

KARAKTERISASI DAN UJI TOKSISITAS IKAN BUNTAL DARI PERAIRAN PAMEUNGPEUK, JAWA BARAT

CHARACTERIZATION AND TOXICITY TEST OF PUFFER FISH FROM PAMEUNGPEUK WATERS, WEST JAVA

Eka Deskawati^{1*}, Sri Purwaningsih¹, dan Purwantiningsih²

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

*e-mail: ekadeskawati@yahoo.co.id

²Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor, Bogor

ABSTRACT

A puffer fish contains a secondary metabolite toxic called tetrodotoxin (TTX), which can be used as an anesthetic and medication to relieve chronic pain for cancer patients. The purposes of this study were to determine the LC₅₀ value and chemical composition of extracts from various tissues of puffer fishes as a first step to determine the further isolation of tetrodotoxin. In this study various tissues from meat, liver, skin, heart, and ovary of Arothron hispidus and Diodon hystrix species were extracted, characterized, and tested levels of toxicity using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) methods. Between the two puffer fishes studied, the highest toxicity was found in Arothron hispidus ovary with LC₅₀ value of 29.65 ppm. Chemical constituents of the ovary were alkaloids, carbohydrates, and amino acids. Toxic compounds found in the extracts of puffer fish ovaries were tetrodotoxin which is a compound of the alkaloid class of secondary metabolites.

Keywords: *Puffer fish, Arothron hispidus, Diodon hystrix, toxicity, Brine Shrimp Lethality Test*

ABSTRAK

Ikan buntal memiliki metabolit sekunder berupa racun yang bernama tetrodotoxin (TTX) yang dapat dimanfaatkan sebagai obat anastesi dan obat untuk mengurangi rasa sakit kronis yang dialami pasien kanker. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan nilai LC₅₀ dan komposisi kimia ekstrak dari berbagai macam bagian tubuh ikan buntal sebagai langkah awal untuk menentukan proses isolasi tetrodotoxin selanjutnya. Pada penelitian ini berbagai organ ikan buntal seperti daging, hati, kulit, jantung dan ovarium dari spesies Arothron hispidus dan Diodon hystrix diekstraksi, dikarakterisasi dan diuji tingkat toksisitasnya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil penelitian menunjukkan diantara dua ikan buntal yang diteliti, nilai toksisitas tertinggi yaitu organ ovarium Arothron hispidus dengan nilai LC₅₀ yaitu 29,65 ppm. Kandungan kimia dari ovarium ini yaitu alkaloid, karbohidrat dan asam amino. Senyawa racun yang terdapat di dalam ekstrak ovarium ikan buntal ini diperkirakan tetrodotoxin yang merupakan senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid.

Kata kunci: *Ikan buntal, Arothron hispidus, Diodon hystrix, racun, *Brine Shrimp Lethality Test**

I. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu pusat keanekaragaman hayati dunia. Berbagai jenis organisme baik tanaman, hewan maupun mikroorganisme tersebar luas dengan jumlah yang melimpah.

Dalam organisme tersebut terkandung senyawa kimiawi hasil metabolisme yang digunakan sebagai upaya untuk mempertahankan hidupnya. Senyawa tersebut dikenal sebagai metabolit sekunder. Potensi senyawa metabolit sekunder yang ada merupakan pustaka kimiawi

(*chemical library*) yang dapat dieksplorasi dan dijadikan rujukan untuk kajian upaya pemanfaatannya (Wibowo *et al.*, 2003). Salah satu sumber daya hayati yang belum optimal untuk dieksplorasi dan dimanfaatkan adalah ikan buntal.

Ikan buntal berasal dari famili *Diodontidae* dan berasal dari ordo *Tetraodontiformes*. Nama *tetraodontiformes* berasal dari morfologi gigi ikan ini, yaitu memiliki dua gigi besar pada rahang atas dan bawahnya yang cukup tajam (BPOM, 2006). Ikan ini banyak ragamnya di perairan tropis, tidak umum ada di perairan subtropis maupun di perairan dingin. Di Asia ikan buntal menyebar di Jepang, India, Birma, Thailand, Singapura dan Philipina. Di Indonesia sendiri, ikan buntal tersebar di seluruh perairan seperti Pulau Weh, Sumatera (Bagan Siapi-api, Sibolga, Deli), Pulau Bintang, Pulau Bangka, Pulau Jawa (Jakarta, Karawang, Subang, Cilacap, Semarang, Surabaya), Madura, Kalimantan (Pemangkat, Singkawang, Pontianak, Sungai Kapuas, Banjarmasin, Sungai Mahakam) (Weber dan de Beaufort, 1962).

