

## TOKSISITAS EKSTRAK AIR TUBUH BUAH *GANODERMA* SP. TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* Leach.

### TOXICITY OF THE AQUEOUS EXTRACTS FROM THE FRUITING BODY OF *GANODERMA* SP. BY BRINE LETHALITY TEST OF *Artemia salina* Leach.

Rumiyati\*, Sismindari\*, S.M. Widyastuti\*\*

\*Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. \*\* Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada

#### ABSTRAK

Penggunaan *Ganoderma* sp. sebagai obat perlu diuji toksisitasnya dengan metode kematian larva udang *Artemia salina* Leach. Diharapkan dari penelitian ini dapat diketahui tingkat toksisitasnya dan kemungkinannya untuk dikembangkan sebagai penghasil obat antitumor.

Tubuh buah *Ganoderma* sp. dan *Ganoderma lucidum* yang diperoleh dari media buatan kayu sengon (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen), kelapa (*Cocos nucifera* Linn.) dan flamboyan (*Delonix regia* Bojer ex Hook Rafin) diekstraksi dengan dapar fosfat 0,02 M pH 7,2. Ekstrak yang diperoleh diuji toksisitasnya dengan metode kematian larva udang *A. salina* Leach. pada dosis 150; 300 ; 600 ; 1200 ; 2400 dan 4800 µg ekstrak air/ml. Tingkat ketoksikan diukur dengan harga  $LC_{50}$ .

Hasil menunjukkan bahwa toksisitas ekstrak air tubuh buah *Ganoderma* sp. pada BST dipengaruhi oleh media penumbuh. *Ganoderma* sp. yang ditanam pada serbuk gergaji flamboyan menghasilkan senyawa yang paling toksik dengan harga  $LC_{50}$  480 µg ekstrak air/ml, diikuti dengan *Ganoderma* sp. yang ditanam pada media serbuk gergaji sengon ( $LC_{50}$  770 µg ekstrak air/ml) dan kelapa ( $LC_{50}$  1040 µg ekstrak air/ml).

*Ganoderma lucidum* dengan efek toksik paling tinggi adalah *G. lucidum* yang ditanam pada media serbuk kelapa dengan harga  $LC_{50}$  660 µg ekstrak air/ml, diikuti *G. lucidum* yang ditanam pada media sengon ( $LC_{50}$  1100 µg ekstrak air/ml) dan flamboyan ( $LC_{50}$  1970 µg ekstrak air/ml). *Ganoderma* yang bersifat toksik terhadap BST ini kemungkinan besar berpotensi sebagai senyawa penghasil obat antitumor.

**Kata kunci:** *Ganoderma* sp., ekstrak air, toksisitas

#### ABSTRACT

The level of toxicity of aqueous extract from *Ganoderma* sp. fruiting body isolated from different plant media was determined in this experiment using *Brine shrimp lethality test* (BST) on *Artemia salina* Leach. The influence of media on the toxicity level of aqueous extract from *Ganoderma* sp. fruiting body was determined in this experiment. *Ganoderma* sp. and *G. Lucidum* were grown on three flamboyant, (*Delonix regia* Bojer ex Hook Rafin), sengon (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen) and coconut(*Cocos nucifera* Linn.) plant media. The aqueous extracts were prepared from fruiting body using 0.02 M phosphate buffer pH 7.2. The toxicity level of these aqueous extract were then screened using the BST method. The level of the toxicity was determined by  $LC_{50}$ .

The results indicated that the aqueous extracts of *Ganoderma* sp. and *G. lucidum* isolated from flamboyant, sengon and coconut plant media were influenced by plant media. *Ganoderma* sp. was isolated from flamboyant plant media possessed the highest toxicity ( $LC_{50}$  480 µg aqueous extract/ml), then followed by *Ganoderma* sp. isolated from sengon plant media ( $LC_{50}$  770 µg aqueous extract /ml) and coconut ( $LC_{50}$  1040 µg aqueous extract /ml).

*G. lucidum* from coconut plant media possessed the highest toxicity ( $LC_{50}$  660 µg aqueous extract /ml), followed by *G. lucidum* were isolated from sengon plant media ( $LC_{50}$  1100 µg aqueous extract /ml) and flamboyant ( $LC_{50}$  1970 µg aqueous extract /ml). It was suggested that *G.lucidum* having highest toxicity might produce compounds having antitumor activity.

