



**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL BUAH ANGGUR
(*Vitis vinifera*) TERHADAP LARVA *Artemia salina* Leach DENGAN
METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST)**

ACUTE TOXICITY TEST OF ETANOL EXTRACT OF GRAPE FRUIT (*Vitis
vinifera*) AGAINST *Artemia salina leach* LARVA USING BRINE SHRIMP
LETHALITY TEST (BST) METHOD

**ARTIKEL
KARYA TULIS ILMIAH**

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna mencapai derajat sarjana strata-1 kedokteran umum**

**DITA MUTIA
G2A006050**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
TAHUN 2010**

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Buah Anggur (*Vitis vinifera*) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)

Dita Mutia¹, Suhardjono²

ABSTRAK

Latar belakang: Anggur (*Vitis vinifera*) merupakan salah satu buah yang telah banyak dikenal dan dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Buah ini mengandung senyawa saponin, polifenol, flavonoid dan resveratrol. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi toksisitas akut pada ekstrak buah anggur menurut metode Brine Shrimp Lethality Test (BST).

Metode: Digunakan hewan uji 250 ekor larva yang dibagi dalam 5 kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 10 ekor, dengan replikasi 5 kali tiap kelompok. Kemudian ekstrak anggur diberikan ke dalam media dengan konsentrasi akhir, berturut-turut kelompok 1,2,3,4 dan 5 adalah 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 200 µg/ml dan 0 µg/ml sebagai kontrol negatif. Hasil pengamatan adalah terhadap larva yang mati 24 jam setelah pemberian bahan uji. Berdasarkan data, LC 50 ekstrak etanol buah anggur ditentukan dengan analisis probit menggunakan *SPSS 16.0 for windows*.

Hasil: Hasil dari analisis probit menunjukkan harga LC 50 dari ekstrak buah anggur adalah 648.004 µg/ml. Sedangkan dari analisis regresi, akan didapatkan persamaan $LC50=0.239\log\text{konsentrasi} - 0.125$

Kesimpulan: Pemberian ekstrak buah anggur pada penelitian ini, menunjukkan potensi toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina* Leach menurut metode BST. Hal ini ditunjukkan dengan harga LC 50 <1000 µg/ml.

Kata kunci: *Vitis vinifera*, *brine shrimp lethality test*, toksisitas akut

¹ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

² Staf Pengajar, Bagian Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

Acute Toxicity Test Of Etanol Extract of Grape Fruit (Vitis vinifera) Against Artemia salina Leach Larvae Using Brine Shrimp Lethality Test (BST) Method

ABSTRACT

Background: Grape fruit (*Vitis vinifera*) is one of plants which has been known and consumed by Indonesian society. This fruit contains saponin, polifenol, flavonoid and resveratrol. The aim of this research is to know acute toxicity potential on grape fruit's extract depend on Brine Shrimp Lethality Test (BST) method.

Method: It is used 250 larvae as test animal which is divided on 5 groups. Each group contains 10 larvae with replication of research for 5 times. Then the extract of grape fruit got into final concentration in the media, consecutively as the group of 1,2,3,4 and 5 is 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 200 µg/ml and 0 µg/ml as negative control. The result is against larvae that died 24 hours after component test was given. Through the data, LC 50 value of etanol extract of *Vitis vinifera* was analyzed by probit analysis using SPSS 16.0 for windows.

Result: The result of probit analysis indicated that LC 50 value of fruit extract of *Vitis vinifera* was 648.004 µg/ml. Whereas, the result of analysis regression got equation $LC50=0.239\log\text{concentration} - 0.125$

Conclusion: The administering of fruit extract of *Vitis vinifera*, in this research, had acute toxicity potential against *Artemia salina* Leach larvae according to BST method. It is indicated by LC 50 value <1000 µg/ml.

Key words: *Vitis vinifera*., brine shrimp lethality test, acute toxicity.

