

Skrining Bahan Anti Kanker pada Berbagai Jenis Sponge dan Gorgonian Terhadap L1210 Cell Line

Agus Trianto^{1*}, Ambariyanto¹, dan Retno Murwani^{2,3}

¹ Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan-Universitas Diponegoro, Semarang

² Fakultas Peternakan-Universitas Diponegoro, Semarang

³ Pusat Kajian Makanan dan Obat Tradisional, Lembaga Penelitian, Universitas Diponegoro, Semarang

Abstrak

Sejarah evolusi yang panjang pada biota laut menyebabkan biota laut mempunyai keanekaragaman molekuler yang sangat tinggi. Potensi biota laut tersebut sebagai sumber obat anti kanker menjadi objek penelitian penting dalam tahun-tahun terakhir. Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah sponge dan gorgonian yang dikoleksi dari perairan Jepara pada kedalaman 1-3 m dan di perairan Labuhan Bajo, Flores pada kedalaman 3-38 m. Sampling dilakukan dengan Skin diving dan SCUBA diving. Sampel kemudian diekstrak dengan metanol. Selanjutnya ekstrak diujikan terhadap sel kanker leukemia (L-1210 cell line) dengan konsentrasi 0, 1, 5 dan 10 ppm. Uji dilakukan pada media RPMI lengkap dan penghitungan daya hambat dilakukan dengan metoda direct counting. Ekstrak yang diperoleh dari sponge dan gorgonian berkisar antara 0,55 - 24,7% dari berat kering atau 0,36-7,34% dari berat basahnya. Seluruh ekstrak dari sampel-sampel mampu menghambat pertumbuhan L1210 cell line dan layak untuk pemurnian lanjut. Ekstrak metanol tiga jenis sponge (*Xestospongia* sp2 dan *Phyllospongia* sp1 dan UP8) dan fraksi etil asetat dari ekstrak gorgonian *I. hippuris* mempunyai $IC_{50} < 3$ mg/mL, ekstrak metanol dari delapan jenis sponge (*Agelas nakamurai*, *Ircina ramosa*, A06, *Phyllospongia lamellosa*, *Phyllospongia* sp, UP9, *Calispongia* sp dan *Fascaplynopsis* sp) mempunyai $IC_{50} < 5$ mg/mL, dan ekstrak metanol dari lima jenis sponge (*Hyrtilios erecta*, *Xestospongia* sp, *Cladocroce* sp, *Oceanapia* cf. *Amboiensis* dan *Haliclona* sp.) dan fraksi air dari ekstrak gorgonian *I. Hippuris* mempunyai $IC_{50} < 10$ mg mL Satu sponge *Xestospongia* sp 1 mengandung ekstrak yang mempunyai $IC_{50} > 10$ mg/mL.

Kata kunci : Sponge, Gorgonian, L-1210, sel kanker, IC_{50}

Abstract

The long history of the evolution of marine organisms has made these organisms as a source of high molecular diversity. In search of a new anti cancer drugs, these organisms has become an intense object of research. Sponges and the gorgonian were collected from Jepara and Labuan Bajo-Flores water on a depth of 1-3 m and 3-38 m repectively by Skin and SCUBA diving. The samples were extracted with methanol. The extract were assayed against cancer cell (L-1210 cell line) with tested concentration range of 0, 1, 5 and 10 ppm. The cell line was cultured in complete RPMI media and growth inhibition was measured by direct counting. Methanol extract of sponges and gorgonian yielded approximately 0.55 - 24.7 % dry weight or 0,36 - 7.34 % wet basis. All methanol extract of the samples could inhibit the growth of L1210 cell line and is potential for further purification. Methanol extract from 3 species of sponges (*Xestospongia* sp2 dan *Phyllospongia* sp1 and UP8) and one ethyl acetate fraction of *I. hippuris* had IC_{50} value < 3 mg/mL. Methanol extract of 8 species of sponges (*Agelas nakamurai*, *Ircina ramosa*, A06, *Phyllospongia lamellosa*, *Phyllospongia* sp, UP9, *Calispongia* sp dan *Fascaplynopsis* sp) had $IC_{50} < 5$ mg/mL, methanol extract of 5 species of sponges (*Hyrtilios erecta*, *Xestospongia* sp, *Cladocroce* sp, *Oceanapia* cf. *Amboiensis* and *Haliclona* sp.) and one water extract of *I. hippuris* had $IC_{50} < 10$ mg mL. Methanol extract of one species of sponge (*Xestospongia* sp 1) had $IC_{50} > 10$ mg/mL.

