

AKTIVITAS ANTIMITOSIS HASIL FRAKSINASI EKSTRAK KLOOROFORM SPONS *Siphonocalina* sp TERHADAP SEL ZIGOT BULU BABI *Tripneustus gratilla* Linn.

Rina Agustina, Gemini Alam, Christiana Lethe
Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar

ABSTRAK

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan karena ketidaknormalan pertumbuhan sel. Resistensi sel kanker pada beberapa jenis obat kanker serta efek samping obat yang begitu besar terhadap sel normal merupakan masalah dalam pengobatan kanker. Hal ini mendorong para peneliti untuk melakukan penelitian guna penemuan obat antikanker baru. Penelitian ini memanfaatkan biota laut yang diperoleh dari perairan di Sulawesi Selatan yaitu spons *Siphonocalina* sp yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimitososis dari hasil fraksinasi ekstrak kloroform spons *Siphonocalina* sp. terhadap sel zigot *Tripneustus gratilla* Linn dan mengetahui golongan komponen kimia yang berperan dalam aktivitas antimitososis tersebut. Pengujian aktivitas antimitososis menggunakan sel zigot yang diperoleh dengan pemuatan sel telur dan sperma *Tripneustus gratilla* Linn yang dilakukan secara invitro. Sel zigot kemudian diberi perlakuan fraksi-fraksi hasil fraksinasi ekstrak kloroform dengan konsentrasi 100 µg/ml. Fraksi yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar selanjutnya dilarutkan dengan pelarut etil asetat sehingga diperoleh subfraksi larut etil asetat dan tidak larut etil asetat. Selanjutnya, uji aktivitas subfraksi larut etil asetat dan tidak larut etil asetat dilakukan dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/ml. Pembelahan sel diamati menggunakan mikroskop cahaya setelah 2 jam inkubasi. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa fraksi tidak larut etil asetat memiliki aktivitas antimitososis yang kuat dengan nilai IC₅₀ 15,14 µg/ml. Kontrol positif yang digunakan yaitu vinkristin dengan IC₅₀ sebesar 0,183 µg/ml. Hasil identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa golongan senyawa kimia yang memiliki aktivitas antimitososis pada fraksi tidak larut etil asetat spons *Siphonocalina* sp diduga golongan alkaloida.

Kata Kunci :

Siphonocalina sp,
antimitosis,
Tripneustus gratilla

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang dapat dikenali dengan pertumbuhan dan penyebaran sel yang abnormal. Setiap tahun diperkirakan sekitar 6 juta pasien baru didiagnosa kanker di seluruh dunia (1). Di Indonesia, menurut hasil Riset Kesehatan Dasar Tahun 2013, sebanyak 1,4 dari 1000 penduduk Indonesia menderita kanker dan merupakan penyebab kematian nomor tujuh di Indonesia dengan presentasi 5,7% dari seluruh penyebab kematian. (2).

Biota laut khususnya spons merupakan salah satu sumber senyawa baru yang memiliki struktur yang unik dan memiliki berbagai aktivitas farmakologi. Beberapa senyawa kimia tersebut antara lain; Aaptamine yang diisolasi dari spons *Aaptos* sp memiliki aktivitas antiapoptosis dan antiproliferasi (3), Caliculin A yang diisolasi dari spons *Dyscodermia calyx* juga terbukti memiliki aktivitas antiproliferasi (4) Agosterol A yang berasal dari spons *Spongia* sp terbukti efektif terhadap sel kanker yang resisten terhadap vinkristin, colchisine, dan doxorubisin (5,6), serta banyak lagi senyawa lainnya.

