

UJI TOKSISITAS INFUSA *ACALYPHA SIAMENSIS* DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)

Sheila Frizqia Jelita^{1,2}, Gita Widi Setyowati^{1,2}, Michelle Ferdinand^{1,2}, Ade Zuhrotun², Sandra Megantara³

¹Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21 Sumedang 45363

²Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21 Sumedang 45363

³Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran Jl.
Raya Bandung-Sumedang KM 21 Sumedang 45363

sheilafrzq@gmail.com

Diserahkan 24/01/2020, diterima 29/01/2020

ABSTRAK

Uji toksisitas merupakan uji untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa yang terjadi dalam waktu. Subjek uji untuk uji toksisitas adalah larva udang. Larva udang memiliki karakteristik yang sensitif dan akan mati apabila zat atau senyawa asing tersebut bersifat toksik. Uji toksisitas digunakan untuk mengetahui pengaruh racun yang dihasilkan oleh dosis tunggal dari suatu campuran zat kimia pada hewan coba sebagai uji pra skrining senyawa bioaktif antikanker. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC50 (*lethal concentration*) ekstrak uji. Semakin kecil harga LC50 semakin toksik suatu senyawa. Hasil LC50 di dengan analisis probit menggunakan program EPA probit. Nilai LC50 dengan nilai sebesar 1333,5 ppm untuk metode vial (makroskopik).

Kata kunci: BSLT, *Lethal Concentration* 50% (LC50), Uji toksisitas.

ABSTRACT

Toxicity test is a test to observe the pharmacological activity of a compound. The test subject for the toxicity test was shrimp larvae. Shrimp larvae have sensitive characteristics and will die if the foreign substances or compounds are toxic. Toxicity tests are used to determine the effect of poisons produced by a single dose of a chemical mixture in experimental animals as a pre-screening test for anticancer bioactive compounds. The results is the LC50 (lethal concentration) value of the test extract. The smaller the price of LC50, the more toxic a compound is. The LC50 results in probit analysis using the EPA probit with a value of 1333.5 ppm for the vial method and 862.97 ppm for the microplate method.

Keywords: BSLT, *Lethal Concentration* 50% (LC50), Toxicity Test.

PENDAHULUAN

Kanker termasuk ke dalam ancaman bagi manusia karena pertumbuhan sel tubuh yang abnormal menyerang suatu organ dan akan berkembang biak sehingga merusak sel tubuh dengan sangat cepat. Hingga saat ini masih belum ada pengobatan yang pasti dapat menghentikan pertumbuhan sel kanker tersebut. Maka dari itu, dilakukan pengujian terhadap beberapa senyawa alami maupun sintesis untuk mengobatinya.

Pemakaian bahan alam sebagai obat tradisional di masyarakat dijamin keamanannya oleh pemerintah dengan implementasi dari Permenkes No.760/Menkes/Per/IX/1992, tentang obat tradisional dan fitofarmaka. Sebelum menjadi suatu sediaan fitofarmaka, setiap bahan alam harus melewati beberapa tahapan meliputi uji farmakologi eksperimental, uji toksisitas, uji klinis, uji kualitas dan pengujian lainnya sesuai persyaratan demi keamanan pengguna (Vivi, dkk., 2006).

Bahan alam yang digunakan adalah tumbuhan teh-tehan (*Acalypha siamensis*). Tanaman ini diketahui memiliki metabolit sekunder acalyphaser A yaitu senyawa turunan tetraterpene dan masuk ke dalam golongan terpenoid dan dipercaya memiliki khasiat sebagai antikanker (Kambara *et al.*, 2006).

Uji toksisitas merupakan uji untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat setelah terpapar atau pemberian dalam dosis tertentu. Prinsip uji toksisitas adalah bahwa komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah (Makiyah dan Sumirat, 2017). Larva udang memiliki kulit yang tipis dan peka terhadap lingkungannya sehingga banyak digunakan dalam uji toksisitas. Zat atau senyawa asing yang ada di lingkungan akan terserap ke dalam tubuh secara difusi dan langsung memengaruhi kehidupannya. Larva udang yang sensitif ini akan mati apabila zat atau senyawa asing tersebut bersifat toksik.

Uji toksisitas digunakan untuk mengetahui pengaruh racun yang dihasilkan oleh dosis tunggal dari suatu campuran zat kimia pada hewan coba sebagai uji pra skrining senyawa bioaktif antikanker.

