



SKRINING TOKSISITAS BEBERAPA SPESIES SPONS ANAT PULAU  
BARRANG LOMPO DENGAN METODE BRINE SHRIMP

LETHALITY TEST

OLEH

ENDANG DWI ASTUTI  
H 511 99 010



PERPUSTAKAAN PUSAT UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. Terima	12-07-2005
Asal Dari	Bank - MIPA
Banyaknya	[ (satu) eksemplar ]
Harga	H
No. Inventaris	312/12-7-05
No. V. C.	

JURUSAN FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2004

# SKRIPSI

ENDANG DWI ASTUTI

H 511 99 010



JURUSAN FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2004

**SKRINING TOKSISITAS BEBERAPA SPESIES SPONS ASAL PULAU  
BARRANG LOMPO DENGAN METODE BRINE SHRIMP  
LETHALITY TEST**

**OLEH**

**ENDANG DWI ASTUTI  
H 511 99 010**

*Skripsi untuk melengkapi tugas  
dan memenuhi syarat untuk  
memperoleh gelar sarjana*


**JURUSAN FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2004**

**SKRINING TOKSISITAS BEBERAPA SPESIES SPONS ASAL PULAU  
BARRANG LOMPO DENGAN METODE BRINE SHRIMP  
LETHALITY TEST**

**Disetujui oleh :**


**Pembimbing Utama,**

  
**Drs. Fachruddin Tobo, Apt**  
**NIP. 130 369 546**

**Pembimbing Pertama,**

  
**Drs. Hasvim Bariun, M.Si**  
**NIP : 130 879 519**

**Pembimbing Kedua,**

  
**Dra. Rahmawaty Syukur, M.Si**  
**NIP : 132 012 988**

**Pada tanggal : 28 Juni 2004**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabbil Alamin penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas berkah dan ridha-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan studi, penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Pada kesempatan ini penulis menghaturkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Drs.H. Fachruddin Tobo selaku pembimbing utama, Bapak Drs.H. Hasyim Bariun, M.Si selaku pembimbing pertama dan Ibu Dra. Rahmawati Syukur selaku pembimbing kedua serta Bapak Drs. Gemini Alam, MSi yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya membimbing dan mengarahkan penulis sampai terselesaikannya skripsi ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam Universitas Hasanuddin
2. Bapak Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
3. Ibu Dra. Sukati Kadis, MS selaku penasehat akademik
4. Bapak/Ibu Kepala Laboratorium di Lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam khususnya Jurusan Farmasi Universitas Hasanuddin
5. Bapak/Ibu Dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam khususnya Jurusan Farmasi Universitas Hasanuddin
6. Seluruh staf dan karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Dengan segala penghormatan kepada kedua orang tua tercinta, Ayahanda Kadimin dan Ibunda Matiti Mamonto atas kasih sayang dan doa restu yang diberikan hingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan ini. Kepada kakak Abdul Rahim, Ssi, Apt, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas segala dorongan, waktu, tenaga, pikiran serta doa yang diberikan selama ini.

Kepada saudaraku Djoko Setioko, ST dan kakak iparku Endang, serta Nenek tersayang dan Ka' Kiki atas segala bantuan dan doa yang diberikan selama ini.

Kepada keluarga besar Angkatan 99 farmasi, Zulkifli, Abang Haidir, Mas Kamril PNS, Baso potter, Ronny dan Casey cakep, Irmah manis, Arni, Renny, Mba' Tanty dan Ade, Yuyu', Naya, Illy, Aput, Wati, Atun dan keluarga 99 lainnya yang tidak sempat disebutkan namanya pada kesempatan ini, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas segala bantuannya.

Kepada keluarga Multazam, Drs. H. Sirajuddin dan Hj. Nurrung, Mama Ayu, K' Mala, K' Lim, K' Ani, Nur, Nia, Ani, Santi Tisa, Ati, Isa, Bia, Ancang, Puput, Arma, Femmy, Oma dan Rahma terima kasih atas segala bantuannya.

Pada kesempatan ini, tak lupa pula penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada bapak Syuaib yang selalu setia mendampingi hingga penelitian ini selesai dilaksanakan.

Penulis menyadari bahwa kesempurnaan adalah milik Allah namun penulis masih tetap berharap semoga skripsi yang jauh dari sempurna ini masih dapat memberikan manfaat bagi kita semua. *Amin*.

Makassar, Februari 2004

**Penulis**

## ABSTRAK

Telah dilakukan skrining toksisitas ekstrak metanol dan ekstrak kloroform spons BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Penelitian ini meliputi pengamatan efek toksik dengan parameter kematian larva udang setelah 24 jam perlakuan sampel uji dan perbandingan negatif (metanol 1000  $\mu$ l dan kloroform 1000  $\mu$ l) dilanjutkan dengan perhitungan  $LC_{50}$  (24 jam).

Spons diekstraksi secara maserasi dengan metanol dan dipisahkan dengan corong pisah menggunakan pelarut kloroform dan air. Ekstrak metanol dan ekstrak kloroform spons BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 dibuat konsentrasi 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml dan 1000  $\mu$ g/ml serta perbandingan negatif (metanol 1000  $\mu$ l dan kloroform 1000  $\mu$ l) kemudian dilarutkan dengan air laut. Setiap konsentrasi digunakan 10 ekor larva udang dan dilakukan replikasi sebanyak 5 kali.

Hasil penelitian berupa data jumlah larva yang mati terhadap sampel uji dan selanjutnya diolah menggunakan metode grafik probit log-konsentrasi, diperoleh  $LC_{50}$  (24 jam) Ekstrak metanol spons BRLP-01  $75,31 \pm 18,06$   $\mu$ g/ml, BRLP-02  $17,72 \pm 4,38$   $\mu$ g/ml, BRLP-03  $32,01 \pm 13,028,36$   $\mu$ g/ml, BRLP-04  $51,05 \pm 10,79$   $\mu$ g/ml, BRLP-05  $9,69 \pm 2,08$   $\mu$ g/ml dan ekstrak kloroform spons BRLP-01  $8,67 \pm 1,64$   $\mu$ g/ml, BRLP-02  $10,69 \pm 2,29$   $\mu$ g/ml, BRLP-03  $5,01 \pm 0,88$   $\mu$ g/ml, BRLP-04  $8,91 \pm 1,63$   $\mu$ g/ml, BRLP-05  $9,90 \pm 3,42$   $\mu$ g/ml. Sedangkan perbandingan negatif tidak diperoleh data kematian, jadi sampel uji bersifat toksik.

Hasil kromatogram KLT ekstrak kloroform spons BRLP-03 (paling toksik) diperoleh 6 noda dengan penampakan noda sinar UV 254/366 nm, harga Rf masing-masing 0,69, 0,64, 0,38, 0,21, 0,08 dan 3 noda dengan penampakan noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %, harga Rf masing-masing 0,69, 0,66 dan 0,05. Sedangkan untuk ekstrak metanol spons BRLP-03 diperoleh 1 noda dengan penampakan noda sinar UV 254/366 nm, harga Rf masing-masing 0,66, dan 1 noda dengan penampakan noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, harga Rf masing-masing 0,05 dengan eluen heksan : etil asetat (1:5).

