

**AKTIVITAS UJI ANTIMITOTIK SENYAWA ASAM HEKSADEKANOAT ISOLAT
DARI HYDROID *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux PADA
CLEAVAGE BULU BABI *Tripneustes gratilla* Linn.**

Sjafaraenan dan Eva Johannes

Staf Pengajar Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin

enan.gidinnur@gmail.com dan evayohannes@unhas.ac.id

Abstrak

Studi tentang aktivitas antimitotik senyawa asam heksadekanoat isolat dari hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux pada cleavage bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh senyawa bioaktif asam heksadekanoat dari hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux pada cleavage bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn. Metode yang digunakan adalah metode uji aktivitas antimitotik senyawa asam heksadekanoat pada cleavage bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn. pada konsentrasi 1, 10, dan 100 µg/ml dengan kontrol positif vinkristin pada konsentrasi 0.01, 0.1, dan 1 µg/ml setelah fertilisasi penghambatan tertinggi terjadi pada konsentrasi 100 µg/ml yaitu 66,66 %. Kemudian setelah dihitung dengan analisis probit, asam heksadekanoat memiliki IC50 sebesar 22,076 µg/ml yang memiliki kesamaan sifat antimitotik dengan vinkristin yang memiliki IC50 sebesar 0,219 µg/ml. Sehingga asam heksadekanoat isolat dari hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux berpotensi untuk dijadikan bahan dasar anti kanker.

Kata kunci : Antimitotik, asam heksadekanoat, hydroid, *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux.

Abstract

The study of antimitotic activity of compounds hexadecanoic acid isolates of hydroids *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux on cleavage urchins *Tripneustes gratilla* Linn. This study aimed to determine the effect of the bioactive compounds hexadecanoic acid hydroids *A. cupressina* Lamoureaux on cleavage sea urchin *T. gratilla* Linn. method used is the method of test compounds hexadecanoic acid antimitotic activity against cell zygote urchins *Tripneustes gratilla* Linn. at concentrations of 1, 10, and 100 ug / ml with a positive control vincristine at concentrations of 0.01, 0.1, and 1 mg / ml after fertilization highest inhibition occurred at a concentration of 100 ug / ml is 66,66%. Then after calculated by probit analysis, hexadecanoic acid has IC50 of 22,076 ug / ml which has similarities with vincristine antimitotic properties. That have IC50 of 219 ug/ml. So hexadecanoic acid isolates of *A. Hydroids cupressina lamoureaux* potential to be used as anti-cancer ingredients.

Key words: antimitotic, hexadecanoic acid, hydroids, *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux.

Pendahuluan

Penelitian dengan menggunakan metode pengujian terhadap organisme hidup telah banyak dilakukan. Salah satunya adalah penelitian untuk mengetahui pengaruh zat-zat atau senyawa tertentu terhadap aktifitas sel-sel organisme tersebut, contohnya seperti ekstrak tumbuhan dan hewan, hasil penelitian dari ekstrak tersebut telah dimanfaatkan sebagai bahan baku obat-obatan, pengelolaan bahan makanan dan bahan kimia lainnya. Termasuk pula dalam hal ini, penelitian tentang pengaruh senyawa-senyawa tersebut dalam menghambat proses pembelahan sel tubuh organisme (uji antimitotik). Dalam penelitian tersebut sel zigot bulu babi merupakan salah satu bahan yang sering digunakan.

Sel zigot bulu babi mempunyai sensitivitas selektif terhadap obat dan mengalami tahapan pembelahan seperti halnya sel kanker, sehingga banyak digunakan dalam penelitian zat anti kanker. Misalnya, untuk melihat pengaruh suatu senyawa dalam menghambat laju pembelahan dan pertumbuhan sel atau yang sering disebut sebagai sifat antimitotik. Mekanisme ini juga merupakan indikator yang dapat digunakan dalam menemukan senyawa-senyawa yang dapat dijadikan bahan dalam pembuatan obat anti kanker. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Gisella (1994) bahwa pada umumnya kerja dari anti kanker berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses sel yang esensial. Pada sel kanker maupun sel normal tidak mengalami perbedaan yang kualitatif, maka bahan anti kanker bersifat sitotoksik dan bukan kankerosid atau kankerotoksik yang selektif.

