

Uji Toksisitas Ekstrak Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test Sebagai Kandidat Obat Antikanker

Toxicity Testing Of White Pomegranate (*Punica granatum L.*) Fruit Extracts Using Brine Shrimp Lethality Test Method As A Candidate Of Anti-Cancer Drug

Ferian Firnanda¹, Eduardus Bimo Aksono Herupradoto², Kadek Rahmawati²,
Rochmah Kurnijasanti², Mohammad Sukmanadi², Nove Hidajati²
¹Mahasiswa, ²Departemen Kedokteran Hewan Dasar
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Corresponding author: ferian.f-2015@fkh.unair.ac.id

ABSTRACT

This research aimed to determine the effects of toxic white pomegranate fruit extract (*Punica granatum L.*) against larvae of brine shrimp (*Artemia salina Leach*) indicated LC50 values below 1000 µg/ml. This study is purely experimental by using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). The study was divided into seven groups, namely ethanol extract of white pomegranate fruit (*Punica granatum L.*) with a concentration of 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/ml and negative control (seawater). Mortality data percentage of *Artemia salina Leach* analyzed by probit analysis. Results showed that the extract of white pomegranate fruit extract (*Punica Granatum L.*) has a toxic effect with LC50 values of 248,6 µg/ml calculate from probit analysis. From these results, it can conclude that white pomegranate extract is toxic to larval shrimp (*Artemia salina Leach*) with Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method which means white pomegranate extract has the potential to be an anticancer drug.

Keywords: White pomegranate, Brine Shrimp Lethality Test, Toxicity, *Artemia salina leach*

Received: 02-09-2021

Revised: 03-10-2021

Accepted: 16-11-2021

PENDAHULUAN

Tumbuhan obat merupakan tumbuhan yang mengandung bahan aktif pada salah satu bagian atau seluruh bagian tumbuhan yang dapat digunakan untuk mengobati penyakit tertentu. Bagian tumbuhan yang bisa dimanfaatkan meliputi daun, buah, bunga, biji, akar, rimpang, batang, kulit kayu, getahnya (Sada dan Tanjung, 2010). Salah satu jenis tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah buah delima putih (*Punica granatum*). Buah delima telah lama digunakan sebagai tanaman obat dan hampir semua bagian tanaman bermanfaat untuk kesehatan, mulai daun, bunga, buah, dan kulit akar (Sudjidjo, 2014).

Buah delima mengandung berbagai unsur yang bervariasi pada setiap bagiannya. Pada kulit buahnya mengandung flavonoids, ellagitannins, komponen proanthocyanidin, dan mineral. Biji dan daging buahnya diantaranya mengandung flavonoid dan tannin. Punicalagin, ellagitannin, dan gallotannin merupakan unsur-unsur yang terdapat pada tannin buah delima.

Buah delima merah telah terbukti menunjukkan aktivitas anti-proliferasi, anti-invasif, anti metastasis, dan apoptosis (Khwairakpam et al., 2018). Berbeda dengan buah delima merah, penelitian mengenai aktivitas antikanker buah delima putih belum banyak dilakukan. Mengacu pada hasil-

hasil penelitian tentang buah delima merah tersebut, diasumsikan buah delima putih juga memiliki potensi dan kandungan zat-zat fitokimia yang tidak jauh berbeda terutama kandungan antioksidan dan antikanker.

Dalam perkembangan di bidang kesehatan telah ditemukan berbagai macam obat antikanker, tujuan utama penggunaan obat antikanker adalah merusak secara selektif sel kanker tanpa mengganggu sel normal. Tujuan ini sering mengalami kegagalan dan sampai sekarang masih sedikit sekali obat antikanker yang bekerja secara selektif untuk pengobatan jenis kanker tertentu (Harjono dkk., 2016). Diharapkan dari banyaknya penelitian terhadap tanaman obat akan ditemukan berbagai obat antikanker baru yang aman, efektif, dan efisien. Penelitian beberapa tahun terakhir telah mengungkapkan bahwa buah-buahan dan sayuran yang mengandung senyawa fitokimia dengan sifat antikanker sangat terkait dengan penurunan risiko kanker. Selain itu, produk bahan alam umumnya mempunyai efek samping minimal, menjadikannya kandidat ideal sebagai terapi kanker. (Muaja dkk., 2013; Khwairakpam et al., 2018).