## ABSTRACT

The  $LC_{50}$  of methanol and chloroform extracts from the sponge BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 and BRLP-05 at the Brine Shrimp *Artemia salina* Leach. have been conducted. This research included the observation of mortality on *Artemia. salina* nauplii after treated with samples and negative control (methanol 1000  $\mu$ l and chloroform 1000  $\mu$ l) and followed by determination  $LC_{50}$  (24h) for each sample.

Sponge was extracted by maceration with methanol and followed by separation with separator funnel, successively with chloroform extract were dissolved in sea water concentration of 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 1000  $\mu$ g/ml, and negative control (methanol 1000  $\mu$ l and chloroform 1000  $\mu$ l). Each concentration used 10 *Artemia. salina* nauplii that was treated and it was carried out by 5 replications.

The result was according using probit graph method, the  $LC_{50}$  (24h) of the methanol extract BRLP-01  $75,31 \pm 18,06$   $\mu$ g/ml, BRLP-02  $17,72 \pm 4,38$   $\mu$ g/ml, BRLP-03  $32,01 \pm 13,028,36$   $\mu$ g/ml, BRLP-04  $51,05 \pm 10,79$   $\mu$ g/ml, BRLP-05  $9,69 \pm 2,08$   $\mu$ g/ml and chloroform extract BRLP-01  $18,67 \pm 1,64$   $\mu$ g/ml, BRLP-02  $10,69 \pm 2,29$   $\mu$ g/ml, BRLP-03  $5,01 \pm 0,88$   $\mu$ g/ml, BRLP-04  $8,91 \pm 1,63$   $\mu$ g/ml, BRLP-05  $9,90 \pm 3,42$   $\mu$ g/ml. On negative control no mortality was found.

Chromatogram of thin layer chromatography of chloroform extract BRLP-03 (most toxic extract) was found 5 spots with UV 254/366 nm, Rf is 0,69, 0,64, 0,38, 0,21, 0,05 and 3 spot with  $H_2SO_4$  10 %, Rf 0,69, 0,64 and 0,05. Methanol extract BRLP-03 was found 1 spots with UV 254/366 nm, Rf is 0,09 and 1 spots with  $H_2 SO_4$ , Rf is 0,05 by using heksan : ethyl acetate (1:5) as solvent system.



## DAFTAR ISI

	Halaman
Ucapan terimakasih .....	v
Abstrak .....	vii
Abstract.....	viii
Daftar isi.....	ix
Daftar tabel.....	xii
Daftar lampiran .....	xii
Daftar gambar .....	xv
BAB I Pendahuluan .....	1
BAB II Pola Penelitian .....	4
BAB III Tinjauan Pustaka .....	6
III.1 Spons .....	6
III.2 Metode Ekstraksi .....	8
III.2.1 Tujuan Ekstraksi .....	8
III.2.2 Jenis-Jenis Ekstraksi .....	8
III.2.3 Ekstraksi Secara Maserasi.....	9
III.2.4 Ekstraksi Cair-Cair.....	9
III.3 Uji toksisitas .....	10
III.4 Brine Shrimp Lethality Test.....	12
III.5 Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	12
III.5.1 Klasifikasi.....	12
III.5.2 Morfologi.....	13

III.6 Kromatografi Lapis Tipis.....	15
BAB IV Pelaksanaan Penelitian .....	17
IV.1 Penyiapan Alat dan Bahan .....	17
IV.1.1 Alat-alat yang digunakan .....	17
IV.1.2 Bahan-bahan yang digunakan .....	18
IV.2 Penyiapan bahan penelitian .....	18
IV.2.1 Pengambilan Sampel .....	18
IV.2.2 Pengolahan Spons .....	18
IV.3 Ekstraksi Sampel .....	18
IV.4 Penyiapan larva udang .....	19
IV.5 Pembuatan konsentrasi sampel spons .....	20
IV.6 Uji Larva Udang .....	20
IV.7 Pengumpulan data .....	21
IV.8 Pembahasan hasil penelitian .....	21
IV.9 Kesimpulan .....	21
BAB V Hasil dan Pembahasan .....	22

V.1 Hasil Penelitian .....	22
V.2 Pembahasan .....	24
BAB VI Kesimpulan dan Saran .....	28
VI.1 Kesimpulan .....	28
VI.2 Saran .....	28
DAFTAR PUSTAKA .....	29
TABEL	
LAMPIRAN	
GAMBAR	
SKEMA KERJA	

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 : Data Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach Setelah 24 jam Perlakuan Dengan Ekstrak Metanol Spons .....	32
Tabel 3 : Data Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach. Setelah 24 jam Perlakuan Dengan Ekstrak Kloroform Spons .....	33
Tabel 3 : Hasil Perhitungan $LC_{50(24 \text{ jam})}$ Terhadap Beberapa Sampel Uji .....	34
Tabel 4 : Harga Probit Sesuai Prosentase .....	35
Tabel 5 : Nilai Bobot Per Probit .....	36

## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1-a : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	36
Lampiran 2-a : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 .....	37
Lampiran 1-b : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	38
Lampiran 2-b : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 .....	39
Lampiran 1-c : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	40
Lampiran 2-c : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 .....	41
Lampiran 1-d : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	42
Lampiran 2-d : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 .....	43
Lampiran 1-e : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	44
Lampiran 2-e : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 .....	45
Lampiran 1-f : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Kloroform Spons BRLP-01 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	46
Lampiran 2-f : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Kloroform Spons BRLP-01 .....	47
Lampiran 1-g : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Kloroform Spons BRLP-02 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	48
Lampiran 2-g : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya	

Dari Ekstrak Kloroform Spons BRLP-02 .....	49
Lampiran 1-h : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Kloroform Spons BRLP-03 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	50
Lampiran 2-h : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Kloroform Spons BRLP-03 .....	51
Lampiran 1-i : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Kloroform Spons BRLP-04  Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	52
Lampiran 2-i : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Kloroform Spons BRLP-04 .....	53
Lampiran 1-j : Perhitungan $LC_{50}$ Ekstrak Kloroform Spons BRLP-05 Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi .....	54
Lampiran 2-j : Perhitungan Ketelitian $LC_{50}$ Probit Sesuai Beratnya Dari Ekstrak Kloroform Spons BRLP-05 .....	55

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 : Daur hidup Hewan Uji <i>Artemia salina</i> .....	56
Gambar 2a : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Metanol Spons BRLP-01 .....	56
Gambar 2b : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Metanol Spons BRLP-02 .....	57
Gambar 2c : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 .....	58
Gambar 2d : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Metanol Spons BRLP-04 .....	59
Gambar 2e : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Metanol Spons BRLP-05 .....	60
Gambar 2f : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Kloroform Spons BRLP-01 .....	61
Gambar 2g : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Kloroform Spons BRLP-02 .....	62
Gambar 2h : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Kloroform Spons BRLP-03 .....	63
Gambar 2i : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Kloroform Spons BRLP-04 .....	64
Gambar 2j : Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi Dari Prosentase Kematian (Probit) Ekstrak Kloroform Spons BRLP-05 .....	65
Gambar 3a : Hasil Kromatogram Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Kloroform Spons BRLP-03 .....	66
Gambar 3b : Hasil Kromatogram Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons BRLP-03 .....	67
Gambar 4a : Sampel Spons BRLP-01 .....	68
Gambar 4b : Sampel Spons BRLP-02 .....	69

