

Full Paper**UJI SITOTOKSIK KAPANG LAUT PERAIRAN NIPAH
TERHADAP *Artemia salina* Leach****CYTOTOXIC ACTIVITY OF MARINE FUNGI FROM NIPAH WATER
AGAINST *Artemia salina* Leach**Elrade Rofaani^{*)} dan Reni Nur`aini Adiati^{**)}**Abstract**

Test on cytotoxic activity of marine fungi from Nipah waters have been conducted. Each isolate was cultured on malt extract liquid for 15 days, and extracted by using ethyl acetate to both pellet and supernatant. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) was applied for cytotoxic test against *Artemia salina* Leach at concentrations of 10; 100; 500; and 1000 µg/ml. Cytotoxic activity showed that the percentage mortality of the brine shrimp was obtained by 1000 µg/ml at 75-100%, and the LC₅₀ of each extract was varied from 117.21 to 531.65 µg/ml. Furthermore, the lowest LC₅₀ was showed by sample with code number NA 14.3 at 117.21 µg/ml.

Key words: antioxidant, BSLT, LC₅₀, marine fungi**Pengantar**

Kapang laut atau kapang berfilamen yang hidup di laut diklasifikasikan sebagai organisme eukariotik yang mempunyai dinding sel seperti tumbuhan tetapi tidak berklorofil, komponen dinding selnya berupa kitin, tidak bisa memproduksi makanannya sendiri melainkan dengan cara mengabsorpsi nutrien-nutrien yang ada di lingkungannya (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Secara geografis kapang ini terdistribusi sangat luas, ada yang bersifat obligat dan ada yang fakultatif, dari perairan dangkal estuarin (payau), mangrove, terumbu karang sampai dengan perairan dalam dengan kondisi lingkungan ekstrim dan nutrien yang sangat terbatas.

Eksplorasi metabolit sekunder kapang laut berawal pada pertengahan abad ke-20, dan perkembangannya terus mening-

kat dan mengarah pada suatu hal yang baru. Kapang laut merupakan sumber senyawa-senyawa bioaktif dengan potensi untuk terapi dan hal ini belum banyak dieksploitasi. Beberapa penelitian senyawa bioaktif kapang laut telah ditunjukkan oleh *Aspergillus flavus* yang berasosiasi dengan spons *Hyrtios aff. Reticulantus*, mempunyai toksisitas terhadap *Artemia* dengan *brine shrimp lethality test* (Raquel, 2002).

Uji sitotoksitas menggunakan sel manusia atau hewan sering dipakai sebagai uji pendahuluan dalam rangka mencari obat antitumor baru. Obat antiviral dan antikanker adalah senyawa penghambat pertumbuhan sel tanpa merusak organisme induknya. Metoda *Artemia salina* adalah tes letalitas yang tidak spesifik untuk aktivitas antitumor dan metoda ini dapat digunakan sebagai indikator sitotoksitas serta ideal untuk

^{*)} Pusat Teknologi Farmasi dan Medika Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Jl. M. H. Thamrin 8 BPPT Gd. II/ Lt. 15 Jakarta-10340, Telp./Fax. : (021)3169505

^{**)} Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Institut Sains dan Teknologi Nasional, Jl. Moh. Kahfi II, Srengseng Sawah, Jakarta Selatan-12640, Telp: (021) 7271112, Fax: (021) 7869617

^{*} Penulis untuk korespondensi: E-mail: elrade_ms2000@yahoo.com

evaluasi terhadap prosedur fraksinasi (Scheuer, 1987).

Uji toksisitas terhadap *Artemia salina* dilakukan sebagai panduan dalam rangka isolasi metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Metode ini merupakan metode sederhana, mudah, murah dan cepat untuk skrining aktivitas ekstrak produk alam. Metode ini mempunyai korelasi positif dengan pengujian sitotoksitas pada 3PS (P-38S Leukimia *in vivo*) (Hostettmann, 1991). Demikian pula dengan Carballo *et al.* (2002) telah melakukan dua metode uji aktivitas sitotoksik terhadap spons, gorgonian, tunikata, assinidian, hasilnya menunjukkan bahwa uji kematian *Artemia salina* dan *cell line* (*lung carcinoma* A-549 dan *colon carcinoma* HT-29) mempunyai korelasi positif dan konsisten, dan menyarankan penggunaan kedua metode tersebut secara bersamaan untuk pengujian aktivitas produk alam laut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak kapang laut perairan Nipah terhadap *Artemia salina*.

