



Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Isolat Bakteri Asal Sarang Lebah Madu (*Apis cerana* F.)

Alfira Oksalina Shintha¹, Fauziah¹, Yekki Yasmin¹, Lenni Fitri^{1*}

¹Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Syiah Kuala, Jl. Tgk Syeek Abdurrauf No. 7 Darussalam, Banda Aceh 23111

INFO ARTIKEL

* Penulis koresponden
email: lennifitri@usk.ac.id

Kata kunci: Bakteri sarang lebah madu
LC₅₀
Artemia salina
BSLT

Keywords: *Beehive bacteria*
LC₅₀
Artemia salina
BSLT

ABSTRAK

Bakteri asal sarang lebah telah diketahui memiliki potensi antibakteri dan sitotoksik pada penelitian sebelumnya. Penelitian mengenai potensi sitotoksik dari bakteri asal sarang lebah madu masih sedikit dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas ekstrak bakteri asal sarang lebah madu, BSL 1, BSL 2, BSL 3, BSL 6, dan BSL 7 terhadap larva *Artemia salina* Leach. Metode yang digunakan dalam menentukan nilai LC₅₀ adalah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), dengan konsentrasi 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm dan 0 ppm, kemudian dianalisis dengan analisis probit menggunakan aplikasi SPSS. Analisis hasil LC₅₀ dari isolat BSL 1 adalah 1643,653 ppm, BSL 2 adalah 1143,989 ppm, BSL 3 adalah 2662,499 ppm, BSL 6 adalah 663,805 ppm, dan BSL 7 adalah 9200,545 ppm. Hasil penelitian menunjukkan BSL 6 memiliki nilai LC₅₀ terbaik, yakni 663,805 ppm.

ABSTRACT

Beehive bacteria have been known to have antibacterial and cytotoxic potency in previous studies. Research on the cytotoxic potency of beehive bacteria is still limited. This study aims to determine the level of toxicity of the bacterial extract from beehive, BSL 1, BSL 2, BSL 3, BSL 6, and BSL 7 against larvae of *Artemia salina* Leach. The method used in determining the LC₅₀ value is the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method, with a concentration of 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm and 0 ppm, then analyzed by probit analysis using the SPSS application. Analysis of the results of LC₅₀ from isolate BSL 1 is 1643,653 ppm, BSL 2 is 1143,989 ppm, BSL 3 is 2662,499 ppm, BSL 6 is 663,805 ppm, and BSL 7 is 9200,545 ppm. The results showed that BSL 6 had the best LC₅₀ value at 663.805 ppm.

1. PENDAHULUAN

Sarang lebah merupakan tempat perkembangbiakan lebah, produksi madu dan tempat perlindungan bagi koloni lebah dari serangan predator (Yuliana, 2015). Sarang lebah diketahui memiliki senyawa bioaktif, seperti senyawa tanin, asam fenolat dan flavonoid yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber obat (Hartini, 2017). Pemanfaatan sarang lebah sebagai sumber obat alami diharapkan dapat membantu meningkatkan upaya pengembangan obat dari bahan alam yang kini masih terus dilakukan. Meo *et al.* (2017) menyatakan bahwa madu memiliki manfaat sebagai antioksidan, antibakteri dan anti inflamatori. Sehingga madu banyak digunakan sebagai bahan obat untuk berbagai penyakit.

Tahapan awal untuk menemukan sumber obat dari bahan alam dapat dilakukan dengan menggunakan uji

toksisitas awal. Toksisitas merupakan kemampuan suatu zat kimia untuk menimbulkan kerusakan pada organisme. Toksisitas yang bekerja pada tingkat sel disebut dengan sitotoksik (Priyanto, 2015). Salah satu metode dalam uji toksisitas awal dapat dilakukan dengan uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Meyer *et al.*, 1982). Menurut Yasmin *et al.* (2019), ekstrak bakteri asal sarang lebah madu memiliki kemampuan sebagai zat sitotoksik, karena nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) pada pengujian dengan metode BSLT menunjukkan bahwa ekstrak bakteri asal sarang lebah madu tergolong ke dalam senyawa toksik.