Salah satu metode awal yang sering dipakai untuk mengamati toksisitas senyawa dan merupakan metode penapisan untuk aktivitas antikanker senyawa kimia dalam ekstrak tanaman adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), dengan menggunakan cara Meyer. Metode ini ditujukan terhadap tingkat mortalitas larva udang *Artemia salina* L. yang disebabkan oleh ekstrak uji.

Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC50 (*lethal concentration*) ekstrak uji, yaitu jumlah dosis atau konsentrasi ekstrak uji yang dapat menyebabkan kematian larva udang sejumlah 50% setelah masa inkubasi 24 jam. Senyawa dengan LC50 < 1000 ppm dapat dianggap sebagai suatu senyawa aktif berdasarkan Meyer (Meyer, 1982).

Penelitian bertujuan untuk mengetahui potensi aktivitas biologi tanaman berdasarkan toksisitas senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya, dan sekaligus sebagai uji penapisan awal aktivitas antikanker senyawa kimia dalam ekstrak tanaman (Colegate and Russel., 1993).

ALAT DAN BAHAN

Alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas, cawan petri, lampu belajar mikropipet dan tip, pipet tetes, pompa aquarium, saringan, tabung eppendorf, vial (30 buah), wadah bersekat dan tutup gelap.

Bahan yang digunakan yaitu air suling, DMSO, ekstrak daun teh-tehan, label dan spidol, larva *Artemia salina* Lich., metanol, garam laut, dan ragi.

METODE

Penyiapan Ekstrak dan Pemanding

Sampel disuspensikan dalam air laut buatan dengan penambahan DMSO sebagai kosolven (1%) sampai konsentrasi 10.000 µg/mL (larutan stok). Larutan ini pada saat pengujian akan diencerkan dengan suspensi larva sehingga pada saat pengujian, konsentrasi ekstrak dalam vial berada pada rentang 15,625-1000 µg/mL. Proses pengenceran dilakukan pada vial terpisah.

Penyiapan Suspensi Larva Artemia salina Lich

Penetasan *A.salina* dilakukan dalam 3 L medium penetasan yang ditempatkan dalam wadah bersekat yang memiliki dua bagian, satu bagian diberi tutup gelap dan bagian lainnya dibiarkan terbuka. Sebanyak 100 mg telur dimasukkan dalam bagian wadah yang diberi tutup gelap. Selanjutnya telur dibiarkan menetas menjadi larva pada suhu kamar selama 2x24 jam dengan aerasi menggunakan pompa aquarium. Setelah menetas, larva akan bergerak menuju bagian wadah yang terbuka yang diberi sumber cahaya lampu. Untuk keperluan pengujian, larva dipindahkan dengan cara dipipet ke dalam cawan petri yang berisi air laut buatan. Dalam wadah baru tersebut dilakukan proses pemekatan dengan cara pengurangan volume air laut menggunakan pipet atau selang plastik kecil sampai didapatkan suspensi dengan

kepekatan larva 10-15 ekor per 100 μ L air laut buatan. Proses ini dilakukan di bawah cahaya lampu.

Tahap Pengujian

Secara makro, vial (yang sudah mengandung 10 ekor larva) ditambah air laut buatan hingga volume 9 mL. Tiap vial ditambah sebanyak 1 mL ekstrak daun teh-tehan dengan konsentrasi tertentu. Konsentrasi yang digunakan yaitu 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125

