

## Aktivitas Sitotoksik dan Apoptosis Ekstrak Spons Spesies A Anggota Ordo Astroporida terhadap Sel HeLa (*Cervical Cancer Cell Line*)

Cytotoxic and Apoptosis Activity of Sponge Species A of Astroporida Order's Extract on HeLa Cells (cervical cancer cell line)

Ardaning Nuriliani\*, Ibnu Agus Ariyanto, Mei Ria Santi, Andi Mahendra, Ni Wayan Erly Sintya Dewi, Arif Luthfi Nurul Huda, dan Nastiti Wijayanti

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada  
Jln. Teknik Selatan, Sekip Utara Yogyakarta  
Email: [d\\_ningciit@yahoo.com](mailto:d_ningciit@yahoo.com) \*Penulis untuk korespondensi

### Abstract

Sponges are marine organisms which have a lot of bioactive compounds. Those compounds are having potency as antibacteria, antivirus, and anticancer. This research was purposed to study the cytotoxicity and apoptosis activity of sponge species A of Astroporida order's extract on HeLa cells. Cytotoxic activity of ethanolic, methanolic, and chloroform extract of sponge species A on HeLa cells were done using MTT assay and apoptotic test was done using double staining of ethidium bromide-acridine orange. Compound groups on sponge species A were detected using Thin Layer Chromatography (TLC). The results showed that ethanolic, methanolic, and chloroform extract of sponge species A have  $IC_{50}$  value 18.25; 27.87; and 13.87  $\mu\text{g/mL}$  respectively. Moreover ethanolic, methanolic, and chloroform extract of sponge species A at the concentration of 31,25  $\mu\text{g/mL}$  could induce apoptosis  $35.3 \pm 11.16\%$ ;  $82.64 \pm 16.21\%$ ; and  $86.76 \pm 9.27\%$  respectively. TCL detection showed that sponge species A contains active compounds such as alkaloid, flavonoid, phenol, and terpenoid. Based on the results it could be concluded that extract of sponge species A have potency as anticancer agent.

Keywords: extract of sponge species A, cytotoxic, apoptosis, HeLa cells

### Abstrak

Spons merupakan fauna laut yang diketahui memiliki berbagai senyawa bioaktif. Senyawa tersebut berpotensi sebagai antibakteri, antivirus, dan antikanker. Penelitian ini bertujuan mempelajari aktivitas sitotoksik dan apoptosis ekstrak spons spesies A anggota ordo Astroporida terhadap sel HeLa. Pada penelitian ini pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak etanolik, metanolik, dan kloroform spons spesies A terhadap sel HeLa dilakukan menggunakan *MTT assay* dan uji apoptosis menggunakan *double staining*, yaitu etidium bromida-acridine orange. Deteksi golongan senyawa yang terkandung di dalam spons spesies A dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil uji sitotoksitas menunjukkan bahwa ekstrak etanolik, metanolik, dan kloroform spons spesies A masing-masing memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 18,25; 27,87; dan 13,87  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak etanolik, metanolik, dan kloroform spons spesies A pada konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/mL}$  dapat menginduksi kematian sel melalui apoptosis masing-masing sebesar  $35,3 \pm 11,16\%$ ;  $82,64 \pm 16,21\%$ ; dan  $86,76 \pm 9,27\%$ . Berdasarkan uji menggunakan KLT diketahui bahwa spons spesies A mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, dan terpenoid. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa ekstrak spons spesies A berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

Kata kunci: ekstrak spons spesies A, sitotoksik, apoptosis, sel HeLa

Diterima: 09 Agustus 2012, disetujui: 12 November 2012

## Pendahuluan

Kanker serviks merupakan salah satu kanker yang paling sering dijumpai pada wanita di negara berkembang. Kasusnya dapat mencapai 25% dari seluruh kanker pada wanita. Pada kanker serviks uteri, dari 471.000 kasus baru terjadi 233.000 kasus kematian (Turkistant dkk., 2003).

Salah satu bentuk terapi kanker adalah dengan penggunaan obat antikanker. Pada umumnya, obat tersebut sangat toksik sehingga penggunaannya harus dilakukan secara hati-hati dengan dosis tepat untuk menghindari komplikasi (Sukardja, 1999; Velde dkk., 1999). Obat-obatan tersebut telah digunakan secara rutin meski beberapa obat mekanisme kerjanya belum diketahui dengan jelas (Velde dkk., 1999). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian secara terus-menerus untuk menemukan obat antikanker yang efektif tetapi aman dengan harga yang terjangkau masyarakat.

Spons merupakan fauna laut multiselular tingkat rendah. Organisme ini kaya senyawa metabolit sekunder dengan berbagai aktivitas biologis (Yalcin, 2007; Shinde dkk., 2008). Berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa spons memiliki aktivitas antimikrobia, antimalaria, antivirus (Pedpradab dkk., 2010), dan antikanker (Setyowati dkk., 2007; Reddy dkk., 2006; Nishimura dkk., 2005; Rangel dkk., 2001; Carotenuto dkk., 1998). Penelitian yang dilakukan oleh Rangel dkk., (2001) menunjukkan bahwa 24 jenis spons dari pantai sebelah tenggara Brazil yang diteliti, sebanyak 13 spons (54%) memiliki tingkat toksisitas sedang hingga tinggi.

