

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI GOLONGAN
SENYAWA ANTIMITOSIS DARI SPONS
Callyspongia hispidonulosa dan
Siphanochalina sp**



**RINA AGUSTINA
H 511 02030**



PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS HASANUDDIN	
Tgl. Terima	30-11-2006
Asal	Fak. MIPA
Banyaknya	1 (satu) ek
Harga	H
No. Inventaris	804/30-11-6
No. Klas	34621

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2006**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI GOLONGAN
SENYAWA ANTIMITOSIS DARI SPONS
Callyspongia hispidonulosa dan
Siphanochalina sp**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas dan memenuhi
syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**RINA AGUSTINA
H51102030**

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2006**

ISOLASI DAN KARAKTERISASI GOLONGAN SENYAWA ANTIMITOSIS
DARI SPONS *Callyspongia hispidocnulosa* dan *Siphanochalina* sp

RINA AGUSTINA

H51102030

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



DR. Gemini Alam, M.Si
NIP. 131 876 917

Pembimbing Pertama,



Dra. Rachmawati Syukur, M.Si
NIP.132 012 988

Pembimbing Kedua,



Dra. Christiana Lethe
NIP. 131 122 062

Pada Tanggal 7 November 2006

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, tiada kata yang patut diucapkan selain puji dan syukur atas kehadiran Allah Subhanahu Wata'ala yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Sudah merupakan fitrah bagi manusia dalam hidupnya yaitu sebagai mahluk sosial tidak dapat lepas dari bantuan orang lain baik secara langsung maupun tidak langsung. Demikian halnya dalam penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis dengan tulus menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Bapak DR. Gemini Alam, M.Si, sebagai pembimbing utama, Ibu Dra. Rachmawati Syukur, M.Si sebagai pembimbing pertama, dan Ibu Dra. Christiana Lethe sebagai pembimbing kedua yang ditengah kesibukannya masih meluangkan waktu dan kesempatannya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran dan pikiran kepada penulis sejak perencanaan penelitian hingga selesainya skripsi ini.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Drs. Abd Muzakkir Rewa, M.Si selaku penasehat akademik, Ketua Jurusan Farmasi FMIPA beserta seluruh staf atas segala fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.

Terkhusus lagi kepada teman-teman angkatan 2002 dan teman-teman penelitian di Laboratorium Fitokimia yang senasib dan seperjuangan, kepada kakak Abdul Rahim dan Pak Suaib yang senantiasa membantu hingga terselesaikannya penelitian ini.

Akhirnya dengan segala kerendahan hati, penyusun mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Ayahanda Tanri Gau, Ibunda Basse Asya dan kak Ani tercinta, atas doa restu, kasih sayang, motivasi dan dukungannya selama menempuh pendidikan di bangku kuliah hingga selesainya penyusunan skripsi ini.

Penyusun menyadari bahwa dalam skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan dan kelemahan, namun besar harapan penyusun kiranya ini dapat bermanfaat sebagaimana mestinya. Semoga apa yang telah kita lakukan mendapatkan ridho dan pahala dari-Nya. Amin.

Makassar, 7 Juli 2006

RINA AGUSTINA

ABSTRAK



Bahan alam laut adalah salah satu sumber penelitian senyawa – senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. Spons telah banyak dilaporkan memiliki senyawa-senyawa dengan struktur unik dan mempunyai bioaktivitas tinggi. Ekstrak kloroform dari Spons *C. hispidocnulus* dan *Siphonochalina* sp telah dilaporkan memiliki toksisitas yang tinggi terhadap larva *Artemia salina* Leach. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan karakterisasi golongan senyawa antimitosis dari ekstrak kloroform spons *C. hispidocnulus* dan spons *Siphonochalina* sp dari perairan pulau Barrang Lompo. Isolasi komponen kimia dilakukan dengan kromatografi kolom cair vakum. Ekstrak kloroform *C. hispidocnulus* menghasilkan 4 fraksi gabungan dan ekstrak kloroform *Siphonochalina* sp menghasilkan 3 fraksi gabungan. Uji aktivitas antimitosis sel telur bulubabi (*Tripneustus gratilla* Linn) terfertilisasi menunjukkan bahwa fraksi 4 dari *C. hispidocnulus* dan fraksi 3 dari *Siphonochalina* sp paling aktif. Selanjutnya kedua fraksi aktif tersebut dilarutkan dalam etil asetat sehingga diperoleh subfraksi larut dan tidak larut etil asetat. Kedua subfraksi diuji lagi aktivitasnya dengan metode yang sama pada konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/ml . IC_{50} dihitung dengan analisis probit . Subfraksi I (tidak larut etil asetat) *C. hispidocnulus* memiliki IC_{50} sebesar 21,60 µg/ml sedangkan *Siphonochalina* sp IC_{50} sebesar 15,14 µg/ml . Karakterisasi golongan senyawa aktif subfraksi I menunjukkan sedikitnya 2 senyawa alkaloida pada *C. hispidocnulus* dan 3 senyawa alkaloida pada *Siphonochalina* sp.

Kata Kunci : Isolasi, antimitosis, *C. Hispidocnulus*, *Siphonochalina* sp, alkaloida

ABSTRACT

Marine natural product is a source of chemical active compounds in cancer research. Sponge has been reported have compounds unique structures and potential bioactivities. It has been alleged that extract chloroform of sponge *Callyspongia hispidocnulosa* and *Siphonochalina* sp have the high toxicity to larvae *Artemia salina* Leach.

The study aimed to doing the isolation and characterization antimitotic compounds of extract chloroform *C. hispidocnulosa* dan *Siphonochalina* sp taken from the waters of Barrang Lompo island.

Isolation chemical compound by doing the chromatography liquid vacuum column.

The results of isolation of extract chloroform *C. hispidocnulosa* were 4 mixed fraction and 3 mixed fraction for extract chloroform *Siphonochalina* sp. Antimitotic test of fertilized sea urchin eggs (*Tripneustus gratilla* Linn) shown that fraction four from *C. hispidocnulosa* and fraction three from *Siphonochalina* sp to be the most active. And then, both of the active fraction dissolved in ethyl acetate is so that obtained by insoluble and soluble subfraction of ethyl acetate. Both of the subfraction tested again its activity with the same method at concentration 1, 10, and 100 µg/ml. IC₅₀ was calculated using probit analysis. Subfraction I (ethyl acetate insoluble) of *C. hispidocnulosa* own the IC₅₀ equal to 21,60 µg/ml while *Siphonochalina* sp of equal to 15,14 µg/ml. Characterization of active compound subfraction I shown at least 2 alkaloida compound at *C. hispidocnulosa* and 3 alkaloida compound at *Siphonochalina* sp.

Key words : Isolation, antimitotic, *C. hispidocnulosa*, *Siphonochalina* sp, alkaloida

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN	i
UCAPAN TERIMA KASIH	ii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Spons	4
II.2 Metode Ekstraksi	7
II.2.1 Tujuan Ekstraksi	7
II.2.2 Jenis-Jenis Ekstraksi	7
II.2.3 Ekstraksi Secara Maserasi	7
II.2.4 Ekstraksi Cair-Cair	8
II.3 Metode Pemisahan	9
II.3.1 Kromatografi Lapis Tipis	9
II.3.2 Isolasi dengan Kromatografi Kolom Cair Vakum	10
II.4 Bioassay	11

II.5 Uji Toksisitas	11
II.6 Uji Antimitosis	12
II.7 Sel Telur Bulubabi	13
II.8 Bulubabi	13
II.8.1 Klasifikasi	13
II.8.2 Morfologi	14
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	17
III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan	17
III.2 Penyiapan Sampel Penelitian	17
III.2.1 Pengambilan Sampel	17
III.2.2 Pengolahan Sampel	17
III.3 Ekstraksi dan Partisi	18
III.4 Isolasi Senyawa Aktif Ekstrak Kloroform	18
III.5 Uji Aktivitas dengan Metode Uji Antimitotik Sel Telur Bulubabi	19
III.5.1 Penyiapan Sel telur dan Sperma Bulubabi	19
III.5.2 Penyiapan Sampel dan Pelaksanaan Uji.....	19
III.6 Identifikasi Senyawa Aktif	20
III.7 Pengolahan dan Analisis Data	21
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	22
IV.1 Hasil Penelitian	22
IV.2 Pembahasan	23
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	28

V.1 Kesimpulan	28
V.2 Saran	28
DAFTAR PUSTAKA.....	29

DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

1. Hasil Pengamatan Penghambatan Pembelahan Sel Telur Bulubabi (<i>T. gratilla</i>) Beberapa Fraksi Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons <i>Callyspongia hispidocnulosa</i> & <i>Siphonochalina</i> sp	22
2. Hasil Analisis KLT Ekstrak Kloroform <i>C. hispidocnulosa</i> dan <i>Siphonochalina</i> sp dengan Berbagai Penampak Noda	23
3. Hasil Pengamatan Pembelahan Sel Telur Bulubabi (<i>T. gratilla</i>) Setelah 2 jam Perlakuan dengan Subfraksi Isolat IV Ekstrak Kloroform <i>C. hispidocnulosa</i>	34
4. Hasil Pengamatan Pembelahan Sel Telur Bulubabi (<i>T. gratilla</i>) Setelah 2 jam Perlakuan dengan Subfraksi Isolat IV Ekstrak Kloroform <i>Siphonochalina</i> sp	35
5. Hasil Pengamatan Kontrol Negatif	36
6. Hasil Pengamatan Kontrol Positif	37
7. Hasil Perhitungan IC ₅₀ Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Skema kerja ekstraksi, isolasi, dan karakterisasi senyawa aktif spons *C. hispidoconulosa*..... 31
2. Skema kerja ekstraksi, isolasi, dan karakterisasi senyawa aktif spons *Siphanochalina* sp 33
3. Skema kerja pengujian aktivitas antimetastasis dengan sel telur bulubabi (*T. gratilla*) 34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bentuk Luar dan Irisan Melintang Tubuh Spons	6
2. Anatomi Tubuh Bulubabi	16
3. Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi dan Persentase Penghambatan Pembelahan Sel (Probit) Subfraksi I Ekstrak Kloroform Spons <i>Callyspongia hispidoconulosa</i>	39
4. Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi dan Persentase Penghambatan Pembelahan Sel (Probit) Subfraksi I Ekstrak Kloroform Spons <i>Siphanochalina</i> sp.....	40
5. Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi dan Persentase Penghambatan Pembelahan Sel (Probit) Vinkristin	40
6. Gambar Spons <i>Callyspongia hispidoconulosa</i>	41
7. Gambar Spons <i>Siphanochalina</i> sp.....	41
8. Pembelahan Sel Telur Bulubabi Setelah Pemberian Vinkristin dan Sebagai Kontrol negatif	42
9. Pembelahan Sel telur Bulubabi Setelah Pemberian Subfraksi I Spons <i>Siphanochalina</i> sp	43
10. Pembelahan Sel telur Bulubabi Setelah Pemberian Subfraksi I Spons <i>Callyspongia hispidoconulosa</i>	43
11. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons <i>Callyspongia hispidoconulosa</i>	44
12. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons <i>Callyspongia hispidoconulosa</i> pada UV 254 nm	44
13. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons <i>Callyspongia hispidoconulosa</i> pada UV 366 nm	45
14. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons <i>Siphanochalina</i> sp	45
15. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons	

<i>Siphonochalina</i> sp pada UV 254 nm	46
16. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons <i>Siphonochalina</i> sp pada UV 366 nm	46
17. KLT Fraksi aktif	47
18. KLT Subfraksi	48
19. KLT Subfraksi aktif	49

BAB I PENDAHULUAN

Sumber daya akuatik yang paling besar di Indonesia adalah laut, sehingga pemanfaatan potensi alam kelautan sangat besar peluang pengembangannya. Dalam bidang Farmasi kekayaan alam kelautan sebagian sudah dimanfaatkan, sebagian baru diketahui potensinya dan sebagian lagi belum diketahui potensinya. Hal ini menuntut perlu dilakukannya penggalian, penelitian dan pengembangan bahan alam kelautan (1).

Di lingkungan laut, selain tumbuh-tumbuhan laut, hewan tak bertulang belakang seperti spons merupakan salah satu sumber senyawa-senyawa baru yang mempunyai keanekaragaman hayati yang tinggi dan penelitian yang telah ada terhadap spons telah menghasilkan senyawa-senyawa baru dengan struktur unik dan memiliki aktivitas farmakologis. Bioaktivitas senyawa yang diisolasi dari spons telah banyak dilaporkan antara lain kemampuannya meningkatkan system imun dari tikus yang terinfeksi parasit malaria, kemampuannya menghambat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* serta sebagai senyawa insektisida (2). Telah dilaporkan pula bahwa sebagian senyawa yang diisolasi dari spons (sebagai contoh Manzamine) mempunyai sifat toksik yang tinggi (3).

