

## **Spons *Penares* sp dari Perairan Pulau Menjangan Taman Nasional Bali Barat: Isolasi Senyawa Sitotoksik**

### ***Penares* sp sponge from Menjangan Island-water West Bali National Park: Isolation of Cytotoxic Compounds**

**Erna Prawita Setyowati<sup>1\*</sup>, Sudarsono<sup>1</sup>, Retno Murwanti<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

#### **ABSTRAK**

*Spons merupakan binatang multiseluler yang banyak menghasilkan senyawa sitotoksik. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan uji aktivitas sitotoksik spons *Penares* sp dari perairan Taman Nasional Bali Barat. Isolasi dilakukan dengan metode isolasi dipandu uji aktivitas. Deteksi senyawa dilakukan dengan berbagai reagen penampak bercak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform dan fraksi GF V *Penares* sp adalah toksik menurut metode uji Brine Shrimp Lethality Test (kematian sebesar 85% dan 63,3% pada konsentrasi 25 µg/mL). Hasil isolasi fraksi GF V diperoleh senyawa (Bercak 4) yang aktif sebagai agen sitotoksik terhadap sel T47D (IC<sub>50</sub> 12,7 ug/mL). Bercak 4 adalah senyawa terpenoid yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi.*

**Kata kunci:** *Penares* sp; spons; senyawa sitotoksik; sel T47D

#### **ABSTRACT**

*Sponges are multicellular animals which have cytotoxic compounds. In this study, isolation and cytotoxic activity of *Penares* sp sponge from Menjangan island-water West Bali National Park have been carried out. The results showed that chloroform extract and GF V *Penares* sp fraction were toxic according to Brine Shrimp Lethality Test method (each 85% and 63.3% mortality at 25µg/mL concentration). The isolation result of GF V fraction was obtained a compound (Spot 4) that is active as cytotoxic agent against T47D cells (IC<sub>50</sub> of 12.7 ug/mL). Spot 4 is a terpenoid compound which has conjugated double bonds.*

**Keywords:** *Penares* sp; sponge; cytotoxic agents; T47D cells

#### **PENDAHULUAN**

Kanker merupakan masalah kesehatan yang serius tidak hanya di negara berkembang tetapi juga di negara-negara maju. Walaupun kemajuan pesat telah diperlihatkan dalam bidang diagnosis dan terapi tetapi kemungkinan sembuh dari penyakit ini masih perlu ditingkatkan. Menurut WHO pada tahun 2012, terdapat 14 juta kasus kanker dan jumlah ini akan meningkat mencapai 22 juta dalam dua dekade mendatang. Tahun 2012 angka kematian yang disebabkan oleh penyakit ini mencapai 8,2 juta jiwa (Sawadogo 2015). Di Indonesia, kasus kanker payudara menjadi kasus kematian tertinggi dengan angka 21,5 pada setiap 100.000 (Samodra, 2016).

Laut menutupi hampir 70% luas permukaan bumi, sehingga organisme laut hadir sebagai sumber pene muan senyawa baru yang

sangat potensial untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi obat (Cragg and Newman, 2013). Spons (filum Porifera) merupakan organisme multiseluler, tak bertulang belakang dengan tubuh berpori. Lebih kurang 4.851 senyawa telah diisolasi dari spons dan memberikan kontribusi hampir 30% dari semua senyawa laut. Ada sekitar 1.499 senyawa diisolasi dalam kurun lima tahun (2008-2012). Hal ini membuat spons menjadi produsen laut yang paling produktif dengan lebih dari 200 senyawa baru dilaporkan setiap tahun selama sepuluh tahun terakhir (Mebhub 2014). Spons merupakan sumber bahan baku yang potensial untuk menghasilkan senyawa sitotoksik sehingga spons dapat dijadikan bahan eksplorasi pencarian senyawa baru antikanker (Dias *et al.*, 2012).