Gambar 4c : Sampel Spons BRLP-03 .....	70
Gambar 4d : Sampel Spons BRLP-04 .....	71
Gambar 4e : Sampel Spons BRLP-05 .....	72



# BAB I

## PENDAHULUAN



Perairan nusantara yang sangat luas dan beriklim tropis, banyak mengandung sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber penghidupan masyarakat, baik untuk memenuhi kebutuhan pangan, maupun untuk kebutuhan obat-obatan (1). Hal ini didukung oleh banyaknya spesies organisme yang berasosiasi pada terumbu karang, khususnya golongan invertebrata tingkat rendah seperti spons, karang lunak dan tunicates. Studi tentang nilai ekonomi dari segi kimiawi dan farmasi dalam 3 dekade ini pada organisme laut, memperlihatkan adanya kandungan substansi bioaktif yang mampu dikembangkan untuk pembuatan obat-obat baru (2).

Sejak 30 tahun yang lalu, sejumlah senyawa bioaktif yang berasal dari biota laut telah diisolasi dan diidentifikasi, dan tidak kurang dari 25 % kandungan senyawa bioaktif tersebut diisolasi dari spons, dibandingkan filum-filum lain dari invertebrata (3). Sejauh ini telah dihasilkan struktur senyawa bioaktif yang jelas yang berasal dari 675 spesies spons melalui berbagai penelitian (4).

Spons merupakan biota laut yang termasuk kedalam golongan invertebrata yang hidup pada ekosistem terumbu karang. Spons adalah nama umum sekelompok biota dari filum porifera dan merupakan hewan multiseluler yang paling sederhana, tidak memiliki organ maupun jaringan yang sebenarnya. Semua yang termasuk filum ini menunjukkan pergerakan yang tidak dapat teramati.

Data dari National Cancer Institute (Washington), yang telah melalui proses skrining menyatakan bahwa banyak tipe dari produk alam laut yang menunjukkan aktifitas biologik, dimana lebih dari 20 kategori senyawa bioaktif yang berbeda-beda dari spons telah ditemukan, seperti antivirus, antibiotik, sitotoksin, antelmentik dan antikanker (5). Berdasarkan uraian tersebut diatas, maka diperlukan bukti ilmiah ketoksikan spons yang diperoleh dari perairan pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan yg diduga memiliki potensi yang sangat besar sebagai sumber senyawa bioaktif, dan dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat atau menjadi senyawa penuntun dalam sintesis obat baru.

Salah satu metode penapisan senyawa bioaktif dari bahan alam adalah dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST). Metode ini menunjukkan aktifitas farmakologis yang luas dan tidak spesifik dan dimanifestasikan sebagai toksisitas senyawa terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Senyawa yang telah berhasil dianalisis dari metode ini antara lain pestisida, mycotoxin, anestetik, toksin dinoflagellata, senyawa antikanker, dan pencemaran air laut. Metode ini mudah, murah dan cepat. (6,7).

Untuk memudahkan penemuan senyawa bioaktif dari bahan alam, perlu dilakukan pemisahan komponen kimia berdasarkan tingkat kepolaran senyawa tersebut dengan menggunakan pelarut organik yang sesuai. Selanjutnya kelompok komponen kimia (fraksi) tersebut diuji aktivitasnya, sehingga dengan mengetahui aktivitas dari fraksi tersebut dapat dilakukan isolasi untuk memperoleh senyawa tunggal yang aktif (8).

Penelitian ini dilakukan dengan menentukan toksisitas ekstrak kloroform dan metanol dari 5 jenis spons yang berbeda. Sehingga diharapkan penelitian ini dapat menjadi uji pendahuluan untuk menentukan jenis spons yang berasal dari Pulau Barrang Lompo yang memiliki toksisitas yang paling besar dengan menggunakan metode brine shrimp lethality test.

## **BAB II**

### **POLA PENELITIAN**

#### **II.1 Penyiapan Alat dan Bahan**

Alat dan bahan disiapkan sesuai kebutuhan penelitian

#### **II.2 Penyiapan Bahan Penelitian**

##### **II.2.1 Pengambilan Sampel**

Sampel spons diambil dari perairan pantai Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan.

##### **II.2.2 Pengolahan Spons**

Spons dibersihkan dan dicuci dengan air laut kemudian dimasukkan dalam toples dan direndam metanol .

#### **II.3 Ekstraksi Spons**

Spons dipotong kecil-kecil dengan ukuran 0,25-0,06 cm sesuai ayakan 4/18, kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan metanol. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian diuapkan dan dipisahkan lebih lanjut dengan kloroform dan air dengan menggunakan corong pisah. Lapisan air ditambahkan metanol kemudian disentrifus. Endapan dibuang sedangkan supernatannya diuapkan sampai kering.

#### **II.4 Penyiapan Larva Udang**

Telur udang *Artemia salina* Leach, ditetaskan 48 jam sebelum dilakukan uji. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur tersebut dalam air

laut secukupnya, pada kondisi pH 7-8 dibawah cahaya lampu pijar 60 watt dan pada suhu kamar 25 °C yang dilengkapi dengan aerator.

#### **II.5 Pembuatan Konsentrasi Sampel Spons**

Ekstrak spons dilarutkan dalam pelarut kloroform dan metanol. Kemudian dibuat kadar dengan konsentrasi 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, dan 1000 µg/ml, diuapkan pelarutnya hingga kering kemudian ditambahkan air laut sebanyak 2 ml. Selanjutnya diuji pada larva udang *Artemia salina* Leach. Sebagai kontrol digunakan air laut dan pelarut yang digunakan.

#### **II.6 Pelaksanaan Uji**

Dimasukkan 10 ekor larva udang ke dalam masing-masing vial yang berisi ekstrak spons dan kontrol. Selanjutnya disimpan ditempat yang cukup mendapat cahaya lampu selama 24 jam. Diamati dan dihitung menggunakan loop (kaca pembesar) jumlah larva yang mati ( $LC_{50}$ ) untuk tiap ekstrak.

#### **II.7 Pengumpulan data**

Dihitung tingkat toksisitas dengan menghitung jumlah larva yang mati ( $LC_{50}$ ).

#### **II.8 Pembahasan Hasil Penelitian**

#### **II.9 Pengambilan Kesimpulan**

### BAB III

#### TINJAUAN PUSTAKA

##### III.1 Spons (10, 11,12)

Spons merupakan biota laut yang termasuk kedalam golongan invertebrata yang hidup pada ekosistem terumbu karang. Spons adalah nama umum sekelompok biota dari filum porifera dan merupakan hewan multiseluler yang paling sederhana, tidak memiliki organ maupun jaringan yang sebenarnya. Semua yang termasuk filum ini menunjukkan pergerakan yang tidak dapat teramati.