Selain memiliki kandungan metabolit primer yang cukup lengkap terutama asam aminonya, ikan buntal juga memiliki kandungan metabolit sekunder seperti racun tetrodotoksin (TTX). Racun ini biasanya digunakan sebagai alat pertahanan diri dari serangan predator. Beberapa kasus keracunan yang terjadi di Indonesia diantaranya pada tahun 2010 dan 2008 di Cirebon (Seo, 2010). Kasus keracunan ikan buntal juga terjadi di beberapa daerah seperti Tapanuli tengah, Bengkulu dan Maluku. Meskipun berbahaya, tetrodotoksin ternyata dapat dimanfaatkan terutama pada bidang farmasi. Tetrodotoksin dapat digunakan sebagai obat anastesi lokal (dapat memblok syaraf). Tetrodotoksin yang dicampur dengan bupivacaine dan dexamethasone dapat meningkatkan waktu anastesi (Kohane *et al.*, 2003). Obat berbahan dasar dari tetrodotoksin yang

pertama kali dipasarkan adalah Tectin, obat ini dikembangkan oleh WEX Pharmaceutical Inc. Dalam dosis kecil, obat ini sangat mampu mengurangi rasa sakit kronis yang dialami oleh pasien kanker (Hagen *et al.*, 2007).

Di Indonesia, penelitian mengenai racun ikan buntal masih jarang dilakukan. Melihat manfaat racun TTX terutama pada bidang farmasi maka penelitian mengenai karakteristik kimia ikan buntal dan pengujian toksisitas menggunakan model hewan uji *Artemia salina* penting dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan nilai LC_{50} dan komposisi kimia ekstrak dari berbagai macam bagian tubuh ikan buntal sebagai langkah awal untuk menentukan proses isolasi tetrodotoksin selanjutnya.

II. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan yaitu ikan buntal bintik putih (*Arothron hispidus*) dan buntal duren (*Diodon hystrix*) yang diperoleh dari Perairan Pameungpeuk pada bulan September 2012. Bahan-bahan lain yang digunakan yaitu air laut dan *Artemia salina*.

Peralatan utama yang digunakan antara lain timbangan, *homogenizer*, corong pisah, labu erlenmeyer, *magnetic stirrer*, desikator, *freezer*, *vaccum evaporator*, *freeze drying*, *centrifuge*.

2.2. Ekstraksi Sampel

Sampel berupa ovarium, hati, jantung, kulit dan daging ikan buntal dipisahkan, disimpan dalam plastik dan dibekukan untuk dibawa ke laboratorium. Ekstraksi sampel dilakukan dengan mengacu pada metode Hasan *et al.* (2008). Masing-masing sampel sebanyak 100 gram dicampur dengan 300 ml aquades dingin, kemudian distirer selama 2 jam pada suhu ruangan. Setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 8

menit pada suhu 10°C. Ekstrak supernatant (aq) dicuci menggunakan berbagai pelarut organik seperti hexane, chloroform dan etil asetat untuk menghilangkan senyawa yang larut dalam pelarut organik. Ekstrak hasil pencucian kemudian di *freeze dried*.

2.3. Uji Toksisitas *Brine Shrimp* Lethality Test (BSLT)

Uji toksisitas ekstrak sampel dilakukan dengan menentukan nilai *Lethal Concentration* (LC₅₀) menggunakan larva udang *Artemia salina* L. yang mengacu pada metode Meyer *et al.* (1982). Telur udang ditetaskan dalam gelas piala yang berisi air laut, disinari dengan lampu TL 40 watt dan diaerasi agar kadar oksigen tercukupi sehingga telur udang menetas menjadi larva. Penetasan dilakukan selama 48 jam.

Sebanyak 1 mL air laut yang mengandung larva udang sebanyak 10 ekor dipipet, kemudian dimasukkan ke dalam wadah uji. Ditambahkan larutan ekstrak sampel yang akan diuji masing-masing sebanyak 1 mL, sehingga konsentrasi akhir dalam wadah uji adalah 10, 100, 500 dan 1000 ppm. Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Untuk kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan ditentukan % mortalitasnya. Data % mortalitas dianalisis dengan menggunakan analisis probit untuk menentukan harga LC₅₀. Nilai LC₅₀ ditentukan dengan membuat kurva hubungan antara mortalitas probit (sumbu y) dan log konsentrasi ekstrak (sumbu x). Nilai LC₅₀ merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50% yang diperoleh dengan memakai persamaan regresi linier $y = a + bx$. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai LC₅₀ < 1000 ppm untuk ekstrak dan < 30 ppm untuk suatu senyawa.