Bahan dan Metode

Pulau Nipah terletak di antara Selat Philip dan selat utama (*main strait*), yang berbatasan langsung dengan Singapura. Posisi Pulau Nipah terletak di koordinat: 103 39'04.68"-103 39' 39.384" BT dan 1 8' 26.88"-1 9' 12.204" LU, dengan luas wilayah: 63 Ha (*lowest water surface*); 58 Ha (*mean sea level*); dan 28 Ha (*highest water surface*) (Anonim, 2004). Pengambilan sampel air dilakukan tanggal 2 dan 3 Agustus 2004 mengguna-

kan *water sampler* dari kedalaman 5 m.

Isolasi kapang laut

Satu ml sampel air ditumbuhkan pada media padat saboraud 2% di cawan petri selama 7 hari pada suhu kamar. Kapang yang telah tumbuh dipisahkan satu persatu ke cawan petri lain berdasarkan pengamatan makroskopis. Pemisahan ini dilakukan sampai diperoleh isolat tunggal (Tabel 1).

Masing-masing isolat kapang laut ditumbuhkan dalam 300 ml media cair ekstrak malt pada suhu ruang dengan metode *standing culture* selama 15 hari dan dilakukan pengukuran parameter pH awal dan akhir.

Ekstraksi

Supernatan dan miselia diekstraksi dengan pelarut etil asetat dengan tujuan mengambil senyawa-senyawa yang bersifat non polar sampai semipolar. Miselia diekstraksi dengan cara maserasi selama 3 x 1 jam dengan pengadukan, sedangkan untuk supernatan dilakukan ekstraksi cair-cair dengan perbandingan pelarut dan media 1:2, masing-masing dilakukan 3 kali. Hasil ekstraksi ini kemudian dikeringkan dengan *rotavapor* pada suhu 40°C dan kecepatan 80 rpm. Persiapan konsentrasi ekstrak dilakukan pada 1000 µg/ml dan dilanjutkan dengan konsentrasi yang lebih rendah 500, 100 dan 10 µg/ml.

Preparasi kultur *Artemia salina*

Telur *Artemia salina* ditetaskan dalam larutan garam dengan salinitas sekitar 13,8 g/l. Media penetasan telur tersebut diberi aerasi udara dan disinari dengan cahaya

Tabel 1. Daftar isolat tunggal yang telah diisolasi

No	Isolat	Posisi pengambilan sampel air	Kedalaman (m)
1	NA 14.1	103.41'.27"BT dan 1.3'.19"LU	5
2	NA 14.2	103.41'.27"BT dan 1.3'.19"LU	5
3	NA 14.3	103.41'.27"BT dan 1.3'.19"LU	5
4	NA 15	103.45'.47"BT dan 1.4'.49"LU	5
5	NA 23.1	103.30'.37"BT dan 1.11'13"LU	5
6	NA 23.2	103.30'.37"BT dan 1.11'13"LU	5

lampu. Proses penetasan dilakukan selama 48 jam (Hostettmann, 1991) dan *Artemia salina* yang telah berumur 48 jam siap untuk digunakan dalam penelitian.

Uji sitotoksik

Dalam botol uji yang berisi formula sampel dimasukkan 1 ml larutan garam (NaCl) 13,8 g/l dan 20 µl DMSO (dimethyl sulfoxid) untuk membantu kelarutan formula sampel. Setelah formula sampel larut, dimasukkan 20 ekor *Artemia salina* dan ditambahkan 4 ml larutan garam hingga diperoleh konsentrasi 10, 100, 500 dan 1000 µg/ml. Pengamatan terhadap *Artemia salina* dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung persentase kematiannya. Perbandingan negatif (blanko negatif) dibuat dalam botol uji DMSO dan Metanol. Uji BSLT dilakukan dengan 3 ulangan yang akan diperoleh persentase kematian, kemudian diolah dengan regresi linier untuk memperoleh *Lethal Concentration*₅₀ (*LC*₅₀) (Finney, 1971).