Sel kanker adalah sel yang mengalami perubahan bentuk, sifat dan kinetiknya. Pertumbuhannya menjadi otonom, liar, tidak terkendali, lepas dari koordinasi pertumbuhan normal. Perubahan sel itu terjadi karena mutasi gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel yaitu proto-onkogen dan anti-onkogen (Soekarja, 2000). Berbagai usaha dilakukan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit kanker, salah satu diantaranya adalah pencarian senyawa dari bahan alam.

Hydroid (filum Coelenterata) merupakan invertebrate laut yang hidup menempel pada karang, kaya akan senyawa kimia seperti: alkaloid, steroid, terpenoid, histamine yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat-obatan. Hasil isolasi dan karakterisasi metabolit sekunder hydroid *A. cupressina* Lamoureux menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari golongan asam karboksilat, alkaloid dan steroid, menunjukkan toksisitas terhadap *Artemia salina* (Johannes, 2008).

Penelitian ekstrak hydroid yang telah dilakukan, seperti pemanfaatannya untuk pengujian sebagai bahan anti fungi, anti bakteri, dan obat-obatan lainnya, diperoleh hasil yang menunjukkan adanya pengaruh yang berarti dari ekstrak ini. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka dilakukanlah penelitian mengenai aktivitas antimitotik senyawa asam heksadekanoat isolat dari hydroid *A. cupressina* Lamoureux terhadap pembelahan sel zigot bulu babi *T. gratilla* Linn.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh senyawa bioaktif asam heksadekanoat isolat dari hydroid *A. cupressina* Lamoureux pada cleavage bulu babi *T. gratilla* Linn dan diharapkan dapat memberikan informasi tentang senyawa metabolit

sekunder asam heksadekanoat dari hydroid *A. cupressina* Lamoureaux yang berpotensi mempunyai aktivitas anti kanker.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan menguji aktivitas penghambatan mitosis senyawa asam heksadekanoat isolat dari hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux pada uji antimitotik (*antimitotic bioassay*).

Metode Kerja

Uji Antimitotik

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bulu babi *T. gratilla* Linn. Diambil di sekitar perairan pulau Bonebatang Makassar, pada kedalaman 1-2 meter dari permukaan air laut.

Penyiapan Sel Telur dan Sperma Bulu Babi *Tripneustes gratilla* Linn.

Bulu babi *T. gratilla* Linn. jantan dan betina diinduksi dengan penyuntikan 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 5 ml sel telur difertilisasikan dalam gelas kimia yang berisi 50 ml air laut bebas protozoa, kemudian dibiarkan selama 10-15 menit.

Persiapan Sampel Uji

Isolat (asam heksadekanoat) hydroid *A. cupressina* Lamoureaux ditimbang sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan dengan DMSO sebanyak 100 μ l, diencerkan dengan air laut bebas protozoa sehingga diperoleh konsentrasi 1000 μ g/ml sebagai stok. Larutan stok ini dipipet menggunakan mikropipet ke dalam tabung eppendorf untuk mendapat konsentrasi 1, 10, dan 100 μ g/ml. Kemudian dibuat kontrol negatif (tanpa senyawa bioaktif) dengan menggunakan air laut bebas protozoa sebanyak 2 tabung eppendorf. Sedangkan untuk control positif berupa senyawa vinkristin dengan jumlah konsentrasi 0,01, 0,1, dan 1 μ g/ml.

Inhibitory Concentration 50 (IC-50)

Tabung eppendorf yang berisi sampel ditambahkan air laut sesuai perhitungan untuk mencukupkan volume akhir hingga 1 ml. Kemudian dalam tabung tersebut ditambahkan zigot sebanyak 100 μ g/ml setelah 10 menit terjadi fertilisasi. Dilakukan pengulangan 3 kali untuk setiap sampel uji dan kontrol. Selanjutnya disimpan pada suhu 15 – 20°C dengan diselingi pengocokan. Pengamatan sel yang

membelah dilakukan setelah 2 jam inkubasi dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan kamera.

Pengamatan aktivitas antimitotik

Prosedur uji antimitotik dilakukan serupa dari awal hingga tahapan pencampuran sel-sel zigot dengan larutan (senyawa) uji.

Pengamatan aktivitas antimitotik (mitosis) dilakukan dibawah mikroskop berkamera. Setiap sampel uji dipipetkan ke deck glass sebanyak 2-3 tetes dan dilakukan pewarnaan sel zigot dengan pewarna acetocarmine.