Berbagai golongan senyawa aktif seperti alkaloid dan terpenoid diketahui memiliki efek sitotoksik terhadap berbagai sel kanker. Bastaldin alkaloid dari spons *Dendrilla cactus* diketahui mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel kanker Sup-T1 (limfoma sel T) (Reddy dkk., 2006). Pedpradab dkk., (2010) melaporkan bahwa ekstrak deklorometan (DCM) dari *Phakellia ventilabrum* menunjukkan aktivitas sitotoksik kuat terhadap sel Vero. Berbagai derivat bromotirosin dari asosiasi spons *Jaspis* sp. dan *Poecillastra* sp. memiliki efek sitotoksik terhadap sel A-549

(kanker paru-paru manusia), sel SK-OV-3 (kanker ovarium manusia), sel SK-MEL-2 (kanker kulit manusia), sel XF-498 (kanker sistem saraf pusat manusia), dan sel HCT-15 (kanker kolon manusia). Carotenuto dkk., (1998) juga melaporkan bahwa berbagai senyawa litenolides yang berasal dari *Cacospongia* cf. *linteiformis* menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel WEHI 164 (*murine fibrosarcoma cell line*), sel J774 (*murine monocyte/macrophage cell line*), sel P388 (*murine leukemia cell line*), dan GM7373 (*bovine endothelial cell line*) dengan tingkat sitotoksitas yang berbeda. Ferreira dkk., (2007) menyatakan bahwa ekstrak *Geodia corticostylifera* menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan sel yang tinggi terhadap pertumbuhan sel tumor dan memiliki efek hemolitik yang cukup tinggi terhadap eritrosit mencit. Senyawa ecionines A dari spons *Ecionemia geodides* juga diketahui memiliki efek toksik sedang terhadap sel TSU-Pr1, TSU-Pr1-B1, TSU-Pr1-B2, dan 5637 *human bladder cancer cell lines* (Barnes dkk., 2010).

Berbagai kajian mengenai potensi spons untuk dikembangkan sebagai obat antikanker tampaknya memberikan hasil yang cukup menggembirakan. Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati laut tinggi memiliki berbagai jenis spons yang potensial untuk digunakan sebagai obat antikanker. Salah satunya adalah anggota ordo Astrophorida. Namun, sampai saat ini di Indonesia belum banyak penelitian yang mengkaji potensi antikanker spons khususnya anggota ordo Astrophorida. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengkaji potensi aktivitas sitotoksik dan apoptosis ekstrak salah satu spesies spons anggota ordo Astrophorida terhadap sel HeLa (*cervical cancer cell line*). Pada penelitian ini masih belum dapat ditentukan secara pasti nama spesies dari spons yang digunakan sehingga di dalam naskah selanjutnya akan disebut sebagai spesies A.

## Metode Penelitian

### Bahan penelitian

Ekstraksi spons: Spons spesies A anggota ordo Astrophorida diperoleh dari

pantai Wediombo, Gunungkidul, DIY, etanol 96%, methanol, aseton, dan kloroform. Bahan untuk identifikasi spons adalah alkohol 70%. Bahan yang digunakan untuk analisis aktivitas sitotoksik dan apoptosis, yaitu kultur sel HeLa, media RPMI 1640, FBS, antibiotik serum, fungizon, penstrep, DMSO, doksorubisin (Kalbe), MTT, *trypan blue*, tripsin 0,5%, SDS 1% dalam 0,1 N HCl, PBS, etidium bromida-*acridine orange*, akuades, akuabides. Bahan untuk melakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT): kloroform, metanol, toluene, etil asetat, asam formiat, dan n-heksana.

### Alat penelitian

Alat untuk ekstraksi spons: pisau steril, blender, filter (kertas saring), *water bath* alumunium, *hot plate*, timbangan analitik, cawan porselen, kipas angin, dan satu set alat gelas steril. Alat untuk kromatografi lapis tipis: plat silika gel dan UV 254 nm. Alat untuk analisis aktivitas sitotoksik dan apoptosis: *inverted microscope*, *laminar air flow hood*, *waterbath*, gelas beker, *flask culture*, mikropate 96 sumuran, mikropate 24 sumuran, *coverslip*, mikropipet, inkubator CO<sub>2</sub>, pipet, dan *ELISA reader*.

### Cara kerja

#### Pengambilan spons spesies A

Spons spesies A diperoleh dari zona intertidal pantai Wediombo, Gunungkidul, DIY dengan metode jelajah sepanjang garis pantai sampai surut terjauh, pada bulan mati dengan estimasi surut maksimal pada tanggal 19–20 Juli 2011. Sampel spons bagian ektosom dan koanosom sebesar 1 x 1 cm<sup>2</sup> dipreparasi dengan metode NASP (*Nitric Acid Spicule Preparation*). Selanjutnya dilakukan identifikasi dengan buku acuan Identifikasi Spons Van Soest dan Hooper (2002).

#### Ekstraksi spons spesies A

##### Ekstrak etanolik

Spons spesies A dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Spons dipotong dan dimaserasi dengan 250 mL alkohol 96% serta diaduk selama 30 menit. Kemudian didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya rendaman spons

disaring. Filtrat disimpan di dalam botol gelap (filtrat I). Ampas sisa penyaringan diekstraksi kembali seperti cara diatas sebanyak 2 kali. Kumpulan filtrat I s/d III dikeringanginkan dengan kipas angin hingga diperoleh massa kental. Metode ini merupakan modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Tang (2004) dan Raghavendran dkk., (2004). Pada proses ekstraksi ini dari 1,7 kg berat basah spons diperoleh ekstrak etanolik seberat 28,02 g.

##### Ekstrak kloroform dan metanolik

Spons spesies A dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Spons dipotong dan dimaserasi dengan aseton (E merck) 250 mL serta diaduk selama 30 menit. Kemudian didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya rendaman spons disaring. Filtrat dikeringanginkan dengan kipas angin hingga aseton menguap seluruhnya dan diperoleh massa kental. Ekstrak yang telah bebas pelarut kemudian dipartisi menggunakan kloroform (E merck). Selanjutnya didapatkan ekstrak aseton yang larut dalam kloroform dan yang tidak larut dalam kloroform. Kedua bagian tersebut dikeringanginkan dengan kipas angin sampai seluruh pelarutnya menguap dan diperoleh massa kental. Bagian yang tidak larut dalam kloroform dipartisi menggunakan metanol (E merck) sehingga didapat bagian yang larut dalam metanol dan yang tidak larut dalam metanol. Bagian yang larut dalam metanol dikeringanginkan dengan kipas angin hingga seluruh pelarutnya menguap dan diperoleh massa kental. Metode ini merupakan modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Isnansetyo dkk., (2009). Pada proses ekstraksi ini dari 1,5 kg berat basah spons diperoleh 1,54 g ekstrak metanolik dan 3,5 g ekstrak kloroform.