**Key words:** *Ganoderma* sp., aqueous extracts, toxicity .

## PENDAHULUAN

*Ganoderma* sp. adalah jamur poliporus penyebab penyakit akar pada tanaman-tanaman keras, palma dan pohon berdaun jarum. Dalam hutan alami, jamur ini menyerang pohon-pohon yang sudah tua, pohon yang menurun kondisinya dan ditemukan juga pada tonggak-tonggak yang mati. Pada Hutan Tanaman Industri (HTI) dan perkebunan di Indonesia, jamur ini telah dilaporkan menjadi patogen akar yang potensial dan telah banyak menyerang beberapa jenis tanaman (Lee, 1996; Semangun, 1991; Widyastuti dan Sumardi, 1998).

Dari beberapa penelitian, tubuh buah *Ganoderma* sp. diketahui mempunyai kandungan polisakarida (Hikino and Mizuno, 1989; Wang dkk., 1984), terpenoid dan asam ganoderik (Hirofani dkk., 1993; Nishitoba dkk., 1984); germanium organik (Chin dkk., 1991); protein (Liu, 1997; Terashita dkk., 1984), adenosin (Kawagishi dkk., 1993) dan serat. Senyawa-senyawa aktif tersebut dapat dibagi menjadi tiga kelompok utama, yaitu 30% senyawa larut air, 65% senyawa larut dalam pelarut organik dan 5% merupakan senyawa volatil. Polisakarida dan germanium organik merupakan senyawa yang larut dalam air, adenosin dan terpenoid larut dalam pelarut organik, sedangkan asam ganoderat merupakan senyawa volatil. Selain itu *Ganoderma* diketahui mengandung *immunopotentiator* dan polisakarida yang mampu menginduksi ekspresi interferon (Jong and Birmingham, 1992).

*Brine shrimp lethality test* (BST) adalah salah satu metode pelacakan senyawa bioaktif yang terdapat di dalam bahan alam dengan menggunakan larva *Artemia salina*. Sifat toksisitas diketahui berdasarkan jumlah kematian larva (McLaughlin and Ferrigni, 1983). Menurut Meyer dkk. (1982) suatu ekstrak dikatakan bersifat toksik terhadap *A. salina* apabila mempunyai harga  $LC_{50}$  (konsentrasi yang dapat mematikan 50% larva udang) kurang dari 1000 µg/ml.

Metode uji toksisitas ini sering digunakan untuk penapisan awal terhadap senyawa aktif yang terkandung di dalam suatu ekstrak tanaman karena murah, cepat, mudah dan dapat dipercaya (Meyer dkk., 1982). Selain itu uji ini dapat digunakan untuk penapisan awal terhadap senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antitumor (Anderson dkk., 1991).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan toksisitas ekstrak air tubuh buah *Ganoderma* sp. isolat lokal yang ditanam pada berbagai media buatan melalui uji toksisitas menggunakan metode BST (*Brine shrimp lethality test*). Hasil penelitian ini dapat dijadikan pertimbangan pada penggunaan *Ganoderma* sp. sebagai bahan obat alternatif antitumor.

## METODOLOGI

### Bahan

Dua isolat *Ganoderma* sp. yang digunakan dalam penelitian ini adalah *G. lucidum* yang telah diidentifikasi dan diperoleh dari Dinas Pertanian Tanaman Pangan DIY (dikembangkan oleh pakar dari Taiwan di Ngipiksari), dan *Ganoderma* sp. isolat no. 35 yang diisolasi dari tubuh buah jamur yang menyerang asam jawa (*Tamarindus indica* Linn.) di desa Cangkringan, Kabupaten Sleman, Yogyakarta (Widyastuti dkk., 1999). Isolat-isolat ini merupakan koleksi Laboratorium Perlindungan Hutan, Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada.

