

Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Jamur yang Diisolasi dari Spons *Phyllospongia foliascens* Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Maria Esmeralda Elvira Ngedo Reo¹, Komang Tria Noviana Dewi¹, Ni Putu Eka Leliqia^{1,2} dan Ni Putu Ariantari^{1,2}

¹ Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Badung, Bali 80361

² Program Studi Magister Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Denpasar, Bali 80114

Reception date of the manuscript: 26 September 2024

Acceptance date of the manuscript: 1 Agustus 2025

Publication date: 30 Agustus 2025

Abstract— Marine fungi are microorganisms that live in the marine environment and can associate with various marine organisms, such as algae, sponges, and others. They are known for their capability to produce secondary metabolites with various pharmacological activities, including cytotoxic compounds. In our previous study, *Aspergillus nomiae*, *Penicillium steckii*, *Penicillium citrinum*, and *Aspergillus niger* were isolated from the sponge *Phyllospongia foliascens*, collected in Amed Beach, Bali. The present study aims to evaluate the toxicity of methanolic extracts afforded after rice fermentation of those fungi against *Artemia salina* larvae using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. For the assay, each treatment group consisting of ten *A. salina* larvae in artificial seawater was exposed to each fungal extract with concentrations ranging from 3.9 to 1000 µg/mL in a 24-microwell plate. After incubation for 24 h, the number of dead larvae in each well was counted and the LC₅₀ was calculated through probit analysis. The results of this study indicate that extracts of *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum*, and *A. niger* exhibit toxic effects against *A. salina* larvae, with LC₅₀ values of 68.47, 83.43, 85.04, and 12.20 µg/mL, respectively. In addition, TLC analysis showed that each extract contains various secondary metabolites, including alkaloids, flavonoids, terpenoids, triterpenoids, and polyphenols. The BSLT method is commonly used as a screening test to evaluate the potential cytotoxicity of an extract; therefore, further studies on the cytotoxic effects of *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum*, and *A. niger* extracts against cancer cells are promising.

Keywords—*Aspergillus niger*, *Aspergillus nomiae*, Brine Shrimp Lethality Test, *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii*, *Phyllospongia foliascens*, Sponge, Toxicity

Abstrak— Jamur laut adalah mikroorganisme yang hidup di lingkungan laut dan dapat berasosiasi dengan berbagai organisme laut, seperti alga, spons, dan lainnya. Jamur ini dikenal memiliki kemampuan untuk menghasilkan metabolit sekunder dengan berbagai aktivitas farmakologi, termasuk senyawa sitotoksik. Dalam penelitian sebelumnya, *Aspergillus nomiae*, *Penicillium steckii*, *Penicillium citrinum*, dan *Aspergillus niger* telah diisolasi dari spons *Phyllospongia foliascens* yang dikoleksi dari Pantai Amed, Bali. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi toksisitas ekstrak metanol yang diperoleh setelah fermentasi pada media beras dari keempat jamur tersebut terhadap larva *Artemia salina* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Dalam pengujian ini, setiap kelompok perlakuan terdiri dari sepuluh larva *A. salina* dalam air laut buatan dan dipaparkan dengan masing-masing ekstrak pada konsentrasi antara 3,9 hingga 1000 µg/mL dalam lempeng 24-sumuran. Setelah diinkubasi selama 24 jam, jumlah larva yang mati di setiap sumur dihitung, dan nilai LC₅₀ dihitung menggunakan analisis probit. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum*, dan *A. niger* memiliki efek toksik terhadap larva *A. salina*, dengan nilai LC₅₀ masing-masing sebesar 68,47; 83,43; 85,04; dan 12,20 µg/mL. Selain itu, hasil analisis KLT menunjukkan masing-masing ekstrak mengandung senyawa metabolit sekunder dari golongan alkaloid, flavonoid, terpenoid, triterpenoid, dan polifenol. Metode BSLT umum digunakan sebagai uji skrining untuk menilai potensi sitotoksitas suatu ekstrak, sehingga penelitian lebih lanjut mengenai efek sitotoksik ekstrak *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum*, dan *A. niger* terhadap sel kanker perlu dilakukan.

Kata Kunci—*Aspergillus niger*, *Aspergillus nomiae*, *Brine Shrimp Lethality Test*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii*, *Phyllospongia foliascens*, Spons, Toksisitas

1. PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara dengan keanekaragaman hayati laut yang paling tinggi di dunia. Hal ini

Penulis koresponden: Ariantari, putu_aariantari@unud.ac.id

diperkuat oleh fakta bahwa perairan Indonesia memiliki wilayah terumbu karang terluas secara global, yaitu mencapai 51.020 km² atau sekitar 17,95 % dari total luas terumbu karang dunia. Terdapat lebih dari 35.000 spesies biota laut di Indonesia yang berpotensi sebagai sumber bahan baku obat (Anisa et al., 2014). Spons laut menjadi habitat bagi berbagai mikroorganisme, termasuk jamur laut yang menghasilkan metabolit sekunder dengan potensi bioaktif, seperti antimikroba dan antikanker (Rosita et al., 2017). Spons juga mampu mensintesis senyawa organik kompleks, seperti poliketida dan alkaloid, yang berpotensi digunakan dalam pengembangan obat (Izzati et al., 2021). Selain itu, spons juga berperan sebagai inang bagi berbagai mikroorganisme yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif. Salah satu genus spons yang diketahui memiliki kemampuan tersebut adalah *Phyllospongia foliascens* (Zhang et al., 2017).

Penelitian oleh Putra et al. (2025) berhasil mengisolasi empat isolat jamur dari spons *Phyllospongia foliascens* yang dikoleksi dari pantai Amed, Bali dengan yakni *Aspergillus nomiae*, *Penicillium steckii*, *Penicillium citrinum* dan *Aspergillus niger*. Keempat isolat jamur tersebut difermentasi pada media beras dan ekstrak metanol yang diperoleh dari fermentasi keempat jamur tersebut dilaporkan mengandung alkaloid, flavonoid, polifenol, terpenoid, dan triterpenoid. Ekstrak tersebut dilaporkan aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Methicillin-resistant S. aureus* (MRSA) dan *Staphylococcus epidermidis*. Berbagai senyawa alkaloid, flavonoid dan terpenoid juga dilaporkan aktif menghambat sel kanker pada berbagai studi. Pada penelitian oleh Liu et al. (2019), alkaloid dan flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik dengan menghambat proliferasi sel, menginduksi apoptosis, serta mengganggu jalur transduksi sinyal, sehingga memiliki potensi besar dalam pengembangan antikanker.

