

A study on the cytotoxic activity of marine sponges on the embryo development of sea urchin *Diadema savigny*

Studi aktivitas sitotoksik dari beberapa jenis spons laut terhadap perkembangan embrio Bulubabi *Diadema savigny*

Esther D. Angkouw^{1*} and Remy E. P. Mangindaan²

¹ Program Studi Ilmu Perairan, Program Pascasarjana, Universitas Sam Ratulangi, Jl. Kampus Unsrat Kleak, Manado 95115, Sulawesi Utara, Indonesia.

² Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

* E-mail: estherangkouw@yahoo.co.id

Abstract: A study on the cytotoxic activity of five sponges has been conducted. The samples were collected from Malalayang beach, extracted with ethanol to give ethanolic extract. The ethanolic extract then partitioned with hexane, ethyl acetate, butanol to yield three fractions. Crude extracts, hexane and chloroform fractions were subjected to cytotoxic assay using fertilized Sea urchin eggs. The results showed that sponge *Theonella* sp. contained a potential cytotoxic compound(s). After partitioned lay open that dissolve fraction ethyl acetate showed activity of highest cytotoxic. The study gives a high probability in discovering many novel cytotoxic compounds from the sea©

Keywords: cytotoxic activity; sponges; sea urchin eggs; partitioned.

Abstrak: Suatu penelitian tentang pengujian aktivitas sitotoksik dari lima jenis spons (*Petrosia nigricans*, *Plakinolophia mirabilis*, *Axinella corrugata*, *Ianthella basta*, *Theonella* sp.) telah dilakukan. Spons yang diambil dari perairan Malalayang diekstrak dengan etanol. Ekstrak etanolik dipartisi dengan pelarut heksan, etil asetat dan butanol. Ekstrak etanolik dan fraksi-fraksi diujikan pada sel telur bulu babi *Diadema savigny* yang telah dibuahi. Pengamatan dilakukan selama 48 jam. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kontrol mencapai tahap pluteus sedangkan pengujian ekstrak etanolik dari kelima jenis spons diperoleh hasil *Theonella* sp. mempunyai aktivitas tertinggi. Sampel spons *Theonella* sp. mampu menghambat/memperlambat pembelahan sel bulu babi sampai pengamatan 48 jam hanya sampai pada pembelahan 4. Dari pengujian ketiga fraksi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas sitotoksik yang tinggi dibanding fraksi heksan dan fraksi butanol. Hasil penelitian ini membuka peluang besar penemuan berbagai senyawa aktif sitotoksik dari organisme laut khususnya spons yang berasal dari perairan Sulawesi Utara©

Kata-kata kunci: aktivitas sitotoksik; spons; sel telur bulu babi; partisi; ekstraksi.

PENDAHULUAN

Organisme laut merupakan sumber bahan alam yang sangat kaya dengan aktivitas biologi yang unik. Dari sekian banyak organisme yang ada di laut, spons salah satu yang mempunyai potensi dalam bidang kesehatan. Spons merupakan invertebrata laut yang paling banyak diteliti dalam pencarian produk alami laut sebagai bahan obat dengan target utama sebagai antikanker (McKay, 1999). Hal ini disebabkan karena spons kaya akan senyawa bioaktif (Faulkner *et al.*, 1994).

Spons telah menghasilkan beragam substansi bioaktif salah satunya ialah sitotoksik.

Sitotoksik adalah substansi bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan dan pembelahan

sel. Senyawa-senyawa yang bersifat sitotoksik adalah senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh sel.