Saat ini pengobatan yang tersedia untuk penyakit-penyakit kanker dan infeksi, tidak mampu membasmi penyakit bahkan menimbulkan resistensi atau menyebabkan efek samping yang parah. Oleh karena itu

2

sangatlah penting adanya penemuan baru yang menuntun untuk ditemukannya senyawa yang mempunyai aktivitas yang lebih baik dan toksisitas yang rendah (3).

Uji aktivitas antikanker didasarkan atas adanya efek toksik pada sel (sitotoksik). Metode yang sering digunakan untuk aktivitas antikanker yaitu uji sitotoksitas (4). Uji sitotoksitas adalah pengembangan metode untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik baru termasuk diantaranya bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker (5). Berdasarkan sifat-sifat toksik senyawa tersebut maka sifat sitotoksik merupakan syarat mutlak dari obat antikanker. Obat antikanker sering dinamakan pula sebagai obat sitotoksik, sitostatik atau senyawa antineoplasma (4).

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 (6).

Menurut Alam, dkk (7) ekstrak kloroform spons *Callyspongia hispidocnulosa* memiliki $LC_{50} = 0,360 \mu\text{g/ml}$ dan ekstrak kloroform spons *Siphonochalina* sp memiliki $LC_{50} = 245,9 \mu\text{g/ml}$ terhadap larva *Artemia salina* Leach. Hasil uji dikatakan toksik dengan metode BST apabila senyawa yang diujikan memiliki $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ (8). Oleh karena itu, ekstrak kloroform spons *C. hispidocnulosa* dan *Siphonochalina* sp perlu

diteliti lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang dapat dikembangkan sebagai bahan baku obat antikanker.

Aktivitas ketoksikan terhadap larva *A. salina* diduga berhubungan dengan kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pembelahan sel telur bulubabi (*Tripneustus gratilla* Linn). Metode ini telah dilaporkan digunakan untuk mengetahui tingkat kontaminasi air laut (30) dan pengujian toksisitas fraksi quinon dari *Auxemma oncocalyx* (9).

Permasalahan dalam penelitian ini yaitu belum diketahui komponen kimia dari spons *C. Hispidoconulosa* dan *Siphanochalina* sp yang bertanggungjawab terhadap aktivitas penghambatan pembelahan sel telur bulubabi .

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan karakterisasi golongan senyawa bioaktif yang terdapat dalam spons *C. hispidoconulosa* dan *Siphanochalina* sp yang dimonitor oleh aktivitas penghambatan mitosis sel telur bulubabi (*T. gratilla* Linn) setelah fertilisasi. Produk yang dihasilkan dari penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan lebih lanjut dalam penemuan bahan baku obat antikanker yang berpotensi tinggi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Spons

Spons (*sponges*) merupakan organisme multiseluler dalam filum porifera yaitu invertebrata yang paling rendah tingkatannya. Binatang ini belum mempunyai susunan otot, daging maupun susunan syaraf dan belum memiliki saluran pencernaan makanan maupun organ-organ tubuh lainnya (10).

Spons bersifat diploblastik, terdiri dari dua lapisan sel tunas, tetapi bukan sebagai ektoderm dan endoderm, melainkan sebagai epiderm dan sel-sel leher. Spons bersifat hermafrodit. Reproduksi berlangsung secara seksual dan dengan pembentukan tunas. Spons mempunyai ruang sentral atau ruang gastral yang berfungsi sebagai kloaka . Ruang itu dikelilingi oleh dinding yang ditembus oleh sejumlah saluran yang tersusun majemuk . Ruang gastral ini terbuka pada ujung tubuh spons. Muara ruang sentral disebut oskulum. Butir-butir makanan mikroskopik melewati saluran-saluran itu dan masuk ke ruang gastral dengan bantuan gerakan-gerakan flagellum sel daripada dinding ruang gastral tersebut (Gambar.1) (11).

Spons dibagi menjadi 4 kelas yaitu : (12)

a. Kelas Calcarea (*Calcispongiae*)

Spons dari kelas ini mempunyai rangka yang tersusun dari kalsium karbonat, biasa hidup di lautan yang dangkal, memiliki

Choanocyte besar terdiri dari 2 ordo, yaitu ordo *Asconosa* dan ordo *Syconosa*. Contoh : *Leucosolenia* dan *sycon*

a. Kelas Hexactinellida (Hyalospongiae)

Spons ini banyak ditemukan pada kedalaman lebih dari 50 meter mempunyai siliceous specules. Beberapa spons dari kelas ini mempunyai syconoid, kerangka tubuhnya terbuat dari silikat dan spikulanya berduri enam terdiri dari 2 ordo yaitu ordo *Hexastorophora* dan ordo *Amphidiscophora*. Contoh : *Euplectella*

b. Kelas Demospongiae

Sekitar 90 % dari tubuh spons berpori, megasklera dan mikrosklera Sponging fibers, atau keduanya, dalam satu famili, mempunyai sedikit rangka spons dari famili spongilidae termasuk dalam kelas ini. Terdiri 8 ordo yaitu ordo *Carnosa*, ordo *Choristida*, ordo *Epipolasida*, ordo *Hadromerida*, ordo *Halicondrina*, ordo *Poeciloclerina*, ordo *Haploscerina*, dan ordo *keratosa*. Contoh *Epidatia*, *Cliona*, *spongilla*, *Spongia*.

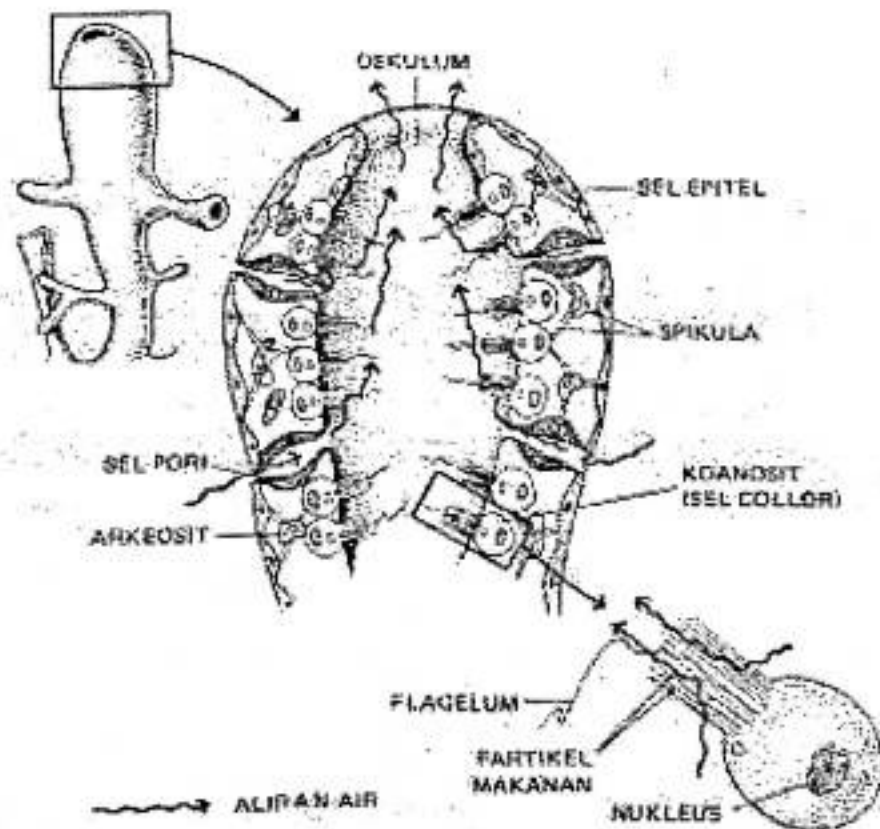
c. Kelas Sklerospongiae

Dari spons tropik sampai subtropik biasanya ditemukan di habitat cryptic, memiliki rangka calcareous yang besar. Contoh : *Calcifibrosporgia* dan *Merlia*.

Morfologi luar spons sangat dipengaruhi oleh faktor fisik, kimia dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya spesimen dari jenis yang sama pada lingkungan terlindung

atau pada perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung tegak dan tinggi. Pada perairan yang lebih dalam, spons cenderung memiliki bentuk tubuh yang lebih simetris dan lebih besar sebagai akibat dari lingkungan yang lebih stabil apabila dibandingkan dari jenis yang sama yang hidup pada perairan yang dangkal (13).

Banyak kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam beberapa spons antara lain terpen, polyketid, asetogenin, peptide, karotin, asam amino bebas, sterol, asam lemak, brominat phenol, derivate senyawa dibromotyrosin, bromopyron, alkaloid dengan berbagai variasi struktur dan bermacam-macam senyawa hasil biosintesis (14).



Gambar 1. Bentuk luar dan irisan melintang tubuh spons (11)

II.2 Metode Ekstraksi Bahan Alam

II.2.1 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan dan biota laut dengan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini berdasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan antara konsentrasi di dalam dan konsentrasi diluar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel.(15).

II.2.2 Jenis-Jenis Ekstraksi

Proses ekstraksi dapat dilakukan secara panas dan secara kering. Ekstraksi secara panas yaitu dengan metode refluks dan destilasi uap air, sedangkan ekstraksi dingin yaitu dengan maserasi, perkolasi dan soxhletasi (15).

II.2.3 Ekstraksi Secara Maserasi

Metode maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana, yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperature yang terlindung oleh cahaya. Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara

pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat halus yang cocok kedalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian penyari, dan ditutup, serta dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil sekali-kali diaduk, diserkai dan peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya sampai diperoleh 100 bagian. Pindahkan ke dalam bejana tertutup, biarkan di tempat sejuk dan terlindung dari cahaya selama 2 hari. (15).

II.2.4 Ekstraksi cair-cair

Penyarian merupakan proses pemisahan dimana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur.

$$K_d = \frac{C_1}{C_2}$$

Pelarut yang sering digunakan adalah air dan pelarut organik yang tidak bercampur dengan air. Dengan demikian senyawa organik polar sebagian besar akan terdapat dalam fase organik. Hal ini yang dikatakan "like dissolves like" yang berarti bahwa senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut polar dan sebaliknya.

Jika suatu ekstrak dipisahkan dalam dua pelarut yang tidak bercampur satu sama lain maka akan terbentuk dua lapisan. Komponen dari ekstrak akan memiliki kelarutan dalam dua lapisan tersebut (biasanya

disebut fase) dan setelah beberapa waktu akan tercapai keseimbangan konsentrasi dalam dua lapisan. Waktu yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan biasanya dipersingkat oleh pencampuran kedua fase tersebut dalam corong pisah (16).

II.3 Metode Pemisahan

II.3.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah cara pemisahan dengan adsorpsi pada lapisan tipis adsorben yang dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion anorganik, kompleks senyawa-senyawa organik dengan anorganik dan senyawa-senyawa organik baik yang terdapat di alam maupun senyawa-senyawa organik sintetis (17).

Pada kromatografi lapis tipis, fase diam berupa lapisan tipis (ketebalan 0,1-2 mm) yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, tetapi dapat pula terbuat plat polimer atau logam. Lapisan melekat pada permukaan dengan bantuan pengikat, biasanya dengan kalsium sulfat atau amilum (18).

Prinsip KLT adalah pemisahan secara fisikokimia. Lapisan yang memisahkan komponen kimia terdiri dari bahan yang berbutir-butir (fase diam), ditempatkan dalam penyangga berupa plat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan yang ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Setelah plat atau lapisan ditaruh

di dalam bejana yang ditutup rapat berisi fase gerak, pemisahan terjadi selama pengembangan (19).

Lapisan tipis pada KLT sering mengandung indikator fluoresensi yang ditambahkan untuk membantu penempakan bercak tanpa warna pada lapisan yang dikembangkan. Indikator fluoresensi ialah senyawa yang memancarkan sinar tampak jika disinari dengan sinar berpanjang gelombang lain, biasanya sinar UV. Indikator fluoresensi yang paling berguna ialah sulfide anorganik yang memancarkan cahaya jika disinari cahaya pada panjang gelombang 254 nm. Beberapa senyawa organik bersinar atau berfluoresensi jika disinari pada panjang gelombang 254 nm atau 366 nm dan dapat tampak dengan mudah (18).

