

Uji sitotoksitas dan uji antimikroba senyawa bioaktif spons *Stylissa labelliformis*

Cytotoxicity and antimicrobial test of the bioactive compound isolated from *Stylissa flabelliformis* sponge

Erna Prawita Setyowati, Sudarsono dan Subagus Wahyuono

Bag. Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Telah dilakukan penelitian uji sitotoksik dan uji antimikroba senyawa bioaktif spons *Stylissa flabelliformis*. Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel mieloma sedangkan uji antimikroba dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Penelitian dilakukan dengan mengisolasi senyawa bioaktif fraksi aktif spons *S. flabelliformis* yang dimonitor dengan uji Brine Shrimp Lethality Test (BST). Terhadap fraksi aktif dilakukan kromatografi preparatif menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak heksana:etil asetat (1:1 %) hingga diperoleh isolat 1,2,3 dan 4.

Hasil penelitian menunjukkan isolat 3 bersifat paling toksik karena mampu mematikan larva *A. salina* menurut uji BST sebesar 100% pada dosis 25 µg/ml. Harga LC₅₀ isolat 3 adalah 0,9 µg/ml. Hasil uji sitotoksitas terhadap isolat 3 yang dilakukan menurut metode pengecatan langsung menggunakan biru tripan dengan kepadatan sel mieloma $4,5 \times 10^5$ sel/100 µl menunjukkan isolat 3 bersifat sangat toksik terhadap sel mieloma dengan harga LC₅₀ sebesar 0,08 µg/ml.

Hasil uji antimikroba dengan metode difusi menggunakan sumuran menunjukkan isolat 3 bersifat fungisid terhadap *Candida albicans* tetapi tidak bersifat bakterisid terhadap *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli*.

Key words: sponge, *Stylissa flabelliformis*, sitotoksitas, fungisid

Abstract

A research of cytotoxicity and antimicrobial test of bioactive compound of *Stylissa flabelliformis* sponge have been done. Cytotoxicity test were conducted on myeloma cells, while antimicrobial test were conducted against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albican*. The research was initiated with the isolation of bioactive compound from the active fraction of sponge *S. Stylissa* monitored by Brine shrimp Lethality tes (BST). The active fraction was chromatographed with silica gel as its immobile phase and the mixture of hexane and ethyl acetate (1:1) as the mobile phase to obtain compound 1,2,3 and 4.

Compound 3 has the most toxic character because it could kill *A. salina* equal to 100% at dose 25 µg/ml, and has LC₅₀ of 0,9 µg/ml. Cytotoxicity test with direct staining method using tripan blue on myeloma cell at density of $4,5 \times 10^5$ cell / 100 ul showed that the compound 3 had a high activity against myeloma cell, having LC₅₀ equal to 0,08 µg/ml.

The result of antimicrobial effect showed that compound 3 was a fungicide against *Candida albicans* but having no activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Key words: sponge, *Stylissa flabelliformis*, cytotoxicity, fungicide

Pendahuluan

Spons termasuk organisme multiseluler dan merupakan invertebrata laut dengan tingkat paling rendah. Sebagian besar spons hidup di laut (80%), sedangkan sisanya hidup di air tawar. Spons dapat ditemukan di semua daerah kawasan laut dari katulistiwa sampai kutub, di laut dangkal maupun dalam (Hooper, 1997)

Spons *Styliosa flabelliformis* berwarna merah dengan bentuk tipis dan lunak, permukaan berpori dengan tonjolan tak beraturan pada seluruh tubuh, bagian dalam tubuh berwarna putih kekuningan. Klasifikasi spons ini adalah sebagai berikut: Kerajaan Animalia, Divisi Porifera, Kelas Demospongiae, Anak Kelas Ceractinomorpha, Bangsa Halicondrida, Suku Axenellida, Marga stylissa dengan nama jenis *Styliosa flabelliformis* (Hooper dan Soest, 2002).