METODE

Sample yang dipakai adalah larva *Artemia salina* untuk tiap konsentrasi (vial) adalah 10. Pada penelitian ini dibuat 6 konsentrasi dengan satu kelompok kontrol. Dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Jadi total sampel yang dibutuhkan sebanyak 280 ekor.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2021. Penelitian dan pembuatan ekstrak delima putih dilakukan di Laboratorium Divisi Kedokteran Hewan Dasar, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.

Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: mesin penyerbuk, alat saring filtrat, rotary evaporator, gelas ukur, neraca analitik, pipet ukur, pipet tetes, batang pengaduk kaca, vial atau botol kaca, aquarium, aerator, lampu.

Bahan penelitian meliputi ekstrak buah delima putih, telur *Artemia salina* dengan merk dagang supreme plus dan air laut yang didapat dari Pasar Ikan Hias Gunungsari, Surabaya.

Persiapan Penelitian

Persiapan yang harus dilakukan berkaitan dengan peralatan maupun bahan. Peralatan yang digunakan haruslah dalam keadaan yang baik dan steril, dan bahanbaik organik maupun bahan kimia yang digunakan harus yang memiliki kualitas baik dan layak digunakan. Setelah dapat dipastikan alat dan bahan telah disiapkan sesuai standart barulah penelitian dapat dilaksanakan.

Tahap Ekstraksi

Ekstrak buah delima putih (*Punica granatum Linn*) didapat dari ekstraksi seluruh bagian buah. Buah delima putih dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50o C lalu dihaluskan menggunakan mesin penyerbuk. Buah yang telah dihaluskan kemudian ditimbang sebanyak 1 kg kemudian dimasukkan dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan larutan etanol 96%. Proses perendaman serbuk buah delima ini dinamakan maserasi. Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dan setiap hari diaduk. Selanjutnya dilakukan penyaringan sehingga didapatkan hasil berupa maserat. Labu erlenmeyer yang berisi maserat selanjutnya dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* pada suhu 90o C dengan kecepatan 50 rpm sampai semua pelarut dan sebagian kandungan air dari buah delima putih terpisah,

sehingga didapatkan cairan ekstrak kental dari buah delima putih.

Tahap Persiapan *Artemia salina*

Air laut dimasukkan dalam wadah kecil yang sudah dibagi menjadi dua bagian ruangan dengan menggunakan sekat. Telur udang *Artemia salina* dimasukkan di salah satu ruang, kemudian ruangan tersebut ditutup sedang sisi lain dibiarkan terbuka atau diberi penerangan untuk menarik udang yang telah menetas melalui lubang sekat, sehingga larva udang dapat terpisahkan dari bagian telur atau kulit telur. Setelah dua hari telur akan berkembang menjadi larva dan siap untuk dilakukan pengujian.

Pembuatan Konsentrasi Sampel Uji

Konsentrasi larutan uji untuk BSLT ialah 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml dan 0 µg/ml (sebagai kontrol negatif). Untuk pembuatan larutan stok, ekstrak ditimbang sebanyak 200 mg, kemudian dilarutkan dengan air laut sebanyak 100 ml, hingga diperoleh konsentrasi larutan stok 2000 µg/ml (Lestari dkk., 2019).

