

Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Fahrauk Faramayuda dan Akhirul Kahfi Syam
Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UNJANI

Abstrak - Mikroalga merupakan tumbuhan thalus yang berklorofil dan mempunyai pigmen tumbuhan yang dapat menyerap cahaya matahari melalui proses fotosintesis. Beberapa mikroalga bahkan digunakan sebagai sumber obat-obatan, dan dimanfaatkan dalam industri farmasi. Dalam beberapa tahun belakangan, beberapa industri farmasi telah banyak memanfaatkan mikroalga berbasis farmasi untuk keperluan tertentu. Sebagai contoh adalah mikroalga jenis *Isochrysis galbana* dapat digunakan sebagai sumber bioaktif untuk penyembuhan penyakit tuberkulosis. Mikroalga sebagai sumber vitamin juga dapat diaplikasikan dalam skala besar. *Dunaliella salina* adalah mikroalga merah yang memiliki kandungan beta karotin yang tinggi. beta karoten digunakan sebagai obat peredam nyeri kanker payudara, sebagai obat mata, pencegah penyakit kulit yang mudah iritasi bila terkena sinar matahari, sebagai pencegah penyakit bronkitis, peredam nyeri ketika melahirkan dan sebagainya. *Chlorella vulgaris* merupakan mikroalga jenis klorofita atau alga hijau. Pada umumnya, klorofita atau alga hijau memiliki biopigmen yang digunakan untuk berfotosintesis yaitu klorofil disamping adanya biopigmen karotenoid (karoten dan xantofil). Alga hijau didominasi warna hijau karena berasal dari pigmen klorofil a dan klorofil b. *Chlorella vulgaris* termasuk dalam spesies mikroalga dari kelompok Chlorophyta yang mengandung senyawa sitotoksik seperti flavonoid, tanin, senyawa fenolik, terpenoid, klorofil dan karotenoid. Oleh karena itu akan dilakukan uji sitotoksik dari ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* hasil kultivasi dalam media walne. Hasil pemeriksaan mikroskopis mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki bentuk sel coccus (membulat). Media yang digunakan untuk kultivasi mikroalga adalah pupuk pro analisis dimana populasi terbanyak ada di hari ke duabelas. Pengujian sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), pada konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 ppm belum menunjukkan aktivitas sitotoksik.

Kata kunci : Mikroalga, *Chlorella vulgaris*, Sitotoksik

I. PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang memiliki klorofil sehingga sangat efisien dalam menangkap dan memanfaatkan energi matahari dan karbondioksida untuk keperluan fotosintesis (Kawaroe dkk., 2010). Keberadaannya melimpah di air laut serta memiliki kemampuan bertahan hidup yang tinggi. Keberadaan karbondioksida dan sinar matahari yang cukup sangat mendukung pertumbuhan mikroalga.

Mikroalga spesies *Chlorella vulgaris* mengandung karbohidrat 12-55%, protein 42-58%, lipid 5-40%, klorofil 1-2%, beta-karoten, astaxanthin, cantaxanthin,

lutein, pheophytin, violoxanthin, mineral (Na, K, Ca, Mg, P, Cr, Cu, Zn, Mn, Se, I dan Fe) dan vitamin (B1, B2, B3, B6, B7, B9, B12, C, E, dan A) (Carl Safi, 2014). Selain itu, *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa fenolik, tanin, flavonoid, glikosida jantung, saponin dan terpenoid (Shabudeen, et al., 2015) yang diduga berpotensi sebagai agen toksik. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari *Chlorella vulgaris* mengandung aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan dengan *Porphyridium cruentum* dan *Phaeodactylum tricornutum* (Rodriguez-Garcia, 2008). Studi in vivo telah mengungkapkan khasiat *Chlorella vulgaris* sebagai antitumor yang signifikan dan antigenotoksik (Yasukawa, et al., 1993). Ekstrak *Chlorella vulgaris* ditemukan dapat menginduksi apoptosis dan kerusakan oksidatif pada sel HepG2 kanker hati (Saad, et al., 2006) dan menghambat pertumbuhan serta migrasi sel kanker paru-paru, yang merupakan indeks dari metastasis kanker. Dengan demikian, *Chlorella vulgaris* berpotensi untuk kemoprevensi kanker. Selain itu, ekstrak ini dapat digunakan sumber daya antioksidan alami dan suplemen makanan atau dalam aplikasi farmasi (Hui-Min Wang, et al., 2010).