2.4. Analisis Fitokimia

Organ dari spesies dengan nilai LC₅₀ paling rendah dianalisis fitokimianya. Uji fitokimia dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang terdapat pada serbuk ekstrak kasar organ ikan buntal paling toksik. Analisis fitokimia yang dilakukan terdiri dari alkaloid, steroid/triterpenoid, saponin, flavonoid, fenol hidrokuinon, molisch, benedict, biuret, ninhidrin yang mengacu pada metode Harbone (1987).

a) Alkaloid

Sejumlah contoh dilarutkan dalam beberapa tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan tiga pereaksi alkaloid, yaitu pereaksi dragendorf, meyer dan wagner. Hasil uji dinyatakan positif bila dengan pereaksi meyer terbentuk endapan putih kekuningan, dengan pereaksi wagner membentuk endapan coklat dan dengan pereaksi dragendorf membentuk endapan merah sampai jingga.

Pereaksi meyer dibuat dengan cara menambahkan 1,36 HgCl₂ dengan 0,5 g kalium iodida lalu dilarutkan dan diencerkan dengan akuades menjadi 100 ml dalam labu takar. Pereaksi ini tidak berwarna. Pereaksi wagner dibuat dengan cara 10 ml akuades dipipet kemudian ditambahkan 2,5 g iodin dan 2 g kalium iodida, kemudian dilarutkan dan diencerkan dengan akuades menjadi 200 ml dalam labu takar. Pereaksi ini berwarna coklat. Pereaksi dragendorf dibuat dengan cara 0,8 g bismut subnitrat ditambahkan dengan 10 ml asam asetat dan 40 ml air. Larutan ini dicampur dengan larutan yang dibuat dari 8 g kalium iodida dalam 20 ml air. Sebelum digunakan, 1 volume campuran ini diencerkan dengan 2,3 volume campuran 20 ml asam asetat glasial dan 100 ml air. Pereaksi berwarna jingga.

b) Steroid/Triterpenoid

Sejumlah contoh dilarutkan dalam 2 ml kloroform dalam tabung reaksi. Anhidri-

da asetat sebanyak 10 tetes dan asam sulfat pekat sebanyak 3 tetes ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Hasil uji positif contoh mengandung steroid dan triterpenoid yaitu terbentuknya larutan berwarna merah untuk pertama kali kemudian berubah menjadi biru dan hijau.

c) Saponin

Saponin dapat dideteksi dengan uji busa dalam air panas. Busa yang stabil selama 30 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan contoh mengandung saponin.

d) Flavonoid

Sejumlah contoh ditambah serbuk magnesium 0,1 mg dan 0,4 ml amil alkohol (campuran asam klorida 37% dan etanol 95% dengan volume sama) dan 4 ml alkohol, kemudian campuran dikocok. Hasil uji positif contoh mengandung flavonoid, yaitu terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

e) Fenol Hidrokuinon

Sebanyak 1 g contoh diekstrak dengan 20 ml etanol 70%. Larutan yang dihasilkan diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 5%. Hasil uji positif contoh mengandung senyawa fenol, yaitu terbentuknya larutan berwarna hijau atau hijau biru.

f) Molisch

Sebanyak 1 ml larutan contoh ditambahkan 2 tetes pereaksi molisch dan 1 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Hasil uji positif contoh mengandung karbohidrat ditandai oleh terbentuknya kompleks berwarna ungu diantara 2 lapisan cairan.

g) Benedict

Larutan contoh sebanyak 8 tetes dimasukkan ke dalam 5 ml pereaksi benedict. Campuran dikocok dan dididih-

kan selama 5 menit. Hasil uji positif contoh mengandung gula pereduksi yaitu terbentuknya larutan berwarna hijau, kuning atau endapan merah bata.

h) Biuret

Larutan contoh sebanyak 1 ml ditambahkan pereaksi biuret sebanyak 4 ml. Campuran dikocok dengan seksama. Hasil uji positif contoh mengandung senyawa peptida yaitu terbentuknya larutan berwarna ungu.

i) Ninhidrin

Larutan contoh sebanyak 2 ml ditambahkan beberapa tetes larutan ninhidrin 0,1%. Campuran dipanaskan dalam penangas air selama 10 menit. Hasil uji positif contoh mengandung asam amino, yaitu terbentuknya larutan berwarna biru.