Ciri-ciri dari spons ini mempunyai bentuk badan membulat atau merumpun pada aliran arus kuat dan lemah, umumnya membentuk percabangan. Spons yang umumnya hidup pada laut dalam umumnya berwarna putih, kuning dan hijau, ada sejumlah spesies yang berwarna hijau terang, kuning, orange, merah dan ungu yang merupakan keistimewaan dari air laut dangkal. Struktur spons umumnya terdiri atas flagella dan sel lengkung.

Semua spons hidup di air dan melekat pada batu, kerangka atau benda padat, beberapa diantaranya hidup diatas pasir halus dan dasar Lumpur. Sebagian spesiesnya hidup dilaut mulai dari garis pasang sampai kedalaman 7,3 km. Spons hidup dengan memanfaatkan makanan disekelilingnya dengan cara mengisap dan menyaring, sehingga dikategorikan sebagai "Filter feeder". Spons mempunyai semacam perisai yang berupa susunan spikula yang berbentuk seperti duri atau jarum dengan ujung runcing. Spikula ini terbentuk dari

senyawa silika dan kalsium karbonat. Spons memproduksi senyawa bioaktif hasil metabolisme sekunder yang bermanfaat dalam proses pencernaan secara enzimatik, terutama untuk mencerna bakteri sebagai sumber nutrisi baginya. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons tidak hanya bermanfaat untuk proses pencernaan makanannya, tetapi kandungan kimianya juga mampu menangkal dan menghambat pertumbuhan pathogen pengganggu.

Zat bioaktif spons diduga mengandung peptida, terpenoid, glikosida, saponin, steroid, amina, asam fenolat, dan squalen serta turunan-turunannya yang merupakan hasil metabolit sekunder.

Spons meliputi 10000 spesies baik yang sudah menjadi fosil maupun yang masih hidup. Dari sekian spesies itu terbagi atas 1400 genera. Atas dasar bahan pembentuk kerangka tubuhnya serta tipe spikulanya, spons digolongkan menjadi 3 klas dan 12 ordo. Adapun ke 3 klas tersebut adalah :

1. Klas *Calcarea* atau *Calcispongiae*

Merupakan spons yang hidup didaerah pantai yang dangkal, bentuk tubuhnya sederhana, kerangka tubuhnya terbuat dari bahan  $\text{CaCO}_3$ . Terdiri dari 2 ordo, yaitu ordo *Asconosa* dan ordo *Syconosa*.

2. Klas *Hexactinellida* atau *Hyalospongiae*

Merupakan spons yang hidup didaerah yang dalam, kerangka tubuhnya terbuat dari bahan silikat dan spikulanya berduri enam (hexaxon). Terdiri dari 2 ordo, yaitu ordo *Hexastrophora* dan ordo *Amphidiscophora*.

3. Klas *Demospongiae*

Spons ini umumnya hidup dilaut, tetapi ada yang sementara jenis hidup di air tawar. Kerangka tubuhnya ada yang terbuat dari bahan silikat, ada yang dari bahan sponging, ada yang campuran. Terdiri atas 8 ordo yaitu ordo *Carnosa*, ordo *Choristida*, ordo *Epipolasida*, ordo *Hadromerida*, ordo *Halicondrina*, ordo *Poeciloclerina*, ordo *Haploscerina*, ordo *Keratosa*.

### **III.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam (14, 15)**

#### **III.2.1 Tujuan Ekstraksi**

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan, dan biota laut dengan menggunakan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini didasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara di dalam dan di luar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel.

#### **III.2.2 Jenis-Jenis Ekstraksi**

Proses ekstraksi yang biasanya digunakan yaitu ekstraksi secara panas dan secara dingin. Ekstraksi secara panas yaitu dengan metode refluks dan destilasi uap air, sedangkan ekstraksi secara dingin yaitu dengan maserasi, perkolasi dan soxhletasi.



### III.2.3 Ekstraksi Secara Maserasi

Metode maserasi merupakan metode yang paling sederhana, yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya. Digunakan terutama untuk menyari simplisia yang mempunyai tekstur yang lunak dan tidak tahan pemanasan atau dengan pemanasan dapat menyebabkan kerusakan pada zat aktifnya. Ekstraksi secara maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia dengan derajat halus tertentu sebanyak 10 bagian dalam bejana maserasi yang ditambahkan dengan 75 bagian cairan penyari. Ditunggal dan dibiarkan selama 5 hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Hasil maserasi yang diperoleh kemudian diserkai dan ampasnya ditambahkan lagi cairan penyari. Penyarian dianggap selesai apabila hasil identifikasi dengan kromatografi lapis tipis tidak menampilkan noda lagi.

### III.2.4 Ekstraksi Cair-Cair (17)

Ekstraksi cair-cair merupakan proses pemisahan zat terlarut dalam 2 macam pelarut yang tidak saling bercampur.

$$KD = C_1/C_2$$

KD adalah koefisien distribusi atau partisi yang merupakan tetapan keseimbangan yang merupakan kelarutan relatif dari suatu senyawa yang terlarut dalam dua pelarut yang tidak bercampur.  $C_1$  dan  $C_2$  adalah kadar senyawa yang terlarut dalam pelarut 1 dan pelarut 2.

Kerap kali sebagai pelarut 1 adalah air sedangkan pelarut kedua adalah pelarut organik yang tidak bercampur dengan air. Dengan demikian ion anorganik atau senyawa organik polar sebagian besar akan terdapat dalam fase air sedangkan senyawa organik nonpolar sebagian besar akan terdapat dalam fase organik. Hal ini dikatakan "like dissolves like" yang berarti bahwa senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut polar dan sebaliknya.

Jika suatu cairan ditambahkan ke dalam ekstrak cairan lain yang tidak dapat bercampur dengan yang pertama, akan terbentuk dua lapisan. Satu komponen dari campuran akan memiliki kelarutan ke dalam dua lapisan tersebut (biasanya disebut fase) dan setelah beberapa waktu dicapai kesetimbangan konsentrasi dalam kedua lapisan. Waktu diperlukan untuk tercapainya keseimbangan biasanya dipersingkat oleh pencampuran kedua fase tersebut dalam corong pisah.

Ekstraksi cair-cair secara berturut-turut dapat dilakukan dengan cairan yang tidak bercampur dengan berbagai derajat kepolaran.

### III.3 Uji Toksisitas (6,18, 19, 20, 21)

Toksisitas adalah efek berbahaya dari suatu bahan kimia atau suatu bahan obat pada organ target. Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan dan keberbahayaan zat yang akan diuji. Adapun sumber zat toksik dapat berasal dari bahan alam maupun sintetik.

Toksisitas diukur dengan mengamati kematian hewan percobaan. Kematian dari hewan percobaan dianggap sebagai respon dari pengaruh

senyawa yang diuji, sehingga hubungan dari respon dengan menggunakan kematian sebagai jawaban toksis adalah merupakan titik awal untuk mempelajari toksisitas.

