

Skripsi Penelitian

**KARAKTERISASI DAN STUDI *IN VITRO* ENZIM L-METIONINASE
DARI BAKTERI SIMBION ALGA MERAH *Eucheuma spinosum*
SEBAGAI BAHAN ANTIKANKER**

FENI SARI AFRIANI

H031 18 1029



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**KARAKTERISASI DAN STUDI IN VITRO ENZIM L-METIONINASE
DARI BAKTERI SIMBION ALGA MERAH *Eucheuma spinosum*
SEBAGAI BAHAN ANTIKANKER**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh

FENI SARI AFRIANI

H031 18 1029



MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**KARAKTERISASI DAN STUDI *IN VITRO* ENZIM L-METIONINASE DARI BAKTERI
SIMBION ALGA MERAH *EUCHEUMA SPINOSUM* SEBAGAI BAHAN ANTIKANKER**

Disusun dan diajukan oleh

FENI SARI AFRIANI

H031 18 1029

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas

Hasanuddin

Pada 22 November 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Prof. Dr. Ahyar Ahmad Ph.D
NIP. 19671231 199103 1 020

Pembimbing Pertama

Dr. Seniwati Dali, M.Si
NIP. 19581231 198803 2 003

Ketua Program Studi

Dr. St. Fauziah, M.Si
NIP. 19720202 199903 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN DOKUMEN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Feni Sari Afriani
Nomor Mahasiswa : H031 18 1029
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi yang berjudul **Karakterisasi dan Studi *In Vitro* Enzim L-Metioninase dari Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma Spinosum* sebagai Bahan Antikanker** adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, penulis bersedia menerima sanksi perbuatan tersebut.

Makassar, 23 November 2023

Menyatakan,



PRAKATA

Alhamdulillah Rabbilalamin, dengan nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Syukur tidak henti-henti selalu terpanjatkan pada sang Pencipta akan limpahan rahmat, hidayah dan inayah-Nya yang telah memberikan kekuatan dan kesabaran kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat terlaksana sebagaimana adanya. Sholawat serta salam tak lupa kita kirimkan kepada baginda Rasulullah SAW yang telah mengangkat derajat manusia dari jaman jahiliah menuju jaman peradaban ilmu.

Limpahan rasa hormat, bakti serta doa yang tulus, penulis persembahkan kepada Ibunda Karyawanti dan ayahanda Maskur, yang telah membesarkan, mendidik dengan penuh keikhlasan dan kesabaran serta saudaraku Ferdi Ari Agusti.

Terima kasih penulis ucapkan kepada:

1. **Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D**, selaku dosen pembimbing utama, dan **Dr. Seniwati Dali, M. Si**, selaku dosen pembimbing pertama yang telah membimbing penulis dengan begitu luar biasa, meluangkan banyak waktu dan memberikan dorongan, masukan dan saran-saran selama penyusunan skripsi
2. **Dr. Syarifuddin Liong, M. Si** dan **Dr. Syahrudin Kasim, S.Si, M.Si** sebagai tim dosen penguji yang telah memberikan banyak ilmu dan masukan selama proses penyusunan skripsi ini.
3. **Bulkis Musa, S. Si, M.Si**, selaku koordinator seminar Proposal dan Hasil selama proses penyusunan skripsi ini.

4. Seluruh staf pegawai lingkup fakultas dan analis Laboratorium di Departemen Kimia, terkhusus untuk **Ibu Mahdalia, S.Si, M.Si, kak Siti Khairunnur, S.Si, M.Si,** dan **kak Wahyudin Rauf, S.Si,** selaku analis laboratorium Biokimia atas bantuan semangat serta arahannya selama penelitian berlangsung. Ucapan terima kasih juga kepada analis Laboratorium Bioteknologi Fakultass Perternakan Unhas **Kak Tri** dan analis Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unhas **Pak Markus.**
5. Semua **Rekan-kerja Peneliti di Laboratorium Biokimia** yang selalu membersamai dalam setiap keluh kesah dan ratapan kepasrahan penulis. Kalian selalu meninggalkan kesan indah yang senantiasa penulis dambakan dan tentunya dorongan untuk menyelesaikan perjuangan ini selalu tersematkan.
6. Teman-teman **KIMIA 2018, khususnya HIBRIDISASI 2018,** dengan slogan **Loyalitas tanpa Batas,** tetapi selepas sidang membatasi. Gurauan si penulis yang hampir menjadi penghuni the last
7. **Kakak-Kakak seperjuangan di laboratorium (Kak Moel, Kak Lulu, Kak Salim, kak Esse, kak Maldini),** yang telah membantu dan memberi saran selama penelitian berlangsung.
8. Teman-teman diluar lingkup kampus terkhusus **Komunitas BSBB, Kelas Diskusi Teras Caknur, Ira Tea Break,** dan kawan-kawan perdiskusian lainnya, yang secara tidak langsung ikut andil dalam perjalanan penulis mengarungi lika-liku penelitian dan terus menyemangati untuk menyelesaikan dengan baik yang telah dimulai.

9. Warga Desa Pajukukang, Kecamatan Pajukukang, Kabupaten Bantaeng, terkhusus **Kak Agus Umar dan Keluarga Kak Amin Natsir**, yang telah membantu penelitian penulis dalam pengambilan sampel.
10. Semua pihak yang terlibat lainnya yang tidak bisa disebutkan semua
11. Paling utama pada **Diriku**, berusaha tetap ada dalam jalur dan saling memahami satu sama lain.

Semoga segala bentuk bantuan berupa doa, saran, motivasi dan pengorbanan yang telah diberikan kepada penulis dapat bernilai ibadah dan diganjarkan pahala di sisi Allah Subhanahu wa Ta'ala. Aamiin.

Makassar, Oktober 2023

Feni Sari Afriani
NIM. H031181029

ABSTRAK

L-Metioninase saat ini tengah dieksplorasi besar-besaran terutama sebagai agen antikanker. Keberagaman biota laut, khususnya alga merah *Eucheuma spinosum* dapat berpotensi sebagai agen antikanker dengan nilai toksisitas yang telah diuji beberapa peneliti. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi L-Metioninase dari bakteri simbion *Eucheuma spinosum* yang berasal dari Pantai Pajukukang, Desa Pajukukang, Kecamatan Pajukukang, Kabupaten Bantaeng sebagai bahan antikanker. Hasil skrining dan identifikasi isolat bakteri didapatkan spesies *Providencia* sp.. Berdasarkan hasil fraksinasi dengan amonium sulfat, didapatkan aktivitas tertinggi pada F3 (60-80%) sebesar 26,6524 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 7,2326 U/mg. Aktivitas optimum L-metioninase berada pada pH 7, suhu 40 °C dengan waktu inkubasi 30 menit dan aktivator berupa Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan Co^{2+} . Uji toksisitas metode BSLT dengan larva artemia salina sebagai hewan ujinya, didapatkan nilai LC_{50} sebesar 149,23 ppm yang tergolong toksik sehingga dapat berpotensi sebagai antikanker.