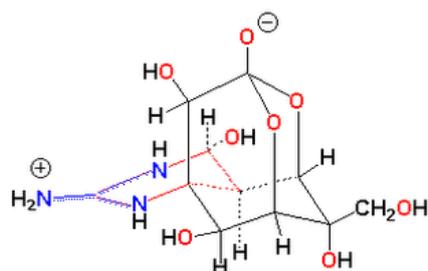
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Ekstraksi Ikan Buntal

Tetrodotoxin merupakan neurotoxin yang memiliki berat molekul rendah (319,27) dan memiliki struktur yang sangat unik yang dapat dilihat pada Gambar 1. Racun ini sangat polar sehingga dapat larut dalam air dan tidak larut dalam senyawa organik. Berbagai penelitian mengenai isolasi racun tetrodotoxin telah dilakukan, Hasan *et al.* (2008) menggunakan aquades dingin untuk mengekstrak liver ikan buntal, dan menggunakan berbagai macam pelarut organik untuk mencucinya. Nilai randemen ekstrak dapat dilihat di Tabel 1.

3.2. Toksisitas Ikan Buntal

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel ikan buntal memiliki kadar racun yang tinggi (Tabel 1). Menurut Meyer *et al.* (1982) suatu zat dianggap sangat toksik jika nilai LC₅₀<30 ppm, toksik jika nilai LC₅₀ 30-1000 ppm, dan kurang toksik jika nilai LC₅₀>1000 ppm.



Gambar 1. Struktur kimia tetrodotoxin (Noguchi dan Arakawa, 2008).

Tabel 1. Nilai randemen dan toksisitas ekstrak ikan buntal.

No.	Nama organ	Nama spesies	Nilai randemen (%)	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1.	Jantung	<i>Diodon hystrix</i>	4,47	155,67
2.	Kulit	<i>Diodon hystrix</i>	3,38	79,91
3.	Daging	<i>Diodon hystrix</i>	3,34	38,52
4.	Hati	<i>Diodon hystrix</i>	4,93	190,27
5.	Kulit	<i>Arothron hispidus</i>	2,41	181,91
6.	Hati	<i>Arothron hispidus</i>	5,51	35,16
7.	Ovarium	<i>Arothron hispidus</i>	3,57	29,65
8.	Daging	<i>Arothron hispidus</i>	4,36	57,09

Organ *hispidus* ovarium dari *Arothron* memiliki nilai LC₅₀ paling rendah yaitu 29,65 ppm. Tingkat toksisitas ikan buntal bervariasi tergantung pada jenis organ tubuh, geografi, musim, dan jenis kelamin. Racun TTX pada ikan betina lebih tinggi daripada jantan karena di ovarium terdeteksi TTX lebih banyak bila dibandingkan dengan testis ikan (Hashimoto dan Kamiya, 1970). Menurut Noguchi dan Arakawa (2008) racun TTX pada ikan buntal terdistribusi di organ hati dan ovarium (paling tinggi), diikuti oleh usus dan kulit. Daging dan testis merupakan organ yang tidak toksik atau toksisitasnya lemah, kecuali pada spesies *Lagocephalus lunaris* dan *Chelonodon patoca*. Tingkat toksisitas pada organ hati umumnya sangat tinggi sepanjang tahun, kecuali pada musim pemijahan dimana racun dari hati akan ditransfer ke organ ovarium. Racun TTX pada telur yang dipijahkan dari ovarium berfungsi untuk melindungi telur dari predator. Selain itu,

ketika ada predator ikan buntal akan menggelembungkan dirinya 2-3 kali ukuran normal dan racun TTX akan diekresikan dari kulit untuk mengusir musuh.

3.3. Komposisi Kimiawi Ekstrak Ikan Buntal

Penapisan fitokimiawi secara kualitatif dilakukan sebagai uji awal untuk mengetahui keberadaan senyawa kimiawi spesifik, yaitu senyawa metabolit sekunder yang diharapkan merupakan racun tetrodotoxin. Penapisan fitokimiawi ini berdasarkan pada metode Harborne (1987). Hasil pengujian analisis fitokimia dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil penelitian mendapatkan ovarium *Arothron hispidus* positif (+) mengandung alkaloid, karbohidrat dan asam amino serta negatif (-) mengandung steroid/triterpenoid, saponin, flavonoid, dan fenol hidroquinon. Hal ini sesuai dengan struktur dari tetrodotoksin yang merupakan

Tabel 2. Hasil uji fitokimia ekstrak ovarium *Arothron hispidus*.