Metode awal yang sering dipakai untuk mengamati toksisitas senyawa dan merupakan metode penapisan untuk aktivitas antikanker senyawa kimia dalam ekstrak tanaman adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini ditujukan terhadap tingkat mortalitas larva udang *Artemia salina* L. yang disebabkan oleh ekstrak uji. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC₅₀ (*Letal Concentration*) ekstrak uji, yaitu jumlah dosis atau konsentrasi ekstrak uji yang dapat menyebabkan kematian larva udang sejumlah 50% setelah masa inkubasi 24 jam. Senyawa dengan LC₅₀ < 1000 µl dapat dianggap sebagai suatu senyawa aktif berdasarkan Meyer (Colegate, et al, 1993 ; Meyer, et al., 1982). Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dan akurat (Meyer, et al., 1982). Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan toksisitas salah satu spesies mikroalga yaitu *Chlorella vulgaris* dengan menggunakan metode BSLT.

II. METODE PENELITIAN

A. Bahan

Ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* yang diperoleh dari Universitas Indonesia, Jakarta. Hewan percobaan telur udang laut *Artemia salina* L. Bahan yang digunakan adalah air suling, air laut, ammonia, kloroform, HCl, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf,

serbuk Mg, amil alkohol, gelatin 1%, FeCl₃ 1%, eter, pereaksi Liebermann-Burchard, etanol 96 %, vanillin 10%, NaOH, NaNO₃, NaH₂PO₄·2H₂O, Na EDTA, H₃BO₃, MnCl₂·4H₂O, ZnCl₂, CoCl₂·6H₂O, CuSO₄·5H₂O.

B. Alat

Autoklaf, *Laminar Air Flow (LAF)*, botol kultur 1 L, digital pH meter, lampu TL, selang silicon, pipa L gelas, aerator, kaca objek dan kaca penutup, mikroskop, *freeze dryer*, mortir dan stamper, oven, desikator, adsorben (silika gel), cawan penguap, gunting, bunsen, kasa, kaki tiga, pinset, kertas saring, aluminium foil, mikropipet, pipet *Pasteur*, *stopwatch*, lup, lampu bohlam 40 watt, akuarium.

C. Kultivasi Mikroalga *Chlorella Vulgaris*

1) Optimasi Ruangan, Alat dan Media Kultur Jaringan

Sterilisasi ruangan dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 90% dan sterilisasi lantai dengan alkohol 90% atau fenol. Kemudian sterilisasi alat inokulasi (*LAF* kabinet) dilakukan dengan spirtus atau alkohol 70%. *Laminar* dilengkapi dengan lampu UV, sebelum digunakan juga dinyalakan selama 1-2 jam untuk mematikan kontaminan yang ada di permukaan *laminar*. Hal serupa juga dilakukan setelah melakukan penanaman atau inokulasi. Sterilisasi alat-alat logam dan gelas yang akan digunakan dalam kultur jaringan dapat disterilkan dengan *autoklaf* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 30 menit, sedangkan sterilisasi bahan atau media kultur selama 15 menit. Alat-alat seperti pinset dan *scalpel* selain disterilkan dengan *autoklaf* dapat dilakukan dengan pembakaran di atas api bunsen. Botol-botol yang akan disterilisasi sebelumnya ditutup dengan aluminium foil atau plastik dan diikat dengan karet. *Aquadest* disterilkan seperti sterilisasi alat selama 30 menit.