Beberapa senyawa dari invertebrata laut sampai saat ini sudah memasuki uji klinis sebagai obat antikanker (Higa *et al.*, 2001). Discodermolida yang diisolasi dari spons *Discodermia dissolute* memiliki aktivitas sitotoksik dan antimetabolik serta secara *in vivo* menunjukkan aktivitas sebagai senyawa immunosupresif. Discodermolida juga dapat digunakan sebagai penuntun (lead compound) dalam program pencarian obat secara kimia (Faulkner, 2000; Proksch *et al.*, 2003). Halikondrin B yang diisolasi dari spons *Halicondria okadai* memiliki aktivitas yang sangat baik dalam melawan sel tumor P-388 leukimia, B-16 melanoma

dan L-120 leukimia secara *in vivo* (Faulkner, 2000). *Petrosia* sp. yang berasal dari perairan Korea mengandung senyawa bioaktif poliasetilen yang termasuk dalam golongan alkohol. Senyawa ini memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap sel tumor leukemia pada manusia (K-562) (Seo *et al.*, 1999), dapat menghambat replikasi DNA secara *in vitro* (Kim *et al.*, 2002) dan dapat menginduksi apoptosis pada sel melanoma kulit manusia (Choi *et al.*, 2004). *Leucetta chagosensis* yang berasal dari perairan Sulawesi Utara mengandung senyawa Naamides H dan I yang memberikan pengaruh sitotoksik pada sel kanker HeLa (Tsukamoto *et al.*, 2007).

Kanker merupakan salah satu penyakit yang berbahaya dan penyakit penyebab kematian utama di dunia (Astuti, *et al.*, 2005). Usaha pencegahan dan pengobatan kanker ditujukan untuk merusak secara selektif sel kanker yang berbahaya tanpa merusak sel normal. Namun ternyata masih sedikit obat antikanker yang dapat bekerja secara selektif pada sel kanker tanpa merusak sel normal sehingga hal ini menyebabkan efek samping yang merugikan (Siswandono dan Soekardjo, 2000). 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 di antaranya dari organisme laut.

Penelitian tentang substansi bioaktif sitotoksik dari spons belum begitu banyak dibandingkan dengan jumlah spesies spons yang diketahui di dunia terdapat 5000 spesies dan diantaranya 850 spesies ada di Indonesia. Berdasarkan fakta tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk memberi informasi tentang jenis-jenis spons dari perairan laut Sulawesi Utara yang mengandung substansi bioaktif sitotoksik.

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan jenis spons yang menunjukkan aktivitas sitotoksik terkuat dan juga untuk mendapatkan fraksi terunggul dengan aktivitas sitotoksik. Uji aktivitas sitotoksik ini dilakukan terhadap perkembangan awal embrio bulu babi. Bulu babi telah lama digunakan dalam penelitian tentang fertilisasi dan perkembangan awal embrio serta pengujian sitotoksik. Embrio bulu babi digunakan karena fertilisasi buatan mudah dilakukan pada sel sperma dan sel telur, membran fertilisasinya mudah terlihat dan embrio bulu babi transparan sehingga mudah dalam pengamatan dibawah mikroskop. Selain itu bulu babi juga mudah diamati dari perkembangan awal embrio sampai terbentuknya organisme baru.

Ukuran gamet bulu babi yang sama dengan ukuran gamet manusia serta perkembangan tahap gastrulanya sama. Gamet manusia dan gamet bulu babi keduanya berbentuk deuteroatom

Umumnya bulu babi adalah hewan uniseksual. Fertilisasi bulu babi terjadi secara eksternal, telur dan spermanya dilepaskan langsung ke dalam air. Gamet-gamet bulu babi merupakan sel reproduktif haploid yang setelah bersatu dengan gamet lain akan memulai perkembangan menjadi individu baru. Sulit untuk membedakan bulu babi jantan dan bulu babi betina bila hanya berdasarkan pada bentuk pengamatan morfologinya. Dan sampai saat ini belum ada indikasi akurat yang membedakannya kedua jenis kelamin ini (Barnes, 1987; Shokita, 1991). Gamet jantan dan betina dihasilkan dalam gonad bulu babi. Bentuk gonad jantan dan betina sama dan dikelilingi oleh suatu bidang otot yang membantu proses evakuasi produk alat reproduksi selama terjadi pemijahan.

MATERIAL DAN METODE

Pengambilan sampel

Sampel spons dan bulu babi diperoleh dari perairan Malalayang Kotamadya Manado, Sulawesi Utara. Pengambilan sampel spons dilakukan dengan bantuan alat selam pada kedalaman 3-7 m.