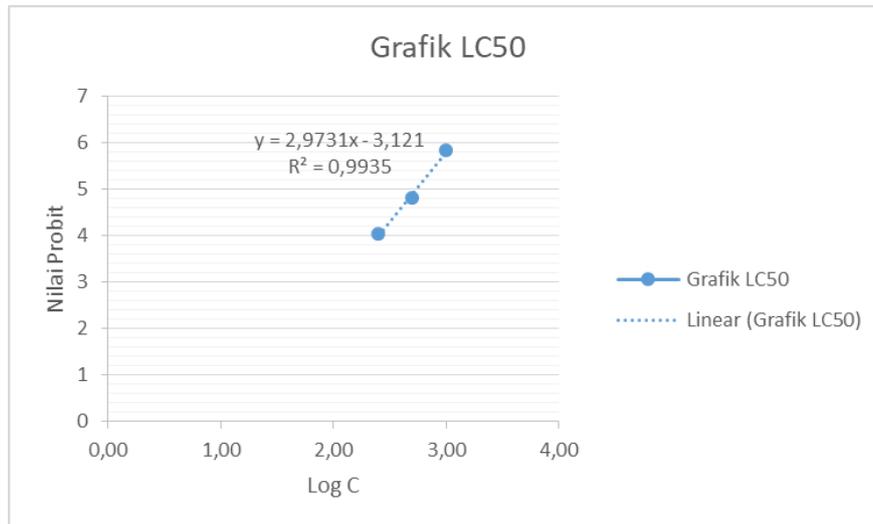
ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm, dan 16,25 ppm. Larva dibiarkan terpapar oleh ekstrak daun teh-tehan pada suhu kamar di bawah cahaya lampu selama 24 jam. Blanko dibuat berupa air laut buatan yang ditambah DMSO 1% dan mengandung suspensi larva. Kematian larva *A. salina* dalam vial diamati dan dicatat. Jumlah kematian selanjutnya dijadikan data untuk menghitung prosentase kematian dengan menggunakan rumus.

HASIL

Tabel 1. Data *Macrowell* (Vial)

| Konsentrasi (ppm) | Blanko | Jumlah Larva Mati | Jumlah Larva Hidup | Total Larva | % Mortalitas | Rata-rata (%) | Nilai Probit | LogC |
|-------------------|--------|-------------------|--------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|------|
| 1000 | 0 | 12 | 3 | 15 | 80,0 | 80 | 5,84 | 3,00 |
| | 0 | 7 | 8 | 15 | 46,7 | | | |
| 500 | 0 | 7 | 8 | 15 | 46,7 | 43 | 4,82 | 2,70 |
| | 0 | 6 | 9 | 15 | 40,0 | | | |
| 250 | 0 | 2 | 13 | 15 | 13,3 | 17 | 4,05 | 2,40 |
| | 0 | 3 | 12 | 15 | 20,0 | | | |
| 125 | 0 | 0 | 15 | 15 | 0 | 0 | - | 2,10 |
| | 0 | 0 | 15 | 15 | 0 | | | |
| 62,5 | 0 | 0 | 15 | 15 | 0 | 0 | - | 1,80 |
| | 0 | 0 | 15 | 15 | 0 | | | |
| 31,25 | 0 | 0 | 15 | 15 | 0 | 0 | - | 1,49 |
| | 0 | 0 | 15 | 15 | 0 | | | |
| 15,625 | 0 | 0 | 15 | 15 | 0 | 0 | - | 1,19 |
| | 0 | 0 | 15 | 15 | 0 | | | |

Grafik 1. Grafik LC50 *Macrowell* (Vial)



LC50:

$$y = 2,9731x - 3,121$$

$$5 = 2,9731x - 3,121$$

$$x = 2,731$$

$$LC50 = \text{antilog } 2,731$$

$$LC50 = 538,88 \text{ ppm}$$

PEMBAHASAN

Pada Pada praktikum kali ini dilakukan penentuan LC50 dari ekstrak teh-tehan dengan Uji Toksisitas yang dimaksudkan untuk memaparkan adanya efek toksik atau menilai batas keamanan dalam kaitannya dengan penggunaan suatu senyawa. Metode Uji Toksisitas yang digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Bioassay* atau BSLB/BSLT yang bertujuan untuk menentukan konsentrasi yang dibutuhkan pada ekstrak teh-tehan dalam membunuh setengah populasi awal hewan uji, "*Brine shrimp lethality test*" adalah uji pendahuluan suatu senyawa yang memiliki keuntungan yaitu hasil yang diperoleh lebih cepat (24 jam), tidak

mahal, mudah pengerjaannya dari pengujian lainnya karena tidak membutuhkan peralatan dan latihan khusus/ sampel yang digunakan relatif sedikit. Efek toksik dapat diketahui atau diukur dari kematian larva karena pengaruh bahan uji.

Metode BSLT juga digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa toksik dalam proses isolasi senyawa dari bahan alam yang berefek sitotoksik dengan menentukan harga LC50 dari senyawa aktif. Metode BST dapat digunakan dari berbagai sistem uji seperti uji pestisida, mitotoksin, polutan, anestetik, komponen seperti morfin, karsinogenik, dan ketoksikan dari hewan

dan tumbuhan laut serta senyawa racun dari tumbuhan darat.