II.3.2 Isolasi dengan Kromatografi Kolom Cair Vakum

Kromatografi kolom cair vakum menggunakan corong Buchner kaca masir atau kolom pendek dan dapat pula menggunakan kolom yang lebih panjang. Kolom kromatografi dikemas kering (biasanya dengan penjerap KLT 10-40 mikro meter) dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penjerap lalu divakumkan lagi. Kolom dihisap sampai kering dan siap dipakai. Sampel dilarutkan dalam pelarut yang cocok kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom atau pada lapisan prapenjerap (tanah diatomae, celite) dan dihisap perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan memvakumkannya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dengan pelarut yang

kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi.

Kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak. Berbeda dengan metode yang menggunakan tekanan pada bagian atas kolom untuk meningkatkan laju aliran, mengotak-atik kolom mudah karena kepala kolom berada dalam tekanan atmosfer (20).

II.4 Bioassay

Bioassay merupakan metode pengujian aktivitas suatu senyawa dari bahan alam maupun sintetik menggunakan makhluk hidup. Bioassay terdiri dari banyak metode diantaranya yaitu uji toksisitas, uji antimutagenik, uji daya hambat dll. Berdasarkan hasil bioassay tersebut dapat dilakukan isolasi senyawa dari bahan alam atau disebut *Bioassay Guided Isolation*(21).

II.5 Uji Toksisitas

Toksisitas adalah efek berbahaya dari suatu bahan kimia atau suatu bahan obat pada organ target. Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan dan keberbahayaan zat yang akan diuji. Adapun sumber dari zat toksik dapat berasal dari bahan alam maupun sintetik (22).

Toksisitas diukur dengan mengamati kematian hewan percobaan. Angka kematian hewan percobaan dihitung sebagai Median Lethal Dose

(LD₅₀) atau Median Lethal Concentration (LC₅₀). Penggunaan LC₅₀ dimaksudkan untuk pengujian ketoksikan dengan perlakuan terhadap hewan coba secara inhalasi atau dengan menggunakan media air (23).

Cara penentuan LC₅₀ ada beberapa cara yaitu a) dengan metode Reed dan Muench; b) Metode grafik; c) Perhitungan secara matematik; d) Metode grafik Probit. Disamping itu nilai LC₅₀ juga dapat digunakan untuk menentukan tingkat efek toksik suatu senyawa sehingga dapat juga untuk memprediksi potensinya (8).

Kanker adalah suatu proliferasi sel-sel yang tidak teratur. Pada beberapa kasus, laju proliferasi sangat tinggi. Yang membedakan kanker dengan pembelahan sel normal yaitu sel-sel kanker tidak pernah berhenti membelah (24). Uji aktivitas antikanker didasarkan pada adanya efek toksik pada sel (sitotoksik). Salah satu uji efek sitotoksik adalah dengan menggunakan metode antimitotik yaitu penghambatan pembelahan sel telur bulubabi setelah fertilisasi. (25). Dalam metode ini penghambatan pembelahan sel dihitung sebagai IC₅₀.

II.6 Uji Antimitosis

Penghambatan pembelahan sel merupakan suatu ukuran aktivitas antimitotik dari senyawa kimia. Senyawa kimia yang bersifat antimitotik 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 (25).

Studi perubahan 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 (6).

II.7 Sel Telur Bulubabi

Sel telur bulubabi berbentuk bola, terdiri atas inti sel, sitoplasma dengan kuning telur dan dikelilingi oleh membrane vitelin.

Proses pembelahan sel setelah terjadi fertilisasi terdiri dari beberapa tahap. Pembelahan pertama sel terjadi kira-kira 2-3 jam setelah terjadinya fertilisasi (25). Selanjutnya pembelahan tambahan terjadi dengan interval sekitar 20 menit untuk membentuk 4 sel, 8 sel, 16 sel, dan seterusnya. Setelah 6 jam, akan terbentuk blastula. Perkembangan selanjutnya akan menampakkan terbentuknya gastrula pada 1 atau 2 hari kemudian (28).

II.8 Bulubabi

II.8.1 Klasifikasi

Kingdom	: Protista
Filum	: Echinodermata
Kelas	: Echinoidea
Subkelas	: Regularia
Bangsa	: Aulodonta

- Suku : Toxopneustidae
Marga : Tripneustus
Jenis : *Tripneustus gratilla* Linn. (26)

II.8.2 Morfologi

Bulubabi atau Landak laut hidup di atas batu karang atau dalam lumpur pada daerah pantai atau di dasar laut pada kedalaman sampai 5000 m. Hewan ini bergerak dengan menggunakan duri yang bersendi dan kaki ambulakral. Kecuali itu kaki juga berfungsi meraba objek pada waktu berada di dasar laut.

Pada umumnya landak laut mempunyai jerohan atau vicera tersimpan dalam cangkok yang tersusun menurut 10 jajaran lempengan kapur yang tersambung bersama membentuk bola. Pada cangkok terdapat tonjolan atau tuberculum sebagai tempat persendian duri-duri. Tiap duri merupakan bentuk kristal dari CaCO_3 yang ujung pangkalnya agak melebar tempat sendi dengan tuberculum. Pangkal duri ini terikat dengan otot sehingga duri dapat digerakkan. Di antara duri terdapat tantakel. Tantakel berfungsi menjaga tubuh agar selalu bersih dan untuk menangkap makanan yang kecil-kecil.

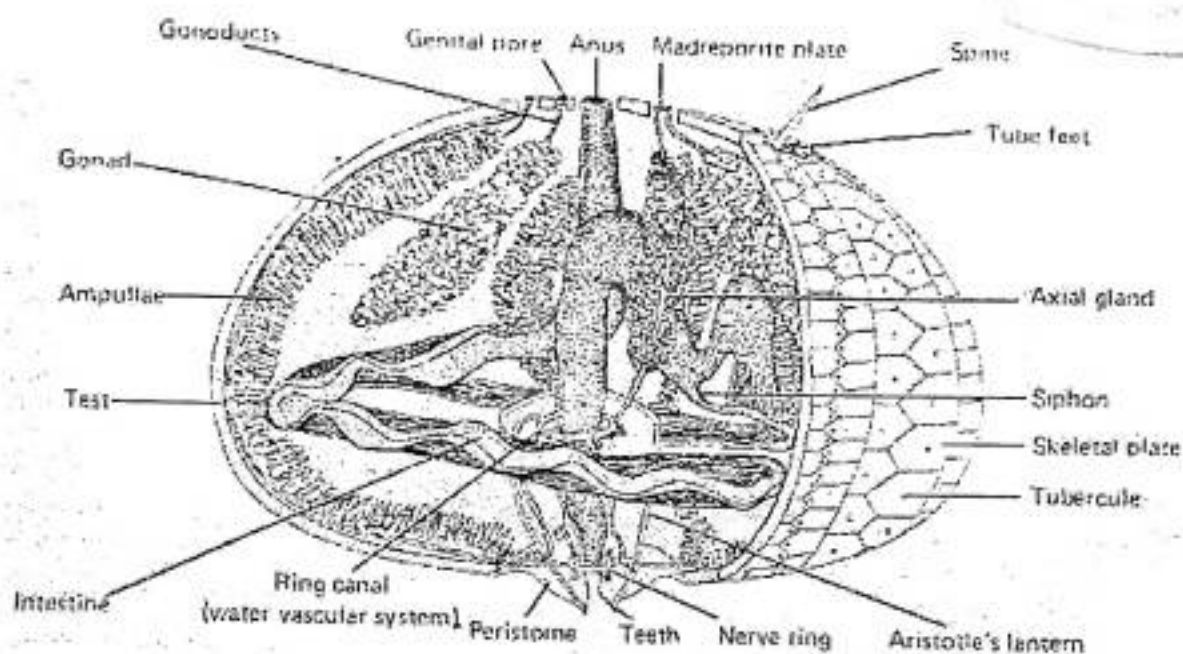
Saluran pencernaan yang panjang melingkar di dalam cangkang. Saluran pencernaan dimulai dari mulut terus ke oesophagus, lambung yang diperluas dengan kantung-kantung, intestinum yang bagian akhir disebut rectum, dan berakhir dengan anus. Pada oesophagus terdapat

saluran siphon yang memiliki silia kuat yang menghubungkan oesophagus dengan intestinum.

Anus terletak di pusat tubuh pada permukaan aboral, terletak di antara lempengan kapur yang besar yang mengandung 5 atau 4 atau 2 lubang genital. Mulut yang besar terletak di daerah oral dikelilingi oleh 5 buah gigi yang kuat dan tajam. Gigi tersebut disokong oleh 5 rangka samping di sebelah dalam cangkok yang terkenal sebagai "Lentera aristoteles".

Terdapat 10 insang yang menjorok dari membrane peritoneum. Madreporit terdapat di daerah aboral, sedang saluran cincin melingkar oesophagus dan saluran radial tetap dalam interior cangkok yang terhubung dengan kaki ambulakral. Saraf cincin melingkari mulut.

Terdapat 5 gonad yang menempel mesenteris ke bagian permukaan aboral. Dari masing-masing gonad terdapat saluran ke lubang genital. Telur-telur dan sperma dilepaskan ke dalam air laut, kemudian terjadi pembuahan yang selanjutnya tumbuh menjadi larva plutea yang akan mengalami metamorphosis setelah 5 atau 6 minggu.



Gambar 2. Anatomi Tubuh Bulubabi (28)

Semua Echinoidea membersihkan tubuh dengan jalan menggerakkan duri-duri dan tantakel. Bersama gerakan itu sisa-sisa bahan makanan dikeluarkan dari anus. Hewan ini memakan bermacam makanan di laut, misalnya hewan lain yang telah mati, organisme kecil lainnya, rumput laut, di samping itu juga mencerna lumpur atau pasir yang mengandung bahan organik (27).

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan

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

Bahan-bahan yang digunakan adalah spons *C. hispidocnulus* dan *Siphonochalina* sp, 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, FeCl₃ 5 %, H₂SO₄ 10 %.

III.2 Penyiapan Sampel Penelitian

III.2.1 Pengambilan Sampel

Spons *C. hispidocnulus* dan *Siphonochalina* sp diperoleh dari koleksi sampel Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Universitas Hasanuddin. Sampel spons ini diperoleh dari perairan pulau Barrang Lompo, Makassar.

III.2.2 Pengolahan Sampel

Sampel spons dibersihkan kemudian dipotong kecil-kecil.

III.3 Ekstraksi dan Partisi

Sampel spons *C. hispidoconulosa* dan *Siphanochalina sp* yang telah dipotong-potong ditimbang masing-masing sebanyak 500 g, kemudian diekstraksi secara maserasi menggunakan cairan penyari metanol selama 1 x 24 jam dan dilakukan penyarian sebanyak dua kali. Filtrat disaring dan diuapkan menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak metanol kental sebanyak 2 g. Selanjutnya ekstrak metanol dipisahkan dengan kloroform-air menggunakan corong pisah, lapisan kloroform dikumpulkan dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kloroform .

III.4 Isolasi Senyawa Aktif Ekstrak Kloroform

Ekstrak kloroform kedua spons di KLT untuk menentukan fase gerak yang akan digunakan pada kromatografi cair vakum. Ekstrak kloroform spons *C. hispidoconulosa* 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. Sedangkan ekstrak kloroform spons *Siphanochalina sp* menggunakan fase gerak Heksan; Heksan : etil asetat (20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1) ; Etil asetat : Heksan (5:1); kloroform; Kloroform: metanol (1:1); Metanol. Fase gerak tersebut masing-masing berdasarkan profil KLT ekstrak kloroform kedua spons.. Fraksi-fraksi yang diperoleh diuapkan kemudian di KLT . Fraksi yang memiliki kesamaan Rf dan warna 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. Secara skematis, prosedur ini terlampir pada lampiran 1 & 2.

III.5 Uji Aktivitas dengan Metode Uji Antimitotik Sel Telur Bulubabi

III.5.1 Penyiapan Sel telur dan Sperma Bulubabi

Bulubabi jantan dan betina diinduksi 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 . Setelah itu dimasukkan pada lemari pendingin. Fertilisasi dilakukan dengan cara 1 ml sperma dan 4 ml sel telur difertilkan dalam gelas kimia yang berisi 50 ml air laut bebas protozoa.