Ekstraksi dan partisi

Spons dipotong seukuran dadu lalu dimaserasi dengan 1 L etanol selama 24 jam. Campuran spons dan etanol disaring sehingga diperoleh filtrat dan debris. Debris dimaserasi kembali dengan etanol sebanyak 1 L selama 24 jam lalu disaring sehingga didapatkan debris dan filtrat kedua. Debris kedua dimaserasi kembali dengan etanol sebanyak 1 L selama 24 jam kemudian disaring mendapatkan debris dan filtrat ketiga. Ketiga filtrat yang diperoleh digabungkan dan disaring dengan kertas Whatman no.42 sehingga diperoleh filtrat yang jernih. Filtrat dievaporasi menggunakan rotary evaporator sampai volume akhir mencapai kira-kira 20% dari volume awal lalu dikeringkan dengan desikator sehingga diperoleh ekstrak kasar.

Partisi dilakukan untuk menarik komponen-komponen senyawa sesuai dengan kepolarannya. Ekstrak kasar spons dimasukkan ke dalam labu pemisah selanjutnya ditambahkan pelarut heksan dengan perbandingan 1:2 (v/v) kemudian dikocok berulang-ulang hingga tercampur rata setelah itu didiamkan hingga terbentuk lapisan air dan lapisan

heksan. Masing-masing lapisan ditampung dalam wadah yang berbeda, selanjutnya lapisan heksan dievaporasi hingga kering lalu ditimbang, hasil inilah yang dinamakan fraksi heksan. Lapisan air dimasukkan kembali kedalam labu pemisah lalu ditambahkan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:2 (v/v), dikocok berulang kali hingga tercampur rata lalu didiamkan hingga terdapat lapisan air dan lapisan etil asetat, masing-masing lapisan ditampung pada wadah yang berbeda. Selanjutnya lapisan etil asetat diuapkan hingga kering lalu ditimbang sehingga diperoleh fraksi etil asetat. Lapisan air dimasukkan lagi kedalam labu pemisah dan dipartisi dengan pelarut butanol yang prosedurnya sama seperti sebelumnya.

Pengujian aktivitas sitotoksik

Bulu babi terlebih dahulu digunting duri-durinya untuk mengeluarkan bagian lantera aristoteles. Setelah itu bulu babi dibersihkan dengan air laut saring dan diletakkan diatas permukaan beker gelas yang berisi air laut saring dengan posisi bagian mulut berada diatas. Untuk merangsang bulu babi mengeluarkan isi gonad digunakan 1 ml larutan 0,54 M KCl diteteskan pada bagian oral yang telah terbuka. Sel telur dan sel sprema akan keluar dengan sendirinya dan ditampung di gelas piala.

Sel telur yang ditampung dipindahkan ke dalam gelas arloji untuk dibilas. Air laut saring ditambahkan ke dalam gelas arloji. Selanjutnya didiamkan sebentar sehingga sel telur matang mengendap di dasar gelas arloji. Dari tepian gelas arloji, sebanyak mungkin air laut diisap dengan pipet lalu dibuang. Air laut yang baru ditambahkan ke dalam gelas arloji lalu diaduk kembali. Pembilasan dilakukan sebanyak 3 kali. Untuk sel sprema tidak dilakukan pembilasan tetapi diencerkan sepuluh kali dengan air laut saring.

Fertilisasi dilakukan dengan menggabungkan sel telur yang telah dibilas dengan sel sperma ke dalam gelas piala berisi air laut saring. Inkubasi dilakukan selama 30 menit. Sebagian sel telur diamati di bawah binokuler pembesaran 10 kali untuk memeriksa keberhasilan pembuahan yang ditandai dengan terbentuknya membran fertilisasi.

Langkah berikutnya yang dilakukan yaitu beberapa tetes suspensi sel telur dan sel sperma hasil fertilisasi dimasukkan ke dalam petridish yang berisi air laut saring, ekstrak kasar dan fraksi-fraksi yang diujikan dengan 3 kali ulangan. Kemudian didiamkan selama 20 menit selanjutnya dicuci kembali sebanyak 2 kali dan diamati di bawah mikroskop.

