

Sebagai bagian dari usaha peneliti global untuk menemukan obat baru, beragamnya spesies spons Indonesia dapat menjadi sumber eksplorasi senyawa bioaktif untuk mencukupi kebutuhan lokal akan obat, terutama obat. Penelitian ini mencakup isolasi dan uji toksisitas untuk mengetahui potensi farmakologi spons-spons zona intertidal di Indonesia.

2. Tinjauan Teoritis

2.1. Spons Laut *Ancorina* sp.

Spons famili *Ancorinidae* seperti genus *Ancorina* merupakan spons yang hidup di perairan laut dalam. Spons jenis ini banyak ditemukan di Samudra Atlantik pada kedalaman 32-48 meter (Xavier dan Soest, 2007). Menurut Kerr dan Grace (2005) spons *Ancorina* sp. dapat ditemukan pada kedalaman 33-100 meter di bawah permukaan laut dengan kondisi arus yang tenang. Spons *Ancorina* sp. dari perairan laut dalam telah dilakukan isolasi dan menghasilkan senyawa golongan indole yaitu ankorinolat A, B, dan C serta bis-ankorinolat B dan ankorinazol. Senyawa tersebut memiliki aktivitas anti HIV (Meragelman *et al.*, 2002). Golongan asam tetramat glikosida yaitu ankorinosida A juga telah berhasil diisolasi dari spons *Ancorina* sp. yang memiliki aktivitas menghambat blastulasi embrio bintang laut (Ohta *et al.*, 1997). Spons *Ancorina* sp. juga dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria. Ekstrak etil asetat spons *Ancorina* sp. mempunyai nilai penghambatan Plasmodium sebesar 32,2% (Said *et al.*, 2010). Hasil isolasi spons *Ancorina* sp. dari laut Australia mempunyai nilai IC₅₀ penghambatan pertumbuhan Plasmodium Ddz dan 3D7 sebesar 3,5-5,4 µM dengan kategori sedang. Senyawa bioaktif tersebut berupa alkaloid β-karbolin yaitu, (+)-7-bromotripargin (Davis *et al.*, 2009).

Spons *Ancorina* sp. selain ditemukan di perairan laut dalam juga ditemukan tumbuh di zona intertidal (pasang surut) Pantai Wediombo, Gunungkidul dengan kondisi lingkungan berombak besar. Hartono dan Bronto (2007) mengungkapkan bahwa di zona

intertidal Pantai Wediombo banyak ditemukan batuan dengan komposisi andesit yang diduga batuan tersebut merupakan sisa gunung api purba. Kondisi geologi ini memiliki peran penting dalam pembentukan mineral untuk kebutuhan organisme seperti spons *Ancorina* sp. yang hidup di zona intertidal. Ekstrak polar etanol spons *Ancorina* sp. dari zona intertidal Gunungkidul telah dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara dengan IC₅₀ sebesar 50,45 µg/mL (Faizah, 2015) dan berpotensi sebagai antiretrovirus HIV dengan IC₅₀ terhadap sel HT-29 sebesar 82,11 µg/mL (Nirwantono, 2014).

Perbedaan habitat lingkungan hidup antara spons *Ancorina* sp. yang tumbuh di perairan laut dalam dengan di zona intertidal, memungkinkan adanya perbedaan kandungan senyawa metabolit sekunder dari spons *Ancorina* sp. asal zona intertidal Pantai Wediombo.

2.2. Uji Toksisitas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Deteksi awal untuk mengetahui adanya aktivitas farmakologi dari produk alam secara sederhana adalah menggunakan metode BSLT yang diusulkan oleh Meyer *et al.*, (1982). Kelebihan uji bioaktivitas ini adalah mudah, cepat, murah dan akurat yaitu dengan menggunakan larva udang *Artemia salina*. Uji mortalitas larva udang merupakan salah satu metode uji bioaktivitas pada penelitian senyawa bahan alam. Uji ini merupakan *screening* awal untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa (Hamburger dan Hostettmann, 1991).

Senyawa aktif yang memiliki daya bioaktivitas tinggi diketahui berdasarkan nilai *Lethal Concentration* 50% (LC₅₀), yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat menyebabkan kematian hewan uji sampai 50%. Data mortalitas yang diperoleh kemudian diolah dengan analisis probit yang dirumuskan oleh Finney (1971) untuk menentukan nilai LC₅₀ pada derajat kepercayaan 95%.

