

Toksisitas Akut Senyawa Metabolit Sekunder dari Spons Laut *Clathria* sp.

Baru Sadarun¹, Muh. Hajrul Malaka², Wahyuni², Sahidin^{2*},

¹Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Halu Oleo, Kampus Hijau Bumi Tridharma Anduonohu Kendari 93232

²Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo, Kampus Hijau Bumi Tridharma Anduonohu Kendari 93232

Abstrak

Isolasi dan penentuan struktur senyawa metabolit sekunder dari ekstrak metanol spons laut *Clathria* sp serta uji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach telah dilakukan. Tahapan isolasi dimulai dengan ekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan pelarut metanol dilanjutkan, selanjutnya dilakukan pemisahan dengan teknik kromatografi, meliputi kromatografi kolom vakum (KKV), dan kromatografi radial (KR). Struktur senyawa hasil pemurnian dianalisis dengan metode spektroskopi menggunakan FTIR dan NMR-1D (¹H dan ¹³C-NMR) serta dibandingkan dengan data sejenis dari literatur. Isolat diperoleh berupa padatan berwarna putih *3β-(hydroxymethyl)-A-nor-5α-cholest-15-ene*. Hasil uji toksisitas akut isolat terhadap larva *A. salina* menunjukkan isolat tidak bersifat toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 497,58 ppm

Kata kunci: *Clathria*, spons, steroid, toksisitas, *A. salina*

1. Pendahuluan

Indonesia sebagai negara kepulauan terbesar di dunia dengan 17.506 pulau dan 81.000 km garis pantai diakui yang terkaya di dunia dalam hal keanekaragaman organisme laut dalam sistem terumbu karang [1]. Fungsi utama ekosistem terumbu karang yang penting adalah menciptakan kesinambungan antara daratan dan lautan, sedangkan fungsi kimia ekosistem terumbu karang adalah bahan obat-obatan yang memiliki aktivitas farmakologi serta sebagai penyerap karbon di alam [2]. Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut jenis terumbu karang seperti spons untuk pencarian senyawa bioaktif yang baru.

Spons merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang persentase keaktifannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat [3]. Penelitian yang telah dilakukan terhadap spons menghasilkan senyawa baru dengan struktur yang unik dan memiliki aktivitas farmakologi [4].

Aktivitas sebagai antikanker dan antivirus juga ditunjukkan oleh senyawa-senyawa dalam spons [5].

Selain itu spons juga memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, analgetik, immunomodulator, alergi, antivirus, anti-AIDS, anti-TBC dan anti-alzheimer [8]. Metabolit sekunder yang telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari spons Indonesia antara lain β-sitosterol; Cholest-5-en-3β-ol; Cholestan-3β-ol; Ergosta-5,22-dien-3β-ol; 9,19-Siklocholest-24-en-3β-ol; dan Ergost-5-en-3β-ol, senyawa tersebut menunjukkan toksisitas terhadap *Artemia salina* [4].

Beragamnya jenis metabolit sekunder yang belum diketahui dan mungkin terdapat dalam spons *Clathria* sp maka isolasi dan identifikasi kandungan metabolit sekunder merupakan langkah awal yang penting dalam penelitian pencarian senyawa bioaktif baru dari spons yang dapat menjadi prekursor bagi sintesis obat baru atau prototipe obat beraktivitas tertentu.

2. Metode

2.1 Umum

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol selama 3x24 jam dengan penggantian pelarut. Isolasi dilakukan dengan teknik kromatografi vakum cair (KCV), kromatografi radial (KR) menggunakan fase

* KBK Farmasi Sains, Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo
Email: sahidin02@yahoo.com

diam Si-gel 60 GF (Merck), analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄, 0.25 mm). Pengukuran spektra 1D-NMR (¹H dan ¹³C-NMR) dan 2D-NMR (HMBC, HMQC) menggunakan spektrometer Agilent 500 pada frekuensi 500 MHz (¹H) dan 125 MHz (¹³C) di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Institut Teknologi Bandung, Indonesia.

2.2 Sampel Spons

Spons *Clathria sp* diperoleh di Taman Pendidikan Laut Bintang Samudra, Kabupaten Konawe. Pengambilan sampel dilakukan pada daerah tubir karang (*reef slope*) dengan kemiringan 70⁰ mengikuti kontur sejajar garis pantai. Spons diambil dari perairan pada kedalaman yang sama menggunakan peralatan selam *Self Contained Underwater Breathing Apparatus* (SCUBA) dari kedalaman 2-10 meter dengan metode koleksi bebas induk. Spons dipotong 70 % dari volume awal untuk memberikan kesempatan beregenerasi.

