

Uji sitotoksik senyawa alkaloid dari spons *Petrosia sp*: potensial pengembangan sebagai antikanker

Cytotoxicity testing of alkaloid compounds isolated from sponge *Petrosia sp*: its potency for development of anticancer agent

Puji Astuti¹⁾, Gemini Alam²⁾, Mae Sri Hartati W.³⁾, Dinar Sari⁴⁾ dan Subagus Wahyuono¹⁾

¹⁾ Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²⁾ Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Hassanuddin, Makassar

³⁾ Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁴⁾ Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Surakarta

Abstrak

Kanker masih merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia. Berbagai macam senyawa telah dikembangkan melawan kanker, akan tetapi tak satupun jenis senyawa-senyawa tersebut menghasilkan efek yang memuaskan dan tanpa efek samping yang merugikan. Usaha eksplorasi senyawa-senyawa baru antikanker terus dilakukan dengan sifat penghambatan yang lebih baik.

Spons merupakan salah satu sumber senyawa-senyawa baru dari biota laut yang memiliki aktivitas farmakologis. Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan spons laut Indonesia untuk pencarian senyawa bioaktif yang baru. Dalam penelitian ini dipelajari efek sitotoksik dua isolat toksik terhadap larva dari fraksi kloroform spons *Petrosia sp* hasil koleksi dari taman laut Bunaken terhadap sel myeloma

Dua isolat toksik diperoleh berdasar *bioassay guided-isolation* terhadap larva *Artemia salina* Leach. Metode fraksinasi yang digunakan adalah *vacuum liquid chromatography* dan isolasinya dilakukan dengan KLT preparatif. Daya sitotoksik isolat yang diperoleh dilakukan dalam *96 well plate* dengan RPMI 1640 sebagai media pertumbuhan. Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan metode MTT assay. Analisis akhir dilakukan dengan perhitungan nilai LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

Dua senyawa yang diisolasi dari spons *Petrosia sp* adalah senyawa alkaloid yang menunjukkan tingkat toksisitas cukup tinggi terhadap larva *A. salina* dengan LC_{50} masing-masing sebesar 7,23 (isolat 1) dan 5,69 $\mu\text{g/mL}$ (2). Sitotoksitas terhadap sel myeloma menunjukkan nilai LC_{50} masing-masing sebesar 16,95 $\mu\text{g/mL}$ (isolat 1) dan 18,8 $\mu\text{g/mL}$ (isolat 2). Semakin lama waktu pemberian, kedua isolat tersebut semakin toksik yang ditunjukkan dengan semakin rendahnya LC_{50} .

Kata kunci: sitotoksik, *Petrosia sp*, *Artemia salina* Leach, myeloma

Abstract

Cancer is still a major problem and common cause of death around the world. Various therapeutic agents have been developed to fight against cancer, but none of these agents give satisfactory results and without debilitating side effects. A number of researches have been conducted to search anticancer compounds with renewed vigour.

Sponges, marine invertebrates, are known as rich sources of compounds which pronounced pharmacological activities. The aims of this study are to determine cytotoxic effect of two toxic compounds isolated from chloroform fraction of *Petrosia sp* sponges collected from Bunaken on myeloma cells.

The two toxic compounds were isolated based on bioassay guided-isolation on brine shrimp larvae. Isolation was conducted using column chromatography followed by preparative TLC. Cytotoxic effect of the two compounds was conducted in 96 well plate using RPMI 1640 as medium. The number of viable cells was determined using MTT assay and LC₅₀ (µg/mL) of the compounds was analysed using probit analysis.

The results showed that the two compounds were alkaloid and toxic to larva *A. salina* with LC₅₀ of 7.23 (compound 1) and 5.69 µg/mL (compound 2). These compounds were also toxic to myeloma cells with LC₅₀ values of 16.95 µg/mL (compound 1) and 18.8 µg/mL (compound 2). The longer the incubation time, the compounds were more toxic as showed by the lower LC₅₀ values .