Analisa probit

Analisa probit dilakukan dengan menghitung persentase kematian *Artemia salina* dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Kematian} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ dengan perlakuan}}{A \text{ kontrol}} \times 100\%$$

dimana: A = Jumlah ikan

Penetapan nilai *LC*₅₀ dilakukan dengan menggunakan metoda regresi linear, dimana nilai logaritma konsentrasi digunakan sebagai absis (*X*_{*i*}) dan nilai probit prosentase kematian sebagai ordinat (*Y*_{*i*}).

$$a = \frac{(\sum Y_i) (\sum X_i^2) - (\sum X_i) (\sum X_i Y_i)}{\dots}$$

$$b = \dots$$

$$c = \frac{\dots}{\sqrt{(\sum X_i^2 \sum Y_i^2)}}$$

Persamaan regresinya adalah:

$$Y = a + b X$$

Hasil dan Pembahasan

Isolat tunggal kapang laut dikultur selama 15 hari kemudian dipisahkan antara miselia dan supernatan. Pengukuran pH media awal berkisar 7,8 turun menjadi 4,5, hal ini terjadi karena selama fase pertumbuhan (eksponensial) sampai fase pertumbuhan statis (stasioner) kapang terdapat sistem metabolisme yang memanfaatkan nutrien-nutrien yang ada menjadi massa sel.

Ekstrak miselia

Mortalitas *Artemia* oleh ekstrak miselia etil asetat disajikan pada Tabel 2. Ekstrak miselia etil asetat pada konsentrasi 1000 µg/ml menyebabkan kematian sebesar 93,33-100%. Persentase kematian ini terus menurun sebanding dengan konsentrasi ekstrak etil asetat miselia. Isolat NA 14.1 pada konsentrasi 1000 µg/ml menunjukkan persentase kematian 95%, hal ini juga tidak jauh berbeda pada konsentrasi 500 µg/ml (90%). Kemudian persentase kematiannya turun secara signifikan pada konsentrasi 100 µg/ml (11,67%) dan 10 µg/ml (6,67%).

Untuk mengetahui perbedaan persentase kematian pada faktor kelompok isolat yang dipengaruhi konsentrasi dilakukan dengan analisa statistik parametrik atau non-parametrik. Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas, konsentrasi 10 dan 1000 µg/ml digunakan analisa statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis H*, dengan hasil tidak berbeda nyata (*P*>0,05). Sedangkan konsentrasi 100 dan 500 µg/ml digunakan analisa statistik parametrik *one way anova* dengan hasil tidak berbeda nyata (*P*>0,05). Sehingga pada masing-masing konsentrasi, antara isolat kapang laut menunjukkan persentase kematian yang tidak berbeda nyata. Untuk mengetahui konsentrasi

Tabel 2. Rerata persentase kematian *Artemia* oleh ekstrak miselia

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	NA14.1	NA 14.2	NA 14.3	NA 15	NA 23.1	NA 23.2
1	1000	95	93,33	100	100	98,33	98,33
2	500	90	91,67	100	100	88,33	76,67
3	100	11,67	35	31,67	30	11,67	23,33
4	10	6,67	0	0	0	3,33	6,67

ekstrak miselia yang memberikan pengaruh persentase kematian 50%, maka dilakukan analisa probit (Tabel 3).

Tabel 3. Nilai LC_{50} ekstrak miselia

No	Isolat	LC_{50}	R
1	Na 14.1	137,91	0,8446
2	NA 14.2	230	0,9519
3	NA 14.3	117,21	0,9803
4	NA 15	117,95	0,9801
5	NA 23.1	137,64	0,8886
6	NA 23.2	120,9	0,8853

Keterangan :

R = koefisien korelasi

Isolat NA 14.1; NA 14.2; NA 14.3; NA 15; NA 23.1 dan NA 23.2 menunjukkan nilai LC_{50} yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$), yaitu berkisar pada 117,21-230 $\mu\text{g/ml}$.