PENDAHULUAN

Obat tradisional merupakan pilihan pengobatan yang kini makin diminati, terlebih lagi dengan kesadaran untuk kembali ke alam, bahkan dengan perkembangan yang kini ada makin mendapat perhatian bagi alternatif pelayanan kesehatan.¹ Dari berbagai penelitian, obat tradisional memang telah diakui keberadaannya oleh masyarakat. Dengan demikian meningkatkan manfaat tanaman bagi kesehatan telah menciptakan kondisi yang mendorong pengembangan obat tradisional.

Manfaat tanaman obat untuk mengatasi penyakit kanker merupakan terobosan konkrit, mengingat saat ini pengobatan kanker sangat mahal. Di Indonesia, penyakit kanker menempati urutan kelima.² Seiring dengan penggunaan kemoterapi untuk mengatasi penyakit kanker. Pengembangan produk herbal menjadi salah satu pilihan.

Salah satu tanaman buah yang telah banyak dikenal dan digunakan secara luas oleh masyarakat Indonesia adalah buah anggur (*Vitis vinifera*). Buah anggur mudah sekali ditemukan dan didapatkan hampir di seluruh Indonesia. Masyarakat Indonesia telah sejak lama mengkonsumsi buah anggur sebagai hidangan sehari-hari. Hal inilah yang mengundang penelitian mengenai buah anggur mulai dari kandungan kimia yang ada didalamnya sampai manfaat atau khasiat yang dapat diperoleh dari buah anggur sendiri.

Anggur mengandung flavonoid, saponin dan polifenol.³ Flavonoid merupakan antioksidan ampuh yang bekerja sebagai pencegah kanker dan juga memiliki efek

antimikroba. Saponin memiliki efek menurunkan kadar gula darah. Polifenol juga merupakan antioksidan, pada buah anggur dikenal dengan nama resveratrol yang menghambat enzim yang dapat menstimulir pertumbuhan sel kanker dan menekan respon imun.^{4,5} Juga mengandung ellagic acid, sejenis senyawa yang menghambat enzim yang diperlukan sel-sel kanker, yang tampak membantu memperlambat perkembangan tumor.⁵ Selain itu Anggur juga mengandung magnesium yang tinggi, dimana magnesium itu merupakan suatu elemen yang diperlukan untuk pergerakan feses yang baik.¹

Senyawa yang diduga memiliki aktivitas anti kanker, harus diujikan terlebih dahulu pada hewan percobaan. Penelitian ini menerapkan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina leach* sebagai hewan uji. Metode ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa anti kanker baru yang berasal dari tanaman. Hasil uji toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksis senyawa anti kanker.⁶ Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat.⁷ Bentuk ekstrak dipilih dengan harapan akan didapatkan kandungan senyawa aktif yang ada dalam buah anggur. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan bahan informasi tentang potensi anti kanker pada buah anggur sebagai salah satu tanaman yang telah dikenal dan digunakan secara luas oleh masyarakat.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test-Only Control Group Design* dan cara pengambilan sampel yaitu *Simple Random Sampling* terhadap larva *Artemia salina Leach*, karena anggota populasi telah bersifat homogen, artinya sampel larva *Artemia salina Leach* dengan jenis serta cara penyediaan yang sama, sehingga mempunyai kesempatan yang sama untuk diseleksi sebagai sampel. Sampel penelitian berupa 250 ekor larva *Artemia salina Leach*. Kriteria inklusi adalah larva berumur 48 jam, sedangkan kriteria eksklusi yaitu larva *Artemia salina Leach* yang tidak menunjukkan aktivitas pergerakan sebelum perlakuan.

Bahan yang digunakan adalah ekstrak buah anggur. Buah anggur yang digunakan sebelumnya ditimbang terlebih dahulu dan didapatkan berat buah anggur sebelum dan sesudah dikeringkan adalah 2000 gram dan 1220 gram.

