company, London.
- Dapas C.C., Koleangan H.S.J. dan Sangi M., 2014, Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Batang Bawang Laut (*Proiphys amboinensis* (L.) Herb.), *Jurnal MIPA Unsrat Online*, 3 (2):144-148.
- Dhinakaran D.I., Manohari V., Atchya B., Tamilselvi K. and Lipton A.P., 2012, Antifungal and Cytotoxic Activities of Some Marine Sponges Collected from South East Coast of India, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (1):52-55.
- El-Damhougy K.A., El-Naggar H.A., Ibrahim H.A.H., Bashar M.A.E. and Senna F.M.A., 2017, Biological Activities of Some Marine Sponge Extracts from Aqaba Gulf, Red Sea, Egypt, *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5 (2):652-659.
- Guo J., Chiang C., Lu M., Chang W. And Su J., 2012, 4-Methylenesterols from a Sponge *Theonella swinhoei*, *Mar. Drugs*, 10:1536-1544.
- Harborne J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah: K. Padmawinata dan I. Soediro, Penerbit ITB, Bandung.
- Haris A., 2013, *Sponge: Biologi dan Ekologi*, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Ilyas A., Novianty I. dan Irmayanti, 2015, Senyawa Golongan Steroid dari Ekstrak *n*-Heksana Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofasus*) dan Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach., *Chimica et Natura Acta*, 3 (3):119-123.
- Kemntrian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI), 2018, *Situasi Penyakit Kanker*, Pusat Data dan Informasi, Jakarta.
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., McLaughlin J.L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta medica*, 45: 31-34.
- Mondong F.R., Sangi M.S. dan Kumaunang M., 2015, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Patikan Emas (*Euphorbia prunifolia* Jacq.) dan Bawang Laut (*Proiphys amboinensis* (L.) Herb), *Jurnal MIPA Unsrat Online*, 4 (1):81-87.
- Ratu K., Simbala H.E.I., dan Rotinsulu H., 2019, Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Spons *Phllospongia lamellosa* dari Perairan Tumbak, Minahasa Tenggara terhadap Pertumbuhan Mikroba *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*, *Pharmacogn: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 8 (4): 58-67.
- Rezeki S., Sapar A. dan Harlia, 2009, Identifikasi Steroid dari Fraksi *n*-Heksan Spons *Haliclona* sp. Asal Perairan Pulau Randayan Provinsi Kalimantan Barat, Universitas Tanjungpura, FMIPA, Pontianak, (Skripsi).
- Rohmah R.N., Ratnaningtyas N.I. dan Asnani, A., 2014, Kajian Toksisitas dari Tubuh Buah *Ganoderma lucidum* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), *Scripta Biologica*, 1 (1):30-32.
- Sab'ngatun dan Hanifah L., 2019, Hubungan Antara Pengetahuan Kader Posyandu tentang Kanker Payudara dengan Sadari, *Jurnal Kebidanan Indonesia*, 10 (2): 122-131.
- Singh D., Singh P., Gupta A., Solanki S., Sharma E. and Nema R., 2012, Qualitative Estimation of the Presence of Bioactive Compound in *Centella asiatica*: An Important Medicinal Plant, *International Journal of Life Science and Medicinal Science*, 2 (1):5-7.
- Swantara I.M.D., Rita W.S. and Hernindy R.A., 2017, Isolation and Phytochemical Test of Anticancer Isolate of Sponge *Hyrtios erecta*, *IRSC UNUD Journals*, 1 (1):16-19.
- Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. and Kaur H., 2011, Phytochemical Screening and Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1 (1):98-106.
- Zubair M.S., Lallo S., Putra M.Y., Hadi T.A. and Jantan I., 2018, Antibacterial and Cytotoxic Activities of Sponges Collected off The Coast of Togean Islands, Indonesia, *Pharmacogn J.*, 10 (4):988-992.