Uji aktivitas antikanker didasarkan atas adanya efek toksik pada sel (sitotoksik). Metode yang sering digunakan untuk aktivitas antikanker yaitu uji sitotoksitas (7) Studi penghambatan pada perkembangan sel telur bulubabi merupakan model yang cocok untuk mendeteksi aktivitas

sitotoksik, teratogenik, dan antineoplastik dari senyawa baru. Sel telur bulubabi juga digunakan secara luas sebagai model untuk mengevaluasi perkembangan toksikologi (8). Penghambatan pembelahan sel merupakan suatu ukuran aktivitas antimitosotik dari senyawa kimia. Senyawa kimia yang bersifat antimitosotik seperti vinblastine dan podophyllotoxin telah ditunjukkan penghambatannya terhadap pembelahan sel telur bulubabi setelah fertilisasi. Metode bioassay ini merupakan metode yang mudah untuk mendeteksi aktivitas senyawa kimia (9).

Berdasarkan studi yang dilakukan Alam, dkk (10), ekstrak kloroform spons *Siphonocalina* sp memiliki LC₅₀ = 245,9 µg/ml terhadap larva *Artemia salina* Leach. Hasil uji dikatakan toksik dengan metode BST apabila senyawa yang diujikan memiliki LC₅₀ < 1000 µg/ml (11). Aktivitas ketoksikan terhadap larva *A. salina* diduga berhubungan dengan kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pembelahan sel telur bulubabi (*Tripneustus gratilla* Linn). Oleh karena itu, pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimitososis dari hasil fraksinasi ekstrak kloroform spons *Siphonocalina* sp. terhadap sel zigot *Tripneustus gratilla* Linn dan mengetahui golongan komponen kimia yang berperan dalam aktivitas antimitososis tersebut.

Masuk 01-02-2017
Revisi 19-09-2017
Diterima 10-09-2017

DOI
<http://dx.doi.org/10.20956/mff.v21i3.6855>

Korespondensi
Rina Agustina
rina_agustina84@yahoo.co.id

Fakultas Farmasi,
Universitas Hasanuddin,
Jalan Perintis
Kemerdekaan Km.10,
Makassar 90245,
Indonesia
Telp. +62-411-588-556
Fax. +62-411-585-188

Copyright
© 2017 Majalah Farmasi
Farmakologi Fakultas
Farmasi · Makassar

Diterbitkan tanggal
29-12-2017

Dapat Diakses Daring
Pada:
<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah aerator, chamber, corong pisah, kromatografi kolom cair vakum, lampu UV 254 nm dan 366 nm, mikropipet (Socorex), mikroskop kamera (Nikon), oven listrik (Memmert), spoit 3 ml, tabung mikro (eppendorf).

Sampel spons *Siphonocalina* sp diperoleh dari koleksi sampel Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Bahan lain yang digunakan antara lain; air laut bebas protozoa, air suling, etil asetat, etanol, n-heksan, KCl 10 %, kloroform, lempeng silika gel GF 254 (E.Merck), metanol, Na CMC 1 %, pereaksi Dragendorf, FeCl_3 5 %, H_2SO_4 10 %.

Ekstraksi dan Partisi

Ekstraksi dilakukan dengan tehnik maserasi menggunakan cairan penyari methanol selama 1 x 24 jam dan penyarian dilakukan pengulangan sebanyak dua kali. Filtrat disaring dan diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak methanol kental (7). Ekstrak methanol yang diperoleh selanjutnya dipartisi dengan kloroform- air menggunakan corong pisah. Ekstrak kloroform dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kloroform (11).

Fraksinasi Ekstrak Kloroform

Ekstrak kloroform spons *Siphonocalina* sp. difraksinasi lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom cair vakum dengan fase diam silika gel dan fase gerak Heksan; Heksan : Etil asetat (20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1), Etil asetat : Heksan (5:1), Etil asetat, Etil asetat : metanol (1:1), metanol. Fase gerak tersebut ditentukan berdasarkan profil KLT ekstrak kloroform spons *Siphonocalina* sp. Fraksi-fraksi yang diperoleh diuapkan kemudian di KLT. Fraksi yang memiliki kesamaan profil KLT digabung. Fraksi gabungan digunakan sebagai sampel uji aktivitas. Fraksi aktif yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan etil asetat sehingga diperoleh subfraksi yaitu subfraksi larut dan tidak larut etil asetat. Kedua subfraksi ini diuji kembali aktivitasnya (12).

