

Full Paper

**TOKSISITAS DAN AKTIVITAS ANTI-MIKROBA EKSTRAK ETANOL BUNGA
KARANG DARI PERAIRAN PULAU TABUHAN BANYUWANGI
DAN PULAU MENJANGAN BALI BARAT**

**TOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT
OF SPONGES FROM TABUHAN ISLAND BANYUWANGI
AND MENJANGAN ISLAND WEST BALI WATERS**

Erna Prawita Setyowati^{*)}, Umar Anggara Jenie^{*)}, Sudarsono^{*)}, Broto Kardono^{**)},
dan Rachmaniar Rahmat^{**)}

Abstract

The purpose of the research were to determine the toxicity and antimicrobial activity of ethanolic extract of sponges collected from Tabuhan Island, Banyuwangi and Menjangan Island, West Bali. Extracts were made by maceration of the sponge samples for 3 x 24 hours. The toxicity test was carried out by Brine Shrimp Lethality Test (BST) with 48 hours-old *Artemia* sp. The effect of ethanolic extract was identified by determining the mortality of *Artemia* sp. and LC₅₀ of each extract was analyzed by using probit analysis. Antimicrobial activity was tested by agar diffusion method. The result showed that several ethanolic extracts exhibited toxicity to *Artemia* sp. The toxicity test showed that extract of sponge code B43 was the most toxic with the LC₅₀ of 8.4 µg/ml. Antimicrobial activity test exhibited that ethanolic extract of sponge with code numbers B2, B57, B61 dan W5 were active against *Candida albicans*, while the extracts of sponge with code numbers B9, B35, B47, B51 (*Liosina* sp.), B57, B61, B63 and W11 were active against *Staphylococcus aureus*. One ethanolic extract from sponge with code number B57 exhibited activity against *Escherichia coli*.

Key words: antimicrobial, Brine Shrimp Lethality Test, sponge, toxicity

Pengantar

Indonesia merupakan negara kelautan yang memiliki potensi sumberdaya biota laut yang dapat digunakan dalam pencarian bahan senyawa bioaktif farmasetik. Diantara kelompok biota laut, bunga karang termasuk penghasil senyawa bioaktif dengan berbagai keragaman variasi struktur, sehingga bunga karang digunakan sebagai target favorit bagi peneliti bahan alami (Garson, 1994). Bunga karang merupakan organ-

isma air, multiselular, tak bertulang belakang, tubuhnya berpori dan kebanyakan hidup di lautan. Bunga karang merupakan salah satu bagian dari terumbu karang (Hooper, 1997). Sebagai negara kelautan, penelitian dan pemanfaatan bunga karang di Indonesia masih sangat kurang. Untuk lebih mengenal aktivitas bunga karang di Indonesia kaitannya dengan pemanfaatan biota laut sebagai sumber bahan bioaktif farmasetik maka perlu dilakukan banyak penelitian mengenai bunga karang. Penelitian ini ber-

^{*)} Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Sekip Utara Yogyakarta 55281, Telp.: (0274) 543120, Fax: (0274) 543120

^{**)} Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl Gatot Subroto 10 Jakarta Selatan, Telp.: (021) 5251542, Fax: (021) 52961370

^{*)} Penulis untuk korespondensi : E-mail : erna_ps@yahoo.co.uk

tujuan untuk menyeleksi bunga karang yang mempunyai potensi kandungan senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai dasar dalam pencarian obat baru.

Feeney pada tahun 1950 berhasil menemukan senyawa bioaktif yang berpotensi tinggi seperti spongouridine dan spongothymidine dari bunga karang *Cryptotethya crypta*, kemudian senyawa tersebut oleh Scheur pada tahun 1980 dimodifikasi menjadi Ara-A (Vidarabine) dan telah digunakan untuk pengobatan penyakit *Hodgkins lymphoma* dan *acute myelocytic leukimia* (Muller et al., 2004).

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) menggunakan naupli *Artemia salina* Leach merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari bahan alam. Metode ini merupakan metode yang cukup praktis, cepat, mudah, murah dan akurat. Hasil uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian naupli *Artemia salina* Leach karena pengaruh ekstrak senyawa bahan alam tertentu dari dosis yang telah ditentukan (Mc. Laughin & Ferigni, 1983). Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya LC_{50} selama 24 jam, dan menggunakan volume media atau air laut sebanyak 5 ml dengan jumlah cuplikan 50 mg untuk suatu ekstrak bahan alam (Meyer et al., 1982).