Key words : Sponge, Gorgonian, L-1210, Cancer cell, IC_{50}

Pendahuluan

Potensi biota laut sebagai sumber bahan bioaktif baru banyak diteliti dalam tahun-tahun terakhir, meskipun belum sebanyak penelitian terhadap biota darat. Sejarah evolusi yang panjang pada biota laut menyebabkan biota laut mempunyai keaneka ragaman molekul yang sangat tinggi. Berbagai jenis senyawa dengan bermacam-macam bioaktivitas telah ditemukan dari biota tersebut mulai dari antibakteri, anti jamur anti virus, antiplasmodium dan sebagainya.

Diantara berbagai biota laut, sponge merupakan sumber bahan bioktif yang paling kaya (Belarbi *et al*, 2003). Misalnya, spons mengandung senyawa anti virus (Wipf and Lim, 1995, Cutignano *et al*, 2000, Wellington *et al*, 2000), antibakteri (Cafieri *et al*, 1998 Pettit *et al*, 1997), anti jamur (Sata *et al*, 1999 Clarks *et al*, 1998), dan anti kanker (Septic *et al*, 1997). Disamping itu gorgonian juga telah terbukti mengandung berbagai macam bahan bioaktif seperti anti kanker dan anti peradangan (He *et al*; 1995, Higa *et al*, 1981).

Pencarian obat baru anti kanker juga sangat gencar dilakukan. Hal ini disebabkan kanker masih merupakan penyakit yang mematikan dan belum ada obat yang dapat menyembuhkan hingga seratus persen. Di Amerika pada tahun 2000 hampir 9.6 juta jiwa terdeteksi mengindap kanker (NCI, 2003). Walaupun tingkat keberhasilan dalam terapi kanker semakin meningkat, namun terapi modern yang ada saat ini seperti operasi, kemoterapi, atau radiasi bervariasi tingkat kesuksesannya tergantung pada stadium dan jenis tumor/kanker. Disamping biayanya tinggi, terapi tersebut juga masih mempunyai efek samping yang tinggi. Hal ini menyebabkan banyak penderita kanker menyerah karena tidak tahan terhadap efek samping yang ditimbulkan oleh obat-obatan yang digunakan dalam kemoterapi dewasa ini, disamping mahalnya biaya pengobatan itu sendiri. Tingginya efek samping dari kemoterapi disebabkan obat yang dipergunakan masih belum mempunyai mekanisme yang spesifik terhadap sel kanker saja, tetapi obat tersebut juga menyerang sel-sel normal. Munculnya sel kanker yang bersifat *Multidrug resistance* (MDR) atau tahan terhadap berbagai obat kanker juga memacu peneliti untuk menemukan obat anti kanker baru yang mampu menembus dan mematikan sel kanker tersebut (Tanaka *et al*, 2000, NCI, 2004).

Dalam paper ini akan dipaparkan hasil skrining bahan anti kanker dari sponge dan gorgonian terhadap L1210 *cell line*.

Materi dan Metode

Koleksi Sampel

Sampel sponge dikoleksi dari perairan Jepara dan perairan Labuhan Bajo, Flores pada bulan Mei 2003. Metoda yang digunakan dalam sampling di perairan Jepara adalah Skin diving atau snorkling pada kedalaman antara 1-3 meter. Sedangkan sampel dari perairan Flores dikoleksi dengan metoda SCUBA diving pada kedalaman antara 3 - 38 m. Sampel yang dikoleksi di perairan Jepara segera disimpan di dalam freezer hingga dipakai dalam proses ekstraksi. Sedangkan sampel dari perairan Flores dikering anginkan segera setelah koleksi.

Ekstraksi

Sampel dibersihkan dari pengotor yang menempel dan dipotong kecil-kecil kemudian diekstrak dengan metanol sebanyak tiga kali. Proses pemekatan dilakukan dengan Rotary evaporator.

