

AKTIVITAS SITOTOKSIK, INDUKSI APOPTOSIS DAN EKSPRESI GEN p53 FRAKSI METANOL SPONS *Petrosia cf. nigricans* TERHADAP SEL TUMOR HeLa

Muhammad Nursid^{*)}, Thamrin Wikanta^{*)}, Nurrahmi Dewi Fajarningsih^{*)} dan Endar Marraskuranto^{*)}

ABSTRAK

Spons merupakan hewan invertebrata laut yang kaya akan kandungan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif dari spons banyak dieksplorasi sebagai bahan obat antitumor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik, induksi apoptosis dan ekspresi gen p53 fraksi metanol spons *Petrosia cf. nigricans* terhadap sel tumor HeLa. Uji aktivitas pendahuluan dan sitotoksik masing-masing dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan *MTT* ([3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) assay. Induksi apoptosis dilakukan dengan metode pengecatan menggunakan akridin oranye dan etidium bromida. Analisis PCR menggunakan primer p53 dilakukan untuk mengetahui ekspresi gen p53. Hasil uji BSLT memperlihatkan bahwa ekstrak kasar *P. cf. nigricans* memiliki aktivitas tahap awal yang sangat baik dengan $LC_{50} = 23,4 \mu\text{g/mL}$. Hasil uji MTT menunjukkan bahwa fraksi metanol memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dengan nilai LC_{50} sebesar $11,9 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan uji induksi apoptosis metode pengecatan dapat dinyatakan bahwa fraksi metanol mampu menginduksi peristiwa apoptosis pada sel HeLa. Fraksi metanol juga mampu meningkatkan ekspresi gen p53.

ABSTRACT: *Cytotoxic activity, induction of apoptosis and p53 gene expression of Petrosia cf. nigricans methanol fraction to HeLa cell line. By: Muhammad Nursid, Thamrin Wikanta, Nurrahmi Dewi Fajarningsih and Endar Marraskuranto*

Sponge has been known as marine invertebrate containing bioactive compounds. These compounds have been explored as antitumor agents. This research was aimed to investigate the cytotoxic activity, induction of apoptosis and p53 gene expression of Petrosia cf. nigricans extract and its fractions to HeLa cell line. Pre-activity assay was conducted using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) and the cytotoxic assay was performed using MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) assay. The induction of apoptosis assay was performed by double staining and DNA fragmentation using gel electrophoresis. PCR analysis was performed using p53 primer to detect the expression of p53 gene. The BSLT showed that P. cf. nigricans crude extract was considered very active with LC_{50} value of $23.4 \mu\text{g/mL}$. Cytotoxicity assay indicated that methanol fraction showed a good cytotoxic activity to HeLa cell with LC_{50} value of $11.9 \mu\text{g/mL}$. The result of apoptosis assay indicated that the extract could induce the apoptosis. PCR analysis showed positive expression of p53 gene.

KEYWORDS: *sponge, Petrosia cf. nigricans, cytotoxic, apoptosis, p53 gene, HeLa cell line*

PENDAHULUAN

Sel tumor merupakan sel yang mengalami perubahan (transformasi) sehingga bentuk, sifat, dan kinetiknya berubah, tumbuhnya menjadi otonom, liar, tidak terkendali dan lepas dari koordinasi pertumbuhan normal. Akibatnya timbul tumor yang terpisah dari jaringan tubuh normal. Transformasi sel itu terjadi karena mutasi gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel yaitu proto-onkogen dan atau supresor gen (anti-onkogen) (Sukardja, 2000). Berbagai usaha dilakukan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit tersebut. Salah satu usaha yang sedang

intensif dilakukan adalah melalui pencarian senyawa antitumor dari bahan alam.

Spons (*filum Porifera*) merupakan invertebrata laut yang paling banyak diteliti dalam pencarian produk alami laut sebagai bahan obat dengan target utama sebagai antikanker (McKay, 1999; Munro *et al.*, 1999). Hal ini disebabkan karena spons kaya akan senyawa bioaktif (Faulkner *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004). Senyawa bioaktif tersebut ditemukan dari sekitar 11 genera spons. Tiga genera spons yaitu *Haliclona*, *Petrosia* dan *Discodemia* memiliki efek antikanker yang sangat kuat (Jha & Zi-rong, 2004).