Beberapa senyawa antikanker telah berhasil diisolasi dari bahan alami ekstraksi dan partisi yang dipandu oleh BST. Salah satu contoh pemakaian metode ini untuk pencarian senyawa antikanker adalah diidentifikasinya senyawa jaspamide yang diisolasi dari bunga karang *Stylissa flabelliformis* (Setyowati et al., 2003; 2004; 2005).

Bahan dan Metode

Penyiapan sampel uji

Bunga karang dari perairan Pulau Menja-

ngan Bali dan Pulau Tabuhan Banyuwangi dikoleksi pada bulan Oktober 2004. Bunga karang dicuci kemudian ditiriskan dan diukur beratnya. Bunga karang kemudian dipotong kecil-kecil dan diblender. Bunga karang dimaserasi satu malam menggunakan pelarut etanol dengan pengadukan menggunakan magnetic stirer selama 2 jam. Ekstrak etanol hasil penyaringan diuapkan dengan rotari evaporator. Dua puluh lima mg ekstrak etanol pekat dilarutkan dalam 5 ml etanol sebagai larutan stok. Kemudian diambil sebanyak 1000, 500, 250 μ l dan dimasukkan ke dalam falkon dan diuapkan sampai kering. Ekstrak bunga karang yang menunjukkan toksisitas selanjutnya diuji dengan konsentrasi yang lebih rendah dengan pengambilan sebanyak 100, 50, 25 dan 10 μ l. Sebagai kontrol digunakan pelarut etanol, diperlakukan sama dengan di atas. Setiap konsentrasi dibuat replikasi 4 kali.

Identifikasi bunga karang

Identifikasi jenis bunga karang dilakukan oleh Pusat Oseanografi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia di Ancol Jakarta Utara, berdasarkan data foto dan spesimen yang diberikan.

Uji toksisitas dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)

Penyiapan sampel dan kontrol uji

Seri konsentrasi larutan dibuat dalam pelarut etanol (1000, 500, 250, 100, 50, 25 dan 10 μ g/ml). Sejumlah volume etanol digunakan untuk kontrol pelarut sesuai dengan konsentrasi (μ g/ml). Larutan dimasukkan ke dalam falkon dan diuapkan hingga kering dan tidak berbau pelarut.

Penetasan kista *A. salina*

Kista *Artemia* (Premium Extra Brine Shrimps Eggs, Seagull International, The Great Salt Lake, USA) ditetaskan dalam wadah penetas menggunakan air laut buatan 30 ppt (Sera Sea Salt GB, USA) sebagai media. Telur menetas setelah lebih kurang 24 jam. Naupli yang diguna-

kan untuk uji adalah naupli setelah berumur 48 jam.

Uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)

Uji BST dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Meyer *et al.* (1982). Senyawa uji dalam falkon dilarutkan dalam air laut secukupnya dengan bantuan vortex. Sepuluh ekor naupli *Artemia* dimasukkan secara random ke dalam falkon yang telah berisi senyawa uji dan ditambahkan air laut sampai volume 5 ml. Suspensi yeast (*Saccaromyces ceceviceae*) (S.I. Lessaffre 597 C3 Marcq, France) dengan konsentrasi 0,6 mg/ml ditambahkan ke dalam tiap falkon masing-masing 1 tetes sebagai makanan. Setelah 24 jam jumlah naupli yang hidup dihitung. Bila ada kematian pada kontrol, dikoreksi dengan rumus Abbot's:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Tes} - \text{Kontrol}}{\text{Kontrol}} \times 100\%$$

Hasil uji dikatakan toksik terhadap naupli *Artemia* sp. jika terjadi mortalitas 50% pada dosis kurang atau sama dengan 1000 µg/ml (Meyer *et al.*, 1982). Mortalitas *Artemia* dengan perlakuan masing-masing ekstrak etanol yang toksik dianalisis probit untuk mendapatkan LC₅₀.