Penemuan senyawa spongotimidina dan spongouridina, yang merupakan jenis nukleosida penghambat sel kanker yang dihasilkan oleh spons *Cryptotethia crypta* (Tethylida) di daerah Caribbean oleh Bergmann dan Feeney pada tahun

---

**Correspondence author:** Erna Prawita Setyowati  
**Email :** [erna\\_prawita@ugm.ac.id](mailto:erna_prawita@ugm.ac.id)

1951, menjadikan spons sebagai pusat perhatian dan sumber metabolit aktif potensial dari laut. Penemuan ini menuntun para peneliti untuk mensintesis analog-analognya yaitu Adenin arabinosa (Ara-A, Vidarabine®, Vidarabin Thilo®) dan Sitosin arabinosa (Ara-C, Cytarabine, Alexan®, Udicil®) telah terbukti meningkatkan aktivitas antivirus. (Garcia *et al.*, 2007; Setyowati *et al.*, 2008)

Dilaporkan oleh Mebhub (2014) bahwa Australia, Indonesia dan Papua Nugini sebagai daerah habitat spons yang paling besar di dunia, sehingga dalam penelitian ini dilakukan studi tentang isolasi dan efek sitotoksik senyawa aktif dari spons *Penares sp.* dari perairan Taman Nasional Bali Barat Indonesia terhadap sel kanker T47D

## METODOLOGI

### Alat dan bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons *Penares sp.* Bahan untuk isolasi terdiri dari etanol, kloroform, metanol, n-heksana, etil asetat, lempeng silika gel F<sub>60</sub>, silika gel PF<sub>60</sub>, Bahan untuk uji toksik dan sitotoksik terdiri dari telur *Artemia salina* (*Premium Extra Brine Shrimp eggs*, HS No. 0511.04.600, air laut, ragi *Saccharomyces cereviceae* (S.I Lessafre 597 c 3 Marq france, PT. Eresindo Jaya Trade, Indonesia). Kultur sel T47D yang didapat dari stok Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu (LPPT) UGM. Media yang digunakan adalah: media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Fungison 0,5%, Penisilin-Streptomisn 1% v/v (Gibco), vinkristin sulfat, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazoliumbromida (MTT) [Sigma Chemical Co).

Alat yang digunakan untuk isolasi terdiri atas alat-alat gelas, timbangan analitik, blender, lampu Ultraviolet (UV) (Dessaga), oven (Shimadzu), penangas air dan penguap putar (IKA), vortex (Thermolyne), glas sinter (Iwake TE-32). Alat uji BST terdiri atas wadah penetas telur, vortex (Thermolyne), lampu penerang, aerator. Alat uji sitotoksik terdiri atas inkubator (Hera cell (Heraeus) Kendro laboratory Product Germany), *Laminar air flow* (Labconco purifier™ class II) *inverted microscope* (Axiovert 25), tabung conical steril, mikroplate 96 sumuran (Nuclon), *tissue culture flask* (Iwaki), Ependorf, tip kuning dan biru (Biologix)

### Pengambilan sampel

Spons *Penares sp* diambil dari perairan Pulau Menjangan Taman Nasional Bali Barat dengan tehnik SCUBA *diving*. Voucher spesimen

disimpan di Departemen Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta Indonesia.

### Ekstraksi dan Isolasi senyawa aktif.

Metode ekstraksi dan isolasi senyawa aktif dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Setyowati *et al* (2007). Ekstraksi dan isolasi senyawa sitotoksik dilakukan dengan metode *Bioassay guided isolation*. Bioassay yang digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* dan uji sitotoksik.

Spons dibersihkan dengan air mengalir, dipotong kecil kecil dan ditiriskan. spons kemudian dimaserasi dengan pelarut kloroform selama 3 x 24 jam dan disaring. Sari kloroform kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator*. Ampas dimaserasi dengan etanol 96% dengan cara seperti diatas.

### Fraksinasi dan pemurnian menggunakan *vacuum liquid chromatography* (VLC) dan Kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif

Fase diam digunakan silika gel F60 dan fase gerak digunakan pelarut dengan gradien polaritas yang terdiri atas pelarut nheksana, campuran nheksana dan etil asetat dengan berbagai perbandingan (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 v/v), etil asetat, kloroform-metanol (1:1 v/v) dan metanol. Fraksi aktif dimurnikan dengan KLT preparatif menggunakan fase diam silika gel F60 dan fase diam etil asetat-nheksana (1 :2 v/v).