Angka kematian dari hewan percobaan dihitung sebagai Median Lethal Dose ( $LD_{50}$ ) atau Median Lethal Concentration ( $LC_{50}$ ). Penggunaan  $LC_{50}$  dimaksudkan untuk pengujian ketoksikan dengan perlakuan terhadap hewan coba secara inhalasi atau dengan menggunakan media air.

Cara penentuan  $LC_{50}$  ada beberapa cara yaitu a) dengan metode Reed dan Muench; b) Metode Grafik; c) Perhitungan secara Matematik; d) Metode Grafik Probit. Disamping itu nilai  $LC_{50}$  juga dapat digunakan untuk menentukan tingkat efek toksik suatu senyawa sehingga dapat juga untuk memprediksi potensinya.

Salah satu uji efek toksik yang berkaitan dengan potensi bioaktif suatu bahan adalah dengan menggunakan metode "Brine Shrimp Lethality Test", yaitu menggunakan larva udang sebagai hewan uji dengan keuntungan hasil yang diperoleh lebih cepat (24 jam), tidak mahal, mudah pengerjaannya dari pengujian lainnya. Efek toksik dapat diketahui atau diukur dari kematian larva karena pengaruh bahan yang diuji. Hewan yang digunakan adalah *A. salina* yang merupakan udang-udangan primitif, sederhana dan efektif dalam ilmu biologi dan toksikologi.

Pengujian efek toksik dengan larva udang *A. salina* dihitung dengan metode  $LC_{50}$  yang mana kematian setelah 6 jam pemaparan dimasukkan dalam kategori  $LC_{50}$  akut dan pemaparan setelah 24 jam digolongkan  $LC_{50}$  kronis, dan

dalam pengerjaannya biasanya digunakan  $LC_{50}$  setelah 24 jam mengingat kelarutan ekstrak yang sukar larut membutuhkan waktu yang lebih panjang.

#### **III.4 Brine Shrimp Lethality Test (7, 8, 21)**

Suatu metode ringkas bioaktivitas untuk penelitian bahan alam salah satunya adalah menggunakan udang renik air asin yaitu *Artemia salina* Leach. Yang dikenal dengan metode Brine Shrimp Lethality Test. Telur udang umumnya digunakan sebagai makanan untuk ikan-ikan tropis, mudah diperoleh dengan harga yang relatif murah. Berbagai penerapan untuk untuk sistem bioassay dengan menggunakan udang tersebut antara lain untuk mengetahui residu pestisida, anestetik lokal, senyawa turunan morfin, mikotoksin, karsinogenitas suatu senyawa, dan polutan untuk air laut. Metode ini juga sebagai alternatif metode yang murah untuk uji sitotoksisk.

Senyawa aktif akan menghasilkan tingkat mortalitas yang tinggi terhadap udang. Uji dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. memiliki spektrum farmakologi yang luas dan dengan tingkat kepercayaan 95 %. Sehingga dapat digunakan secara luas untuk penapisan senyawa bioaktif. Tingkat mortalitas dihitung dengan menggunakan analisis probit yang dirumuskan oleh Finney.

#### **III.5 *Artemia salina* Leach (9)**

##### **III.5.1 Klasifikasi**

Filum : Arthropoda

Kelas : Crustaceae

Subkelas : Branchiopoda

- Bangsa : Anostraca  
Suku : Antimiidae  
Marga : Artemia  
Jenis : *Artemia salina* Leach.

### III.5.2 Morfologi

Udang *Artemia salina* Leach. adalah suatu binatang yang mempunyai kulit keras, hidup dalam air, mulai dari air payau sampai air yang berkadar garam tinggi, range toleransi kadar yang luas (dari 10 sampai 220 g/l) sehingga menyebabkan hewan ini mudah dipelihara.

Tingkat hidup *Artemia salina* Leach mengalami beberapa tingkatan, tetapi secara jelas dapat dilihat dalam 3 bentuk yang sangat berlainan yaitu bentuk telur, nauplius (larva) dan artemia dewasa.

Secara berkala, pada saat air laut atau danau menguap, partikel-partikel yang berwarna coklat, berdiameter sekitar 0,2-0,3 mm akan naik ke permukaan, oleh angin akan dibawa hanyut ke darat. Partikel tersebut merupakan telur-telur yang inaktif atau tidur dari *Artemia salina*. Sepanjang telur-telur tersebut terdehidrasi dan dalam keadaan diafase, akan memiliki ketahanan dan kestabilan dalam penyimpanan yang lama.

Jika telur-telur tersebut dimasukkan ke dalam larutan bergaram (air laut), telur akan mengabsorpsi air laut dan mengalami proses embriogenasi hingga sempurna terjadi selama 16-36 jam setelah pencelupan. Embrio keluar dari cangkang yang masih ditutupi oleh membran penetasan. Pembentukan antena dan rahang akan melepaskan

diri dari membran penetasan menjadi nauplius (larva) yang aktif yang berenang. Larva ini dianggap berada pada tingkat instar I (belum sempurna) yang mempunyai ukuran sekitar 300 mikron, ditandai dengan warna jingga, hal ini disebabkan karena adanya kandungan kuning telur yang bertahan selama 3 hari yang menyiratkan bahwa larva ini dapat mempertahankan sumber kuning telurnya selama 72 jam

Larva *Artemia salina* dalam pertumbuhannya memakan sel ragi atau alga bersel satu dengan mengalami 15 kali perubahan bentuk yang digolongkan dalam tingkatan. Tingkatan I, demikian seterusnya hingga instar XV yang merupakan *Artemia salina* dewasa secara seksualitas dan umumnya memerlukan waktu sekitar 2-3 minggu dengan ukuran mencapai 8,5 samapi 9,5 mm. Tubuh terbagi atas bagian kepala, dada, dan perut. Pada bagian kepala terdapat 2 tangkai mata, 2 antena dan 2 antenula. Dada terbagi atas 11 segmen yang masing-masing mempunyai sepasang kaki renang, sedangkan perut terbagi atas 8 segmen. *Artemia salina* dewasa bentuknya telah sempurna.

Reproduksi *Artemia salina* dapat dengan bertelur atau dengan melahirkan anak. Pergantian reproduksi ini dimungkinkan oleh jumlah klorofil dalam makanannya dan faktor oksigen dalam lingkungan. Konsentrasi oksigen yang rendah dan klorofil yang tinggi dalam makanannya menyebabkan reproduksi dengan telur, dan sebaliknya akan menyebabkan reproduksi dengan melahirkan anak.

Kandungan kimia yang terdapat dalam tubuh *Artemia salina* adalah protein dan asam lemak yang tinggi.