III.5.2 Penyiapan Sampel dan Pelaksanaan Uji

Frakasi hasil kolom kromatografi cair vakum ekstrak kloroform kedua spon yang telah digabung berdasarkan kesamaan Rf dan warna , masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg kemudian disuspensikan dengan Na CMC sebanyak 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ sebagai stok. Kemudian dari stok tersebut dipipet 100 μl ke dalam tabung eppendorf yang telah berisi 800 μl air laut bebas protozoa lalu ditambahkan zigot yang diperoleh setelah 10 menit terjadinya fertilisasi sebanyak 100 μl untuk mendapatkan konsentrasi sampel 100 $\mu\text{g/ml}$. Untuk 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 µg/ml. Kemudian dari stok ini dipipet 1, 10, dan 100 µl ke dalam tabung eppendorf yang masing-masing telah berisi 899, 890, dan 800 µl air laut bebas protozoa lalu ditambahkan zigot yang diperoleh setelah 10 menit terjadinya fertilisasi sebanyak 100 µl untuk mendapatkan konsentrasi 1,10, dan 100 µg/ml . Kontrol negatif dibuat dua jenis yaitu kontrol air laut dan kontrol dengan menggunakan Na CMC konsentrasi 100 µg/ml . Kontrol positif menggunakan vinkristin dengan konsentrasi 0,01 µg/ml, 0,1µg/ml, dan 1 µg/ml. Dilakukan pengulangan 3 kali untuk tiap sampel uji dan control. Selanjutnya disimpan pada suhu 15-20 °C dengan diselingi pengocokan. Pengamatan sel yang membelah dilakukan setelah 2 jam inkubasi. Skema kerja dapat dilihat pada lampiran 3.

III.6 Identifikasi Senyawa Aktif

Subfraksi etil asetat yang memiliki IC 50 paling rendah (subfraksi I) ditotolkan pada lempeng KLT kemudian dielusi dengan EtOAc : MeOH : NH₄OH (100 ml : 20 ml : 150 µl), kemudian kromatogramnya disemprot dengan menggunakan penampak noda sebagai berikut :

1. Pereaksi H₂SO₄ 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.

III.7 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan diolah dengan analisis probit.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Hasil kromatografi cair vakum ekstrak kloroform spons *C. hispidoconulosa* diperoleh 15 fraksi yang kemudian digabung menjadi 4 fraksi dan ekstrak kloroform spons *Siphonochalina* sp diperoleh 12 fraksi yang kemudian digabung menjadi 3 fraksi. Fraksi gabungan tersebut selanjutnya diuji aktivitas antimitotiknya terhadap pembelahan sel telur bulubabi. Dari pengujian tersebut diperoleh hasil; fraksi yang paling aktif pada spons *C. hispidoconulosa* adalah fraksi 4 dan fraksi yang paling aktif pada spons *Siphonochalina* sp adalah fraksi 3 (tabel 1).

Tabel 1. Hasil Pengamatan Penghambatan Pembelahan Sel Telur Bulubabi (*T. gratilla* Linn) Beberapa Fraksi Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons *Callyspongia hispidoconulosa* dan *Siphonochalina* sp

Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Penghambatan Pembelahan Sel (%)			
		Isolat I	Isolat II	Isolat III	Isolat IV
<i>C. hispidoconulosa</i>	100	59,6	82,1	71,7	100
<i>Siphonochalina</i> sp		84	91,6	100	-

Ket : Hasil isolasi dari ekstrak kloroform spons *Siphonochalina* sp hanya terdiri dari 3 isolat.

Selanjutnya masing-masing fraksi paling aktif dari kedua spons dilarutkan dengan etil asetat sehingga diperoleh subfraksi tidak larut etil asetat (subfraksi I) dan subfraksi larut etil asetat (subfraksi II). Masing-masing subfraksi tersebut diuji kembali aktivitas antimitosisnya. Dari hasil

pengujian diperoleh bahwa subfraksi I lebih aktif dari subfraksi II sebagai antimitosis (tabel 3 dan 4). Data yang diperoleh kemudian diolah secara analisis probit dan diperoleh hasil spons *C.hispidoconulosa* memiliki $IC_{50} = 21,60 \mu\text{g/ml}$ dan spons *Siphanochalina* sp memiliki $IC_{50} = 15,14 \mu\text{g/ml}$. Sedangkan untuk kontrol positif vinkristin memiliki $IC_{50} = 0,183 \mu\text{g/ml}$.

Analisis dengan kromatografi lapis tipis terhadap subfraksi I spons *C. Hispidoconulosa* dan *Siphanochalina* sp dengan berbagai penampak noda terdapat dalam tabel berikut.

Tabel 2. Hasil Analisis KLT Ekstrak Kloroform *C. hispidoconulosa* dan *Siphanochalina* sp dengan Berbagai Penampak Noda

No	Sampel	Rf	Penampak noda				
			UV 254 nm	UV 366 nm	H ₂ SO ₄ 10 %	Dragendoff	FeCl ₃ 5%
1.	<i>C. hispidoconulosa</i>	0,2	Ungu	Hijau muda	Hitam	Orange	-
		0,385	Ungu	Hijau	Hitam	Orange	-
2.	<i>Siphanochalina</i> sp	0,215	Ungu	Hijau muda	Hitam	Orange	-
		0,261	-	-	-	Orange	-
		0,369	Ungu	Hijau	-	Orange	-

IV.2 Pembahasan

Sampel spons *C. hispidoconulosa* (Gambar. 6) dan *Siphanochalina* sp (Gambar. 7) adalah spons yang dikoleksi dari perairan pulau Barrang Lompo Makassar. Sebelum diekstraksi, sampel terlebih dahulu dipotong-potong kecil. Hal ini dimaksudkan untuk memperbesar luas permukaan sehingga kontak antara cairan penyari dan sampel lebih besar. Sampel diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut

metanol karena metanol memiliki sifat semipolar yang berarti dapat menyari komponen kimia baik polar maupun nonpolar.

Ekstrak metanol yang diperoleh dari hasil maserasi masih mengandung komponen kimia yang polar, semipolar dan nonpolar. Untuk memisahkan komponen kimia tersebut dilakukan partisi cair-cair. Prinsip partisi ini menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur yaitu pelarut kloroform dan air. Komponen kimia yang sifatnya relatif nonpolar akan larut pada kloroform sedangkan yang polar bersama garam akan larut dalam air. Dengan adanya pemisahan, akan memudahkan dalam penelusuran senyawa bioaktif tertentu dari spons.

Uji antimitotik merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi aktivitas sitotoksik senyawa kimia. Dalam metode ini digunakan sel telur bulubabi karena sel telur bulubabi adalah bahan yang telah sering digunakan dalam uji biologis untuk mengukur toksisitas suatu bahan /substansi karena metode ini mempunyai prosedur yang mudah, cepat, sensitive dan biaya yang relatif lebih murah (29).

Penentuan IC_{50} untuk mengetahui efek toksik dari fraksi-fraksi maupun subfraksi dari ekstrak kloroform spons *C. hispidocnulus* dan *Siphonochalina* sp dengan kontrol negatif air laut dan Na CMC serta kontrol positif vinkristin yang dalam hal ini dilakukan terhadap sel telur bulubabi (Gambar.8). Pengamatan ini dilakukan setelah inkubasi 2 jam dengan menghitung jumlah sel yang membelah dan tidak membelah.

Untuk memisahkan komponen kimia dari ekstrak kloroform dilakukan isolasi dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum. Metode ini baik untuk memisahkan komponen kimia yang jumlahnya sedikit dalam ekstrak dan hasilnya cepat diperoleh. Fase gerak yang digunakan berdasarkan hasil orientasi KLT yaitu fase gerak heksan : etil asetat (5:1). Penggunaan fase gerak n- heksan : etil asetat dengan banyak variasi perbandingan karena diharapkan komponen kimia terelusi sedikit demi sedikit sehingga proses pemisahannya lebih baik.

Hasil pemisahan dengan metode kromatografi cair vakum (Gambar 11) diperoleh 15 fraksi untuk spons *C. hispidoconulosa* yang selanjutnya digabung menjadi 4 fraksi. Untuk spons *Siphonochalina* sp (Gambar 14) diperoleh 12 fraksi yang selanjutnya digabung menjadi 3 fraksi berdasarkan kesamaan noda pada KLT. Setelah dilakukan pengujian antimitosis terhadap sel telur bulubabi yang telah difertilkan, diperoleh hasil bahwa fraksi yang paling aktif untuk spons *C. hispidoconulosa* adalah fraksi 4 dan untuk spons *Siphonochalina* sp adalah fraksi 3 (Gambar.17).

Isolasi dilanjutkan dengan melarutkan fraksi-fraksi yang paling aktif tersebut dengan etil asetat sehingga diperoleh subfraksi I (tidak larut etil asetat) dan subfraksi II (larut etil asetat) untuk kedua spons. Hal ini dilakukan untuk memisahkan senyawa - senyawa kurang polar yang tercampur dalam fraksi aktif. Hasil pemisahan dapat dilihat pada gambar 18. Selanjutnya subfraksi ini diuji kembali aktivitas antimitosisnya.

Subfraksi I (tidak larut etil asetat) untuk kedua spons dilarutkan dengan air dan subfraksi II (larut etil asetat) disuspensikan dengan Na CMC. Pembuatan konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, dan 100 $\mu\text{g/ml}$ dimaksudkan untuk melihat respon pembelahan sel telur bulubabi pada beberapa konsentrasi.

Dari hasil pengamatan diperoleh bahwa subfraksi I (tidak larut etil asetat) ekstrak kloroform spons *C. hispidoconulosa* memiliki $\text{IC}_{50} = 21,60$ $\mu\text{g/ml}$ dan spons *Siphanochalina* sp memiliki $\text{IC}_{50} = 15,14$ $\mu\text{g/ml}$. Jika dibandingkan dengan senyawa vinkristin murni yang memiliki $\text{IC}_{50} = 0,183$ $\mu\text{g/ml}$ maka subfraksi I dari kedua spons tersebut memiliki potensi yang sangat besar untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat antikanker.

Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis terhadap subfraksi I spons *C. hispidoconulosa* dan spons *Siphanochalina* 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 2 noda pada spons *C. hispidoconulosa* (R_f 0,2; 0,385). Untuk spons *Siphanochalina* sp 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 R_f yang berbeda tersebut menunjukkan bahwa dalam subfraksi tersebut terdapat sedikitnya 2 senyawa alkaloida pada spons *C. hispidoconulosa* dan 3 senyawa pada *Siphanochalina* sp.

Penampak noda dengan FeCl_3 memberikan hasil yang negatif terhadap senyawa fenol (Gambar.19)

Senyawa berefek antikanker yang berasal dari spons yang pernah dilaporkan antara lain 8-Hidroksimanzamin A (30), isokuinolin (31) dan β -karboline (30). Semua senyawa tersebut merupakan golongan alkaloida.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Subfraksi I (tidak larut etil asetat) ekstrak kloroform spons *C. hispidocoenulosa* menunjukkan tingkat penghambatan pembelahan sel yang tinggi terhadap uji antimitosis sel telur bulu babi (*T. gratilla*) yaitu dengan $IC_{50} = 21,60 \mu\text{g/ml}$
2. Subfraksi I (tidak larut etil asetat) ekstrak kloroform spons *Siphonochalina* sp menunjukkan tingkat penghambatan pembelahan pembelahan sel yang tinggi terhadap uji antimitosis sel telur bulu babi (*T. gratilla*) yaitu dengan $IC_{50} = 15,14 \mu\text{g/ml}$
3. Senyawa kimia yang memiliki aktivitas antimitosis yang terdapat pada subfraksi I (tidak larut etil asetat) untuk kedua spons diduga golongan alkaloida .