Hasil penelitian sebelumnya (Setyowati dkk., 2003) menunjukkan bahwa fraksi heksana:etil asetat (2:8 v/v) dan fraksi etil asetat memberikan gambaran kromatografi yang relatif sama. Monitoring dengan uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) terhadap fraksi-fraksi menunjukkan toksitas fraksi heksana:etil asetat (2:8 v/v) adalah 98% sedangkan fraksi etil asetat 100% pada dosis 25 µg/ml, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi isolat 3 yang terdapat dalam kedua fraksi dan aktivitasnya terhadap *cell line* maupun mikroba.

Metodologi

Bahan

Spons *Styliosa flabelliformis* (koleksi PSOT UGM). Telur *Artemia salina* Leach (Premium extra Brine Shrimp Eggs, HS No. 0511.99.600, Seagull International, The Great Salt Lake ,USA). Air laut buatan konsentrasi 30‰ (Sera sea salt GB USA). Kultur sel mieloma koleksi laboratorium PAU UGM, Vinkristin sulfat injeksi 1 mg/ml (Combi-phar), RPMI 1640 (Sigma), Fetal Bovine Serum 10% (Gibco), Penisilin-streptomisin 1% (Gibco), Biru tripan (Gibco). Bahan-bahan kimia p.a (Merck). Saboroud Dextrose Agar/SDA (Difco), Tryptone Soya Agar/ TSA (Difco), *Staphylococcus aureus* (*SA*) ATCC 25923, *Escherichia coli* (*EC*) ATCC 25922, *Candida albicans* (*CA*) koleksi lab daerah DIY. Pembanding Streptomycin sulfat (Meiji Indonesia) konsentrasi 20 mg/ml untuk *SA* dan *EC*. Miconazole nitrate (Dankos laboratories) konsentrasi 10 mg/ml untuk *CA*

Jalan penelitian Isolasi isolat 3

Spons dimaserasi menggunakan kloroform. Ekstrak kloroform difraksiasi menggunakan pelarut heksana dan etil asetat dalam berbagai konsentrasi. Terhadap fraksi aktif (gabungan fraksi heksana:etil asetat (2:8 v/v) dilakukan kromatografi preparatif menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak heksana:etil asetat (5:1 v/v).

Uji Brine Shrimp Lethality Test

Terhadap masing-masing isolat dimonitoring dengan uji BST. Uji dilakukan menggunakan larva *A. salina* umur 48 jam. Kontrol negatif digunakan DMSO.

Uji sitotoksitas

Terhadap isolat paling aktif dilakukan uji sitotoksik menggunakan kultur sel mieloma. Sampel uji (Isolat 3) dibuat dalam berbagai konsentrasi (tabel IV). Kontrol positif vinkristin sulfat dosis 25 µg/ml. Kontrol negatif pelarut DMSO. Pengamatan dilakukan setiap 24 jam sampai jam ke 72. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang hidup setelah dilakukan pengecatan menggunakan indikator tripan biru.

Uji antimikroba

Digunakan metode difusi dengan sumuran untuk *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Uji aktivitas antibakteri digunakan lempeng TSA sedangkan uji aktivitas antifungi digunakan lempeng SDA. Kedua lempeng media yang telah diinokulasi mikroba pada konsentrasi 10⁸ CFU/ml (standard Mc. Farland) dibuat sumuran dengan perforator diameter 5 mm pada tempat yang telah ditentukan. Berbagai konsentrasi isolat 3 dipipet 20 µl ke dalam sumuran, Kontrol positif dan kontrol negatif diperlakukan sama. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam.

Analisis data

Uji sitotoksitas

Penentuan persentase kematian sel dihitung dengan rumus $((A-B)/A) \times 100\%$ dimana A jumlah sel yang hidup, sedang B adalah jumlah sel hidup pada sumuran yang telah diberi senyawa uji. Sitotoksitas senyawa aktif dihitung berdasarkan analisis probit.

Uji antimikroba

Diukur diameter zona hambatan pertumbuhan yang terjadi setelah inkubasi 24 jam. Terhadap senyawa yang aktif terhadap mikroba dilakukan analisis statistik uji Mean Dua.