Kata kunci: Antikanker, bakteri simbion, *eucheuma spinosum*, L-metioninase

ABSTRACT

L-methioninase is currently being explored heavily, especially as an anticancer agent. The diversity of marine biota, especially the red algae *Eucheuma spinosum* can be potential as an anticancer agent with toxicity values that have been tested by several researchers. The purpose of this study was to isolate L-methioninase from *Eucheuma spinosum* symbiont bacteria from Pakjukukang Beach, Pakjukukang Village, Pakjukukang District, Bantaeng Regency as an anticancer agent. The results of screening and identification of bacterial isolates obtained *Providencia* sp. species. Based on the results of fractionation with ammonium sulfate, the highest activity was obtained in F3 (60-80%) of 26.6524 U/mL with a specific activity of 7.2326 U/mg. The optimum activity of L-methioninase is at pH 7, temperature 40°C with an incubation time of 30 minutes and metal ions that can become activators are Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Co^{2+} . BSLT toxicity test with *Artemia salina* larvae as the test animal, obtained an LC_{50} value of 149,23 ppm which is classified as toxic so that it can have potential as an anticancer material.

Keywords : Anticancer, *eucheuma spinosum*, L-methioninase, symbiont bacteria

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---------------------------------------|----------------|
| PRAKATA..... | v |
| ABSTRAK..... | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| DAFTAR ISI..... | x |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiv |
| DAFTAR TABEL..... | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xvi |
| DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN..... | xvii |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 5 |
| 1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian..... | 5 |
| 1.3.1 Maksud Penelitian..... | 5 |
| 1.3.2 Tujuan Penelitian..... | 6 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 6 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 7 |
| 2.1 Alga Merah..... | 7 |
| 2.2 Bakteri Simbion Alga..... | 8 |
| 2.3 Kanker..... | 10 |
| 2.4 Enzim L-Metioninase..... | 11 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5 Uji Identifikasi Bakteri..... | 13 |
| 2.6 Uji Aktivitas Antikanker | 20 |
| BAB III METODE PENELITIAN..... | 22 |
| 3.1 Bahan Penelitian..... | 22 |
| 3.2 Alat Penelitian..... | 22 |
| 3.3 Waktu dan Tempat Penelitian | 22 |
| 3.4 Prosedur Penelitian..... | 23 |
| 3.4.1 Penyiapan Alat dan Bahan | 23 |
| 3.4.2 Preparasi Sampel | 23 |
| 3.4.3 Pembuatan Media..... | 23 |
| 3.4.3.1 Media <i>Nutrient Broth</i> (NB) | 23 |
| 3.4.3.2 Media <i>Nutrient Agar</i> (NA) | 23 |
| 3.4.3.3 Media M9 atau Medium Selektif..... | 24 |
| 3.4.3.4 Media Fermentasi (Media Produksi) | 24 |
| 3.4.4 Penyegaran Sampel dalam Media <i>Nutrient Broth</i> | 24 |
| 3.4.4.1 Bagian Permukaan Alga | 24 |
| 3.4.4.2 Bagian dalam Alga | 24 |
| 3.4.5 Isolasi Bakteri Simbion dari Alga Merah (<i>E. spinosum</i>) Penghasil L-Metioninase..... | 25 |
| 3.4.6 Identifikasi Spesies Bakteri Simbion dari Alga Merah (<i>E.</i> <i>spinosum</i>) Penghasil L-Metioninase | 25 |
| 3.4.7 Peremajaan Isolat Bakteri Simbion <i>E. spinosum</i> | 25 |
| 3.4.8 Optimasi Produksi L-Metioninase dalam Medium Produksi.. | 26 |
| 3.4.9 Produksi Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah (<i>E. spinosum</i>) | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.10 Pemurnian Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri Symbion Alga Merah (<i>E. spinosum</i>)..... | 27 |
| 3.4.11 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry | 28 |
| 3.4.12 Uji Aktivitas Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri Symbion Alga Merah (<i>E. spinosum</i>)..... | 29 |
| 3.4.13 Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri Symbion Alga Merah (<i>E. spinosum</i>)..... | 31 |
| 3.4.13.1 Pengaruh Variasi pH terhadap Aktivitas Enzim | 31 |
| 3.4.13.2 Pengaruh Variasi Suhu terhadap Aktivitas Enzim.. | 31 |
| 3.4.13.3 Pengaruh Variasi Waktu terhadap Aktivitas Enzim | 31 |
| 3.4.13.4 Pengaruh Variasi Penambahan Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim..... | 31 |
| 3.4.13.5 Pengaruh Variasi Konsentrasi Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim..... | 31 |
| 3.4.14 Uji Sifat Toksisitas dengan Menggunakan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT) | 32 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 33 |
| 4.1 Isolasi Bakteri Symbion dari Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> | 33 |
| 4.2 Skrining Isolat Bakteri Penghasil Enzim L-Metioninase..... | 34 |
| 4.3 Identifikasi Isolat Bakteri Symbion ES 6(1)..... | 35 |
| 4.4 Penentuan Waktu Produksi Optimum Pertumbuhan Bakteri <i>Providencia</i> sp..... | 39 |
| 4.5 Pemurnian Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri <i>Providencia</i> sp... | 40 |
| 4.6 Karakterisasi Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri <i>Providencia</i> sp. | 43 |
| 4.7 Uji Toksisitas Enzim L-Metioninase | 47 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... | 49 |
| 5.1 Kesimpulan | 49 |

| | |
|----------------------|----|
| 5.2 Saran..... | 49 |
| DAFTAR PUSTAKA | 50 |
| LAMPIRAN..... | 58 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | halaman |
|--|---------|
| 1. <i>Eucheuma spinosum</i> | 7 |
| 2. Data Kasus di Indonesia berdasarkan data Globocan dari WHO 2020 | 10 |
| 3. Reaksi Biokimia L-metionin yang dikatalisis oleh MGL | 12 |
| 4. Reaksi hidrolisis triptofan dan uji indol..... | 15 |
| 5. Reaksi uji metil merah | 16 |
| 6. Reaksi uji Voges-Praskauer | 17 |
| 7. Reaksi uji sitrat..... | 17 |
| 8. Reaksi hidrolisis urea | 18 |
| 9. Reaksi uji hidrogen sulfida..... | 19 |
| 10. Reaksi uji Lowry | 29 |
| 11. Reaksi reagen <i>Nessler</i> dengan ammonia..... | 30 |
| 12. Isolat bakteri penghasil enzim L-metioninase dari <i>E. spinosum</i> | 34 |
| 13. Isolat bakteri simbion ES 6(1)..... | 35 |
| 14. Hasil pewarnaan gram isolat bakteri simbion <i>E. spinosum</i> | 36 |
| 15. Penentuan Optimasi Produksi L-Metioninase..... | 39 |
| 16. Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas enzim | 44 |
| 17. Pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas enzim | 45 |
| 18. Pengaruh variasi penambahan ion logam terhadap aktivitas enzim..... | 46 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | halaman |
|--|----------------|
| 1. Potensi sumber isolasi L-metionin γ -lyase..... | 12 |
| 2. Hasil Identifikasi Isolat Bakteri Epifit | 38 |
| 3. Aktivitas Enzim L-Metioninase Tiap Fraksi Pengendapan Amonium Sulfat | 42 |
| 4. Nilai LC ₅₀ Ekstrak Kasar dan Hasil Dialisis L-Metioninase | 47 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | halaman |
|---|---------|
| 1. Diagram alir | 58 |
| 2. Bagan kerja..... | 59 |
| 3. Kurva Standar <i>Bovine Serume Albumine</i> pada λ_{\max} 660 nm..... | 77 |
| 4. Data Hasil Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein dan Aktivitas Enzim L-metioninase | 78 |
| 5. Perhitungan Penambahan Amonium Sulfat pada Tahap Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan | 79 |
| 6. Tabel Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat | 80 |
| 7. Pengukuran Kadar Protein Dializat Enzim L-Metioninase..... | 81 |
| 8. Kurva Standar NH_4Cl pada λ_{\max} 411 nm | 82 |
| 9. Tabel Aktivitas Enzim L- Metioninase | 83 |
| 10. Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Metioninase | 84 |
| 11. Tabel Harga Probit | 85 |
| 12. Perhitungan LC_{50} | 86 |
| 13. Dokumentasi | 88 |

