

UJI TOKSISITAS BEBERAPA TUMBUHAN OBAT INDONESIA DENGAN BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST)

TOXICITY TEST ON SOME INDONESIAN MEDICINAL PLANTS
BY BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST)

Subagus Wahyuono*, Abdul Rachman**

* Lab. Fitokimia, Bag. Biologi Farmasi, Fak. Farmasi, Univ. Gadjah Mada, Yogyakarta

** Fakultas Farmasi, Univ. Airlangga, Surabaya

ABSTRAK

Telah dilakukan uji toksisitas secara terpisah 11 ekstrak tumbuhan obat Indonesia (*Elaeocarpus gramiflorus* J.E. Smith, *Vitex negundo* L., *Leucaena leucocephala* (Lmk) de Witt, *Borreria articularis* (L.f) F.N. Will, *Ardissia humilis* Vahl., *Achyranthus bidentata* L., *Hyptis capitata* Jack., *Gynura procumbens* (Lour.) Merr., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L., dan *Artemisia vulgaris* L.) dengan "Brine Shrimp Lethality Test" (BST) yang sering dikaitkan dengan determinasi aktivitas antikanker. Dari sebelas ekstrak tumbuhan obat tersebut, hanya ekstrak kloroform dari daun *A. squamosa* (LC-50, 1,77 ug/ml) yang potensial untuk dikembangkan penelitian isolasi senyawa aktif.

Kata kunci : Brine Shrimp Lethality Test (BST), Tumbuhan obat Indonesia.

ABSTRACT

A toxicity test was performed on separately 11 extracts of Indonesian medicinal plants (*Elaeocarpus gramiflorus* J.E. Smith, *Vitex negundo* L., *Leucaena leucocephala* (Lmk) de Witt, *Borreria articularis* (L.f) F.N. Will, *Ardissia humilis* Vahl., *Achyranthus bidentata* L., *Hyptis capitata* Jack., *Gynura procumbens* (Lour.) Merr., *Annona squamosa* L., *Annona muricata* L. and *Artemisia vulgaris* L.) by "Brine Shrimp Lethality Test" that is often associated with anticancer activity determination. From the eleven extracts, only the chloroform extract of *A. squamosa* (LC-50, 1.77 ug/ml) was considered to be the most potential for the isolation of the active substances.

Key words : Brine Shrimp Lethality Test (BST), Indonesian medicinal plants.

PENDAHULUAN

Brine shrimp lethality test (BST) merupakan salah satu metode skrining untuk menentukan ketoksikan suatu ekstrak ataupun senyawa. Metode ini juga sering

digunakan untuk *bioassay* dalam usaha mengisolasi senyawa toksik tersebut dari ekstrak. Pertama kali metode ini dipergunakan untuk menentukan keberadaan residu insektisida seperti DDT, Parathion, Dieldrin dll. (Tarpley, 1958; Michael dkk., 1958), dan menentukan potensi senyawa anestetik (Robin, dkk., 1958). Metode ini kemudian berkembang sebagai salah satu metode "bioassay" dalam mengisolasi senyawa aktif yang terdapat dalam suatu ekstrak tanaman, karena metode ini ternyata peka, cepat, sederhana dan dapat diulang tanpa terjadi penyimpangan (Trotter II, dkk., 1983). Lebih jauh lagi bahwa *bioassay* ini sering dikaitkan sebagai metode dalam isolasi senyawa antikanker dari tumbuhan. Untuk membuktikan kebenaran ini, telah dilakukan uji BST terhadap obat antikanker Podofilotoksin dan Adriamisin. Podofilotoksin memberikan LC-50 (2,40 ug/ml) (Meyer, dkk., 1982) dan Adriamisin memberikan LC-50 (0,08 ug/ml) (Gu, dkk., 1995), jauh lebih kecil dibandingkan dengan senyawa selain senyawa antikanker.

Indonesia merupakan salah satu lahan penelitian obat tradisional di dunia, mengingat keanekaragaman nabati di negara tersebut belum sepenuhnya tersentuh. Penelitian ini ditujukan untuk skrining tumbuhan obat Indonesia dengan BST test, dan selanjutnya tumbuhan obat yang menunjukkan aktivitasnya pada uji ini akan dilakukan isolasi senyawa aktifnya dimasa mendatang.