2) Persiapan Medium Kultivasi

a. Penyiapan Larutan Stok Medium

- 1) Ditimbang setiap bahan nutrient sebanyak yang diperlukan.
- 2) Dituang air suling ke dalam gelas kimia sebanyak kira-kira 80% volume akhir larutan yang dibuat.
- 3) Dilarutkan nutrien yang telah ditimbang ke dalam air suling (2) dengan disertai pengadukan (*stirring*) secara terus menerus hingga nutrien terlarut sempurna. Jika larutan terdiri dari beberapa komponen nutrien, maka larutan komponen pertama terlebih dahulu secara sempurna sebelum menambah komponen kedua, dan seterusnya. (Catatan: sebagian besar nutrien larut dengan mudah, namun untuk beberapa diperlukan pemanasan atau pengubahan pH agar terlarut sempurna).
- 4) Ditambahkan air suling ke dalam larutan (3) hingga mencapai volume akhir/volume total yang akan dibuat. Pindahkan larutan ke dalam botol gelas.

- 5) Larutan stok selanjutnya disterilasi dengan autoklaf (kecuali larutan vitamin disterilkan secara aseptis dengan filtrasi menggunakan membran 0,2 µm).
- 6) Disimpan semua larutan stok steril di dalam lemari es (4°C).

b. Penambahan Nutrisi Pada Media Tumbuh

Ditambahkan pupuk pro analisis (Amini, dan Syamdi., 1999 meliputi :

- 1) Larutan A : 100,0 g NaNO₃, 20,0 g NaH₂PO₄·2H₂O, 45,0 g Na-EDTA, 33,6 g H₃BO₃, 0,78 g FeCl₃, 0,36 g MnCl₂·4H₂O, dilarutkan dalam 1000,0 mL air suling
- 2) Larutan B : 2,1 g ZnCl₂, 2,0 g CoCl₂·6H₂O, 0,9 g CuSO₄·5H₂O, dilarutkan dalam 100,0 mL air suling, ditambahkan 10,0 mL HCl pekat.
- 3) Penggunaan larutan A sebanyak 1 mL dan larutan B sebanyak 0,001 mL untuk 1 Liter media kultur.

3) Kultivasi

Menyiapkan 5 botol kaca ukuran 1 L dan tambahkan air suling sebanyak 900 ml ke dalam semua botol, ditutup botol dengan menggunakan tutup karet dan aluminium foil kemudian disterilasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 115-116°C selama 30 menit. Menambahkan pupuk pro analisis larutan A sebanyak 1 mL dan larutan B sebanyak 0,001 mL, kemudian menggunakan digital pH meter diukur pH 7-8 dan ditambahkan 100 mL stok kultur *Chlorella vulgaris* secara aseptis menggunakan lampu bunsen. Menyiapkan aerator, dihubungkan dengan selang ke labu Erlenmeyer 250 ml yang berisi kapas lemak. Mengukur laju aerasi antara 500-700 ml/menit. Menghubungkan dengan selang labu Erlenmeyer 250 ml, ke setiap botol berisi kultur mikroalga. Menyalakan lampu TL, diukur jarak agar didapat intensitas cahaya 5000-10000 lux. Menempatkan botol pada jarak yang telah ditentukan sebelumnya, lalu dinyalakan aerator. Selanjutnya diinkubasi selama 14 hari.

4) Pembuatan Ekstrak

Bahan percobaan adalah mikroalga *Chlorella vulgaris* yang telah dikultivasi dari Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani. Bahan kemudian di determinasi untuk menentukan kebenaran identitas botaninya di Departemen Biologi FMIPA UNPAD, Jati Nangor.

Mikroalga hijau (*Chlorella vulgaris*) yang telah dikumpulkan, di pekatkan dengan *freeze dryer* hingga menjadi ekstrak. Bahan yang telah kering kemudian dihaluskan dan diayak. Ekstrak disimpan dalam wadah yang bersih dan tertutup.