Metode BSLT merupakan uji sitotoksik dari suatu ekstrak berdasarkan kemampuannya untuk membunuh larva *Artemia salina* Leach yang dikultur di laboratorium. *A. salina* Leach digunakan karena kemudahan dalam penetasan larvanya. Jumlah larva yang mati dihitung setelah 24 jam untuk menentukan nilai LC₅₀, nilai tersebut digunakan

dalam penggolongan toksisitas suatu senyawa terhadap hewan uji (Meyer *et al.*, 1982). Menurut Hodgson & Levi (2000) LC₅₀ adalah perkiraan konsentrasi suatu zat yang dapat membunuh 50% dari total hewan uji. Metode BSLT adalah salah satu cara cepat, mudah, sederhana dan murah dalam tahapan awal uji sitotoksik.

Hasil penelitian Siregar (2019) telah didapatkan tujuh jenis isolat bakteri asal sarang lebah. Isolat tersebut adalah BSL1, BSL 2, BSL 3, BSL 6 dan BSL 7. Hasil karakteristik morfologi dan fisiologis menunjukkan bahwa BSL 1, BSL 3, BSL 6 dan BSL 7 merupakan bakteri dari genus *Bacillus* dan BSL 2 dari genus *Microccus*. Uji sitotoksik oleh Yasmin *et al.* (2019), menunjukkan nilai LC₅₀ salah satu ekstrak isolat bakteri asal sarang lebah (BSL 4), sebesar 86,985 ppm dan ekstrak etanol sarang lebah sebesar 67,744 ppm yang termasuk ke dalam golongan senyawa toksik menurut ketentuan Meyer *et al.* (1982). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai LC₅₀ ekstrak bakteri asal sarang lebah madu terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT.

2. METODOLOGI PENELITIAN

Ekstrak isolat bakteri asal sarang lebah

Isolat bakteri asal sarang lebah yang disimpan di media NA dilakukan peremajaan, kemudian NA diambil dan dipisahkan menggunakan *cork borer* berdiameter 5 mm sebanyak 5 buah ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 250 mL yang mengandung 150 mL media cair *Nutrient Broth* (NB). Selanjutnya diinkubasi dalam *shaker* inkubator dengan kecepatan 125 rpm selama 2 hari pada suhu ruang. Biomassa sel dipisahkan menggunakan kertas saring lalu disentrifugasi pada kecepatan 11000 rpm selama 15 menit (Nurjanah, 2019). Bagian supernatan diambil sebagai larutan uji dalam penelitian ini. Setelah mendapatkan supernatan dari isolat BSL 1, BSL 2, BSL 3, BSL 6 dan BSL 7 dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm dan 250 ppm (Lampiran 1.) dari masing-masing isolat, sehingga setiap isolat akan memiliki empat jenis tingkat konsentrasi yang selanjutnya akan diujikan ke larva udang *A. salina* pada pengujian BSLT.

Penetasan telur *A. salina*

Metode penetasan Telur *A. salina* telah dimodifikasi dari penelitian Kadarisman (2000) sebanyak 20 mg telur ditambahkan dengan 2 L air laut yang diperoleh dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Ujung Batee, Banda Aceh ke dalam stoples. Kemudian, diberi pencahayaan lampu TL agar telur menetas sempurna dan aerator dimasukkan. Telur diinkubasi selama 48 jam, telur yang telah menetas selanjutnya dapat diuji.

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Larutan ekstrak sebanyak 1 mL yang telah dibuat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan air laut dan 10 ekor larva *A. salina* hingga volume mencapai 5 mL. Sebagai kontrol dipakai air laut yang berisi 10 ekor larva *A. salina* ke dalam tabung reaksi hingga volume mencapai 5 mL. Setelah dibiarkan selama 24 jam, larva *A. salina* yang masih hidup dan yang sudah mati kemudian dihitung jumlahnya. Setiap sampel dilakukan uji mortalitas sebanyak tiga kali pengulangan. Data yang

diperoleh dimasukkan ke dalam lembar pengamatan, dan dianalisa untuk menentukan nilai LC₅₀ (Puspitasari, 2008).

Analisis Data

Data hasil penelitian akan dianalisis dengan analisis probit menggunakan SPSS Statistik 23.0 untuk mendapatkan nilai LC₅₀.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dilakukan dengan melihat pengaruh ekstrak terhadap larva *Artemia salina* yang menyebabkan kematian. Metode BSLT lazim digunakan dalam pengujian tahap awal untuk mengetahui toksisitas suatu larutan uji. Penelitian ini menggunakan ekstrak bakteri asal sarang lebah madu yang diperoleh dari hasil penelitian Yasmin *et al.* (2019) yaitu BSL 1, BSL 2 dan BSL 3, serta penelitian Siregar (2019) yaitu BSL 6 dan BSL 7. Isolat yang diekstrak berupa supernatan sebagai larutan uji, dengan konsentrasi 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm dan 0 ppm. Penggunaan tingkat konsentrasi yang bervariasi berguna untuk melihat hubungan antara konsentrasi larutan uji dengan kematian *A. salina*. Parra *et al.* (2001) menyatakan bahwa perbedaan konsentrasi setiap larutan berguna untuk menentukan rentang konsentrasi yang memiliki korelasi linear antara konsentrasi larutan uji dan kematian dari larva *A. salina*. Eksperimen yang melibatkan uji BSLT dari ekstrak tanaman dalam pengujian toksisitas menggunakan rentang konsentrasi mulai dari 10, 100 dan 1000 µg/mL.