Key words: cytotoxic, *Petrosia sp*, *Artemia salina* Leach, myeloma

Pendahuluan

Sampai saat ini kanker masih merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia. Berbagai macam senyawa telah dikembangkan melawan kanker yang meliputi senyawa-senyawa pengalkilasi, antimetabolit, obat-obat radiomimetik, hormon dan senyawa antagonis (Cram *et al.*, 1992; Calabresi and Chabner, 1991; Hoppe *et al.*, 1992; Lorgan *et al.*, 1996). Akan tetapi tak satupun jenis senyawa-senyawa ini menghasilkan efek yang memuaskan dan tanpa efek samping yang merugikan (Green *et al.*, 1982; Herzig *et al.*, 1987).

Banyak penelitian dilakukan untuk mencari senyawa antikanker baru dengan harapan sifat yang lebih baik. Spons merupakan salah satu sumber senyawa-senyawa baru dari biota laut yang mempunyai keanekaragaman hayati tinggi. Penelitian yang telah ada terhadap spons telah menghasilkan senyawa-senyawa baru dengan struktur unik dan memiliki aktivitas farmakologis. Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan spons laut Indonesia untuk pencarian senyawa bioaktif yang baru.

Studi pendahuluan telah dilakukan dengan tujuan untuk menskrining senyawa toksik dari beberapa spesies spons laut dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) (Astuti *et al.*, 2002; Astuti *et al.*, 2003; Carballo *et al.*, 2002). Dua isolat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dari spons laut *Petrosia sp* telah berhasil diisolasi. Berdasarkan hasil studi

tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kemampuan senyawa-senyawa toksik tersebut dalam membunuh sel kanker serta penentuan nilai LC₅₀-nya. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini dapat memberikan aset dan kontribusi besar terhadap pengembangan sumber daya laut yang spesifik berasal dari Indonesia dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker unggulan.

Metodologi

Isolasi senyawa bioaktif

Proses isolasi dilakukan berdasarkan sistem *bioassay guided isolation* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (Meyer *et al.*, 1982) sebagai bioassaynya. Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi kolom seperti yang tercantum dalam Alam dkk, 2003.

Isolasi senyawa bioaktif dilakukan dengan cara KLT preparatif pada fraksi aktif yang diperoleh. Satu gram fraksi aktif dilarutkan dalam campuran metanol-kloroform (1:1 v/v) dan ditotolkan pada lempeng preparatif (silica gel 60 F₂₅₄-Merck). Setelah penotolan fraksi kering, lempeng KLT dielusi dengan fase gerak n-heksana-etil asetat-amoniak (66:33:0,8 v/v). Lempeng preparatif dimasukkan ke dalam bejana pengembang. Pita-pita senyawa hasil pengembangan dilihat di bawah lampu UV 254 dan 366 nm. Senyawa yang diisolasi ditandai dan dikerok. Masing-masing kerokan silika gel selanjutnya dilarutkan dengan campuran kloroform-metanol (1:1 v/v) dan diaduk selama 30 menit. Filtrat disaring menggunakan corong sinterglas dan pompa vakum lalu dilakukan pembilasan dengan pelarut yang sama. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan hingga kering. Masing-

masing filtrat kering yang diperoleh selanjutnya disebut isolat 1 dan 2.

Uji Brine shrimp lethality Test (BST)

Uji BST dilakukan sesuai dengan yang tercantum dalam Meyer *et al.*, 1982. Senyawa uji dalam flakon dilarutkan dengan air laut secukupnya dengan bantuan vortex. Sepuluh ekor larva *Artemia* dimasukkan secara random ke dalam flakon yang telah berisi senyawa uji dan ditambahkan air laut sampai volume 5 ml. Dibuat suspensi yeast 0.6 mg/ml dan ditambahkan ke dalam tiap flakon masing-masing 1 tetes sebagai makanan. Setelah 24 jam jumlah larva yang hidup dihitung dengan bantuan kaca pembesar dan prosentasi kematian dihitung. LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) dihitung dengan analisis probit.