Pengujian toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan metode skrining yang dapat digunakan untuk menilai potensi toksisitas suatu bahan uji, sebelum melakukan uji sitotoksitas pada sel kanker pada pengembangan antikanker. Metode ini dilakukan dengan menilai tingkat mortalitas larva *Artemia salina* setelah terpapar senyawa yang diuji. Metode ini tergolong sederhana, membutuhkan waktu yang relatif singkat, serta tidak memerlukan peralatan yang kompleks (Pohan et al., 2023). Meskipun metode BSLT telah banyak digunakan dalam pengujian toksisitas berbagai ekstrak tumbuhan dan mikroorganisme, penelitian yang secara khusus mengevaluasi toksisitas ekstrak jamur laut dari spons masih terbatas. Keterbatasan ini menunjukkan adanya peluang untuk mengetahui tentang potensi bioaktif dari jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* yang hidup dan berasosiasi dengan spons, serta kontribusinya dalam pengembangan senyawa bioaktif baru. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi toksisitas ekstrak jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *P. steckii* yang diisolasi dari spons *P. foliascens* menggunakan metode BSLT, sehingga dapat memberikan informasi awal mengenai potensi bioaktif dari ekstrak tersebut serta mengetahui profil kandungan kimia keempat ekstrak jamur tersebut. Analisis profil kandungan kimia dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode ini merupakan metode pemisahan senyawa yang terdapat dalam suatu campuran dengan cara ditotolkan pada lem-

peng atau plat KLT (Anggreni et al., 2023). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam penemuan senyawa bioaktif baru yang berpotensi dikembangkan lebih lanjut dalam bidang farmasi.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat yang digunakan terdiri dari Laminar Air Flow (LAF) (LabTech®), autoklaf (Gemmy®), kertas saring (Whatman®), cawan petri (Citotest®), gelas ukur (Iwaki®), gelas beaker (Iwaki®), erlenmeyer (Duran®), corong pisah (Phyrex®), parafilm (Merck®), pipet tetes (Brand®), mikropipet (Lvyx Scientifict®), blue tip, yellow tip, white tip, microwell 24-well (Biologix®), penutup gabus, spatula logam, pisau bedah (scalpel), aluminium foil (Klin Pak®), vacuum rotary evaporator (Eyela®), aerator, labu gelas bulat (DURAN®), jarum ose, heating block (DLAB®), pengaduk magnetik (magnetic stirrer) (Labnet®), chamber (CAMAG®), TLC-Visualizer (CAMAG®), TLC-Scanner (CAMAG®), dan TLC-Heater (CAMAG®).

2.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan terdiri dari ekstrak metanol jamur laut *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger*, beras (Putri Sejati®), aluminium foil (Klin Pak®), parafilm "M" (Bemis®), akuades, metanol (pa), etil asetat (teknis), n-heksana (teknis), dimetil sulfoksida (DMSO) (Supelco®), larva udang *Artemia salina*, dan plastik pembungkus (plastic wrap). Media long-term agar yang dibuat dari malt extract (Merck®), bacto agar (Difco BD®), yeast extract (Oxoid®), glycerol (Vivantis®), artificial sea salt water (Himedia®), dan media Potato Dextrose Agar (PDA) (Himedia®). Plat KLT Silika Gel 60 F254 (Sigma®), diklorometana p.a (Emsure®) dan metanol p.a (Emsure®) sebagai eluen, serta reagen penampak bercak CAM, Dragendorff, Sitroborat, FeCl₃, dan Liebermann-Burchard.

2.2 Metode

2.2.1 Kultur Isolat Jamur

Jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* yang diisolasi dari spons *P. foliascens* dan telah diidentifikasi molekuler dengan amplifikasi pada daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS), dengan Genbank accession number masing-masing yakni PQ498731, PQ555229, PQ555230 dan PQ555233 seperti yang dilaporkan pada Putra et al., 2025. Keempat jamur dikultur ulang pada media agar yang mengandung malt extract (Merck®), bacto agar (Difco BD®), yeast extract Oxoid®, *artificial sea salt broth* (Himedia®) dan gliserol (Vivantis®). Kultur dilakukan secara aseptis dengan memindahkan sedikit hifa jamur menggunakan jarum ose yang telah dipijarkan, lalu diinokulasikan di tengah media agar. Cawan petri ditutup, disegel dengan parafilm, dan diinkubasi pada suhu ruang hingga koloni jamur laut tumbuh dengan morfologi yang sesuai dengan kultur sebelumnya (Putra et al., 2025).

2.2.2 Pengamatan Morfologi Isolat Jamur

Pengamatan morfologi jamur dilakukan secara mikroskopis dan makroskopis pada isolat yang tumbuh di media PDA. Media PDA disiapkan dengan menimbang bahan sesuai jum-

lah yang dibutuhkan, yakni 39 g untuk setiap 1 L aquades. Media kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm, dengan *dry time* selama 15 menit. Pengamatan dilakukan secara makroskopis (visual) dan mikroskopis menggunakan pewarna methylene blue. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi koloni yang tumbuh pada media, mencakup tekstur, warna koloni, serta keberadaan eksudat. Sementara itu, identifikasi mikroskopis dilakukan dengan mengambil sedikit hifa jamur yang telah memasuki fase sporulasi untuk diamati bentuk konidianya. Bentuk yang teramati kemudian dibandingkan dengan referensi yang relevan untuk mengkonfirmasi ciri-ciri morfologi secara makroskopis dan mikroskopis sesuai dengan spesies jamur yang diamati tersebut.

2.2.3 Kultivasi Isolat Jamur Laut

Kultivasi isolat jamur dilakukan pada media beras. Media beras dibuat dengan menimbang 100 g beras dan ditambahkan 110 mL akuades, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 30 menit. Prosedur kultivasi dilakukan secara aseptis dengan memasukkan 10 bagian isolat jamur laut yang telah dipotong kecil ke dalam media beras. Proses inkubasi jamur laut dilakukan pada suhu ruang selama 2-4 minggu hingga miselium jamur tumbuh memenuhi media (Ariantari et al., 2020)

2.2.4 Ekstraksi Metabolit Sekunder Isolat Jamur Laut

Isolat jamur yang sudah tumbuh pada media beras diekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat (500 mL) disertai dengan pengadukan menggunakan *shaker* selama 8 jam dengan kecepatan 150 rpm. Filtrat kemudian disaring dan dipisahkan dari pelarutnya dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental etil asetat kemudian dipartisi menggunakan metode ekstraksi cair-cair (ECC) dengan pelarut n-heksana dan campuran metanol:air (9:1 v/v), hingga diperoleh fase n-heksana dan metanol. Pelarut kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental metanol untuk penelitian lebih lanjut (Ariantari et al., 2020).

2.2.5 Pengujian Toksisitas dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Telur *Artemia salina* (6,6 mg) direndam dalam larutan *artificial sea salt* di bawah cahaya lampu pijar hingga menetas menjadi larva setelah 24 jam. Larva yang baik digunakan untuk uji BSLT berusia 48 jam dan aktif bergerak (Sondakh et al., 2017). Larutan uji dibuat dalam konsentrasi 2000 µg/mL dengan melarutkan ekstrak metanol jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* (10 mg) dalam pelarut DMSO (50 µL), lalu diencerkan dengan larutan *artificial sea salt*. Kemudian dilakukan pengenceran serial hingga menghasilkan konsentrasi 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 µg/mL. Larutan kontrol negatif dibuat dengan menambahkan *artificial sea salt* dan DMSO. Selanjutnya, dimasukkan masing-masing 10 larva ke dalam *microwell* 24 sumuran yang mengandung larutan uji dan kontrol. Setelah 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung dan dibandingkan dengan kontrolnya (Ariantari et al., 2023).