Budidaya *Ganoderma*. Kedua isolat tersebut di tanam pada serbuk gergaji sengon (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen) yang sudah dicampur dengan bekatul, kapur gamping ( $CaCO_3$ ), gips ( $CaSO_4$ ) dan pupuk TSP ( $P_2O_5$  46%) (Yusnawan dkk., 2000). Untuk mengetahui pengaruh media pada kandungan tubuh buah jamur, kedua *Ganoderma* ditanam pada dua serbuk gergaji lainnya yaitu flamboyan (*Delonix regia* Bojer ex Hook Rafin) dan kelapa (*Cocos nucifera* Linn.). Tubuh buah jamur *Ganoderma* sp. dipanen setelah berumur 10 minggu (Yusnawan dkk., 2000), dikeringkan di oven pada temperatur 50°C dan diserbuk.

### Cara kerja.

**Ekstraksi.** Masing-masing bahan dihaluskan sampai homogen dalam dapar fosfat 0,02 M pH 7,2 (Somowiyarjo, 1999). Ekstrak dipisahkan dengan dipusingkan menggunakan kecepatan 4500 rpm selama 20 menit. Supernatan yang merupakan ekstrak air, diambil dan disimpan pada suhu dingin (4°C) untuk keperluan uji toksisitas.

**Uji Larva Udang *Artinia salina* (Brine shrimp lethality test).** Larva udang dipersiapkan sama dengan peneliti terdahulu (Wahyuono dkk., 2001). Larva *Artemia salina* Leach. (*Premium Extra Brine Shrimp Eggs*, HS No. 0511.99.600 Seagull Internasional, The Great Salt lake City, USA) diperoleh dari hasil penetasan telur yang dilakukan di akuarium dengan 2 sekat (salah satu sekat disinari lampu), pada temperatur 25-30° C di medium air laut buatan (ALB). Telur menetas menjadi *nauplius* (larva) setelah 48 jam, dan *nauplii* yang sehat/aktif menuju ke tempat terang. Untuk uji BST, dipilih larva sehat dengan usia 24 jam.

Pengujian BST dilakukan dengan metode Meyer dkk (1982) dengan konsentrasi ekstrak 150; 300; 600; 1200; 2400 dan 4800 µg/ml. Dalam tabung uji yang berisi 5 ml ALB dimasukkan 10 ekor larva *A. salina*. Sebagai makanan larva 1 tetes suspensi ragi (*Saccharomyces cerevisiae*, Lessafree 290703 Marc., France) yang setara dengan 3 mg dalam 5 ml ALB, dimasukkan ke dalam tabung uji dan selama pengujian, tabung uji diberi penerangan lampu. Sebagai kontrol negatif digunakan dapar fosfat dan air laut. Setelah 24 jam jumlah larva yang mati dihitung. Setiap konsentrasi pengujian dilakukan 5 replikasi (n=5).

#### Analisis

Prosentase sifat ketoksikan dari suatu ekstrak adalah jumlah larva yang mati dibagi dengan 10 kemudian dikalikan 100 %. Ekstrak dinyatakan toksik apabila pada konsentrasi ≤ 1000 µg/ml, ekstrak mampu membunuh 50 % larva *A. salina* (LC<sub>50</sub> ≤ 1000 µg/ml).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

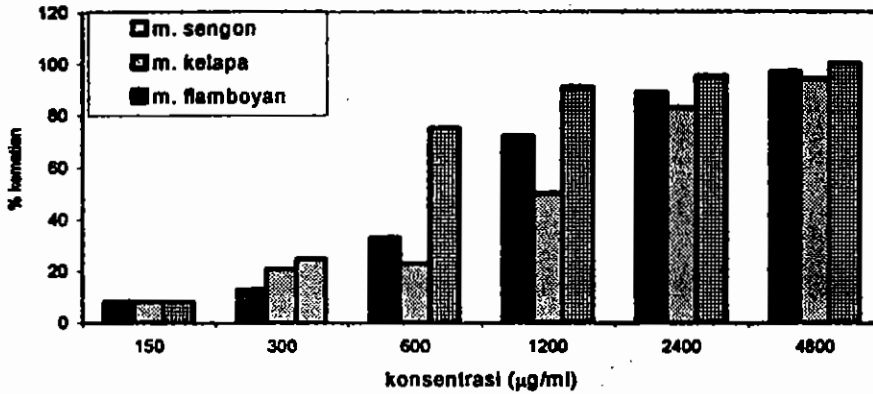
Hasil uji BST dari ekstrak air *Ganoderma* sp. seperti terlihat pada tabel I menunjukkan bahwa dengan meningkatnya jumlah ekstrak yang ditambahkan, terjadi peningkatan persen kematian larva. Kematian sampai dengan 90 % dihasilkan pada penambahan ekstrak yang diperoleh dari 4800 µg ekstrak air/ml. Dari tabel I dan gambar 1, terlihat bahwa toksistas ekstrak air terhadap *A. salina* yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh media penumbuh. Dari ketiga macam media yang digunakan dapat diketahui bahwa *Ganoderma* sp. yang ditanam pada serbuk gergaji flamboyan menghasilkan senyawa yang paling toksik dengan harga LC<sub>50</sub> 480 µg ekstrak air/ml, yang kemudian diikuti dengan *Ganoderma* sp. yang ditanam pada media serbuk gergaji (LC<sub>50</sub> 770 µg ekstrak air/ml) dan kelapa (LC<sub>50</sub> 1040 µg ekstrak air/ml).

