

KAJIAN AWAL BIOAKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSINYA DARI SPONS *Callyspongia* sp. TERHADAP SEL LESTARI TUMOR HeLa

Preliminary Assesment on The Bioactivity of Sponge Callyspongia sp. Ethanol Extract and Its Fractions Against HeLa Tumor Cell Line

Thamrin Wikanta^{1*}, Dewi Gusmita², Lestari Rahayu², dan Endar Marraskuranto¹

¹ Peneliti pada Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Balitbang KP, KKP

² Fakultas Farmasi Universitas Pancasila

* Korespondensi Penulis: Thamrin Wikanta, Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat 10260.

E-mail: thamrin_wikanta@yahoo.com

ABSTRAK

Telah dilakukan kajian awal tentang potensi bioaktivitas ekstrak etanol dari spons *Callyspongia* sp. dan fraksinya terhadap sel lestari tumor HeLa. Spons dimaserasi dalam etanol, kemudian ekstrak diuji toksisitasnya terhadap *Artemia salina* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil uji memberikan nilai LC_{50} sebesar 3,30 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya ekstrak diuji sitotoksitasnya terhadap sel lestari tumor HeLa dengan metoda MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil tetrazolium bromida), dan memberikan nilai IC_{50} sebesar 30,71 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etanol lalu difraksinasi dengan pelarut heksan (non polar), etil asetat (semi polar), dan n-butanol (semi polar). Tiap ekstrak fraksi diuji sitotoksitasnya terhadap sel lestari tumor HeLa. Hasil uji menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki nilai sitotoksitas ($IC_{50}=6,06 \mu\text{g/mL}$) paling tinggi terhadap sel lestari HeLa dibandingkan dengan fraksi heksan ($IC_{50}=50,06 \mu\text{g/mL}$) dan fraksi n-butanol ($IC_{50}=43,75 \mu\text{g/mL}$).

KATA KUNCI: bioaktivitas, ekstrak etanol, spons *Callyspongia* sp., sel lestari tumor HeLa

ABSTRACT

Preliminary assesment on the potency of bioactivity of sponge Callyspongia sp. ethanol extract and its fractions against HeLa tumor cell line has been conducted. Sponge was macerated in ethanol, then the extract was tested against Artemia salina Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Result gave the LC_{50} value of 3.30 $\mu\text{g/mL}$. The cytotoxicity of the extract was then tested against HeLa tumor cell line using MTT (3-(4.5-dimethylthiazolyl-2)-2.5-diphenil tetrazolium bromide) method, gave the IC_{50} value of 30.71 $\mu\text{g/mL}$. The ethanol extract was fractionated with hexane (non polar), ethyl acetate (semi polar), and n-butanol (semi polar). Each extract of fractions was then tested against HeLa tumor cell line. Result showed that the ethyl acetate fraction has the highest cytotoxicity against HeLa tumor cell line ($IC_{50}=6.06 \mu\text{g/mL}$) compared to the hexane ($IC_{50}=50.06 \mu\text{g/mL}$) and n-butanol ($IC_{50}=43.75 \mu\text{g/mL}$) fractions.

KEYWORDS: bioactivity, ethanol extract, sponge *Callyspongia* sp., HeLa tumor cell line

PENDAHULUAN

Interaksi biota laut dalam suatu ekosistem berjalan sangat kompleks dan dinamis. Salah satu upaya biota laut untuk mempertahankan hidupnya adalah dengan memproduksi senyawa metabolit sekunder yang berguna sebagai perisai untuk melindungi diri dari musuh. Senyawa metabolit sekunder tersebut umumnya bermanfaat bagi manusia sebagai senyawa

bioaktif yang bernilai tinggi (Nursid *et al.*, 2005). Paragraf baru dalam upaya pencarian produk alami laut untuk bahan obat, spons menjadi filum yang paling banyak dieksplorasi (Munro *et al.*, 1999). Terdapat sekitar 7000 jenis spons yang telah dipublikasi dan berdasarkan perkiraan sekitar 15.000 jenis hidup di perairan laut dan danau. Suatu wilayah yang terletak di antara Indonesia dan Australia merupakan daerah yang paling banyak ditemukan

jenis spons *Demospongiae*. Sekitar 830 jenis spons yang telah diidentifikasi hidup tersebar di wilayah laut Indonesia (Sumaryanto *et al.*, 2005).

Spons merupakan hewan multiseluler sederhana dan memiliki bentuk yang bervariasi (Amir & Budiyo, 2006). Bentuknya dipengaruhi oleh lingkungan kimia dan lingkungan fisik, seperti kedalaman, arus, ombak, dan sebagainya. Tekanan lingkungan, seperti kompetisi ruang, cahaya, dan sumber lainnya menyebabkan terjadinya keanekaragaman kimia pada berbagai organisme (Fajarningsih *et al.*, 2006^a). Telah banyak publikasi mengenai organisme laut yang mengandung senyawa antikanker dan mempunyai sitotoksitas terhadap sel lestarsi tumor (Mayer, 1999). Di antara organisme laut yang sudah terbukti memiliki sitotoksitas terhadap sel lestarsi tumor adalah spons *Crella papilata*, spons *Stylissa labelliformis*, alga merah *Rhodomyenia palmata* dan lain-lain (Setyowati *et al.*, 2004; Wikanta *et al.*, 2005; Fajarningsih *et al.*, 2006^a).