Hasil dan Pembahasan

Penghambatan Pada Cleavage Bulu Babi *T. gratilla* Linn. Senyawa Asam Heksadekanoat dan Vinkristin.

Asam heksadekanoat adalah senyawa murni hasil ekstraksi senyawa bahan alam dari hydroid *A. cupressina* Lamoureux melalui proses; ekstraksi, maserasi, partisi cair, hingga fraksinasi dengan kromatografi kolom cair vakum. Senyawa tersebut merupakan senyawa murni hasil dari penelitian Johannes (2008). Berdasarkan uji antimitotik terhadap pembelahan sel zigot bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn., dengan vinkristin sebagai pembanding (kontrol positif), diperoleh bahwa senyawa asam heksadekanoat memiliki kesamaan sifat dengan senyawa vinkristin yang bersifat antimitotik.

Senyawa tersebut diperlakukan dengan uji antimitotik untuk menentukan nilai penghambatan pada cleavage bulu babi *T. gratilla* Linn. Pengamatan ini dilakukan setelah sel zigot yang telah ditambahkan senyawa uji kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 15⁰-20⁰ C dengan menghitung jumlah sel zigot bulu babi *T. gratilla* Linn. yang membelah dan tidak membelah. Prosedur fertilisasi yang digunakan pada pengujian ini dimodifikasi dari Dinnel *dkk.* (1987), dan Ringwood (1992), selain itu pengenceran dilakukan pada senyawa uji, karena senyawa uji tersebut merupakan senyawa murni yang akan memberikan pengaruh berlebih pada bahan uji (zigot bulu babi) jika tidak diencerkan. Konsentrasi pengenceran senyawa uji (asam heksadekanoat) hydroid *A. cupressina* Lamoureux yang digunakan pada pengujian ini adalah 1 µg/ml, 10 µg/ml, dan 100 µg/ml, beberapa tingkatan pengenceran ini dimaksudkan untuk melihat respon pada cleavage bulu babi *T. gratilla* Linn pada beberapa konsentrasi pengenceran yang berbeda.

Hasil Pengamatan Pada Cleavage *T. gratilla* Linn. Setelah 2 Jam Perlakuan Dengan Senyawa Uji Asam Heksadekanoat

Dari hasil pengamatan 300 sel total yang mewakili dari sel yang membelah dan sel yang tidak membelah setelah pengulangan sebanyak 3 kali, nilai penghambatan rata-rata dari senyawa asam heksadekanoat pada konsentrasi 1 µg/ml mencapai

nilai 25,66 % dan pada konsentrasi 10 µg/ml mencapai nilai 37,32 %, yang artinya terjadi penghambatan pada cleavage *T. gratilla* Linn. kurang dari setengahnya dikarenakan rendahnya dosis yang diberikan sehingga sel yang membelah lebih banyak dibandingkan sel yang tidak membelah. Namun pada konsentrasi 100 µg/ml mencapai nilai 66,66 %, yang artinya penghambatan pada cleavage *T. gratilla* Linn. lebih dari setengahnya yang menunjukkan bahwa senyawa asam heksadekanoat bersifat antimitotik pada cleavage *T. gratilla* Linn. dan semakin tinggi konsentrasi yang digunakan, maka nilai penghambatannya juga semakin besar. Hal ini mempunyai kesamaan sifat pada penelitian Pengaruh Uji Antimitotik Fraksi N-Heksan Dari Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux terhadap Pembelahan Awal sel Zigot Bulu Babi *Tripneustes gratilla* Linn oleh Johannes dkk (2013), pada penelitian tersebut diperoleh hasil dari salah satu senyawa N-Heksan yaitu Asam Karboksilat yang mempunyai nilai penghambatan rata-rata pada konsentrasi 1 µg/ml mencapai nilai 52 %, pada konsentrasi 10 µg/ml mencapai nilai 49 %, pada konsentrasi 100 µg/ml mencapai nilai 59 %, dan pada konsentrasi 1000 µg/ml mencapai nilai 98,93 %.