Buah anggur dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60-80°C sampai kering. Setelah kering, buah anggur dihaluskan menggunakan blender dan diayak untuk memisahkan bagian yang masih kasar. Setelah itu, ditimbang sebanyak 200 gram dan dibungkus menggunakan kertas saring. Buah anggur yang telah terbungkus kertas saring tersebut dimasukkan dalam alat soxhlet yang labu alas bulatnya telah diisi menggunakan ethanol 70% sebanyak 250-400 ml. Heating mantle set suhu pemanas dinyalakan pada 60-80 ° C, alirkan air pada kondensor dan proses ekstraksi dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih (sekitar 9-12 kali putaran pelarut). Setelah

proses ekstraksi selesai , hasil ekstrak diambil dan dimasukkan dalam labu evaporator. Pelarut diuapkan menggunakan rotary evaporator sampai tidak keluar lagi pada labu alas bulat tempat sisa penampungan pelarut. Hasil ekstraksi dikeringkan dalam oven sampai didapatkan ekstrak yang kering (konsentrasi 100 %). Kemudian ekstrak buah anggur yang diperoleh juga ditimbang dan didapatkan berat ekstrak buah anggur murni yaitu 61.9 gram.

Untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak yang efektif membunuh larva *Artemia salina* Leach, maka dilakukan *trial* atau orientasi dengan uji coba dengan menggunakan konsentrasi desimal, yaitu 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, dan 0,05%. Setelah dilakukan *trial* atau uji orientasi, akan didapatkan konsentrasi terkecil yang dapat menyebabkan kematian pada hampir semua larva adalah 0,2%. Berdasarkan hasil uji orientasi tersebut, dapat ditetapkan konsentrasi yang akan digunakan pada perlakuan (*definitive test*) dan replikasinya, adalah 0,2%, 0,1%, 0,05%, dan 0,02%.

Penyiapan larva *Artemia salina* dilakukan dengan menetasakan telurnya 48 jam sebelum dilakukan uji. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur tersebut dalam air laut secukupnya dengan menerangi bagian wadah yang tidak ditempati telur udang dengan sinar lampu.

Pelaksanaan uji dilakukan dengan mula-mula menyamakan volume akhir ekstrak buah anggur dengan perbandingan konsentrasi perlakuan 1:2:4:8 yang diencerkan dengan menambahkan air laut terlebih dahulu ke dalam masing-masing tabung uji sampai ekstrak buah anggur larut, kemudian baru dimasukkan larva udang

yang telah berumur 48 jam ke dalam seri tabung uji yang berisi ekstrak buah anggur yang telah disiapkan masing-masing sebanyak 10 ekor sehingga volume dalam masing-masing tabung menjadi 5 ml. Tabung uji lalu diletakkan di bawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva udang yang mati. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik observasi.⁸ Setiap konsentrasi perlakuan dilakukan replikasi sebanyak lima kali.

Berikut ini adalah alur penelitian yang dilakukan:

Telur *Artemia salina* Leach

Pemilihan dan penetasan telur *Artemia salina* Leach

Hari I

Hari IV

Larva *Artemia salina* Leach berumur 48 jam

Randomisasi dan *Trial*

P4

Air laut + 2000 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak buah anggur

P3

Air laut + 1000 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak buah anggur

K

Air laut + 0 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak buah anggur

P2

Air laut + 500 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak buah anggur

P1

Air laut + 200 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak buah anggur

Ditambah 10 larva pada tiap tabung uji sehingga volume akhir 5 ml

Replikasi 5 kali tiap kelompok perlakuan

Diletakkan dibawah penerangan

Hari V

Dihitung jumlah larva yang mati (larva yang tidak bergerak)

Dihitung harga LC 50

Data yang dikumpulkan adalah data primer yang didapatkan dari jumlah larva udang yang mati 24 jam setelah perlakuan pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak buah anggur. Setelah melewati proses *editing, coding, entry dan cleaning*, data dianalisis dengan analisis probit menggunakan *SPSS 16.0 for windows* untuk mengetahui harga LC 50, serta disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini memperlihatkan konsentrasi ekstrak dalam media yang dapat membunuh larva dengan konsentrasi 2000 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$. Jumlah kematian larva *Artemia salina Leach* pada setiap tabung uji dalam berbagai konsentrasi perlakuan ekstrak buah anggur ditunjukkan pada tabel. Dari tabel tersebut dapat diketahui bahwa berbagai konsentrasi ekstrak buah anggur pada percobaan ini memperlihatkan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva *Artemia salina Leach*. Hasil penelitian seperti yang disajikan pada tabel.