METODOLOGI

Bahan tanaman : *Elaeocarpus gramiflorus* J.E. Smith (1), *Vitex negundo* L. (2), *Leucaena leucecephala* (Lmk) de Witt (3), *Borreria articularis* (L.F) F.N. Will (4), *Ardissia humilis* Vahl. (5), *Achyranthus bidentata* L. (6), *Hyptis capitata* Jack. (7), *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. (8), *Annona squamosa* L. (9), *Annona muricata* L. (10), *Artemisia vulgaris* L. (11). Bahan tanaman 1, 3, 5, 8, 9, 10 dan 11 berupa daun; sedangkan sampel tanaman 2, 4, 6 dan 7 merupakan bagian tanaman di atas tanah. Pemilihan jenis bahan berdasarkan atas penggunaan pada umumnya oleh masyarakat. Tanaman 1-7 dikumpulkan pada bulan September 1995 di Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur dan dideterminasi ditempat yang sama; sedangkan 8-11 dikumpulkan di Yogyakarta pada bulan Agustus 1995 dan dideterminasi di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.

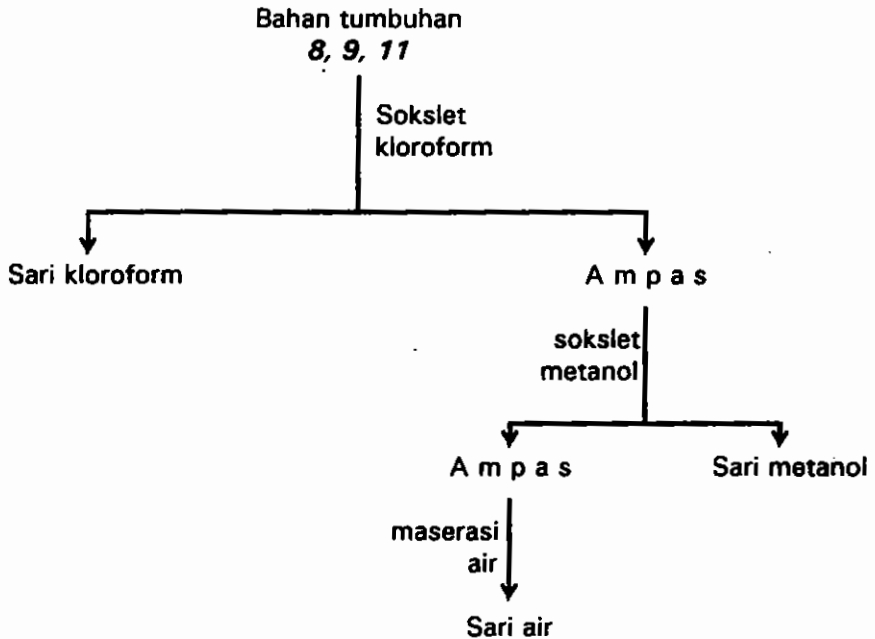
Bahan tumbuhan
1-7 dan 10

maserasi dengan
kloroform:metanol (1:1 v/v)
disaring dan diuapkan
dengan rotavapor

Ekstrak kering
1-7 dan 10

Skema A. Pembuatan ekstrak bahan tumbuhan 1-7 dan 10

Pembuatan ekstrak : Bahan tanaman 1-7 dan 10 kering secara terpisah diserbuk, diayak kemudian \pm 200 gram serbuk dimaserasi beberapa kali dengan campuran kloroform:metanol (1:1, v/v). Maserat yang diperoleh diuapkan dengan rotavapor sehingga diperoleh ekstrak kering (Skema A). Berbeda dengan metoda diatas, maka ekstraksi bahan tanaman 8, 9 dan 11 kering secara terpisah dilakukan seperti pada Skema B. Serbuk 8, 9 dan 11 secara terpisah di sari dalam sokslet dengan kloroform, kemudian ampas disari lagi dalam sokslet dengan metanol, dan ampas yang tersisa dimaserasi dengan air. Penguapan pelarut penyari dalam rotavapor berturut-turut memberi sari kloroform, metanol, dan sari air.



Skema B. Pembuatan ekstrak bahan tumbuhan 8, 9 dan 11

Pembuatan sampel uji : Sampel uji dibuat dengan melarutkan sejumlah tertentu ekstrak kering diatas dalam campuran kloroform:metanol (1:1, v/v) volume tertentu, kemudian sejumlah tertentu dari larutan tersebut dipindahkan dengan mikro pipet ke kertas saring (diameter 4 mm) sehingga diperoleh dosis uji akhir dalam ug/ml air laut dalam vial. Kertas saring dianginkan sampai kering kemudian dimasukkan kedalam vial (4 ml), dan ditambah air laut 1 ml lalu disonikasi selama 2 menit. Setiap sampel dilakukan dengan replikasi sebanyak 5 kali. Dosis sampel uji dibuat sebagai 30 ug/ml dan dosis dapat diturunkan tergantung dari hasil uji yang diperoleh.