Hasil Dan Pembahasan

Pada hasil penelitian sebelumnya (Setyowati dkk,2003) ditunjukkan bahwa fraksi heksana:etil asetat (2:8 v/v) dan fraksi etil asetat memberikan gambaran kromatografi yang relatif sama. Monitoring dengan uji BST terhadap fraksi-fraksi menunjukkan toksisitas fraksi heksana:etil asetat (2:8 v/v) adalah 98% sedangkan fraksi etil asetat 100% pada dosis 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sehingga perlu dilakukan penelitian selanjutnya untuk mengisolasi isolat aktif fraksi-fraksi tersebut. Penelitian dilakukan dengan penggabungan kedua fraksi tersebut dan dikromatografi preparatif menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak heksana:etil asetat (1:1 v/v) (gambar 1).

Isolat-isolat hasil kromatografi preparatif dimonitor sifat toksiknya dengan uji BST (dosis 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Hasil uji dapat dilihat pada tabel II. Isolat 3 bersifat paling toksik bila dibanding isolat lainnya karena mampu mematikan larva *A. salina* sebesar 100%. Harga LC₅₀ isolat 3 (data pada tabel III) setelah dihitung dengan analisis probit adalah 0,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

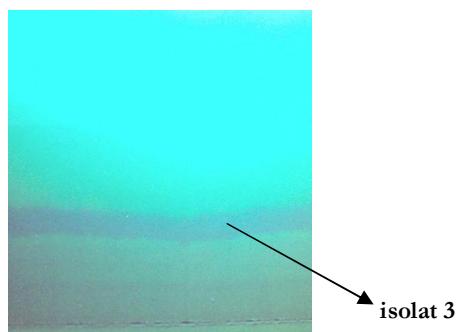
Uji sitotoksik isolat 3

Isolat 3 bersifat toksik terhadap *A. salina* dengan harga LC₅₀ 0,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sehingga isolat 3 perlu dilakukan uji sitotoksitas. Hasil perhitungan persentase kematian sel yang diberi perlakuan dengan isolat 3, kontrol positif vinkristin sulfat dan kontrol negatif larutan DMSO terhadap sel mieloma ditampilkan dalam tabel IV. Dari tabel IV terlihat bahwa

pertumbuhan sel mieloma pada kontrol media menunjukkan kenaikan jumlah sel sampai pada jam ke-48 setelah itu terjadi kematian sel mulai pada pengamatan jam ke 72, hal ini mungkin disebabkan karena nutrisi pada media sudah tidak mencukupi untuk pertumbuhan sel sehingga untuk penghitungan kematian sel hanya dilakukan sampai pada jam ke-48.

Pemberian isolat 3 bersifat toksik terhadap sel mieloma. Tabel IV maupun gambar 3 menunjukkan persentase kematian sel yang cenderung semakin menaik seiring dengan kenaikan dosis isolat 3. Sampai dengan dosis terendah yaitu 0,105 $\mu\text{g}/\text{ml}$; isolat 3 masih menunjukkan aktivitas sitotoksik yang cukup tinggi dengan harga kematian sel hampir 50% (49,8%).

Hasil uji sitotoksitas isolat 3 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dibandingkan dengan vinkristin sulfat (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), menunjukkan bahwa isolat 3 memberikan prosentase kematian sel lebih besar (95,9%, gambar 3b) dibandingkan dengan vinkristin sulfat (92,4, gambar 3c). Harga LC₅₀ isolat 3 yang diperoleh dari hasil analisis probit pada pengamatan jam ke-48 adalah 0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sehingga isolat 3 berpeluang untuk diteliti lebih lanjut sebagai senyawa yang berpotensi antikanker.