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan

Sekitar 17 senyawa bioaktif telah dipelajari mekanisme aksinya sebagai senyawa antitumor (Mayer, 1999). Beberapa senyawa dari invertebrata laut sampai saat ini sudah memasuki uji klinis sebagai obat antikanker (Higa *et al.*, 2001). Discodermolida yang diisolasi dari spons *Discodermia dissoluta* memiliki aktivitas sitotoksik dan antimetabolik serta secara *in vivo* menunjukkan aktivitas sebagai senyawa immunosupresif. Discodermolida juga dapat digunakan sebagai senyawa penuntun (*lead compound*) dalam program pencarian obat secara kimia (Faulkner, 2000; Proksch *et al.*, 2003). Halikondrin B yang diisolasi dari spons *Halicondria okadai* memiliki aktivitas yang sangat baik dalam melawan sel tumor P-388 leukemia, B-16 melanoma dan L-120 leukemia secara *in vivo* dan saat ini sudah memasuki pengujian fase preklinis (Munro *et al.*, 1999; Faulkner, 2000). Sementara itu, senyawa Halikondrin B dari spons *Lissodendoryx* sedang dipersiapkan untuk memasuki uji klinis (Proksch *et al.*, 2003). *Petrosia sp.* yang berasal dari perairan Korea mengandung senyawa bioaktif poliasetilen yang termasuk dalam golongan alkohol. Senyawa ini memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap sel tumor leukemia pada manusia (K-562) (Seo *et al.*, 1999), dapat menghambat replikasi DNA secara *in vitro* (Kim *et al.*, 2002) dan dapat menginduksi apoptosis pada sel melanoma kulit manusia (Choi *et al.*, 2004).

Beberapa contoh lain senyawa bioaktif yang telah diisolasi dari spons di antaranya agelastin, bolinakuinon, krelastatin, gimnastin, haliklonasiklamin, skalaran dan sesterstatin. Senyawa-senyawa ini menunjukkan aktivitas yang kuat sebagai agen sitotoksik tetapi mekanisme aksinya belum diketahui (Mayer, 1999). Spons dari perairan Indonesia yang prospektif sebagai obat antikanker adalah *Theonella swinhoei* yang mengandung senyawa swinhoeiamid A yang memiliki aktivitas antiproliferasi (Widjhati *et al.*, 2004). *Spons sp.* yang diambil dari perairan pulau Baranglombo, Sulawesi Selatan mengandung substansi aktif Jaspamida yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker KB dan sangivamisin yang aktif terhadap sel leukemia L-1210 (Rachmat *et al.*, 2001)

Pencarian bahan obat antitumor dari alam umumnya difokuskan untuk mencari senyawa aktif yang memiliki kemampuan menekan proliferasi sel tumor, mempunyai efek sitotoksik, antimetabolik atau memiliki kemampuan dalam menginduksi terjadinya proses apoptosis pada sel tumor. Apoptosis merupakan proses kematian sel secara terprogram (*programmed cell death*) (Berninghausen & Leippe, 1997). Gen yang sangat berperan dalam peristiwa apoptosis adalah gen p53. Gen p53 juga berperan sebagai supresor tumor. Senyawa antitumor yang baik

adalah senyawa yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik, induksi apoptosis dan ekspresi gen p53 ekstrak metanol *Petrosia cf. nigricans* terhadap sel tumor HeLa.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Contoh Spons, Ekstraksi dan Fraksinasi

Contoh spons diperoleh dari perairan Kepulauan Seribu, yaitu di gosong Pulau Pramuka pada posisi geografis 05° 44'34.5" (lintang) dan 110° 36'37.8" (bujur). Contoh difoto, ditimbang dan dipreservasi dengan pelarut metanol. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol. Sebanyak 100 g sampel dipotong-potong lalu dimasukkan ke dalam larutan metanol dan dimaserasi 3 kali selama 24 jam. Larutan yang diperoleh dievaporasi dengan *Buchi Rotavapor* pada suhu penangas air 27°C dan suhu kondensor 2°C. Evaporasi dilakukan sampai pelarut menjadi kering, sisa air pada ekstrak dikeringkan dengan pengering beku pada suhu -43°C sampai diperoleh ekstrak kasar berbentuk bubuk. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol dan etil asetat masing-masing dilakukan 3 kali dengan volume pelarut sebanyak 50 mL. Setelah disaring kedua fraksi dievaporasi menggunakan nitrogen evaporator dan dikeringkan menggunakan pengering beku.