Eksplorasi senyawa antikanker dari *Callyspongia* sp. yang telah berhasil diantaranya adalah oleh Toth & Schmitz (1994) yang menunjukkan *Callyspongia* sp. dari Papua Nugini mengandung 2 senyawa sitotoksik antikanker yang merupakan senyawa asam dengan rantai bercabang dan mengandung gugusan peroksida siklik. Sedangkan Kobayashi *et al.* (1997) berhasil mengisolasi senyawa Callystatin A dari *Callyspongia truncata* yang merupakan senyawa poliketida rantai panjang tidak jenuh mengandung gugusan δ -laktone dan memiliki aktivitas sitotoksik sangat kuat terhadap sel KB dengan nilai IC_{50} sebesar 0,01 μ g/mL. Youssef *et al.* (2000) mendapatkan 6 senyawa bioaktif golongan poliasetilen dinamai aikupikanynes A-F dan octahydrosiphonochalyne. Braekman *et al.* (2003) mendapatkan spons *Callyspongia pseudoreticulata* dari perairan laut Indonesia yang mengandung senyawa bioaktif antikanker baru, poliasetilen dengan 20 atom C. Youssef *et al.* (2003) mendapatkan 4 senyawa sitotoksik dengan aktivitas sedang dari *Callyspongia* sp. terhadap sel P388 dan sel HeLa yang disebut calyspongenol A-C (senyawa poliasetilen alkohol dengan 22 atom C) dan dehydroisophonochalynol. Sedangkan de Voogd (2007) mendapatkan *Callyspongia (Euplaccella)* hasil alam dan hasil budidaya dari kepulauan Spermonde-Sulawesi Selatan mengandung senyawa bioaktif amphitoksin. Dewasa ini derivat amphitoksin 3-alkilpiridin dapat diisolasi dari berbagai *Callyspongia* sp. Amphitoksin merupakan senyawa yang menjanjikan karena aktif pada berbagai organisme uji dan berbagai uji hayati. Sandeep *et al.* (2007) menyatakan bahwa spons merah *Callyspongia siphonella* kaya akan senyawa triterpenoid sipholane, yaitu sipholenol A dan sipholenone A yang aktif sebagai

antiproliferasi dan antiangiogenik terhadap sel tumor. Zhi Shi *et al.* (2007) mendapatkan senyawa Sipholenol A yaitu senyawa triterpenoid sipholane dari *Callyspongia siphonella* yang mampu memulihkan kondisi *multi drug resistance (MDR)* melalui interaksi dengan glikoprotein P-gp yang terbentuk berlebihan pada sel kanker. Sandeep (2009) mendapatkan 4 senyawa triterpenoid sipholenol A, sipholenol L, sipholenone E, dan siphonelinol D yang dapat memulihkan kondisi kanker yang resisten terhadap banyak jenis obat melalui interaksi dengan glikoprotein P-gp.

Kajian awal diperlukan untuk memastikan adanya potensi kemampuan bahan uji dalam menghambat sel tumor sebelum dilakukan pengujian lebih teliti yang memerlukan bahan yang mahal dan peralatan yang canggih.

BAHAN DAN METODE

Bahan

1. Spons *Callyspongia* sp. diperoleh dari perairan Kepulauan Karimunjawa, Jawa Tengah. Identifikasi biota dilakukan di Pusat Penelitian Oseanologi (P2-O), LIPI.
2. Sel lestarsi tumor HeLa (*HeLa tumor cell line*) merupakan koleksi Laboratorium Bioteknologi, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.

Metode

Penyediaan ekstrak spons *Callyspongia* sp.

- a. Spons *Callyspongia* sp. sebanyak \pm 100 g dimaserasi dalam erlenmeyer yang mengandung 300 mL etanol 95% selama 24 jam, kemudian filtrat disaring dengan kertas Whatman no 1. Residu dimaserasi kembali dengan cara yang sama sebanyak 2 kali. Seluruh filtrat digabung dan pelarut dievaporasi pada suhu dan tekanan rendah hingga didapatkan ekstrak kental. Terhadap ekstrak kental dilakukan pengeringan beku, lalu ekstrak kasar tersebut disimpan di dalam inkubator suhu rendah 10°C agar senyawa tidak rusak, sampai saatnya akan digunakan.
- b. Terhadap ekstrak etanol dari spons *Callyspongia* sp. dilakukan uji toksisitas dengan metode BSLT dan uji sitotoksitas terhadap sel lestarsi tumor HeLa dengan metode MTT.
- c. Terhadap ekstrak etanol selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut heksan (non-

polar), etil asetat (semi-polar), dan *n*-butanol (semi polar), dan pada masing-masing fraksi selanjutnya dilakukan uji sitotoksitas terhadap sel lestari tumor HeLa. Fraksi yang memiliki sitotoksitas tertinggi (nilai $IC_{50} < 30$ ppm) dianggap berprospek baik dan akan dipilih untuk penelitian selanjutnya.

Uji toksisitas ekstrak etanol

Pengujian toksisitas ekstrak etanol dilakukan terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT menurut Meyer (1982).

Persiapan larutan yang akan diuji

Sejumlah ± 20 mg ekstrak etanol yang telah kering dilarutkan dalam 2 mL dimetil sulfoksida (DMSO). Larutan ini digunakan sebagai larutan induk.

Uji toksisitas metode BSLT

Larutan induk sebanyak 25, 50, 100, dan 200 μ L berturut-turut dimasukkan ke dalam vial yang telah disiapkan untuk mendapatkan konsentrasi 25, 50, 100, dan 200 μ g/mL. Setiap konsentrasi dibuat dalam 3 vial (triplo). Ke dalam masing-masing vial dimasukkan air laut kira-kira 5 mL dan 10 ekor *nauplii*, kemudian ditambahkan air laut sampai diperoleh 10 mL. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan melihat jumlah larva udang *Artemia salina* Leach yang mati. Jumlah larva yang mati dan yang masih hidup dihitung selanjutnya dihitung tingkat kematian atau mortalitas dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati terhadap jumlah total larva uji. Nilai LC_{50} diperoleh dengan analisis probit, menggunakan metode regresi linier antara log konsentrasi ekstrak uji versus persen kematian hewan uji *Artemia salina*. Suatu zat dikatakan aktif/toksik bila nilai $LC_{50} < 1000$ μ g/mL (Meyer *et al.*, 1982; Alam, 2002; Carballo *et al.*, 2002).