Penetasan telur *A. salina* : Penetasan telur dilakukan menurut metoda yang diberikan oleh Meyer, dkk., (1982).

Uji BST : Sepuluh ekor anak udang dalam 2 ml air laut dipindahkan kedalam vial yang telah berisi sampel, sehingga volume akhir dalam vial menjadi 3 ml dan dosis untuk uji BST dihitung sebagai ug/ml. Kemudian 1 tetes suspensi ragi (3 mg ragi *Saccharomyces cerevisiae* S.I Lesaffre 597C3, Marcq France dalam 5 ml air laut) dimasukkan kedalam tiap vial sebagai tambahan makanan, kemudian prosentasi udang yang mati dihitung setelah 24 jam dibandingkan dengan blanko.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bahan tanaman *G. procumbens*, *A. squamosa*, *A. vulgaris* dibuat berbagai ekstrak yang berbeda tingkat polaritasnya yaitu ekstrak kloroform, metanol dan ekstrak air, dengan alasan agar isolasi senyawa aktif akan lebih mengarah. *A. squamosa* dan *A. vulgaris* telah dilaporkan secara tradisional dapat digunakan untuk obat kanker (Hartwell, 1982), sedangkan *G. procumbens* dilaporkan dapat untuk penyembuhan kanker payudara, kanker darah dsb., dan pembuktian yang mengarah ke antikanker telah banyak dilakukan (Siswanto, 1984; Sudarto, 1980; Sugiyanto dkk., 1993).

Tabel I. Hasil uji toksisitas ekstrak tumbuhan obat Indonesia (30 ug/ml) dengan BST

| N a m a t u m b u h a n | | % Kematian setelah 24 jam |
|----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| <i>E. gramiflorus</i> (1) | - ekstrak kloroform:MeOH (1:1, v/v) | 62 |
| <i>V. negundo</i> (2) | - ekstrak kloroform:MeOH (1:1, v/v) | 88 |
| <i>L. leucacephala</i> (3) | - ekstrak kloroform:MeOH (1:1, v/v) | 44 |
| <i>B. articularis</i> (4) | - ekstrak kloroform:MeOH (1:1, v/v) | 50 |
| <i>A. humilis</i> (5) | - ekstrak kloroform:MeOH (1:1, v/v) | 40 |
| <i>A. bidentata</i> (6) | - ekstrak kloroform:MeOH (1:1, v/v) | 38 |
| <i>H. capitata</i> (7) | - ekstrak kloroform:MeOH (1:1, v/v) | 32 |
| <i>G. procumbens</i> (8) | - ekstrak kloroform | 24 |
| | - ekstrak MeOH | 36 |
| | - ekstrak a i r | 6 |
| <i>A. squamosa</i> (9) | - ekstrak kloroform | 98 |
| | - ekstrak metanol | 26 |
| | - ekstrak a i r | 39 |
| <i>A. murricata</i> (10) | - ekstrak kloroform:MeOH (1:1, v/v) | 98 |
| <i>A. vulgaris</i> (11) | - ekstrak kloroform | 14 |
| | - ekstrak MeOH | 28 |
| | - ekstrak a i r | 12 |

Dosis uji BST yang digunakan untuk sari kasar adalah 30 ug/ml, dan pada atau di bawah dosis tersebut dinyatakan sangat potensial untuk memperoleh senyawa toksik dari ekstrak tersebut (Meyer, dkk., 1982). Sehingga tanaman *E. gramiflorus*, *V. negundo*, *L. leucocephala*, *B. articularis*, *A. humilis*, *A. bidentata* dan *H. capitata* yang secara tradisional digunakan untuk anti-infeksi cukup disari dengan campuran kloroform:metanol (1:1, v/v) dan dilakukan uji pada dosis 30 ug/ml.

Hasil uji BST dari sari tanaman tersebut (Tabel I) menunjukkan bahwa ekstrak tanaman yang secara tradisional dipakai untuk anti-infeksi (*E. gramiflorus*, *V. negundo*, *L. leucocephala*, *B. articularis*, *A. humilis*, *A. bidentata* dan *H. capitata*) tidak toksik terhadap anak udang. Begitu pula terhadap *A. vulgaris* dan *G. procumbens* yang dilaporkan sebagai anti kanker, ternyata juga tidak menunjukkan toksisitas terhadap anak udang walaupun dosis uji tiap sari dinaikan bertingkat menjadi 150 ug/ml.