Uji aktivitas antimikroba

Aktivitas antimikroba ekstrak bunga karang diuji dengan metode difusi dengan sumuran terhadap *Staphylococcus aureus* (SA), *Escherichia coli* (EC) dan *Candida albicans* (CA). Uji aktivitas antibakteri digunakan lempeng Trypticase Soy Agar (TSA, Oxoid) sedangkan uji aktivitas antifungi digunakan lempeng Saboroud Dextrose Agar (SDA, Oxoid). Kedua lempeng media yang telah diinokulasi mikroba pada konsentasi 10⁸ CFU/ml berdasarkan standar Mc. Farland dibuat sumuran dengan perforator diameter 5 mm. Berbagai konsentrasi sampel uji sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam sumuran. Dilakukan berbagai kontrol yaitu: Kontrol positif, Streptomycin sulfat

(Meiji) konsentrasi 20 mg/ml untuk SA dan EC., miconazole nitrate (Dankos) konsentrasi 10 mg/ml untuk CA. Kontrol negatif digunakan pelarut DMSO (dimetil sufoxid). Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambatan yang terjadi diukur.

Hasil dan Pembahasan

Koleksi

Hasil koleksi bunga karang yang terdapat di perairan Pulau Menjangan Bali pada tanggal 14 dan 15 Oktober 2004 pada kedalaman lebih kurang 20 meter di bawah permukaan air laut diperoleh 36 jenis bunga karang. Dari perairan Pulau Tabuhan Banyuwangi diperoleh 9 jenis bunga karang.

Hasil uji sifat toksik terhadap bunga karang menunjukkan terdapat 10 jenis bunga karang yang toksik terhadap naupli *Artemia salina* Leach (Meyer *et al.*, 1982). Dari bunga karang koleksi Pulau Menjangan Bali terdapat beberapa bunga karang yang sampai kadar 250 µg masih memberikan kematian 100% terhadap naupli *Artemia* yaitu bunga karang kode B2, B9, B43 dan B47. Sedangkan bunga karang koleksi dari pulau Tabuhan hanya bunga karang kode W11 yang sampai kadar 250 µg/ml bisa memberikan kematian naupli *Artemia* sampai 80% (Tabel 1 dan 2).

Aktivitas antimikroba

Uji antimikroba dilakukan pada konsentrasi yang sama yaitu 5 mg/ml dalam pelarut DMSO. Pelarut ini digunakan karena dapat melarutkan ekstrak dan tidak beraktivitas terhadap mikroba yang digunakan. Data dari uji antimikroba yang dilakukan dengan menggunakan metode difusi padat terhadap *S. aureus* (mewakili Gram positif), *E. coli* (mewakili Gram negatif) dan *C. albicans* (mewakili fungi) menunjukkan hasil seperti pada Tabel 1 dan 2. Pada Tabel 1 terlihat dari 36 koleksi

bunga karang dari Bali Barat terdapat 8 jenis bunga karang yang beraktivitas antimikroba. Kebanyakan mempunyai aktifitas terhadap antibakteri gram positif (7 bunga karang), antibakteri gram negatif (1 bunga karang) dan sebagai antifungi (3 bunga karang).

Uji aktivitas antimikroba ekstrak bunga karang dari Pulau Tabuhan menunjukkan

hanya terdapat 1 jenis bunga karang yang bersifat antibakteri dan antifungi yaitu bunga karang kode W5 dan W11 (Tabel 2).

Toksitas terhadap Artemia salina Leach. Dari Tabel 2 terlihat bahwa ekstrak bunga karang kode B2, B9, B43 dan B47 mempunyai aktivitas tertinggi dengan kematian naupli 100% pada kadar 250 µg/ml. Untuk melihat potensi ketoksikan dari

Tabel 1. Toksitas dan aktivitas antimikroba ekstrak etanol bunga karang dari perairan Pulau Menjangan Bali