Uji sitotoksitas terhadap sel myeloma

Uji sitotoksitas dilakukan terhadap kemampuan isolat dalam membunuh sel kanker myeloma. Dibuat serial kadar terhadap isolat uji yang dilanjutkan dengan pengujian aktivitasnya terhadap sel myeloma yang telah diinokulasi pada 96 well plate dengan jumlah inokulasi sel 2×10^4 sel/sumuran. Peringkat kadar pemberian dibuat sebagai berikut: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 dan 0,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pengamatan jumlah kematian sel dilakukan pada jam ke 24, 48 dan 72 jam inkubasi pada suhu 37°C setelah pemberian isolat uji dengan MTT assay (Mosmann *et al.*, 1983) dengan tiga replikasi.

Hasil Dan Pembahasan

Dalam penelitian ini metode pemisahan senyawa yang digunakan adalah kromatografi kolom vakum dan uji toksisitas hasil fraksinasi kolom dilakukan dengan metode BST (Alam

dkk., 2003). Dari hasil uji tersebut diketahui bahwa fraksi 7 merupakan fraksi paling aktif dengan presentase kematian 100% pada konsentrasi terkecil yang digunakan yaitu 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa aktif dari fraksi 7. Fraksi ini ditotolkan pada lempeng KLT preparatif dan dikembangkan dengan fase gerak *n*-heksana-etil asetat-amoniak (66:33:0,8 v/v). Pada lempeng KLT preparatif hasil pengembangan diperoleh 2 pita. Masing-masing pita mempunyai $R_f = 0,8$ (isolat 1) dan $R_f = 0,4$ (isolat 2). Hasil rendemen dua senyawa tersebut masing-masing sebesar 1,77% untuk isolat 1 dan 2,27% untuk isolat 2.

Hasil uji toksisitas isolat aktif dengan metode BST menunjukkan bahwa isolat 2 relatif lebih toksik dibandingkan isolat 1 dengan LC_{50} masing-masing sebesar 7,23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ untuk isolat 1 dan 5,69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ isolat 2 (Tabel I).

Untuk mengetahui potensi kedua senyawa tersebut sebagai antikanker, kedua isolat diuji kemampuannya dalam membunuh sel kanker myeloma. Sel myeloma adalah sel kanker yang berasal dari B-sel dimana pertumbuhan tak terkendali dari sel jenis ini dapat menimbulkan beberapa macam efek seperti kerusakan tulang, gagal ginjal dan immunodeficiency (Hossfeld, 1990).

Pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksitas dimana uji ini sudah banyak digunakan untuk mencari senyawa potensial untuk dikembangkan sebagai obat, kosmetik

Tabel I. Data hasil uji BST isolat 1 (a) dan isolat 2 (b) (n = 5)

a) Isolat 1

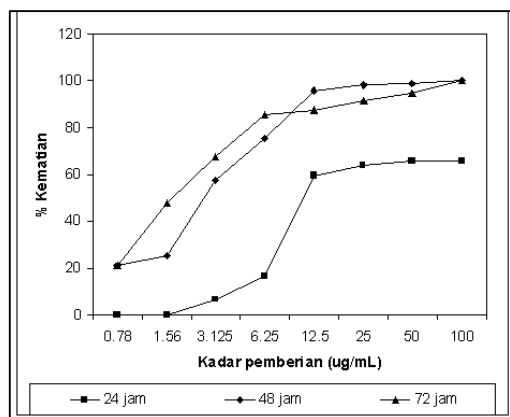
Konsentrasi $\mu\text{g}/\text{mL}$	log Konsentrasi	% Kematian	Angka probit	Persamaan garis	LC_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$
2	0,301	26	4,36	Y=1,192X+3,976 r =0,997	7,23
5	0,699	41	4,77		
10	1	56	5,15		
15	1,176	66	5,41		