Tahap Perlakuan

Pada uji toksisitas masing - masing konsentrasi dilakukan 4 kali pengulangan dengan tiap kelompok sebanyak 10 ekor larva *Artemia salina*. Disiapkan wadah untuk pengujian, untuk masing - masing konsentrasi ekstrak sampel membutuhkan 6 wadah dan 1 wadah sebagai kontrol untuk masing - masing pengulangan. Selanjutnya pada tiap konsentrasi larutan dimasukan 10 ekor larva *Artemia salina*, pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva *Artemia salina* dimana setiap konsentrasi dilakukan 4 kali pengulangan dan dibandingkan dengan kontrol.

Tahap Pengamatan

Setelah 24 jam perlakuan dapat dilakukan pengamatan. Kriteria standar untuk menilai kematian larva *Artemia salina* yaitu bila larva tidak menunjukkan pergerakan selama 10 detik pengamatan.

Analisis Data

Data dari uji toksisitas tersebut akan dianalisis dengan Analisis Probit untuk mengetahui harga LC50. Analisis statistik dilakukan menggunakan bantuan perangkat lunak program komputer *Statistical Program and Service Solution* (SPSS) for windows versi 25 (Sumihe dkk., 2014).

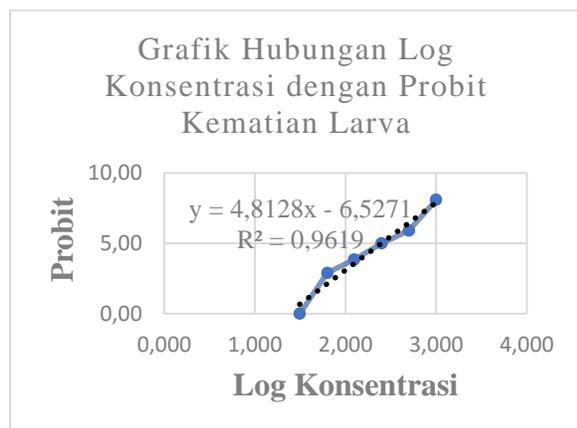
HASIL DAN PEMBAHASAN

Data didapatkan berdasarkan penelitian uji toksisitas ekstrak buah delima putih (*Punica granatum Linn*) terhadap larva *Artemia salina* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test*. Setiap perlakuan menggunakan 10 larva *Artemia salina* sebagai hewan uji dengan jumlah total 280 dari 4 kali replikasi. Hasil dari uji toksisitas ekstrak buah delima putih (*Punica granatum L*) terhadap larva *Artemia salina* termuat pada Tabel 1.

Pada kontrol tidak ditemukan adanya kematian yang menunjukkan bahwa kematian yang terjadi di setiap perlakuan disebabkan oleh pemberian ekstrak buah delima putih bukan karena pengaruh lain dari lingkungan luar. Berdasarkan Gambar 1 diketahui nilai R² sebesar 0,9619 yang mengartikan pengaruh ekstrak buah delima putih dalam membunuh larva *Artemia salina* sebesar 96%. R² adalah kemampuan variabel bebas (konsentrasi) dalam mempengaruhi variabel tergantung (kematian).

Tabel 1. Hasil uji toksisitas ekstrak buah delima putih terhadap larva *Artemia salina*

Replikasi	Jumlah kematian larva tiap perlakuan						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Kontrol
1	0	0	2	5	9	10	0
2	0	1	1	5	8	10	0
3	0	0	2	4	7	10	0
4	0	0	1	6	9	10	0
Total kematian	0	1	6	20	33	40	0
Rata-Rata Kematian	0	0,25	1,5	5	8,25	10	0
% Kematian	0	2,5	15	50	82,5	100	0



Gambar 1. Grafik pengaruh konsentrasi terhadap kematian larva.

Data yang diperoleh kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan program SPSS, uji korelasi pearson dilakukan untuk mengetahui hubungan konsentrasi dengan laju kematian larva. Pada matriks korelasi diperoleh nilai signifikan $< 0,05$ yaitu 0,007 dan nilai korelasi positif dengan angka mendekati 1 yaitu 0,932. Hasil analisis korelasi pearson menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang sempurna antara dosis konsentrasi dengan kematian larva dengan hubungan yang positif yaitu semakin tinggi dosis konsentrasi yang diberikan maka semakin tinggi pula tingkat kematian larva *Artemia salina*.