Larva *A. salina* yang digunakan berusia 48 jam yang sebelumnya telah diinkubasi menggunakan air laut. Menurut Sorgeloos *et al.* (1978) larva yang berusia 48 jam (fase nauplius) digunakan dalam uji toksisitas dikarenakan pada fase tersebut *A. salina* lebih sensitif terhadap toksikan yang diberikan dibandingkan fase lainnya. Hasil uji BSLT yang diperoleh merupakan data kematian larva *A. salina* pada tiap tingkat konsentrasi yang diamati selama 24 jam. Hodgson & Levi (2000) menyatakan bahwa uji toksisitas suatu senyawa yang diamati dalam waktu singkat yakni 24 hingga 48 jam termasuk ke dalam uji toksisitas akut. Efek yang ditimbulkan dari uji toksisitas akut dapat langsung dilihat dalam penelitian ini yakni kematian larva *A. salina*. Kematian yang terjadi pada *A. salina* disebabkan oleh senyawa aktif yang ditandai dengan tidak adanya motilitas pada *A. salina* dalam uji BSLT. Menurut Michael *et al.* (1956) ketika senyawa toksik mempengaruhi *A. salina* maka akan terjadi penurunan kemampuan berenang dan menyebabkan *A. salina* tenggelam ke dasar.

Table 1. Mortalitas larva *A. salina*

Konsentrasi	Mortalitas				
	BSL 1	BSL 2	BSL 3	BSL 6	BSL 7
1000	14	14	2	17	3
750	10	13	3	17	2
500	7	8	0	11	4
250	7	6	0	10	0
K (0)	0	2	0	2	0
Total	38	43	5	57	9
Mortalitas					

Berdasarkan Tabel 1 Total angka kematian larva tertinggi dimiliki oleh ekstrak isolat bakteri BSL 6 dengan total 57 ekor, konsentrasi 1000 ppm dan 750 ppm memiliki

jumlah kematian larva *A. salina* sebanyak 17 ekor. Total angka kematian terendah dimiliki oleh ekstrak isolat bakteri BSL 3 yaitu sebanyak 5 ekor. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak isolat bakteri BSL 3 dan BSL 7 tidak mengalami peningkatan kematian larva *A. salina* serta tidak menunjukkan adanya hubungan antara kematian dan konsentrasi larutan uji. Hal tersebut diduga disebabkan oleh senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak isolat BSL 3 dan 7 tidak memiliki efek berarti terhadap larva *A. salina* karena tidak menunjukkan peningkatan angka kematian pada tiap konsentrasi larutan uji yang semakin tinggi.

Kematian yang terjadi pada larva *A. salina* dengan pemberian ekstrak isolat BSL 1, 2 dan 6 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak bakteri yang diberikan, maka semakin tinggi pula kematian yang terjadi pada larva *A. salina*. Parra *et al.* (2001) menyatakan bahwa peningkatan kematian larva *A. salina* sebanding dengan peningkatan konsentrasi larutan uji, maka semakin tinggi konsentrasi larutan uji yang digunakan maka semakin tinggi pula kematian yang terjadi pada larva *A. salina*.

Mardany *et al.* (2016) menyatakan bahwa penyerapan senyawa toksik oleh *A. salina* terjadi melalui oral dan dermal. Secara oral senyawa toksik masuk melalui bagian mulut dan diserap ke dalam saluran pencernaan. Secara dermal senyawa toksik masuk melalui membran sel dan diserap kemudian didistribusi ke dalam tubuh *A. salina* dan mengganggu reaksi metabolisme. Ningdya *et al.* (2015) menyatakan bahwa penyebaran senyawa toksik dalam tubuh *A. salina* dapat terjadi karena perubahan gradien konsentrasi yang drastis antara di dalam dan di luar sel. Kematian diduga disebabkan oleh kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak bakteri asal sarang lebah tersebut. Kematian yang terjadi pada larva *A. salina* disebabkan oleh gangguan metabolisme larva yang merupakan efek dari senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak bakteri.