V.2 Saran

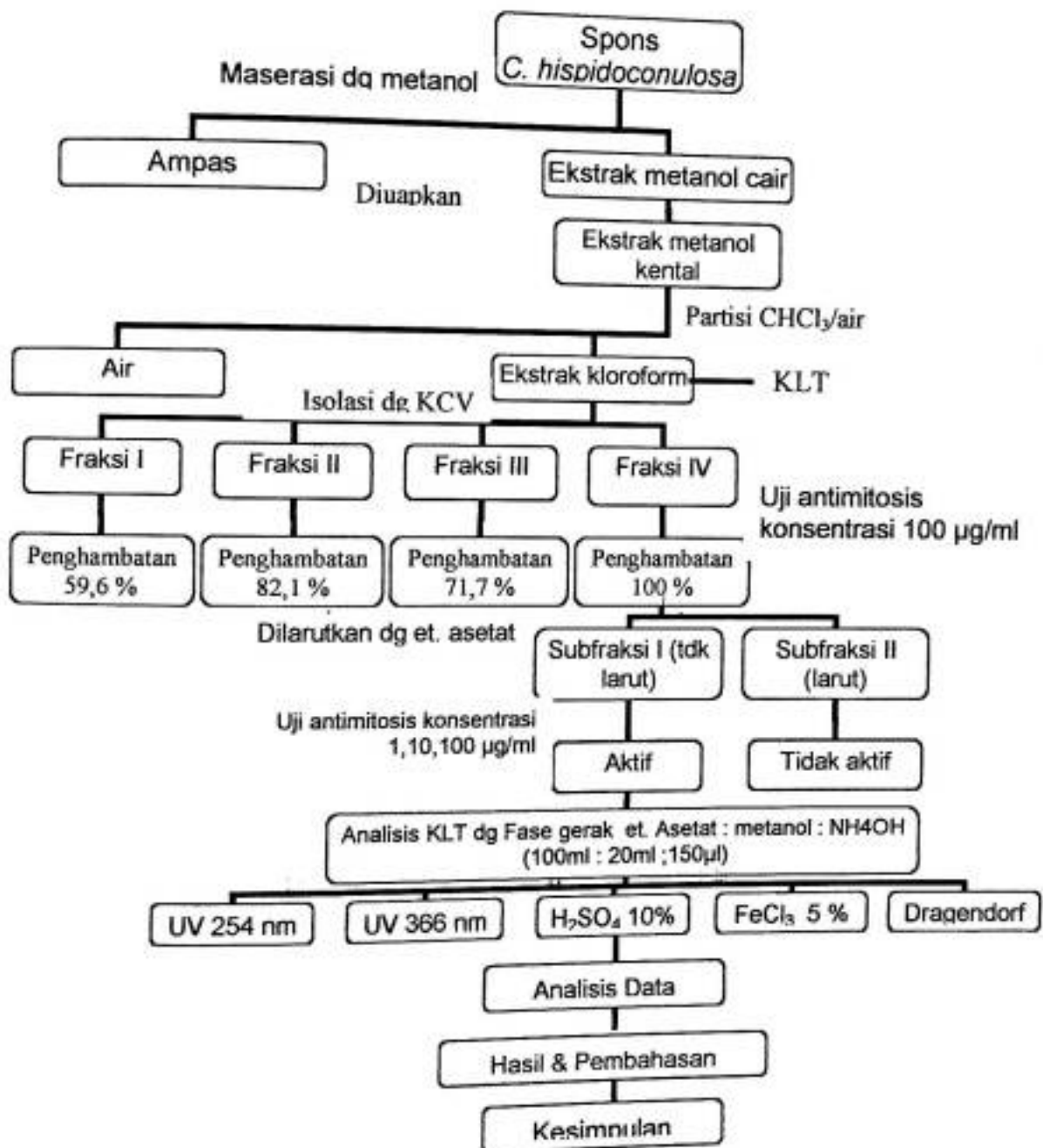
Penelitian ini dilanjutkan untuk memperoleh senyawa murni dan menentukan struktur komponen kimia spons *C. hispidocoenulosa* dan *Siphonochalina* sp.

DAFTAR PUSTAKA

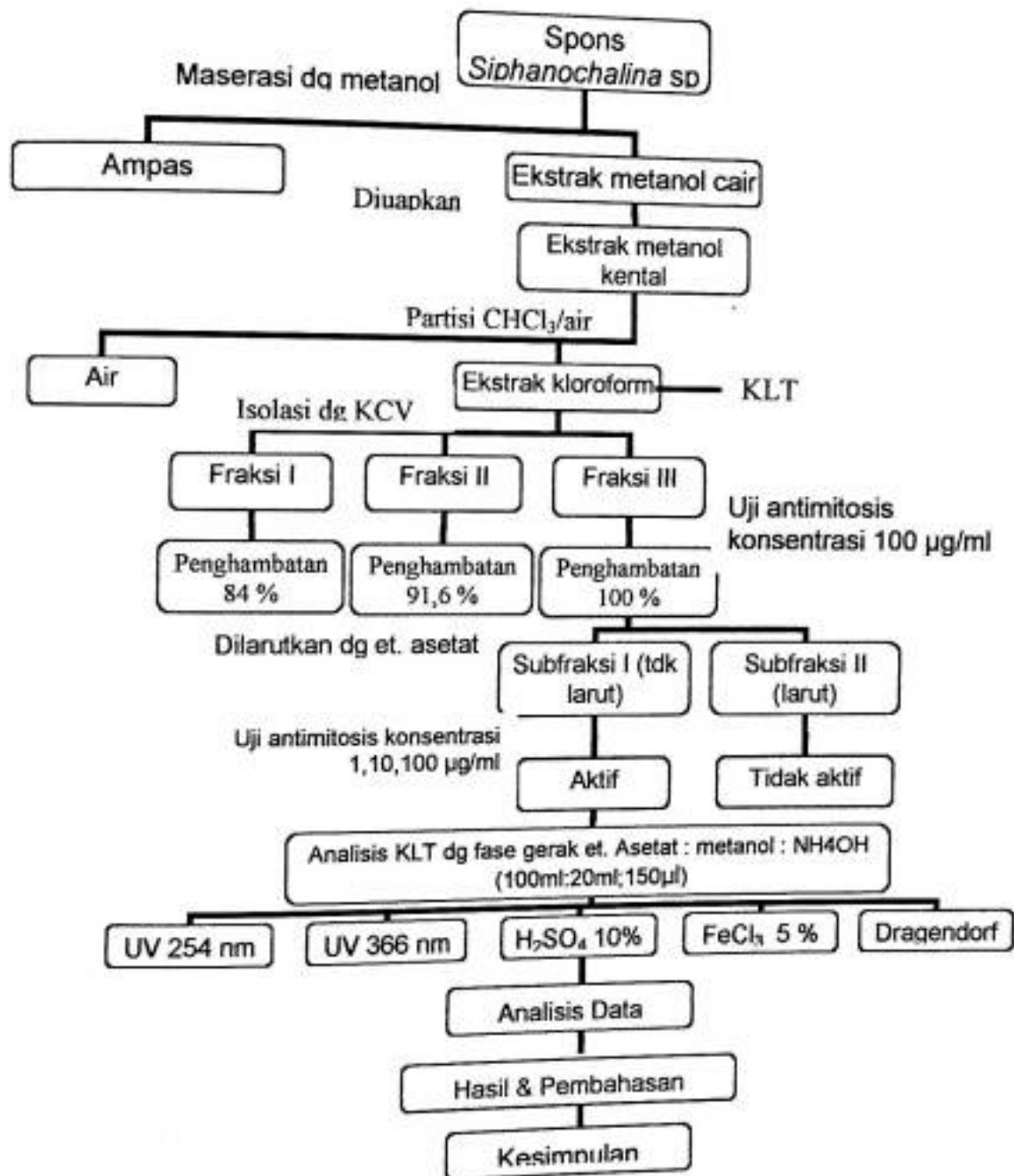
1. Isnansetyo, A dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phitoplankton dan Zooplankton, Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut*. Cetakan I. Penerbit Kanisius. Jogjakarta
2. Ang, K.K.H., Holmes, M.J.m Kara, U.A.K. 2001. Immune-mediated Parasite Clearance in Mice Infated with *Plasmodium berghei*, Foolowing with Manzamine A. *Parasitol Res.* 87
3. El sayed, K.A., Kelly, M., Kara, U.A.K., Ang, K.K.H., Katsuyama, I., Dunbar, D.C., Khan, A.A., Hamann, M.T. 2001. New Manzamine Alkaloids with Potent againts Infectious Diseases. *J.Am. Chem.Soc.* 123. 1804-1808
4. Mae, S.H.W., Mubarika, S., Ibnu Ganjar, G., Wahyuono, S. 2003. Pencarian Senyawa Antikanker Dari Bahan Alam. *Majalah Obat Tradisional*. Vol.8.No.26.: 1-3
5. Siswandono & Soekardjo B. 1995. *Kimia Medisinal*. Universitas Airlangga Press. Surabaya. 407
6. 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.
7. 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
8. Anderson, J.E., Goetz, C.M., Mc Laughlin, J.L. 1991. A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. in *Natural Product Chemistry*. Editor : Elsevier. Amsterdam. 1
9. Costa-Latufo, L.V., Ferreira, M.A.D., Lemos, T.L.G., Pessoa, O.D.L., Viana, G.S.B & Cunha, G.M.A. 2002. Toxycity to sea urchin eggs development of the quinine fraction from *Auxemma oncocalyx* . *Braz J. Med. Biol. Res.* 35(8). 1
10. Hooper, J. 1997. *Guide to Sponge Collection and identification* Version March. Queensland. Australia. 37.
11. Brotowidjoyo, M. D., 1993. *Zoologi Dasar*. Erlangga. Jakarta. 71-72
12. Wallace, R.L., Taylor, W.K. 1997. *Invertebrate Zoology A Laboratory Manual*. edition 5. Prentice-Hall Inc. New Jersey. 38-41.
13. Amir, I dan Agus Budiyanto. 1996. Mengenal Spons Laut (Demospongiae) Secara Umum. *Oseana*. XXI(2). 15-31.
14. Cannel, R.J.P. 1998. *Methods in Biotechnology : Natural Products Isolation*. Humana Press. Totowa. New Jersey. 409-423.
15. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. 1986. *Sediaan Galenik*. Edisi II. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Bhakti Husada. Jakarta. 4-26.

16. Sudjadi. 1988. Metode Pemisahan. Edisi I. Kanisus. Yogyakarta. 60.
17. Adnan, M. 1997. Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan makanan*, Edisi Pertama. Cetakan Pertama. Penerbit ANDI. Yogyakarta. 9
18. Gritter, R.J., Bobbits, J.M. Schwarting, A.E. 1991. Pengantar Kromatografi. Penerjemah Dr. Kosasih Padmawinata & Dr. Iwan Sudiro. Penerbit ITB. Bandung. 6.
19. Stahl, E. 1985. Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi. Penerjemah Dr. Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung. 73
20. Hostettmann, K., M. Hostettmann dan A. Marston. 1985. Cara Kromatografi Preparatif, Penggunaan Pada Isolasi Senyawa Alam. Penerjemah Dr. Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung. 33-34
21. Meyer, B.N., et al., (1982), Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Drug Information Journal*, Vol. 32, 513-524.
22. Loomis, T.A., (1978), "Toksikologi Dasar", Edisi III, Penerjemah Imono Argo, IKIP Semarang Press, 4, 6-21.
23. Casarret, L.J., Doull, J. 1975. Toxicology, The Basic Science of Poison. First Edition. Mac Millan Publishing. Co. Inc. New York. 7-21
24. Kimball, J.W. 1983. *Biologi*. Terjemahan oleh H. Siti Soetarni Tjitrosoepomo & Nawangsari Sugiri. 1992 Erlangga. Jakarta. 418
25. Thomson, W.J., Rahman, A., Ginoudhary, M. I.2001. *Bioassay Techniques For Drug Development*. Harword academic Publisher. Australia. 39-41
26. Radiopoetra. 1983. Zoologi. Cet.2. Erlangga. Jakarta Pusat. 391-385
27. Jasin, M. 1992. Zoologi Invertebrata. Sinar Wijaya. Surabaya . 265-267
28. Sumich, J.L & Dudle, G.H. 1992. Laboratory and Field Investigation In Marine Biologi. Ed.4. W.M.C Brown Publishers. 106
29. Dinnel, P. A., J.M. Link & Q. J. Stober. 1987. Improved methodology for sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Arch. Env. Contam & Toxycol* Vol16: 288
30. Ichiba, T., Corgiat, J.M., Scheuer, P.J., Kelly-Borges, M. 1994. 8-Hydroxymanzamine A & β -Carboline alkaloid from a sponge *Pachypellina* sp. *J.Nat.Prod.* Vol.57.168
31. Fontana, A., Cavaliere, P., Wahidulla, S., Naik, G.C., Cimono G. 2000. A new antitumor isoquinoline alkaloid from the marine nudibranch *Jorunna funebris*. *Tetrahedron*. Vol 56.73