Hasil Pengamatan Pada Cleavage *T. gratilla* Linn. Setelah 2 Jam Perlakuan Dengan Kontrol Positif Vinkristin

Vinkristin merupakan senyawa yang digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) dalam penelitian ini, namun perlakuan konsentrasi (dosis) yang diberikan lebih rendah, dikarenakan vinkristin telah menjadi obat anti tumor maupun kanker sehingga menjadi pembanding bagi penelitian ini, hal tersebut bisa dilihat dari hasil pengamatan kontrol positif vinkristin yang menunjukkan nilai penghambatan rata-rata pada konsentrasi 0,01 µg/ml mencapai nilai 26,55 %, dan pada konsentrasi 0,1 µg/ml mencapai nilai 41,33 %, hal ini menunjukkan bahwa penghambatan sel zigot kurang dari setengahnya. Namun pada konsentrasi 1 µg/ml mencapai nilai 59,77 %, yang artinya penghambatan pada cleavage *T. gratilla* Linn. lebih dari setengahnya. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa uji asam heksadekanoat mempunyai kesamaan sifat dengan kontrol positif (vinkristin) yang bersifat antimitotik. Sedangkan pada kontrol negatif (air laut) menunjukkan bahwa hampir semua sel zigot mengalami pembelahan.

Penentuan IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50%)

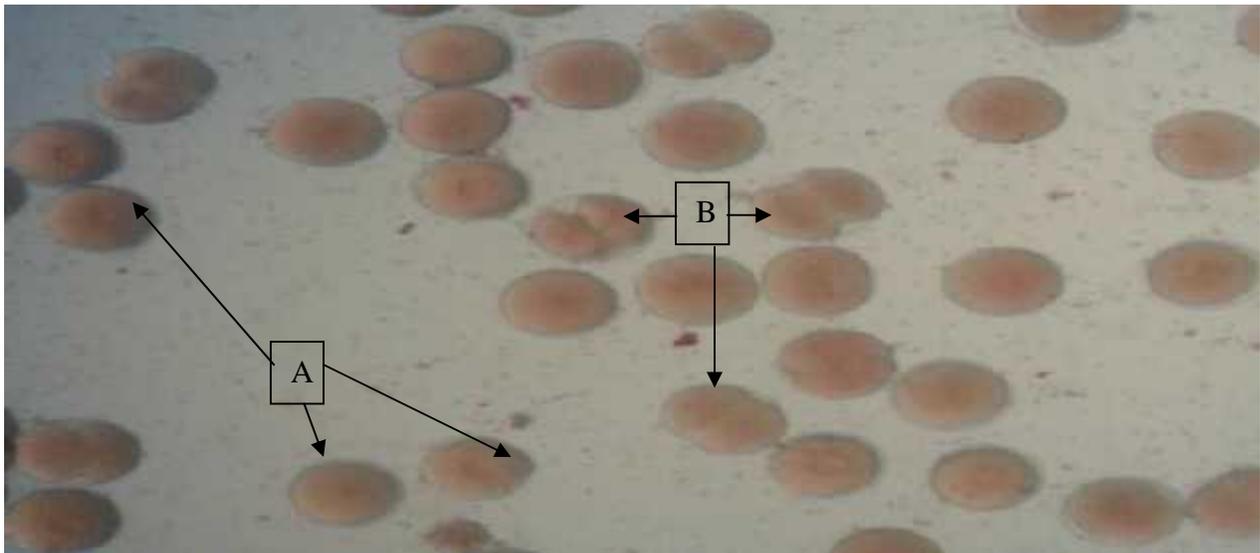
Penentuan IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50%) dilakukan untuk mengetahui kadar terendah dari senyawa uji (asam heksadekanoat) yang dapat digunakan untuk menghambat proses pembelahan setengah dari sel zigot bulu babi *T. gratilla* Linn. yang diujikan, dengan kontrol negatif (air laut) serta kontrol positif (vinkristin). Hal ini sesuai dengan pendapat yang dikemukakan (Usman, 2012) bahwa aktivitas sitotoksik ditetapkan berdasarkan nilai IC₅₀ yaitu kadar yang dibutuhkan ekstrak untuk menghambat pertumbuhan sel uji hingga 50 %.

Uji toksisitas biasanya dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan dan keberbahayaan zat yang akan diuji. Berdasarkan ketentuan, suatu senyawa murni oleh Thomson, dkk. (2001), bahwa 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 zigot bulu babi. Dalam metode ini penghambatan pembelahan sel dihitung sebagai IC₅₀.