Hasil LC_{50} oleh ekstrak miselia antar isolat kapang tidak berbeda nyata, yaitu berkisar pada 117,21-230 $\mu\text{g/ml}$. Keseluruhannya menunjukkan aktifitas sitotoksik yang tinggi terhadap *Artemia salina*. Ekstrak miselia tersebut bersifat toksik karena mempunyai nilai LC_{50} dibawah 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Meyer *et al.*, 1982). Sebagaimana didalam ekstrak miselia yang merupakan produk senyawa-senyawa dari dalam sel kapang (intraseluler) yang mempunyai sistem metabolisme yang memanfaatkan sumber-sumber nutrisi untuk pertumbuhannya, selain itu sel kapang juga memproduksi hasil samping berupa

metabolit sekunder yang bisa dimanfaatkan kelanjutannya untuk aplikasi kesehatan dan farmasi.

Hasil uji LSD (*Least Significant Difference*) pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$, NA 14.1; NA 14.2 berbeda nyata terhadap NA 14.3; NA 15; dan NA 23.1 ($P<0,05$). Sementara isolat NA 14.3 berbeda nyata terhadap NA 23.2 ($P<0,05$). Kemudian pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$, NA 14.1; NA 14.2 berbeda nyata terhadap NA 14.3 ($P<0,05$) dan NA 23.1 ($P<0,05$). Selanjutnya NA 15 berbeda nyata hanya terhadap NA 23.1 ($P<0,05$). NA 23.1 berbeda nyata terhadap NA 14.1 ($P<0,05$); NA 14.2 ($P<0,05$); NA 15 ($P<0,05$); dan NA 23.2 ($P<0,05$). Konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$, NA 14.1, NA 14.2; NA 14.3; NA 15; dan NA 23.2 berbeda nyata terhadap NA 23.1 ($P<0,05$).

Persentase kematian *Artemia salina* oleh ekstrak supernatan etil asetat berkisar pada 75-100%, semakin rendah konsentrasi maka persentase kematian semakin kecil bahkan 0%. Nilai LC_{50} ekstrak supernatan terlihat pada Tabel 5.

Analisa statistik juga dilakukan untuk mengetahui perbedaan pada faktor kelompok isolat yang dipengaruhi konsentrasi. Pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$, persentase kematian masing-masing isolat tidak terdistribusi normal dan homogen, sedangkan konsentrasi 100, 500

Tabel 4. Rerata mortalitas *Artemia* sp. ekstrak supernatan

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	NA14.1	NA 14.2	NA 14.3	NA 15	NA 23.1	NA 23.2
1	1000	98,33	93,33	96,67	100	75	95
2	500	91,67	91,67	61,67	75	46,67	78,33
3	100	26,67	26,67	5	1,67	3,33	33,33
4	10	0	0	1,67	1,67	0	6,67

dan 1000 µg/ml terdistribusi normal dan homogen. Berdasarkan analisa Kruskal-Wallis H, konsentrasi 10 µg/ml memberikan hasil tidak berbeda nyata pada ($P>0,05$). Sedangkan konsentrasi 100, 500, dan 1000 µg/ml digunakan *one-way anova* memberikan hasil berbeda nyata pada ($P<0,05$). Uji lanjutan untuk konsentrasi 100, 500, dan 1000 µg/ml dilakukan dengan menggunakan LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok isolat.

Penetapan nilai LC_{50} dilakukan dengan metoda regresi linear, dimana nilai logaritma konsentrasi digunakan sebagai absis dan nilai probit prosentase kematian sebagai ordinat. Hasil LC_{50} untuk semua ekstrak tertera pada Tabel 5.