2.2.6 Analisis Profil Metabolit Sekunder Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis profil kandungan kimia ekstrak metanol jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* dilakukan menggunakan plat KLT silika gel 60 F254 sebagai fase diam dan fase gerak yakni diklorometana:metanol (95:5 v/v). Larutan uji disiapkan dengan melarutkan ekstrak dengan pelarut metanol p.a. Setiap ekstrak ditotolkan sebanyak 10 µL pada plat KLT dan selanjutnya dielusi dengan menggunakan fase gerak. Setelah dielusi, plat divisualisasi pada UV 254 dan 366 nm menggunakan TLV-Visualizer. Derivatisasi dilakukan dengan reagen CAM untuk deteksi umum, serta reagen spesifik yakni Dragendorff (alkaloid), sitroborat (flavonoid), Liebermann-Burchard (terpenoid), dan FeCl₃ (polifenol). Reagen disemprotkan pada plat KLT, kemudian dipanaskan pada 110°C untuk memperjelas bercak yang terbentuk, khususnya untuk reagen CAM, sitroborat dan Liebermann-Burchard.

2.2.7 Analisa Data

Pada pengujian toksisitas, persentase kematian larva *A. salina* dihitung. Data mortalitas selanjutnya dianalisis dengan analisis probit untuk menentukan nilai lethal Concentration 50% LC₅₀. Penentuan nilai LC₅₀ dilakukan melalui perangkat lunak Microsoft Excel Versi 2016. Hasil analisis berupa hubungan antara konsentrasi dan nilai probit. Nilai LC₅₀ dari konsentrasi yang sesuai dengan nilai probit 0,500 (50%), yang menunjukkan konsentrasi yang menyebabkan kematian pada 50% larva udang (Ariantari et al., 2023).

Data profil kandungan kimia dari ekstrak metanol jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum*, dan *A. niger* dilakukan dengan menentukan nilai Rf masing-masing ekstrak pada bercak yang muncul sebelum dan sesudah diderivatisasi. Identifikasi golongan senyawa dilakukan berdasarkan warna bercak yang dihasilkan oleh reagen penampak bercak yakni CAM berwarna biru, Dragendorff (alkaloid) berwarna jingga-coklat, sitroborat (flavonoid) berwarna kuning, Liebermann-Burchard (terpenoid) berwarna biru, hijau, coklat, kuning, dan FeCl₃ (polifenol) berwarna coklat (Katavic, 2005).

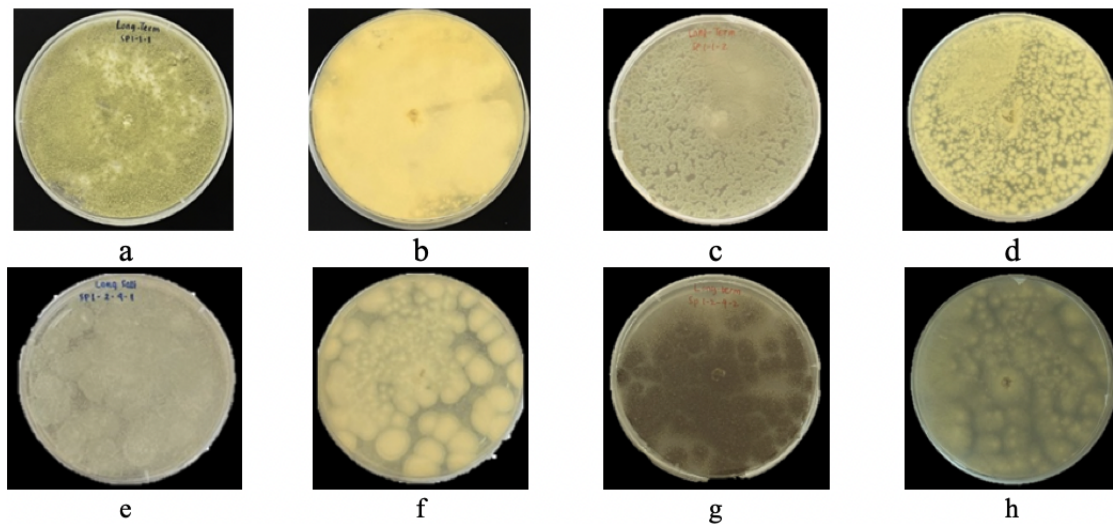
3. HASIL

3.1 Kultur Isolat Jamur Laut

Isolat jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* yang sudah dikultur pada media agar diamati morfologinya (Gambar 1). Isolat jamur *A. nomiae* menunjukkan koloni berwarna putih kemudian berubah menjadi putih sedikit kekuningan dan akhirnya berubah lagi menjadi hijau, dengan tekstur berbulu halus pada bagian depan dan berwarna kuning pada bagian belakang. Isolat jamur *P. steckii* memiliki morfologi berwarna keabu-abuan dengan tekstur yang halus dan kompleks dan pertumbuhan yang merata. Isolat *P. citrinum* tampak berwarna keabu-abuan dengan tekstur yang halus. Isolat jamur *A. niger* menunjukkan warna koloni coklat kehitaman dengan tekstur sedikit berbulu pada bagian depan dan berwarna kuning pada bagian belakang.

3.2 Pengamatan Morfologi Isolat Jamur

Berdasarkan hasil pengamatan isolat jamur *A. nomiae* SP 1-1-1 (Gambar 2), koloni jamur menunjukkan warna kehijauan dengan permukaan kasar, tekstur rapat, dan pertumbuhan radial yang tidak simetris. Bagian belakang koloni



Gambar 1: Hasil Re-kultur Isolat Jamur *A. nomiae* Tampak Depan. (a) dan Tampak Belakang (b); *P. steckii* Tampak Depan (c) dan Tampak Belakang (d); *P. citrinum* Tampak Depan (e) dan Tampak Belakang (f) dan *A. niger* Tampak Depan (g) dan Tampak Belakang (h).

tampak berwarna putih kekuningan. Secara mikroskopis, terlihat konidiofor lurus, tegak, dan tidak bercabang, tumbuh *foot cell* yang membesar. Konidiofor berakhir pada vesikel bulat yang dikelilingi oleh fialid berbentuk botol tanpa metula. Fialid tersusun radial dan menghasilkan konidia berbentuk bulat, berwarna gelap, yang berfungsi sebagai alat reproduksi aseksual dan penyebaran spora.

Isolat jamur *P. steckii* SP 1-1-2 (Gambar 3) secara makroskopis, koloni tampak berwarna hijau keabu-abuan dengan permukaan tidak rata dan pertumbuhan menyebar, sedangkan bagian belakang koloni berwarna kuning. Secara mikroskopis, terlihat konidiofor tegak yang tumbuh dari *foot cell*, dengan vesikel yang mendukung metula sebagai dasar fialid. Fialid menghasilkan konidia secara aseksual.

Isolat jamur *P. citrinum* SP 1-2-4-1 (Gambar 4) secara makroskopis, koloni jamur tampak berwarna hijau keabu-abuan dengan tepi tidak rata dan pertumbuhan radial yang teratur, sementara bagian belakang koloni berwarna kuning. Secara mikroskopis, terlihat konidiofor tegak yang bercabang membawa struktur reproduksi aseksual, dengan metula sebagai cabang pendek yang mendukung fialid. Fialid menghasilkan konidia sebagai spora aseksual, dan *foot cell* tampak sebagai dasar konidiofor yang menempel pada miselium, yaitu jaringan hifa yang membentuk tubuh vegetatif jamur.