Gambar 1.Kromatografi preparatif dari fraksi heksana:etil asetat (2:8 v/v)
Fase diam = silika gel GF₂₅₄
Fase gerak = heksana:etil asetat (1:1 v/v),
Deteksi = UV 254 nm, UV 366 nm, pereaksi serium (IV) sulfat

Tabel I. Harga Rf isolat gabungan fraksi heksana:etil asetat (2:8 v/v) dan fraksi etil asetat

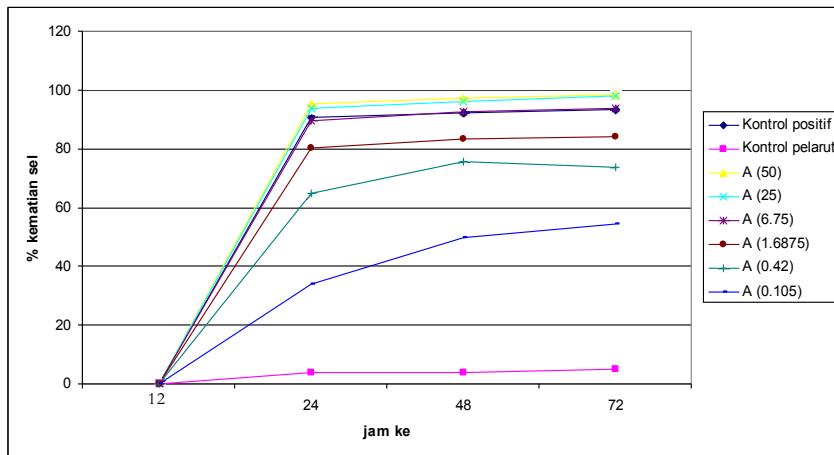
No bercak	Rf	Deteksi sinar UV		Deteksi serum (IV) sulfat
		UV ₂₅₄	UV 366	
1.	0,13	pemadaman	-	coklat
2.	0,24	pemadaman	-	coklat
3.	0,33	pemadaman	-	coklat
4.	0,94	pemadaman	-	coklat

Tabel II. Jumlah kematian larva *A. salina* karena pengaruh isolat gabungan fraksi heksana : etil asetat (2:8 v/v) dan fraksi etil asetat

Isolat	Jumlah kematian larva <i>A. salina</i> tiap flakon					Purata %
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
1	0	0	0	1	0	2
2	0	0	0	0	0	0
3	10	10	10	10	10	100
4	0	0	0	0	0	0
Kontrol	0	0	0	0	0	0

Tabel III. Uji toksisitas isolat 3 dalam berbagai dosis terhadap *A. salina*

Konsentrasi $\mu\text{g/ml}$.	Jumlah kematian larva <i>A. salina</i> tiap flakon					Purata %
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	
25	10	10	10	10	10	100
12,5	10	10	10	10	10	100
6,25	10	10	10	10	10	100
3,125	9	10	8	8	9	88
1,563	7	6	6	7	6	64
0,781	5	5	4	4	4	44
0,391	3	3	3	2	2	26
Kontrol	0	0	0	0	0	0



Gambar 2. Prosentase kematian sel meiloma vs dosis isolat 3

Keterangan : A(50) = isolat 3 konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$; A(25)=isolat 3 konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$
 A(6.75)= isolat 3 konsentrasi 6.75 $\mu\text{g/ml}$; A(1.6875)= isolat 3 konsentrasi 1.6875 $\mu\text{g/ml}$
 A(0.42)= isolat 3 konsentrasi 0.42 $\mu\text{g/ml}$; A(0.105)= isolat 3 konsentrasi 0.105 $\mu\text{g/ml}$