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

| | |
|------------------|---|
| Apoptosis | : kematian sel secara terprogram yang terjadi secara normal selama proses perkembangan dan penuaan semua jaringan tubuh |
| BSA | : <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| BSLT | : <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> |
| LC ₅₀ | : <i>Lethal Concentration 50</i> |
| mg/mL | : miligram per mililiter |
| MGL | : Metionin Gamma Liase |
| NA | : <i>Nutrient Agar</i> |
| NB | : <i>Nutrient Broth</i> |
| OD | : <i>Optical Density</i> |
| pH | : Potensial hidrogen |
| PLP | : Piridoksal fosfat |
| ppm | : <i>part per million</i> |
| Proliferasi | : fase sel saat mengalami pengulangan siklus sel tanpa hambatan |
| rpm | : <i>rotation per minute</i> |
| <i>sp.</i> | : Spesies |
| U/mg | : Unit per miligram |
| U/mL | : Unit per mililiter |
| μl | : mikroliter |
| α | : alpha |
| β | : beta |
| γ | : gamma |
| λ | : lamda |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Keanekaragaman biota laut di Indonesia sangat melimpah dan kaya akan sumber daya alam (Marliza dkk., 2022). Hal ini didukung oleh perairan laut Indonesia yang sangat luas sebesar 3,25 juta km² dari total luas wilayah sebesar 7,81 juta km² (Dirjen Pengelolaan Ruang Laut, 2020). Salah satu biota laut yang melimpah di perairan Indonesia adalah alga laut. Indonesia sebagai bagian dari segitiga karang (*coral triangle*) dunia, memiliki 550 jenis varian alga laut dari sekitar 8000 jenis yang ada di dunia (Kemenlu, 2021). Ratusan jenis alga yang tumbuh dan berkembang di perairan Indonesia, tetapi hanya beberapa jenis yang telah diusahakan secara komersial, salah satunya adalah *Euचेuma spinosum* (Kasim, 2016).

Euचेuma spinosum adalah salah satu jenis alga merah yang tumbuh di daerah tropis termasuk di daerah Sulawesi Selatan. Provinsi Sulawesi Selatan dikenal sebagai salah satu lokasi pembudidayaan alga laut tertua dan terbesar di Indonesia (KKP, 2018). Berdasarkan data tahun 2016, total produksi alga laut jenis *Euचेuma spinosum* dan *Euचेuma cottonii* di 17 kabupaten di daerah Sulawesi Selatan sebesar 2,3 juta ton.

Umumnya alga hidup di alam bersama dengan komunitas bakteri dan dapat mempertahankan hubungan simbiosis. Bakteri memiliki kemampuan yang hampir sama dengan inangnya untuk menghasilkan senyawa bioaktif (Nofiani, 2008). Mayoritas alga dilaporkan telah menunjukkan pertumbuhan yang

lebih baik dengan adanya bakteri (Villarreal-Gomez dkk., 2010). Menurut Proksch dkk., (2003), bakteri simbiosis lebih efektif digunakan dibanding mengekstrak kasar alga laut karena mudah dikultur di laboratorium sehingga dapat menghindari penggunaan bahan alam yang berlebihan. Bakteri simbiosis dari alga merah *Eucheuma sp.* berpotensi dikembangkan sebagai agen antikanker (Ramadan, 2020). Penelitian yang juga dilakukan oleh Arif (2019) dan Anggraini (2021), melaporkan senyawa kimia yang terdapat pada *E. spinosum* dapat menjadi sumber potensial sebagai agen antikanker.

Enzim adalah protein yang berperan sebagai katalisator yang mempercepat maupun menurunkan reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem biologik yang menurunkan energi aktivasi dalam menguraikan substratnya dengan sangat spesifik (Iswari dan Yuniastuti, 2006). Enzim dimanfaatkan dalam bidang medis sebagai agen terapi terutama penyakit kanker. Menurut *American Cancer Society* (2015), penyakit kanker adalah suatu penyakit yang diakibatkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal, tidak terkontrol, dan akan menjadi sel kanker. Menurut WHO (2020), sebanyak 19,3 juta kasus penderita kanker dengan angka kematian 10 juta jiwa. Sebanyak 396.914 kasus di Indonesia dengan angka kematian 234.511 kasus.

Sebuah pendekatan baru dalam pengobatan kanker adalah penggunaan enzim yang dapat menghalangi tersedianya nutrisi utama yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel kanker. Salah satu enzim yang dapat berpotensi yaitu L-metioninase yang sedang dieksplorasi untuk terapi kanker. Oleh karena itu, pencarian sumber biologis baru yang memproduksi L-metioninase sangat penting terhadap penemuan obat kanker (El-sayed dkk., 2012).

Sel kanker memiliki kebutuhan akan asam amino L-metionin yang lebih tinggi karena sel tersebut kekurangan metionin sintase, tidak seperti sel sehat normal (Finkelstein, 1990). Oleh karena itu, penggunaan enzim L-metioninase dapat memecah L-metionin dan mengubah aktivitas metabolisme yang bergantung pada metionin dalam sel kanker sehingga menghentikan pertumbuhan sel kanker tersebut (Rahman dkk., 2013). Adanya pembatasan metionin, sel-sel kanker akan ditangkap pada tahap akhir S-G2 dari siklus sel dan mengalami apoptosis. Pembatasan perkembangan kanker menggunakan L-metioninase, untuk kanker menunjukkan ketergantungan L-metionin untuk pertumbuhan dan proliferasi merupakan strategi menjanjikan untuk pengobatan antikanker (Salim dkk., 2020). Studi terbaru oleh Lieu dkk. (2020), melaporkan bahwa kekurangan metionin dapat mengurangi pertumbuhan sel pemicu tumor payudara dan kanker prostat pada pria. L-metioninase telah dilaporkan dari bakteri seperti *Pseudomonas putifa*, *Clostridium sporogenes*, *Aeromonas* sp., *Citrobacter intermedius*, *Brevibacterium linens*, *Trikomonas vaginalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, dan *Streptomyces* sp. (Pinnamaneni dkk., 2013).

Salah satu cara untuk mengatasi penyakit kanker adalah dengan mengonsumsi obat antikanker. Obat antikanker diharapkan memiliki toksisitas yang selektif artinya dapat menghancurkan sel kanker tanpa merusak jaringan normal. Obat antikanker sekarang ini masih belum banyak memenuhi kriteria sehingga perlu dikembangkan obat baru yang mempunyai efek terapi yang baik. Obat antikanker yang ada umumnya tidak hanya memiliki khasiat sebagai antikanker, obat tersebut juga bersifat merusak sel-sel yang tumbuh normal. Kondisi ini mendorong dilakukannya penelitian untuk menemukan obat antikanker yang memenuhi kriteria tersebut (Muaja dkk., 2013).