Berdasarkan penelitian Fitri *et al.* (2020) BSL 6 diketahui mengandung senyawa saponin, sehingga kematian *A. salina* diduga disebabkan oleh senyawa saponin yang terkandung dalam ekstrak bakteri BSL 6. Berdasarkan penelitian Sharma & Paliwal (2013) senyawa saponin diketahui dapat menyebabkan terjadinya apoptosis pada sel-sel kanker karena senyawa ini memberikan agen antikanker. Membran kulit *A. salina* yang tipis dapat dianalogikan dengan kematian sebuah sel dalam organisme akibat efek sitotoksik dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam larutan uji (Croghan, 1957). Menurut Shashi & Ashoke (1991) senyawa saponin dapat merusak saluran pencernaan.

Nilai *Lethal Concentration* 50 (LC₅₀) dihitung dari jumlah kematian larva *A. salina* yang disebabkan oleh pemberian larutan uji ekstrak bakteri asal sarang lebah. Hasil perhitungan nilai LC₅₀ diperoleh dengan menggunakan analisis probit dengan nilai Logaritma 10 dapat dilihat pada Tabel 2.

Table 2. Nilai LC₅₀ ekstrak isolat bakteri asal sarang lebah

No.	Kode Isolat	Nilai LC ₅₀
1.	BSL 1	1643,653
2.	BSL 2	1143,989
3.	BSL 3	2662,499
4.	BSL 6	663,805
5.	BSL 7	9200,545

Nilai LC₅₀ menunjukkan estimasi konsentrasi larutan uji yang akan membunuh 50% dari populasi hewan uji

(Hudgson & Levi, 2000). Total hewan uji yang digunakan adalah 30 ekor, sehingga nilai LC₅₀ dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak yang mampu membunuh 15 ekor larva *A. salina*. Ketentuan Meyer *et al.* (1982) menyatakan bahwa ekstrak dengan nilai LC₅₀ kurang dari 1000 merupakan ekstrak dengan kandungan senyawa toksik dan ekstrak dengan nilai LC₅₀ lebih dari 1000 merupakan ekstrak dengan kandungan senyawa tidak toksik (Tabel 3). Meyer *et al.* (1982) menyatakan bahwa semakin kecil nilai LC₅₀ maka semakin toksik kandungan suatu senyawa. Ekstrak yang mengandung senyawa toksik adalah ekstrak isolat bakteri BSL 6 dengan nilai LC₅₀ < 1000 ppm yakni 663,805 ppm. Ekstrak BSL 6 mampu membunuh 50% larva udang pada konsentrasi 663,805 ppm.

Table 3. Nilai LC₅₀ ekstrak isolat bakteri asal sarang lebah

No.	Nilai LC ₅₀ (µg/ mL)	Kategori Toksisitas
1.	<1000	Toksik
2.	>1000	Tidak Toksik

Berdasarkan analisis pohon filogenetik menggunakan metode pendekatan *neighbor joining*, isolat BSL 6 diketahui memiliki kekerabatan tertinggi dengan *Bacillus siamensis* strain 64X-5 dan nilai presentase bootstrap 60% (Fitri *et al.*, 2020). Sumpavapol *et al.* (2010) menyatakan bahwa *Bacillus siamensis* merupakan bakteri Gram positif, anaerob fakultatif, berbentuk tunggal, berantai pendek dan berpasangan. *Bacillus* tergolong ke dalam bakteri heterotrofik dan termasuk dalam mikroorganisme dekomposer (Rheinheimer, 1980). Menurut Chaabouni *et al.* (2012) spesies *Bacillus* banyak dikenal dari metabolit sekundernya, kelompok bakteri ini memiliki cakupan yang luas terhadap berbagai macam jenis metabolit sekunder yang dimiliki seperti antibiotik, pigmen, toksin, promotor pertumbuhan dan inhibitor enzim. Berdasarkan penelitian El-sersy *et al.* (2012) diketahui bahwa bakteri jenis *Bacillus subtilis* sp. memiliki nilai inhibisi tinggi terhadap *human cervix adenocarcinoma* (HeLaS3) dalam uji MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) *assay* yakni sebesar 77,2 % dalam masa inkubasi 72 jam, yang menunjukkan potensi *Bacillus subtilis* sp. dalam menghasilkan senyawa antikanker. Secara umum metabolit sekunder digunakan sebagai bentuk pertahanan di lingkungan alami, digunakan sebagai senjata melawan bakteri lain, fungi, amoeba, tumbuhan dan serangga.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak isolat bakteri BSL 6 tergolong ke dalam senyawa toksik dengan nilai LC₅₀ 663,805 ppm. Ekstrak isolat bakteri BSL 1, BSL 2, BSL 3 dan BSL 7 tidak tergolong ke dalam senyawa toksik karena nilai LC₅₀ > 1000 ppm.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Chaabouni, I., Guesmi, A. & Cherif, A. (2012). Secondary Metabolites of *Bacillus*: Potentials in Biotechnology. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology, 347-366.
- Croghan, S. P. (1957). The Osmotic and Ionic of *Artemia salina* (L.). *Journal of Experimental Biology*, 35, 219-233.