Kode Bunga karang	Nama Bunga karang	Mortalitas (%)			Antimikroba Dosis (mg/ml), diameter hambatan (mm)
		1000 µg	500 µg	250 µg	
B1	<i>Niphates</i> sp.	0	0	0	-
B2	Belum teridentifikasi	100	100	100	+ (CA) 5mg/ml (10 mm)
B3	<i>Theonella</i> sp.	0	0	0	-
B5	<i>Paratetils</i> sp.	0	0	0	-
B9	Belum teridentifikasi	100	100	100	+ (SA) 5mg/ml (7,5 mm)
B11	<i>Acanthea</i> sp.	0	0	0	-
B13	<i>Axinella</i> sp.	0	0	0	-
B15	<i>Petrosia</i> sp.	0	0	0	-
B17	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B19	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B21	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B23	<i>Petrosia</i> sp.	0	0	0	-
B25	<i>Niphates</i> sp.	90	70	50	-
B27	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B29	<i>Theonella</i> sp.	0	0	0	-
B31	Belum teridentifikasi	85	80	50	-
B33	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B35	Belum teridentifikasi	5	15	30	+ (SA) 5mg/ml (7 mm)
B37	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B39	Belum teridentifikasi	82,5	32,5	25	-
B41	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B43	Belum teridentifikasi	100	100	100	-
B47	Belum teridentifikasi	100	100	100	+ (SA) 5mg/ml (7 mm)
B49	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B51	<i>Liosina</i> sp.	75	57,5	40	+ (SA) 5mg/ml (6 mm)
B53	Belum teridentifikasi	40	32,5	10	-
B55	Belum teridentifikasi	45	37,5	0	-
B57	Belum teridentifikasi	85	60	50	+ (SA,EC,CA) 5mg/ml (9mm, 8mm, 8 mm)
B59	<i>Phylospongia</i> sp.	0	0	0	-
B61	Belum teridentifikasi	20	15	0	+ (SA,CA) 5mg/mL (6mm, 7mm)
B63	Belum teridentifikasi	37,5	20	0	+ (SA) 5mg/ml (10 mm)
B65	<i>Niphates</i> sp.	0	0	0	-
B67	<i>Axinella</i> sp.	20	7,5	0	-
B69	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B71	Belum teridentifikasi	0	0	0	-
B73	Belum teridentifikasi	0	0	0	-

Keterangan: (SA) *Staphylococcus aureus*, (EC) *Eschericia coli* dan (CA) *Candida albicans*

Tabel 2. Toksisitas dan aktivitas antimikroba ekstrak etanol bunga karang dari perairan Pulau Tabuhan Banyuwangi

Kode Bunga karang	Nama Bunga karang	Mortalitas (%)			Antimikroba Dosis (mg/ml), diameter hambatan (mm)
		1000 µg	500µg	250µg	
W3	<i>Phyospongia</i> sp.	40	30	15	-
W5	Belum teridentifikasi	45	37,5	25	+ (CA); 5mg/ml (10 mm)
W7	<i>Niphates</i> sp.	95	70	60	-
W9	<i>Clathria</i> sp.	12,5	10	0	-
W11	Belum teridentifikasi	95	87,5	80	+ (SA); 5mg/ml (7,5 mm)
W13	<i>Phyospongia</i> sp.	20	22,5	10	-
W15	Belum teridentifikasi	32,5	25	10	-
W17	Belum teridentifikasi	37,5	80	60	-
W19	Belum teridentifikasi	0	0	0	-

Keterangan: + (CA) *Candida albicans*; + (SA) *Staphylococcus aureus*

masing-masing bunga karang tersebut dilakukan uji BST dengan konsentrasi yang lebih rendah yaitu 100, 50, 25 dan 10 µg/ml. Hasil uji terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Mortalitas (%) naupli *Artemia salina* Leach ekstrak etanol bunga karang kode B2, B9, B43 dan B47

Konsentrasi (µg/ml)	Ekstrak EtOH Bunga karang			
	B2	B9	B43	B47
100	100±0	90±5	100±0	80±5
50	100±0	68±4	100±0	48±8
25	100±0	40±5	98±4	23±4
10	58±4	13±4	65±5	0
Kontrol	0	0	0	0

Uji BST ekstrak etanol bunga karang kode B2 dan B43 pada konsentrasi 25 µg/ml menunjukkan mortalitas *Artemia* mencapai 98%, sedangkan ekstrak EtOH bunga karang kode B9 dan B47 membutuhkan konsentrasi di atas 100 µg/ml (Tabel 3). Perlakuan kontrol tidak terlihat adanya kematian naupli *Artemia*, sehingga koreksi dapat diabaikan pada perhitungan prosentase kematian.