Pengamatan dilakukan dengan cara mengambil embrio bulu babi secara acak dengan pipet lalu diteteskan ke atas kaca preparat. Embrio bulu babi diamati tahap perkembangannya dengan binokuler pembesaran 10 kali dan dihitung sebanyak 100 embrio. Tahap-tahap perkembangan awal embrio Bulu babi yang diamati ialah membran fertilisasi, pembelahan 2 sel, pembelahan 4 sel, pembelahan 8 sel, hatching, gastrula, blastula, prisma dan pluteus pada masing-masing perlakuan. Untuk menghindari perkembangan sel selama perhitungan, ditambahkan formalin 1% sebanyak 1 tetes ke dalam mikrocup. Pengamatan tahap pembelahan bulu babi dibandingkan dengan kontrol yaitu air laut saring yang tidak diberi ekstrak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi sampel

Sampel spons yang digunakan berjumlah lima jenis. Sampel diidentifikasi menurut Soest (1989) yaitu *Petrosia nigrans*, *Plakinalopha mirabilis*, *Axinella corrugata*, *Ianthella basta* dan *Theonella sp.*

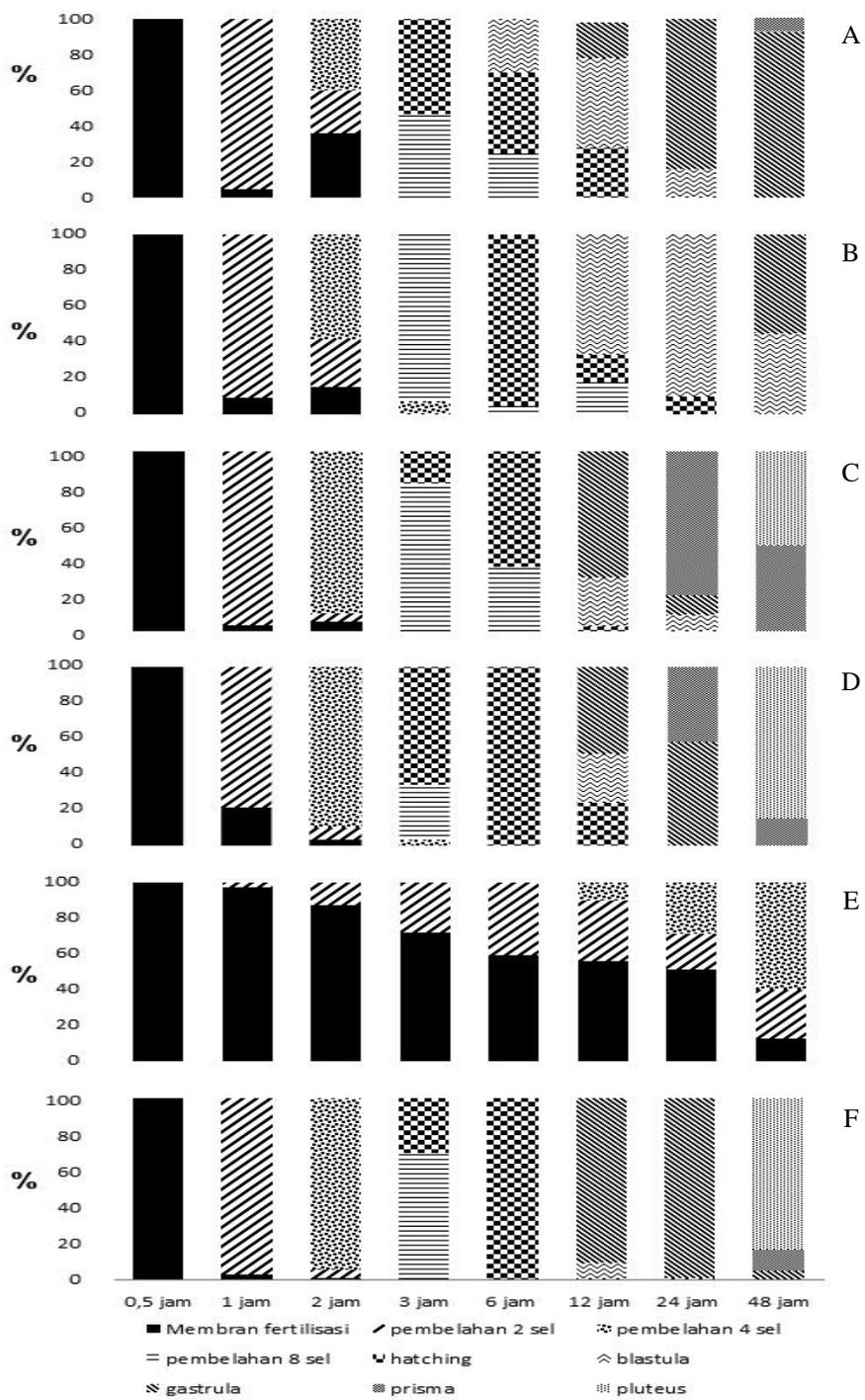
Hasil ekstraksi dan partisi

Hasil ekstraksi kelima jenis spons dengan etanol didapatkan berat kering masing-masing sebagai berikut : *Petrosia nigrans* 18,3 g, *Plakinalopha mirabilis* 11,2 g, *Axinella corrugata* 12,5 g, *Ianthella basta* 14,3 dan *Theonella sp.* 10,1 g. Selanjutnya ekstrak etanolik *Theonella sp.* seberat 10410 mg yang dipartisi dengan tiga jenis pelarut diperoleh fraksi yaitu fraksi etil asetat dengan berat 2200 mg, fraksi heksan dengan berat 2700 mg dan fraksi butanol dengan berat 3500 mg.