Fraksinasi

Terhadap ± 1 gram ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut heksan, etil asetat, dan *n*-butanol. Ekstrak etanol dalam vial diekstrak dengan penambahan pelarut heksan masing-masing 15 mL sebanyak 3 kali, kemudian disentrifus dan larutan dipisahkan. Bagian residunya ditambah pelarut etil asetat dan air (1:3) masing-masing 12 mL sebanyak 3 kali, kemudian disentrifus dan larutan dipisahkan. Bagian residunya ditambah pelarut *n*-butanol masing-masing 15 mL sebanyak 3 kali, kemudian disentrifus dan larutan dipisahkan. Terhadap masing-masing larutan ekstrak fraksi dilakukan penguapan dalam rotavapor pada tekanan 25 mbar dan suhu 23°C,

kemudian dilakukan pengeringan beku (*freeze dryer*) pada tekanan 185×10^{-3} mbar dan suhu -40°C hingga diperoleh ekstrak kering fraksi heksan, etil asetat, dan *n*-butanol kering.

Uji sitotoksitas ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol dengan metode uji MTT

- Sel yang sudah dikultur dihitung kepadatannya dengan *haemocytometer neubauer*. Apabila sel telah berjumlah 10^5 sel/100 μ L maka sel siap digunakan untuk uji sitotoksitas (Freshney, 1994; Wilson, 2002). Selanjutnya dimasukkan sebanyak 100 μ L sel ke dalam masing-masing sumuran kontrol sel dan perlakuan lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan aliran CO_2 5 mL/menit.
- Dibuat larutan induk dengan cara melarutkan 5 mg ekstrak ke dalam 1 mL DMSO. Ekstrak yang akan diuji daya sitotoksitasnya dibuat dengan konsentrasi 25; 50; dan 100 μ g/mL untuk ekstrak etanol, dan 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 μ g/mL untuk fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-butanol yang diambil dari larutan induk.
- Selanjutnya 100 μ L ekstrak dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran kontrol sampel dan perlakuan sampel, kemudian 100 μ L media dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran kontrol sel dan kontrol sampel, dan 200 μ L media ke dalam sumuran kontrol media. Sumuran kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan aliran CO_2 5 mL/menit. Selanjutnya ke dalam tiap-tiap sumuran ditambahkan pereaksi MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenil tetrazolium bromide*) sebanyak 10 μ L. Kemudian mikroplat diinkubasi dalam CO_2 inkubator selama 4 jam, selanjutnya reaksi MTT dihentikan dengan cara menambahkan 100 μ L *sodium dodesil sulfat* (SDS) 10%. Mikroplat diinkubasi selama 12 jam pada suhu kamar, selanjutnya absorbansi tiap sumuran dibaca dengan spektrofotometer *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm (ATCC, 2001; Hughes & Mehmet, 2003; Wikanta *et al.*, 2005). Besarnya penghambatan pertumbuhan sel (dalam %) dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Penghambatan pertumbuhan (\%)} = [(A - B) / A] \times 100\%$$

Keterangan:

A = Absorbansi sel hidup kontrol (kontrol sel - kontrol media)

B = Absorbansi sel hidup perlakuan (perlakuan sampel - kontrol sampel).

Kontrol sel = 100 μ L sel + 100 μ L media; kontrol media = 200 μ L media; kontrol sampel = 100 μ L

sampel + 100 µL media; perlakuan sampel = 100 µL sampel + 100 µL sel). Data prosentase penghambatan pertumbuhan sel digunakan untuk mencari IC₅₀. Prosentase penghambatan pertumbuhan dikonversi menjadi nilai probit versus log konsentrasi. Persamaan garis linier yang diperoleh digunakan untuk mencari nilai IC₅₀.

Analisis Data

Data hasil uji toksisitas dan sitotoksitas dianalisis secara statistik menggunakan analisis probit untuk mendapatkan nilai LC₅₀ dan IC₅₀.

HASIL DAN BAHASAN

Identifikasi Biota

Hasil identifikasi menyatakan bahwa biota laut yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis *Callyspongia* sp.

Ekstraksi

Langkah awal penelitian ini adalah melakukan ekstraksi terhadap spons *Callyspongia* sp. dengan menggunakan pelarut etanol agar dapat melarutkan senyawa organik non polar dan semi polar. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi pada suhu kamar, karena cara tersebut sesuai untuk skala kecil dan tidak merusak senyawa yang tidak tahan pemanasan. Maserasi dilakukan berulang kali agar ekstrak senyawa organik yang terlarut atau didapatkan lebih banyak sehingga dapat mencapai maksimum.

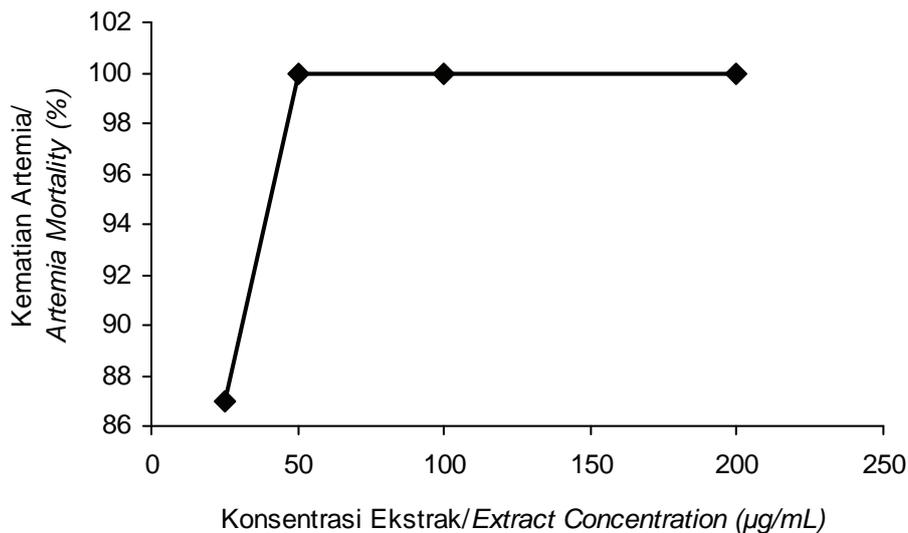
Evaporasi dilakukan pada suhu dan tekanan rendah dimaksudkan agar etanol yang terdapat dalam ekstrak dapat menguap dengan cepat dan sempurna. Ekstrak kental hasil evaporasi kemudian dikeringkan pada suhu dan tekanan rendah, yang bertujuan untuk menarik sisa air yang masih terdapat dalam ekstrak, karena etanol yang digunakan pada proses maserasi adalah etanol teknis dan bahan yang digunakan juga mengandung garam dan banyak mengandung air. Hasil ekstraksi dari 100 g sampel spons *Callyspongia* sp. basah menggunakan pelarut etanol 300 mL adalah 1,1 g ekstrak etanol (kering). Dengan demikian perhitungan rendemen adalah sebagai berikut:

$$\text{Rendemen} = \{(1,1 \text{ g} / 100 \text{ g}) \times 100\% \} = 1,1\%$$

Uji toksisitas ekstrak etanol dengan metode BSLT

Uji toksisitas menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) merupakan langkah awal untuk mengetahui sifat toksik dari suatu bahan atau senyawa dari ekstrak bahan alam. Zat yang bersifat toksik terhadap *Artemia salina* Leach diperkirakan juga bersifat toksik terhadap sel kanker atau tumor, walaupun sebenarnya metode BSLT tidak bersifat spesifik dan hanya merupakan uji pendahuluan (Meyer *et al.*, 1982; Carballo *et al.*, 2002; Fajarningsih *et al.*, 2006^b). Metode ini dipilih karena dapat dilakukan dengan cepat, sederhana, mudah dan memberikan prediksi mengenai tingkat toksisitas sampel.

Data hasil uji dari ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. dengan metode BSLT disajikan pada



Gambar 1. Hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol (µg/mL) spons *Callyspongia* sp. dengan tingkat kematian *Artemia salina* (%) pada uji toksisitas ekstrak dengan metode BSLT.

Figure 1. Correlation between concentration (µg/mL) of sponge *Callyspongia* sp. ethanol extract versus mortality of *Artemia salina* (%) on the extract toxicity test using BSLT method.

Gambar 1. Pada Gambar 1 dapat diketahui tingkat kematian *Artemia* pada setiap konsentrasi yang diujikan. Tampak bahwa ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. pada konsentrasi 50, 100, dan 200 µg/mL sudah mampu mematikan semua larva uji *Artemia salina* Leach. Berdasarkan analisis probit dapat diketahui nilai LC_{50} ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. yang diperoleh adalah 3,30 µg/mL dari persamaan garis regresi linier $Y = 1,953 X + 3,987$. Zat bersifat aktif atau toksik apabila memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ µg/mL (Meyer *et al.*, 1982; Carballo *et al.*, 2002). Semakin kecil nilai LC_{50} semakin tinggi toksisitasnya. Ekstrak etanol tersebut memiliki nilai LC_{50} sebesar 3,30 µg/mL adalah jauh lebih kecil dari 30 µg/mL menunjukkan bahwa ekstrak etanol tersebut bersifat sangat toksik.

Uji sitotoksitas ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. terhadap sel lestari tumor HeLa

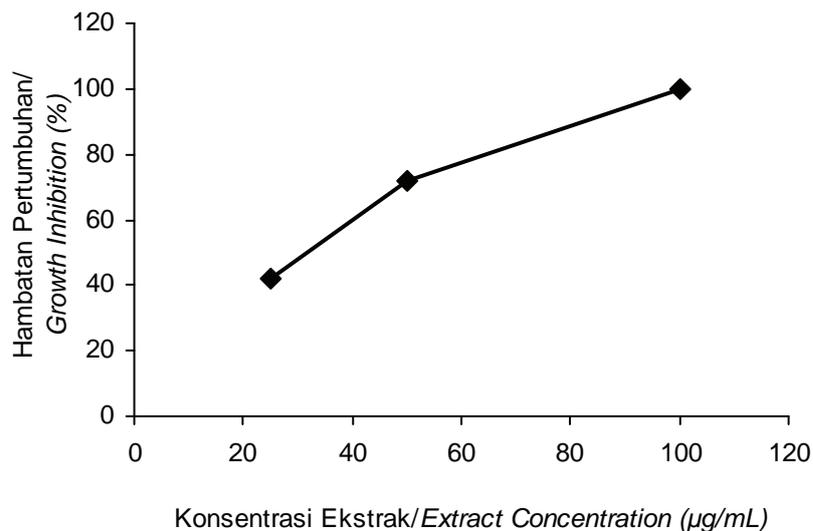
Sifat toksik senyawa tersebut kemudian diujikan terhadap sel HeLa. Uji sitotoksitas secara *in vitro* dari ekstrak etanol terhadap sel lestari tumor HeLa bersifat lebih spesifik, cepat dan hanya membutuhkan sedikit bahan uji jika dibandingkan dengan pengujian secara *in vivo* dan juga dapat membatasi penggunaan hewan percobaan. Dari hasil uji sitotoksitas ekstrak etanol terhadap sel lestari tumor HeLa didapat persamaan garis regresi linier antara log konsentrasi dan nilai probit, yaitu $Y = 5,464 X - 3,127$ dan didapatkan nilai $IC_{50} = 30,71$ µg/mL. Berdasarkan persyaratan dari *National Cancer Institute* yang

menyatakan bahwa batas nilai toksisitas tertinggi adalah 30 µg/mL (Scheuer, 1987; Torres *et al.*, 2005) maka ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. memiliki toksisitas rendah terhadap sel lestari tumor HeLa.

Pada Gambar 2 disajikan data tingkat penghambatan pertumbuhan sel lestari tumor yang dihasilkan pada setiap konsentrasi ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. yang diujikan. Tampak bahwa ekstrak tersebut menghasilkan tingkat penghambatan pertumbuhan sel lestari tumor yang makin meningkat pada konsentrasi 25, 50, dan 100 µg/mL. Ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. memiliki toksisitas terhadap sel lestari tumor HeLa cukup baik, dengan nilai IC_{50} sebesar 30,71 µg/mL. Presentase penghambatan sel cenderung makin meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi.