Uji toksisitas dilakukan secara *in vitro* yang memberikan berbagai keuntungan diantaranya dapat digunakan pada langkah awal pengembangan obat, hanya menggunakan sejumlah kecil bahan yang digunakan untuk kultur sel primer manusia dari berbagai organ target (ginjal, liver, kulit) serta dapat memberikan informasi secara langsung efek potensial pada sel target manusia yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle dkk., 2000).

Penelitian ini menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina leach* sebagai hewan uji. Menurut *National Cancer Institute United State of America* (NCI USA), terdapat hubungan antara uji toksisitas metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan senyawa antitumor atau antikanker. Hal ini dapat dilihat pada pemilihan usia pertumbuhan larva udang *Artemia salina*. Pengujian akan dilakukan jika usia larva udang *Artemia salina* berusia 48 jam. Hal ini disebabkan pada usia tersebut pertumbuhan larva udang *Artemia salina* dalam kondisi tidak terkendali sama seperti pertumbuhan sel kanker. Metode BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian suatu senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman (Colegate dan Molyneux, 2007). Nilai toksisitas dinyatakan dengan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) (Aras, 2013). Menurut Meyer dkk., (1982) menyatakan bahwa senyawa uji dikatakan toksik jika harga LC_{50} lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Putra dkk. (2021), nilai LC_{50} ekstrak alga laut *Eucheuma cottonii* menggunakan n-heksan terhadap larva *Artemia salina* adalah 62,62 ppm, sedangkan dengan pelarut metanol mempunyai aktivitas toksisitas dengan nilai LC_{50} yaitu 459,4 ppm (Arif, 2019). Nilai LC_{50} alga merah *Eucheuma cottonii* yang memiliki toksisitas paling tinggi didapatkan

oleh Nurvita (2019) sebesar 56,776 ppm. Menurut Azizah (2016), isolat steroid dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* memiliki sifat paling toksik pada nilai LC₅₀ sebesar 18,879 ppm. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa enzim L-metioninase yang diisolasi dari bakteri *Streptomyces* sp. dan *Methylobacterium* sp. dalam sampel yang dimurnikan sebagian dengan aktivitas spesifik masing-masing 282 U/mg dan 606 U/mg dapat menghambat pertumbuhan sel Hep-G2, namun bakteri *Streptomyces* sp. paling berefek pada sel kanker yang dapat berpotensi untuk aplikasi bahan antikanker (Kavya dan Nadumane, 2020). Berdasarkan uraian diatas, maka akan dilakukan penelitian tentang potensi pemanfaatan bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai bahan antikanker.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. spesies bakteri apa yang bersimbion dengan alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat menghasilkan enzim L-metioninase?
2. bagaimana karakteristik enzim L-metioninase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*?
3. bagaimana potensi enzim L-metioninase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai bahan antikanker secara *in vitro*?

1.3. Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas enzim L-metioninase dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai bahan antikanker *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat memproduksi enzim L-metioninase,
2. menentukan karakteristik enzim L-metioninase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*,
3. menguji toksisitas enzim L-metioninase secara *in vitro* dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. memberikan informasi mengenai jenis-jenis bakteri simbion yang dapat menghasilkan enzim L-metioninase dari alga merah *Eucheuma spinosum* sehingga menambah informasi bidang mikrobiologi,
2. memberikan informasi mengenai toksisitas enzim L-metioninase sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan dasar obat antikanker yang baru.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Merah *Eucheuma Spinosum*

Alga merah merupakan kelompok alga yang mempunyai warna kemerahan. Warna merah pada alga karena mengandung pigmen fikoeritrin yang sangat dominan dibandingkan dengan klorofil, karoten, dan xantofil. Morfologi alga merah sangat beragam dan sering dijumpai pada daerah tropis. Salah satu contoh jenis alga merah yang sangat dominan ditemukan di daerah tropis adalah genus *Eucheuma* dan *Gracillaria*. Alga merah ditemukan 98% di perairan laut dengan jumlah spesies sekitar 9.000 jenis (Kasim, 2016).



Gambar 1. *Eucheuma spinosum* (Msuya, 2011)

Menurut Berhimpon (2001), klasifikasi Alga merah *Eucheuma spinosum* adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Divisi : Rhodophyta
Kelas : Rhodophyceae

Sub Kelas : Florideae
Ordo : Gigartinales
Famili : Soliriaceae
Genus : *Eucheuma*
Spesies : *Eucheuma spinosum*

Eucheuma spinosu disebut agar-agar oleh masyarakat Sulawesi Selatan. Ciri-ciri alga jenis ini adalah memiliki *thallus* silindris dengan percabangan berujung runcing atau tumpul, dan ditumbuhi nodulus atau tonjolan-tonjolan berupa duri lunak yang tersusun berputar dan teratur mengelilingi cabang. Jaringan tengah yang terdiri dari filamen tidak berwarna serta dikelilingi oleh sel-sel besar, lapisan korteks, dan lapisan epidermis. Pembelahan sel terjadi pada bagian apikal *thallus* (Anggadiredja dkk., 2009).

Eucheuma spinosum tumbuh melekat pada terumbu karang, batu karang, batuan, benda keras, dan cangkang kerang. *Eucheuma spinosum* memerlukan sinar matahari untuk melakukan proses fotosintesis sehingga hanya hidup pada lapisan fotik (Anggadiredja dkk., 2009).

2.2 Bakteri Simbion Alga

Beberapa bakteri dapat hidup bersimbiosis dalam kehidupannya dengan organisme lain, salah satunya adalah rumput laut. Bakteri berada pada alga laut dan bersimbiosis dikarenakan pada dinding sel alga laut terdapat nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri berupa bahan organik fosfor, sulfur, karbon, nitrogen, dan unsur-unsur lainnya (Egan dkk., 2013). Oleh karena itu, bakteri simbion adalah bakteri yang hidup

menetap pada suatu inang yang biasanya menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti inangnya (Peres-Matos dkk., 2007).

Hasil eksplorasi metabolit bioaktif bakteri laut merupakan salah satu sumber potensial bahan baku obat. Berdasarkan cara hidupnya, bakteri penghasil metabolit bioaktif dapat berasal dari bakteri yang hidup bebas, bakteri laut yang terdapat pada suatu sedimen, bakteri yang bertautan dengan permukaan alga, atau bakteri yang bertautan dengan invertebrata. Bakteri yang hidup berikatan dengan partikel tertentu menghasilkan metabolit bioaktif 5-10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri yang hidup bebas (Long dan Azam, 2001).

Keberadaan bakteri simbiosis umumnya untuk melindungi biota yang ditumpanginya dan dirinya dengan menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan golongan senyawa dengan struktur bervariasi dan khas untuk setiap organisme, memiliki berat molekul relatif kecil, ditemukan dalam jumlah kecil yang berfungsi untuk pertahanan diri organisme, melawan penyakit, pertumbuhan, atau hormon (Funtty, 2015).

Pemanfaatan metabolit sekunder pada alga, misalnya sebagai bahan bioaktif dapat menyebabkan kepunahan jenis-jenis alga tertentu. Hal ini disebabkan jumlah alga yang digunakan untuk mendapatkan metabolit sekundernya sangat banyak. Oleh karena itu, pemanfaatan bakteri simbiosis alga adalah salah satu solusi yang paling baik dalam mengeksploitasi bahan bioaktif yang dihasilkan akibat simbiosis antara bakteri dan alga merah (Nurhaedar, 2008).