Dengan dilakukannya pengujian BSLT ini dapat ditentukan nilai LC50 yang tepat dari ekstrak *Acalypha siamensis* yang merupakan parameter ketoksikan akut berdasarkan analisa probit. LC50 adalah konsentrasi dari suatu senyawa kimia di udara atau dalam air yang dapat menyebabkan 50% kematian pada suatu populasi hewan uji atau makhluk hidup tertentu. Penggunaan LC50 dimaksudkan untuk pengujian ketoksikan dengan perlakuan terhadap hewan uji secara berkelompok yaitu pada saat hewan uji dipaparkan suatu bahan kimia melalui udara maka hewan uji tersebut akan menghirupnya atau percobaan toksisitas dengan media air. Nilai LC50 dapat digunakan untuk menentukan tingkat efek toksik suatu senyawa sehingga dapat juga untuk memprediksi potensinya sebagai antikanker.

Toksisitas adalah efek berbahaya dari bahan kimia atau suatu obat pada organ target. Umumnya seperti senyawa kimia mempunyai potensi terhadap timbulnya gangguan atau kematian jika diberikan kepada organisme hidup dalam jumlah yang cukup. Ekstrak yang ditambahkan pada hewan uji yang dilakukan di vial yaitu sebesar 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm,

62,5 ppm, 31,25 ppm masing-masing sebanyak 5 mL.

Uji BSLT ini dilakukan secara duplo untuk memperoleh keakuratan data dan mengurangi kesalahan hasil dalam penelitian. Selain itu, perlu disiapkan larutan kontrol yang berisi air laut sintetik. Penambahan larutan kontrol bertujuan untuk mengetahui pengaruh air laut maupun faktor lain terhadap kematian larva udang *Artemia salina* L. sehingga kematian larva dapat dipastikan karena efek dari ekstrak pekat sampel ekstrak yang ditambahkan.

Dapat diketahui bahwa masing-masing konsentrasi ekstrak digunakan memperlihatkan pengaruh yang berbeda. Pengujian di vial atau secara makroskopik ini dilakukan pengamatan dan dihitung banyaknya larva yang mati. Didapatkan hasil larva yang mati pada konsentrasi 2000, 1000, dan 500 ppm (duplo) yaitu memiliki rata rata presentase kematian sebesar 63%, 43%, 17%.

Menurut Meyer dkk. (1982) tingkat toksisitas dari ekstrak tanaman dapat ditentukan dengan melihat harga LC50-nya. Apabila harga LC50 lebih kecil dari 1000 µg/ml dikatakan toksik, sebaliknya apabila harga LC50 lebih besar dari 1000µg/ml dikatakan tidak toksik. Tingkat toksisitas tersebut akan memberi makna terhadap potensi aktivitasnya

sebagai antikanker. Semakin kecil harga LC50 semakin toksik suatu senyawa.

Analisa data berdasarkan perhitungan mortalitas larva yang mati pada pengamatan 24 jam dan perhitungan nilai *lethal concentration* 50% (LC50) oleh analisis probit dengan program EPA probit. EPA Probit merupakan salah satu metode analisis statistik yang digunakan untuk menghitung besarnya LC50 dengan menggunakan analisis probit. Analisis tersebut diperkenalkan oleh Finney tahun 1971. Analisis probit umumnya digunakan dalam toksikologi untuk menentukan toksisitas relatif dari bahan kimia untuk organisme hidup. Hal ini dilakukan dengan menguji respon organisme di bawah berbagai konsentrasi masing-masing bahan kimia tersebut dan kemudian membandingkan konsentrasi. Metode regresi linear digunakan untuk mendapatkan grafik garis lurus apabila probit kematian ditransformasikan pada log konsentrasi. Konsentrasi yang dapat mengakibatkan kematian 50% populasi hewan diperoleh dengan menarik garis dari 50% probit kematian.