Hasil pengamatan ini berdasarkan data yang diolah secara analisis probit (Menentukan *Lethal Dose 50 / Inhibitory concentration 50*) dan diperoleh hasil Senyawa asam heksadekanat memiliki IC₅₀ = 22,076 µg/ml, hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji (asam heksadekanat) merupakan senyawa yang aktif bersifat antimitotik. Jika dilihat dari persamaan sifat dengan kontrol positif (vinkristin) yang memiliki IC₅₀ = 0,219 µg/ml, maka asam heksadekanat memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat antikanker.

Pengamatan aktivitas antimitotik



Gambar Pengamatan Aktivitas Antimitotik menggunakan zat pewarna Acetocarmine Perbesaran 100 x 10.

Keterangan Gambar :

- A. Tampak inti sel tidak mengalami pembelahan, dinding sel masih utuh, dan
- B. Tampak terjadi proses telofase dan sitokinesis

Pengamatan aktivitas antimitotik yang menggunakan zat pewarna (acetocarmine), dalam proses mitosis berdasarkan gambar diatas yang diambil menggunakan mikroskop DINO pada perbesaran 100 kali, zat tersebut memberi warna merah pada zigot yang akan diamati, dimana inti sel (nucleus) dari sel zigot bulu babi (*T. gratilla* Linn.) tidak mengalami pembelahan, seperti terlihat pada gambar diatas. Tampak pada gambar bahwa inti sel tidak mengalami pembelahan dikarenakan dinding sel masih utuh, berdasarkan sifat dari kontrol positif (vinkristin) kita ketahui bahwa dalam proses mitosis, vinkristin bersifat antimitotik dikarenakan mekanisme kerja dari vinkristin yaitu menghambat cara kerja dari benang spindle

yang menarik kromosom kedua kutub yang berlawanan pada tahap metaphase. Hal tersebut kita tidak dapat lihat pada gambar diatas dikarenakan mikroskop yang tidak memadai dalam penelitian ini.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Uji antimitotik senyawa asam heksadekanoat isolat dari hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux menunjukkan adanya penghambatan (efek antimitotik) pada cleavage bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn.
2. Hasil nilai rata-rata penghambatan tertinggi dari senyawa uji (asam heksadekanoat) isolat dari hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux diperoleh pada konsentrasi 100 µg/ml yaitu 66,66 %.
3. Senyawa uji asam heksadekanoat memiliki efek antimitotik berdasarkan dari nilai IC50 yaitu 22,076 µg/ml yang memiliki kesamaan sifat dari kontrol positif vinkristin yang memiliki nilai IC50 yaitu 0,219 µg/ml.
4. Asam heksadekanoat isolat dari hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux berpotensi untuk dijadikan bahan dasar antikanker.

Daftar Pustaka

1. Dinnel, P. A., Link J. M. dan Stober Q. J., 1987. Improved Methodology For Sea Urchin Sperm Cell Bioassay For Marine Waters. Archives Of Environmental
2. Gisela, 1994. Screening of Marine Samples, in Natural Products Workshop work Book. Marine Science Intitute University of The Philipphines. Philipphine.
3. Johannes, E. Sjaferaenan, R. Agus dan M. R. Umar (2013). Aktivitas Antimitotik B Sitosterol Isolat dari Hydroid *Aglaophenia Cupressina* Lamoureaux Terhadap Pembelahan Awal Sel Zigot Bulu Babi *Tripneustes Gratilla* Linn Jurnal Manasir FMIPA UNHAS Vol. 1 No.1. ISSN 2337-9073.
4. Johannes, E., 2008. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder dari Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux Sebagai Bahan Dasar Antimikroba, Thesis. Program PascaSarjana Universitas Hasanuddin. Makassar.
5. Ringwood A. H., 1992, Comparative Sensitivity of Gametes and Early Developmental Stages of a Sea urchin Species (*Echinometra mathaei*) and A Bivalve species (*Isognomon*
6. Sukardja I.D.G., 2000. Onkologi klinik. Edidi II. Erlangga University Press. Surabaya
7. Thomson, W.J., Rahman,A.,dan Ginoudhary, M.I., 2001. Bioassay Techniques For Drug Development, Harword academic Publisher, Australia.
8. Usman, 2012. Dasar-Dasar Kimia Organik Bahan Alam. Penerbit Dua satu Press.