Uji Aktivitas Tahap Awal terhadap *Artemia salina* (Uji BSLT)

Uji aktivitas tahap awal dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (McLaughlin & Rogers, 1998). Biota uji yang digunakan adalah larva *Artemia salina*. Kista *A. salina* ditetaskan di dalam air laut buatan (38 g garam dapur dalam 1 L air) dan ditempatkan di bawah lampu TL 40 watt. Setelah 48 jam kista menetas menjadi nauplii instar III/IV dan siap digunakan sebagai biota uji. Sepuluh larva *A. salina* dimasukkan ke dalam vial yang telah berisi ekstrak sampel dengan dosis 10, 100 dan 1000 µg/mL (masing-masing dosis terdiri dari 3 vial sehingga jumlah *A. salina* yang diuji tiap dosis berjumlah 30 ekor) kemudian ditambahkan air laut buatan sampai volume mencapai 10 mL. Air laut buatan tanpa pemberian ekstrak (0 µg/mL) digunakan sebagai kontrol. Semua vial diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam di bawah penerangan lampu TL 40 watt. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah *A. salina* yang mati pada tiap perlakuan.

Kematian larva *A. salina* dihitung berdasarkan Harmita & Radji (2004) dengan rumus $B-C/D \times 100\%$, yaitu B adalah jumlah larva yang mati, C adalah jumlah larva yang mati pada kontrol (0 ppm ekstrak) dan D adalah jumlah larva yang diujikan. Penentuan nilai LC_{50} pada uji BSLT dilakukan dengan menggunakan analisis probit.

Uji Sitotoksik terhadap Sel Tumor HeLa

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*]. Sel tumor HeLa diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Sel tersebut dikultur dalam medium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, fungison 0,5% dan penisilin-streptomisin 2%.

Ekstrak dibuat dengan seri dosis 10, 25, 50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$ dengan 3 kali ulangan. Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam mikroplat 96 sumuran sebanyak 100 μL setara dengan 2×10^4 sel/100 μL . Dalam pengujian ini digunakan 3 jenis kontrol yaitu kontrol sel yang terdiri dari 100 μL sel + 100 μL media, kontrol sampel yang terdiri 100 μL ekstrak + 100 μL media dan kontrol media yang terdiri dari 200 μL media kultur. Mikroplat diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dengan aliran CO_2 5 mL/menit. Setelah 24 jam ditambahkan MTT sebanyak 10 μL ke dalam tiap sumuran. Mikroplat diinkubasikan kembali pada inkubator CO_2 selama 4 jam, kemudian reaksi MTT dihentikan dengan cara menambahkan 100 μL sodium dedosil sulfat (SDS) 10%. Mikroplat diinkubasikan kembali selama 12 jam pada suhu kamar. Setelah 12 jam, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan spektrofotometer *ELISA microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm.

Kematian sel HeLa dihitung berdasarkan besarnya viabilitas sel akibat pengaruh pemberian ekstrak. Semakin tinggi viabilitas sel, maka sel yang mati dianggap semakin sedikit. Penentuan persentase kematian sel dihitung berdasarkan rumus $(A-B)/A \times 100\%$, yaitu A adalah jumlah sel yang hidup (viabel) pada sumuran tanpa perlakuan ekstrak (kontrol sel) dan B adalah jumlah sel hidup pada sumuran yang diberi ekstrak uji. Penentuan nilai *lethal concentration* uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan analisis probit.

