

Isolasi senyawa sitotoksik spons Kaliapsis

Isolation of cytotoxic substance from Kaliapsis sponge

Erna Prawita Setyowati ^{1*)}, Umar Anggara Jenie ^{1,2)}, Sudarsono ¹⁾, Broto Kardono ²⁾, Rachmaniar Rahmat ²⁾ dan Edy Meiyanto ¹⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

²⁾ Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jakarta.

Abstrak

Telah dilakukan penelitian isolasi senyawa aktif sitotoksik dari spons Kaliapsis. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, partisi, kromatografi cair hampa udara dan kromatografi lapis tipis preparatif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bercak 1 memiliki sifat sitotoksik paling tinggi. Uji sitotoksik terhadap sel myeloma dilakukan menggunakan reagen MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolium bromida] menunjukkan bahwa bercak 1 paling poten terhadap sel myeloma dengan harga IC₅₀ sebesar 0,18 µg/mL

Kata kunci : spons Kaliapsis, sitotoksik, sel myeloma

Abstract

An isolation of cytotoxic substance of Kaliapsis sponge has been conducted. The substance was isolated using maceration, partition, vacuum liquid chromatography and preparative thin layer chromatography methods.

The result of research showed that peak 1 has the most cytotoxic activity. Cytotoxicity test with MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide] reagen on myeloma cell showed that the peak 1 had a high activity against myeloma cell. It has IC₅₀ equal to 0,18 µg/mL.

Key word: Kaliapsis sponge, cytotoxic, myeloma cell

Pendahuluan

Kebutuhan obat baru antikanker semakin mendesak, karena obat-obatan yang dipakai selama ini disamping harganya mahal juga selektivitasnya masih rendah. Pencarian sumber-sumber baru untuk menghasilkan senyawa antikanker terus dilakukan diantaranya dari organisme laut.

Pemanfaatan kekayaan laut Indonesia selama ini masih pada budidaya ikan dan sejenisnya untuk konsumsi pakan sedangkan pemanfaatan dalam bidang medis dan pengobatan masih jarang dilakukan. Di lain pihak, potensi *bioprospecting* dari biota laut untuk bahan dasar industri farmasi, kosmetika, bioenergi, dan industri lainnya di Indonesia sangat besar, diperkirakan mencapai nilai ekonomi sebesar 40 miliar dollar AS per tahun (Dahuri, 2004). Pada tahun 1995, hasil perdagangan untuk dunia obat-obatan yang berasal dari *bioprospecting* ini mencapai angka \$

US 14 miliar (Fachrudin, 2003). Ironisnya, Indonesia masih belum bisa memproduksi bahan dasar kimia untuk produksi obat dengan hampir 90% bahan dasar kimia tersebut masih diimpor.



Gambar 1. Spons Kaliapsis.

Spons merupakan organisma multiseluler tak bertulang belakang yang potensial dijadikan bahan eksplorasi pencarian senyawa baru antikanker karena spons merupakan penghasil senyawa bioaktif antiviral maupun senyawa sitotoksik (Garson, 1994). Data dari Schmitz (1998) menyebutkan, dari 434 struktur kimia biota laut yang bersifat sitotoksik spons menempati peringkat terbesar dengan 193 senyawa, ascidian (57), alga (44), moluska (46), Koral lunak (27), gorgonian (20), dinoflagella (8), anemon (8), *echinoderm* (7), *worms* (8), briozoan (5), bakteri (3) dan *hydroid* (3).

Spons Kaliapsis mempunyai warna coklat agak kehitaman dengan permukaan lembut tak berlubang-lubang dan tidak berbau menyengat. Jika dilakukan pemotongan vertikal terlihat adanya lendir putih ditengah dengan lubang-lubang diantaranya. Spons Kaliapsis tidak mudah dipatahkan. Klasifikasi spons ini adalah Kerajaan Animalia, Filum Porifera, Kelas Demospongiae, Bangsa Lithisda, Sub bangsa Triacenosina, Suku Theonellidae, Marga Kaliapsis Bowerbank, 1968 (Hooper and Soest, 2002)