### III.6 Kromatografi Lapis Tipis (16)

Kromatografi lapis tipis adalah teknik kromatografi yang sederhana dan banyak digunakan untuk memisahkan komponen kimia secara cepat berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi. Kromatografi lapis tipis terbuat dari gelas atau logam yang tahan karat atau lempengan besi yang cocok sebagai penyangga. Zat penjerap biasa dilapiskan pada penyangga secara merata dengan ketebalan antara 0,1-0,3 mm. Pemisahan komponen kimia yang dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis tergantung pada jenis pelarut, zat penjerap dengan sifat daya serap masing-masing komponen. Komponen yang terlarut akan terbawa oleh fase gerak dengan kecepatan pemindahan yang berbeda-beda. Perbandingan kecepatan Bergeraknya komponen terlarut dalam fase gerak (pelarut) adalah dasar untuk mengidentifikasi komponen kimia yang dipisahkan. Perbandingan kecepatan ini dinyatakan dalam Rf (rate of flow) dengan persamaan :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pelarut yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Beberapa faktor yang mempengaruhi harga Rf, antara lain :

1. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan
2. Ukuran partikel penjerap
3. Derajat keaktifan lapisan penjerap
4. Kemurnian dan konsentrasi pelarut



5. Tebal dan kerataan lapisan penjerap
6. Kejenuhan ruang elusi
7. Terdapatnya pengotoran pada ekstrak
8. Jumlah cuplikan yang digunakan
9. Perbandingan eluen



**BAB IV**  
**PELAKSANAAN PENELITIAN**

**IV.1 Penyiapan Alat dan Bahan**

IV.1.1 Alat-alat yang digunakan

1. Aerator
2. Corong (pyrex)
3. Corong pisah 500 ml (pyrex)
4. Erlenmeyer 1000 ml (pyrex)
5. Gelas ukur 10, 50, dan 100 ml (pyrex)
6. Kompor listrik
7. Labu takar 50 ml (pyrex)
8. Mikropipet 10, 50, 500  $\mu$ l (Socorex)
9. Oven listrik (Memmert)
10. Pipet tetes
11. Pipet volume 2, 5, 10 ml
12. Rotavapor (Buchi)
13. Seperangkat alat maserasi
14. Sentrifus
15. Timbangan kasar
16. Timbangan analitik (Sartois)
17. Vial
18. Kaca pembesar (loop)



#### IV.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

1. Air laut
2. Air suling
3. Sampel spons
4. Indikator universal
5. Kloroform teknis
6. Larva udang *Artemia salina* Leach.
7. Makanan ikan Galaxy®
8. Metanol teknis

#### IV.2 Penyiapan bahan penelitian

##### IV.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan berupa spons yang terdiri dari 5 jenis yaitu sampel dengan kode BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05, yang diambil dari kepulauan Barrang Lompo, Sulawesi Selatan.

##### IV.2.2 Pengolahan Spons

Setiap sampel spons dibersihkan kemudian dicuci dengan air laut. Dimasukkan dalam toples kemudian direndam dengan metanol hingga sampel terendam semuanya selama transportasi.

#### IV.3 Ekstraksi Sampel

Masing-masing sampel spons dikeluarkan dari metanol yang dipakai selama transportasi. Ditimbang masing-masing sampel spons sebanyak 500 g dalam keadaan basah. Sampel spons dipotong kecil-kecil, kemudian

dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Ditambahkan metanol sebanyak 2 liter. Setelah 24 jam cairan penyaringnya diganti dengan metanol yang baru. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali dengan jumlah cairan penyari yang sama. Ekstrak metanol yang diperoleh dan metanol yang dipakai untuk merendam selama transportasi kemudian diuapkan cairan penyaringnya dengan menggunakan rotavapor kemudian dilanjutkan di atas penangas air sampai diperoleh ekstrak metanol kental BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 masing-masing berturut-turut 8,30 g, 11,45 g, 36,28 g, 20,19 g, dan 9 55 g. Ekstrak metanol kental selanjutnya dimasukkan dalam corong pisah dan ditambahkan kloroform dan air suling dengan perbandingan 1 : 1. dibiarkan hingga memisah. Lapisan kloroform ditampung, sedangkan lapisan airnya dimasukkan kembali ke dalam corong pisah dan diekstraksi kembali dengan kloroform. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali. Fraksi kloroform yang diperoleh diuapkan sampai kering dan selanjutnya ditimbang.

Lapisan air diuapkan sampai kering kemudian ditambahkan dengan metanol dan disentrifus. Supernatannya diambil sedangkan endapannya yang berupa garam dibuang. Hal ini dilakukan beberapa kali hingga supernatan yang diperoleh sudah jernih.. Diuapkan hingga pelarutnya habis dan ditimbang.

#### **IV.4 Penyiapan Larva Udag**

Telur udang *Artemia salina* Leach. yang diperoleh dari The Great Salt USA sebanyak 10 g direndam dalam wadah berisi air laut 1 liter pada kondisi pH 7-8 di bawah cahaya lampu pijar 60 watt dan pada suhu kamar 25 °C

yang dilengkapi dengan aerator. Telur akan menetas selama 24 jam menjadi larva. Setelah larva berumur 48 jam larva udang siap diujikan.

#### IV.5 Pembuatan Konsentrasi Sampel Spons

Ekstrak kloroform dan Ekstrak metanol untuk tiap jenis spons ditimbang sebanyak 50 mg. Ekstrak kloroform dilarutkan dalam kloroform : methanol (1:1) dan Ekstrak metanol dilarutkan dalam metanol masing-masing sebanyak 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 5 mg/ml sebagai stok. Dari stok tersebut dipipet ke dalam vial masing-masing 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, dan 1000  $\mu$ l menggunakan mikropipet dan pipet volume untuk mendapatkan konsentrasi 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, dan 1000  $\mu$ g/ml. Untuk kontrol negatif dibuat konsentrasi 1000  $\mu$ g/ml dengan menggunakan pelarut metanol dan kloroform. Sampel dan pembanding kemudian pelarutnya diuapkan sampai kering lalu ditambahkan air laut masing-masing 2 ml.

#### IV.6 Uji Larva Udang

Dimasukkan larva udang *Artemia salina* Leach. Sebanyak 10 ekor ke dalam masing-masing vial yang berisi Ekstrak kloroform dan Ekstrak metanol dari masing-masing jenis spons serta pembanding. Ke dalam vial ditambahkan 1 tetes suspensi makanan ikan Galaxy<sup>®</sup> (3 mg dalam 5 ml air laut) sebagai sumber makanan. Volumennya dicukupkan dengan menggunakan air laut sampai 5 ml. Selanjutnya disimpan ditempat yang cukup mendapat sinar lampu. Setelah 24 jam diamati jumlah larva yang mati. Dilakukan pengulangan 5 kali untuk tiap sampel uji dan kontrol.

#### **IV.7 Pengumpulan Data**

Dihitung jumlah larva yang mati untuk tiap jenis spons pada setiap konsentrasi ( $LC_{50}$ )

#### **IV.8 Pembahasan Hasil Penelitian**

Pembahasan diuraikan berdasarkan hasil yang diperoleh dari analisis data.

#### **IV.9 Kesimpulan**

Berdasarkan pembahasan hasil dapat disimpulkan toksisitas dari ekstrak metanol dan ekstrak kloroform spons BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05, yang mana bila harga  $LC_{50}$  dibawah 1000  $\mu\text{g/ml}$  dinyatakan toksik sedang apabila harganya diatas 1000  $\mu\text{g/ml}$  dinyatakan tidak toksik.