Isolat jamur *A. niger* SP 1-2-4-2 (Gambar 5) secara makroskopis menunjukkan koloni berwarna kehitaman dengan pinggiran keabu-abuan dan pertumbuhan yang tidak merata pada permukaan media, sementara bagian belakang koloni berwarna kuning dengan batas koloni tidak teratur. Secara mikroskopis, terlihat konidiofor berupa hifa tegak yang tumbuh dari miselium dan berakhir pada vesikel bulat. Vesikel ini menjadi tempat tumbuhnya fialid yang menghasilkan konidia secara aseksual, dengan susunan konidia yang radial mengelilingi vesikel.

3.3 Kultivasi Isolat Jamur Pada Media Beras

Kultivasi isolat jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum*, dan *A. niger* pada media beras berlangsung selama 3-4 minggu pada suhu ruang (25-30°C). Selama proses kultivasi, pengamatan harian menunjukkan pertumbuhan miselia yang me-

rata pada permukaan atas dan bawah media tanpa adanya tanda kontaminasi. Kultivasi dihentikan ketika seluruh permukaan media beras tertutupi dengan miselia, yang kemudian dilanjutkan dengan proses ekstraksi.

3.4 Ekstraksi Metabolit Sekunder Isolat Jamur Laut

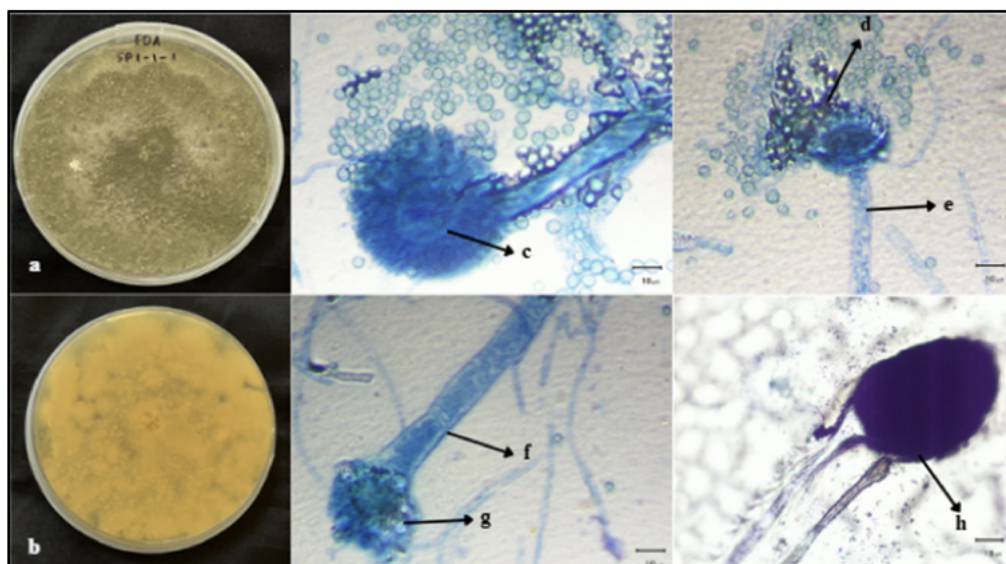
Hasil kultivasi kemudian di maserasi menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 500 mL. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dipekatkan dengan vakum *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental etil asetat diekstraksi cair-cair dengan pelarut metanol-air dan n-heksan. Dari hasil ekstraksi cair-cair diperoleh ekstrak metanol jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* berturut-turut sebesar 0,41; 1,64; 1,26; dan 1,03 g. Ekstrak metanol selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas dengan metode BSLT dan analisis profil kandungan metabolit sekunder dengan metode KLT.

3.5 Pengujian Toksisitas Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

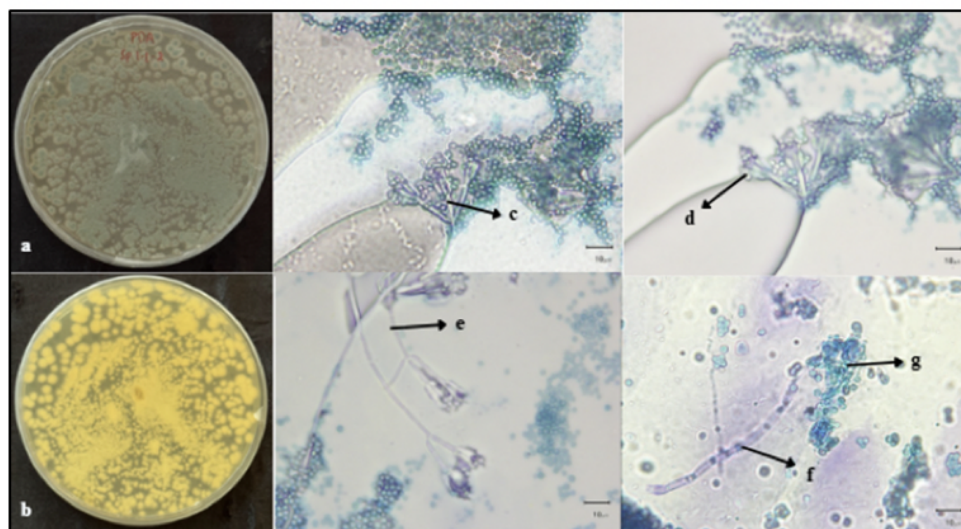
Hasil uji toksisitas ekstrak metanol jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* menunjukkan bahwa mortalitas larva *A. salina* terendah terjadi pada konsentrasi 3,9 µg/mL (20%) dan tertinggi pada konsentrasi 1.000 µg/mL (100%), seperti ditampilkan pada Gambar 6. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula persentase kematian larva *A. salina*. Uji toksisitas menggunakan BSLT menunjukkan bahwa keempat ekstrak jamur memiliki aktivitas toksik terhadap larva *A. salina*. Selanjutnya, nilai LC₅₀ keempat ekstrak tersebut ditunjukkan pada Tabel 1.

3.6 Analisis Profil Kandungan Metabolit Sekunder Dengan Metode KLT

Analisis profil metabolit sekunder menggunakan KLT menunjukkan bahwa masing-masing ekstrak mengandung senyawa berbeda yang tergolong dalam alkaloid, flavonoid, terpenoid, triterpenoid, dan polifenol. Pada profil kromatogram (Gambar 7), ekstrak metanol *A. niger*, *A. nomiae*, *P. steckii* dan *P. citrinum* menunjukkan masing-masing 12, 11, 10 dan 9 bercak pada pengamatan di bawah UV 254, 366 nm dan



Gambar 2: Morfologi isolat jamur *A. nomiae* SP 1-1-1 pada media PDA dengan perbesaran 10× (d, e, f, g), 40× (c), dan 100× (h). Keterangan: (a) koloni tampak depan jamur *A. nomiae* SP 1-1-1, (b) koloni tampak belakang jamur *A. nomiae* SP 1-1-1, (c) vesikel, (d) filid, (e, f) konidiofor, (g) konidia, dan (h) *foot cell*.



Gambar 3: Morfologi isolat jamur *P. steckii* SP 1-1-2 pada media PDA dengan perbesaran 40× (e, f, g) dan 100× (c, d). Keterangan: (a) koloni tampak depan jamur *P. steckii* SP 1-1-2, (b) koloni tampak belakang jamur *P. steckii* SP 1-1-2, (c) metula, (d) konidiofor, (e) miselium, (f) filid, dan (g) *foot cell*.

setelah derivatisasi. Derivatisasi menggunakan reagen CAM, Dragendorff, Sitroborat, Liebermann-Burchard, dan FeCl₃ memperlihatkan warna bercak khas untuk masing-masing golongan senyawa.