##### Kromatografi lapis tipis (KLT)

Proses pengerjaan KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam berupa plat silika gel F254. Fase gerak untuk ekstrak metanolik dan kloroform digunakan kloroform : metanol (9 : 1). Adapun fase gerak untuk ekstrak etanolik yang digunakan untuk identifikasi flavonoid adalah toluene : etil asetat : metanol (70 : 20 : 10); untuk identifikasi alkaloid adalah etil asetat : metanol

: asam formiat (85 : 10 : 5); untuk identifikasi fenol adalah n-heksana : etil asetat (1 : 1); dan untuk identifikasi terpenoid adalah toluene : etil asetat : metanol (85 : 10 : 5) (Soetarto dkk., 2005). Pengamatan warna yang muncul dilakukan di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm.

#### Uji aktivitas sitotoksik

Sel HeLa dikultur dalam mikroplate 96 sumuran dengan kerapatan  $2 \times 10^4$  sel/100  $\mu\text{L}$ /sumuran. Setiap perlakuan dengan 3 kali ulangan. Kelompok pada penelitian ini yaitu: a) Kontrol media (suspensi sel HeLa diinkubasi dalam media RPMI 1640 dengan FBS 10% tanpa diberi senyawa yang diuji). b) Kontrol pelarut (suspensi sel HeLa + media + DMSO masing-masing dengan konsentrasi 0,125; 0,25; 0,5; dan 1%). c) Kelompok kontrol positif: setiap kelompok kontrol positif diberi doksorubisin masing-masing dengan konsentrasi 7,8125; 15,625; 31,25; dan 62,5  $\mu\text{g/mL}$ . Doksorubisin yang ditambahkan ke dalam setiap sumuran sebanyak 100  $\mu\text{L}$ . d) Kelompok perlakuan: setiap kelompok perlakuan diberi senyawa uji masing-masing dengan konsentrasi 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Senyawa uji yang ditambahkan ke dalam setiap sumuran sebanyak 100  $\mu\text{L}$ .

Sel HeLa diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5 % selama 24 jam. Uji aktivitas sitotoksik dilakukan menggunakan metode *MTT assay* dengan cara sebagai berikut: pada akhir masa inkubasi, pada tiap-tiap sumuran ditambahkan *MTT* (5 mg/mL) 10  $\mu\text{L}$ . Kemudian suspensi sel diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5% selama 4 jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan SDS 1% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100  $\mu\text{L}$ /sumuran. Hasilnya dibaca dengan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 550 nm. Persentase penghambatan pertumbuhan (*Inhibition Concentration/IC*) sel dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan pertumbuhan} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100\%$$

Keterangan:

A = absorbansi kontrol media

B = absorbansi kontrol negatif media

C = absorbansi perlakuan

D = absorbansi kontrol negatif perlakuan

Modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Sismindari (2003) & Yuan dkk., (2005).

#### Uji aktivitas apoptosis

Uji apoptosis dilakukan dengan menggunakan kombinasi larutan etidium bromida-*acridine orange* yang dibuat dengan cara membuat larutan stok dari 50 mg etidium bromida dan 15 mg *acridine orange* dilarutkan dalam 1 mL etanol 95% kemudian ditambahkan akuades 49 mL. Selanjutnya dari larutan stok tersebut diambil 1 mL dan diencerkan dalam PBS (1:100). Sel HeLa yang akan diuji apoptosisnya dikultur dalam 24 *well microplate*. Tiap-tiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Kemudian *microplate* diinkubasi dalam inkubator suhu  $37^\circ\text{C}$  yang dialiri  $\text{CO}_2$  5%. Setelah diinkubasi selama 24 jam, cairan dalam well dibuang, coverslip diambil dan diletakkan pada gelas objek. Selanjutnya, larutan etidium bromida-*acridine orange* diteteskan sebanyak 5–10  $\mu\text{L}$  pada *coverslip*. Preparat diamati dengan mikroskop fluoresen. Nukleus sel yang utuh berwarna hijau terang adalah sel yang hidup. Nukleus sel yang berwarna oranye dengan kondensasi kromatin adalah sel yang mengalami apoptosis. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dinyatakan dalam persen (%).

#### Analisis data

Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dengan menghitung persentase penghambatan pertumbuhan dari data OD penghambatan pertumbuhan hasil pembacaan dengan *ELISA reader*. Uji aktivitas apoptosis dinyatakan dalam persen. Selanjutnya data tersebut dianalisis menggunakan ANAVA satu jalan dan dilakukan uji beda nyata menggunakan *Tuckey's HSD test*. Kemudian dari data persentase penghambatan pertumbuhan ditentukan nilai  $\text{IC}_{50}$  senyawa uji menggunakan analisis probit.

## Hasil dan Pembahasan

### Identifikasi spons spesies A

Spons yang digunakan merupakan anggota ordo Astrophorida yang memiliki karakter spikula megaskleres oxea dan triane, spikula mikroskleres oxyastereuaster, tipe pertumbuhan *encrusting growth formation*, bentuk permukaan *hispid surface features*, serta struktur skeleton *paratangential ectosome* (Gambar 1). Meskipun demikian, belum dapat ditentukan secara pasti nama spesies dari spons yang digunakan dalam penelitian ini mengingat banyak spesies spons yang memiliki karakter hampir sama. Oleh karena itu, untuk menghindari terjadinya kesalahan kami menyebut spesies yang digunakan dalam penelitian ini sebagai spons spesies A.