Spons Kaliapsis adalah koleksi dari perairan Pulau Menjangan Bali Barat, merupakan spons dengan hasil uji *Brine Shrimp Lethality Test* paling toksik diantara ke 45 koleksi spons (Setyowati *et al.*, 2007). Nilai LC_{50} 8,04 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak etanol Kaliapsis adalah toksik menurut Meyer (1982). Hasil uji ekstrak etanol spons Kaliapsis terhadap sel myeloma memberikan IC_{50} sebesar 22,6 $\mu\text{g/mL}$, paling kecil diantara 4 jenis spons yang bersifat sitotoksik (Setyowati dan Meiyanto, 2007)

Metodologi

Bahan

Semua bahan yang digunakan dalam penelitian ini berkualitas *pro analysis* (Merck), kecuali disebutkan lain. Air yang digunakan adalah air suling.

- Bahan utama spons Kaliapsis yang diambil dari perairan Pulau Menjangan Bali Barat tanggal 14 Oktober 2004. Determinasi dilakukan oleh laboratorium Hydrobiologi jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian UGM.
- Bahan pelarut untuk ekstraksi dan isolasi terdiri dari etanol, kloroform, metanol, heksan, etil asetat dan air

- Bahan untuk kromatografi terdiri atas plat silika gel 60 F_{254} , silika gel GF_{254} preparatif, berbagai pereaksi (serium (IV) sulfat, uap I_2)
- Bahan untuk uji sitotoksik terdiri dari kultur sel myeloma stok Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada. Media RPMI 1640 (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Fungison 0,5%, penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), MTT [Sigma Chemical Co). Kontrol positif digunakan doksorubisin HCl (Ebewe/Ebedoxo Stok 10 mg/5mL)

Cara Penelitian

Isolasi senyawa aktif spons yang dimonitor dengan uji

Isolasi senyawa bioaktif spons dilakukan dengan modifikasi metode yang dilakukan oleh Setyowati *et al.* (2003, 2004, 2005).

Ekstraksi

Spons ditiriskan dari rendaman etanol, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Spons dipotong dan dimaserasi dengan kloroform. Pendiaman dilakukan selama 24 jam. Setelah pendiaman kemudian disaring dan dikumpulkan dalam wadah, untuk selanjutnya disebut filtrat I. Ampas sisa penyaringan diekstraksi seperti cara di atas hingga 3 kali (warna bening). Kumpulan filtrat (I s/d III) diuapkan dengan penguap putar hampa udara hingga diperoleh masa kental dan diangin-anginkan kering. Ekstrak kering yang diperoleh ditimbang dan disebut ekstrak kloroform.

Terhadap sisa spons diekstraksi seperti cara di atas dengan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak kloroform dan ekstrak metanol yang diperoleh diuji sifat toksiknya dengan *bioassay*.

Fraksinasi dengan kromatografi cair hampa udara (KCHU)

Isolasi senyawa aktif gabungan fraksi Gf II dilakukan dengan KCHU. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F_{60} preparatif dan fase gerak dengan kepolaran bertingkat yaitu: heksana, campuran heksan-etil asetat (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.

Campuran ekstrak kloroform dan silika gel G_{254} preparatif ditempatkan diatas penyaring *glas sinter* yang telah berisi silika gel F_{60} preparatif. Filtrasi dilakukan dengan pengurangan tekanan udara. Filtrat yang dihasilkan diuapkan hingga kering, ditimbang dan dibuat seri konsentrasi untuk uji.

Pemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Fraksi yang aktif dimurnikan menggunakan KLTP. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄ preparatif dan fase gerak heksan etil asetat (1:2 v/v).

Uji kemurnian isolat aktif

Uji kemurnian isolat aktif dilakukan dengan menggunakan KLT dengan berbagai variasi fase gerak. Senyawa dikatakan murni apabila memberikan peak tunggal pada KLT dengan berbagai fase gerak.