Uji Apoptosis Metode Pengecatan

Sebanyak 500 μL sel HeLa (kepadatan 1×10^5 sel/mL) dimasukkan ke dalam mikroplat 24 sumuran yang telah berisi *cover slip* pada inkubator CO_2 . Setelah 24 jam ekstrak dimasukkan ke dalam

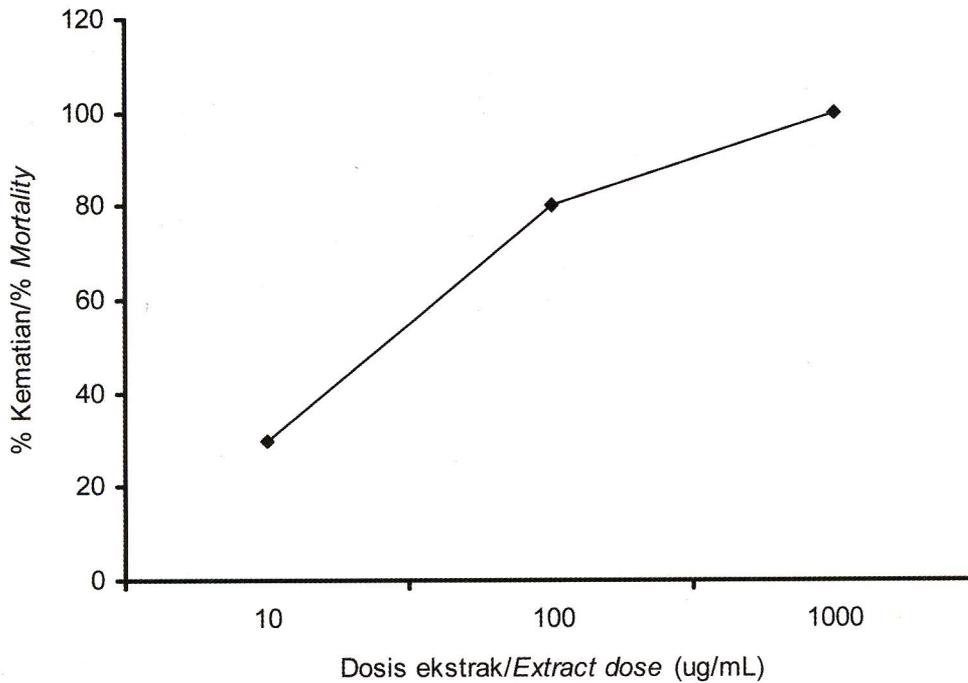
mikroplat sebanyak 500 μL pada dosis LC_{50} hasil uji sitotoksik. Mikroplat diinkubasi kembali selama 24 jam pada inkubator CO_2 . Media disedot dari mikroplat sehingga yang tertinggal hanya sel yang menempel pada permukaan *cover slip*. Pada permukaan *cover slip* ditambahkan sebanyak 25 μL larutan akridin oranye dan etidium bromida lalu diamati di bawah mikroskop fluoresense dengan perbesaran 100 kali. Sel yang mati dan diduga mengalami apoptosis akan berwarna oranye (menyerap akridin oranye) dan sel yang hidup berwarna hijau (menyerap etidium bromida).

Isolasi DNA Sel HeLa

Sebanyak 500 μL sel HeLa (kepadatan sel 1×10^5 sel/mL) dimasukkan ke dalam mikroplat 24 sumuran. Ekstrak sampel (dosis 25 $\mu\text{g/mL}$) dimasukkan ke dalam sumuran kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada inkubator CO_2 . Sel tanpa pemberian ekstrak digunakan sebagai kontrol negatif. Setelah 24 jam supernatan diambil dan disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit. Sel yang melekat pada sumuran diambil dengan menambahkan *buffer lysis* sebanyak 700 μL . Suspensi dimasukkan ke dalam tabung ependorf lalu ditambah proteinase K sebanyak 20 μL dan dipanaskan dalam penangas air selama 1 jam pada suhu 55°C , setelah itu ditambah fenol dengan perbandingan 1 : 1. Suspensi digoyang selama 2 jam kemudian disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit. Lapisan DNA yang terdapat pada bagian paling atas dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung ependorf yang baru serta ditambahkan isopropanol 1 : 1 kemudian disimpan pada suhu -70°C . Setelah 1 jam suspensi disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 300 μL lalu disentrifus kembali selama 5 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Supernatan dibuang, DNA yang diperoleh dikeringkan selama lebih kurang 5 menit pada suhu kamar. Setelah etanol benar-benar kering, ditambahkan tripsin EDTA sebanyak 15 μL lalu diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C . DNA yang diperoleh disimpan pada suhu minimum -20°C dan siap untuk dianalisis.

