



Studi ketoksikan dinoflagelata spesies *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) Schiller (Pavillard)

Rozirwan^a dan Gires Usup^b

^a Program Studi Ilmu Kelautan FMIPA Universitas Sriwijaya, Indralaya, Indonesia

^b Program Sains Laut FST Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia

Received 02 February 2010; received in revised form 10 June 2010; accepted 21 June 2010

ABSTRACTS

This study was carried out to determine the toxicity of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* species that formed massive blooms in Lido Beach, Johor Bahru in July 2002. Clone cultures were established in ES-DK medium at 26° C under a 14:10 hour light dark cycle. Species toxicity was determined by intra peritoneal (i.p.) injection of culture extract into mice. Cultured cell extracts were toxic to mice. The major symptoms were muscular paralysis and diarrhea. However no mouse mortality was observed even after 13 hours. Extracts of cultured cells were also hemolytic on rabbit red blood cells.

Keywords: Dinoflagellate, HAB, *Prorocentrum minimum*, Red Tide dan Toxicity

ABSTRAK

Kajian dilakukan untuk menentukan ketoksikan dinoflagelata spesies *Prorocentrum minimum* yang menyebabkan kejadian pasang merah besar-besaran di perairan Pantai Lido, Johor Bahru pada Juli tahun 2002. Kultur klon telah dibuat dalam medium ES-DK pada suhu 26° C dan siklus pencahayaan 14:10 jam terang gelap. Ketoksikan spesies diuji dengan penyuntikan ekstrak kultur secara intra peritoneal (i.p.) terhadap tikus. Hasil pengamatan menunjukkan ekstrak sel yang dikultur memberikan pengaruh racun kepada tikus. Gejala utama adalah kejang otot dan menceret/diare. Walau bagaimanapun tidak didapati tikus yang mati setelah dilakukan pengamatan selama 13 jam. Ekstrak toksin spesies ini juga menunjukkan pengaruh hemolitik terhadap eritrosit kelinci.

Kata kunci: Dinoflagellata, HAB, *Prorocentrum minimum*, Red Tide dan Toxicity

I. PENDAHULUAN

Fenomena ledakan populasi alga secara besar-besaran di kawasan perairan Pantai Lido, Johor Bahru pada Juli 2002 adalah disebabkan oleh dinoflagelat *Prorocentrum minimum*. Pada kejadian tersebut kepadatan *P. minimum* mencapai 200.000 sel L⁻¹. Tangen (1979) melaporkan kepadatan 1.8x10⁶ sel L⁻¹ semasa bloom *P. minimum* di Oslofjord, manakala Witek et al. (2000) menunjukkan semasa kejadian pasang merah (red tides) yang disebabkan *P. minimum* pada tahun 1997 di

Teluk Gdansk, Poland kepadatan sel mencapai 350 juta sel L⁻¹. Spesies ini adalah spesies kosmopolitan khususnya di kawasan muara.

Spesies *P. minimum* telah dinyatakan juga menghasilkan toksik yang dapat mengancam kesehatan manusia dan membunuh ikan-ikan (Denardou-Queneherve 1999; Grzebyk et al. 1997; Okaichi & Imatomi 1979; dan Shimsizu 1987). Toksin tersebut dinamakan *Venerupin*. Ekstrak sel *P. minimum* yang dilaporkan mempunyai aktivitas hemolitik yang kuat. Sejauh ini kajian ketoksikan *P. minimum* dari Malaysia belum pernah dilakukan.

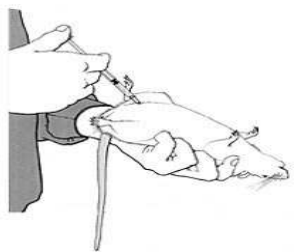
Kejadian ledakan populasi spesies tersebut kemungkinan akan mendatangkan masalah kepada hidupan laut dan/atau manusia sekiranya, karena spesies dapat menghasilkan toksin. Untuk itu perlu dilakukan uji dalam menentukan aktivitas bioaktif *P. minimum*.