5) Pembiakan Nauplii Udang *Artemia salina* Leach (McLaughlin, 1991)

Pembiakan telur *Artemia salina* dilakukan dalam wadah akuarium berisi air laut yang terdiri dari dua bagian yang berhubungan yaitu bagian terang yang

disinari lampu dan bagian gelap yang ditutup dengan *aluminium foil*. Telur *Artemia salina* yang akan ditetaskan, terlebih dahulu direndam dalam air suling selama ± 1 jam, kemudian telur yang mengapung dibuang dan yang mengendap dimasukkan ke dalam tempat penetasan diletakkan pada bagian gelap bejana untuk ditetaskan, setelah kira-kira 24 jam nauplii yang telah menetas akan berenang menuju tempat yang terang. Nauplii yang digunakan untuk uji adalah yang berumur 48 jam setelah menetas.

6) Penyiapan Uji BSLT

Jumlah nauplii *Artemia salina* Leach yang digunakan adalah 10 ekor nauplii tiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini terdapat lima kelompok perlakuan dibuat dalam konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dalam air laut. Botol disiapkan untuk pengujian, dimana masing-masing konsentrasi dilakukan triplo dan ditambah dengan 1 botol sebagai kontrol (blanko). Ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg dalam vial yang sebelumnya ditara terlebih dahulu kemudian ekstrak dilarutkan dalam 100 ml air laut. Larutan tersebut masing-masing dianggap sebagai larutan induk (100 $\mu\text{g/mL}$). Kemudian masing-masing larutan induk dibuat pengenceran untuk rangkaian konsentrasi uji. Sebanyak 200 μL larutan induk dipipet untuk konsentrasi 2 $\mu\text{g/mL}$, 400 μL larutan induk dipipet untuk konsentrasi 4 $\mu\text{g/mL}$, 600 μL larutan induk dipipet untuk konsentrasi 6 $\mu\text{g/mL}$, 800 μL larutan induk dipipet untuk konsentrasi 8 $\mu\text{g/mL}$, dan 1000 μL larutan induk dipipet untuk konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian larutan induk yang telah dipipet dimasukkan ke dalam masing-masing vial, ditambahkan air laut sebanyak 3 mL agar saat nauplii udang ditambahkan tidak terlalu pekat, lalu baru setelah itu dimasukkan 10 ekor nauplii udang, dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, sehingga konsentrasi kelompok perlakuan masing-masing menjadi 2, 4, 6, 8 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ lalu didiamkan selama 24 jam.

7) Prosedur Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Metode BSLT digunakan untuk mempelajari toksisitas sampel secara umum dengan menggunakan telur udang (*Artemia salina* Leach).

Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan (triplo). Larutan diaduk sampai homogen. Untuk kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah nauplii udang yang mati dan masih hidup dari tiap tabung. Angka mati dihitung dengan menjumlahkan nauplii udang yang mati dalam setiap konsentrasi. Angka hidup dihitung dengan menjumlahkan nauplii udang yang hidup dalam setiap konsentrasi.

Selanjutnya dihitung mortalitas dengan cara: akumulasi mati dibagi jumlah akumulasi hidup dan mati (total) dikali 100%. Grafik dibuat dengan logaritma 10 dari konsentrasi sebagai sumbu x terhadap nilai persen kematian yang telah dikonversi menjadi nilai Probit sebagai sumbu y. Nilai LC_{50} merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50 % (nilai Probit 5,0) yang diperoleh dengan memakai persamaan regresi

linier $y = bx + a$. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm. Sedangkan untuk senyawa murni dikatakan toksik apabila nilai ≤ 30 ppm.