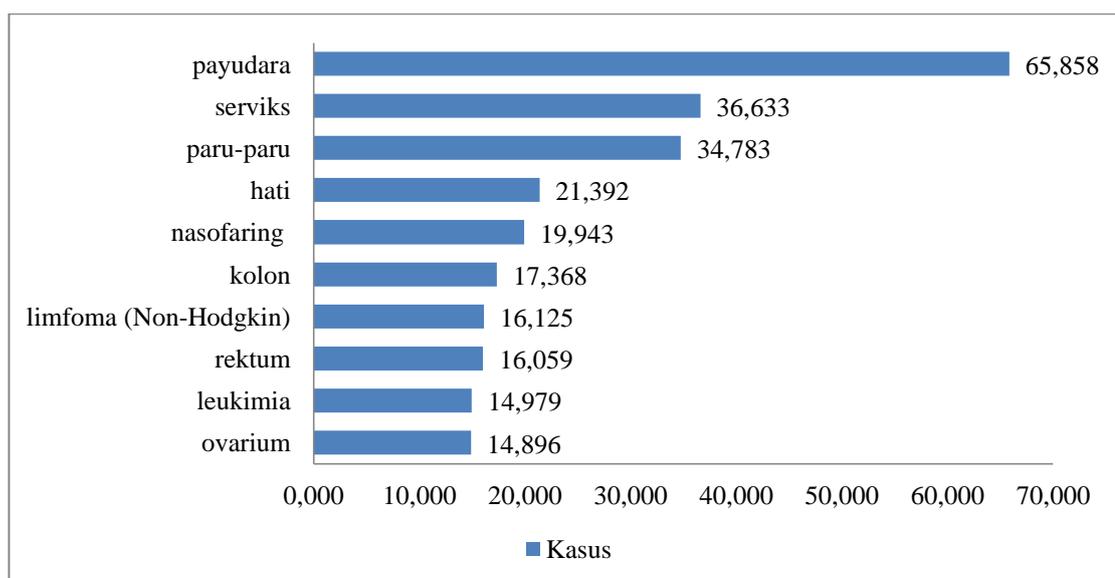
Menurut Proksch dkk., (2003), bakteri simbiosis identik dengan inangnya, sehingga memungkinkan bakteri simbiosis alga laut *Eucheuma spinosum* memiliki kemampuan yang sama dengan ekstrak kasarnya dari sel inangnya. Bakteri simbiosis lebih efektif digunakan dibandingkan dengan mengekstrak kasar alga laut

karena mudah dikultur di laboratorium sehingga dapat menghindari penggunaan bahan alam yang berlebihan agar terhindar dari kepunahan populasi alga laut.

2.3 Kanker

Kanker merupakan masalah utama dalam kesehatan di seluruh negara di dunia. Kanker adalah salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia. Jumlah kasus baru diperkirakan akan meningkat sekitar 70% selama dua dekade berikutnya (Fridlender dkk., 2015).

Kanker merupakan penyebab kematian urutan ke-6 di Indonesia. Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker terbanyak di Indonesia. Menurut data *Global of Cancer Study* (Globocan) dari *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2020 mencatat bahwa total kasus kanker payudara sebesar 65.858 kasus atau 16,6% dari total 396.914 kasus kanker. Kanker serviks menempati urutan kedua dengan jumlah 36.633 kasus atau 9,2% dari total kasus kanker. Menyusul kanker paru-paru, hati, dan nasofaring dengan jumlah masing-masing 34.783 kasus, 21.392 kasus dan 19.943 kasus (Gambar 2).



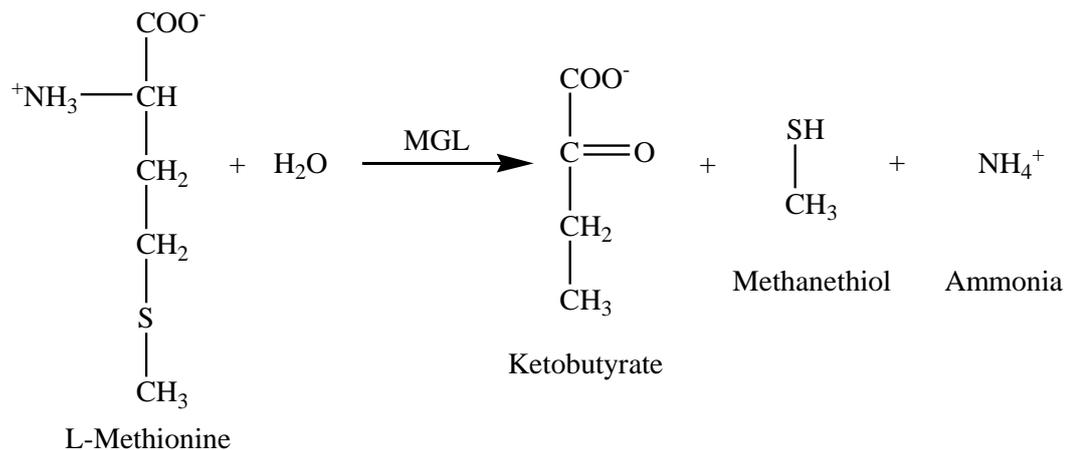
Gambar 2. Data kasus penyakit kanker di Indonesia berdasarkan data Globocan dari WHO (2020)

Beberapa usaha pengobatan terhadap kanker telah dilakukan secara intensif, yaitu dengan pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi, namun belum mampu secara efektif menanggulangi kanker. Pengobatan dengan cara-cara tersebut cukup menolong penderita kanker yang terdeteksi dini dan belum mengalami metastasis (Ganiswarna, 1995).

Secara umum, penyebab kanker dapat dibagi dalam tiga kategori, yaitu karsinogen fisik (radiasi sinar UV dan radiasi ionisasi), karsinogen kimiawi (asap tembakau dan asbestos) dan karsinogen biologis (virus, bakteri, parasit) (PCC, 2013). Kanker juga dapat disebabkan karena pola hidup yang tidak sehat. Hampir separuh dari kanker yang terdiagnosis setiap tahun disebabkan oleh gaya hidup yang tidak sehat. Pencetus kanker dapat berasal dari makanan yang kaya akan gula buatan, karbohidrat olahan, pengawet, produk sampingan dari hasil penggorengan (minyak jelantah), mengandung banyak lemak, asupan antioksidan yang kurang, dan minuman yang mengandung bahan kimia (minuman beralkohol). Penyebab kanker juga bisa timbul karena kondisi kejiwaan yang tidak stabil dan faktor keturunan (Magdalena, 2014).