Uji Aktivitas dengan Metode Uji Antimitotik Sel Telur Bulubabi

Penyiapan Sel Telur dan Sperma Bulubabi

Bulubabi jantan dan betina diinduksi dengan dengan menyuntikkan 1 ml KCl 10 % ke dalam bagian gonad. Sperma yang berwarna putih susu dan sel telur yang berwarna kuning keemasan ditampung pada gelas kimia yang berbeda. Fertilisasi dilakukan dengan cara 1 ml sperma dan 4 ml sel telur difertilkan dalam gelas kimia yang berisi 50 ml air laut bebas protozoa (13).

Penyiapan Sampel Uji

Fraksi gabungan dari hasil kolom kromatografi cair vakum ekstrak kloroform spons *Siphonocalina* sp ditimbang sebanyak 10 mg kemudian disuspensikan dengan Na CMC sebanyak 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebagai stok. Dari stok tersebut dipipet ke dalam tabung mikro dengan menggunakan mikropipet untuk mendapatkan konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Subfraksi larut dan tidak larut etil asetat masing-masing ditimbang 10 mg kemudian disuspensikan dengan 10 ml Na CMC untuk subfraksi larut etil asetat sedangkan subfraksi tidak larut etil asetat dilarutkan dengan 10 ml air suling sehingga diperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dari larutan stok ini dipipet menggunakan mikropipet ke dalam tabung mikro untuk mendapatkan konsentrasi 1,10, dan 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kontrol negatif dibuat dua jenis yaitu kontrol air laut dan kontrol dengan menggunakan Na CMC konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Kontrol positif menggunakan vinkristin dengan konsentrasi 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dan 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pelaksanaan Uji

Tabung mikro yang berisi sampel ditambahkan air laut sesuai perhitungan untuk mencukupkan volume akhir 1 ml. Kemudian dalam tabung tersebut ditambahkan zigot sebanyak 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ setelah 10 menit terjadinya fertilisasi. Dilakukan pengulangan 3 kali untuk tiap sampel uji dan kontrol. Selanjutnya disimpan pada suhu 15-20 o C dengan diselingi pengocokan. Pengamatan sel yang membelah dilakukan setelah 2 jam inkubasi (13).

Pelaksanaan Uji

Subfraksi I ditotolkan pada lempeng KLT kemudian dielusi dengan EtoAc : MeOH : NH_4OH (100 : 20 : 3 tetes), kemudian kromatogramnya disemprot dengan menggunakan penampak noda sebagai berikut :

1. Pereaksi H_2SO_4 10 % : Kromatogram dipanaskan pada 105 °C selama 10 menit dan diamati ; kebanyakan senyawa organik memberikan warna kuning, coklat, atau hitam.
2. Pereaksi Dragendorf : Akan dihasilkan warna jingga dengan latar belakang kuning untuk senyawa golongan alkaloida.
3. Pereaksi FeCl_3 5 % : akan dihasilkan warna hijau atau biru untuk senyawa golongan fenol.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan diolah dengan menggunakan analisis probit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemisahan ekstrak kloroform spons *Siphonocalina* sp dengan metode KCV menghasilkan 12 fraksi yang selanjutnya digabung menjadi tiga fraksi berdasarkan kesamaan noda pada KLT. Ketiga fraksi tersebut diuji aktivitas antimitosis dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan menunjukkan aktivitas penghambatan pembelahan sel zigot bulu babi yang sangat besar. (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil pengukuran pH sediaan