Hasil analisis menunjukkan, alkaloid hanya terdeteksi pada ekstrak *P. citrinum* dengan nilai Rf 0,56 dan 0,68. Flavonoid dan terpenoid terdeteksi pada keempat ekstrak ditandai munculnya bercak kuning dan biru-kehijauan setelah plat KLT diderivatisasi dengan pereaksi sitroborat dan Liebermann-Burchard. Golongan polifenol terdeteksi pada Rf 0,14 (ekstrak *A. nomiae*); 0,05; 0,67; 0,77; dan 0,88 (ekstrak *A. niger*).

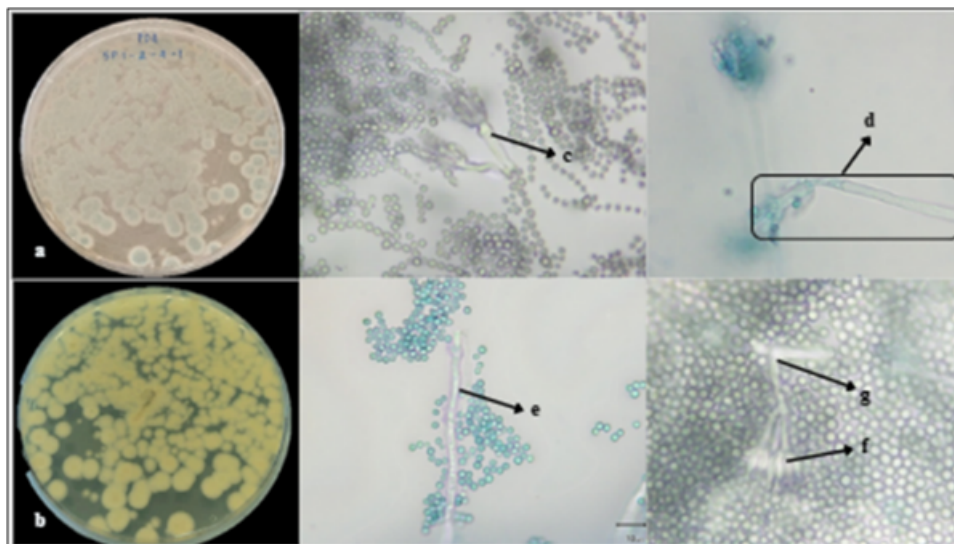
4. PEMBAHASAN

4.1 Kultur Isolat Jamur Laut

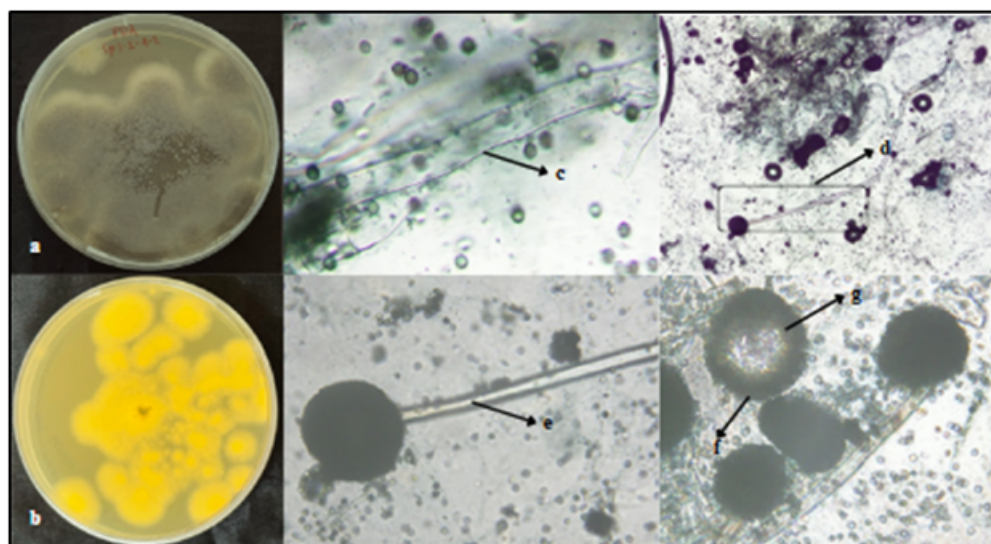
Kultur ulang (re-kultur) merupakan proses peremajaan atau pemurnian kembali strain jamur yang bertujuan untuk memastikan viabilitas dan kemurniannya. Proses re-kultur jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* dilakukan secara aseptis untuk menghindari kontaminasi mikroorganisme bakteri yang tumbuh pada media. Jika terjadi kontaminasi bakteri pada kultur jamur, maka isolat jamur harus dimurnikan dengan melakukan re-kultur ke media baru yang mengandung antibiotik (Kjer et al., 2010).

4.2 Pengamatan Morfologi Isolat Jamur

Pengamatan morfologi isolat jamur dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis untuk memperoleh karakteristik



Gambar 4: Morfologi isolat jamur *P. citrinum* SP 1-2-4-1 pada media PDA dengan perbesaran 40 $\times$ (d, e) dan 100 $\times$ (c, f, g). Keterangan: (a) koloni tampak depan jamur *P. citrinum* SP 1-2-4-1, (b) koloni tampak belakang jamur *P. citrinum* SP 1-2-4-1, (c) metula, (d) konidiofor, (e) miselium, (f) fialid, dan (g) foot cell.