Fraksinasi

Penelitian dilanjutkan dengan melakukan fraksinasi untuk menghilangkan pengotor yang terdapat pada ekstrak dan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol berdasarkan sifat kepolarannya dengan menggunakan 3 macam pelarut yang polaritasnya berbeda yaitu fraksi heksan (non polar), fraksi etil asetat (semi polar) dan fraksi *n*-butanol (semi polar). Pemilihan pelarut untuk fraksinasi disesuaikan dengan sifat fisika dan sifat kimia senyawa yang terkandung dalam bahan. Dalam kimia berlaku kaidah *like dissolved like*, yaitu senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar, senyawa yang bersifat semi polar akan larut dalam pelarut semi polar, dan senyawa yang



Gambar 2. Hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol (µg/mL) spons *Callyspongia* sp. dengan hambatan pertumbuhan (%) sel lestari tumor HeLa pada uji sitotoksitas dengan metode MTT.

Figure 2. Correlation between ethanol extract concentration (µg/mL) of sponge *Callyspongia* sp. versus growth inhibition (%) of HeLa tumor cell line on the cytotoxic assay using MTT method.

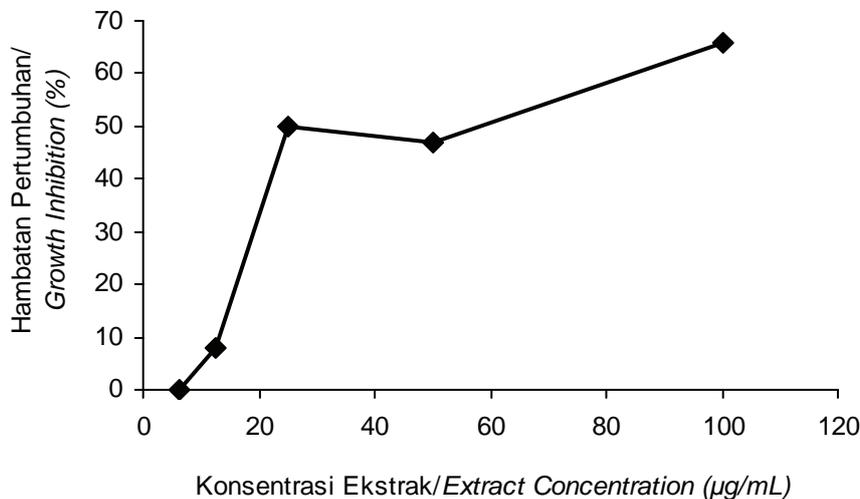
bersifat polar akan larut dalam pelarut polar. Hasil fraksinasi yang dilakukan terhadap 1,015 mg ekstrak etanol *Callyspongia* sp. didapatkan masing-masing: fraksi heksan 3,6 mg (rendemen 0,36%), fraksi etil asetat 5,4 mg (rendemen 0,53%), fraksi *n*-butanol 196,2 mg (rendemen 19,33%), dan sisanya 809,8 mg (sebesar 79,78%) adalah pengotor atau residu.

Uji sitotoksitas fraksi heksan, etil asetat, dan *n*-butanol dari spons *Callyspongia* sp. terhadap sel lestari tumor HeLa

Terhadap masing-masing fraksi heksan, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol dilakukan uji sitotoksitas terhadap sel lestari tumor HeLa dengan seri

makin meningkat. Dapat dilihat, ekstrak fraksi heksan spons *Callyspongia* sp. memiliki toksisitas kurang baik atau tidak berprospek baik terhadap sel lestari tumor HeLa, dengan nilai IC_{50} sebesar 50,06 $\mu\text{g/mL}$. Persentase penghambatan sel cenderung makin meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi yang diujikan, dengan menghasilkan persamaan garis regresi linier $Y = 4,036 X - 1,858$ tetapi menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 50,06 $\mu\text{g/mL}$ lebih besar dari pada yang disyaratkan oleh *National Cancer Institute* dengan batas tertinggi 30 $\mu\text{g/mL}$ (Scheuer, 1987; Torres *et al.*, 2005).

Senyawa antikanker yang bersifat tidak polar umumnya adalah senyawa terpenoid yang larut dalam



Gambar 3. Hubungan antara konsentrasi ekstrak fraksi heksan spons *Callyspongia* sp. dengan hambatan pertumbuhan sel lestari tumor HeLa pada uji sitotoksitas dengan metode MTT.

Figure 3. Correlation between concentration of sponge *Callyspongia* sp. hexane fraction extract versus HeLa tumor cell line growth inhibition on the cytotoxic assay using MTT method.

konsentrasi tertentu. Berdasarkan analisis probit dengan menggunakan perhitungan antara log konsentrasi versus nilai probit penghambatan akan didapatkan persamaan garis regresi linier yang dapat digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} dari masing-masing fraksi.

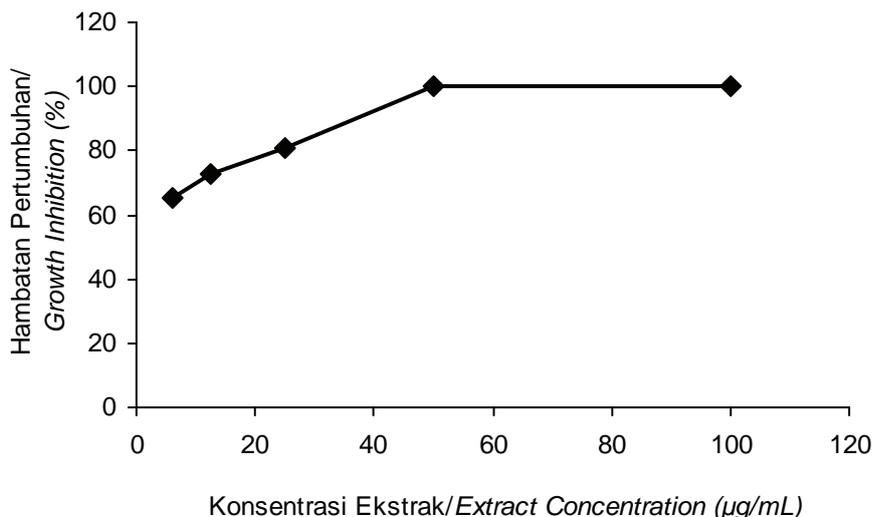
Fraksi heksan

Pada Gambar 3 disajikan data tingkat penghambatan pertumbuhan sel lestari tumor yang dihasilkan pada setiap konsentrasi ekstrak fraksi heksan spons *Callyspongia* sp. yang diujikan. Tampak bahwa ekstrak tersebut pada konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan tingkat penghambatan pertumbuhan sel lestari tumor yang