### Uji toksik menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test*

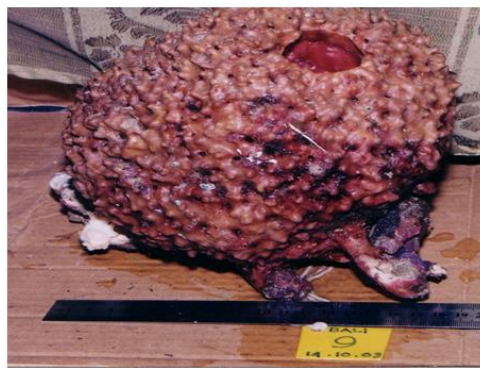
Uji toksik dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Meyer *et al* (1982). Uji dilakukan menggunakan larva *A. salina* umur 48 jam. Kontrol negatif digunakan DMSO (Dimethyl Sufoxide).

### Uji sitotoksitas terhadap sel T47D

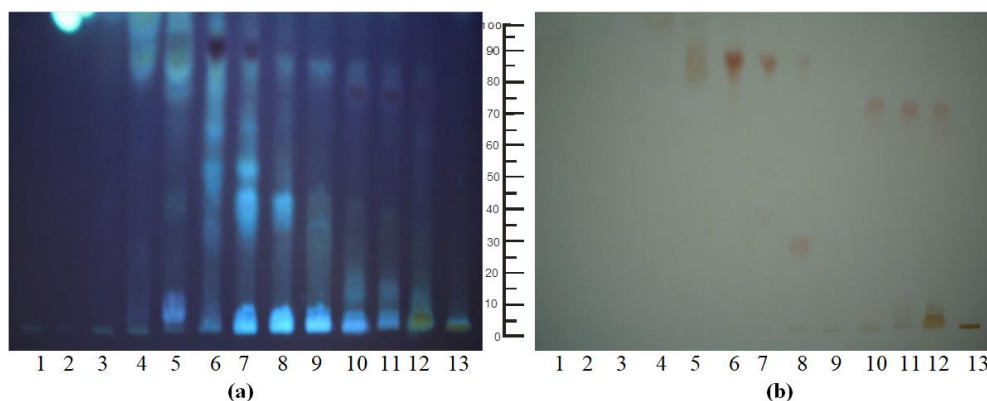
Uji sitotoksik dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Doyle (1998). Kontrol positif digunakan vinkristin sulfat dosis 25 µg/ml. Kontrol negatif pelarut DMSO. Pengamatan jumlah kematian sel dilakukan pada jam 24 inkubasi pada suhu 37°C setelah pemberian sampel uji dengan MTT assay.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum digunakan spons *Penares sp* (gambar 1) disimpan dalam pelarut etanol 96% karena sebagian besar organisma laut mati segera setelah diangkat ke udara dan mengalami dekomposisi. Senyawa yang ada dengan cepat mengalami degradasi karena oksidasi, reaksi enzimatik atau proses polimerisasi sehingga



Gambar 1. Spons *Penares* sp



Gambar 2. Profil KLT ekstrak kloroform spons *Penares* sp Fd: Silika gel F60, Fg: nheksana: etil asetat = 1:2 v/v, deteksi: a. UV 366nm b. Serium (IV) sulfat