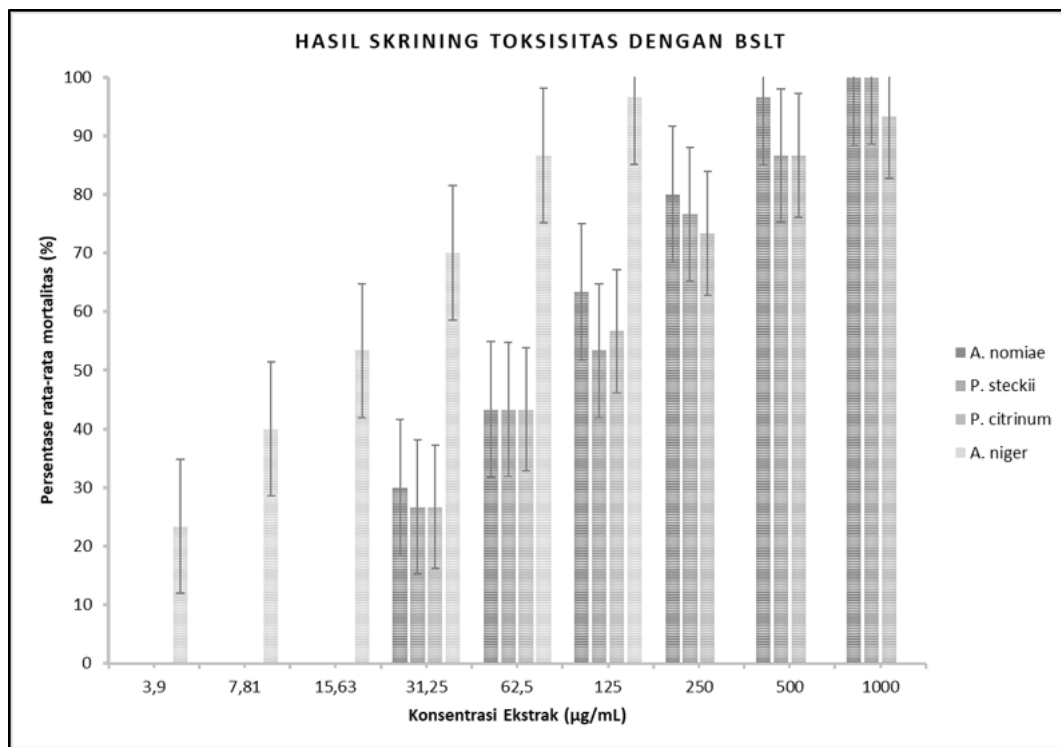


Gambar 5: Morfologi isolat jamur *A. niger* SP 1-2-4-2 pada media PDA dengan perbesaran 40 $\times$ (d, e, f, g) dan 100 $\times$ (c). Keterangan: (a) koloni tampak depan jamur *A. niger* SP 1-2-4-2, (b) koloni tampak belakang jamur *A. niger* SP 1-2-4-2, (c-e) konidiofor, (f) konidia, dan (g) vesikel.

yang lebih komprehensif. Secara makroskopis diamati warna, bentuk, dan tekstur koloni pada media PDA, sedangkan secara mikroskopis diamati struktur hifa dan spora dengan bantuan pewarna methylene blue untuk meningkatkan visibilitas. Berdasarkan hasil pengamatan morfologi mikroskopis dan makroskopis isolat jamur *A. nomiae* dan *A. niger* menunjukkan struktur konidiofor yang berakhir dengan vesikel terminal, yang mana tersusun atas fialid secara radial dan menghasilkan konidia dalam bentuk rantai. Karakteristik ini mengarah kuat pada genus *Aspergillus*. Isolat *P. steckii* dan *P. citrinum* menunjukkan konidiofor yang bercabang secara khas seperti sikat, terdiri dari metula yang membawa fialid, dan konidia yang terbentuk dalam rantai panjang. Ciri ini mengarah kuat pada genus *Aspergillus*.

4.3 Kultivasi Isolat Jamur pada Media Beras

Isolat jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* dikultivasi pada media beras untuk memperoleh ekstrak dalam jumlah yang cukup. Bahan alternatif yang digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan jamur dapat bersumber dari karbohidrat, seperti beras. Media beras digunakan sebagai media dalam proses kultivasi karena mengandung nutrisi yang kompleks seperti karbohidrat, protein, vitamin, mineral, nitrogen, dan air yang dibutuhkan dalam pertumbuhan jamur dan produksi metabolit sekunder. Produksi metabolit sekunder dikarenakan adanya interaksi antara nutrisi kompleks dalam beras dan aktivitas enzimatis dari jamur (Bastian et al., 2023).



Gambar 6: Persentase Rata-Rata Kematian Larva *Artemia salina* pada Setiap Konsentrasi yang Diuji dari Seluruh Ekstrak Jamur yang Diisolasi dari Spons *Phyllospongia foliascens*

4.4 Ekstraksi Metabolit Sekunder Isolat Jamur Laut

Proses pemisahan senyawa metabolit sekunder melalui ekstraksi cair-cair memanfaatkan perbedaan kepolaran pelarut. Senyawa dengan sifat polar akan lebih mudah larut dalam pelarut polar seperti metanol-air, sedangkan senyawa non-polar cenderung larut dalam pelarut non-polar seperti n-heksan (Mirwan, 2013). Prinsip ini memungkinkan pemisahan fraksi senyawa efektif dari ekstraksi etil asetat yang diperoleh setelah tahap maserasi dan pemekatan. Variasi massa ekstrak metanol yang dihasilkan dari masing-masing isolat jamur (*A. nomiae* 0,41; *P. steckii* 1,64; *P. citrinum* 1,26; dan *A. niger* 1,03 g) mengindikasikan adanya perbedaan kemampuan pada setiap spesies jamur dalam menghasilkan senyawa polar. Perbedaan ini dapat dipengaruhi oleh faktor genetik masing-masing isolat maupun kondisi fermentasi yang mempengaruhi jalur biosintesis metabolit sekunder.

4.5 Pengujian Toksisitas Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

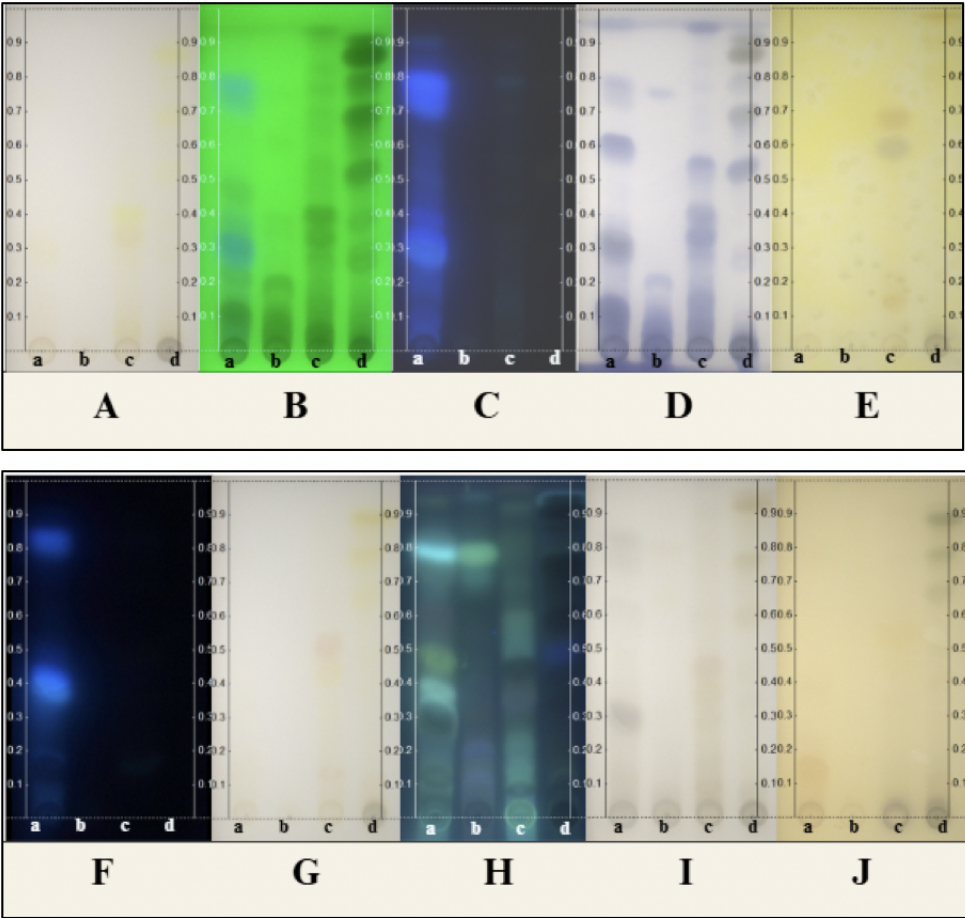
Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT yang merupakan skrining awal untuk mengetahui potensi sitotoksitas bahan uji. Metode ini tergolong sederhana, singkat, tidak memerlukan teknik aseptis, menggunakan sampel uji dalam jumlah kecil, hasil yang representatif serta tidak memerlukan peralatan yang kompleks. Larva *A. salina* digunakan dalam uji BSLT karena memiliki kesamaan sistem enzim (DNA-dependent RNA polymerase dan ouabain sensitive ATPase) dengan mamalia.