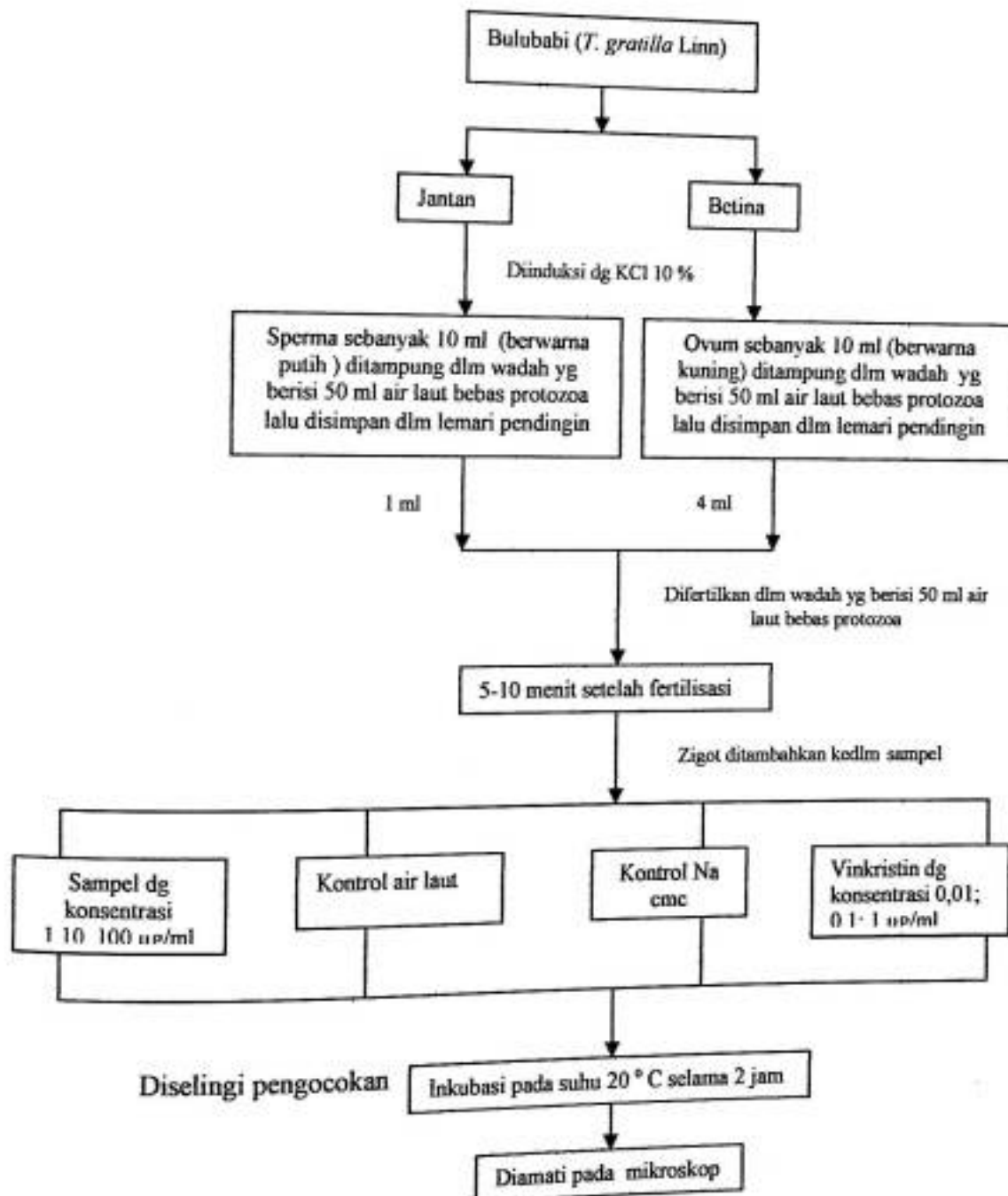
Lampiran. 1

Skema Kerja Ekstraksi, Isolasi & Karakterisasi Senyawa Aktif Spons *C. hispidoconulosa*

Lampiran 2

Skema Kerja Ekstraksi, Isolasi & Karakterisasi Senyawa Aktif Spons *Siphonochalina* sp

Lampiran.3

Skema Kerja Pengujian Aktivitas Antimitosis dengan Sel Telur Bulubabi (*T. gratilla*)

Tabel 3. Hasil Pengamatan Pembelahan Sel Telur Bulubabi (*T. gratilla*) Setelah 2 jam Perlakuan dengan Subfraksi Isolat IV Ekstrak Kloroform *Callyspongia hispidocnulus*

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Subfraksi					
	Subfraksi I (tidak larut Etilasetat)			Subfraksi II (larut etil asetat)		
	Jumlah sel yg membelah	Jumlah sel yg tidak membelah	% penghambatan	Jumlah sel yg membelah	Jumlah sel yg tidak membelah	% penghambatan
1 ($\mu\text{g/ml}$)	26	0	1,03	16	0	0
	41	1		24	0	
	29	0		31	0	
	96	1		71	0	
	23	0	1,35	8	0	0
	30	1		29	0	
	20	0		24	0	
	73	1	133	0		
	40	0	0,71	21	0	0
	45	1		41	0	
56	0	27		0		
141	1	89		0		
% penghambatan rata-rata			1,028 \pm 0,3			0
10 ($\mu\text{g/ml}$)	25	1	1,71	22	1	1,57
	48	1		38	0	
	42	0		75	1	
	115	2		135	2	
	35	0	1,8	32	1	1,14
	32	1		22	0	
	42	1		32	0	
	109	2	86	1		
	45	1	1,66	19	0	1,63
	43	1		23	0	
30	0	18		1		
118	2	60		0		
% penghambatan rata-rata			1,72 \pm 0,07			1,45 \pm 0,27
100 ($\mu\text{g/ml}$)	2	26	97,6	20	1	1,19
	0	28		40	0	
	0	28		23	0	
	2	82	83	1		
	0	11	100	22	0	1,58
	0	11		24	0	
	0	11		16	1	

	0	33		62	1	
	0	33	98	52	1	1,73
	2	31		67	2	
	0	35		51	0	
	2	99		170	3	
% penghambatan rata-rata			98,5±1,28			1,5±0,28

Tabel 4. Hasil Pengamatan Pembelahan Sel Telur Bulubabi (*T. gratilla*) Setelah 2 jam Perlakuan dengan Subfraksi Isolat III Ekstrak Kloroform *Siphonochalina* sp

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Subfraksi					
	Subfraksi I (tidak larut Etil asetat)			Subfraksi II (larut etil asetat)		
	Jumlah sel yg membelah	Jumlah sel yg tidak membelah	% penghambatan	Jumlah sel yg membelah	Jumlah sel yg tidak membelah	% penghambatan
1 ($\mu\text{g/ml}$)	16	0	1,56	17	0	0
	21	0		26	0	
	26	1		20	0	
	63	1		63	0	
	25	0	1,66	21	0	0
	40	1		46	0	
	53	1		29	0	
	118	2		96	0	
	37	0	1,2	40	0	0
	65	0		58	0	
	60	1		30	0	
	162	1		128	0	
% penghambatan rata-rata			1,47±0,24			0
10 ($\mu\text{g/ml}$)	48	2	9,6	28	0	0
	36	5		46	0	
	29	5		43	0	
	151	12		117	0	
	40	6	11,11	27	0	0
	45	4		23	0	
	35	5		31	0	
	120	15		81	0	
	24	2	11,68	21	0	0
	19	5		63	0	
	25	2		60	0	
	47	9		144	0	
% penghambatan rata-rata			10,79±1,07			0

100 ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	98	14	0	2,27
	1	19		13	0	
	0	10		16	1	
	1	49	98,3	43	1	2,77
	1	23		26	1	
	0	14		23	1	
	0	20		21	0	
	1	57	100	70	2	2,43
	0	18		20	1	
	0	17		29	1	
	0	13		31	0	
	0	48	98,7 \pm 1,708	80	2	2,49 \pm 0,25
% penghambatan rata-rata						

Tabel 5. Hasil Pengamatan Kontrol Negatif

	Jumlah membelah (sel)	Jumlah tidak membelah (sel)	% penghambatan
Kontrol air laut	38	0	0
	23	0	
	16	0	
	77	0	
	29	0	0
	36	0	
	34	0	
	99	0	
	25	0	0
	32	0	
30	0		
87	0		
% penghambatan rata-rata			0
Kontrol Na-cmc	19	0	0
	25	0	
	28	0	
	72	0	
	17	0	0
	32	0	
	20	0	
	69	0	
	21	0	0
	23	0	
33	0		
67	0		
% penghambatan rata-rata			0

Tabel 6. Hasil Pengamatan Kontrol Positif

Konsentrasi Vinkristin	Jumlah membelah (sel)	Jumlah tidak membelah (sel)	% penghambatan
0,01 µg/ml	18	1	
	9	0	
	15	0	
	42	1	2,38
	26	1	
	25	1	
	17	0	
	68	2	2,94
	10	0	
	16	0	
	13	1	
	39	1	2,5
% penghambatan rata-rata			2,6±0,29
0,1 µg/ml	37	1	
	19	2	
	28	2	
	84	5	7,69
	26	0	
	14	2	
	17	2	
	57	4	7,01
	26	2	
	30	3	
	18	1	
	74	6	7,5
% penghambatan rata-rata			7,4±0,35
1 µg/ml	0	27	
	0	15	
	0	10	
	0	52	100
	1	11	
	2	18	
	1	13	
	4	42	91,30
	0	26	
	0	26	
0	18		
	0	70	100
% penghambatan rata-rata			97,1±5,02

Tabel 7. Hasil Perhitungan IC₅₀ Menurut Metode Grafik Probit Log-Konsentrasi

Nama Sampel	Log Konsentrasi (X)	Probit (Y)	Pers. Garis	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>C. hispidoconulosa</i>	0	2,68	$y = 1,991 + 2,255x$ $r = 0,884$	21,60
	1	2,87		
	2	7,19		
<i>Siphanochalina sp</i>	0	2,80	$y = 2,38 + 2,22x$ $r = 0,950$	15,14
	1	3,76		
	2	7,24		
Vinkristin	-2	3,05	$y = 6,413 + 1,919x$ $r = 0,918$	0,183
	-1	3,54		
	0	6,89		

Perhitungan IC₅₀ subfraksi I spons *C. hispidoconulosa*

Persamaan garis linear :

$$y = a + bx$$

y = Persentase penghambatan pembelahan sel dalam satuan probit

x = Log-konsentrasi subfraksi I

a = Intersep

b = Kemiringan

Berdasarkan hasil perhitungan regresi diperoleh :

$$a = 1,991$$

$$b = 2,255$$

$$r = 0,884$$

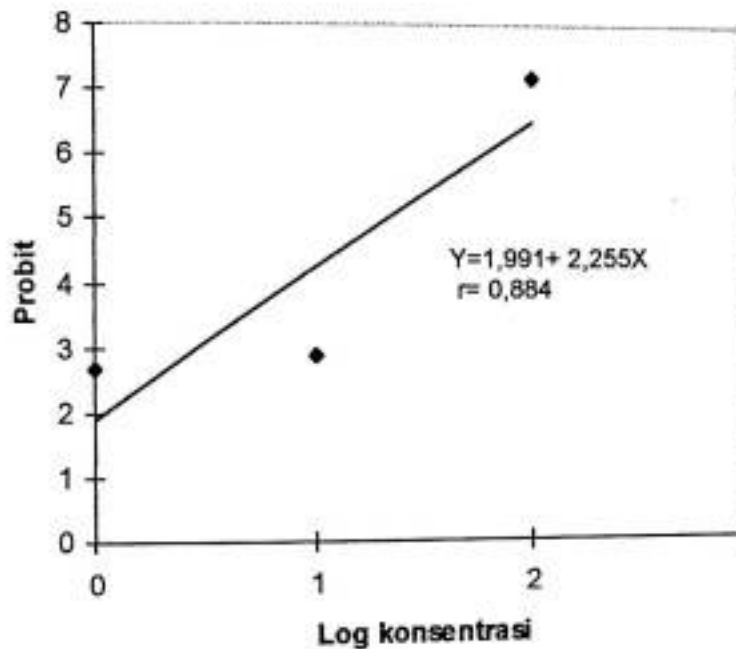
Sehingga diperoleh persamaan regresi :