Uji Ekspresi Gen p53

Amplifikasi gen p53 dilakukan dengan PCR menggunakan *puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences). Komponen reaksi yang digunakan adalah DNA sel HeLa yang diberi perlakuan, primer p53, dNTP (terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), *puReTaq DNA Polymerase* dan *buffer* (10mM Tris-HCL pH 9, 50 mM KCl dan 1,5 mM MgCl_2). Analisis PCR menggunakan primer p53 dengan urutan basa :



Gambar 1. Mortalitas *A. salina* setelah pemberian ekstrak metanol *P.cf. nigricans*.
Figure 1. *A. salina* mortality after being exposed to methanolic extract of *P.cf. nigricans*.

Forward: 5'-AAGCAGTCACAGCACATGACGGAG-3'
Reverse: 5'-GAGTCTTCCAGTGAGATGATGGT-3'

Semua komponen reaksi tersebut dicampur dalam *microtube* dengan volume total 25 μ L. *Microtube* dimasukkan ke dalam mesin PCR dan dioperasikan dalam 30 siklus. Denaturasi awal dilakukan pada suhu 95°C selama 3 menit. Tiap siklus terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, tahap penempelan (*annealing*) pada suhu 60°C selama 30 detik, tahap sintesis pada suhu 72°C selama 10 menit, tahap akhir sintesis pada suhu 72°C selama 10 menit dan tahap akhir PCR pada suhu 4°C selama 4 menit. Produk hasil PCR selanjutnya dielektroforesis dengan gel agarosa 2% kemudian ekspresi gen p53 divisualisasikan dengan UV transiluminator.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil Fraksinasi

Hasil fraksinasi menggunakan pelarut metanol dan etil asetat memperlihatkan bahwa hanya metanol yang dapat mengekstrak senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak kasar *P. cf. Nigricans*. Fraksi yang terekstrak dalam pelarut etil asetat jumlahnya sangat sedikit sehingga dalam proses pengujian selanjutnya hanya menggunakan fraksi metanol.

Aktivitas Tahap Awal terhadap *Artemia salina*

Viabilitas *A. salina* dan nilai LC_{50} hasil uji BSLT dari ekstrak metanol *P. cf. nigricans* disajikan pada Gambar 1. Pada dosis ekstrak 1000 μ g/mL semua *A. salina* yang diuji mengalami kematian. Hasil perhitungan analisis probit untuk mencari nilai LC_{50} disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa nilai LC_{50} ekstrak metanol spons *P. cf. nigricans* sebesar 23,4 μ g/mL. Menurut McLaughlin & Rogers (1998) suatu ekstrak termasuk dalam katagori sangat aktif apabila memiliki nilai $LC_{50} < 30$ ppm.

Hasil penelitian Astuti *et al.* (2003) menunjukkan bahwa fraksi kloroform spons *Petrosia sp.* yang berasal dari perairan Bunaken memiliki nilai LC_{50} sebesar 48,15 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa spons dari genera *Petrosia* memiliki potensi bahan bioaktif yang menarik untuk ditelusuri lebih lanjut.

Aktivitas Sitotoksik terhadap Sel HeLa

Mortalitas sel HeLa hasil uji MTT disajikan pada Gambar 2. Pada pemberian dosis ekstrak 6,25 μ g/mL, sekitar 20% sel HeLa mengalami kematian dan pada dosis 12,5 μ g/mL persentase sel HeLa yang mati meningkat dengan tajam yaitu sekitar 60%. Nilai