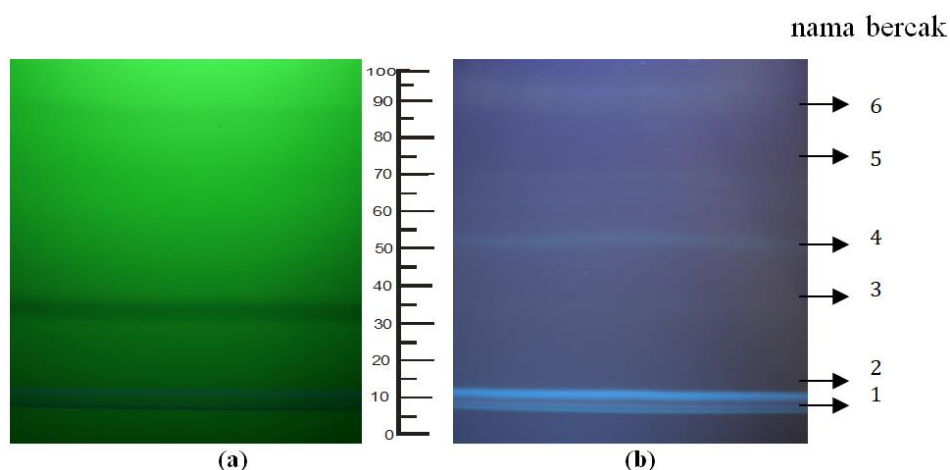
organisma perlu untuk dikeringkan, diekstraksi atau didinginkan dengan segera untuk mengurangi pembusukan dan degradasi kimia.

*Voucher specimen* untuk identifikasi jenis spons disimpan dalam pelarut etanol 70% (Wright *et al.*, 2005). *Voucher specimen* diperlukan sebagai dokumen pada saat pengisian paten penemuan dan dibuat sedemikian rupa sehingga dapat mewakili kondisi dari organisma yang diambil. Bagian yang diambil adalah bagian yang dapat mewakili spons yaitu pada bagian permukaan, struktur dalam dan keseluruhan morfologi.

Spons *Penares* sp diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi menggunakan kloroform dan etanol. Ekstraksi menggunakan pelarut kloroform terhadap spons *Penares* sp pada skrining awal karena spons *Penares* sp termasuk dalam kelas Demospongiae dimana pada kelas tersebut sebagian besar tubuhnya terdiri dari kolagen, gelatin dan spongin (sejenis protein) yang tidak larut kloroform. Eliminasi ini akan memudahkan dalam isolasi metabolit sekunder dari spons (Hooper & Soest, 2002).

#### Uji toksik menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BST) dan uji sitotoksik menggunakan sel T47D

Hasil uji ekstrak kloroform dan etanol spons terhadap larva *A. salina* menunjukkan ekstrak kloroform memberi kematian sebesar 85% pada konsentrasi 25 $\mu$ g/ml dan lebih besar dibanding ekstrak etanol (kematian 45% pada konsentrasi 250  $\mu$ g/mL). Hasil uji sitotoksitas menunjukkan bahwa IC<sub>50</sub> ekstrak kloroform dan etanol spons *Penares* sp masing-masing 75,6 dan 256  $\mu$ g/ml. Data uji ketoksikan menggunakan BST ini sejalan dengan uji sitotoksitas menggunakan sel T47D. Hal ini sesuai dengan pernyataan Carballo *et al* (2002) yang menyatakan bahwa metode BST memiliki hubungan positif dan konsisten dengan sitotoksitas ketika diujikan dengan sel kanker karsinoma paru A-549 dan karsinoma kolon HT-29 dan merekomendasikan penggunaan kedua metode secara simultan untuk kegiatan pengujian pada isolasi senyawa alam laut. Ghisalberti (2008) menyatakan uji BST adalah tes cepat untuk memprediksi aktivitas sitotoksik senyawa/ekstrak.



Gambar 2. Profil KLT preparatif GF V spons *Penares sp*, Fd: Silika gel F60, Fg: nheksan:etil asetat = 1:2 v/v, deteksi: a. UV254nm b. UV 366nm

Tabel I. Jumlah kematian larva *A. salina* /10 larva karena pemberian fraksi-fraksi ekstrak pada dosis kloroform pada dosis 25µg/mL

No	Gradien nheksana : etil asetat v/v	Jumlah kematian larva <i>A. salina</i> /10 larva			rata-rata	% kematian
		(1)	(2)	(3)		
1	10:0	0	0	0	0	0
2	9:1	0	0	0	0	0
3	8:2	0	0	0	0	0
4	7:3	0	0	0	0	0
5	6:4	0	0	0	0	0
6	5:5	0	0	0	0	0
7	4:6	0	0	0	0	0
8	3:7	0	0	0	0	0
9	2:8	0	0	0	0	0
10	1:1	6	6	7	6,33	63,3
11	0:10	6	6	7	6,33	63,3
12	K:M = 1:1	7	7	7	5,75	57,5
13	M	5	5	4	4,66	46,6
14	Kp	0	0	0	0	0