Uji antikanker

Uji anti kanker dilakukan dengan menentukan nilai IC_{50} yaitu nilai yang menunjukkan konsentrasi ekstrak atau isolat yang dibutuhkan untuk menghambat 50% pertumbuhan sel selama pertumbuhan linier sel. Uji ini digunakan sebagai pemandu (*Bioassay Guide Fractionation*) dalam proses isolasi dan purifikasi senyawa bioaktif. Sel kanker yang dipakai adalah lini sel L1210, turunan dari sel kanker leukemia. Uji dilakukan pada media RPMI lengkap dan penghitungan daya hambat dilakukan dengan metoda *direct counting* (Lobert *et al*, 2000).

Hasil dan Pembahasan

Hasil ekstraksi dengan metanol menghasilkan ekstrak kasar yang akan digunakan dalam uji anti kanker. Adapun berat dan prosentase ekstrak dari masing-masing sampel adalah seperti yang tercantum pada Tabel 1.

Selanjutnya ekstrak metanol tersebut diujikan terhadap sel kanker leukemia (L-1210 *cell line*). Hasil uji menunjukkan seluruh ekstrak dari sampel mampu menghambat pertumbuhan sel uji, meskipun dengan daya hambat yang berbeda seperti yang tercantum pada Tabel 2.

Tabel 1. Berat sampel dan kandungan ekstrak metanol pada beberapa jenis sponge dan gorgonian.

No	Jenis Biota	Berat sampel (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen Ekstrak (%)
1	<i>Agelas nakamurai</i>	1293.34	135.423	10.47
2	<i>Hyrtios erecta</i>	81.90	0.4523	0.55
3	<i>Xestospongia</i> sp1.	269.10	27.8529	10.35
4	A06	42.00	5.8390	14.20
5	<i>Cladocroce</i> sp.	204.50	50.5199	24.70
6	<i>Oceanapia</i> sp.	57.30	6.0522	10.56
7	<i>Ircina ramosa</i>	240.14	49.9037	20.78
8	<i>P. lamellosa</i>	131.00	16.6484	12.70
9	<i>Phyllospongia</i> sp1	170.00	2.8770	1.69
10	<i>Phyllospongia</i> sp2	240.00	32.46	13.46
11	<i>Isis Hipuris</i>	2000.00	97.2122	4.86
12	<i>Fascaplynopsis</i> sp.	9.03	0.2174	0.57
13	<i>Xestospongia</i> sp 2.	89.60	3.0716	3.43
14	<i>Haliclona</i> sp.	1011.03	3.6742	0.36
15	UP-8	70.21	3.3709	4.80
16	UP-9	53.20	1.6821	3.15
17	<i>Haliclona cymaeformis</i>	35.90	2.6336	7.34
18	<i>Calispongia</i> sp	73.70	0.3761	0.51

Note : No. 1-11; sampel dalam keadaan kering.
 No. 12- 18; sampel dalam keadaan basah.

Proses ekstraksi dengan metanol bertujuan untuk mendapatkan ekstrak kasar yang akan digunakan untuk uji anti kanker. Disamping itu juga untuk mengetahui prosentase ekstrak yang diperoleh dari bahan segar (rendemen ekstrak) sehingga akan diketahui jumlah bahan baku yang dibutuhkan untuk memperoleh sejumlah ekstrak tertentu. Hasil ekstrak yang diperoleh dari seluruh sampel (18 jenis biota) baik yang diperoleh dari Flores menunjukkan bahwa sponge *Cladocroce* sp mempunyai prosentase rendemen ekstrak tertinggi (24,7 % berat kering). Sedangkan untuk sampel dari Jepara, *Haliclona cymaeformis* mempunyai prosentase rendemen ekstrak tertinggi yakni 7.34 % berat basah.

Hasil uji menunjukkan bahwa seluruh ekstrak dari sampel sponge mampu menghambat pertumbuhan sel L1210. Tiga species sponge dan fraksi etil asetat dari gorgonian *Isis hippuris* mempunyai IC-50 kurang dari 3 mg/mL (mikrogram/mililiter), 8 sponge mempunyai IC-50 > 5 mg (mikrogram)/mL dan selebihnya mempunyai IC-50 > 10 mg. Ekstrak