Uji sitotoksik sel

Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolium bromida] pada plate 96 *wells* terhadap biakan sel yang diberi perlakuan dengan senyawa uji pada berbagai kadar. Sel dengan kepadatan 2×10^4 sel/sumuran. Absorbansi dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550nm. Hasil pengukuran serapan digunakan untuk menghitung % Hidup dengan rumus:

$$\% \text{ hidup} = \frac{\text{Abs}(\text{sel perlakuan} - \text{Kmedia})}{\text{Abs}(\text{Ksel} - \text{kmedia})} \times 100\%$$

selanjutnya dilakukan penghitungan % kematian dan penghitungan IC₅₀ dengan menggunakan analisis probit

Hasil Dan Pembahasan

Sampel Spons

Spons Kaliapsis diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan kloroform. Pada awal penyarian pelarut berwarna hijau tua. Penyarian dihentikan setelah ekstrak kloroform berwarna jernih yang berarti sebagian besar senyawa yang larut dalam kloroform sudah terekstrak. Dari total 2109.2 g berat basah spons diperoleh 6,04 g ekstrak kering spons.

Sisa spons kemudian dimaserasi lagi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol yang diperoleh sebanyak 8,9 g ekstrak kering. Ekstrak etanol hasil maserasi spons dilakukan preparasi dengan penyaringan dan perendaman pada suhu 4 °C selama 24 jam. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan garam-garam yang terlarut. Setelah diupkan filtrat kental yang diperoleh dipartisi dengan kloroform. Filtrat kloroform diupkan dan diperoleh 3,76 g ekstrak kering kloroform.

Pemeriksaan kandungan ekstrak kloroform spons dan ekstrak kloroform dari perendaman etanol dengan KLT menunjukkan

profil kromatogram yang relatif sama sehingga kedua ekstrak ini dapat digabung. Berat gabungan kedua ekstrak adalah 9,8 g ekstrak kering atau rendemen total ekstrak sebesar 0,47 % b/b spons basah

Uji pendahuluan sitotoksitas

Untuk mendapatkan senyawa aktif perlu dilakukan uji terhadap ekstrak kloroform dan metanol. Dari Tabel 1 terlihat toksisitas ekstrak kloroform terhadap sel myeloma jauh lebih besar bila dibandingkan dengan ekstrak metanol sehingga untuk penelitian selanjutnya digunakan ekstrak kloroform.

Tabel I. Efek sitotoksik ekstrak kloroform dan metanol spons Kaliapsis terhadap sel myeloma

No	Nama ekstrak	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)
1	Kloroform	16,8
2	Metanol	164,9

Fraksinasi ekstrak kloroform dan uji aktifitas fraksi-fraksi

Ekstrak kloroform dipartisi menjadi beberapa fraksi dengan metode kromatografi kolom hampa udara dengan sistem fase gerak bertingkat. Kromatografi kolom hampa udara atau kromatografi kolom cepat merupakan metode pemisahan yang cepat dan mudah dari suatu ekstrak. Penyarian dilakukan atas dasar perbedaan tingkat polaritas. Pemilihan fase gerak didasarkan atas profil KLT. Analisis KLT terhadap ekstrak kloroform menunjukkan pemisahan yang cukup bagus menggunakan fase gerak heksana:etil asetat (5:1 v/v).

Dari gambaran kromatografi yang telah dilakukan maka sistem fase gerak yang digunakan untuk mengelusi senyawa berturut-turut adalah sebagai berikut:

Fraksi 1: Heksana 100%	100 mL
Fraksi 2: Heksana:etil asetat = 90:10 (% v/v)	50 mL
Fraksi 3: Heksana:etil asetat = 80:20 (% v/v)	50 mL
Fraksi 4: Heksana:etil asetat = 70:30 (% v/v)	50 mL
Fraksi 5: Heksana:etil asetat = 60:40 (% v/v)	50 mL
Fraksi 6: Heksana:etil asetat = 50:50 (% v/v)	50 mL
Fraksi 7: Heksana:etil asetat = 40:60 (% v/v)	50 mL
Fraksi 8: Heksana:etil asetat = 30:70 (% v/v)	50 mL
Fraksi 9: Heksana:etil asetat = 20:80 (% v/v)	50 mL
Fraksi 10: Heksana:etil asetat = 10:90 (% v/v)	50 mL
Fraksi 11: Etil asetat 100%	50 mL
Fraksi 12: Kloroform:Metanol = 50:50 (% v/v)	50 mL
Fraksi 13: Metanol 100%	150 mL



Gambar 2. Profil KLT fraksi-fraksi spons Kaliapsis

Keterangan:

Fd: Silika gel GF 254, Fg: Heksan:etil asetat= 1:2 (asam)

Ke 13 fraksi hasil pemisahan tersebut dianalisis menggunakan KLT dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak heksan:etil asetat (1:2 v/v). Profil KLT tiap-tiap fraksi terlihat pada Gambar 1.