2.4 Enzim L-Metioninase

L-metioninase (metionin γ -liase) adalah enzim yang bergantung pada piridoksal fosfat (PLP) yang mengkatalisis konversi langsung L-metionin menjadi methanethiol, α -ketobutyrate dan ammonia (Tanaka dkk., 1985). Reaksinya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi Hidrolisis L-metionin yang dikatalisis oleh Metionin gamma liase (Sharma dkk., 2014)

L-metioninase telah dilaporkan terdapat dalam filtrat kultur dari beberapa ragi termasuk *Geotrichum candidum*, *Debaromyces hasenii*, dan *Saccharomyces cereviceae*, namun, L-metioninase tidak ada dalam sel mamalia (Sharma dkk., 2014). Mengenai sifatnya, L-metioninase dicirikan dari banyak spesies bakteri sebagai enzim intraseluler dan dari spesies jamur sebagai enzim intraseluler dan ekstraseluler (Tanaka dkk., 1976). Potensi sumber isolasi enzim L-metioninase γ -lyase dari sumber bakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Potensi sumber isolasi L-metionin γ -lyase

| Sumber | Contoh | Referensi |
|---------|--|---------------------|
| Bakteri | <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Citobacter intermedius</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Providencia</i> dan <i>Clostridium sporogenes</i> | Alshehri, 2020 |
| | <i>Aliccaligenes</i> sp. <i>Achromobacter</i> sp. | Mohkam dkk. 2020 |
| | <i>Citrobacter freundii</i> | Manukhov dkk., 2006 |
| | <i>Pseudomonas putida</i> | Hu dan Cheung, 2010 |

| | | |
|--|--|---------------------|
| | <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium glutamicum</i> dan <i>Staphylococcus equorum</i> | Bonnarme dkk., 2000 |
|--|--|---------------------|

L-metioninase memiliki peran utama dalam industri makanan dengan memberikan aroma khas pada banyak makanan ppfermentasi tradisional termasuk keju melalui degradasi L-metionin yang melepaskan senyawa sulfur volatil. Paling umumnya senyawa sulfur volatil ditemukan dalam keju adalah methanethiol yang berasal dari degradasi enzimatik asam amino metionin yang hadir dalam dadih keju (Khalaf dan El-sayed, 2009). Disisi lain, lebih banyak perhatian telah diberikan pada L-metioninase sebagai antikanker yang kuat terhadap berbagai jenis sel tumor payudara, paru-paru, usus besar, ginjal, dan glioblastoma (Tan dkk., 1998).

Banyak peneliti melaporkan ketergantungan penuh sel tumor pada L-metionin untuk proliferasi, sedangkan sel-sel normal yang tidak bergantung pada metionin, sel kanker bertahan dibawah penipisan metionin. Akibatnya metionin adalah target spesifik tumor utama untuk teknik terapeutik. Jadi, eksploitasi terapeutik L-metioninase untuk menguras metionin plasma telah diselidiki secara ekstensif. Selain itu, distribusi terbatas L-metioninase sebagai enzim intraseluler di antara semua mikroba patogen tetapi tidak pada manusia membuat enzim ini menjadi target obat yang menjanjikan untuk terapi antibakteri, antijamur, dan anti-protozoa (Sato dan Nozaki, 2009).

2.5 Uji Identifikasi Bakteri

2.5.1 Uji Morfologi Bakteri

Uji morfologi bakteri dilakukan dengan cara pengamatan makroskopis bakteri yang dimulai dari sterillisasi alat dan bahan, pembuatan media biakan

bakteri, pemurnian bakteri, dan pengamatan makroskopis langsung (Fitri dan Yasmin, 2011).

2.5.2 Uji Fisiologis Bakteri (Pewarnaan Gram)

Uji fisiologis bakteri dilakukan dengan metode pewarnaan Gram. Pembuatan preparat dengan metode pewarnaan gram dilakukan melalui dua tahap yaitu membuat biakan bakteri dan melakukan pewarnaan Gram terhadap isolat bakteri (Fitri dan Yasmin, 2011).

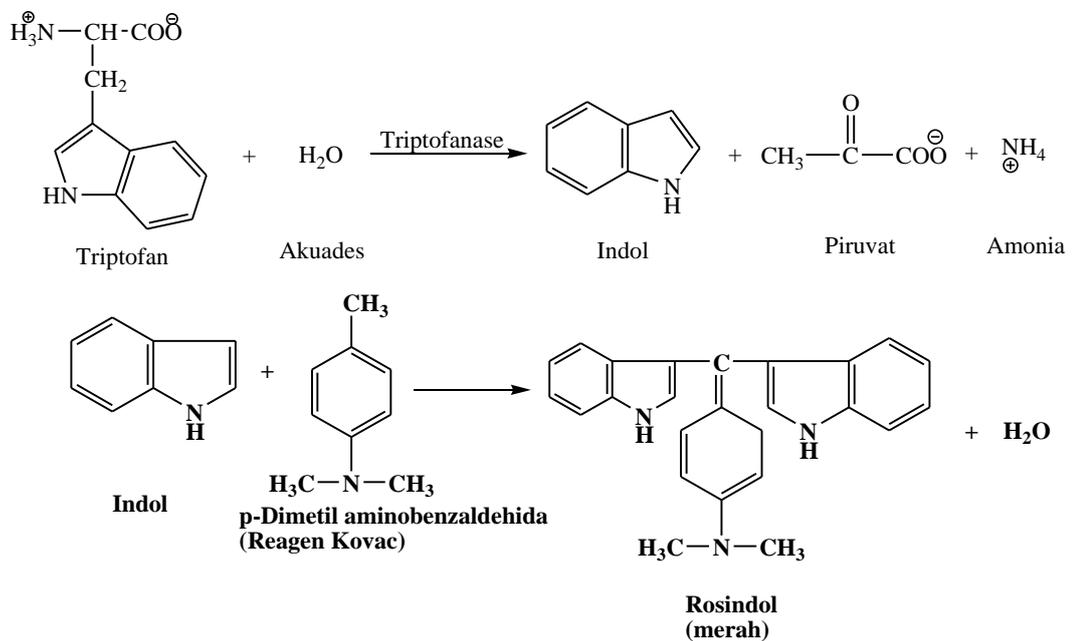
2.5.3 Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat fisiologis koloni bakteri hasil isolasi. Biokimia bakteri berkaitan dengan proses metabolisme sel bakteri. Identifikasi bakteri tidak dapat dilakukan dengan mengetahui sifat morfologinya saja, namun harus mengetahui sifat fisiologis bakteri juga. Sifat fisiologis bakteri sangat penting diketahui apabila melakukan identifikasi bakteri karena sifat morfologis bakteri dapat tampak serupa bahkan tidak dikenal sehingga dengan melakukan uji biokimia terhadap koloni bakteri dapat mengetahui sifat dan menentukan spesies bakteri (Handayani dkk., 2013).

a. Uji Indol

Uji indol berfungsi untuk mengetahui apakah bakteri memiliki enzim triptopanase sehingga bakteri tersebut mampu mengoksidasi asam amino triptopan membentuk indol. Adanya indol dapat diketahui dengan penambahan reagen Ehrlich/Kovac's yang berisi paradimetil amino bensaldehid. Hasil uji indol dapat diketahui negatif (-) ditandai dengan tidak adanya bentukan berwarna merah seperti lapisan cincin di permukaan biakan. Apabila positif (+) ditandai dengan

adanya bentukan berwarna merah seperti lapisan cincin di permukaan biakan bakteri, dapat diartikan bahwa sumber karbon berasal dari triptopan yang membentuk indol (Lumantouw dkk., 2013). Berikut reaksi hidrolisis triptofan dan uji indol. Bakteri yang menghasilkan reaksi positif pada penambahan reagen Kovac mengandung HCl, n-amil alkohol dan p-dimetilaminobenzaldehida kedalam media SIM, maka p-dimetilaminobenzaldehida akan bereaksi dengan indol, menghasilkan senyawa Quinoidal merah (Mahmudah dkk., 2016).