pelarut heksan yang tidak polar (indeks polaritas 0,0), tetapi apabila senyawa tersebut memiliki gugus fungsi yang bersifat agak polar maka senyawa terpenoid tersebut akan lebih mudah larut dalam pelarut etil asetat yang bersifat semipolar (indeks polaritas 4,2). Akibatnya banyak senyawa bioaktif terakumulasi dalam pelarut etil asetat pada saat ekstraksi, yang selanjutnya dipisahkan secara bertahap menggunakan partikel kolom berbeda berdasarkan polaritas senyawa dan berdasarkan besarnya ukuran atau struktur molekul senyawa bioaktif.

Fraksi etil asetat

Pada Gambar 4 disajikan data tingkat penghambatan pertumbuhan sel lestari tumor yang



Gambar 4. Hubungan antara konsentrasi ekstrak fraksi etil asetat ($\mu\text{g/mL}$) spons *Callyspongia* sp. dengan hambatan pertumbuhan (%) sel lestari tumor HeLa pada uji sitotoksitas dengan metode MTT.

Figure 4. Correlation between ethyl acetate fraction extract concentration ($\mu\text{g/mL}$) of sponge *Callyspongia* sp. versus growth inhibition (%) of HeLa tumor cell line on the cytotoxic assay using MTT method.

dihasilkan pada setiap konsentrasi ekstrak fraksi etil asetat spons *Callyspongia* sp. yang diujikan. Tampak bahwa ekstrak tersebut pada konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan tingkat penghambatan pertumbuhan sel lestari tumor yang makin meningkat, bahkan pada konsentrasi 50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghasilkan tingkat penghambatan hingga 100%. Gambar 4 memperlihatkan ekstrak fraksi etil asetat spons *Callyspongia* sp. memiliki toksisitas sangat baik atau sangat berprospek baik terhadap sel lestari tumor HeLa, dengan nilai IC_{50} sebesar 6,06 $\mu\text{g/mL}$.

Persentase penghambatan sel cenderung makin meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi yang diujikan, dengan menghasilkan persamaan garis regresi linier $Y = 2,618 X + 2,953$ dan menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 6,06 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini berarti bahwa ekstrak tersebut sangat potensial terhadap sel lestari tumor HeLa dan memenuhi persyaratan sebagaimana yang ditetapkan oleh *National Cancer Institute* dengan batas tertinggi 30 $\mu\text{g/mL}$ (Scheuer, 1987; Torres *et al.*, 2005).

Senyawa-senyawa yang umumnya memiliki aktivitas antikanker adalah senyawa flavonoid, terpenoid, dan poliketida (Mayer, 1999) sehingga senyawa-senyawa tersebut pada saat diekstrak sangat mungkin masuk dalam pelarut etil asetat. Senyawa flavonoid sesuai dengan gugus fungsi yang terikatnya secara umum memiliki tingkat polaritas antara semi polar dan polar sedangkan senyawa terpenoid dan poliketida banyak yang memiliki gugus fungsi bersifat agak polar sehingga memiliki polaritas

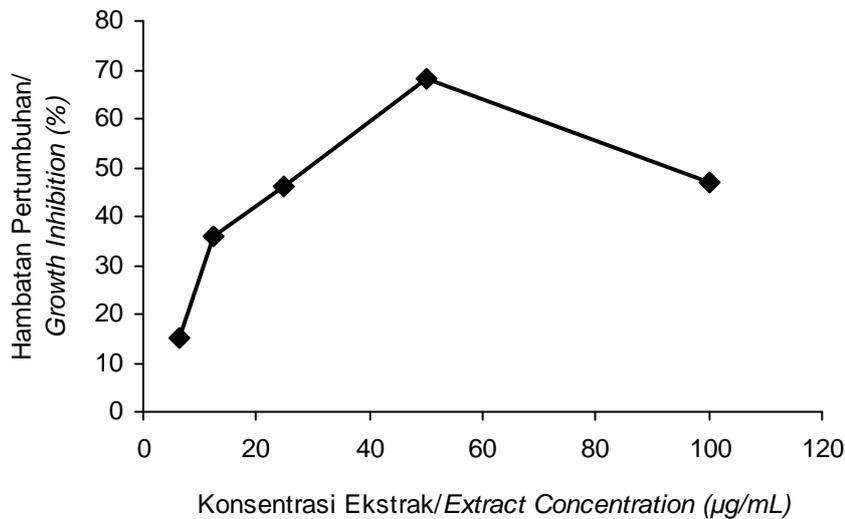
antara tidak polar dan semi polar. Ketiga golongan senyawa tersebut sangat mungkin dapat terekstrak masuk ke dalam pelarut etil asetat yang bersifat semi polar.

Fraksi *n*-butanol

Pada Gambar 5 disajikan data tingkat penghambatan pertumbuhan sel lestari tumor yang dihasilkan pada setiap konsentrasi ekstrak fraksi *n*-butanol spons *Callyspongia* sp. yang diujikan. Tampak bahwa ekstrak tersebut pada konsentrasi 6,25; 12,5; 25; dan 50 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan tingkat penghambatan pertumbuhan sel lestari tumor yang makin meningkat walaupun menghasilkan tingkat kematian yang relatif rendah (kurang dari 50%), sedangkan pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ menurun, yang menunjukkan penyimpangan.