Dari gambaran bercak pada KLT terlihat adanya distribusi pemisahan bercak ekstrak kloroform ke dalam fraksi-fraksi. Analisis KLT menunjukkan kesamaan profil pada fraksi 1-9, kesamaan profil pada fraksi 10-11 dan kesamaan profil pada fraksi 12-13. Terhadap fraksi-fraksi dengan profil KLT mirip digabungkan dan dikeringkan untuk selanjutnya fraksi 1-9 disebut Gf I, fraksi 10-11 disebut Gf II sedangkan fraksi 12-13 disebut Gf III. Pada gabungan fraksi tersebut perlu dilakukan uji sitotoksik untuk melihat keaktifan dari masing-masing gabungan fraksi tersebut (Gambar 1).

Tabel II. Efek sitotoksik gabungan fraksi I, II dan III ekstrak kloroform spons Kaliapsis terhadap sel myeloma

No	Nama fraksi	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)
1	Gf I	158,2
2	Gf II	8,5
3	Gf III	29,8

Dari Tabel II dapat diketahui bahwa fraksi Gf II memberikan hasil uji yang berpotensi untuk diisolasi senyawa aktifnya karena memberikan harga IC₅₀ sebesar 8,5 µg/mL

Kromatografi preparatif fraksi Gf II

Pemurnian terhadap gabungan fraksi II dengan KLT preparatif dilakukan melakukan pelarutan endapan Gf II dengan kloroform kemudian ditotolkan pada silika gel F₂₅₄ dengan

campuran fase gerak heksan:etil asetat (1:2 v/v). Hasil pengembangan terlihat pada Gambar 3.

Uji kemurnian Senyawa 1, 2 dan 3

Sebelum dilakukan analisis berikutnya perlu pengecekan terhadap kemurnian senyawa 1, 2 dan 3. Analisis kemurnian dilakukan dengan KLT dengan berbagai fase gerak menurut tingkat kepolaran yaitu heksan etil asetat (1:2 v/v) dan heksan etil asetat (1:5 v/v).

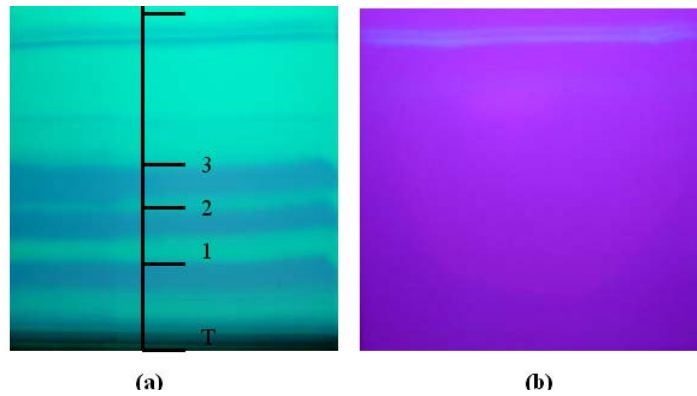
Hasil uji kemurnian menunjukkan bahwa bercak 1, 2 dan 3 adalah murni secara KLT (Gambar 4). Bercak T tidak dilakukan uji kemurnian karena masih memerlukan purifikasi lebih lanjut. Untuk bercak 1 untuk fase gerak yang semakin polar memberikan bercak dengan harga hR_f yang semakin besar pula. Fase gerak (b) mempunyai harga hR_{f1} = 32 sedangkan fase gerak (a) hR_{f1} = 20. Dari data tersebut dapat dikatakan bahwa bercak yang terdeteksi relatif murni. Hal ini juga berlaku pula untuk bercak 2 (b) hR_{f2} = 32 dan (a) hR_{f2} = 36. Bercak 3 (b) hR_{f3} = 54 dan (a) hR_{f3} = 60. Gambar 5 menunjukkan profil kristal dari bercak 1, 2 dan 3.