Seperti halnya *Ganoderma* sp., toksistas ekstrak air *G. lucidum* cenderung naik dengan kenaikan jumlah ekstrak yang ditambahkan (tabel II). Dari perhitungan harga LC<sub>50</sub> diperoleh bahwa yang mempunyai efek toksik paling tinggi adalah *G. lucidum* yang ditanam pada media kelapa, sedangkan yang ditanam pada serbuk gergaji flamboyan toksistasnya sangat rendah karena mempunyai harga LC<sub>50</sub> di atas 1000 µg/ml yakni 1970 µg ekstrak/ml. Dari hasil yang diperoleh tersebut menunjukkan bahwa serbuk gergaji kelapa lebih cocok sebagai media penumbuh *G. lucidum*. Dan sebaliknya serbuk gergaji flamboyan lebih cocok sebagai media penumbuh *Ganoderma* sp. daripada untuk *G. lucidum*.

Tabel I. Prosentase kematian larva udang dan LC<sub>50</sub> pada penambahan ekstrak air tubuh buah *Ganoderma* sp (isolat no. 35) yang ditumbuhkan pada media serbuk gergaji sengon, kelapa dan flamboyan

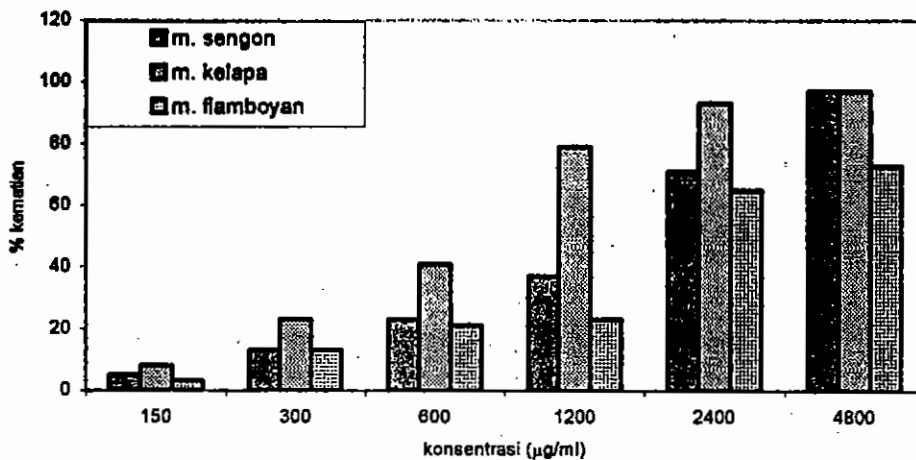
No	Serbuk-Gergaji	Prosentase kematian larva udang <sup>*)</sup>					LC <sub>50</sub> (µg/ml)	
		150 µg/ml	300 µg/ml	600 µg/ml	1200 µg/ml	2400 µg/ml		4800 µg/ml
1	Sengon	8±1,1	13±1,5	33±2,5	72±3,1	89±4,5	97±5,4	770±8
2	Kelapa	8±0,5	21±2,2	23±1,7	50±2,9	83±5,2	94±6,7	1040±13
3	Flamboyan	8±0,8	25±2,4	75±3,6	91±5,6	95±6,2	100±6,3	480±6

Keterangan: \*) ulangan 5 kali



Gambar 1. Diagram batang konsentrasi ekstrak air tubuh buah *Ganoderma sp.* vs. % kematian larva udang *A. salina*