Fenomena menurunnya persentase hambatan saat konsentrasi ekstrak tertinggi, secara hipotetik disebut sebagai efek hormesis bahan kimia (Calabrese & Baldwin, 1998). Efek hormesis ditunjukkan dengan adanya peningkatan efek ekstrak pada konsentrasi rendah dan penurunan efek ekstrak pada titik tertentu saat ekstrak mencapai konsentrasi yang tinggi. Hal ini harus dibuktikan lebih lanjut untuk mengetahui apakah terjadi efek hormesis.

Butanol digunakan sebagai salah satu pelarut karena mampu menarik senyawa organik semi polar. Senyawa organik semi polar termasuk di antaranya senyawa flavonoid dengan indeks polaritas agak rendah di bawah indeks polaritas etil asetat (indeks



Gambar 5. Hubungan antara konsentrasi ekstrak fraksi *n*-butanol (µg/mL) spons *Callyspongia* sp. dengan hambatan pertumbuhan (%) sel lestari tumor HeLa pada uji sitotoksitas dengan metode MTT.

Figure 5. Correlation between *n*-butanol fraction extract concentration (µg/mL) of sponge *Callyspongia* sp. versus growth inhibition (%) of HeLa tumor cell line on the cytotoxic assay using MTT method.

polaritas etil asetat = 4,3 dan *n*-butanol = 3,9) karena adanya gugus fungsi yang terikat padanya atau senyawa lain yang memiliki gugus fungsi bersifat polar.

Dengan perlakuan yang sama seperti ekstrak fraksi heksan dan etil asetat, hasil analisis regresi linier data persentase hambatan sel terhadap konsentrasi ekstrak menghasilkan persamaan garis regresi linier $Y = 0,914 X + 3,501$ dan menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 43,75 µg/mL. Nilai IC_{50} ini menunjukkan bahwa ekstrak fraksi *n*-butanol spons *Callyspongia* sp. memiliki toksisitas kurang baik atau tidak berprospek baik terhadap sel lestari tumor HeLa karena tidak memenuhi persyaratan sebagaimana ditetapkan oleh *National Cancer Institute* dengan batas tertinggi 30 µg/mL (Scheuer, 1987; Torres *et al.*, 2005). Hasil perhitungan data pada konsentrasi di bawah 100 µg/mL versus hambatan yaitu pada daerah linieritas menghasilkan persamaan garis regresi linier $Y = 1,591 X + 2,757$ dan nilai IC_{50} sebesar 25,69 µg/mL. Hal ini membuktikan bahwa efektivitas penghambatan senyawa bioaktif ekstrak fraksi *n*-butanol spons *Callyspongia* sp. terhadap pertumbuhan sel HeLa terjadi pada daerah linieritas di bawah konsentrasi 100 µg/mL.

Senyawa bioaktif dengan aktivitas antikanker yang larut dalam air bersifat polar. Senyawa organik polar tersebut untuk isolasinya harus ditarik oleh pelarut organik, pelarut yang biasa digunakan adalah butanol. Senyawa yang masuk dalam kelompok ini biasanya adalah senyawa flavonoid dengan polaritas agak tinggi di atas polaritas etil asetat (indeks polaritas > 4,3)

karena adanya gugus fungsi yang terikat padanya atau senyawa lain yang memiliki gugus fungsi bersifat polar. Senyawa antikanker yang bersifat polar sangat sedikit, umumnya bersifat semi polar atau non polar.

Berdasarkan hasil pengujian yang dilakukan terhadap ketiga fraksi heksan, etil asetat, dan *n*-butanol, zat yang potensial mempunyai sitotoksitas tinggi terdapat pada fraksi etil asetat karena memiliki nilai $IC_{50} = 6,06$ µg/mL ($IC_{50} \leq 30$ µg/mL).

Memperhatikan hasil-hasil peneliti terdahulu menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terdapat pada spons *Callyspongia* sp. adalah senyawa terpenoid (Sandeep *et al.*, 2007; Zhi Shi *et al.*, 2007; Sandeep, 2009), poliketida (Toth & Schmitz, 1994; Kobayashi *et al.*, 1997), dan poliasetilen (Braekman *et al.*, 2003; Youssef *et al.*, 2003), yang memiliki rantai karbon panjang dan mengandung banyak ikatan rangkap (Youssef *et al.*, 2000), serta memiliki gugus aktif alkohol, asam, lakton, dan peroksida siklik. Senyawa-senyawa tersebut termasuk dalam golongan sedikit polar atau semi polar sehingga pada saat fraksinasi masuk dalam pelarut etil asetat yang bersifat agak polar. Senyawa terpenoid biasanya masuk dalam pelarut heksan yang tidak polar tetapi hasil pengujian bioaktivitas terhadap fraksi heksan menunjukkan nilai bioaktivitas sangat rendah sehingga kemungkinan senyawa terpenoid yang ada memiliki gugus aktif yang bersifat agak polar sehingga masuk dalam pelarut etil asetat, sedangkan yang masuk dalam pelarut heksan kemungkinan adalah senyawa tidak polar dan tidak memiliki sitotoksitas yang cukup baik sebagai antitumor.