2.3 Isolasi

Sebanyak 2 kg serbuk kering spons *P. pulchrum* Bl dimaserasi dengan metanol selama 3x24 jam di dalam wadah yang tertutup dengan penggantian pelarut. Setelah dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* (Buchi, Switzerland), diperoleh ekstrak kental berwarna kecokelatan (70 g). Ekstrak dipisahkan dengan kromatografi cair vakum (25 g, diameter kolom Φ 13,5 cm, fase diam Si-gel 150 g) dengan fase gerak yang ditingkatkan kepolarannya (*n*-heksan:etilasetat, metanol), menghasilkan 20 fraksi yang selanjutnya dikelompokkan ke dalam 5 fraksi gabungan berdasarkan profil KLT. Fraksi F5 (15 g) dipisahkan lebih lanjut dengan KCV (diameter kolom Φ 5 cm, fase diam Si-gel 80 g, dan fase gerak etilasetat:*n*-heksan (10-100%, MeOH 100%)) menghasilkan 7 fraksi gabungan. Pemurnian fraksi F5e menggunakan kromatografi radial (KR), fase diam Si-gel PF₂₅₄, fase gerak etilasetat:*n*-heksan (30:70%) menghasilkan padatan putih sebanyak 15 mg.

2.4 Identifikasi

Isolat diperoleh sebagai padatan putih, Spektrum IR (KBr) $\tilde{\nu}_{maks}$ (cm⁻¹) 3456 (OH); 2954 (Csp³-H); 1466 (C-C); 1327 (C-C); 1075 (C-O). Spektrum (¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 3,71 (1H, *dd*); 3,41 (1H, *t*, *J*=7,7 Hz); 1,11 (1H, *d*, *J*=6,5 Hz); 0,85 (1H, *d*); 0,7 (1H, *s*); 0,6 (1H, *s*). Spektrum ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 Hz): 39.2, 27.4, 42.7, 67.1, 52.6, 24.6, 32.8, 35.6, 55.5, 44.1, 22.8, 39.9, 43.1, 56.5, 24.6, 28.3, 56.4, 14.7, 12.5, 35.9, 18.9, 36.3, 23.9, 40.9, 28.1, 22.9, 23.3.

2.5 Uji Toksisitas dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Larutan stok dari masing-masing bahan uji dengan cara melarutkan 15 mg isolat dalam 1.500 μL DMSO 5% masing-masing pelarut yang sesuai sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 10.000 ppm. Pelarut yang digunakan disesuaikan dengan sifat kelarutan sampel. Seri konsentrasi sampel uji dibuat dengan pengambilan volume tertentu dari larutan stok menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam vial. Vial yang telah diisi sampel dan kontrol diangin-anginkan hingga kering dan tidak berbau pelarut lagi.

Penetasan telur *Artemia salina* Leach dilakukan dalam wadah penetas telur atau akuarium mini dengan dua bagian ruang bersekat, satu bagian yang terisolasi dari cahaya dan bagian yang lain yang disinari oleh cahaya lampu. Sekat dibuat berlubang dengan diameter 2 mm. Air laut dimasukkan ke dalam wadah, serta diaerasi menggunakan aerator. Sejumlah telur *Artemia salina* Leach dimasukkan ke dalam satu ruang, kemudian ruang tersebut ditutup. Sisi yang lain dibiarkan terbuka dan diberi lampu untuk menarik *Artemia salina* Leach yang telah menetas melalui lubang sekat. Telur akan menetas kira-kira setelah 18-24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas [7].

Pengujiannya dilakukan dengan menggunakan konsentrasi desimal dilakukan dengan 4 variasi konsentrasi yaitu 500 ppm; 250 ppm; 100 ppm; 50 ppm dengan 3 kali ulangan [8]. Pengujian sampel dilakukan dengan cara memasukkan masing-masing sampel ke dalam vial yang kemudian diuapkan dengan diangin-anginkan hingga pelarutnya hilang. Selanjutnya vial diisi air laut 5 mL dan ditambahkan 50 μL DMSO 1%, kemudian dihomogenkan dengan vortex. Sebanyak 10 ekor *A. salina* umur 48 jam yang bergerak aktif dipilih secara acak, dimasukkan ke dalam vial yang berisi sampel yang bebas pelarut menggunakan pipet tetes. Satu tetes suspensi tepung jagung (1 mg/5 mL air laut) ditambahkan ke dalamnya sebagai makanan *A. salina* kemudian ditambahkan air laut sampai 5 mL. Vial diletakkan di bawah lampu penerangan selama 24 jam dan dihitung jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati (tidak bergerak lagi) [7].