sponge *Xestospongia* sp2 dan *Phyllospongia* sp1 yang dikoleksi dari perairan Flores serta satu jenis sponge yang dikoleksi dari perairan Jepara yaitu sponge dengan kode UP8 merupakan sponge yang termasuk dalam kategori sangat aktif karena mempunyai IC-50 kurang dari 3 mg. Sedangkan ekstrak dari delapan jenis sponge yaitu *Agelas nakamurai*, *Ircina ramosa*, A06, *Phyllospongia lamellosa*, *Phyllospongia* sp ? UP9, *Calispongia* sp dan *Fascaplynopsis* sp dapat dikategorikan mempunyai *medium activity*. Dari kedelapan jenis sponge lima diantaranya dikoleksi dari perairan Flores dan selebihnya dikoleksi dari perairan Jepara. Kelima sponge mempunyai aktivitas lemah yaitu *Hyrtios erecta*, *Xestospongia* sp, *Cladocroce* sp, *Oceanapia* cf. *Amboiensis* dan *Haliclona* sp. Satu sponge yang mempunyai IC-50>10 mg adalah *Xestospongia* sp 1.

Menurut standar NCI seluruh sampel masih dikategorikan layak untuk uji atau penumian lanjut karena IC-50 masih dibawah 30 mg/mL. Ekstrak

Tabel 2. Daya hambat dan nilai IC-50 ekstrak berbagai jenis sponge dan gorgonian terhadap sel kanker leukemia (L-1210 cell line).

No	Sampel	Inhibisi (%)				IC-50 (mg/L)
		Konsentrasi (ppm)				
		0	1	5	10	
1	<i>Agelas nakamura</i>	0,00	15,89	55,96	82,78	4,5
2	<i>Hyrtios erecta</i>	0,00	8,87	40,37	75,23	6,38
3	<i>Xestospongia sp 1.</i>	0,00	9,49	21,52	49,05	10,17
4	A06	0,00	36,42	60,60	92,38	3,25
5	<i>Cladocroce sp</i>	0,00	26,58	48,51	79,07	8,16
6	<i>Oceanapia cf. amboiensis</i>	0,00	14,15	25,40	59,16	8,68
7	<i>Ircina ramosa</i>	0,00	34,43	60,98	82,95	3,25
8	<i>Phyllospongia lamellosa</i>	0,00	25,38	63,30	85,63	3,6
9	<i>Isis hippuris EA</i>	0,00	38,82	65,46	79,61	2,72
10	<i>Xestospongia sp 2.</i>	0,00	40,20	68,77	86,38	2,37
11	<i>Phyllospongia sp 1</i>	0,00	38,81	65,46	83,22	2,68
12	<i>Phyllospongia sp 2.</i>	0,00	33,12	64,92	86,23	3,12
13	<i>Haliclona sp</i>	0,00	8,68	20,14	67,36	8,16
14	UP8	0,00	34,69	69,73	91,84	2,75
15	UP9	0,00	19,44	52,66	80,25	4,71
16	<i>Haliclona cymaeiformis</i>	0,00	6,94	26,04	67,36	7,85
17	<i>Calispongia sp</i>	0,00	33,86	58,31	79,00	3,64
18	<i>Fascaplynopsis sp</i>	0,00	23,81	55,10	78,57	4,02

bahan hayati dengan ED₅₀ > 30 mg/ml pada tes awal pertama dan rata-rata ED₅₀ > 20 mg/ml pada tes awal kedua dapat dikategorikan sebagai senyawa aktif. Untuk senyawa murni dianggap layak untuk tes berikut apabila mempunyai ED₅₀ > 10 mg/ml (Grabley and Thiericke, 1999).

Keberadaan bahan bioaktif pada organisme laut diduga sebagai alat untuk pertahanan diri dari predator. Sponge merupakan organisme sesil yang hampir tidak mempunyai kerangka atau pelindung. Untuk menghindari predator dan patogen, biota ini memproduksi berbagai jenis bahan kimia baik sebagai *feeding repellent* maupun sebagai antibiotika.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kami ucapkan kepada Dr. Made yang telah membantu di laboratorium dalam proses uji antikanker. Terimakasih juga kami sampaikan kepada Sdr. Cipto Hadi, Toyani, dan Tiwi Handayani, serta Yan Yan H, Eka dan Hipsul Watani. Penelitian ini didanai oleh program penelitian RUT X dengan surat perjanjian Nomor 14.14/K/RUT/2004 tanggal 29 Januari 2004.