$$y = 1,991 + 2,255x$$

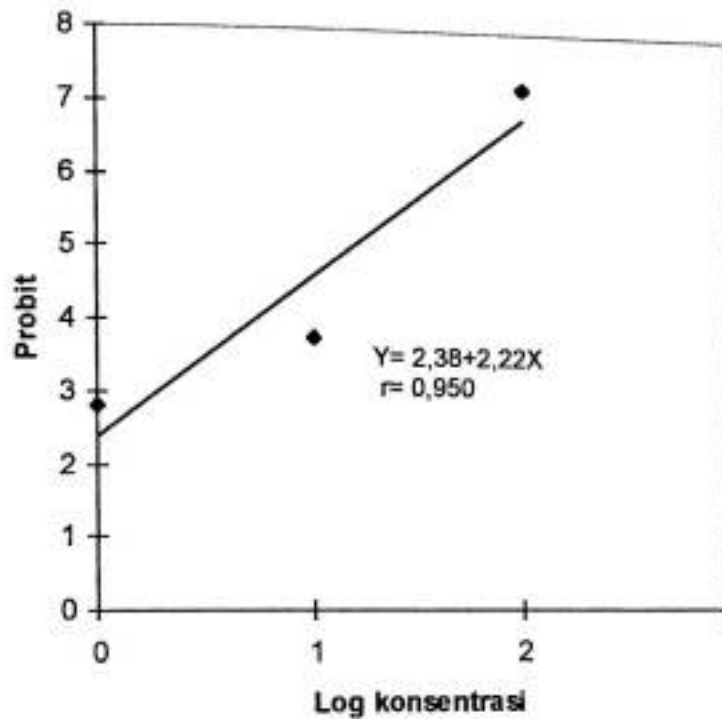
Untuk $\log IC_{50} y = 5$, maka

$$x = \frac{5 - 1,991}{2,255} = 1,334$$

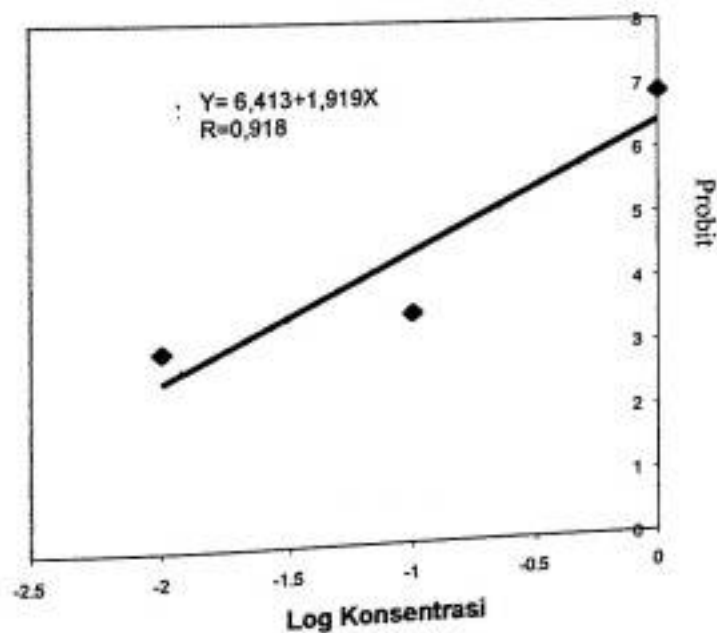
Sehingga $IC_{50} = 21,60 \mu\text{g/ml}$



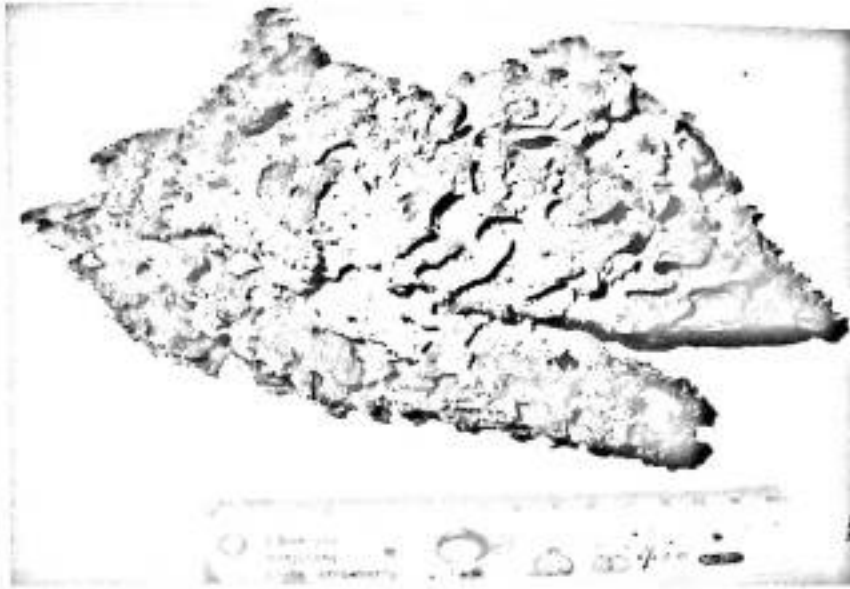
Gambar 3. Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi dan Persentase Penghambatan Pembelahan Sel telur bulubabi dengan Subfraksi I Ekstrak Kloroform Spons *Callyspongia hispidocnulosa*



Gambar 4. Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi dan Persentase Penghambatan Pembelahan Sel telur Bulubabi dengan Subfraksi I Ekstrak Kloroform Spons *Siphonochalina* sp



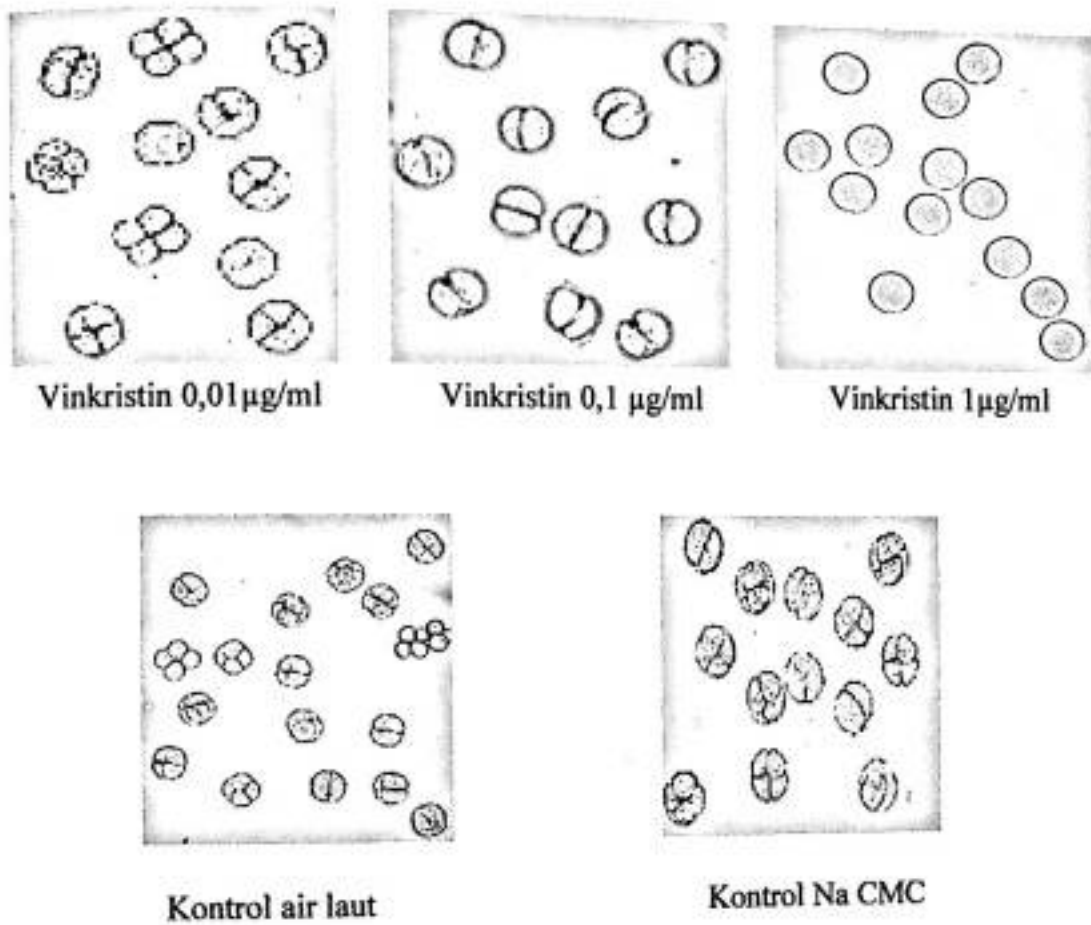
Gambar 5. Kurva Hubungan Antara Log-Konsentrasi dan Persentase Penghambatan Pembelahan Sel telur Bulubabi dengan Vinkristin



Gambar 6. Spons *Callyspongia hispidoconulosa*



Gambar 7. Spons *Siphanochalina* sp



Gambar 8. Pembelahan Sel Telur Bulubabi Setelah Pemberian Vinkristin dan kontrol negatif



1 µg/ml



10 µg/ml



100 µg/ml

Gambar 9. Pembelahan Sel telur Bulubabi Setelah pemberian Subfraksi I Spons *Siphonochalina* sp



1 µg/ml

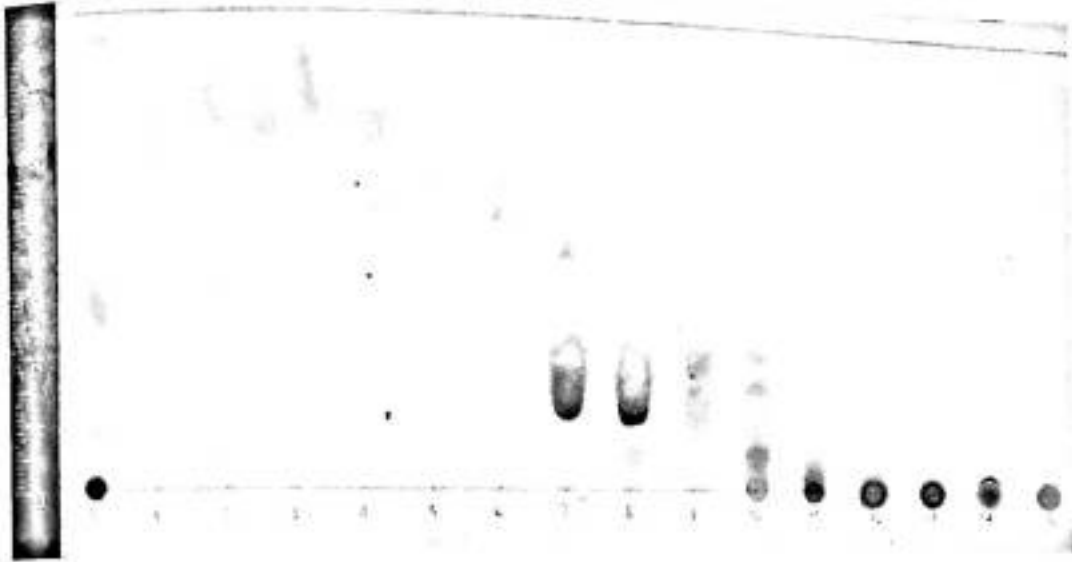


10 µg/ml



100 µg/ml

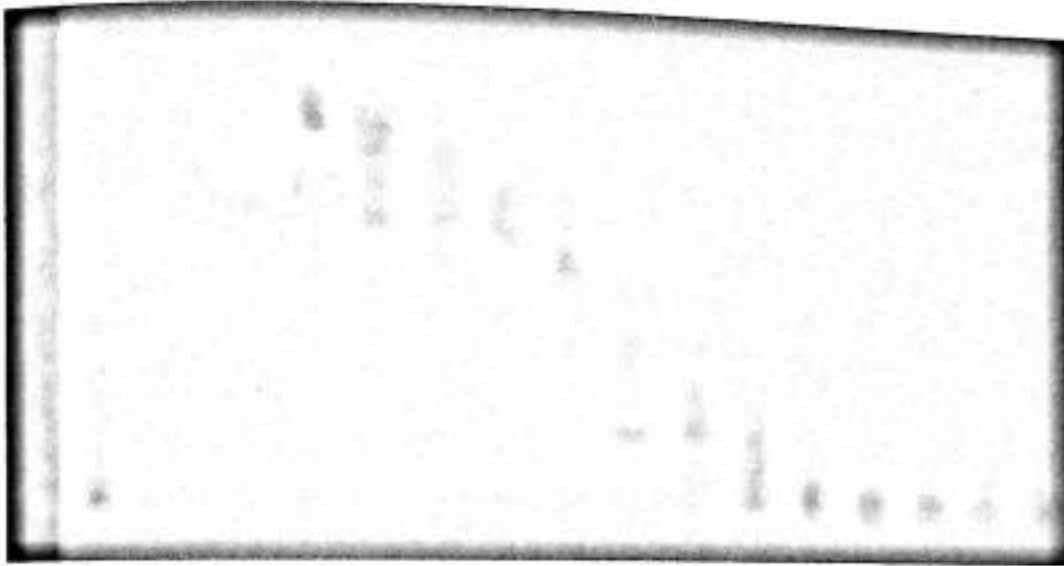
Gambar 10. Pembelahan Sel telur Bulubabi Setelah Pemberian Subfraksi I (tidak larut etil asetat) Spons *Callyspongia hispidocnulosa*