Tabel 5. LC_{50} ekstrak supernatan

No	Isolat	LC_{50}	R
1	Na 14.1	209,98	0,9855
2	NA 14.2	239,11	0,9638
3	NA 14.3	246,16	0,8368
4	NA 15	144,64	0,7171
5	NA 23.1	531,65	0,9963
6	NA 23.2	123,92	0,9626

Keterangan : R = koefisien korelasi

Nilai LC_{50} oleh ekstrak supernatan menunjukkan perbedaan yang nyata, yaitu isolat NA 23.1 yang berbeda nyata terhadap isolat lain, yaitu NA 14.1; NA 14.2; NA 14.3; NA 15; NA 23.2. Nilai LC_{50} ini berkisar pada 123,92-531,65 µg/ml, yang keseluruhannya dibawah 1000 µg/ml. Berdasarkan kriteria Meyer *et al.* (1982) ekstrak supernatan tergolong bersifat toksik terhadap *Artemia salina*. Aktivitas sitotoksik ini didukung oleh pembentukan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang diekspresikan di luar sel kapang. Sebagaimana kapang *P. crysogenum* NRRL 1951 yang memproduksi senyawa metabolit sekunder dalam jumlah besar dibawah permukaan kultur (Judoamidjojo, 1992).

Nilai LC_{50} oleh ekstrak supernatan menunjukkan perbedaan yang nyata antara masing-masing isolat ($P<0,05$), yaitu 123,92-531,65 µg/ml. Perbedaan sifat toksik terhadap *Artemia salina* ini tergantung pada karakteristik senyawa yang terdapat pada ekstrak tersebut. Kemungkinan besar, senyawa yang potensial mempunyai aktivitas sitotoksik adalah ekstrak miselia, yang sering juga disebut dengan intraseluler. Dari nilai LC_{50} yang diperoleh bisa menjadi panduan untuk melanjutkan ke tahapan isolasi senyawa dari ekstrak miselia.

Kesimpulan

Hasil uji sitotoksik isolat kapang laut NA 14.1; NA 14.2; NA 14.3; NA 15; NA 23.1; dan NA 23.2 oleh ekstrak miselia dan supernatan menunjukkan nilai LC_{50} ekstrak miselia tidak berbeda nyata ($P>0,05$), yaitu berkisar pada 117,21-230 µg/ml, sedangkan ekstrak supernatan menunjukkan nilai LC_{50} yang berbeda nyata ($P<0,05$), yaitu 123,92-531,65 µg/ml. Persentase kematian dari varian konsentrasi diperoleh LC_{50} terendah pada ekstrak supernatan NA 14.3 sebesar 117,21 µg/ml.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih diucapkan kepada Tim ekspedisi POTRETS Pulau Nipah (Pusat Teknologi Pemetaan Sumberdaya Alam dan Tim Kapal Baruna Jaya 1-Balai Teknologi Survei Kelautan-BPPT).

Daftar Pustaka

Anonim. 2004. Ekspedisi potential reports (POTRETS) pulau nipah. <http://tisd.bppt.go.id/nipah/nipah-geologi.html>. Diakses tanggal 21 Desember 2004.

- Lay, B.W. dan S. Hastowo. 1992. Mikrobiologi. CV Rajawali. Jakarta. 376 p.
- Carballo, J.L., Z.L. Hernandez-Inda, P. Perez, and M. D. Garcia-Gravales. 2002. Methodology article: a comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. 1472-6750. BMC Biotechnology. Mexico. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/17>. Diakses tanggal 20 Februari 2006.
- Csuros, M. and C. Csuros. 1999. Microbiological examination of water and wastewater. Lewis Publishers. Boca Raton London New York Washington, D.C. 70-72.
- Finney, D. L. 1971. Probit analysis. 3rd Edition, Canbridge University Press. London. 333 p.
- Hostettmann, K. 1991. Methods in plant biochemistry assays for bioactivity. Institute of Pharmacognosy and Phytochemistry. University of Lausanne. Switzerland. London. 6:8-33.
- Judoamidjojo, M. 1992. Teknologi fermentasi. PAU Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor. 272-273.
- Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1979. Marine mycology-the higher fungi. Academic Press. New York. 690 p.
- Meyer, B.N. *et al.* 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica*. Braunschweig. 31-34.
- Raquel, C.J. 2002. Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from marine sponges and sponge-derived fungi. Dissertation of Doctoral. Wurzburg University. Germany. 9-90.
- Scheuer, P.J. 1987. Biorganic marine chemistry. Vol. I. Spinger-Verlag, Berlin Heidelberg. 20-34.
- Panggabean, M.G.L. 1984. Teknik penetasan dan pemanenan *Artemia salina*. Oseana. Jakarta: IX(2):1-4.