Daftar Pustaka

- Belarbi, E. H., A. C Gomez, Y. Chisti, F. G Camacho and E. Grima, 2003, Producing drugs from marine sponges, *Biotechnology Advances*, 21, 585 - 598, www.elsevier.com/locate/biotechadv
- Cafieri F.; Fattonusso E.; Tagliatalata-Scafati O., 1998, Novel betaines from the marine sponge *Agelas dispar*. *Journal of Natural Products*, Volume 61, Issue 9. Pages 1171-1173. Colin, P.L., and C. Arneson. 1995. *Tropical Pacific Invertebrates*. Coral Reef Press. California
- Clark, D.P; J. Carrol, S. Naylor, and P. Crews, 1998, Antifungal Cyclodepsipeptide, Cyclolittisthid A, from the sponge *Theonella swinhoei*, *J. Org. Chem.*, page EST :7.5.
- Cutignano et al, 2000, Dragmacidin F : A new antiviral bromoindole alkaloid from the Mediterranean *Halicortex sp.*, *Tetrahedron*. 56, pp. 3743-3748.
- Gamble, W.R; N. A. Durso, R. W. Fuller, C. K. Westergaard, T. R. Johnson, D. L. Sackett, E. Harel, J. H. Cardellina II, and M. R. Boyd, 1999, Cytotoxic and Tubulin-Interactive Hemiasterlins

- from *Auletta* sp. and *Siphonochalina* spp., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7 : 1611-1615.
- Grabley, S. and R. Thiericke, 1999. Drug Discovery from Nature. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Hale, R. L.; J. Ierclercq, B. Tursch, C. Djerassi, R. A. Gross Jr., A.J. Weinheimer, K. Gupta, and P.J. Scheuer, 1970. Demonstration of a biogenetically unprecedented side chain in the marine sterol, gorgosterol. *J. Am. Chem. Soc.* 92:2179-2180
- Higa, T.; J. Tanaka, Y. Tsukitani, and H. Kikuchi, 1981. Hippuristanol, cytotoxic polyoxygenated steroids from the gorgonian *Isis hippuris*. *Chemistry Lett.* 1647-1650
- Idbert, S; J. Fahy, B.T. Hill, A. Diflos, C. Etievant, and J. J. Correia, 2000, Vinca Alkaloid-Induced Tubulin Spiral Formation Correlates with Cytotoxicity in the Leukemic L1210 Cell Line, 12053 *Biochemistry*, 39:12053-12062.
- NCI, 2003, Progress Report 2003, <http://www.cancer.gov>.
- NCI, 2004, Progress Report 2003, Scientists Establish Database of Genes Associated With Cancer Drug Resistance <http://www.cancer.gov>.
- Pettit G.R.; Butler M.S.; Bass C.G.; Doubek D.L.; Williams M.D.; Schmidt J.M.; Pettit R.K.; Hooper J.N.A.; Tackett L.P.; Filiatrault M.J. 1994, Antineoplastic Agents, 326. The Stereochemistry of Bastadins 8, 10, And 12 From The Bismarck Archipelago Marine Sponge *Ianthella Basta*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Volume 42(12) : 2449-2451.
- Qureshi, A., P. L. Colin and D. J. Faulkner, 2000, Microsclerodermins F-I, Antitumor and Antifungal Cyclic Peptides from the Lithistid Sponge *Microscleroderma* sp., *Tetrahedron*, 56 : 3679-3685.
- Sata, N. U., S. Matsunaga, N. Fusetani, R. V. M. van Soet. 1999. *J. Nat. Prod.* 62:969-971.
- Tanaka, J; Agus Trianto, Musri Musman, Hammad H. Issa, Ikuko I. Ohtani, Toshio Iciba, Tatsuo Higa Wesley Y. Yoshida and Paul J. Scheuer, 2002. New Polyoxygenated steroids exhibiting reversal of multidrug resistance from the gorgonian *Isis hippuris*, *Tetrahedron*. 58:6259-6266.
- Trianto, A; J. Tanaka, and T. Higa, 2001, Structural Elucidation of A New Anticancer Sterol from Marine Gorgonian *Isis hippuris*. Ilmu Kelautan. Special edition. Pp 215-221.
- Wellington, K.D., R.C. Cambie, P.S. Rudledge, and P.R. Berquist, 2000, Chemistry of Sponges.19. Novel Metabolites from *Hamigera tarangensis*, *J. Nat. Prod.*, 63 : 79-85.
- Wipf, P. and S. Lim, 1995, Total Synthesis of the Enantiomer of the Antiviral Marine Natural Product Hennoxazole A, *J. Am. Chem. Soc.* 117:558-569.