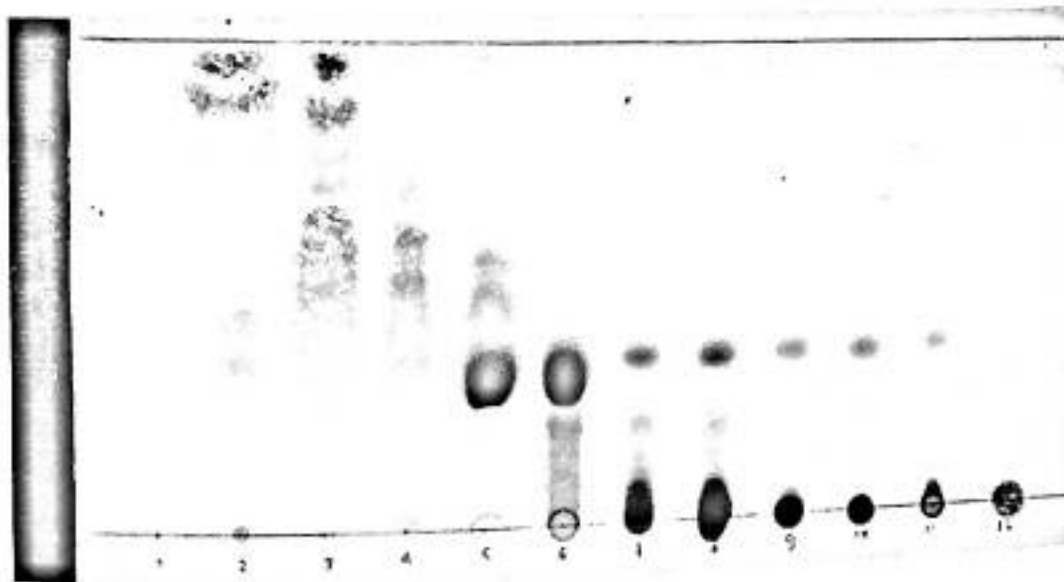
Gambar 11. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons *Callyspongia hispidoconulosa* (fase diam : SiO₂ F₂₅₄, fase gerak = n- heksan : EtoAc (5:1), visualisasi dengan pereaksi H₂SO₄ 10 %)



Gambar 12. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons *Callyspongia hispidoconulosa* (fase diam : SiO₂ F₂₅₄, fase gerak = n- heksan : EtoAc (5:1), visualisasi pada UV 254 nm)



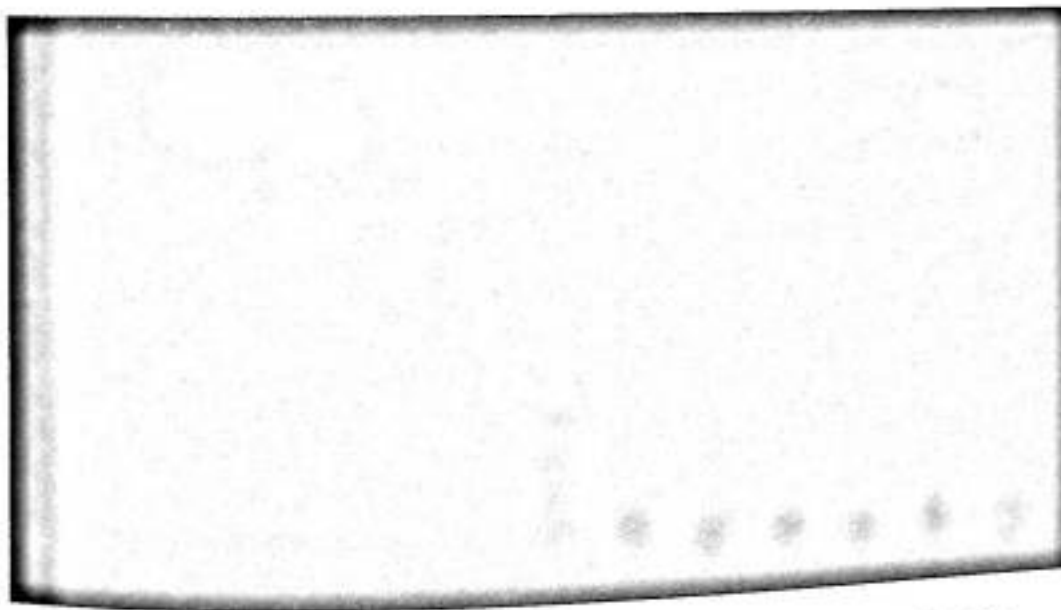
Gambar 13. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons *Callyspongia hispidiconulosa* (fase diam : SiO₂ F₂₅₄, fase gerak = n- heksan : EtoAc (5:1), visualisasi pada UV 366 nm)



Gambar 14. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons *Siphonochalina* sp (fase diam : SiO₂ F₂₅₄, fase gerak = n- heksan : EtoAc (5:1), visualisasi dengan pereaksi H₂SO₄ 10 %)



Gambar 15. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons *Siphonochalina* (fase diam : SiO F₂₅₄ , fase gerak = n- heksan : EtoAc (5:1), visualisasi pada UV 254 nm)



Gambar 16. Hasil Kromatografi Cair Vakum Ekstrak Kloroform Spons *Siphonochalina* sp (fase diam : SiO F₂₅₄ , fase gerak = n- heksan : EtoAc (5:1), visualisasi pada UV 366 nm)



Gambar 17. KLT Fraksi aktif

Keterangan Gambar :

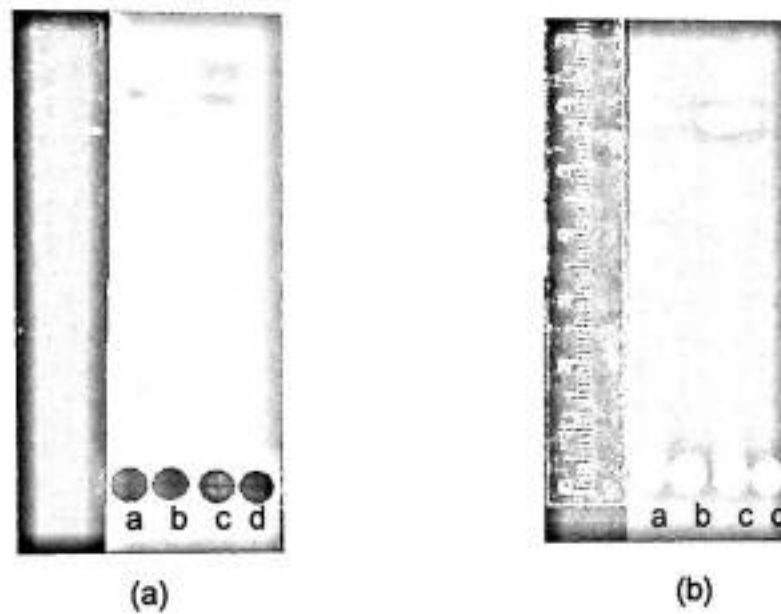
A = Fraksi 4 ekstrak kloroform spons *C. hispidocnulus*

B = Fraksi 3 ekstrak kloroform spons *Siphonochalina* sp

Fase gerak = Etil asetat : metanol (5 : 1)

Fase Diam : Lempeng KLT 60 PF₂₅₄

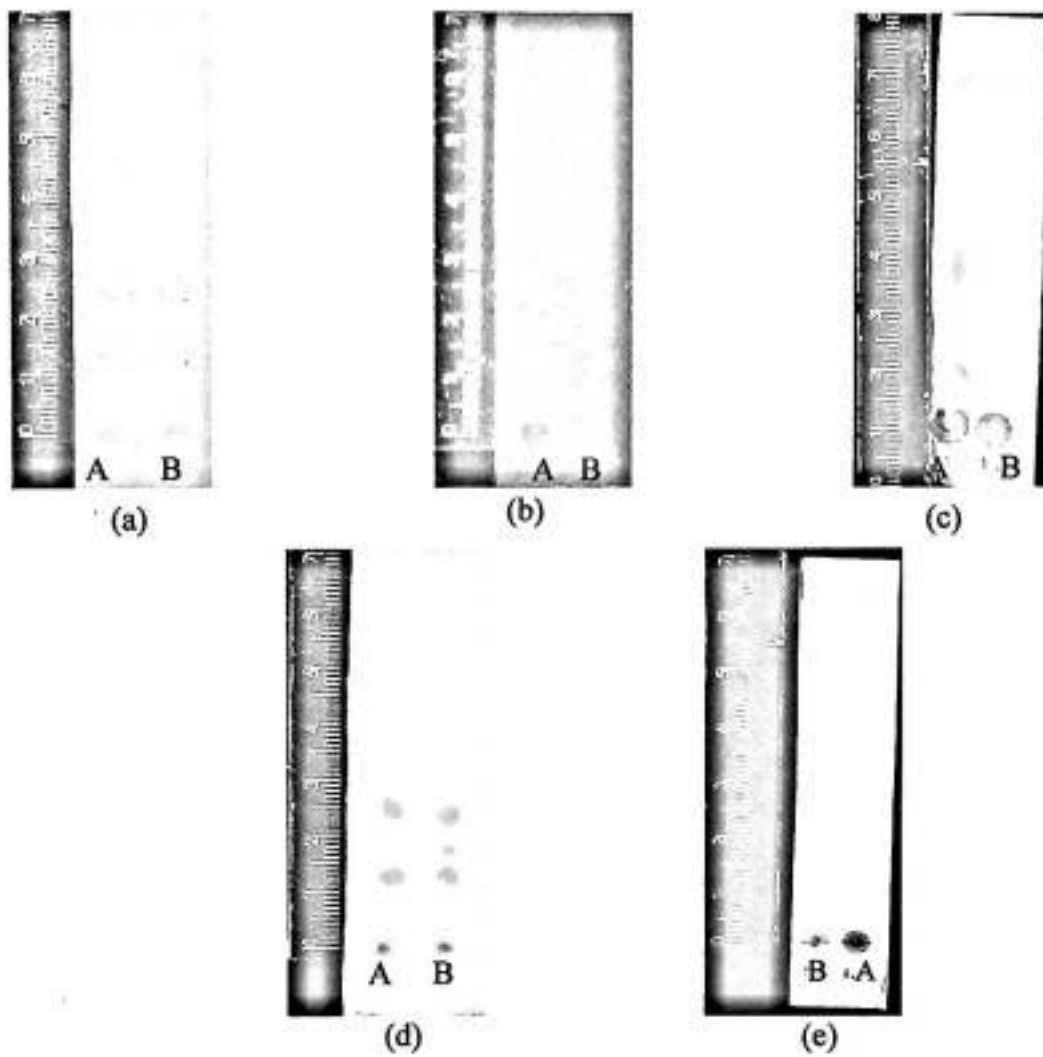
Penampak Noda = Reagen Dragendorf



Gambar 18. KLT Subfraksi

Keterangan Gambar :

- a = Subfraksi I ekstrak kloroform spons *C. hispidocnulosa*
 - b = Subfraksi II ekstrak kloroform spons *C. hispidocnulosa*
 - c = Subfraksi I ekstrak kloroform spons *Siphonochalina* sp
 - d = Subfraksi I ekstrak kloroform spons *Siphonochalina* sp
- Fase gerak = Heksan : etil asetat (5:1)
 Fase Diam = Lempeng KLT 60 PF₂₅₄
 Penampak noda = (a) : UV 254 nm
 (b) : UV 366 nm



Gambar 19. KLT Subfraksi aktif

Keterangan :

A : Subfraksi tidak larut etil asetat Spons *C. hispidocnulus*

B : Subfraksi tidak larut etil asetat Spons *Siphonochalina* sp

Fase Gerak : Etil asetat : methanol : NH_4OH (5:1: 3 tetes)

Fase Diam : Lempeng KLT 60 PF₂₅₄

(a) UV 254 nm (c) H_2SO_4 10 %

(e) FeCl_3

(b) UV 366 nm (d) Reagen Dragendorff