II. BAHAN DAN METODE

Kultur untuk uji ketoksikan dilakukan dalam elemeyer satu liter. Sel-sel dituai pada fasa eksponensial dengan dengan centrifuge pada kecepatan 5000 rpm selama lima menit. Supernatant dibuang dan pelet sel ditambahkan metanol 100% dengan perbandinga 3:1 (vol). Sel dipecahkan dengan sonikasi selama 2-3 menit. Setelah itu, sel centrifuge untuk mendapatkan supernatant. Setiap kultur diproses secara triplikat.

Untuk biossay tikus, toksin diekstrak dalam metanol merujuk metode Yasumoto et al. (1987). Metanol dikeringkan dalam rotovapor untuk mendapatkan residu. Kemudian dilarutkan residu dengan larutan 1% Tween 60 dalam penimbal/Bafer Pofat Salin (PBS). Ekstrak toksin tersebut disimpan pada suhu -20° C.

Ekstrak toksin dicairkan 1x, 2x dan 10x dengan larutan 1% Twen 60 dalam PBS. Sebanyak satu mL ekstrak disuntikan kepada tikus secara *intra peritoneal* (i.p.) (Gambar 1). Setiap pencairan ekstrak disuntik ke dalam dua ekor tikus. Tikus yang digunakan adalah tikus jantan strain BALB/C yang mempunyai berat badan sekitar 20 gram, berumur 30-40 hari. Simptom-simptom yang terdapat pada tikus diamati selama 24 jam mengikut Denardou-Queneherve (1999) (Tabel 1).



Gbr 1. Penyuntikan ekstrak kepada tikus secara *intra peritoneal* (i.p.)

Tabel 1. Skala simptom-simptom yang digunakan bagi menilai aktivitas ekstrak terhadap tikus dalam Unit Tikus (MU).

Unit Tikus (MU)	Obserpasi Simptom-simptom
0	Normal, tidak nampak tanda-tanda keracunan
1	Tingkahtaku tidak normal
2	Mempunyai sifat tertekan yang lemah
3	Sifat tertekan yang tinggi
4	Ketahanan hidup lebih dari 1 jam
5	Mati cepat, kurang dari 1 jam

Aktivitas tikus untuk suatu ekstrak ditentukan dengan formula Denardou-Queneherve (1999):

$$Am = (B/V) \times (C/20 \text{ g})$$

dimana:

Am = Aktivitas tikus (MU L⁻¹);

B = Pengaruh (MU);

V = volume suntikan (L);

C = Berat tikus (g);

2.3 Uji Hemolitik

Untuk ujian hemolitik dua jenis ekstrak disediakan, yaitu ekstrak yang larut dalam air dan ekstrak yang larut dalam organik. Kultur pada fasa eksponensial dituai dan dicentrifuge pada kecepatan 5000 rpm selama lima menit. Pelet sel dibilas dua kali dengan air suling. Untuk ekstrak air, pelet sel dicampur larutan PBS dengan perbandingan 1:1 (vol) dan disonikit selama tiga menit di atas es. Setelah sel dicampurkan, centrifuge pada kecepatan 5000 rpm selama lima menit. Supernatant diambil dan disimpan pada 4° C. Untuk ekstak larut organik, pelet sel yang telah dibilas dengan ddH₂O ditambahkan metanol 100% dengan nisbi 1:3 (vol) dan disonikat selama tiga menit. Kemudian centrifuge pada kecepatan 5000 rpm selama lima menit untuk memisahkan pelet dan supernatant. Supernatan dan dikeringkan dengan menggunakan rotovapor. Residu yang terhasil ditimbang dan dilarutkan dalam PBS dengan nisbi 1:1 (vol).

Uji hemolitik terhadap darah kelinci dilakukan mengikuti metode Bernheimer (1988). Darah kelinci ternyata fibrin dibilas hingga bersih dengan menggunakan larutan PBS pada kecepatan 2500 rpm selama lima menit pada suhu 4° C. Eritrosit kemudian dilarutkan dalam PBS pada kepekatan 2% (vol). Ekstrak *P. minimum* dilakukan pencairan (25%, 50%, 75% dan 100%). Larutan ekstrak kemudian ditambahkan pada larutan eritrosit pada nisbi 1:4 (vol). Campuran dieram pada suhu kamar selama 30 menit dan serapan dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm. Setiap ekstrak diuji secara triplikat. Aktivitas hemolitik ekstrak dibandingkan dengan larutan standar saponin.