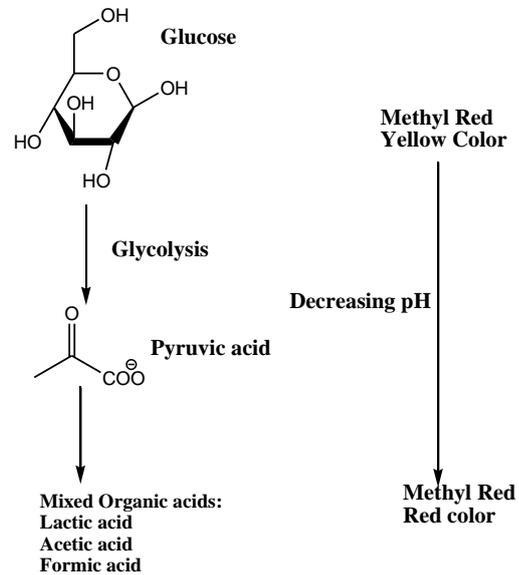


Gambar 4. Reaksi hidrolisis triptofan dan uji indol (Mahmudah dkk., 2016)

b. Uji *Methyl Red* (MR)

Uji MR berfungsi untuk mengetahui ada tidaknya fermentasi asam campuran (metilen glikon) pada koloni bakteri. Hasil uji MR dapat diketahui negatif (-) ditandai dengan setelah penambahan *methyl red*, media tidak mengalami perubahan warna menjadi merah. Apabila positif (+) ditandai dengan setelah penambahan *methyl red*, media mengalami perubahan warna menjadi merah, dapat diartikan bahwa asam campuran (metilen glikon) dihasilkan oleh

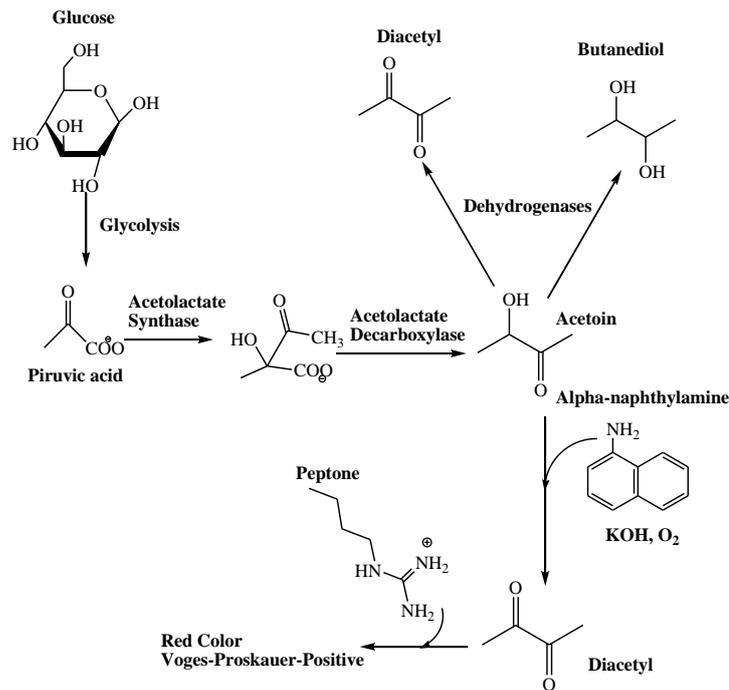
bakteri melalui proses fermentasi glukosa pada media *methyl red* (Rahayu dan Gumilar, 2017).



Gambar 5. Reaksi uji metil merah (Kusuma, 2009)

c. Uji Voges-Prokauer (VP)

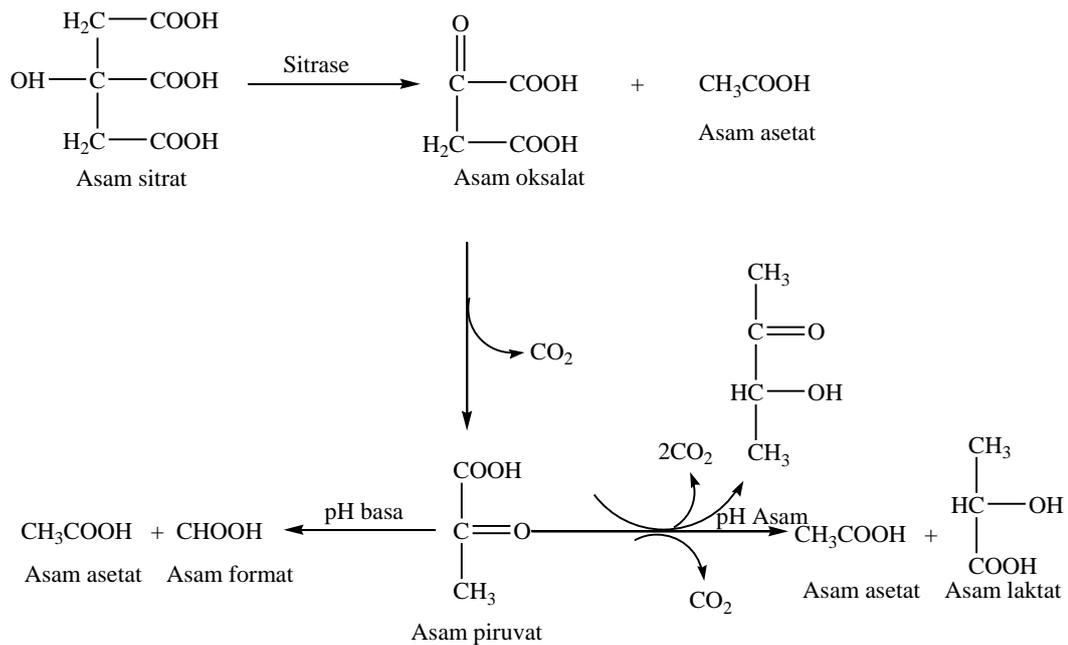
Uji VP berfungsi untuk mengetahui hasil fermentasi glukosa membentuk (asetoin) asetil metil karbinol. Hasil uji VP dapat diketahui negatif (-) ditandai dengan setelah media ditambahkan reagen α -naphthol dan KOH tidak mengalami perubahan warna menjadi merah. Apabila positif (+) ditandai dengan setelah media ditambahkan reagen α -naphthol dan KOH mengalami perubahan warna menjadi merah, dapat diartikan bahwa hasil fermentasi glukosa dapat membentuk (asetoin) asetil metil karbinol (Antriana, 2014).



Gambar 6. Reaksi uji Voges-Proskauer (Kusuma, 2009)

d. Uji Sitrat

Uji sitrat berfungsi untuk mengetahui sumber karbon bakteri menggunakan sitrat atau tidak menggunakan sitrat. Hasil uji sitrat dapat diketahui negatif (-) ditandai dengan media bakteri tidak mengalami perubahan warna dari hijau menjadi warna biru. Apabila positif (+) ditandai dengan media bakteri mengalami perubahan warna dari hijau menjadi biru, dapat diartikan bahwa salah satu sumber karbon bakteri menggunakan sitrat (Ummamie, 2017).