### Kromatografi lapis tipis (KLT)

Berdasarkan penelitian hasil uji KLT diketahui bahwa ekstrak etanolik, dan ekstrak kloroform mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, dan flavonoid. Adapun, ekstrak metanolik mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, dan fenol.

### Uji sitotoksik (penghambatan pertumbuhan)

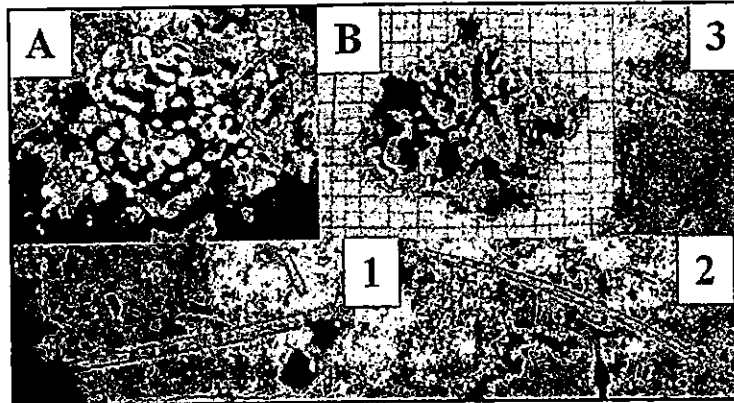
Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak etanolik, metanolik, dan kloroform spons spesies A menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan pola tergantung konsentrasi (semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan sel HeLa). Kemampuan dalam menghambat pertumbuhan ketiga ekstrak > 50% pada konsentrasi 31,25 µg/mL (Gambar 2). Pada penelitian ini DMSO digunakan sebagai kontrol pelarut dan hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase penghambatan pertumbuhan oleh DMSO dari konsentrasi 0,125–1% berkisar dari 0–9,54% (Gambar 1). Secara statistik hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan kontrol media, sehingga dikatakan bahwa penghambatan pertumbuhan pada sel HeLa disebabkan oleh senyawa yang terdapat pada ekstrak spons spesies A. Pada penelitian ini doksorubisin digunakan sebagai kontrol positif, persentase penghambatan pertumbuhan 30,61–38,62% (Gambar 2).

Potensi penghambatan pertumbuhan oleh doksorubisin terhadap sel HeLa dalam penelitian ini, lebih rendah daripada ekstrak spons spesies A. Pada penelitian ini konsentrasi senyawa uji yang digunakan antara 7,8125–1000 µg/mL. Hal ini sesuai dengan pernyataan Meyer dkk., (1992) dalam Fajarningsih dkk., (2006) bahwa jika nilai  $LC_{50}$  suatu ekstrak < 30 ppm maka dikategorikan sangat toksik, jika nilai  $LC_{50}$  suatu ekstrak berkisar antara 30–1000 ppm maka dikategorikan toksik. Adapun, nilai  $LC_{50}$  suatu ekstrak > 1000 ppm maka dikategorikan tidak toksik.

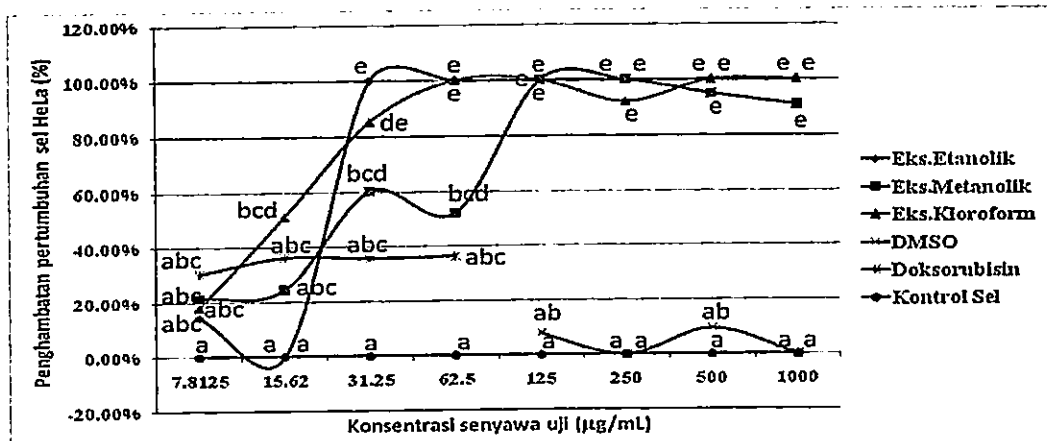
Berdasarkan analisis probit diketahui bahwa nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanolik, metanolik, dan kloroform spons spesies A terhadap sel HeLa berturut-turut sebesar 18,25; 27,87; dan 13,87 µg/mL.