Fraksi	Persen Penghambatan (%)
Fraksi I	84,0
Fraksi II	91,6
Fraksi III	100,0

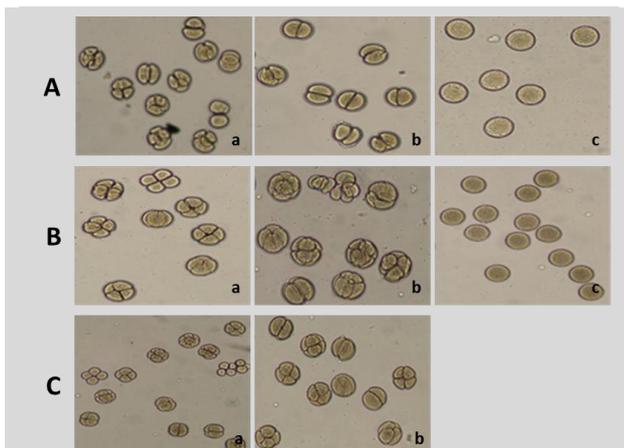
Fraksi yang memiliki penghambatan terbesar yaitu fraksi III dengan persen penghambatan sebesar 100 %. Fraksi III tersebut selanjutnya dilarutkan dengan pelarut etil asetat sehingga diperoleh subfraksi tidak larut etil asetat (subfraksi I) dan subfraksi larut etil asetat (subfraksi II). Subfraksi I dan II selanjutnya diuji kembali dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hasil yang diperoleh (Tabel 2) menunjukkan subfraksi I memiliki penghambatan pembelahan sel yang sangat besar yaitu nilai IC_{50} sebesar 15,14 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Penghambatan pembelahan sel dapat dilihat pada Gambar 1. Jika dibandingkan dengan senyawa vinkristin murni yang memiliki $\text{IC}_{50} = 0,183$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ maka subfraksi I dari spons *Siphonocalina* sp memiliki potensi yang sangat besar untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat antikanker.

Identifikasi dengan KLT terhadap subfraksi I spons *Siphonocalina* sp menunjukkan ada 2 noda pada sinar UV 254 nm dan juga 2 noda pada sinar UV 366 nm. Dengan menggunakan reagen semprot H_2SO_4 10 % juga menunjukkan 2 noda berwarna hitam. Sedangkan dengan reagen semprot Dragendorf menunjukkan 3 noda (R_f 0,215 ; 0,261 ; dan 0,369) yang berwarna jingga dengan latar kuning

(hasil yang positif terhadap adanya senyawa nitrogen yang diduga sebagai senyawa golongan alkaloid). Dengan harga Rf yang berbeda tersebut menunjukkan bahwa dalam subfraksi tersebut terdapat sedikitnya 3 senyawa pada *Siphonochalina* sp. Penampak noda dengan FeCl_3 memberikan hasil yang negatif terhadap senyawa fenol (**Gambar 2**)

Tabel 2. Penghambatan Pembelahan Sel oleh Subfraksi Isolat III

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Persen penghambatan (%)	IC ₅₀
NaCMC	-	0	0
Kontrol air laut	-	0	0
	0.01	2.6 \pm 0.29	
Vinkristin	0.1	7.4 \pm 0.35	0.183
	1	97.1 \pm 5.02	
	1	1.47 \pm 0.24	
	1	1.47 \pm 0.24	
Subfraksi I	10	10.79 \pm 1.07	15.14
	100	98 \pm 1.7	
	1	0	
Subfraksi II	10	0	0
	100	2.49 \pm 0.25	