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### V.I Hasil penelitian

Hasil ekstraksi secara maserasi dan pemisahan komponen kimia menggunakan corong pisah 500 g sampel BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 diperoleh ekstrak kloroform masing-masing berturut-turut 2 g, 3,7 g, 4,95 g, 2,04 g dan 2,5 g serta ekstrak metanol masing-masing berturut-turut 3,25 g, 5,78 g, 25,63 g, 15,78 g dan 5,95 g.

Masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , dan 1000  $\mu\text{g/ml}$ , bersama pembanding negatif yaitu pelarut metanol dalam konsentrasi 1000  $\mu\text{g/ml}$  dan pelarut kloroform dalam konsentrasi 1000  $\mu\text{g/ml}$ , diujikan terhadap hewan uji larva udang *Artemia salina* dengan parameter kematian setelah 24 jam perlakuan sebagai respon toksisitas, diperoleh hasil sebagai berikut :

1. Perlakuan terhadap pembanding negatif (metanol 1000  $\mu\text{g/ml}$  dan kloroform 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) tidak memberikan respon kematian.
2. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-01 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 75,31  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 18,06  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-a dan 2-a).
3. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-02 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 17,72  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 4,38  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-b dan 2-b).

4. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-03 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 32,01  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 8,36  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-c dan 2-c).
5. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-04 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 51,05  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 10,79  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-d dan 2-d).
6. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-05 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 9,69  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 2,08  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-e dan 2-e).
7. Perlakuan terhadap ekstrak kloroform spons BRLP-01 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 8,67  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 1,64  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-f dan 2-f).
8. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-02 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 10,69  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 2,29  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-g dan 2-g).
9. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-03 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 5,01  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 0,88  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-h dan 2-h).
10. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-04 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 8,91  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 1,63  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-i dan 2-i).
11. Perlakuan terhadap ekstrak metanol spons BRLP-05 menunjukkan  $LC_{50}$  (24 jam) 9,90  $\mu\text{g/ml}$  dengan deviasi 3,42  $\mu\text{g/ml}$  (lihat tabel 3 lampiran 1-j dan 2-j).
12. Hasil kromatogram kromatografi lapis tipis ekstrak kloroform spons BRLP-03 (yang memberikan respon toksisitas paling toksik), menunjukkan 6 noda

dengan penampak noda sinar UV 254/366 nm dan 1 noda dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %. (lihat gambar 3).

## V.2 Pembahasan

Sampel spons BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 diperoleh dari bagian utara pulau Barrang Lompo, mempunyai populasi yang cukup besar dan tersebar mulai pada kedalaman 7-15 m. Hidup pada dasar laut berpasir, dasar berbatu, punggung karang yang padat, tebing karang atau pada patahan karang mati, sampel didokumentasikan dengan kamera manual (lihat lampiran gambar). Sampel direndam dalam pelarut metanol untuk mengawetkan selama dalam perjalanan. Pengawetan ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya proses pembusukan. Adanya usaha pencegahan terhadap proses pembusukan diharapkan agar zat aktif yang terkandung dalam spons tetap terjaga.

Digunakan spons dengan kode BRLP 01-05 karena spons tersebut belum diidentifikasi, sehingga untuk mempermudah penyebutan digunakan kode tersebut. Selain itu kode tersebut juga menunjukkan lokasi tempat spons diambil yaitu pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan.

Preparasi sampel untuk ekstraksi berupa sampel basah tanpa didahului proses pengeringan dimaksudkan untuk menghindari rusaknya kandungan aktif dari spons. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol untuk menarik komponen kimia yang bersifat polar dan non polar, kemudian untuk pemisahan selanjutnya digunakan corong pisah



dengan pelarut kloroform dan air dengan perbandingan 1 : 1. H.H. Abas dkk. (1999) menggunakan perbandingan kloroform : air (1:1) untuk memisahkan antara komponen kimia polar dan nonpolar dari sampel spons. Komponen kimia yang nonpolar terlarut pada kloroform sedangkan komponen kimia yang polar bersama garam berada pada lapisan air. Pemisahan garam dari komponen polar selanjutnya dilakukan dengan cara mengeringkan lapisan air. Setelah kering ditambahkan pelarut metanol dan disentrifus. Diperoleh endapan berupa garam yang tidak larut metanol.

Penentuan  $LC_{50}$  untuk mengetahui efek toksik ekstrak metanol dan ekstrak kloroform dari spons BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 dengan kontrol negatif metanol 1000  $\mu\text{g/ml}$  dan kloroform 1000  $\mu\text{g/ml}$  dilakukan terhadap larva udang. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva yang mati. Adapun uji ketoksikan dengan larva udang ini dipilih karena mudah, murah, cepat pelaksanaannya dan mempunyai korelasi positif terhadap efek toksiknya.

Senyawa aktif akan menghasilkan tingkat kematian yang tinggi terhadap larva udang. Menurut Meyer dkk. (1982), uji dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach memiliki spektrum aktivitas farmakologi yang luas dan dengan tingkat kepercayaan 95 %. Dengan demikian dapat digunakan secara luas untuk skrining senyawa aktif dari bahan alam.

Penggunaan pembanding negatif (pelarut metanol dan kloroform 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) dimaksudkan untuk melihat apakah respon kematian benar-benar berasal dari sampel dan bukan disebabkan oleh faktor teknis perlakuan.

Ekstrak metanol dan ekstrak kloroform spons BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 dilarutkan dengan pelarut masing-masing untuk mempermudah kelarutannya dan dibuat konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  dan 1000  $\mu\text{g/ml}$ , ini dimaksudkan untuk melihat variasi respon yang diberikan dibawah dan pada konsentrasi 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Pelarut dalam sampel kemudian diuapkan hingga kering dan diujikan pada larva udang yang berumur 48 jam, dimana pada umur tersebut mengalami pertumbuhan yang sangat cepat sehingga diasumsikan sebagai pertumbuhan sel yang abnormal. Sebanyak 10 ekor untuk tiap konsentrasi sampel uji diperlakukan dengan parameter kematian setelah 24 jam, dan direplikasi sebanyak 5 kali. Selama pengamatan kondisi ditentukan dengan pH air 7-8, suhu 25°C dan kedalam vial diberikan 1 tetes suspensi makanan ikan (3 mg dalam 5 ml air) untuk mengoptimalkan hasil yang diperoleh. pH perlakuan antara 7-8 yang merupakan pH yang cocok untuk *Artemia salina* Leach (Mujiman, 1988).

Efek toksik masing-masing sampel dapat ditentukan dengan melihat  $LC_{50}$ -nya dari perhitungan data kematian larva udang *Artemia salina* Leach. (tabel-3) menggunakan metode grafik probit log-konsentrasi. Apabila harga  $LC_{50}$  (24 jam) lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/ml}$  dikatakan toksik dan sebaliknya bila harga  $LC_{50}$  (24 jam) lebih besar dari 1000  $\mu\text{g/ml}$  dikatakan tidak toksik (Anderson, et al. (1991)). Dan dari hasil perhitungan diperoleh :

Hasil perhitungan  $LC_{50}$  (24 jam) pada tabel 3 diperoleh bahwa tingkat toksisitas sampel uji berada dalam interval toksik dan ekstrak kloroform spons dari semua sampel memberikan respon yang paling toksik. Ini menunjukkan

$LC_{50}$  (24 jam) lebih besar dari 1000  $\mu\text{g/ml}$  dikatakan tidak toksik (Anderson, et al. (1991)). Dan dari hasil perhitungan diperoleh :

Hasil perhitungan  $LC_{50}$  (24 jam) pada tabel 3 diperoleh bahwa tingkat toksisitas sampel uji berada dalam interval toksik dan ekstrak kloroform spons dari semua sampel memberikan respon yang paling toksik. Ini menunjukkan bahwa zat bioaktif spons paling toksik bersifat non polar. Sedangkan dari semua ekstrak kloroform sampel spons, ekstrak dari sampel BRLP-03 memberikan efek toksik yang paling tinggi.