Tabel 2. Pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol buah Anggur (*Vitis vinifera*) terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Replikasi ke-	Jumlah Kematian Larva Tiap Konsentrasi				Kontrol (-)	Volume Akhir Media
	0,2% (2000 µg/ml)	0,1% (1000 µg/ml)	0,05% (500 µg/ml)	0,02% (200 µg/ml)		
1	10	5	3	0	0	5 ml
2	10	6	3	3	0	5 ml
3	10	5	2	1	0	5 ml
4	10	7	5	0	0	5 ml
5	10	8	3	2	0	5 ml
Total Kematian	50	31	15	6	0	
Rata-Rata	10	6.2	3	1.2	0	
Persentase Kematian	100%	62%	30%	12%	0%	

Jumlah larva tiap tabung uji dengan lima kali replikasi adalah 50 ekor. Jumlah total larva *Artemia salina* Leach yang digunakan adalah 250 ekor larva. Total kematian diperoleh dengan menjumlahkan larva yang mati pada setiap konsentrasi, sedangkan rata-rata kematian larva diperoleh dengan membagi total kematian larva pada tiap konsentrasi dengan jumlah replikasi yang dilakukan yaitu lima kali. Kemudian dihitung persentase kematian larva dari rata-rata kematian pada tiap

konsentrasi. Hasil dari analisis probit dengan menggunakan *SPSS 16.0 for windows* menunjukkan harga LC 50 dari ekstrak buah anggur adalah **648.004** µg/ml. *Output* data dari hasil analisis probit beserta grafiknya dapat dilihat pada Lampiran 3.

PEMBAHASAN

Brine Shrimp Lethality Test (BST) adalah salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Metode ini dapat digunakan sebagai bioassay-guided fractionation dari bahan alam, karena mudah, cepat, murah dan cukup reproducible. Penelitian Carballo dkk, menunjukkan adanya hubungan yang konsisten antara toksisitas dan letalitas *Brine shrimp* pada ekstrak tanaman. Metode BST dapat dipercaya untuk menguji aktivitas farmakologis dari bahan-bahan alami.⁸ Beberapa senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi dan dimonitor aktivitasnya dengan BST menunjukkan adanya korelasi terhadap suatu uji spesifik antikanker.⁶ Namun, bila tidak bersifat toksik maka tanaman tersebut dapat diteliti kembali untuk mengetahui khasiat lainnya dengan menggunakan hewan coba lain yang lebih besar dari larva *Artemia salina Leach* seperti mencit dan tikus secara *in vivo*.

Uji toksisitas dengan metode BST ini merupakan uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat, yaitu rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji. Prosedurnya dengan menentukan nilai LC 50 dari aktivitas komponen aktif tanaman terhadap larva *Artemia salina Leach*. Suatu ekstrak dikatakan toksik berdasarkan metode BST jika harga LC < 1000 µg/ ml.⁹

Pengujian terhadap ekstrak buah anggur menunjukkan harga LC 50 sebesar **648.004** µg/ml, sehingga dapat dikatakan ekstrak buah anggur pada percobaan ini memiliki potensi toksisitas akut menurut metode BST yaitu pada perlakuan dengan hewan coba larva *Artemia salina Leach*.

Pada penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak buah anggur mempunyai potensi toksisitas akut. Hal tersebut berkaitan dengan keempat senyawa yang terdapat dalam buah anggur yaitu saponin, polifenol, flavonoid dan resveratrol^{3,5} dimana pada kadar tertentu memiliki potensi toksisitas akut serta dapat menyebabkan kematian larva *Artemia salina Leach*. Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa-senyawa tersebut diatas, dalam buah anggur yang dapat menghambat daya makan larva (antifedant). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya. Akibatnya, larva mati kelaparan.^{10,11}

Sesuai penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut harga LC 50 dengan metode BST, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat anti kanker^{8,9}, maka buah anggur dapat dilanjutkan penelitiannya sebagai obat anti kanker di masa yang akan datang.