Hasil uji BST *A. squamosa* menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan air tidak toksik, tetapi sari kloroform tumbuhan ini pada dosis 10 ug/ml masih menunjukkan ketoksikannya terhadap anak udang (98%), bahkan dengan penurunan dosis uji sari kloroform sampai 6 ug/ml (LC-50 1,77 ug/ml, metode *Litchfield-Wilcoxon*) masih menunjukkan toksisitasnya (98%) (Tabel II). *A. murricata* mempunyai kesamaan genus dengan *A. squamosa*, kemungkinan besar mampu menunjukkan aktivitas sama atau bahkan lebih baik dari aktivitas *A. squamosa*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa walaupun *A. murricata* masih mampu menunjukkan toksisitasnya pada 30 ug/ml, tetapi seiring dengan penurunan dosis (25, 15 dan 10 ug/ml) toksisitasnya pun juga mengalami penurunan (Tabel II).

Tabel II. Hasil uji toksisitas ekstrak kloroform *A. squamosa* (9) dan *A. murricata* (10) dengan BST pada penurunan dosis uji

| N a m a t u m b u h a n | Dosis ug/ml | % kematian setelah 24 jam |
|--------------------------|-------------|---------------------------|
| <i>A. squamosa</i> (9) | 10 | 98 |
| | 8 | 98 |
| | 6 | 98 |
| | 4 | 74 |
| | 2 | 58 |
| <i>A. murricata</i> (10) | 25 | 82 |
| | 15 | 76 |
| | 10 | 68 |

KESIMPULAN

Berdasarkan atas hasil uji BST 11 tumbuhan obat Indonesia diatas maka dapat disimpulkan bahwa hanya daun *A. squamosa* yang potensial untuk dilakukan isolasi senyawa toksiknya. Walaupun sari kloroform:metanol (1:1, v/v) *A. murricata* hanya menunjukkan toksisitas yang marginal (30 ug/ml) tetapi karena sari ini masih mengandung senyawa dengan perbedaan polaritas yang luas, maka perlu diuji sari-sari yang telah terpisahkan berdasarkan atas polaritasnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bagian Biologi Farmasi dan Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur yang telah membantu mengidentifikasi tanaman; Kemudian W. Heriawan, Soesi dan N. M. Sudiasih yang telah membantu melakukan uji BST.

KEPUSTAKAAN

Gu, Z. M., Zeng, L., Schwedler, J. T., Wood, K. V., dan McLaughlin, J. L., (1995), New bioactive adjacent Bis-THF Annonaceous acetogenins from *Annona bullata*, *Phytochemistry*, vol. 40, pp. 467-477

Hartwell, J. L., (1982), *Plants used against cancer, A survey*, Quarterman Publications, Inc., Lawrence, Massachusetts, p. 406

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., dan McLaughlin, J. L., (1982), Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *Journal of Medicinal Plant Research Planta Medica*, vol. 45, pp. 31-34

Michael, A. S., Thomson, C. G., dan Abramowitz, M., (1958), *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay, *J. of Econ. Ent.*, vol. 54, no. 6, p. 784

Robin, A. B., Ma, K. F., Anth, M. P., Catch, J. F., dan Paul, L., (1958), Anesthesia of *Artemia* larvae: Method for quantitative study, *J. of Econ. Ent.*, vol. 54, no. 6, pp. 785-788

Siswanto, A., (1984), Pengaruh daun ngokilo terhadap aktivitas laktatdehidrogenase, glutamat piruvat transaminase dan total protein serum tikus putih jantan yang telah diperlakukan dengan benzidin, *Skripsi fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*

Sudarto, B., (1986), Skrining fitokimia daun dewa (*Gynura procumbens*) yang diduga berkhasiat sebagai antikanker, *Laporan Penelitian*, no. 15/5, Proyek PPPT-UGM 1985/1986

Sugiyanto, Sudarto, B., dan Edy Meiyanto, (1993), Efek penghambatan karsinogenisitas Benzo(a)pyrena oleh preparat tradisional tanaman *Gynura procumbens* dan identifikasi awal senyawa yang berkhasiat, *Proyek DPPM* no. 371/P4M/DPPM/L-3311/BBI/1992

Tarpley, W. A., (1958), Studies on the use of the Brine Shrimp Artemia salina (leach) as a Test Organism for Bioassay, *J. of Ent.*, vol. 51, no. 6, pp. 780-783

Troter II, R. T., Logan, M. H., Rocha, J. M., dan Boneta, J. L., (1983), Ethnography and Bioassay: Combined Methods for a Preliminary Screen of Home Remedies for Potential Pharmacological Activity, *J. of Ethnopharm.*, 8, pp. 113-119