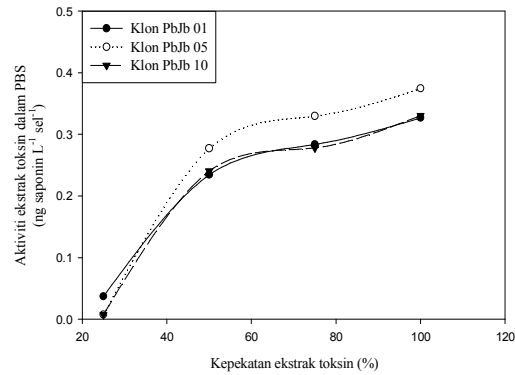
III. HASIL DAN DISKUSI

Tabel 2. menunjukkan ekstrak *P. minimum* bersifat toksik terhadap tikus dengan nilai aktivitas toksin 2.831-9.095 MU L⁻¹ pada pencairan 1, 2 dan 10 kali. Simptom-simptom yang nyata adalah kejang otot dan diare. Walau bagaimanapun tidak ada kematian tikus diperoleh setelah pengamatan selama 13 jam.

Tabel 2. Ketoksikan kultur sel *P. minimum* dalam Unit Tikus. Nilai adalah rata-rata untuk tiga sampel.

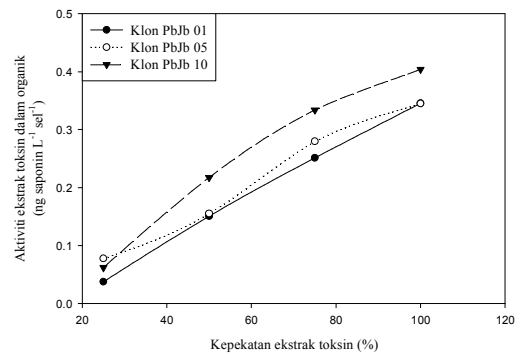
Pencairan ekstrak (ml)	Berat tikus (g)	Unit tikus (MU)	Aktivitas toksin pada tikus (MU L ⁻¹)
1 ml	19.36	3	2.904
(tiada pencairan)	18.87	3	2.831
0.5 mL (2 X)	17.78	2	5.334
0.1 mL (10 X)	18.19	1	9.095
	17.77	1	8.885

Ekstrak toksin ketiga-tiga sampel dalam PBS menunjukkan pengaruh hemolitik pada eritrosit kelinci. Aktivitas ekstrak toksin adalah pada kisaran 0.33-0.37 ng saponin L⁻¹ sel⁻¹ (Gambar 2).



Gbr 2. Aktivitas ekstrak toksin larut dalam larutan PBS dibandingkan dengan aktivitas saponin.

Aktivitas hemolitik juga diperoleh dari ekstrak dalam pelarut organik (Gambar 3). Aktivitas ekstrak toksin yang diperoleh adalah pada kisaran 0.34-0.40 ng saponin L⁻¹ sel⁻¹.



Gbr 3. Aktivitas ekstrak toksin larut dalam pelarut organik dibandingkan dengan aktivitas saponin.

Hasil pengamatan di lokasi persampelan menunjukkan kematian ikan, tetapi tidak ada kasus keracunan kerang-kerangan pada manusia dilaporkan. Ini berbeda dengan kejadian bloom spesies lain seperti *Pyrodinium bahamense* dan *Alexandrium minutum* yang menyebabkan kerang menjadi toksik (Usup et al. 2002). Namun kematian ikan besar-besaran di perairan Filipina Utara Januari hingga

Februari 2002 telah dikaitkan dengan ledakan *P. minimum*. Ledakan spesies tersebut menyebabkan rendahnya DO perairan yang mencapai 1.95-2.25 mg L⁻¹ (Azanza et al. 2005). Ikan mati di lokasi persampelan semasa kejadian ledakan *P. minimum* menunjukkan bahawa kandungan DO yang sangat bervariasi sehingga kejadian ikan mati tersebut mungkin terjadi disaat DO pada tingkat terendah.