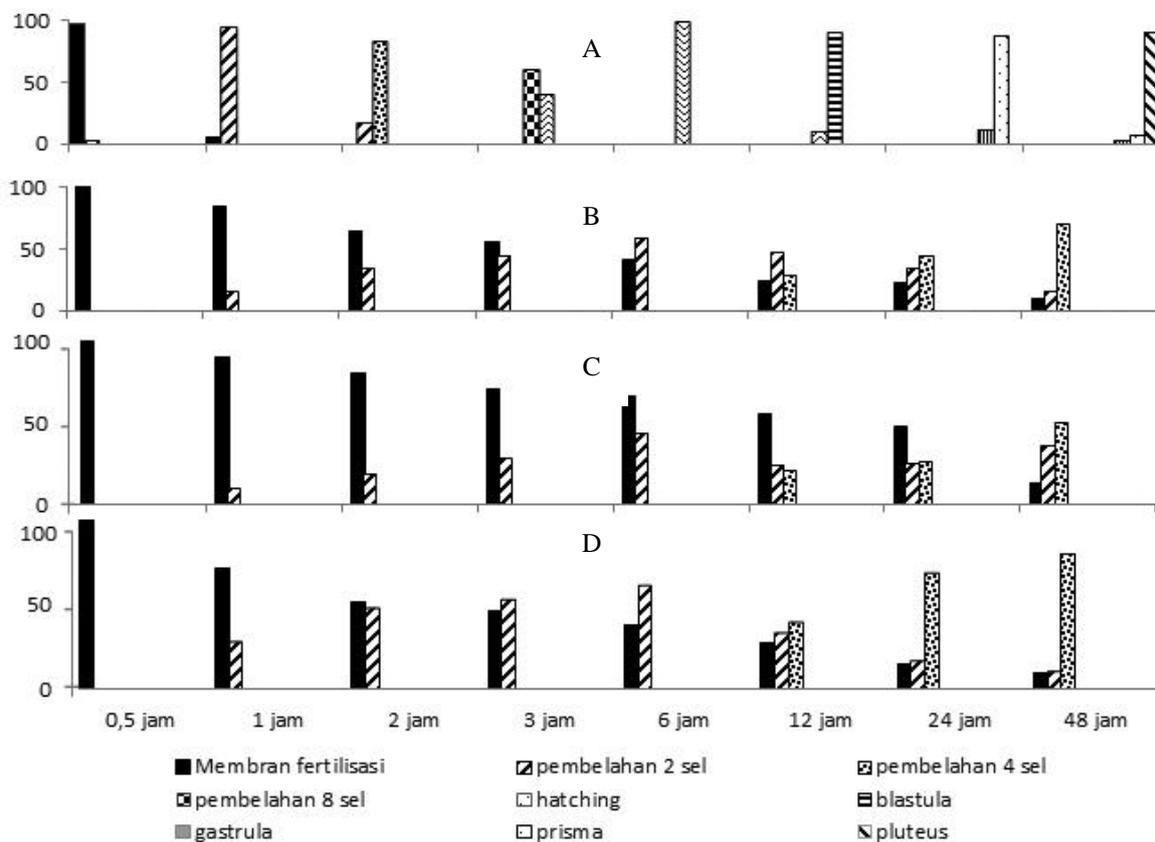
Pengujian aktivitas sitotoksik

Perlakuan dengan ekstrak etanolik menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan memperlambat pembelahan sel. Hal ini teramati dengan adanya tahap membran fertilisasi pada 0,5 jam sampai 48 jam. Pembelahan 2 sel teramati pada 1 jam sampai 48 jam. Pembelahan 4 sel teramati dari 1 jam sampai 48 jam. Sedangkan pada perlakuan dengan kontrol air laut menunjukkan bahwa pada pengamatan 0,5 jam sampai 48 jam pembelahan sel berlangsung normal dari tahap membran fertilisasi hingga tahap pluteus (Gambar 1A).

Dari hasil pengujian menunjukkan bahwa perlakuan dengan ekstrak etanolik spons *Theonella sp.* memiliki aktivitas sitotoksik terkuat disusul