Suatu senyawa dikategorikan sangat toksik jika memiliki nilai LC_{50} kurang dari 30 ppm, dikategorikan toksik jika memiliki nilai LC_{50} 30-1000 ppm, dan dikategorikan tidak toksik jika memiliki harga LC_{50} di atas 1000 ppm. Tingkat toksisitas tersebut juga dapat menunjukkan potensi aktivitasnya sebagai antikanker dimana semakin kecil nilai LC_{50} maka semakin toksik suatu senyawa dan berpotensi sebagai antikanker (Meyer *et al.*, 1982).

3. Metodologi

3.1. Ekstraksi dan Partisi

Spons seberat 400 gram dipotong kecil-kecil kemudian dilakukan maserasi dengan pelarut metanol:diklorometana 1:1 (v/v) sebanyak masing-masing 200 mL selama 2 x 1 jam. Hasil maserasi yang diperoleh kemudian disaring menggunakan corong dan kapas dan dipisahkan antara ekstrak metanol dan ekstrak diklorometana. Ekstrak diklorometana diuapkan dengan evaporator pada suhu di bawah titik didihnya yaitu ± 35 °C sehingga diperoleh ekstrak kental diklorometana. Ekstrak kental diklorometana dimasukkan ke dalam corong pisah, dilakukan partisi dengan etil asetat:air (1:2), kemudian digojok perlahan, dan dibiarkan sampai diperoleh dua lapisan yaitu lapisan organik (etil asetat) dan lapisan air. Lapisan etil asetat diuapkan dengan evaporator pada suhu 77 °C hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat (ekstrak kasar).

3.2. Pemisahan dan Fraksinasi

Pemisahan dengan analisis KLT dilakukan untuk mendapatkan pelarut yang menghasilkan pemisahan terbaik pada kromatografi kolom. Analisis dengan KLT dilakukan dengan menggunakan berbagai variasi pelarut. Pemisahan ekstrak kasar etil asetat dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 dan dielusi menggunakan pelarut dengan *step gradien polarity* (SGP) dimulai dari pelarut nonpolar hingga polar. Masing-masing sistem pelarut sebanyak 15 mL

dan eluat yang turun dari kolom ditampung tiap 5 mL.

3.3. Uji Toksisitas

Uji pendahuluan untuk mengetahui bioaktivitas suatu produk bahan alam secara sederhana adalah menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang diusulkan oleh Meyer *et al.*, (1982). Telur *Artemia salina* ditetaskan dengan media air laut. Masing-masing fraksi dibuat larutan stok dengan konsentrasi 250 ppm dengan cara sebanyak 2,5 mg fraksi dilarutkan dalam 50 μ L DMSO dan ditambahkan air laut hingga 10 mL. Larutan induk masing-masing fraksi dipipet ke dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL masing-masing sebanyak 75, 125, 300, 600, dan 1200 μ L kemudian masing-masing tabung ditambahkan dengan 10 ekor larva *Artemia salina* berumur 48 jam yang dipipet dari wadah penetasan, selanjutnya diencerkan dengan air laut hingga tanda batas 1,5 mL sehingga diperoleh variasi konsentrasi sebesar 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, dan 200 ppm. Tabung *Eppendorf* berisi sampel uji diamati di bawah lampu penerangan dan jumlah larva *Artemia salina* yang mati dihitung setelah 24 jam. Data persentase kematian pada larva *Artemia salina* yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analisis probit untuk menentukan LC_{50} .

4. Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi pada penelitian ini diperoleh ekstrak kasar etil asetat berwarna ungu kecokelatan sebanyak 0,765 gram dan fraksinasi melalui kromatografi kolom dihasilkan 7 fraksi etil asetat seperti pada Tabel 1.

Semua fraksi yang diperoleh dilakukan uji toksisitas dan hasilnya seperti pada Tabel 2. Berdasarkan hasil uji toksistas diperoleh bahwa fraksi etil asetat spons *Ancorina* sp. termasuk dalam kategori toksik LC_{50} 30-1000 μ g/mL dan sangat toksik $LC_{50} < 30$ μ g/mL (Meyer *et al.*, 1982), sehingga dimungkinkan adanya aktivitas farmakologi dari senyawa-

senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat spons *Ancorina* sp.