Menurut Meyer et al. (1982) terdapat tiga kategori toksisitas yakni $LC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ termasuk kategori sangat toksik, $LC_{50} 30-1000 \mu\text{g/mL}$ toksik, dan $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ tidak toksik. Berdasarkan nilai LC_{50} yang diperoleh, ekstrak metanol *A. niger* tergolong ke dalam kategori sangat toksik ka-

rena nilai $LC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$, sedangkan ekstrak *A. nomiae*, *P. steckii* dan *P. citrinum* masuk ke dalam kategori toksik, karena nilainya berada di rentang $LC_{50} 30-1000 \mu\text{g/mL}$. Hasil pengujian ini mengindikasikan bahwa keempat spesies jamur ini menunjukkan toksisitas terhadap larva *A. salina* serta berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif khususnya dalam pengembangan antikanker.

Senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, terpenoid dan triterpenoid dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan dan proliferasi sel kanker pada studi sebelumnya. Alkaloid bekerja dengan menghambat siklus pembelahan sel dan menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik mitokondria, yaitu dengan meningkatkan ekspresi protein pro-apoptotik dan menurunkan protein anti-apoptotik (Fulda and Debatin, 2006). Flavonoid berperan sebagai antioksidan kuat, menghambat enzim topoisomerase I dan II, serta memodulasi jalur pensinyalan sel yang terlibat dalam regulasi siklus sel dan apoptosis. Polifenol merupakan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas antikanker yang tinggi, bekerja dengan menghambat siklus sel pada fase tertentu, seperti G1 atau G2/M, melalui penekanan ekspresi protein siklin, serta memodulasi jalur pensinyalan yang mengatur proliferasi dan kelangsungan hidup sel kanker (Scalbert et al., 2005). Terpenoid dan triterpenoid, yang banyak ditemukan pada jamur laut, juga memiliki aktivitas antikanker dengan cara menghambat transisi fase G1 ke S melalui penekanan ekspresi protein siklin dan CDK. Selain itu, keduanya dapat menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria dengan meningkatkan ekspresi protein pro-apoptotik dan aktivitas caspase-3 serta caspase-9, sambil menekan protein anti-apoptotik (Wagner and Elmadfa, 2003; Liggett et al., 2014).

Selain aktivitas toksiknya, tiga dari empat isolat jamur ini juga memiliki aktivitas biologis lainnya seperti antimikroba



Gambar 7: Profil KLT ekstrak metanol jamur *Aspergillus nomiae* SP 1-1-1 (a), *Penicillium steckii* SP 1-1-2 (b), *Penicillium citrinum* SP 1-2-4-1 (c), dan *Aspergillus niger* SP 1-2-4-2 (d) dari spons *Phyllospongia foliascens* sebelum dan setelah derivatisasi. Keterangan: (A) deteksi cahaya tampak sebelum derivatisasi, (B) deteksi UV 254 nm sebelum derivatisasi, (C) deteksi UV 366 nm sebelum derivatisasi, (D) deteksi cahaya tampak setelah derivatisasi dengan CAM, (E) deteksi cahaya tampak setelah derivatisasi dengan Dragendorff, (F) deteksi UV 366 nm setelah derivatisasi dengan sitroborat, (G) deteksi cahaya tampak setelah derivatisasi dengan sitroborat, (H) deteksi UV 366 nm setelah derivatisasi dengan Liebermann–Burchard, (I) deteksi cahaya tampak setelah derivatisasi dengan Liebermann–Burchard, dan (J) deteksi cahaya tampak setelah derivatisasi dengan FeCl_3 .

TABEL 1: NILAI LC_{50} EKSTRAK METANOL HASIL FERMENTASI JAMUR YANG DIISOLASI DARI *P. FOLIASCENS* PADA UJI TOKSISITAS DENGAN METODE BSLT (N = 3)

Ekstrak Jamur	Nilai LC_{50} (rata-rata $\pm$ SD)
<i>A. nomiae</i>	68,47 $\pm$ 7,12
<i>P. steckii</i>	83,43 $\pm$ 7,04
<i>P. citrinum</i>	85,04 $\pm$ 6,60
<i>A. niger</i>	12,20 $\pm$ 2,85

seperti dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Putra et al., 2025). Ekstrak metanol dari *A. nomiae* dan *P. steckii* memiliki aktivitas antibakteri terhadap MRSA, sedangkan ekstrak dari *P. citrinum* aktif terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan jamur *Candida albicans*.

4.6 Analisis Profil Kandungan Metabolit Sekunder Dengan Metode KLT

Analisis profil kandungan kimia ekstrak metanol isolat jamur dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Penggunaan metode ini bertujuan untuk menganalisis secara kualitatif kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak (Singh and Kumar, 2023). Per-

bedaan pola bercak antar ekstrak menunjukkan variasi golongan metabolit sekunder yang terdapat dalam masing-masing ekstrak. Warna bercak jingga setelah disemprot reagen Dragendorff mengindikasikan keberadaan alkaloid, sedangkan warna biru kehijauan dengan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan adanya terpenoid. Bercak kuning dengan pereaksi sitroborat mengindikasikan flavonoid, sedangkan bercak gelap dengan pereaksi FeCl_3 mengindikasikan keberadaan polifenol.

Menariknya, ekstrak metanol dari fermentasi *A. niger* menunjukkan jumlah bercak terbanyak dan terdeteksi dari golongan flavonoid, terpenoid, dan polifenol. Hal ini sejalan dengan hasil uji BSLT yang menunjukkan toksisitas tertinggi pada ekstrak tersebut, sehingga terdapat kemungkinan hubungan antara keanekaragaman senyawa bioaktif dengan aktivitas toksisitas yang dihasilkan.

5. KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol jamur *A. nomiae*, *P. steckii*, dan *P. citrinum* yang diisolasi dari spons *P. foliascens* memiliki aktivitas toksik terhadap larva *A. salina* berdasarkan hasil uji toksisitas dengan metode BSLT. Hasil uji toksisitas menunjukkan nilai LC_{50} dari ekstrak *A.*

nomiae, *P. steckii*, *P. citrinum* dan *A. niger* berturut-turut sebesar 68,47; 83,43; 85,04 dan 12,20 µg/mL. Keempat spesies jamur ini berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif khususnya dalam pengembangan agen antikanker. Hasil analisis KLT menunjukkan masing-masing ekstrak mengandung metabolit sekunder yang termasuk dalam golongan alkaloid, flavonoid, terpenoid, triterpenoid, dan polifenol. Pengujian lanjut ekstrak tersebut untuk mengevaluasi sitotoksitasnya pada sel kanker potensial dilakukan untuk menggali potensinya sebagai antikanker. Dengan demikian, eksplorasi sumber daya hayati laut, khususnya jamur yang berasosiasi dengan spons, dapat menjadi langkah penting pada penemuan senyawa bioaktif baru yang memiliki manfaat medis.

6. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Udayana atas bantuan pendanaan penelitian melalui hibah Penelitian/Riset Kampus Merdeka dengan nomor kontrak: B/266.46/UN14.4A/PT.01.03/2024 dan kepada Pemerintah Kabupaten Karangasem atas izin pengambilan sampel untuk penelitian.

7. DAFTAR PUSTAKA

- Anisa H, R., Made, I., Swantara, D., & Suaniti, N. (2014). Identifikasi Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Spons *Hyrtios erecta* Terhadap Larva Udang *Artemia salina* L. Cakra Kimia Indonesian E-Journal of Applied Chemistry. 2(1), 25-30. <https://jurnal.harianregional.com/cakra/full-9004>
- Anggreni, M.A. 2023. Validasi Metode Analisis Senyawa Piperin Dalam Jamu Menggunakan Metode KLT-Densitometri. Original Article MFF. 27(3), 71–75. <https://doi.org/10.20956/mff.v27i3.24411>.
- Ariantari, N.P., Elena, A., Marian, F., Fabian, S., Dieter, M., Yvonne, G., dkk. 2020. Didymellanosine, A New Decahydrofluorene Analogue, and Ascolactone C from *Didymella sp.* IEA-3B.1, an Endophyte of *Terminalia catappa*. The Royal Society of Chemistry. 10, 7232-7237. Doi:10.1039/c9ra10685e.
- Ariantari, N.P., I, P. Y. A. P., Ni, P. E. L., Putu, S. Y., Meitini, W. P., Nadzifa, N., Ummi, M. Z., Riris, I. J., Edy, M. 2023. Antibacterial and cytotoxic secondary metabolites from endophytic fungi associated with *Antidesma bunius* leaves. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 13(7), 132–143. Doi: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2023.101347>.
- Bastian, A. & Septia, D.G. 2023. Pengaruh Penggunaan Media Alternatif Bekatul Beras Merah (*Oryza nivara*) dan Beras Putih (*Oryza sativa* L) terhadap Jumlah Koloni Jamur *Candida albicans* dengan kontrol Media Sabouraud Dextrose Agar. Jurnal Analisis Kesehatan Klinik Sains. 11(2), 156-164. Doi: <http://jurnal.univrab.ac.id/index.php/klinikal>.
- Fulda, S., & Debatin, K.M. 2006. Extrinsic Versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy. Oncogene. 2, 4798–4811. Doi: 10.1038/sj.onc.1209608
- Izzati, F. Mega, F. W., Asep, B., Anggia, P., Akhirta, A., Linda, S., dkk. 2021. Chemical diversity and biological activity of secondary metabolites isolated from Indonesian marine invertebrates. Molecules. 4(1), 2-22. <https://doi.org/10.3390/molecules26071898>.
- Katavic, A. 2005. Chemical Investigations of the Alkaloids from the Plants of the Family Elaeocarpaceae . Tesis . 26-50. Doi: 10.25904/1912/3377.
- Kjer, J. 2010. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. Nature Protocols, 5(3), 479–490. Doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.233>.
- Liggett, J. L. 2014. Anti-tumor Activity of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Cyclooxygenase-Independent Targets Cancer Letters. Elsevier Ireland Ltd. 217–224. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.021>
- Liu, H., Zhang, H., Hou, Y., Wang, J., Liu, J. 2019. Vitexin Induces Apoptosis Through Mitochondrial Pathway and PI3K/Akt/mTOR Signaling Inhibition In Non-Small Cell Lung Cancer Celss. Biomedicine and Pharmacotherapy. 110, 554-562. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.038>
- Malmstrum, J., Christophersen, C. & Frisvad, J.C. 2015. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. Phytochemistry. 4(20), 301-309. Doi: 10.1016/s0031-9422(00)00106-0
- Mastura, M., Mauliza, M. & Hasby, H. 2022. Toxicity Test of Acehnese Plants Using The Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. EduChemia, 7(1), 110. Doi: <https://doi.org/10.30870/educhemia.v7i1.12341>
- Meyer, B. N. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. Planta Medica. 45: 31-34. Doi: 10.1055/s-2007-971236.
- Mirwan, A. 2013. Keberlakuan Model HB-GFT Sistem n-Heksana-Mek-Air Pada Ekstraksi Cair-Cair Kolom Isian. Konversi. 8 (2), 1-7. Doi: <https://ppjp.ulm.ac.id/journal/index.php/konversi/article/view/126>.
- Pohan, D.J., Marantuan, R.S., & Djojaputro, M. 2023. Toxicity Test of Strong Drug Using the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Method. International Journal of Health Sciences & Research, 13(2), 203–209. Doi: <https://doi.org/10.52403/ijhsr.20230228>.
- Putra, I.P.Y.A. Ketut, S. U., Junita, H., Wirasuta, I. M. A. G., Nonye, T. U., & Ariantari, N. P. 2023. Fermentation, Bioactivity and Molecular Identification of Endophytic Fungi Isolated From Mangrove *Ceriops tagal*. Biodiversitas. 24(5), 3091–3098. Doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240565>.
- Putra, I.P.Y.A. Ariantari, N. P., Joko, T. W., Leliqia, N. P. E., Ida, B. N. P. D., Wulandari, N. M. W., Dwijayanti, N. K., Putri, N. P. A. E., Dewi, K. T. N. 2025. *Phyllospongia foliascens* -Derived Fungi: Molecular Identification, Antimicrobial Activity and Secondary Metabolite Profile of Their Methanolic Extracts. BIO Web of Conferences. 176, 1-10. Doi: <https://doi.org/10.1051/bioconf/202517602003>
- Rosita J., Lintang, U., Losung, F. S., Menajang, F., & Sumilat, D. 2017. Optimizing Thin Layer Chromatography (TLC) Eluent Composition for Compound Content Separation the Ethanolic Extract of Sponge and Ascidia. Jurnal Ilmiah PLATAX. 12(2), 132-136. Doi: <https://doi.org/10.35800/jip.v10i2.57116>.

- Scalbert, A., Johnson, I.T., & Saltmarsh, M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1, 215-217. Doi: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/81/1/215S/4607494>.
- Singh, V.K. & Kumar, A. 2023. Secondary metabolites from endophytic fungi: Production, methods of analysis, and diverse pharmaceutical potential. *Symbiosis Springer Science and Business Media B.V.* 8(1), 87-94. Doi:<https://doi.org/10.1007/s13199-023-00925-9>
- Shin, H., Pil, G., Heo, S., Lee, H., Lee, J., Lee, Y., dkk. 2016. Anti-inflammatory Activity of Tanzawaic Acid Derivatives From a Marine-Derived Fungus *Penicillium steckii* 108YD142. *Marine Drugs*. 14(1), 2-9. Doi: <https://doi.org/10.3390/md14010014>.
- Sondakh, R., Posangi, J., Wowor, P., & Manado, S. 2017. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Spons Laut (*Callyspongia aerizusa*) terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. 5(2), 1-2. Doi: <https://doi.org/10.35790/ebm.v5i2.18312>
- Wagner, K.H., & Elmadfa, I. 2003. Biological relevance of terpenoids: Overview focusing on mono-, di- and tetra-terpenes. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 47(3), 95-106. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>.
- Zhang, H. 2017. Secondary Metabolites From the Marine Sponge Genus *Phyllospongia*. *Marine Drugs*. 15(1), 2-10. Doi: <https://doi.org/10.3390/md15010012>.