Gambar 1. Persentase Perkembangan Embrio Bulu Babi pada Ekstrak Etanolik Spons

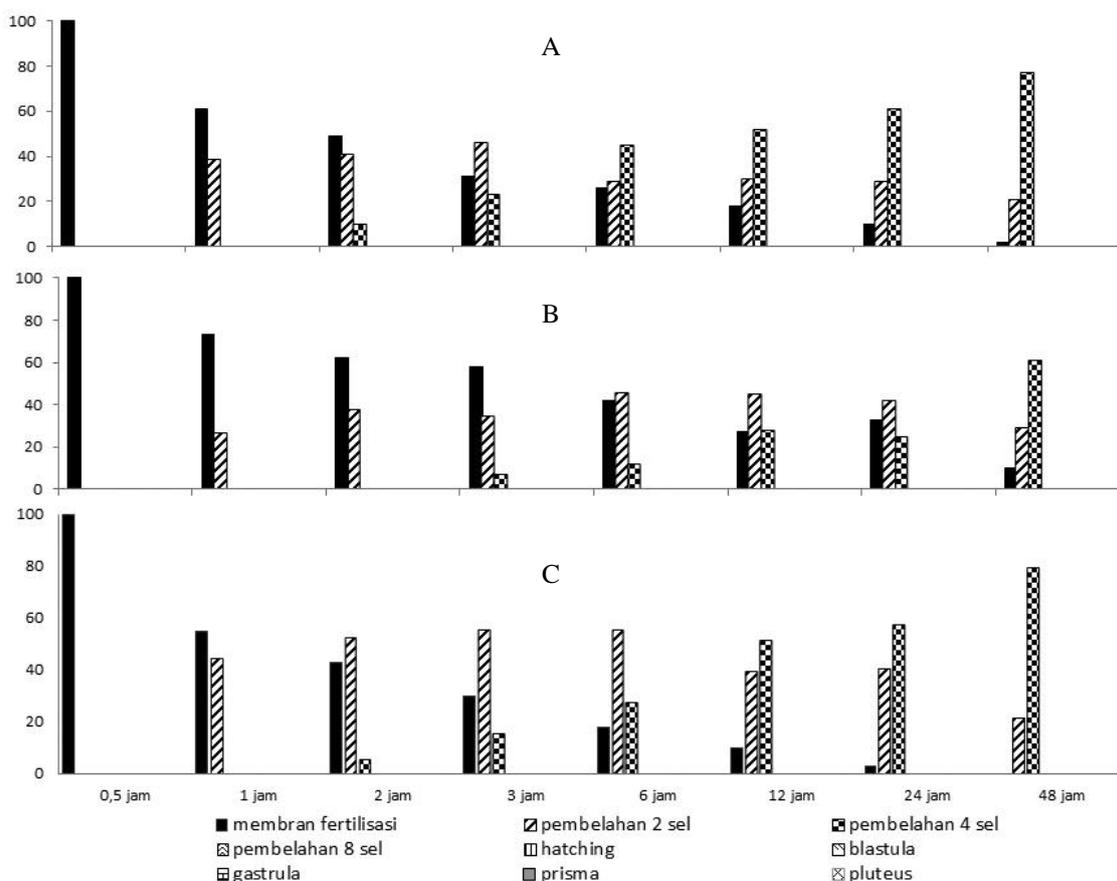


Gambar 2. Persentase perkembangan embrio bulu babi dengan perlakuan fraksi Hasil partisi spons *Theonella* sp. 20 ppm

ekstrak etanolik spons *Ianthella basta* dan *Petrosia nigricans*. Pada ekstrak etanolik *Theonella* sp. nilai persentase yang dihasilkan sampai di pengamatan 48 jam yaitu membran fertilisasi 14%, pembelahan 2 sel 30% dan pembelahan 4 sel 66%. Selanjutnya ekstrak etanolik spons *Ianthella basta* pada pengamatan 48 jam berada dalam tahap blastula 45% dan gastrula 55%. Sedangkan ekstrak etanolik *Petrosia nigricans* telah mencapai tahap gastrula 93% dan blastula 7%. Perlakuan dengan ekstrak etanolik *Plakinalophia mirabilis* dan *Axinella corrugata* perkembangan embrio bulu babi pada pengamatan 48 jam telah mencapai tahap pluteus 52% dan 85% (Gambar 1B-F).

Pengujian aktivitas sitotoksik masing-masing fraksi hasil partisi dilakukan pada tahap perkembangan awal sel bulu babi dengan konsentrasi 20 ppm dan 10 ppm (Gambar 2). Hasil pengamatan pada kontrol menunjukkan sel bulu babi dapat berkembang secara normal dari tahap membran fertilisasi sampai tahap pluteus. Sampai pada pengamatan 48 jam sel bulu babi telah mencapai tahap gastrula 3%, prisma 7% dan pluteus 90%. Berbeda halnya dengan sel bulu babi yang