Tabel IV. Aktivitas isolat 3 terhadap sel meiloma *in vitro*

Bahan $\mu\text{g}/\text{ml}$	Jam ke	Hidup sel ($\times 10^4$)		Kematian %
		Setelah diberi senyawa uji	Kontrol media	
Kontrol media	0		45	
	24		128,5	
	48		152,3	
	72		95,5	
Kontrol positif vinkristin sulfat (25)	0	45		0
	24	12,2		90,5
	48	11,5		92,4
	72	6,4		93,3
Isolat 3 (50)	0	45		0
	24	6,1		95,3
	48	4,2		97,2
	72	1,6		98,3
Isolat 3 (25)	0	45		0
	24	7,9		93,9
	48	6,2		95,9
	72	2,2		97,9
Isolat 3 (6,75)	0	45		0
	24	13,2		89,7
	48	11,1		92,7
	72	5,9		93,8
Isolat 3 (1,6875)	0	45		0
	24	25,6		80,1
	48	25,1		83,5
	72	15,2		84,1
Isolat 3 (0,42)	0	45		0
	24	45,4		64,7
	48	37,3		75,5
	72	24,1		73,8
Isolat 3 (0,105)	0	45		0
	24	85		33,9
	48	76,5		49,8
	72	43,5		54,5
Kontrol negatif DMSO	0	45		0
	24	123,5		3,89
	48	146,5		3,83
	72	90,6		5,13

Tabel V Hasil pengukuran diameter hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* karena pengaruh berbagai konsentrasi isolat 3.

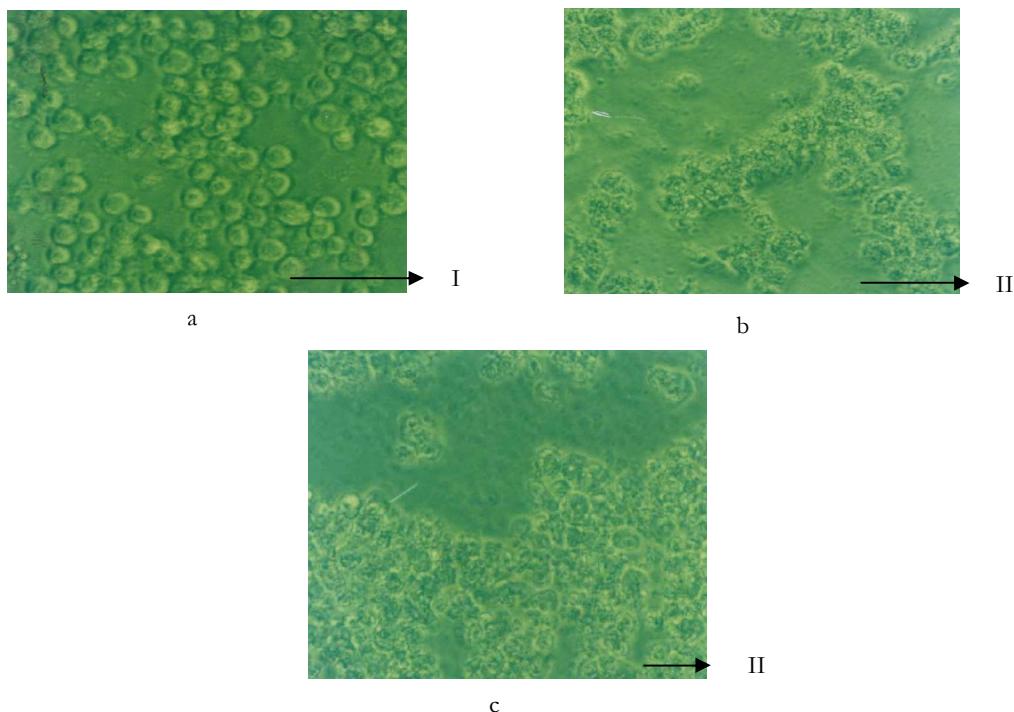
No	Sreptomisin sulfat pada konsentrasi 20mg/ml (mm)	Konsentrasi isolat 3		
		30mg/ml (mm)	20mg/ml (mm)	10mg/ml (mm)
1.	15,75	0	0	0
2.	14,05	0	0	0
3.	15,70	0	0	0

Tabel VI Hasil pengukuran diameter hambatan terhadap *Escherichia coli* karena pengaruh berbagai konsentrasi isolat 3.