Hasil uji bioassay tikus menunjukkan spesies *P. minimum* adalah bersifat toksik. Simtom-simtom yang ditunjukkan oleh tikus adalah kejang-kejang dan diare. Pengaruh tersebut berkurangan apabila ekstrak dicairkan. Walau bagaimanapun kepekatan maksimum ekstrak toksin yang disuntik kepada tikus tidak menyebabkan kematian. Hasil uji ketoksikan pada penelitian ini mempunyai perbezaan dengan kasus kematian manusia akibat keracunan kerang-kerangan yang disebabkan *P. minimum* yang dilaporkan di Jepang dan Mexico (Nakazima 1968; dan Okaichi & Imatomi 1979).

Merujuk penelitian Nakazima (1968), *P. minimum* dapat menyebabkan keracunan *venerupin shellfish poisoning* (VSP), yang dapat menyebabkan keracunan sistem gastrointestinal pada manusia. Kasus kematian manusia yang disebabkan *venerupin* telah dilaporkan di Jepang. Sementara Hashimoto (1979), menyatakan terdapat enam kasus keracunan kerang-kerangan pada manusia di Jepang yang mengakibatkan 542 orang keracunan dengan angka kematian 185 orang (34% mati). Okaichi dan Imatomi (1979) telah mencoba mengidentifikasi struktur kimia *venerupin* tetapi gagal.

Toksin yang dihasilkan oleh *P. minimum* masih belum dikenal dengan tepat, walaupun banyak penelitian yang telah dilakukan. Menurut Shimizu (1987), spesies *P. minimum* dapat menghasilkan dua jenis toksin, yaitu hepatotoksin dan toksin DSP. Sedangkan Grzebyk et al. (1997) pula menunjukkan toksin *P. minimum* adalah bersifat polar dan merupakan neurotoksin.

Penelitian yang dilakukan Denardou-Queneherve et al. (1999) menunjukkan pengaruh toksik spesies *P. minimum* dari

perairan Mediterranean tidak menunjukkan kesamaan dengan spesies *P. minimum* dari perairan Jepang. Spesies dari Mediterranean tidak menunjukkan pengaruh toksik pada hepatosit kerang-kerangan yang dikultur. Sedangkan penelitian terhadap larva Diptera menunjukkan toksin *P. minimum* bertindak menghalang saluran-saluran ion kalsium. Sedangkan menurut Hegaret et al. (2004) *P. minimum* dapat merusakkan alat pernafasan kerang-kerangan. Pengaruh yang disebabkan *P. minimum* tersebut 35% lebih tinggi dibandingkan dengan dinoflagelata lain. Manakala Denardou-Queneherve et al. (1999) menunjukkan *P. minimum* dapat menyebabkan keracunan kerang-kerangan secara alami dan dapat menimbulkan risiko pada kesehatan manusia. Hasil berbagai penelitian tersebut ini menunjukkan bahawa ketoksikan isolat *P. minimum* mungkin berbeda mengikut lokasi geografi.

Berdasarkan hasil uji hemolitik menunjukkan pengaruh aktivitas hemolitik baik dalam pelarut PBS maupun organik adalah relatif sama. Kajian Deeds et al. (2002) menunjukkan kultur *P. minimum* yang diisolat dari perairan Maryland dan California bahagian utara tidak mempunyai aktivitas hemolitik. Ini adalah jelas berbeda dengan isolat dari Malaysia.

Pengaruh kejadian pasang merah yang dilaporkan selama ini secara umum dapat mengancam kehidupan organisme laut. Dampak utama adalah pada sektor industri perikanan, walaupun spesies penyebab tersebut tidak bersifat toksik atau mempunyai ketoksikan yang rendah. Kerugian dalam sektor perikanan ini telah terjadi di Filipina Utara pada Januari hingga Februari 2002. kejadian ikan mati secara besar-besaran yang disebabkan ledakan *P. minimum*. Kerugian tersebut mencapai US\$ 120,000 (Azanza et al. 2005). Manakala Morton et al. (2002) menyatakan bahawa spesies ini tidak menghasilkan unsur-unsur bioaktif. Walaupun begitu ledakan spesies ini tetap dapat mengancam kehidupan organisme laut karena menyebabkan kekurangan oksigen terlarut di perairan dan berakibat fatal.