diberi perlakuan fraksi heksan, etil asetat dan butanol justru mengalami gangguan dalam perkembangan sel. Hal ini terindikasi dari adanya perlambatan pembelahan sel bulu babi. Pada perlakuan dengan fraksi etil asetat 10 ppm sampai di pengamatan 48 jam masih ditahap membran fertilisasi 10%, pembelahan 2 sel 29% dan pembelahan 4 sel 61%. Hal serupa ditunjukkan pula oleh fraksi heksan dan fraksi butanol 10 ppm (Gambar 3). Pada pengamatan 48 jam fraksi heksan mencapai tahap pembelahan 4 sel 77%, pembelahan 2 sel 21% dan membran fertilisasi 2%. Untuk perlakuan dengan fraksi butanol tahapan pembelahan sel bulu babi mencapai 79% pembelahan 4 dan 21% pembelahan 2 sel. Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas sitotoksik terkuat terhadap perkembangan embrio bulu babi *Diadema savigny*. Hal ini disebabkan karena etil asetat merupakan senyawa yang bersifat semi polar yang dapat menarik senyawa polar maupun non polar. Hal ini menyebabkan senyawa yang larut dalam etil asetat lebih banyak sehingga menunjukkan aktivitas yang tinggi dibandingkan dengan pelarut heksan dan



Gambar 3. Persentase perkembangan embrio bulu babi dengan perlakuan fraksi hasil partisi spons *Theonella sp.* 10 ppm

butanol. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Kapojos (2005) yang menyatakan fraksi etil asetat spons *Theonella sp.* dari selat Lembah mampu menghambat perkembangan embrio bulu babi sampai dengan konsentrasi 5 ppm.