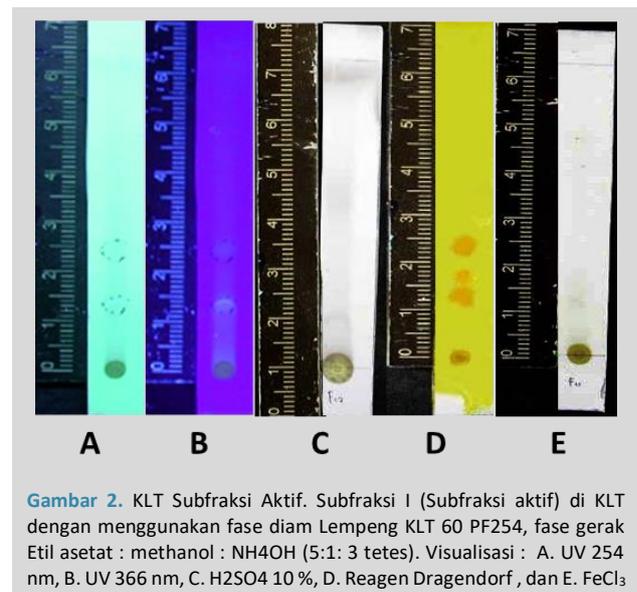


Gambar 1. Pembelahan Sel zigot Bulu Babi Setelah 2 jam perlakuan. A Pembelahan sel zigot setelah pemberian subfraksi I spons *Siphonochalina* sp. a, b, dan c (Konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, dan). B. Pembelahan sel zigot setelah pemberian Vinkristin. a, b, dan c (Konsentrasi 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 0.1 $\mu\text{g/ml}$, dan 1 $\mu\text{g/ml}$), C. Kontrol negative. a. Kontrol air laut, b. NaCMC

Studi menunjukkan bahwa senyawa fitokimia menyebabkan gangguan mikrotubulus dan siklus sel. Alkaloid mengikat protein yang disebut tubulin selama pembelahan sel dan menghambat pembentukan tubulin (14). Steroid memblokir fase G₂ / M dari siklus sel, menginduksi apoptosis, dan perubahan distribusi Ca^{2+} yang memicu pemecahan sitoplasma dalam sel somatik (15). Terpenoid memblokir mitosis dengan menstabilkan polimer tubulin yang selanjutnya menghambat pembongkaran mikrotubulus (16). Glikosida mengganggu pembentukan benang spindle yang menyebabkan kelainan selama tahap anafase (17). Aaptamines adalah salah satu senyawa golongan alkaloid yang memiliki aktivitas antikanker yang sangat baik, senyawa ini di isolasi dari spons *Aaptos* sp. (3)

Pada hewan bulu babi, mikrotubulus berperan penting dalam tahap embriogenesis. Mikrotubulus ini sangat penting dalam pemeliharaan bentuk, motilitas sel, transportasi intraseluler dan pembelahan sel (18). Mikrotubulus ini terbentuk dari subunit tubulin heterodimerik yang akan membentuk

mikrotubulus multi-subunit ketika mengalami polimerisasi (19). Struktur ini yang mungkin dapat dipengaruhi oleh aktivitas antimitotik hasil fraksinasi ekstrak kloroform *Siphonochalina* sp.



Gambar 2. KLT Subfraksi Aktif. Subfraksi I (Subfraksi aktif) di KLT dengan menggunakan fase diam Lempek KLT 60 PF254, fase gerak Etil asetat : methanol : NH_4OH (5:1: 3 tetes). Visualisasi : A. UV 254 nm, B. UV 366 nm, C. H_2SO_4 10%, D. Reagen Dragendorff, dan E. FeCl_3

KESIMPULAN

Subfraksi I (tidak larut etil asetat) ekstrak kloroform spons *Siphonochalina* sp menunjukkan tingkat penghambatan pembelahan sel yang tinggi terhadap uji antimitosis sel zigot bulu babi (*T. gratilla*) yaitu dengan IC₅₀ = 15,14 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan analisis KLT, senyawa kimia yang memiliki aktivitas antimitosis yang terdapat pada subfraksi I tersebut diduga golongan alkaloida