Mekanisme kerja senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak teh-tehan adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Senyawa

ini juga dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva yang mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa dan tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan. Senyawa toksik yang ada pada ekstrak dapat masuk melalui bagian mulut *A. salina* dan diabsorpsi masuk ke dalam saluran pencernaan terjadi proses absorpsi melalui membran sel. Setelah proses absorpsi dilanjutkan dengan proses distribusi senyawa toksik ke dalam tubuh *A. salina*, dan terjadi proses kerusakan reaksi metabolisme. Struktur anatomi tubuh *A. salina* pada tahap naupli masih sangat sederhana, yaitu terdiri dari lapisan kulit, mulut, antena, saluran pencernaan atau digesti yang masih sederhana, dan calon thoracopoda. Perubahan gradient konsentrasi yang drastis antara di dalam dan di luar sel yang menyebabkan senyawa toksik mampu menyebar dengan baik ke tubuh *A. salina*. Efek kerusakan metabolisme yang ditimbulkan terjadi secara cepat dapat dideteksi dalam waktu 24 jam, hingga menyebabkan 50% kematian *A. salina*.

Pada penelitian ini nilai probit yang didapatkan dengan metode vial (makro) yaitu sebesar 5.33, 4.82, dan 4.05 pada vial dengan konsentrasi 2000, 1000, dan 500 ppm. Setelah didapatkan nilai probit, dilakukan pembuatan grafik antara nilai probit dan konsentrasi ekstrak yang

dimasukan kedalam *microplate* dan vial. Didapatkan nilai regresi pada metode yaitu $y = 2,9731x + 3,121$. Pada perhitungan LC50, nilai y yang dimasukan yaitu sebesar 5. Nilai 5 mewakili nilai LC50 agar didapatkan berapa konsentrasi dari LC50 yang didapatkan dari hasil penelitian. Didapatkan hasil perhitugan LC50 yaitu sebesar 538,8 ppm.

Nilai LC50 kurang dari 1000 ppm (<1000ppm) memiliki aktivitas toksik yang lebih kuat, semakin kecil konsentrasi yang dihasilkan maka akan semakin tinggi sifat toksiknya pada larva *Artemia salina* Leach. Nilai LC50 lebih dari 1000 ppm (>1000 ppm) tidak memiliki aktifitas toksik. Hasil perhitungan LC50 dengan menggunakan persamaan grafik didapatkan nilai sebesar 538,8 ppm sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak *Acalypha siamensis* ini memiliki potensi untuk mematikan larva *Artemia salina* L. pada penelitian ini. Semakin kecil nilai LC50 dari suatu sampel maka semakin tinggi bioaktivitasnya. Oleh karena itu, ekstrak *Acalypha siamensis* dianggap memiliki bioaktivitas yang tinggi dan dinyatakan sangat toksik karena memiliki LC50 rendah.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dapat menghitung nilai LC50 dari analisis probit setelah didapatkan hasil

dari 2 metode yang digunakan yaitu metode macrowell (vial) dan microwell (microplate). Nilai LC50 yang didapatkan adalah 538,8 ppm. Nilai LC50 dari metode *microplate* memiliki potensi toksik karena nilai yang di bawah 1000ppm. Konsentrasi LC50 yang masih dibawah 15,625 ppm perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar aktivitas toksiknya dapat diamati dengan lebih baik lagi.

DAFTAR PUSTAKA

- Colegate, S.M. dan J.M. Russel. 1993. *Bioactive Natural Products, Detection, Isolation, and Structural Determination*. Boca Raton USA, CRC Press. A hlm. 442,444-448.
- Makiyah, A., dan Sumirat T. 2017. Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD50 Ekstrak Etanol Umbi Iles-iles (*Amorphophallus variabilis* Bl.) pada Tikus Putih Strain Wistar. *MKB*, Volume 49 No. 3, hlm.145-155.
- Meyer, H.N. 1982. *Brine Shrimp Lethality Test: Med. Plant Research*. Vol. 45 No. 3. Amsterdam, Hipokrates Verlag Gmbrl. Hlm. 1-3
- Vivi Lisdawati, Sumali Wiryowidagdo, dan L.Broto S. Kardono. 2006. BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT) DARI BERBAGAI FRAKSI EKSTRAK DAGING BUAH DAN KULIT BIJI MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*). *Bul. Penel. Kesehatan* Vol. 34 No. 3, hlm 111-118.
- Kambara, H., Yamada, T., Tsujioka, M., Matsunaga, S., Tanaka, R., Ali, H. I., and Fauzi, Z. M. 2006. A study

on medicinal plants from
Malaysia focused on *Acalypha*
siamensis Oliv. ex Gage. isolation
and structure of a new

tetraterpene, acalyphaser A.
Chemistry & biodiversity, 3(12),
1301-1306.