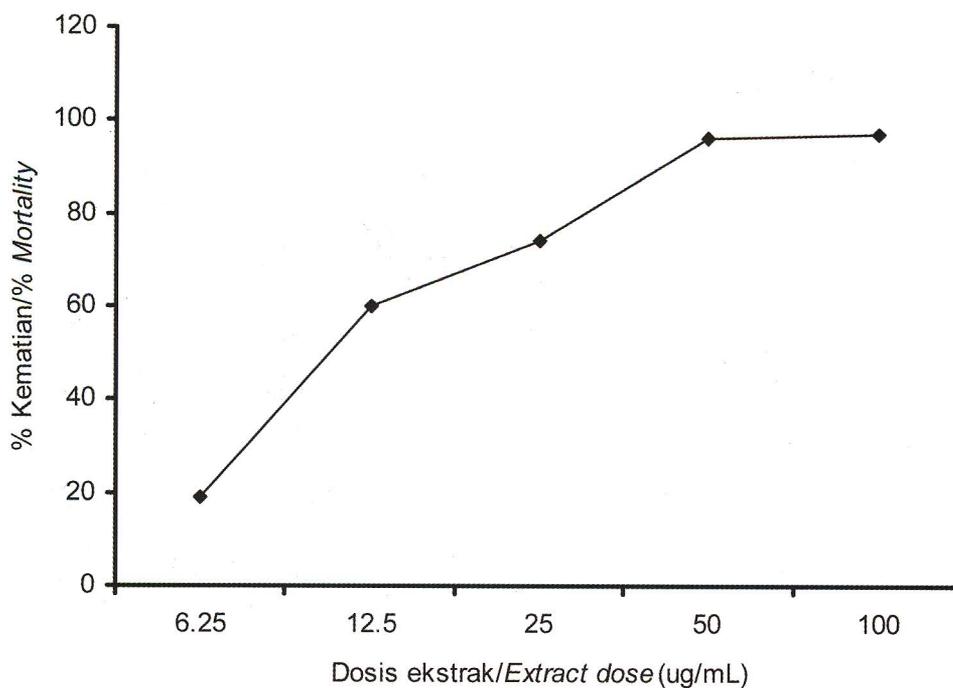
Tabel 1. Hasil uji BSLT ekstrak kasar *P. cf. nigricans*
 Table 1. BSLT result of *P. cf. nigricans* crude extract

Dosis/Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Log dosis/ Log of dose	% Kematian/ % Mortality	Nilai probit/ Probit value	Persamaan garis/ Linear equation	LC ₅₀ /LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
10	1	30.0	4.48	Y = 1.805X + 2.52 R ² = 0.98	23.45
100	2	80.0	5.84		
1000	3	100.0	8.09		

LC₅₀ fraksi metanol spons *P. cf. nigricans* disajikan pada Tabel 2.

Nilai LC₅₀ fraksi metanol *P. cf. nigricans* sebesar 11,9 $\mu\text{g/mL}$. Nilai tersebut tergolong sangat baik karena ekstrak yang diujikan belum murni. Suatu ekstrak kasar dianggap memiliki efek antitumor yang kuat apabila hasil uji sitotoksik memiliki LC₅₀ kurang dari 30 $\mu\text{g/mL}$ (Munro *et al.*, 1987; Anderson, 1994 dalam Sismindari *et al.*, 2002). Pada umumnya senyawa aktif yang sudah dalam bentuk murni (*pure compound*) memiliki aktivitas biologi yang lebih kuat dengan catatan pada waktu proses pemurnian senyawa aktif tidak hilang atau mengalami kerusakan.

MTT assay merupakan salah satu uji kolorimetri yang didasarkan atas pemecahan garam tetrazolium (MTT) yang berwarna kuning dan larut dalam air menjadi kristal biru-formazan yang tidak larut dalam air. Pemecahan MTT terjadi pada mitokondria sel yang hidup oleh enzim suksinat dehidrogenase. Absorbansi yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi biru-formazan yang larut dalam pelarut organik misalnya isopropanol. Absorbansi yang dihasilkan sebanding dengan jumlah sel yang hidup (Zachary, 2003). Reduksi garam tetrazolium merupakan cara yang dapat dipercaya untuk mendeterminasi proliferasi sel. Garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning



Gambar 2. Mortalitas sel HeLa hasil uji MTT.
 Figure 2. Result of MTT assay showing HeLa cell mortality.