Semakin besar harga LC₅₀ maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Dari data di atas diketahui bahwa harga LC₅₀ untuk bunga karang kode B43 adalah 8,04 µg/ml, kode B2 9,07 µg/ml, kode B9 31,19

µg/ml sedangkan kode B47 50,95 µg/ml. Keempat ekstrak tersebut dapat dikatakan bersifat toksik karena menurut Meyer *et al.* (1982), suatu senyawa dikatakan toksik jika mempunyai harga LC₅₀ kurang dari 1000 µg/ml. Metode BST menggunakan naupli *Artemia* sp. merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk skrining awal pencarian senyawa antikanker yang berasal dari bahan alam. Metode ini merupakan metode yang cukup praktis, cepat, mudah, murah dan akurat. Hasil uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian naupli *Artemia* sp. karena pengaruh ekstrak senyawa bahan alam tertentu dari dosis yang telah ditentukan (Mc. Laughin & Ferigni, 1983). Dari hasil di atas terlihat bahwa bunga karang kode B43 merupakan bunga karang dengan toksisitas yang tinggi. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan terhadap bunga karang aktif untuk mengisolasi senyawa aktif dengan dipandu oleh uji aktifitas. Setyowati *et al.* (2003; 2004; 2005) berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa jaspamide dari bunga karang *Stylissa flabelliformis* dengan LC₅₀ 0,9 µg/ml terhadap naupli *Artemia salina* Leach, sedangkan uji sitotoksik terhadap sel mieloma sebesar LC₅₀ = 0,08 µg/ml.

Kesimpulan

Sejumlah 36 sampel bunga karang dari perairan Pulau Menjangan Bali Barat terdapat 11 jenis bunga karang yang bersifat toksik dan 8 jenis bunga karang yang bersifat antimikroba. Sejumlah 9 sampel bunga karang dari perairan Pulau Tabuhan Banyuwangi terdapat 3 jenis bunga karang yang bersifat toksik dan 2 jenis bunga karang yang bersifat antimikroba. Ekstrak etanol bunga karang kode B43 mempunyai toksisitas paling tinggi dengan LC_{50} 8,04 $\mu\text{g/ml}$.

Daftar Pustaka

- Castro, P. and M.E. Huber. 1997. Marine biology. Second Edition. Mc. Graw Hill Book Company Inc., New York. 109-112 p.
- Garson, M.J. 1994. The Biosynthesis of secondary metabolites: Why is important. *In*: Sponges in time and space. R.W.M. van Soest, Th. M.G. Van Kempen and J.C Braekman (Eds.). Proceeding 4th International Porifera Congress, Amsterdam/ Netherland.: 428-429.
- Hooper, J.N.A., 1997, Guide to sponge collection and identification, *Sponge Guide*, version March, Queensland Museum, Brisbane.: 33-38.
- Meyer, F., Putnam, J. Nichols, and Mc. Laughin. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active lants constituent. *Plant Medica*. 45.
- Schmitz, F.J., B.F. Bowden, and S.I.Toth. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms, *in: Marine Biotechnology*. D.H. Attaway, and O.R. Zaborsky. (Eds.). Plenum Press. New York and London. 237-260.
- Setyowati, E.P., Sudarsono, and S. Wahyuono. 2003. Active fraction from sponge *Stylissa flabelliformis* collected from Menjangan National Park West Bali. *Journal of Technoscience Yogyakarta*. 16 (3): 499-513.
- Setyowati, E.P., Sudarsono, and S. Wahyuono. 2004. Cytotoxic and antimicrobial test of the bioactive compound isolated from *Stylissa flabelliformis* sponge. *Indonesian Journal of Pharmacy*. Yogyakarta. 15 (2): 50-56.
- Setyowati, E.P., Sudarsono, and S. Wahyuono. 2005. Jaspamide: structure identification of citotoxic and fungicide compound from *Stylissa flabelliformis* sponges. *Indonesian Journal of Pharmacy*. Yogyakarta. 16 (1): 1-5.
- Soest, R.W.M. van, 1990, Shallow-water reef sponges of eastern Indonesia. *In*: New perspectives in sponge biology. K. Rützler. (Ed). Smithsonian Institution. John Press. Washington DC. 302-308