IV. KESIMPULAN

Data awal menunjukkan ekstrak dari *P. minimum* mempunyai pengaruh toksik terhadap tikus. Ekstrak toksin spesies ini juga menunjukkan pengaruh hemolitik terhadap eritrosit kelinci. Jenis toksin belum diketahui dan perlu dilaksanakan penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Azanza, R.V., Fukuyo, Y., Yap, L.G. & Takayama, H. 2005. *Prorocentrum minimum* bloom and its possible link to a massive fish kill in Bolinao, Pangasinan, Northern Philippines. *Harmful Algae* **4**: 519-524
- Bernheimer, A. W. 1988. Assay of hemolytic toxins. *Methods Enzymology* **165**: 213-217.
- Deeds, J.R., Terlizzi, D.E., Adolf, J.E., Stoecker, D.K. & Place, A.R. 2002. Toxicity activity from culture of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae) a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae* **1**: 169-189.
- Denardou-Queneherve, A., Grzebyk, D., Pouchus, Y.P., Sauviat, M.P., Alliot, E., Biard, J.F., Berland, B. & Verbist, J.F. 1999. Toxicity of French strains of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* experimental and natural contaminations of mussels. *Toxicon* **37**: 1711-1719.
- Grzebyk, D., Denardou, A., Berland, B. & Pouchus, Y.F. 1997. Evidence of a new toxin in the red tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Journal of Plankton Research* **19**: 1111-1124.
- Hashimoto, Y. 1979. Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Dlm. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & Cembella, A.D. (pnyt.). *Manual on harmful marine microalgae*, hlm. 486. New York: UNESCO Publishing.
- Hegaret, H. & Wikfors, G.H. 2005. Effects of natural and field-simulated blooms of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* upon hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, from two different populations. *Harmful Algae* **4**: 201-209
- Morton, S.L., Faust, M.A, Fairey, E.A. & Moerller, P.D.R. 2002. Morphology and toxicity of *Prorocentrum arabianum* sp. nov. (Dinophyceae) a toxic planktonic dinoflagellate from the Gulf of Oman, Arabian Sea. *Harmful Algae* **1**: 393-400.
- Nakazima, M., 1968. Studies on the source of shellfish poison in Lake Hamana-IV: Identification and collection of the noxious dinoflagellate. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **34**: 130-132.
- Okaichi, T. & Imatomi, Y. 1979. Toxicity of *Prorocentrum minimum* var. *mariae-lebouriae* assumed to be a causative agent of short-necked clam poisoning. Dlm. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & Cembella, A.D. (pnyt.). *Manual on harmful marine microalgae*, hlm. 486. New York: UNESCO Publishing.
- Shimizu, Y. 1987. Dinoflagellate toxins. Dlm. Witek, B., & Plinski, M. (pnyt.). *The first recorded bloom of Prorocentrum minimum (Pavillard) Schiller in the coastal zone of the Gulf of Gdansk*, hlm. 30. Poland: Oceanologia.
- Tangen, K. 1979. Brown water in the Oslofjord, Norway, in September 1979 caused by the toxic *Prorocentrum minimum* & other dinoflagellates. Dlm. Witek, B., and Plinski, M. (pnyt.). *The first recorded bloom of Prorocentrum minimum (Pavillard) Schiller in the coastal zone of the Gulf of Gdansk*, hlm. 29. Poland: Oceanologia.
- Usup, G., Pin, C.P., Ahmad, A. & Teen, L.P. 2002. *Alexandrium* (Dinophyceae) species in Malaysia waters. *Harmful Algae* **1**: 265-275.
- Witek, B. & Plinski, M. 2000. The first recorded bloom of *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller in the coastal zone of the Gulf of Gdansk. *Oceanologia* **42**(1): 29-36.
- Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y. & Murata, M. 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biol. Bull.* **172**: 128-131.