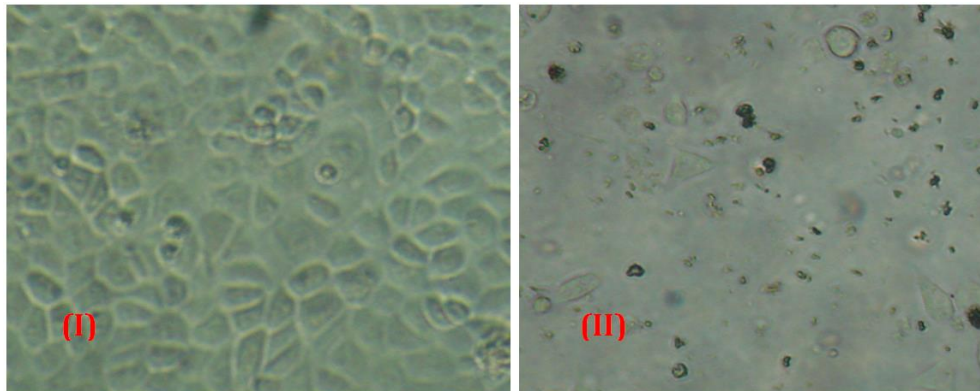
Catatan: K = kloroform; M = metanol; Kp= Kontrol pelarut

Tabel II. Uji sitotoksitas gabungan fraksi (GF I - VI) ekstrak kloroform spons *Penares sp* pada sel T47D

No	Gabungan fraksi	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1.	GF I	358
2.	GF II	256
3.	GF III	312
4.	GF IV	245
5.	GF V	33
6.	GF VI	46

Ada hubungan positif antara toksisitas BST dan sifat sitotoksik senyawa dengan beberapa jenis sel kanker (9 cell line KB (karsinoma nasofaring manusia) dan sel P388 (in vivo murine leukemia). Setyowati *et al.* (2004, 2005) berhasil mengisolasi

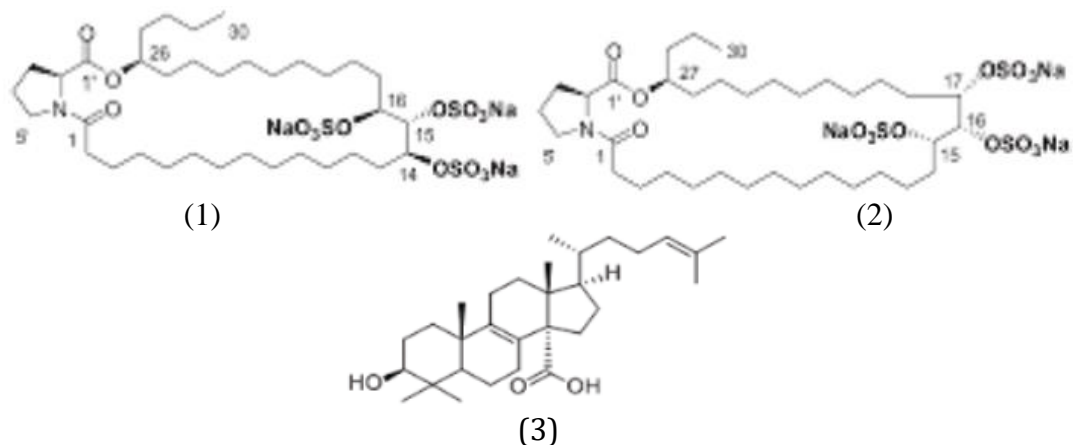
Jaspamide (Zabriskie *et al.*, 1986) atau jasplakinolide (Crews *et al.*, 1986) senyawa sitotoksik sebelumnya dikenal beracun untuk larva *A. salina* dengan LC<sub>50</sub> 0,9 µg/ml spons *Stylissa flabelliformis*.