Gambar 7. Reaksi uji sitrat (Kusuma, 2009)

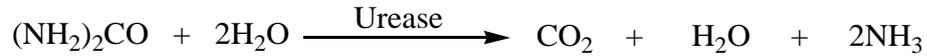
e. Uji Motilitas

Uji motilitas berfungsi untuk mengetahui gerak. Hasil uji motilitas dapat diketahui negatif (-) ditandai dengan pada bekas tusukan inokulasi saja terdapat bentukan warna putih seperti akar yang menyebar. Apabila positif (+) ditandai dengan disekitar inokulasi terdapat bentukan warna putih seperti akar yang menyebar, dapat diartikan bahwa bakteri yang diinokulasi memiliki flagel sehingga dapat melakukan pergerakan (Handayani dkk., 2013).

f. Uji Urease

Uji urease berfungsi untuk mengetahui kandungan enzim urease pada bakteri sehingga dapat menguraikan urea membentuk amoniak. Hasil uji urease dapat diketahui negatif (-) ditandai dengan pada media tidak mengalami perubahan warna menjadi warna merah jambu atau pink. Apabila positif (+) ditandai dengan pada media mengalami perubahan warna menjadi warna merah jambu atau pink, dapat diartikan bahwa bakteri memiliki enzim urease sehingga

dapat memecah urea membentuk amoniak (Antriana, 2014). Berikut reaksi hidrolisis urea.



Gambar 8. Reaksi hidrolisis urea (Mahmudah dkk., 2016)

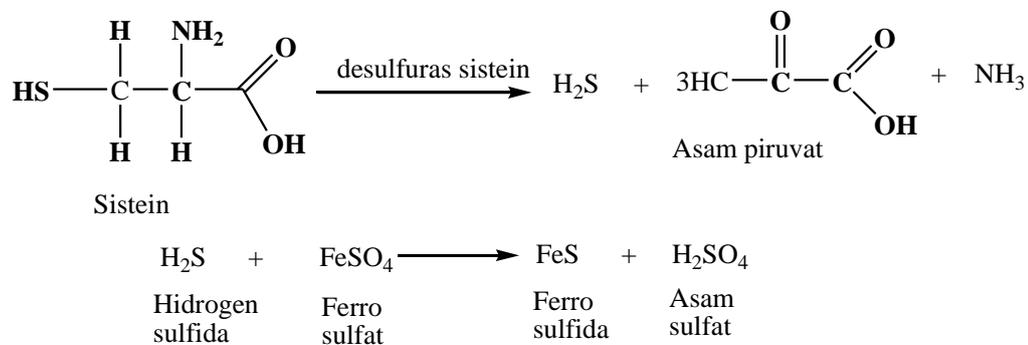
g. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, dan sukrosa). Hasil uji TSIA dapat diketahui bakteri dapat memfermentasi glukosa saja ditandai dengan warna kuning (asam) pada dasar media dan berwarna merah pada lereng (basa) Alk/A atau Alkali/*Acid*. Apabila bakteri dapat memfermentasi semua karbohidrat ditandai dengan warna kuning pada dasar media (asam) dan berwarna kuning juga pada lereng media (asam) A/A atau *Acid/Acid*. Apabila bakteri tidak dapat memfermentasi semua karbohidrat ditandai dengan warna merah pada dasar media (basa) dan berwarna merah juga pada lereng media (basa) Alk/Alk atau Alkali/Alkali (Anggraini dkk., 2016).

h. Uji Produksi H₂S dan Gas

Uji H₂S adalah uji biokimia yang digunakan untuk mendekteksi kemampuan bakteri dalam menghasilkan gas H₂S. Beberapa bakteri dapat mereduksi senyawa yang mengandung sulfur menjadi hidrogen sulfida dan memperoleh energi selama proses tersebut. Senyawa yang mengandung sulfur dapat berupa senyawa anorganik seperti sulfat, sulfit, tiosulfat atau dapat berupa senyawa organik yang mengandung sulfur seperti asam amino atau bahkan unsur sulfur itu sendiri. Sulfur dari senyawa-senyawa tersebut direduksi secara

enzimatis dan dibebaskan sebagai gas hidrogen sulfida (H_2S) (Aryal, 2023). Hasil positif menandakan bahwa isolat bakteri tidak menghasilkan desulfurase sewaktu dibiakkan dalam media yang kaya akan asam amino yang mengandung sulfur yang akan membentuk H_2S yang bereaksi dengan Fe^{2+} pada media biakan menghasilkan FeS yang berwarna hitam dan tidak larut dalam air (Mahmudah dkk. 2016). Reaksi dengan salah satu asam amino yang mengandung sulfur (sistein) dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Reaksi uji hidrogen sulfida (Mahmudah dkk., 2016)

2.6 Uji Aktivitas Antikanker

Pengujian aktivitas antikanker dapat diperiksa secara *in vitro* dan *in vivo*. *In vitro* adalah uji aktivitas yang dilakukan di luar sel seperti membuat atau menghidupkan sel line dalam kultur jaringan. Salah satu skrining awal senyawa yang berpotensi dikembangkan sebagai senyawa antikanker adalah dengan metode BSLT dengan mempergunakan larva udang dengan melihat atau mengukur LC_{50} . Hal ini pertama kali dikembangkan oleh Meyer dan kawan-kawan, hasil penelitiannya menunjukkan bahwa 7 dari sembilan sampel yang positif agen antikanker ($\text{LC}_{50} < 1000$ ppm) ternyata positif menghambat pertumbuhan sel line kanker (Parwata, 2014).

Uji sitotoksitas adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetik, zat tambahan makanan, pestisida dan digunakan juga untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel tumor secara *in vitro* dan juga dapat bersifat toksik pada sel normal yang berproliferasi cepat. Jika toksisitas ini ditransfer menembus sel tumor *in vivo*, senyawa tersebut mempunyai aktivitas antitumor (Freshney, 2000).

Metode *in vitro* memberikan berbagai keuntungan, seperti: dapat digunakan pada langkah awal pengembangan obat, hanya membutuhkan sejumlah kecil bahan yang digunakan untuk kultur sel primer manusia dari berbagai organ target (ginjal, liver, kulit) serta dapat memberikan informasi secara langsung efek potensial pada sel target manusia. Akhir dari uji sitotoksitas pada organ target memberikan informasi tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle dkk., 2000).

Uji toksisitas merupakan metode uji yang digunakan untuk mengetahui tingkat toksik dari suatu senyawa yang ditentukan dalam waktu singkat setelah pemberian suatu sediaan. Uji toksisitas dengan metode BSLT ini memiliki spektrum aktifitas farmakologi yang luas, prosedurnya sederhana, cepat dan tidak membutuhkan biaya yang besar, serta hasilnya dapat dipercaya. Selain itu, metode ini sering dikaitkan sebagai acuan atau landasan dalam pengujian antikanker. Berdasarkan alasan-alasan tersebut, maka uji ini sangat tepat digunakan dalam penelitian bahan alam (Krishnaraju dkk., 2006).

Uji BSLT telah dilakukan sejak 1956 untuk pengamatan toksisitas senyawa bahan alam. Uji toksisitas menggunakan larva udang merupakan uji penapisan senyawa bioaktif tahap awal dan rangkaian uji toksisitas awal untuk mendapatkan dosis aman untuk manusia. Kelebihan metode BSLT adalah cepat,

sederhana, murah, serta memenuhi kebutuhan data statistik dengan menggunakan sedikit sampel (Meyer dkk., 1982).

Uji toksisitas dengan metode BSLT didasarkan pada kemampuan senyawa yang dapat mematikan larva udang. Metode BSLT ditentukan tingkat toksisitasnya berdasarkan nilai LC_{50} setelah penelitian dilakukan selama 24 jam. Metode tersebut merupakan metode murah, sederhana, dan relatif cepat untuk menentukan efeknya (McLaughlin, 1998).