% kematian =

$$\frac{\text{jumlah kematian nauplii} - \text{jumlah kematian nauplii pada kontrol}}{\text{jumlah nauplii awal}}$$

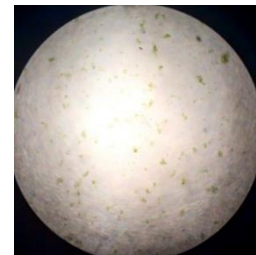
8) Analisis Hasil

Analisis hasil diolah menggunakan analisis probit dengan SPSS. Nilai probit dimasukkan ke dalam data SPSS untuk mendapatkan nilai LC_{50} dari masing-masing konsentrasi ekstrak. Nilai LC_{50} menunjukkan persentase kematian sel pada larva udang *Artemia* sebanyak 50%.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pemeriksaan Mikroskopis

Dilakukan identifikasi sampel mikroalga *Chlorella vulgaris* untuk menjamin keaslian bahan yang digunakan. Hasil pemeriksaan mikroskopis bentuk sel mikroalga *Chlorella vulgaris* membulat.



Gambar 1. Bentuk Sel Mikroalga *Chlorella vulgaris* Perbesaran 100 x



Gambar 2. Bentuk Sel Mikroalga *Chlorella vulgaris* Perbesaran 400 x

B. Kultivasi

Kultivasi mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan dengan menggunakan medium pro analisis dan pada hari ke duabelas kultivasi dihentikan.



Gambar 3. Kultivasi mikroalga *Chlorella* hari ke 12

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki bentuk sel coccus (membulat). Media yang digunakan untuk kultivasi mikroalga adalah pupuk pro analisis dimana populasi terbanyak ada di hari ke duabelas. Pengujian sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), pada konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 belum menunjukkan aktivitas sitotoksik.

Perlu dilakukan optimasi teknik kultur mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan medium pertumbuhan lain seperti NPK.

DAFTAR PUSTAKA

- Kawaroe M., Prariono T., Sunuddin A., Wulan Sari D., Augustine D. 2010. *Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press.
- Carl Safi, Bachar Zebib, Othmane Merah, Pierre-Yves Pontalier, Carlos Vaca-Garcia. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Journal of Elsevier; Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol 35, Pages. 265–278
- Shabudeen Syed, Ashok Arasu, Indhumathi Ponnuswamy. 2015. The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bioactive Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. *International Journal of Bioscience and Biotechnology*. Vol. 7, No. 1, Pages. 185-190.
- Rodriguez-Garcia I, Guil-Guerrero JL. 2008. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem*. Vol. 108, Pages. 1023.
- Yasukawa K, Akihisa T, Kanno H, Kaminaga T, Izumida M, Sakoh T, et al. 1996. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-otetradecanoyl phorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biol Pharm Bull*. Vol. 19, Pages. 573.
- Malaysian Journal of Pathology, Md. Saad S, Mohd Yusof YA, Wan Ngah WZ. 2006. Comparison between locally produced *Chlorella vulgaris* and *Chlorella vulgaris* from Japan on proliferation and apoptosis of liver cancer cell line, HepG2. *Malays J Biochem Mol Biol*. Vol. 13, Pages. 32.
- Hui-Min Wang, Jian-Liang Pan, Chun-Yen Chen, Chien-Chich Chiu, Mu-Hoe Yang, Hsueh-Wei Chang, Jo-Shu Chang. 2010. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Elsevier; Process Biochemistry*. Vol. 45, Page. 1865–1872.
- Colegate, S.M. & J.M. Russel. 1993. *Bioactive Natural Products, Detection, Isolation, and Structural Determination*. Boca Raton USA: CRC Press. A. Page 442,444-448.
- Amini, Sri. dan Syamdidi,. 1999. Konsentrasi Unsur Hara Pada Media dan Petumbuhan *Chlorella vulgaris* dengan Pupuk Anorganik Teknis dan Analisis. *Jurnal Perikanan (J. Fish. Sci.)*. Vol. 8, No. 2, Hal. 201-206.
- McLaughlin, Jerry L. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality : Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation, Methods in Plant Biochemistry. Academic Press. *Harcourt Brace Jovanovich Publisher; Assay for Bioactivity*. Vol. 6, Page 8-10.