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Jika terjadi kematian pada kontrol uji dapat dikoreksi dengan rumus Abbot, yaitu :

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva mati (uji-kontrol)}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Analisis probit antara konsentrasi uji dan jumlah kematian larva diuji dengan menggunakan Minitab® ver 17.1.2 sehingga menunjukkan nilai LC50 dari masing-masing sampel. Berdasarkan suatu ketentuan, senyawa murni dikatakan aktif apabila nilai LC50 di bawah atau sama dengan 200 ppm dan 500 ppm untuk ekstrak atau fraksi [9, 13].

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Isolasi dan Identifikasi

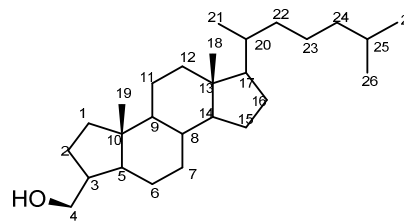
Pengkajian kandungan senyawa metabolit sekunder spons *Clathria sp.* dilakukan dengan mengisolasi senyawa yang terkandung dari spons dan menguji aktivitas isolat tersebut sebagai antibakteri dan toksisitas akut. Secara keseluruhan kegiatan penelitian ini terdiri atas tahapan isolasi, identifikasi dan pengujian aktivitas isolat. Spons *Clathria sp.* diambil dalam keadaan segar pada daerah tubir karang (*Reef Slope*) dengan kemiringan 70° mengikuti kontur sejajar garis pantai pada kedalaman 10 meter dengan menggunakan peralatan selam *Self Contained Underwater Breathing Apparatus* (SCUBA).

Spons yang diperoleh diekstraksi menggunakan metanol kemudian ekstrak difraksinasi menggunakan berbagai metode kromatografi sampai diperoleh padatan berwarna putih. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan berbagai teknik spektroskopi (IR dan NMR). Hasil analisis FTIR memperlihatkan Frekuensi serapan ikatan Csp^3-H ditunjukkan dengan pada bilangan gelombang 2954 cm^{-1} . Keberadaan ikatan Csp^2 ($C=C$) ditunjukkan dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1466 cm^{-1} dan 1643 cm^{-1} . Serapan khas yang menunjukkan adanya vibrasi uluran gugus hidroksil ($-OH$) ditunjukkan pada bilangan gelombang 3456 cm^{-1} dan diperkuat oleh adanya uluran ikatan $C-O$ pada bilangan gelombang 1075 cm^{-1} .

Spektrum ^{13}C NMR memperlihatkan 27 sinyal karbon alifatik dan 1H NMR menunjukkan 15 sinyal yang mengindikasikan 46 proton alifatik. Berdasarkan data-data tersebut, senyawa isolat memiliki rumus molekul $C_{27}H_{46}O$ dengan DBE (*Double Bond Equivalence*) = 4 yang berasal dari sistem siklik. Satu dari 15 sinyal proton menunjukkan geseran kimia di atas 5 ppm yaitu 5,13 ppm. Selanjutnya sinyal karbon menunjukkan karbon yang mengikat gugus hidroksil berada pada geseran kimia δ_C 67,1 ppm ($C-OH$) dan sejumlah karbon metil terisolasi pada daerah 0-25 ppm.

Pembuktian lebih lanjut dilakukan dengan 2D-NMR menggunakan teknik HMBC dan HSQC. Keberadaan karbon yang mengikat hidroksil ditetapkan berdasarkan korelasi H-pada δ_H 3,52 ppm dan δ_C 42,7 ppm. Melalui penelusuran literatur dari Eggensdorfer

(1982), hipotesis struktur senyawa isolat adalah 3 β -(hydroxymethyl)-A-nor-5 α -cholestane [10,11].



Gambar 1. 3 β -(hydroxymethyl)-A-nor-5 α -cholestane

3.2 Uji Toksisitas Akut

Suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai LC_{50} kurang dari 1000 $\mu g/mL$, sedangkan senyawa dinyatakan mempunyai potensi toksik jika mempunyai nilai LC_{50} kurang dari 200 $\mu g/mL$ (ppm) (Meyer, 1982). Nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) merupakan konsentrasi zat yang menyebabkan terjadinya kematian pada 50% hewan percobaan yaitu larva *A. salina* Leach. Perlakuan uji toksisitas ini dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan/replikasi (*triplo*) untuk mendapatkan keakuratan data dan data yang didapat baik, sehingga data yang diperoleh dapat dihitung secara statistik.