Gambar 3. Profil sel T47D hidup (I) dan T47D mati (II) setelah pemberian Bercak 4

Tabel III. Efek uji sitotoksik Bercak gabungan fraksi spons *Penares* sp terhadap T47D

Bercak	IC <sub>50</sub> µg/mL
1	247
2	176
3	153
4	12.7
5	164
6	365



Gambar 4. Penarolide sulfates A(1), Penarolide sulfates A(2) dan Penasterol (3) (Nakao *et al*, 2000)

#### Fraksinasi ekstrak kloroform dan uji aktivitas masing-masing fraksi

Profil kromatografi fraksinasi ekstrak kloroform dengan metode VLC terlihat pada gambar 2. Tidak ada fraksi dengan profil kromatogram yang sama, sehingga uji ketoksikan dilakukan pada setiap fraksi. Jumlah kematian *A. salina*/10 larva fraksi-fraksi ekstrak kloroform dapat dilihat pada tabel I.

#### Uji Sitotoksitas terhadap sel payudara T47D

Fraksi-fraksi dengan profil KLT yang sama (gambar 2) digabungkan dan dikeringkan sehingga diperoleh 6 gabungan fraksi (GF) yaitu GF 1-3 (GF I), 4-5 (GF II), 6-7 (GF III), 8-9 (GF IV), 10-11 (GF V) dan 12-13 (GF VI). Hasil uji sitotoksitas terhadap sel T47D terlihat pada Tabel II. Data menunjukkan bahwa GF V memberikan hasil uji dengan IC<sub>50</sub> sebesar 33

ug/ml paling kecil bila dibandingkan dengan fraksi gabungan lain.

### **Pemurnian GF V dengan kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif**

Hasil pemurnian GF V dengan KLT preparatif menunjukkan terdapat 6 Bercak pada kromatogram (gambar 3). Masing-masing Bercak diuji efek sitotoksik terhadap sel T47D (tabel 4). Pada tabel 3 dapat dilihat bahwa Bercak 4 mempunyai nilai IC<sub>50</sub> terkecil di antara lima Bercak/senyawa yaitu 12,7 ug/ml. Sel T47D sel hidup berbentuk persegi tidak teratur sedangkan sel T47D mati hasil pengujian dengan Bercak 4 berbentuk tidak teratur dan tidak bersinar (gambar 3)

Bercak 4 larut dalam etanol dan pelarut DMSO tetapi tidak larut dalam air. Di hRf 50 (n-heksana:etil asetat = 1: 2 v/v) pada UV 254 nm Bercak ini meredam (gambar 2). Deteksi dengan Serium (IV) sulfat dengan pemanasan pada 110°C selama 10 menit, Bercak 4 menunjukkan warna coklat. Kesimpulan sementara menunjukkan Bercak 4 merupakan golongan terpenoid dengan ikatan rangkap terkonjugasi.

*Spons Penares sp* pernah diteliti oleh Nakao *et al* (2000) menghasilkan beberapa senyawa sitotoksik diantaranya adalah *Penarolide sulfates* A1, A2 dan Penasterol (gambar 4).

### **KESIMPULAN**

Isolasi senyawa sitotoksik terhadap spons *Penares sp* yang diambil dari Taman Nasional Bali Barat mendapatkan senyawa dengan kode Bercak 4 yang bersifat sitotoksik terhadap sel T47D dengan IC<sub>50</sub> sebesar 12,7 µg/ml. Bercak 4 merupakan senyawa terpenoid dengan ikatan rangkap terkonjugasi.

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Peneliti mengucapkan terima kasih atas bantuan dana yang diberikan oleh Fakultas Farmasi UGM (Hibah Penelitian No.: UGM/FA/1493.d/M/05/01)

### **DAFTAR PUSTAKA**

Carballo, J.L., Inda, Z.L.H., Pérez, P. and Grávalos, M.D.G, 2002, A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products, *BMC Biotechnol*, 2: 17.