KESIMPULAN

1. Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT menunjukkan bahwa ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. dikategorikan bersifat sangat toksik terhadap *Artemia salina* Leach dengan $LC_{50} = 3,30 \mu\text{g/mL}$.
2. Ekstrak etanol spons *Callyspongia* sp. memiliki sitotoksitas terhadap sel lestari tumor HeLa dengan nilai $IC_{50} = 30,71 \mu\text{g/mL}$.
3. Berdasarkan hasil pengujian terhadap tiga fraksi heksan, etil asetat, dan *n*-butanol hanya fraksi etil asetat yang potensial mempunyai sitotoksitas tinggi terhadap sel lestari tumor HeLa dengan nilai $IC_{50} = 6,06 \mu\text{g/mL}$ sehingga layak untuk dilakukan isolasi dan elusidasi lebih lanjut menggunakan instrumen LCMS, NMR, dan FTIR.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, G. 2002. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) sebagai bioassay dalam isolasi senyawa bioaktif dari bahan alam. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 6(2): 423–425.
- Amir, I. dan Budiyanto, A. 2006. Mengenal sponge laut (*Demospongiae*) secara umum. *Oseana*. 21(2): 15–31.
- ATCC (*American Type Culture Collection*). 2001. *MTT proliferation Assay, Instructions*. P.O. Box 1549, Manassas, USA. 6 pp.
- Braekman, J.C., Daloz, D., Devijver, C., Dubut, D., and Van Soest, R.W.M. 2003. A New C-20 polyacetylene from the sponge *Callyspongia pseudoreticulata*. *J. Nat. Prod.* 66(6): 871–872.
- Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. 1998. Hormesis as a biological hypothesis. *Environmental Health Perspective*. 106(1): 357–362.
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., and Garcia-Gravalos, M.D. 2002. A comparison between two brine shrimp assay to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural product (Methodology Article). *BMC Biotechnology* 2: 1–5.
- De Voogd, N.J. 2007. The mariculture potential of the Indonesian reef-dwelling sponge *Callyspongia* (*Euplaccella*) biru: Growth, survival, and bioactive compounds. *Aquaculture*. 262(1): 54–64.
- Fajarningsih, N.D., Januar, H.I., Nursid, M., dan Wikanta, T. 2006^a. Potensi antitumor ekstrak sponge *Crella papilata* asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 1(1): 35–42.
- Fajarningsih, N.D., Januar, H.I., Wikanta, T., and Nursid, M. 2006^b. Correlation between brine shrimp lethality test and cytotoxicity assay in marine natural product screening. International seminar and workshop marine biodiversity and their potential for developing bio-pharmaceutical industry in Indonesia. Departemen Kelautan dan Perikanan, IPB Bogor, COREMAP. *Forum Biofarmasi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta, 15 Mei 2006.
- Freshney, R.I. 1994. *Culture of Animal Cell; A Manual of Basic Technique 3rd ed.*: Wiley-liss Inc; New York. p. 85–287.
- Hughes, D. and Mehmet, H. 2003. *Cell Proliferation and Apoptosis*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford. 373 pp.
- Kobayashi, M., Higuchi, K., Murakami, N., Tajima, H., and Aoki, S. 1997. Callystatin A a potent cytotoxic polyketide from the marine sponge, *Callyspongia truncata*. *Tetrahedron Letters*. 38(16): 2859–2862.
- Mayer, A.M.S. 1999. Marine pharmacology in 1998: Antitumor and cytotoxic compounds. *The Pharmacologist*. 11(4): 159–164.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45: 31–34.
- Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., Hickford, S.J.H., Lill, R.E., Li, S., Battershill, C.N., and Duckworth, A.R. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnology*. 70: 15–25.
- Nursid, M., Munifah, I., dan Januar, H.I. 2005. Skrining senyawa bioaktif ekstrak metanol dari karang lunak *Alcyonidae*. *J. Penel. Perik. Indon.* 11(4): 33–38.
- Sandeep, J., Amit, S., Shenouda, Y., Ashley, B., Sylvester, P.W., Huntimer, E., and Sayed, K.A. 2007. Biocatalysis dari triterpenoids siphonane antikanker. *Planta Medica* 73(6): 591–596.
- Sandeep, J. 2009. *Bioactive Siphonane Triterpenoids from the Marine Sponge Callyspongia siphonella*. Disertasi Ph.D. University of Louisiana at Monroe. 151 pp.
- Scheuer, P.J. 1987. *Bioorganic Marine Chemistry*. Vol. I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 105–106.
- Setyowati, E.P., Sudarsono, dan Wahyuno, S. 2004. Uji sitotoksitas dan uji antimikroba senyawa bioaktif sponge *Stylissa labelliformis*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 15(2): 50–56.
- Sumaryanto, W., Wibowo, A.E., dan Chaidir. 2005. Isolasi dan elusidasi struktur senyawa utama dari sponge *Axynissa aplysinoides*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 16(4): 186–191.
- Torres, M.R., Sousa, A.P.A., Filho, E.A.T.S., Pessoa, C., Moraes, M.E.A., Moraes, M.O., and Costa-Lotuf, L.V. 2005. Biological activity of aqueous and organic extracts of seaweeds from Ceara State, Brazil. *Arq. Cien. Mar., Fortaleza*. 38: 55–63.
- Toth, S.I. and Schmitz, F.J. 1994. Two new cytotoxic peroxide-containing acids from a New Guinea sponge, *Callyspongia* sp. *J. Nat. Prod.* 57(1): 123–127.
- Wikanta, T., Januar, H.I., dan Nursid, M. 2005. Uji aktivitas antioksidan, toksisitas, dan sitotoksitas ekstrak alga merah (*Rhodymenia palmata*). *J. Penel. Perik. Indon. Edisi Pasca Panen*. 11(4): 41–49.
- Wilson, A.P. 2002. Cytotoxicity and viability assay. In Master, J.R.W. (ed.). *Animal Cell Culture: A Practical*

- Approach*. 3rd ed. New York. Oxford University Press. New York. p. 263–272.
- Youssef, D.T.A., Yoshida, W.Y., Kelly, M., and Scheuer, P.J. 2000. Polyacetylenes from a red sea sponge *Callyspongia* species. *J. Nat. Prod.* 63(10): 1406–1410.
- Youssef, D.T.A., Van Soest, R.W.M., and Fusetani, N. 2003. Callyspongenols A-C, new cytotoxic C22-polyacetylenic alcohols from a red sea sponge, *Callyspongia* species. *J. Nat. Prod.* 66(55): 679–81.
- Zhi Shi, Sandeep, J., Kim in-Wha, Xing-Xiang, P., Loana, A., Youssef, D.T.A., Khalid, S., Suresh, V.A., and Zhe-Sheng, C. 2007. Sipholenol A, a marine-derived sipholane triterpene, potently reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistant. *Cancer Science.* 98(9): 1373–1380.