Tabel 1. Hasil perhitungan nilai LC_{50} Isolat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Mortalitas	LC_{50} (ppm)
Isolat	0	0,00	713,67
	50	26,67	
	100	26,67	
	250	30,00	
	500	33,33	

Hasil uji menunjukkan senyawa hasil isolasi bersifat tidak toksik dengan nilai LC_{50} 713,67 ppm. Tabel 1 memperlihatkan perbedaan konsentrasi ekstrak maupun senyawa cukup mempengaruhi tingkat kematian hewan uji dengan asumsi bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula efek toksik yang dapat ditimbulkan.

Fase yang digunakan dalam penelitian ini adalah fase *nauplius* karena pada saat itu *A. salina* Leach berada pada fase yang paling aktif membelah secara mitosis yang identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis. Hal ini menyebabkan uji BSLT ini sering digunakan sebagai penelitian pendahuluan dari aktivitas antikanker. Salah satu mekanisme kerja obat antikanker juga bersifat sitotoksik yaitu dengan cara menghambat pertumbuhan sel yang akhirnya menyebabkan kematian pada sel sedangkan mekanisme aktivitas sitotoksik pada *A. salina* Leach belum diketahui secara pasti.

Berdasarkan uraian di atas dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan keamanan bahan obat dari bahan alam laut khususnya dari spons *Clathria* sp dengan cara uji toksisitas akut secara *invivo* untuk menentukan *lethal dose* (LD₅₀) atau pada pemberian suatu bahan sebagai dosis tunggal yang dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji. Pendekatan kefarmasian menekankan bahwa keamanan bahan obat merupakan salah satu jaminan mutu yang diminta dalam pengembangan bahan baku obat tradisional atau konvensional di samping manfaat (efek farmakologi) dan kualitas bentuk sediaan yang akan digunakan

4. Kesimpulan

Senyawa yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari ekstrak metanol spons laut *Clathria* sp. yaitu 3β-(hydroxymethyl)-A-nor-5α-cholestane yang bersifat tidak toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 750,77 ppm.

Daftar Pustaka

1. Jaswir Yunovilsa M. 2014. The Alkaloids from Indonesian Marine Sponges. *Oceanography: Open Access*, 02(02).
2. Sadarun B., Lestari., A., Yusuf A.A, Leri N., Eric Z. 2008. *Petunjuk Pelaksanaan Tranplantasi Karang*. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
3. Muniarsih T, dan Rachmaniar R. 1999. Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98*. Jakarta 14–15 Oktober 1998: 151-158.
4. Astuti P, Apristiani, DWI. 2005. Isolasi Komponen Aktif Antibakteri Ekstrak Kloroform Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) Dengan Bioautografi. *Biofarmasi*, 3(2).
5. Bhakuni, D. S., Rawat, D. S. 2005. *Bioactive Marine Natural Products. J. of Nat. Pro.* Vol. 48.
6. Ichiba, T., Corgiat, J. M., Scheuer, P. J., & Kelly Borges, M., 1994. 8-Hydroxymanzamine A, a beta -carboline alkaloid from a sponge, *Pachypellina* sp. *Journal of Natural Products*, 57(3), 168–170
7. Anderson, J.E., Goetz, C.M, and McLaughlin, J.L.1990. A blind Comparison of Simple Banch-top Bioassay and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Anti tumour Prescreen. *Phytochemical Analysis*. (6): 107-111
8. Dian H., Yohanes A.,Nicole. J.D.V. 2012. Isolasi Senyawa Sitotoksik Dari Spons Laut *Petrosia* sp. *JPB Perikanan*. Vol. 7 (1): 69–76
9. Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E Putnan, L.B. Jacobsen, D.E. Nicholas, J.L. McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Departement of Medical Chemistry and Pharmacognocoy*, School of Pharmacy and pharmacal science, and Cell Culture Libratory, Perdue Cancer Center. West lavayette. USA
10. Eggersdorfer W. C., Kokke M. C., Christopher W. Crandell, Jill E. Hochlowski and Carl Djerassi. 1982. **Sterols in Marine** Invertebrates. 32.' Isolation of 3P-(Hydroxymethyl)-A -nor-5a-cholest-15-ene, the First Naturally Occurring Sterol with a 15-16 Double Bond. *J. Org. Chem.* 5304-5309. California
11. Faulkner, D. J. (2002). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 19(1), Hal 1–48.
12. McLaughlin, J.L. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination, *Methods in Plants Biochemistry*, 6(1): 1-30c