	Uji	Hasil
Alkaloid	Wagner	+
	Meyer	+
	Dragendorf	+
Steroid/Triterpenoid		-
Saponin		-
Flavonoid		-
Fenol hidroquinon		-
Molisch		+
Benedict		-
Biuret		-
Ninhidrin		+

Keterangan: (+): Terdeteksi, (-): tidak terdeteksi

alkaloid yang memiliki gugus fungsi guanidium (Cordell *et al.*, 1993). Gugus guanidium ini dapat terikat pada reseptor *neurotoxin site 1* di subunit- α serambi luar VGSC (*Voltage-Gate Sodium Channels*) dan memblokir masuknya ion natrium dengan menyumbat pori saluran (French *et al.*, 2010). Ikatan ini akan menghambat penjalaran aksi potensial, sehingga melumpuhkan fungsi syaraf dan otot (Lee *et al.*, 2008). Pakar lain membuktikan bahwa TTX adalah senyawa amin dan gula (Noguchi dan Arakawa, 2008).

IV. KESIMPULAN

Penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa diantara dua ikan buntal yang diteliti, nilai toksisitas tertinggi yaitu organ ovarium *Arothron hispidus* dengan nilai LC₅₀ yaitu 29,65 ppm. Kandungan kimia dari ovarium ini yaitu alkaloid, karbohidrat dan asam amino. Senyawa racun yang terdapat di dalam ekstrak ovarium ikan buntal ini diperkirakan tetrodotoxin yang merupakan senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid.

DAFTAR PUSTAKA

- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2006. Ikan buntal (*Puffer Fish*) ikan nikmat yang beracun. *InfoPOM*, 7(6):5-10.
- Cordell, G.A., A.D. Kinghorn, and J.M. Pezzuto. 1993. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. *In*: Colegate, S.M. and R.J. Molyneux (eds.). *Bioactive natural products: detection, isolation and structure elucidation*. CRC Press. Boca Raton. 196-198pp.
- French, R.J., D. Yoshikami, M.F. Sheets, and B.M. Olivera. 2010. The tetrodotoxin receptor of voltage-gated sodium channels: perspectives from interactions with μ -conotoxins. *Mar. Drugs*, 8:2153-2161.
- Hagen, Fisher, Lapointe, Souich, Chary, Moulin, Sellers, and Ngoc. 2007. A multicenter open label safety and efficiency study of tetrodotoxin for cancer pain. *J. of Pain and Symptom Management*, 34(2):171-182.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*, (2nd ed.). Padma-

- winata, K. dan I. Soedira (penterjemah). ITB Press. Bandung. 354 hlm.
- Hasan, S., F. Nikkon, F. Pervin, M.M. Rahman, S. Khatun, T. Hossain, A. Khan, S.K. Sarker, A. Mosaddik, and N. Absar. 2008. Biochemical and histopathological effects of tetrodotoxin isolated from Puffer fish *Tetraodon patoca* available in Bangladesh. *Research J. of Medicine and Medical Sciences*, 3(2):177-181.
- Hashimoto, Y. and H. Kamiya. 1970. Food chain hypothesis on the origin of marine toxins. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 36:425-434.
- Kohane, D.S., S.E. Smith, D.N. Louis, G. Colombo, P. Ghoroghchian, N.G. Hunfeld, C.B. Berde, and R. Langer. 2003. Prolonged duration local anesthesia from tetrodotoxin-enhanced local anesthetic microspheres. *Pain*, 104:415-421.
- Lee, C.H. and P.C. Ruben. 2008. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels*, 2:407-412.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrighi, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, and J.L. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45:31-34.
- Noguchi, T. and O. Arakawa. 2008. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organism, and cases of human intoxication. *Marine Drugs*, 6:220-242.
- Seo, Y. 2010. Empat warga tewas setelah makan ikan buntal. *Tempo*, 13 Maret 2010.
- Wibowo, A.E., A. Supriyono, Subintoro, dan Y. Rusman. 2003. Studi eksplorasi senyawa metabolit sekunder dari biota laut. Prosiding Seminar Teknologi untuk Negeri. Buku 2. Hlm.:112-118.
- Weber, M. and L.F. De Beaufort, 1962. The fishes of the Indo-Australian Archipelago. XI. Scleroparei, Hypostomides, Pediculati, Plecognathi, Opisthomi, Discocephali, Xenopterygii. A.J. Reprints Agency, New Delhi, India. 481p.
- Diterima* : 11 Mei 2014
Direview : 28 Mei 2014
Disetujui : 9 Juni 2014