No	Sreptomisin sulfat pada konsentrasi 20 mg/ml (mm)	Konsentrasi isolat 3		
		30mg/ml (mm)	20mg/ml (mm)	10mg/ml (mm)
1.	17,25	0	0	0
2.	18,30	0	0	0
3.	17,50	0	0	0

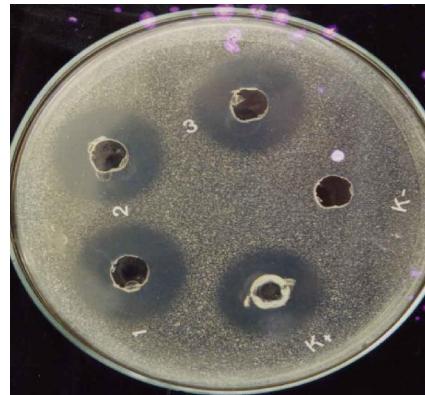
Tabel VII Hasil pengukuran diameter hambatan terhadap *Candida albicans* karena pengaruh berbagai konsentrasi isolat 3.

No	Mikonazol nitrat pada konsentrasi 10 mg/ml (mm)	Konsentrasi isolat 3		
		30mg/ml (mm)	20mg/ml (mm)	10mg/ml (mm)
1.	18,25	21,25	20,55	19,95
2.	18,0	21,30	20,45	20,05
3.	17,75	21,15	20,50	20,10



Gambar 3. Sel mieloma

- (a) (kontrol media)
- (b) hasil uji dengan isolat 3 dosis 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- (c) hasil uji dengan vinkristin sulfat dosis $\mu\text{g}/\text{ml}$.
I = sel hidup, II = sel mati



Keterangan: K+ mikonazole nitrat. K- pelarut DMSO.

Gambar 4 Efek antimikroba isolat 3 terhadap *Candida albicans*.

Uji antimikroba isolat 3

Hasil pengukuran diameter hambatan pertumbuhan terhadap *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli* dan *Candida albicans* karena pengaruh berbagai konsentrasi isolat 3 dapat dilihat pada tabel IV, V dan VI. Profil hasil uji isolat 3 terhadap fungi *Candida albicans* terlihat pada gambar 4.

Dari tabel V dan VI terlihat isolat 3 tidak memberikan hambatan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* maupun *Eschericia coli*. Tabel VII menunjukkan isolat 3 memberikan pengaruh yang cukup besar terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dengan adanya zona radikal pada media SDA (gambar 4).

Hasil analisis statistik uji Mean Dua sampel independen didapatkan bahwa diameter hambatan pertumbuhan yang dihasilkan oleh isolat 3 sampai dengan konsentrasi 10mg/ml setara dengan 11.13mg/ml mikonazol nitrat, sehingga isolat 3 merupakan senyawa yang sangat poten sebagai senyawa antifungi.

Daftar Pustaka

- Hooper, J.N.A., 1997, *Sponge Guide: Guide to Sponge Collection and Identification*, pp : 33-38, version March, Quensland Museum, Brisbane.
- Hooper, J.N.A and van Soest, R.W.M., 2002, *Systema Porifera : A Guide to Classification of Sponges*, pp : 783-784, volume 1, Kluwer Academic, Plenum Publisher, New York.
- Setyowati, E.P., Sudarsono dan Wahyuono, S., 2003, Penentuan Fraksi Aktif Spons *Styliissa flabelliormis* yang toksik terhadap *Artemia salina* Leach, *J.Teknosains*, Seri A, IPA Jilid 16, nomor 3, hal 499-513 , Pascasarjana UGM, Yogyakarta

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat 3 dari spons *Styliissa flabelliormis* bersifat toksik terhadap larva *A. salina* dengan harga $LC_{50} = 0,9 \mu\text{g}/\text{ml}$ dan sel mieloma in vitro dengan harga $LC_{50} = 0,08 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Isolat 3 bersifat fungisid terhadap *Candida albicans*, sampai dengan konsentrasi 10 mg/ml menghasilkan hambatan pertumbuhan yang setara dengan 11.13mg/ml mikonazole nitrat. Isolat 3 tidak bersifat bakterisid terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Eschericia coli*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof.Dr. Peter Proksch, Universitas Duesseldorf, Jerman yang telah banyak membantu penelitian ini. Dr. Wayan T. Artama, PAU UGM yang telah menyediakan stok sel mieloma.