b) Isolat 2

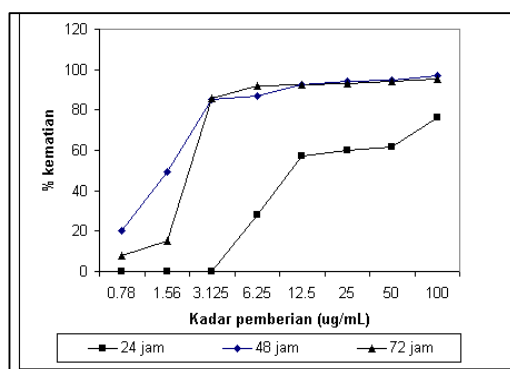
Konsentrasi $\mu\text{g}/\text{mL}$	log Konsentrasi	% Kematian	Angka probit	Persamaan garis	LC_{50} $\mu\text{g}/\text{mL}$
5	0,699	46	4,90	Y=2,440x+3,1157 r =0,982	5,69
10	1	68	5,46		
15	1,176	88	6,18		
20	1,301	90	6,28		

Tabel II. Nilai LC₅₀ isolat terhadap sel myeloma

Sampel	LC ₅₀ (µg/mL)		
	24 jam	48 jam	72 jam
Isolat I	16,95	2,50	1,84
Isolat II	18,8	2,50	2,18



(a)



(b)

Gambar 1. Hasil uji sitotoksitas isolat 1 (a) dan 2 (b) terhadap sel myeloma

atau antikanker (Freshney, 2000). Uji sitotoksitas dari dua isolat diawali dengan skrining kemampuan isolat tersebut dalam membunuh sel kanker uji dan dimulai dengan seri kadar 1000, 500, 250 dan 100 µg/mL. Pada uji aktivitas terhadap sel myeloma, terdapat jumlah kematian sel sebesar 100% pada semua kadar yang diberikan. Oleh karena itu dilakukan penurunan seri kadar dan diperoleh peringkat seri 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 µg/mL.

Baik isolat 1 maupun isolat 2 bersifat toksik terhadap sel myeloma pada semua kadar pemberian apabila diberikan selama 48 dan 72 jam (Gambar 1). Apabila diberikan selama 24 jam, pada kadar 3,13 µg/mL isolat 1 sudah tidak memberikan efek dan sedangkan isolat 2 sudah tidak berefek pada kadar 1,56 µg/mL. Dapat ditarik kesimpulan bahwa lamanya waktu pemberian mempengaruhi kemampuan isolat tersebut dalam membunuh sel kanker uji.

Apabila dilihat dari nilai LC₅₀ senyawa-senyawa tersebut (Tabel II), isolat 1 dan 2 menunjukkan nilai yang kurang lebih sama. Hal ini terlihat pada nilai LC₅₀ 48 jam, dimana nilai LC₅₀ keduanya adalah 2,5 µg/mL. Suatu senyawa dikatakan berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai antikanker apabila diketahui senyawa tersebut mempunyai LC₅₀ ≤ 30 µg/mL (Meyer *et al.*, 1982). Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa sitotoksitas isolat 1 dan isolat 2 terhadap sel myeloma cukup tinggi dan layak untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai antikanker.

Dari data perolehan senyawa bioaktif dengan metode BST dan uji sitotoksitasnya terhadap sel kanker dapat diketahui bahwa senyawa yang toksik terhadap larva *Artemia* juga toksik terhadap sel kanker uji. Hal ini

Tabel III. Hasil Deteksi Senyawa Bioaktif dengan Pereaksi Semprot dan Sinar UV.

Fase diam: silica gel GF 254, fase gerak isolat 1: *n*-heksana-etil asetat-amoniak (4:1:0,08 v/v), isolat 2: *n*-heksana-etil asetat- amoniak (3:2:0,08 v/v)

Sampel	Rf	Deteksi		
		Pereaksi Dragendorf	Sinar UV ₂₅₄	Sinar UV ₃₆₆
Isolat 1	0,35	Orange	Peredaman	Fluorescensi kuat
Isolat 2	0,42	Orange	Peredaman	Fluorescensi lemah

menunjukkan kesamaan dengan pernyataan Carballo *et al*, 2002 yang merekomendasikan uji BST sebagai uji awal skrining perolehan senyawa bioaktif.