Uji analisis probit dilakukan untuk membuat estimasi pengaruh variabel bebas terhadap variabel tergantung. Hasil analisis probit menggunakan program SPSS antara konsentrasi ekstrak buah delima putih (*Punica granatum L.*) terhadap persentase kematian larva *Artemia salina* diperoleh harga LC50 sebesar 248,6 $\mu\text{g/ml}$. Nilai LC 50 juga dapat dihitung melalui persamaan garis $y = ax + b$ yang didapat dari Gambar 4.2 bila dimasukkan nilai probit 5 ($y = 5$) untuk persamaan $y = 4,8128x - 6,5271$ maka akan didapatkan nilai $x = \log 2,396$. Selanjutnya nilai x diantilogkan maka akan diperoleh nilai 248,6 $\mu\text{g/ml}$.

Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui adanya pengaruh berbeda berkaitan dengan nilai konsentrasi terhadap tingkat kematian larva. Pada konsentrasi 250 $\mu\text{g/ml}$ diketahui dapat mengakibatkan 50% kematian larva *Artemia salina*, nilai LC 50 tersebut sedikit berbeda dengan hasil analisis probit menggunakan program spss yang bernilai 248,6 $\mu\text{g/ml}$. Hal tersebut disebabkan hasil dari analisis probit dari program SPSS yang merupakan nilai estimasi atau pendugaan sehingga tidak menunjukkan nilai yang sebenarnya, oleh karena itu didalam hasil analisis probit juga memunculkan estimasi interval, yaitu suatu interval

yang menyatakan selang dimana nilai LC 50 yang sebenarnya mungkin berada. Dari analisis yang dilakukan estimasi interval berada pada selang nilai dengan batas bawah 214 dan batas atas 280.

Pada penelitian uji toksisitas ekstrak buah delima putih (*Punica granatum*) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* sebagai kandidat obat antikanker dibuktikan bahwa ekstrak buah delima putih bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* pada uji BSLT. Berdasarkan hasil analisis probit antara konsentrasi ekstrak buah delima putih dengan kematian larva *Artemia salina* diperoleh nilai sebesar 248,6 µg/ml, hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai LC50 < 1000 µg/ml sehingga bersifat toksik.

Kriteria toksisitas untuk penilaian tingkat toksisitas ekstrak tumbuhan diklasifikasikan dengan urutan sebagai berikut: ekstrak dengan LC50 > 1000 µg/ml tidak toksik, LC50 500 - 1000 µg/ml toksik rendah, ekstrak dengan LC50 100 - 500 µg/ml bersifat toksik sedang, sedangkan ekstrak dengan LC50 0 - 100 µg/ml sangat toksik (Hamidi et al., 2014). Dari kriteria tersebut ekstrak buah delima putih termasuk dalam tingkat toksisitas sedang, tingkat toksisitas tersebut memberi makna terhadap potensi aktivitas ekstrak tanaman sebagai kandidat obat antikanker, semakin kecil nilai LC50 maka semakin potensial tumbuhan tersebut digunakan dalam pengobatan kanker.

Buah delima mempunyai kandungan senyawa aktif yang mengakibatkan efek toksik pada larva *Artemia salina*. Diantaranya yaitu senyawa flavonoid dan tannin yang memiliki aktivitas antioksidan dan anti-proliferasi. Senyawa ini paling banyak terkandung didalam buah delima sehingga diduga menjadi penyebab

utama kematian larva *Artemia salina* (Jahromi, 2018).

Penelitian yang pernah dilaporkan oleh Tang et al. (2017) menunjukkan bahwa Ellagitannin (Punicalagin) memiliki aktivitas kemopreventif dan kemoterapi terhadap kanker serviks pada manusia melalui penghambatan jalur β -catenin. Diantara ellagitannins, asam ellagat memiliki aktivitas biologis penting termasuk antitumor, antivirus, dan antimikroba. Selain itu, ditunjukkan bahwa asam ellagat menginduksi lisis sel, apoptosis, dan menurunkan viabilitas sel karena kerusakan DNA dan perubahan dalam siklus sel.