Tabel 2. Hasil uji sitotoksik fraksi metanol *P. cf. nigricans* terhadap sel HeLa
 Table 2. Result of cytotoxicity assay of *P. cf. nigricans* methanol fraction against HeLa cell

Dosis/Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Log dosis/ Log of dose	% Kematian/ % Mortality	Nilai probit/ Probit value	Persamaan garis/ Linear equation	LC ₅₀ /LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
6.25	0.79	18.91	4.12		
12.50	1.09	60.00	5.25		
25.00	1.39	74.05	5.64	Y = 2.235X + 2.5909	11.9
50.00	1.69	96.37	6.75	R ² = 0.92	
100.00	2.00	96.21	6.75		

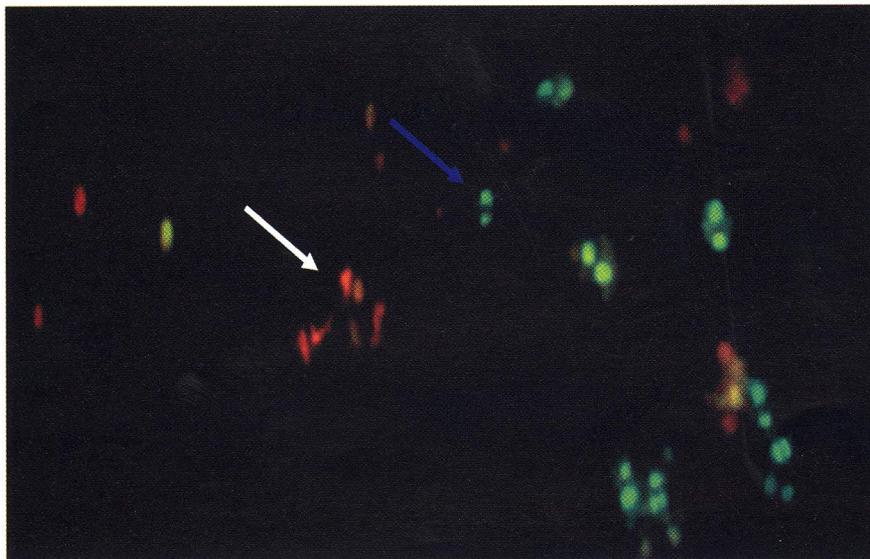
berkurang sebagai akibat dari aktivitas metabolisme sel terutama oleh kerja enzim suksinat dehidrogenase. Kristal formazan berwarna ungu yang terbentuk dapat dilarutkan dan dikuantifikasi dengan alat spektrofotometer (ATCC, 2001).

Induksi Apoptosis

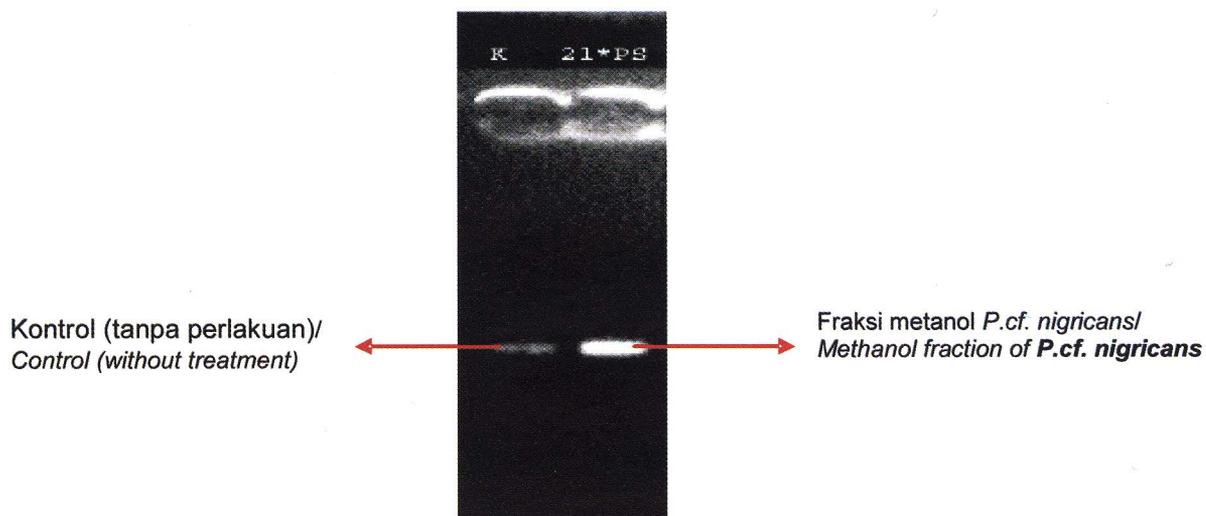
Hasil uji induksi apoptosis ekstrak metanol *P. cf. nigricans* memperlihatkan bahwa ekstrak memiliki kemampuan dalam menginduksi terjadinya apoptosis pada sel HeLa. Sel yang mati dan diduga mengalami