Hasil uji toksisitas dengan BST ini dapat diasosiasikan dengan sifat sitotoksik yang digunakan sebagai prasyarat senyawa antitumor. Dengan demikian adanya sifat toksik dari *Ganoderma sp.* ini dapat dijadikan pendukung ilmiah penggunaan *Ganoderma* sebagai obat antitumor. Hasil penelitian ini juga mendukung penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Somowiyarjo, 1999 yang menunjukkan adanya potensi menghambat proliferasi sel myeloma sebesar 100 % pada kadar 1000 µg/ml dari ekstrak air miselium *Ganoderma sp.* Disamping fraksi air, fraksi metanol dan kloroform dari *Ganoderma sp.* diketahui bersifat sitotoksik terhadap sel tumor secara *in vitro* (Meyer dkk. 1982 ) dan bersifat toksik pada larva *A. salina* (Wahyuno dkk., 2001).



Gambar 2. Diagram batang konsentrasi ekstrak air tubuh buah *G. lucidum* vs. % kematian larva udang *A. salina*

Tabel II. Presentase kematian larva udang dan LC<sub>50</sub> pada penambahan ekstrak air tubuh buah *Ganoderma lucidum* yang ditumbuhkan pada media serbuk gergaji sengon, kelapa dan flamboyan

No	Serbuk Gergaji	Presentase (%) kematian larva udang **)						LC <sub>50</sub> (µg/ml)
		150 µg/ml	300 µg/ml	600 µg/ml	1200 µg/ml	2400 µg/ml	4800 µg/ml	
1	Sengon	5 ± 1,2	13 ± 2,1	28 ± 3,4	37 ± 3,5	71 ± 4,8	97 ± 5,6	1100 ± 12
2	Kelapa	8 ± 1,8	23 ± 2,7	41 ± 3,8	79 ± 4,8	93 ± 5,2	97 ± 6,1	660 ± 8
3	Flamboyan	3 ± 0,7	13 ± 1,9	21 ± 2,3	23 ± 2,4	65 ± 4,2	73 ± 4,4	1970 ± 23

Keterangan: \*\*) ulangan 5 kali

Penelitian lain yang menunjukkan adanya sifat toksistas dari ekstrak air pada BST dan sel kanker secara *in vitro* adalah ekstrak air daun *Morinda citrifolia* L. (Sulistiyani, 1999). Ekstrak air tersebut diketahui mengandung protein mirip RIP (*Ribosome-inactivating protein*) yang dapat membunuh sel dengan mekanisme inaktivasi ribosom. Dengan demikian kemungkinan besar ekstrak air *Ganoderma sp.* ini mengandung protein mirip RIP tersebut. Oleh karena itu kandungan zat aktif yang bertanggungjawab pada toksistas tersebut perlu diteliti lebih lanjut.

### KESIMPULAN

Toksistas ekstrak air tubuh buah *Ganoderma sp.* pada BST dipengaruhi oleh media penumbuh. *Ganoderma sp.* yang ditanam pada serbuk gergaji flamboyan menghasilkan senyawa yang paling toksik dengan harga LC<sub>50</sub> 480 µg ekstrak air/ml, diikuti dengan *Ganoderma sp.* yang ditanam pada media serbuk gergaji (LC<sub>50</sub> 770 µg ekstrak air/ml) dan kelapa (LC<sub>50</sub> 1040 µg ekstrak air/ml).

*G. lucidum* yang mempunyai efek toksik paling tinggi adalah *G. lucidum* yang ditanam pada media serbuk kelapa dengan harga LC<sub>50</sub> 660 µg ekstrak air/ml, diikuti *G. lucidum* yang ditanam pada media sengon (LC<sub>50</sub> 1100 µg ekstrak air/ml) dan flamboyan (LC<sub>50</sub> 1970 µg ekstrak air/ml).