### Uji apoptosis

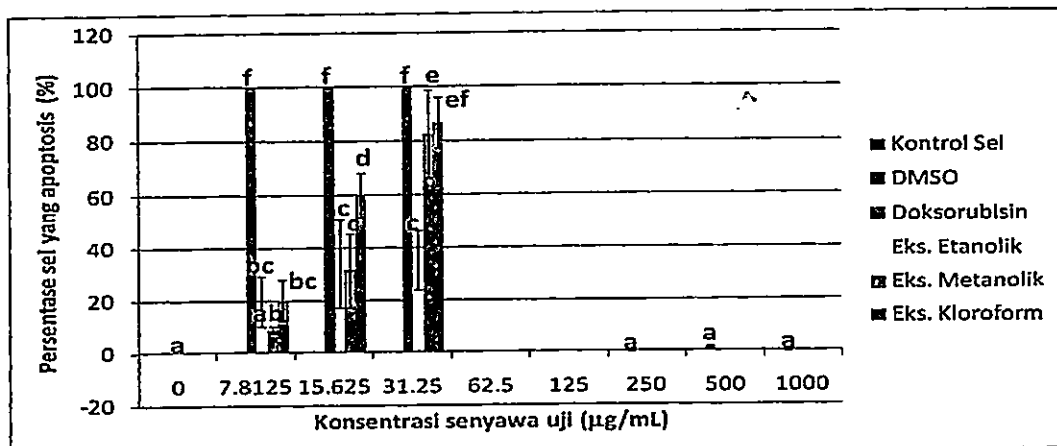
Berbagai upaya untuk penemuan obat antikanker baru banyak ditujukan untuk mempelajari proses induksinya terhadap apoptosis. Hasil penelitian ini menunjukkan konsentrasi 31,125 µg/mL ekstrak etanolik, metanolik, dan kloroform spons spesies A dapat menginduksi apoptosis masing-masing sebesar  $35,3 \pm 11,159\%$ ;  $82,64 \pm 16,206\%$ ; dan  $86,76 \pm 9,269$  (Gambar 3). Kemampuan ketiga ekstrak spons spesies A dalam menginduksi apoptosis menunjukkan pola tergantung konsentrasi (semakin tinggi konsentrasi senyawa uji maka semakin tinggi kemampuannya dalam menginduksi apoptosis). Meskipun demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendeteksi jaras apoptosis yang terjadi dalam perlakuan tersebut. Pada penelitian ini kelompok kontrol pelarut (DMSO) pada berbagai konsentrasi yang diberikan tidak menunjukkan beda nyata dengan kelompok kontrol media dalam proses induksi apoptosis yaitu antara  $0,16 \pm 0,22\%$  –  $2,29 \pm 2,774\%$  (Gambar 3). Hal ini memperkuat hasil dari uji sitotoksik bahwa DMSO pada konsentrasi yang diberikan tidak menyebabkan kematian sel. Pada penelitian ini doksorubisin pada semua konsentrasi uji yang diberikan menunjukkan potensi menginduksi apoptosis hingga 100% (Gambar 3). Morfologi sel yang mengalami apoptosis tampak seperti pada Gambar 4.



Gambar 1. Karakter morfologi spons spesies A (A) Morfologi di substrat, (B) Morfologi saat preparasi, (1) Megaskleres (Trianes ->Orthotrianes), (2) Megaskleres (Oxea), (3) Mikroskleres (oxyastereaster)



Gambar 2. Persentase penghambatan ekstrak spons spesies A, dokсорubisin, dan kontrol pelarut (DMSO) terhadap sel HeLa.  
Keterangan: huruf yang sama di dalam grafik menunjukkan tidak berbeda nyata pada  $p < 0,05$



Gambar 3. Rerata sel HeLa yang mengalami apoptosis (%) antarkelompok kontrol dan perlakuan  
Keterangan: huruf yang sama di dalam grafik menunjukkan tidak berbeda nyata pada  $p < 0,05$ .

Spons merupakan organisme laut dengan aktivitas biologis yang cukup bervariasi. Berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa spons memiliki aktivitas sitotoksik, antibakteri, hemolitik, serta neurotoksik. Potensi aktivitas biologis tersebut sangat beragam tergantung dari jenis spons dan senyawa yang dikandungnya. Beberapa spons anggota Astrophorida yang diketahui memiliki sitotoksitas tinggi terhadap berbagai sel kanker antara lain dari genus *Geodia* dan *Ecionemia*.

Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa ekstrak etanolik dan ekstrak kloroform spons spesies A mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, dan flavonoid. Adapun ekstrak metanolik mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, dan fenol. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Cowan (1999) bahwa etanol dapat melarutkan terpenoid, alkaloid, flavonol, dan sterol. Metanol dapat melarutkan terpenoid, saponin, polifenol, dan flavon. Sedangkan kloroform dapat melarutkan terpenoid dan flavonoid.

Untuk mengetahui potensi ekstrak etanolik, ekstrak metanolik, dan ekstrak kloroform spons spesies A sebagai antikanker dilakukan uji sitotoksitas terhadap sel HeLa. Hal ini dilakukan untuk mengetahui persentase penghambatan pertumbuhan ekstrak spons spesies A terhadap sel HeLa. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kemampuan dalam menghambat pertumbuhan ketiga ekstrak pada konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/mL}$  > 50%. Hasil tersebut lebih efektif dibandingkan dengan persentase penghambatan pertumbuhan doksorubisin pada penelitian ini yang hanya berkisar antara 30,61–38,62% sampai dengan konsentrasi 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (Gambar 1). Selanjutnya untuk menentukan sitotoksitas didasarkan pada nilai *Inhibition Concentration* 50 ( $\text{IC}_{50}$ ). Berdasarkan analisis probit pada penelitian ini diketahui bahwa  $\text{IC}_{50}$  ekstrak etanolik, metanolik, dan kloroform masing-masing sebesar 18,25; 27,87; dan 13,87  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ferreira dkk., (2007) yang menunjukkan bahwa ekstrak hidroetanolik *Geodia corticostylifera* memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  < 1,56  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel HL-60,