Cragg, GM and Newman, DJ., 2013, Natural Products: A Continuing Source of Novel Drugs Leads, *Biochim Biophys Acta*, 183(6): 3670-3695

Crews, P., Manes., L.V., and Bohler,M., 1986, Jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from

the marine sponge *Jaspis sp*, *Tetrahedron Lett.* 27(25), 2797-2800

- Dias, DA., Urban, S and Roessner, U., 2012, A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery, *Metabolites*, 2(2), 303-336
- Doyle, A., and Griffiths, JB, 1998, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedure in Biotechnology*, 1<sup>st</sup>.Ed.JohnWileyandSonsInc, Chichester, UK.
- García, M.M., Valdés, M.D., Esplá, A.R., Salvador, N., Lopez, P., Larriba, E and Antón, J., 2007, Cytotoxicity of the Ascidian *Cystodytes dellechiajei* Against Tumor Cells and Study of the Involvement of Associated Microbiota in the Production of Cytotoxic Compounds, *Marine Drugs*, 5, 52-70
- Ghisalberti, E.L., 2008, Detection and Isolation of Bioactive Natural Products, in Colegate, S.M. and Molyneux, R.J. (eds), *Bioactive natural Product: Detection, Isolation, and Structural Determination*, 2<sup>nd</sup> ed, CRC Press, New York.
- Hooper, J.N.A and Soest, R.W.M. van, 2002, *Systema Porifera: A Guide to The Classification of Sponges*, Volume I, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- Mehbub, M.F, Lei, J., Franco, C and Zhang, W, 2014, Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010, Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives, *Mar. Drugs.*, 12, 4539-4577
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobsen, D.E., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982, Brine Shrimp L A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent, *Planta Medica*, 45, 31-34.
- Nakao, Y., Maki, T., Matsunaga, S., van Soest, R.W.M., and Fusetani, N., 2000, Penarolide sulfates A(1) and A(2) new alpha-glucosidase inhibitors from a marine sponge *Penares sp*. *Tetrahedron* 56:8977-8987
- Samodra, D., 2016, Kanker payudara tertinggi di Indonesia, <http://www.antarane.com/berita/583060/kanker-payudara-tertinggi-di-indonesia>, tanggal akses 29 Maret 2017
- Sawadogo, W.R, Boly, R., Cerella, C., Teiten, M.H., Dicato, M and Diederich, M., A 2015, Survey of Marine Natural Compounds and Their Derivatives with Anti-Cancer Activity Reported in 2012, *Molecules* 20, 7097-7142
- Setyowati, E.P., Jenie, U.A., Sudarsono, Kardono., B., and Rahmat, R, 2008, Identification of

- cytotoxic constituent of Indonesian sponge *Kaliapsis* sp. (Bowerbank), J. Pakistan of Biological Sciences 11(22), 2560-2566
- Setyowati, E.P., Jenie, U.A., Sudarsono, Kardono., B., Rahmat, R, dan Edy Meiyanto, 2007, Isolation of cytotoxic substance from *Kaliapsis* sponge, Indonesian Journal of Pharmacy, 18 (4), 183-189
- Setyowati, E.P., Sudarsono dan Wahyuono, 2005, Jaspamide: Structure Identification of Cytotoxicity and Fungicide Compound from *Stylissa flabelliformis* Sponges, Indonesian Journal of Pharmacy, 6 (1), 12-19
- Setyowati, E.P., Sudarsono dan Wahyuono, S., 2004, Cytotoxicity and antimicrobial test of the bioactive compound isolated from *Stylissa flabelliformis* sponge, Indonesian Journal of Pharmacy, 15 (2), 50-56
- Wright, 2005, Isolation of Marine Natural Product, In: *Natural Product Isolation*, Second Edition, edited by Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, and Alexander I. Gray, Humana Press, New Jersey, 365-377
- Zabrieskie, T.M., Klocke, J.A., Ireland, C.M., Marcus, A.H., Molinski, T.F., Faulkner, J.D., Xu, C., and Clardy, J.C, 1986, Jaspamide, a modified peptide from a Jaspis sponge with insecticidal and antifungal activity, J. Am. Chem. Soc. 108, 3123-3124