Uji sitotoksik bercak 1, 2, 3 dan T

Terhadap masing-masing bercak dilakukan uji sitotoksik menggunakan MTT. Dengan menggunakan pelarut DMSO (Tabel III).

Dari Tabel III, terlihat bercak 1 bersifat paling sitotoksik bila dibandingkan dengan bercak lain yaitu mampu menghambat/mematikan sel myeloma pada IC₅₀ sebesar 0,18 µg/mL, sehingga bercak 1 perlu dilakukan analisis berikutnya.

Spons Kaliapsis merupakan spons bangsa Lithistid. Spons bangsa Lithistid meru-



Gambar 3. KLT preparatif Gf II dengan fase gerak Heksana:etilasetat=1:2 v/v (deteksi dengan UV 254nm)

Keterangan:

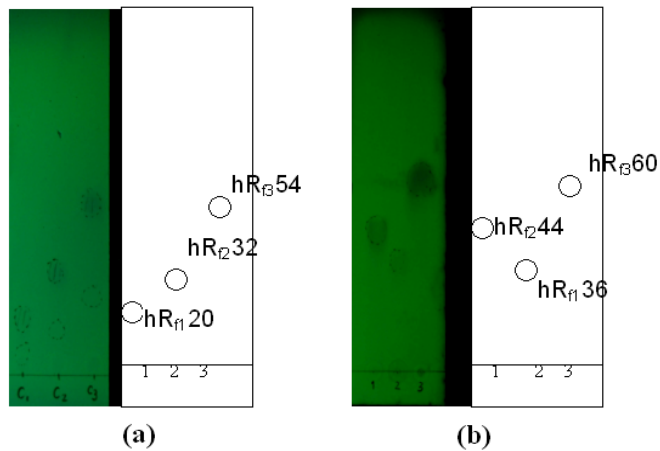
Fase diam: silika gel GF254nm preparatif

Fase Gerak: heksana-etil:asetat (1:2 v/v)

Deteksi: sinar UV254nm (a), UV366nm (b).

Tabel III. Harga hR_f bercak-bercak Gf II

Namabercak	Harga hR_f	Warna bercak		
		UV 254nm	UV 366nm	Serium(IV)sulfat
T	$hR_{f1} = 3$	Pemadaman	-	Coklat
1.	$hR_{f1} = 33$	Pemadaman	-	Coklat
2.	$hR_{f2} = 42$	Pemadaman	-	Coklat
3.	$hR_{f3} = 50$	Pemadaman	-	Coklat

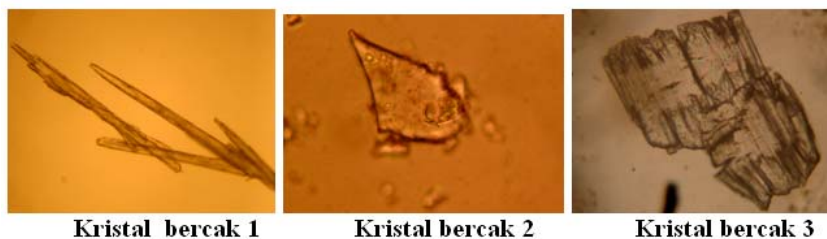


Gambar 4. KLT uji kemurnian bercak 1,2 dan 3 (dua kali pengembangan)

Keterangan:

(a) Fase gerak heksana etilasetat (1:2 v/v)

(b) Fase gerak heksana etilasetat (1:5 v/v)



Gambar 5. Profil Kristal bercah 1 , 2 dan 3

Tabel IV. Efek sitotoksik bercah 1, 2, 3 dan T dari fraksi Gf II spons *Kaliapsis* terhadap sel myeloma