HCT-8, MDA-MBA435, dan SF-295. Sebaliknya penelitian yang dilakukan oleh Rangel dkk., (2001) menunjukkan bahwa ekstrak etanolik *Geodia corticostylifera* memiliki aktivitas sitotoksik yang sangat rendah. Bahkan dari penelitian tersebut diketahui bahwa *Geodia gibberosa* tidak memiliki efek sitotoksik. Hal ini berarti bahwa perbedaan meskipun berada dalam satu genus namun aktivitas sitotoksik *Geodia* cukup beragam tergantung jenisnya. Selain itu kemungkinan perbedaan tempat hidup juga akan menyebabkan perbedaan kuantitas senyawa yang terkandung dalam *Geodia* sehingga spesies yang sama dapat memiliki aktivitas sitotoksik yang berbeda. Barner dkk., (2010) menyatakan bahwa senyawa golongan pyroacridine alkaloids yang berasal dari *Ecionemia geodides* yaitu ecionines A memiliki tingkat toksisitas sedang terhadap sel TSU-Pr1, TSU-Pr1-B1, TSU-Pr1-B2, dan 5637 dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  masing-masing sebesar 6,48; 6,49; 3,55 dan 3,66 mM. Sedangkan senyawa ecionines B memiliki efek toksik terhadap sel 5637 dan TSU-Pr1-B2 dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  10 mM. Perbedaan potensi tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan dalam konfigurasi kimia kedua senyawa tersebut. Menurut *National Cancer Institute* ekstrak kasar berpotensi sebagai antikanker apabila memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  < 30  $\mu\text{g/mL}$ . Stuffness dan Pezzuto (1990) cit Ariffin dkk. (2009). Berdasarkan kriteria tersebut ketiga ekstrak spons spesies A potensial untuk dikembangkan sebagai obat antikanker khususnya pada sel HeLa.

Berbagai senyawa yang terkandung dalam spons spesies A diduga berperan dalam memberikan efek sitotoksik terhadap sel HeLa. Tohme dkk., (2011) menyatakan bahwa senyawa alkaloid pada spons berperan sebagai antikanker dengan menghambat polimerisasi tubulin, menghambat topoisomerase, induksi apoptosis, regulasi ulang pembelahan sel, dan menghambat angiogenesis. Ren dkk., (2003) menyatakan bahwa flavonoid memiliki potensi sebagai antiproliferasi, menginduksi apoptosis, dan menghambat angiogenesis. Senyawa golongan terpenoid yang dihasilkan spons *Geodia japonica* yaitu geoditin dan stelletin A memiliki efek sitotoksik terhadap HL-60 cell

*line*. Geoditin diketahui menginduksi apoptosis dengan mengaktivasi kaspase-3 (Cheung dkk., 2010). Senyawa golongan fenol, neolamellarin yang dihasilkan oleh spons *Dendrilla nigra* terbukti dapat menghambat angiogenesis (Liu dkk., 2007).

Berbagai obat antikanker ditujukan untuk menginduksi apoptosis. Hal ini diharapkan dapat mengurangi efek samping yang ditimbulkan. Ekstrak etanolik spons spesies A menunjukkan bahwa pada konsentrasi 31,125 µg/mL dapat menginduksi apoptosis sebesar  $35,30 \pm 11,16\%$ . Adapun ekstrak metanolik dan kloroform pada konsentrasi 31,125 µg/mL dapat menginduksi apoptosis > 80% (Gambar 3.). Hal ini sejalan dengan hasil persentase penghambatan pertumbuhan pada uji sitotoksitas. Pada proses apoptosis setelah terjadi aktivasi melalui *caspases-dependent pathway* maka terjadi perubahan pada sel. Pada awal proses apoptosis membran sel mulai membentuk lekukan-lekukan, kromatin mengalami kondensasi dan DNA terfragmentasi. Organel sel dan DNA yang telah terfragmentasi akan menyebar menuju lekukan-lekukan membran. Selanjutnya, sel membentuk badan-badan apoptosis difagositosis oleh sel di sebelahnya tanpa menimbulkan respons inflamasi (Goodlett & Horn, 2005) seperti terlihat pada Gambar 4.

Pada penelitian ini diduga senyawa golongan alkaloid, flavonoid, fenol, dan terpenoid yang terkandung dalam spons spesies A itulah yang berperan dalam proses induksi apoptosis meskipun mekanismenya dalam penelitian ini belum diketahui secara pasti. Sebagai salah satu golongan senyawa pereduksi, flavonoid diketahui dapat menghambat berbebagai reaksi oksidasi yang berbahaya bagi sel.

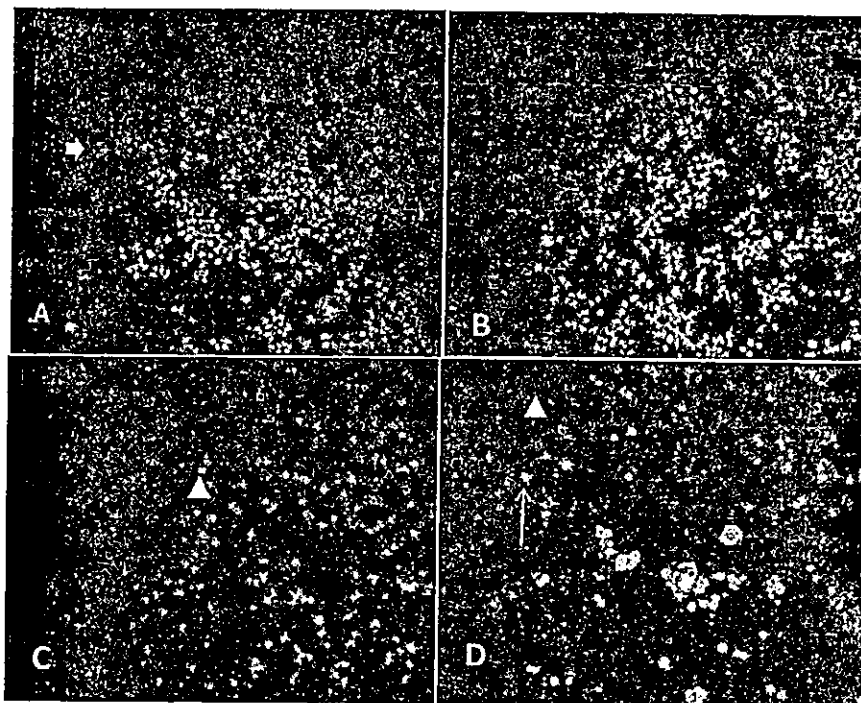
Beberapa senyawa antara sintesis dari golongan alkaloid *halichlorine* yang memiliki struktur inti azaspiro diketahui dapat menginduksi apoptosis pada *acute monocytic leukemia cell line* (THP-1) dan cara menginduksi aktivasi *caspase-time dependently*. Namun, beberapa senyawa lain