Identifikasi pendahuluan terhadap senyawa bioaktif yang diperoleh dilakukan dengan pereaksi semprot Dragendorff dan sinar UV_{254,366}. Hasil analisis dengan detektor diatas menunjukkan bahwa kedua isolat yang diperoleh kemungkinan termasuk dalam golongan senyawa alkaloid (Tabel III).

Kesimpulan

1. Dua senyawa yang diisolasi dari spons *Petrosia* sp menunjukkan tingkat toksisitas yang cukup tinggi terhadap larva *A. salina*

Daftar Pustaka

- Alam, G., Sari, D., dan Astuti, P., 2003, Fraksinasi dan Uji Toksisitas Ekstrak aseton Spons *Petrosia* sp Asal Taman Laut Bunaken terhadap larva *Artemia salina* Leach, *Majalah Obat Tradisional*, Vol. 8., No.25, 20-24.
- Astuti, P., Alam, G., Tahir, A., and Wahyuono, S., 2002, Toxicity Studies of Sponges Collected from Barrang Lompo Island Against *Artemia salina* Leach, *J. Trad. Med.*, Vol. 7 (21), 19-23.
- Astuti, P., Alam, G., and Wahyuono, S., 2003, Bioactivity Testing of Sponges Collected from Bunaken Menado Against *Artemia salina* Leach, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14(1), 238-243.
- Calabresi, P., and Chabner, B., 1991, In: Gilman, G.E., Rall, T.W., Taylor, O., (Eds), *The Pharmacological Basics of Therapeutics*, 8th, ed., 1202-1290, Pergamon Press, USA.
- Carballo, J., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., and Garcia-Gravalos, M.D., 2002, A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products, *BMC Biotechnol.*, Sep 23;2(1):17
- Cram, W.R., Stewart, C.F., In: Herfindal, E.T., Gourley, A.B., and Hart, L.L., (Eds), 1992, *Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 5th ed., 271-290, Williams and Wilkins; Maryland USA.
- Freshney, R.I., 2000, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fourth Ed., A John Wiley and Sons, Inc, Publication, USA.
- Green D., Tew, K.D., Hisamatsu, T., and Schein, P.S., 1982, Correlation of nitrosourea murine bone marrow toxicity with deoxyribonucleic acid alkylation and chromatin binding sites, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 1671-1679.
- Herzig R.H., Hines, J.D., and Herzin, G.P., 1987, Cerebellar toxicity with high-dose cytosine arabinoside, *J. Clin. Oncol.*, Jun 1, 927-932.
- Hoppe, R.T., Coleman C.N., Cox, R.S., Rosenberg, S.A., and Kaplan, H.S., 1982, The management of stage I-II Hodgkin's disease with irradiation alone or combined modality therapy: the Stanford experience, *Blood*, 59, 455-463.
- Hossfeld, D.K., 1990, Multiple Myeloma, in Hossfeld, D.K., Sherman, C.D., Love, R.R., Bosch, F.X (Eds), *Manual of Clinical Oncology*, Fifth ed., Spinger-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Lorgan P.C., Crasey, T., and Coleman, R.E., 1996, *Drugs*, 51, 571-584.
- Meyer, Ferrigni, Putnam, Jacobsen, Nichols, Mc. Laughlin, 1982, *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Lant Constituents, Plant Medica*, Vol 45.
- Mosmann, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunological Methods*, 1983; 65: 55-63.

dengan LC₅₀ masing-masing sebesar 7,23 (isolat 1) dan 5,69 µg/mL (isolat 2).

2. Sitotoksisitas terhadap sel myeloma menunjukkan nilai LC₅₀ masing-masing sebesar 16,95 µg/mL (isolat 1) dan 18,8 µg/mL (isolat 2). Nilai LC₅₀ tersebut semakin rendah seiring dengan semakin lamanya waktu pemberian.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dilaksanakan atas biaya Anggaran Dana Masyarakat Universitas Gadjah Mada Berdasarkan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor: 2588/P.II/LPN/2003 Tanggal 2 Juni 2003