Data toksisitas yang diperoleh dapat digunakan untuk menduga potensi sitotoksik dari fraksi spons yang digunakan karena hal ini merupakan suatu pendekatan senyawa yang berfungsi sebagai antikanker (Meyer dkk, 1982).

Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis spons BRLP-03 yang memberikan efek paling toksik untuk ekstrak kloroform diperoleh 5 noda dengan penampak noda sinar UV 254/366 nm dan 3 noda dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 %. Sedangkan untuk ekstrak metanol diperoleh 1 noda untuk penampak noda sinar UV 254/366 nm dan 1 noda dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 % menggunakan eluen hexan:etil asetat (1:5). Dengan demikian efek toksik ekstrak kloroform yang lebih besar dari ekstrak metanol diduga disebabkan oleh senyawa-senyawa pada fraksi kloroform yang tidak terdapat pada fraksi metanol.

Pengujian bioaktif beberapa spesies spons telah dilakukan sebelumnya, yang diantaranya memberikan aktivitas biologis seperti antimalaria dan antibakteri (Suryati, 1995). Ini membuktikan bahwa senyawa bioaktif spons

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### VI.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan hasil analisa data penentuan  $LC_{50}$  (efek toksik) dari ekstrak metanol dan ekstrak kloroform spons BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. dengan parameter kematian setelah 24 jam, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak metanol dan ekstrak kloroform spons BRLP-01, BRLP-02, BRLP-03, BRLP-04 dan BRLP-05 bersifat toksik terhadap larva udang *A. salina* dan memiliki  $LC_{50}$  (24 jam) lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/ml}$ .
2. Ekstrak kloroform spons BRLP-03 memiliki  $LC_{50}$  (24 jam) paling kecil sehingga dapat dikatakan paling toksik.
3. Ekstrak metanol spons BRLP-01 memiliki  $LC_{50}$  yang paling besar sehingga dapat dikatakan kurang toksik.

#### VI.1 Saran

1. Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa aktif dari spons terutama ekstrak kloroform dari sampel BRLP-03 yang mempunyai tingkat toksisitas paling tinggi.
2. Perlu dilakukan penelitian identifikasi jenis spons BRLP-03 dari Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Nontji, A., (1993), " Laut Nusantara ", Penerbit Djambatan, Jakarta, 6
2. Brewery, K., (1997), " Coral Reefs, Mines of Precious Substances ", Pharmaceutical Research Laboratory, [http // Coral Reefs.com](http://CoralReefs.com), 1
3. Reddy, R., (1995), " Venkatama of Rami Reddy ", [http // Dr. John Faulkner Laboratory.com](http://Dr.JohnFaulknerLaboratory.com), 1
4. Higa, T., Tanaka, J., (2001), " Bioactive Compounds From The Invertebrates ", Departement of Chemistry, Biology, and Marine Science, University of The Ryukus, Nishihara, Okinawa, Japan, 589
5. Faulkner, J.D., (1999), " Marine Research ", Laboratory Scripps Institution of Oceanography, [http // Marine Research.com](http://MarineResearch.com), 2,3
6. Anderson, J.E., Goetz, C.M., Mc Laughlin, J.L., (1991), " A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassay and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens ", Natural Product Chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1
7. Meyer, B.N., et al., (1982), " Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent ", Drug Information Journal, Vol. 32, 513 – 524
8. Alam, G., (2002), " Brine Shrimp Lethality Test (BST) Sebagai Bioassay dalam Isolasi Senyawa Bioaktif dari Bahan Alam ", Majalah Farmasi dan Farmakologi, Vol 6 No. 2, Jurusan Farmasi F.Mipa, Unhas, 432 – 435
9. Mujiman, A., (1988), " Udang Renik Air Asin ", Bharata Karya Aksara, Jakarta, 15 – 25

10. Bernes, R.D., (1980), " Invertebrate Zoologi ", Fourth Edition, Holt-Saunders International Edition, Gettysburg College, Pennsylvania, 104-106
11. Nybakken, J.W., (1993), " Marine Biology ", Third Edition, Harper Collins Collage Publishing, New York, 432
12. Buss, L.W., (1976), " Better Living Through Chemistry ", The Relationship between allelo-chemical Interactions and Competitive Networks, In Harris, F.W., and R.R Cowde (eds), Aspects of Sponge Biology Academic Press, New York, 315-327
13. Steven, M., Collegate and Russel, J., Molyneux, (1993), " Bioactive Natural Products, Detection, Isolation and Structural-Determination ", CRC Press, Inc, London, 442-451
14. Harborne, J.B., (1987), " Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Mengekstraksi Tumbuhan ", Edisi II, Penerbit ITB, Bandung, 13, 16
15. Direktorat Jendral Pengawasan Obat Dan Makanan, (1986), " Sediaan Galenik ", Edisi II, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Bhakti Husada, Jakarta, 4-30
16. Gritter, R.J., Bobbit, J.M., Schwarting, A.E., (1985), " Pengantar Kromatografi ", Edisi II, Terjemahan 1991 oleh Dr. Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 780
17. Sudjadi, (1988), " Metode Pemisahan ", Edisi I, Kanisus, Yogyakarta, 60
18. Loomis, T.A., (1978), " Toksikologi Dasar ", Edisi III, Penerjemah Imono Argo, Ikip Semarang Press, 4, 6-21
19. Casarret, L.J., Doull, J., (1975), " Toxicology, The Basic Science of Poison ", First Edition, Mac Millan Publishing, Co. Inc., New York, 7-21



20. Hayes, A.W., (1983), " Principles and Method of Toxicology ", Raven Press, New York, 4-23
21. Mc. Laughlin, J.L., Chang, C.J., Smith, D.L, (1991), Bench-top, Bioassays for the Discovery of Bioactive Natural Product : An Update ", School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Departement of Medical Chemistry and Pharmacognocny, Robert Hiene, Pharmacy Building, West Lavayette, Indiana, USA, 1-6
22. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, (1978), " Matera Medika Indonesia ", Jilid II, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, XX
23. Direktorat Jendral Pengawasan Obat Dan Makanan, (1979), " Farmakope Indonesia ", Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 9
24. Pudjiastuti, P., Suyanto, Manik, S., dan Cahyandari, C.S., (1997), " Brine Shrimp Test Triterpens From Root Bark of *Sandoricum emergatum* ", Proceeding UNESCO Sub-regional Seminar on The Chemistry of Natural Products, Makassar, 99