dari kelompok ini ternyata ada juga yang tidak dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi kaspase-3 (Itoh dkk., 2002). Flavonoid dapat melindungi sel dari kerusakan membran lipid akibat radikal bebas seperti radikal hidroksi dan superoksida (Robinson, 1995). Schumacher dkk., (2010) melaporkan bahwa heteronemin, sesterterpen dari spons *Hyrtios* sp. dapat mempengaruhi berbagai proses selular pada *chronic myelogenous leukemia cells*. Proses-proses selular yang dipengaruhi oleh heteronemin tersebut antara lain siklus sel (penurunan viabilitas sel), induksi apoptosis, jalur MAPKs, serta penghambatan kaskade NF-κB. Penelitian lain yang dilakukan oleh Wei dkk., (2008) menunjukkan bahwa jaspolid B senyawa golongan terpen yang diisolasi dari spons *Jaspis* sp. diketahui memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap *human hepatoma cells* melalui induksi apoptosis. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa induksi apoptosis tersebut juga diiringi dengan proses penahanan fase G1 dan pembongkaran mikrotubul. Potensi suatu senyawa dalam menginduksi apoptosis dan dalam menentukan jalur mana yang akan diaktivasi agaknya terkait erat dengan struktur kimia senyawa tersebut.

Meskipun pada ekstrak metanolik dan kloroform spons spesies A sebagian besar tampaknya melalui induksi apoptosis, namun diduga pada ekstrak etanolik dan sebagian kecil ekstrak metanolik serta kloroform terjadi kematian sel melalui jalur yang lain. Patil dkk., (2009) menyatakan bahwa terpenoid kemungkinan dapat menyebabkan hilangnya integritas membran sel sehingga dapat menyebabkan sitotoksitas/kematian sel melalui disintegrasi membran.

Pada penelitian ini kemampuan senyawa aktif spons-spons spesies A dalam menginduksikan apoptosis sel HeLa menimbulkan harapan untuk penemuan senyawa aktif antikanker yang bersifat efektif dan memiliki efek samping rendah dapat diwujudkan di masa depan.





Gambar 4. Kelompok kontrol media (A), kelompok DMSO 1% (B), kelompok doxorubisin 7,8125 µg/mL, kelompok perlakuan dengan ekstrak etanolik spons spesies A (D). Tanda panah tebal: sel hidup, tanda panah tipis: tahap awal apoptosis, kepala panah: tahap akhir apoptosis. Perbesaran 10 x 10.

## Simpulan dan Saran

### Simpulan

Ekstrak etanolik, metanolik, dan kloroform spons spesies A berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker terhadap sel HeLa terutama melalui induksi apoptosis.

### Saran

Perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan menguji aktivitas antikanker senyawa yang terkandung dalam spons spesies A sekaligus menguji mekanisme sitotoksik dan apoptosis senyawa-senyawa tersebut.

## Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dilaksanakan dengan dana dari Hibah Dosen Muda Tahun Anggaran 2011 dan Hibah Mahasiswa Tahun Anggaran 2011, Universitas Gadjah Mada.

## Daftar Pustaka

- Ariffin, S.H.Z., Omar, W.H.H.W., Ariffin, Z.Z., Safian, M.F., Senafi, S. dan Wahab, R.M.A. 2009. Intrinsic Anticarcinogenic Effects of *Piper sarmentosum* Ethanolic Extract on A Human Hepatoma Cell Line. *Cancer Cell International*, 9:6 doi:10.1186/1475-2867-9-6. <http://www.cancerci.com/content/9/1/6>.
- Barnes, E.C., Said, N.A.B.M., Williams, E.D., Hooper, J.N.A. dan Davis, R.A. 2010. Ecionines A and B, Two New Cytotoxic Pyridoacridine Alkaloids from the Australian Marine Sponge, *Ecionemia geodides*. *Tetrahedron*, 66: 283–287.
- Carotenuto, A., Fattorusso, E., Lanzotti, V., Magno, S., Carnuccio, R. dan Iuvone, T. 1998. Antiproliferative Sesterpenes from The Caribbean Sponge *Cacospongia cf. linteiformis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 199 (2): 119–123.
- Cheung, F.W.K., Li, C., Che, C.T., Liu, P., Bonnie, L., Wang, L. dan Liu, W.K. 2010. Geoditin A Induces Oxidative Stress and Apoptosis on Human Colon HT29 Cells. *Marine Drugs*, 8 (8): 80–90.

- Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564–582.
- Fajarningsih, N.D., Januari, H.L., Nursid, M. dan Wikanta, T. 2006. Potensi Antitumor Ekstrak Spons *Crella papilata* Asal Taman Nasional Laut Kepulauan Scribu. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 1 (1): 35–41.
- Ferreira, E.G., Wilke, D.V., Jimenez, P.C., Portela, T.A., Silveira, E.R., Hajdu, E., Pessoa, de Moraes, M.O. dan Costa-Lotufo, L.V. 2007. Cytotoxicity Activity of Hydroethanolic Extracts of Sponges (Porifera) Collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park, Ceara State, Brazil. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation, and Sustainability*, 313–318.
- Goodlett, C.R., Horn, K.H. dan Zhou, F.C. 2005. Alcohol Teratogenesis: Mechanisms of Damage and Strategies for Intervention. *Experimental Biology and Medicine*, 12 (230): 394–406.
- Itoh, M., Kuwahara, J., Itoh, K., Fukuda, Y., Kohya, M., Shindo, M. dan Shishido, K. 2002. Apoptosis Inducing Activity of Synthetic Intermediates Halichlorine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12: 2069–2072.
- Nishimura, S., Matsunaga, S., Yoshida, S., Nakao, Y., Hirota, H. dan Fusteni, N. 2005. Structure-activity Relationship Study on 13-deoxytedanolide, A Highly Antitumor Macrolide from The Marine Sponge *Mycale adhaerens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 455–462.
- Patil, J.R., Jayaprakasha, G.K., Murthy, K.N.C., Tichy, S.E., Chetti, M.B. dan Patil, B.S. 2009. Apoptosis-mediated Proliferation Inhibition of Human Colon Cancer Cells by Volatile Principles of *Citrus aurantifolia*. *Food Chemistry*, 114: 1351–1358.
- Pedpradab, P., Molex, W., Nukoolkarn, V. dan Darumas, U. 2010. Biological Activities of Extracts from Andaman Sea Sponges, Thailand. *EurAsian Journal of Bioscience*, 4: 63–69.
- Raghavendran, H.R.B., Sathivel, A. dan Devaki, T. 2004. Hepatoprotective Nature of Seaweed Alcoholic Extract on Acetaminophen Induced Hepatic Oxidative Stress. *Journal of Health Science*, 50 (1): 42–46.
- Rangel, M., de Sanctis, B., de Freitas J.C., Polatto, J.M., Granato, A.C., Berlinck R.G.S. dan Hadju, E. 2001. Cytotoxicity and Neurotoxic Activities in Extracts of Marine Sponges (Porifera) from Southeastern Brazilian Coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262: 31–40.
- Reddy, A.V., Ravinder, K., Narasimhulu, M., Sridevi, A., Satyanarayana, N., Kondapi, A.K. dan Venkateswarlu, Y. 2006. New Anticancer Bastadin Alkaloids from The Sponge *Dendrilla cactos*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 4452–4457.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., Lu Y., Cui, Y. dan Zhang, Z. 2003. Flavonoids: Promising Anti Cancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, 23 (4): 519–534.
- Robinson, T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. (Terj.) Edisi Kcenam. Penerbit ITB, Bandung.
- Schumacher, M. Cerella, C., Eifes, S., Chateauvieux, S., Morceau, F., Jaspars, M., Dicato, M. dan Diederich, M. 2010. Heteronemin, A Spongian Sesterterpene, Inhibits TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B Activation through Proteasome Inhibition and Induces Apoptotic Cell Death. *Biochemical Pharmacology*, 79: 610–622.
- Setyowati, E.P., Jenie, U.A., Sudarsono, Kardono, B., Rahmat, R. dan Meiyanto, E. 2007. Isolasi Senyawa Sitotoksik Spons *Kaliopsis*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 18 (4): 183–189.
- Shinde, P.B., Lee, Y.M., Dang, H.T., Hong, J., Lee, C.O. dan Jung, J.H. 2008. Cytotoxic Bromotirosine Derivatives from Two- Sponge Association of *Jaspis* sp. and *Poecillastra* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18: 6414–6418.
- Sismindari. 2003. Cytotoxic Effect of Methanol Extract Isolated from *Erythrina fusca* Lour Leaves on Cancer Cell-lines. *Berkala Ilmu Kedokteran*, 35 (2): 75–80.
- Suffness M. dan Pezzuto, J.M. 1990. *Assays Related to Cancer Drug Discovery. In Methods in Plant Biochemistry: Assay for Bioactivity*. Volume 6. Edited by: Hostettmann K. Academic Press, London.
- Sukardja, I.D.G. 1999. *Onkologi Klinik*. Edisi 2. Airlangga University Press, Surabaya.
- Tang, H., Inoune, M., Uzawa, Y. dan Kawamura, Y. 2004. Anti-tumoric Components of A Seaweed *Enteromorpha clathrata*. *BioFactor*, 22: 107–110.
- Tohme, R., Darwiche, N. dan Gali-Muhtasib, H. 2011. A Journey Under the Sea: The Quest for Marine Anti-Cancer Alkaloids. *Molecules*, 31 (16): 9665–9696.
- Turkistant, E.C., Sogupinar, N., Saydam, B.K. dan Aydemir, G. 2003. Cervical Cancer Prevention and Early Detection-The Role of Nurse and Midwives. *Asian Pacific Journal Cancer Prev*, 4: 15–21.

- Velde, C.J.H van de., Bosman, F.T. dan Wagener, D.J.Th. 1999. *Onkologi* (Terj.) Alih bahasa: Arjono, Edisi ke-5. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Yalcin, F.N. 2007. Biological Activities of The Marine Sponge *Axinella*. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 27 (1): 47–60.
- Yuan, Y.V., Carrington, M.F. dan Walsh, N.A. 2005. Extracts from Dulse (*Palmaria palmata*) are Effective Antioxidants and Inhibitors of Cell Proliferation *In Vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1073–1081.
- Van Soest, R.W.M. dan Braekman, J.C. 1999. Chemosystematics of Porifera: A Review. *Memoirs of the Queensland Museum*, 44 (2): 569–589.
- Wei, S.Y., Li, M., Tang, S.A., Sun, W., Xu, B., Cui, J.R. dan Lin, W.H. 2008. Induction of Apoptosis Accompanying with G1 Phase Arrest and Microtubule Disassembly in Human Hepatoma Cells by Jaspolide B, A New Isomalabaricane-type Triterpene. *Cancer Letters*, 262: 114–122.