Asam ellagat dapat meningkatkan ekspresi reseptor kematian (apoptosis), antara lain pada *death reseptor* (DR5). *Death reseptor* merupakan bagian dari tumor necrosis factor. Ekspresi DR5 diatur oleh p53, peningkatan p53 akan meningkatkan reseptor DR5. DR5 mengikat stimulasi kematian dan menyebabkan aktivasi *pro-caspase*, yang fungsi utamanya adalah untuk mendorong proses apoptosis. p53 merupakan protein kelompok *tumor suppressor gene* yaitu suatu protein yang berperan sebagai faktor pengendalian pertumbuhan sel, bekerja didalam inti sel, khususnya pada proses pengendalian siklus pembelahan sel. p53 merupakan faktor transkripsi terhadap pembentukan p21, peningkatan p21 yang disintesis akan menekan *cyclin-dependent kinase* (CDK), terjadinya siklus pembelahan sel sangat tergantung pada CDK. Ketika CDK ditekan dan tidak berfungsi maka siklus pembelahan sel akan berhenti (Hernawati, 2012).

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah ekstrak buah delima putih (*Punica granatum*) terbukti

bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* pada uji *Brine Shrimp Lethality Test* dengan nilai LC50 248,6 µg/ml berdasarkan analisis probit, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Hamidi, M., Jovanova B. and Panovska, T. 2014. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Macedonian Pharmaceutical Bulletin. 60(1): 9–18.
- Hardjono S., Siswandono., dan N. W. Diah. 2016. Obat Antikanker. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hernawati, S. 2012. Mekanisme Kerja Ekstrak Buah Delima (*Punica granatum* L) Terstandar Terhadap Degradasi Sel Mukosa Rongga Mulut Mencit Yang Mengalami Transformasi Melalui Ekspresi BCL-2, VEGF, Wild p53 Dan Apoptosis. [Desertasi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.
- Jahromi, S. B. 2018. *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion *unica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention Oncology reviews. 12:345.
- Khwairakpam, A. D., Devivasha B., Krishan K. T., Javadi M., Frank A., Gautam S., Srishti M., Alan P. K. and Ajaikumar B. K. 2018. Possible use of *Punica granatum* (Pomegranate) in cancer therapy. Pharmacological Research. 133: 53–64
- Lestari, D., R. Kartika., dan E. Marliana. 2019. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) Umbi Bawang Tiwai (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb) dan Uji Toksisitas Akut Fraksi Aktif. Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia. 1(1) :1-10.
- Muaja, A. D., H. S. J. Koleangan., dan M. R. J. Runtuwenea. 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. Jurnal MIPA Unsrat Online. 2 (2): 115-118.
- Sada, J. T. dan R. H. R. Tanjung. 2010. Keragaman Tumbuhan Obat Tradisional di Kampung Nansfori Distrik Supiori Utara, Kabupaten Supiori–Papua. Jurnal Biologi Papua. 2(2): 39-46.
- Sudjijo. 2014. Sekilas Tanaman Delima dan Manfaatnya. Iptek hortikultura. 10: 40-43.
- Sumihe, G., M R. J. Runtuwene., dan J. A. Rorong. 2014. Analisis Fitokimia dan Penentuan Nilai LC50 Ekstrak Metanol Daun Liwas. Jurnal Ilmiah Sains. 14(2): 125-128.
- Tang, J., L.Bingshu, S. Hong, C. Liu, J. Min, H. Ming, L. Yang, Y. Liu and L. Hong. 2017. Punicalagin suppresses the proliferation and invasion of cervical cancer cells through inhibition of the β -catenin pathway. Mol Med Rep. 16(2):1439-1444.