KESIMPULAN

- a) Pemberian ekstrak buah anggur pada penelitian ini menunjukkan adanya potensi toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina* Leach yang ditunjukkan dengan harga LC 50 < 1000 µg/ml menurut metode BST.
- b) Besar potensi ekstrak ethanol buah anggur untuk membunuh larva *Artemia salina* termasuk dalam kategori *practically non-toxic*, karena konsentrasinya > 100 µg/ml.¹²

SARAN

Pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa ekstrak buah anggur memiliki potensi toksisitas akut. Oleh karena itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan bahan informasi tentang potensi toksisitas akut pada ekstrak buah anggur sebagai salah satu buah yang sering dikonsumsi dan digunakan secara luas oleh masyarakat. Berdasarkan hasil penelitian ini pula, diperlukan penelitian lebih lanjut tentang potensi toksisitas akut buah anggur dalam bentuk sediaan lainnya seperti infusa, dapat dilanjutkan penelitiannya pada hewan coba yang lebih tinggi tingkatannya, misalnya mencit, serta dapat dilanjutkan penelitiannya sebagai obat anti kanker di masa yang akan datang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Drs. Suhardjono, Apt, M.Si; Dra. Murnah, Apt.; dr.Noor Wijayahadi, M.Kes, Ph.D serta kepada staf bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wijayakusuma H. Potensi tumbuhan obat asli Indonesia sebagai produk kesehatan [Online]. 2000 [cited 2009 Sept 23]; Available from: URL: <http://digilib.batan.go.id/eprosiding/File%20Prosiding/Kesehatan/Risalah%202000/2000.pdf>
2. Annual report BPPT 2007. Obat herbal [Online]. [cited 2009 Sept 24]; Available from: URL: http://repositori.bppt.go.id/ubuntu/index.php?action=download&dir=Download%2Fannualreporttria%2Far07%2FAnnualReport07Eng&item=AR_PDF_07_d_medical.pdf&order=name&srt=yes
3. Hutapea JR. Inventaris Tanaman Obat Indonesia III. Jakarta: Departemen Kesehatan RI Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan; 1994.
4. Herlanda. Khasiat buah untuk kesehatan [Online]. 2008 Jun 6 [cited 2009 Sept 23]; Available from: URL: www.sentrajakarta.com/150-khasiat-buah-untuk-kesehatan.pdf

5. Verona Vern, editor. Makanan antikanker [Online]. 2009 May 18 [cited 2009 Sept 23]; Available from: URL: www.scalamedia.net/artikel/kesehatan/209-makanan-anti-kanker.pdf
6. Harmita DR. Uji toksisitas [Online]. [cited 2009 Des 3]; Available from: URL: <http://repository.ui.ac.id/contents/koleksi/11.pdf>
7. Dyah N, Nurlita A, Rachmat F. Uji toksisitas ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai studi pendahuluan potensi antikanker [Online]. 2006 Okt 1 [cited 2009 Sept 20]; Available from: URL: <http://www.analitik.chem.its.ac.id/attachments/-01.pdf>
8. Carballo JL, Hernandez ZL, Perez P, Garcia MD. Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnology. 2002;2:1472-6570.
9. Mayer BNNR, Ferrigni ML. Brine Shrimp, a convenient general bioassay for active plant constituents. J of Plant Medical Research. 1982;45:31-34.
10. Lenny S. Senyawa flavonoida, fenilpropanoida dan alkaloida. Departemen kimia fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam universitas Sumatera Utara, Medan; 2006.
11. Nguyen HH, Widodo S. *Momordica* L. In: Medicinal and Poisonous Plant Research of South-East Asia 12. De Padua L. S. N. Bunyapraphatsana and R. H.

M. J. Lemmens (eds.). Pudoc Scientific Publisher. Wageningen, the Netherland;1999. p.353-359.

12. Moshi MJ. Brine shrimp toxicity of some plants used as traditional medicines in kagera region, north western tanzania. Tanzania journal of health research: January 2010; 12(1).