*Ganoderma* yang bersifat toksik terhadap BST kemungkinan besar berpotensi sebagai senyawa penghasil obat antitumor.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.E., Goetz, C.M., and McLaughlin, J.L., 1991, A Blind Comparison of Simple Benzch-top Bioassays and Human Tumor Cell, Cytotoxicities Studies as Antitumor Prescreens, *Phytochem Anal.*, 2, 107-111
- Chin, T.C., Leng, K.S. and Wahab, M.N., 1991, Studies on Germanium Uptake by the Fungus *Ganoderma lucidum*, *Berita Penyelidikan UPM* 5(2) : 1-7
- Hikino, H. and Mizuno, 1989, Hypoglycemic Actions of Some Heteroglycans of *Ganoderma lucidum* Fruit Bodies, *Planta Medica*, 55:385
- Hirofani, M.C., Ino and Furuya, 1993, Comparative Study of Strain Specific Triterpenoid Components of *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry*, 33(2):379-382
- Jong, S.C., and Birmingham, J.M., 1992, Medical Benefits of The Mushroom *Ganoderma*, *Adv. Appl. Microbiol.*, 37:101-134
- Kawagishi, H., Fukuhara, K., Sazuka, M., Mitsuburi, T. and Tomita, T., 1993, 5'-Deoxy-5'-Methylsulphinyladenine, a Platelet Aggregation Inhibitor from *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry*, 32(2): 239-241
- Lee S.S. 1996. Diseases of Some Tropical Plantation Acacias in Peninsular Malaysia dalam Old, K.M., Lee, S.S. dan Sharma, J.K., (Eds). *Diseases of Tropical Acacias*, Proc. of an International Workshop held at Sumbarjeriji (South Sumatra), CIFOR, Jakarta
- Liu, F., Ooi, V.E.C. and Chang, S.E.T, 1997. Free Radical Scavenging Activities of Mushroom Polysaccharide Extracts, *Life Science*, 60(10): 763-771

- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobson, L.B., Nichols, D.E., and McLaughlin, J.L., 1982, Brine Shrimp: a Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta Med.*, 45, 31-34
- McLaughlin, J.L., and Ferrigni, N.R., 1983, Potato Discs and Brine Shrimp: Two Simple Bioassays for Antitumor Prescreening and Fractionation Monitoring, *Proceeding of Symposium on Discovery and Development of Naturally Occurring Antitumor Agent*, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, 9-12.
- Nishitoba, T., Sato, H., Kasai, T., Kawagishi and Sakamura, S., 1984, New Bitter C27 and C30 Terpenoids from the Fungus *Ganoderma lucidum* (Reishei), *Agric. Biol. Chem.*, 48(11):2905-2907
- Semangun, H., 1991. *Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Somowiyarjo, S., 1999, Potensi Dua Jenis Jamur Patogen Tumbuhan *Ganoderma* sp. dan *Phytophthora* sp. sebagai Senyawa Bioaktif Penghambat Sel Tumor, *Mediagama* 1:47-51
- Sulistiyani, N., 1999, Uji Aktivitas N-Glikosidase Daun *Morinda citrifolia* L. pada rRNA yeast dan Uji Toksisitasnya dengan Metode BST, *Tesis*, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.
- Terashita, T., Oda, K., Kono, M., and Murao, S., 1984, *Streptomyces pepsin* Inhibitor-intensive Carboxyl Proteinase from *Ganoderma lucidum*, *Agric. Biol. Chem.*, 48 (4): 1029-1035
- Wang, C.H., Shen, M.H., and Yan, X.Y., 1984, Isolation and Characterization of Polysaccharide from *Ganoderma lucidum*, *Chemistry and Industry of Forest Product*, 4(3):42-48
- Wahyuono, Widyastuti dan Sumardi, 2001, Potensi *Ganoderma* sp. sebagai Bahan Obat Alternatif, *Buletin Kehutanan*.
- Widyastuti, S.M. and Sumardi, 1998, Antagonistic Potensial of *Trichoderma* spp. Againsts Root Rot Pathogen of Forest Tree Species, *Asian Journal of Sustainable Agriculture* 2(2):1-8
- Widyastuti, S.M., Sumardi dan Harjono, 1999, Pengenalan *Ganoderma* pada Berbagai Tanaman Kehutanan, *Pros. Sem. Regional Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*, Solo.
- Yusnawan, E., Ambarwati, dan Widyastuti, S.M., 2000, Pertumbuhan Miselium dan Pembentukan Tubuh Buah *Ganoderma* spp. pada Medium Serbuk Gergaji dari Berbagai Jenis Kayu, *Pros. Kong. Nas. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*.