Nama bercah	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)
T	10,5
1	0,18
2	15,35
3	34,03

pakan bangsa spons yang paling unik karena mengandung begitu banyak golongan senyawa. Spons dari bangsa ini terkenal diantara jenis hewan tak bertulang belakang laut lain karena kemampuannya memproduksi beragam metabolit aktif, seperti senyawa aktif dari golongan poliketida, peptid siklik, alkaloid dan sterol. Spons bangsa ini juga menghasilkan beragam senyawa sitotoksik. Contoh bangsa ini adalah dari suku Theonellidae marga *Discodermia* yang menghasilkan *discodermolide* suatu senyawa beraktifitas antikanker dan *immunosuppressant*

Daftar Pustaka

- Bewley, C.A and Faulkner, D.J., 1998, Lithistid Sponges: Star Performers or Hosts to the Stars, *Angewandte Chemie international*, 37, 2162-2178
- Cooper, E.L., 2004, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, *eCAM*, 1, 215–217
- Dahuri, R, 2004, Industri Bioteknologi Perairan dan Kemakmuran Bangsa, *Kompas*, Gedia Press, Jakarta.
- Fachrudin Mangunwijaya, 2004, Bioteknologi Berbasis Kekayaan Hayati, *Sinar Harapan*, Jakarta, <http://www.geocity.com>
- Garson, M.J., 1994, The Biosynthesis of Secondary Metabolites: Why is Important. In: *Sponss in Time and Space*, pp: 428-429, edited by R.W.M. van Soest, Th. M.G. Van Kempen and J.C Brackman (eds.), Proceeding 4th International Porifera Congress, Amsterdam/Netherland.
- Hooper, J.N.A and van Soest, R.W.M., 2002, *Systema Porifera : A Guide to Classification of Sponges*, pp : 674-675 volume 1, Kluwer Academic, Plenum Publisher, New York.
- 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.

yang telah memasuki fase praklinik didalam pengujiannya (Cooper, 2004; Bewley and Faulkner, 1998).

Kesimpulan

Hasil uji sitotoksik terhadap sel myeloma menunjukkan bahwa ekstrak kloroform spons *Kaliapsis sp.* lebih aktif dibanding ekstrak metanol.

Dari gabungan fraksi II ekstrak kloroform spons *Kaliapsis sp* diperoleh bercah-bercah yang potensial sebagai senyawa sitotoksik dengan aktivitas tertinggi pada bercah 1 dengan harga IC₅₀ sebesar 0,18 µg/mL

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih diberikan pada DIKTI yang telah membiayai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing XV/1 tahun 2007.

- Setyowati, E.P., Sudarsono, Wahyuono, S., 2003, Active Fraction from Sponge *Stylissa flabelliformis* Collected from Menjangan National Park West Bali, *Journal of Technoscience*, 16, 499-513.
- Setyowati, E.P., Sudarsono, Wahyuono, S., 2004, Cytotoxic and Antimicrobial Test of The Bioactive Compound Isolated from *Stylissa flabelliformis* Sponge, *Indonesian Journal of Pharmacy*, 15, 50-56
- Setyowati, E.P., Sudarsono, Wahyuono, S., 2005, Jaspamide: Structure Identification of Citotoxic and Fungicide Compound from *Stylissa flabelliformis* Sponge, *Indonesian Journal of Pharmacy*, 16, 1-6.
- Setyowati, E.P., Jenie, U.A., Sudarsono, Kardono., B., Rahmat, R., 2007, Toksisitas dan aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Bunga karang dari perairan Pulau Tabuhan Banyuwangi dan Pulau Menjangan Bali Barat , *Jurnal Perikanan (J. Fish. Sci.)* IX, 167-173
- Setyowati, E. P dan Meiyanto, E., 2007., Isolasi dan Elusidasi struktur senyawa antikanker spons dari perairan Pulau Bali dan Tabuhan Banyuwangi, Laporan Hibah Bersaing, XV/1 , LPPM, UGM, p. 17.

* Korespondensi : Dra. Erna Prawita Setyowati, M.Si., Apt.
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada
Sekip Utara Yogyakarta, 55281. Telp. 0274-542738
E-mail: erna_prawita@ugm.ac.id