- El-sersy, N. A., Abdelwahab, A. E., Abouelkhiir, S. S., Abou-Zeid, D. & Sabry, A., S. (2012). Antibacterial and Anticancer activity of ϵ - poly-L-lysine (ϵ -PL) Produced by a Marine *Bacillus subtilis* sp. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 1-10.
- Fitri, L., Yasmin, Y., Fauziah, Septiani, D. A. & Suhartono. (2020). Characterization of BSL 6 Isolates Isolated from Honey beehive and to Determine its Antibacterial Activity. *Biodiversitas*, 21, 4859-4865.
- Hartini. (2017). Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Sarang Lebah dari Luwu Utara Terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Bioedukasi*, 10, 44-46.
- Hodgson, E. & Levi, P., E. (2000). *Modern Toxicology*. The McGraw-Hill Companies, Singapore.
- Kadarisman, I. (2000). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Kimia Bioaktif dari Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* R.) (Tugas Akhir). Jurusan Kimia FMIPA IPB, Bogor.
- Mardany, M. P., Linus, Y., Chrystomo, & Karim, A. K. (2016). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Sitotoksik dari Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia beccarii* Hook.f.) Asal Kabupaten Merauke. *Jurnal Biologi Papua*, 8, 13-22.
- Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L. & Ansari, M. J. (2016). Role of Honey in Modern Medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E. & Mc Laughlin, J. L. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- Michael, A. S., Thompson, C. G. & Abramovitz M. (1956). *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science*, 123, 464.
- Ningdyah, A. W., Alimuddin, A. H. & Jayuska, A. (2015). Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *JKK*, 4, 75-83.
- Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardinas, I. G. & Buela, L. I. (2001). Comparative Study of The Assay of *Artemia salina* L. and The Estimate of The medium Lethal Dose (LD_{50} Value) in Mice, to Determine Oral Acute Toxicity of Plant Extracts. *Phytomedicine*, 8, 395-400.
- Priyanto. (2015). *Toksikologi, Mekanisme, Terapi Antidotum dan penilaian resiko*. Lembaga Studi Dan Konsultasi Farmakologi, Jawa Barat.
- Sorgeloos, P., Wielen, C. R. V. D. & Persoone, G. (1978). The Use of *Artemia nauplii* for Toxicity Test- A Critical Analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2, 249-255.
- Sharma, V. & Paliwal, R. (2013). Isolation and Characterization of Saponins from *Moringa oleifera* (Moringaceae) Pods. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 179-183.
- Shashi, B. M. & Ashoke, K. N. (1991). Tripenoid Saponins Discovered Between 1987 and 1989. *Phytochemistry*, 30, 1357-1387.
- Siregar, F. W. (2019). Aktivitas Antibakteri dan Uji Toksisitas Bakteri Asal Sarang Lebah Madu (Tugas Akhir). Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.
- Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P. & Visessanguan, S. (2010). *Bacillus siamensis* sp. Nov., Isolated from Salted Crab (poo-khem) in Thailand. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2364-2370.
- Yasmin, Y., Fitri, L., Fauziah & Wasliyah, F. (2019). Isolation of Bacteria from *Apis cerana* Hive, Their Antibacterial Potency and Cytotoxicity. *Biodiversitas*, 20, 2733-2738.
- Yuliana, R., Sutariningsih, E., Santoso, H. B., Hendarto, K.A. & Riendrasari, S.D. (2015). Daya Antimikrobia Sarang Lebah Madu *Trigona* spp. Terhadap Mikrobial Patogen. *Jurnal Bioedukasi*, 8, 67-70.