KESIMPULAN

Berdasarkan pengujian akvitas sitotoksik Ekstrak spons *Theonella sp.* memiliki aktivitas sitotoksik terkuat dengan memberikan pengaruh perlambatan pembelahan sel. Fraksi etil asetat merupakan fraksi yang terunggul aktivitas sitotoksiknya disusul fraksi heksan dan fraksi butanol.

Ucapan terima kasih. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Ir. Fitje Losung, M.Si yang banyak membantu penulis dalam penelitian ini. Orang tua, suami dan anak-anak tersayang serta seluruh sahabat yang selalu

memberikan motivasi, dukungan baik material dan spiritual selama ini.

REFERENSI

- BARNES, R.D. (1987) *Invertebrate Zoologi*. London: W.B. Saunders Company Philadelphia.
- CHOI, H.J., BAE, S.J., KIM, N.D., JUNG, J.H. and CHOI, Y.H. (2004) Induction of apoptosis by dideoxypetrosynol A, a polycetylene from the spons *Petrosia sp.* in human skin melanoma cells. *Int. J. Mol. Med.*, 14(6), pp. 1091-1096.
- FAULKNER, D.J. (2000) Marine Natural Products Report. *Natural Product Reports*, 17, pp. 7-55.
- HIGA T., TANAKA, J., OHTANI, I.I., MUSMAN, M., ROY, M.C. and KURODA, I. (2001) Bioactive from coral reef invertebrates. *Pure Appl. Chem.*, 73 (3), 589-593
- KAPOJOS, M.M. (2004) Screening of Anti-microbial and Cytotoxic Substances of

- Sponges from Lembah Straits. Unpublished thesis (MSc). Manado: Universitas Sam Ratulangi.
- KIM, D.K., LEE, H.S., LEE, D.S., LEE, J.R., LEE, B.J. and JUNG, J.H. (2002) Polyacetylenes from a marine spongs *Petrosia* sp. inhibit DNA replication at the level of initiation. *Cancer Lett.*, 185(2), pp. 95-101.
- MCKAY, J. (1999) Marine Spons: Small Animals with Really Neat Compounds. The evergreen state college olyampie. Washington. <http://www.ucmp.berkeley.edu/porifera.html>.
- PROKSCH, P. , EDRADA-EBEL, R.A. and EBWL, R. (2003) Drugs from the sea – opportunities and obstacles. *Marine Drugs*, 1, 5-17.
- SEO, Y., K.W., LEE, H.S., RHO, J.R. and SHIN, J. (1999) New acetylenic enol ethers of glycerol from the spongs *Petrosia* sp. *J. Nat. Prod*, 62(1):122-126
- SHOKITA S., KAKAZU, A., TAMORI and TOMA (1991) *Aquaculture in Tropical Areas*. Published by Midori Shobo Co., Ltd., pp. 313-327.
- SISWANDONO DAN SOEKARDJO (2000) *Kimia Medisinal*. Edisi kedua. Surabaya: Airlangga University Press.
- TSUKAMOTO S., KAWABATA T., KATO H., OHTA T., ROTINSULU H., MANGINDAAN R.E.P. and Van Soest, R.W. (2007) Naamidines H and I, Cytotoxix Imidazole Alkoloids from the Indonesian Marine Sponge *Leucetta chagosensis*. *J. Nat. Prod*, 70, 1658-1660.

Diterima: 22 April 2013

Disetujui: 2 Mei 2013