Tabel 1. Hasil kromatografi kolom ekstrak kasar etil asetat

Fraksi	Massa (mg)	Eluen	Wujud fisik dan warna
1	71,1	a:b (7:3)	Padat (oranye)
2	86,4	a:b (5:5)	Padat (oranye)
3	69,3	a:b (3:7)	Padat (kuning)
4	88,8	a:b (2:8)	Minyak (kuning)
5	78,7	b 100%	Minyak (coklat)
6	97,5	b:c (9:1)	Minyak (coklat)
7	100,2	b:c (5:5)	Kristal jarum (putih)

Keterangan: a:n-heksan; b: etil asetat; c: metanol

Tabel 2. Hasil uji toksisitas fraksi

Fraksi	Nilai LC ₅₀ (µg/mL)	Kategori toksisitas
1	7,67	Sangat toksik
2	18,18	Sangat toksik
3	74,53	Toksik
4	3,22	Sangat toksik
5	79,02	Toksik
6	2,97	Sangat toksik
7	141,14	Toksik

5. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa fraksi-fraksi hasil isolasi spons *Ancorina* sp. dari zona intertidal Pantai Wediombo memiliki toksisitas yang tinggi.

Daftar Pustaka

1. Faizah, N., 2015, Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanolik Sponge *Ancorina* sp. pada Sel

- Kanker Payudara (t47d cell line), Seminar, Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta.
- Finney, D.J., 1971, *Probit analysis*, 2nd edition. Cambridge University Press.
 - Hartono G. dan Bronto S., 2007, Asal-usul pembentukan Gunung Batur di daerah Wediombo, Gunungkidul, Yogyakarta, *J. Geologi Indonesia*, 2 (3), 143-158.
 - Hamburger, M., Hostettmann, K., 1991, Bioactivity in Plants: The Link between Phytochemistry and Medicine, *Phytochemistry*, 30 (12), 3846-3874.
 - Hooper, J.N.A., and Soest, R.W.M., 2002, *Systema Porivera: A Guide to Clasification of Sponges*, Vol.1, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
 - Jain R., dan Tiwari, A., 2007, Sponges: An Invertebrate of Bioactive Potential. *Curr. Sci.* 9, 444-445.
 - Joseph, B., and Sujatha, S., 2011, Pharmacologically Important Natural products from Marine Sponges, *J Nat Prod*, 4, 05-12.
 - Kerr, V., and Grace, R., 2005, *Intertidal and subtidal habitats of Mimiwhangata Marine Park and adjacent shelf Doc Research & Development Series 201*, Department of Conservation, Wellington, New Zealand.
 - Meragelman, K.M., West, L.M., Northcote, P.T., Pannell, L.K., McKee, T.C., and Boyd, M.R., 2002, Unusual Sulfamate Indoles and a Novel Indolo[3,2-a]carbazole from *Ancorina* sp., *J. Org. Chem*, 67 (19), 6671-6677.
 - Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E, and McLaughlin, J.L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta Medica*, 45(05), 31-34.
 - Nirwantono, R., 2015, Aktivitas Antiretrovirus Ekstrak Etanolik Sponge *Ancorina* sp. terhadap HIV-1. *Skripsi*, Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta.
 - Nontji, A. (2000) Coral Reef of Indonesia: Past, Present, Future. *International Coral Reef Symposium*. Bali, Indonesia.
 - Ohta, S., E. Ohta, and S. Ikegami, 1997, Ancorinoside A: a novel tetramic acidglycoside from the marine sponge, *Ancorina* sp. which specifically inhibits

- blastulation of starfish embryos, *J Biological Science*, 62, 6452-6453.
14. Said, S.A., Moshi M.J., Nondo, R.S.O., Masimba, P.J., Innocent, J., and Guantai, A.N., 2010, Evaluation of the potential of the marine sponges of the Zanzibar Island to yield antimalarial and antimicrobial active compounds, *Tanz. J. Hlth. Res.*, 12 (3).
 15. Xavier, J.R., and Soest, R.W.M., 2007, Demosponge Fauna Of Ormonde And Gettysburg Seamounts (Gorringe Bank, Northeast Atlantic): Diversity And Zoogeographical Affinities, *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 87, 1643–1653