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. (2015). *Cancer Facts & Figures 2015*. American Cancer Society.
- Penyusun, T. (2014). *Profil Kesehatan Indonesia 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Dyshlovoy, S.A.; Fedorov, S.N.; Shubina, L.K.; Kuzmich, A.S.; Bokemeyer, C.; Keller-von Amsberg, G.; Honecker, F. Aaptamines from the marine sponge *Aaptos* sp. Display anticancer activities in human cancer cell lines and modulate ap-1-, NF- κ B-, and p53-dependent transcriptional activity in mouse j6 cl41 cells. *Biomed. Res. Int.* 2014, 2014, 469309
- Edelson, J.R.; Brautigam, D.L. The discodermia calyx toxin calyculin a enhances cyclin d1 phosphorylation and degradation, and arrests cell cycle progression in human breast cancer cells. *Toxins* 2011, 3, 105–119.
- Aoki, S.; Chen, Z.S.; Higasiyama, K.; Setiawan, A.; Akiyama, S.; Kobayashi, M. Reversing effect of agosterol a, a spongean sterol acetate, on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Jpn. J.CancerRes.* 2001, 92, 886–895.
- Chen, Z.S.; Aoki, S.; Komatsu, M.; Ueda, K.; Sumizawa, T.; Furukawa, T.; Okumura, H.; Ren, X.Q.; Belinsky, M.G.; Lee, K.; et al. Reversal of drug resistance mediated by multidrug resistance protein (mrp) 1 by dual effects of agosterol a on mrp1 function. *Int. J. Cancer* 2001, 93, 107–113
- Mae, S.H.W.; Mubarika, S.; Ibnu Ganjar, G.; Wahyuno, S. 2003. Pencarian Senyawa Antikanker Dari Bahan Alam. *Majalah Obat Tradisional*. Vol.8.No.26: 1-3
- Malpezzi ELA, Davino SC, Costa LV, Freitas JC, Giesbrecht AM & Roque NF. 1994. Antimitotik action of extracts of *Petiveria alliacea* on sea urchin egg development. *Brazilian Journal of Medica and Biological Research*. Vol 27. 749.
- Thomson, W.J., Rahman, A., Ginoudhary, M. I. 2001. *Bioassay Techniques For Drug Development*. Harword academic Publisher. Australia. 39-41
- Alam, G., Syukur, R., Tahir, A., Sanusi, M., Khirlan. 2004. Skrining, Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Aktif Antimikroba & Antikanker Beberapa Spons dari Perairan Laut Makassar. Laporan Riset Sains Dasar MIPA. Lembaga Penelitian UNHAS. 15
- Alam, G., Syukur, R., Tahir, A., Sanusi, M., Khirlan. 2004. Skrining, Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Aktif Antimikroba & Antikanker Beberapa Spons dari Perairan Laut Makassar. Laporan Riset Sains Dasar MIPA. Lembaga Penelitian UNHAS. 15
- Costa-Latuf, L.V., Ferreira, M.A.D., Lemos, T.L.G., Pessoa, O.D.L., Viana, G.S.B & Cunha, G.M.A. 2002. Toxicity to sea urchin eggs development of the quinone fraction from *Auxemma oncocalyx*. *Braz J. Med. Biol. Res.* 35(8). 1

13. Militão G., Pinheiro S., Dantas I., Pessoa C., Moraes M., Costa-Lotufo L., Lima M. and Silveira E. (2007). Bioassayguided fractionation of pterocarpanes from roots of *Harpalycebrasiliana* Benth. Science Direct 6687-6691 Moudi M., Go R., Yong SeokYien C., Nazre M. (2013). Vinca Alkaloids. International Journal of Preventive Medicine, 4(11), US National Library of Medicine.
14. Hoffmannová L., Oklešťková J., Steigerová J., Kohouta L., Kolář b Z and Strnada M. (2012). Anticancer Activities of Brassinosteroids. Practical Applications in Agriculture and Human Health, 84-93
15. Nagle A., Hur W. and Gray N.S. (2006). Antimitotic agents of Natural Origin. Curr. Drug Targets, 7 (3), 305-326
16. Tarkowska J. (2009). Antimitotic action of glycosides of *Nerium oleander* L. Wiley Online Library.
17. Bray D. (2001). Cell movements: from molecules to motility. 2nd edition. Garland publishing. New York.
18. Sconzo G., Romancino D., Fasulo G., Cascino D. and Giudice G. (1995). Effect of doxorubicin and phenytoin on sea urchin development. Pharmazie.

Sitasi artikel ini: Agustina R, Alam G, Lethe C. Aktivitas Antimitosis Hasil Fraksinasi Ekstrak Kloroform Spons *Hispidoconulosa sp* Terhadap Sel Zigot Bulu Babi *Tripneustus gratilla* Linn. MFF 2017 April;21(3):59-62.