apoptosis akan berwarna oranye dan sel yang hidup berwarna hijau. Hasil uji induksi apoptosis metode pengecatan ganda disajikan pada Gambar 3.

Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis berupa pengkerutan sel, kerusakan membran plasma dan kondensasi kromatin. Sel yang mati dengan proses ini tidak kehilangan kandungan internal sel dan tidak menimbulkan respon inflamasi. Jika program apoptosis sudah berakhir, sel menjadi kepingan-kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis (*apoptotic bodies*). Badan apoptosis ini



Gambar 3. Sel-sel HeLa yang diduga mengalami apoptosis (panah putih) dan sel-sel HeLa yang masih hidup (panah biru) hasil pengecatan menggunakan akridin-oranye dan etidium bromida.
 Figure 3. HeLa cells suspected apoptosis event (white arrow) and life HeLa cells (blue arrow) stained using acridine-orange and ethidium bromide.



Gambar 4. Hasil analisis PCR (K=kontrol, 21*PS =kode sampel *P. cf. nigricans*).
 Figure 4. Result of PCR analysis (K=control, 21*PS =sample code of *P. cf. nigricans*).

akan dapat dikenali oleh sel makrofag untuk selanjutnya dimakan (Peter *et al.*, 1997 dalam Nurulita, 2005). Kematian sel dapat juga terjadi melalui nekrosis. Nekrosis merupakan proses kerusakan sel yang ditandai oleh meningkatnya volume sel. Pada kasus ini sel kehilangan tekanan membran. Nekrosis biasanya diikuti dengan respon inflamasi. Nekrosis terjadi pada proses patologis karena adanya paparan tekanan fisik atau kimia yang sering menimbulkan rasa sakit.

Hasil analisis PCR untuk mendeteksi ekspresi gen p53 disajikan dalam Gambar 4. Fraksi metanol *P. cf. nigricans* (21*PS) memiliki pita yang lebih tebal dibanding dengan kontrol (K). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian fraksi metanol *P. cf. nigricans* dapat meningkatkan ekspresi gen p53 pada sel tumor HeLa.

Gen p53 merupakan salah satu gen penekan terjadinya tumor. Gen p53 merupakan “penjaga gawang” stabilitas genomik yang berperan dalam siklus regulasi DNA, apoptosis dan kontrol proliferasi sel (Cernochova *et al.*, 2004; Baran *et al.*, 2005). Saat ini eksplorasi untuk mencari senyawa aktif yang dapat meningkatkan ekspresi gen p53 intensif dilakukan di samping eksplorasi bahan aktif yang memiliki efek sitotoksik dan antiproliferatif.

KESIMPULAN

Ekstrak spons *P. cf. nigricans* memiliki aktivitas tahap awal yang baik dengan nilai LC_{50} 23,4 ppm. Fraksi metanol memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat dengan nilai LC_{50} sebesar 11,9 ppm. Fraksi ini juga

mampu menginduksi terjadinya apoptosis dan dapat meningkatkan ekspresi gen p53.

DAFTAR PUSTAKA

- American Type Culture Collection (ATCC). 2001. *MTT Proliferation Assay, Instructions*. P.O.Box 1549, Manassas, USA. 6 pp.
- Astuti, P., Alam, G. and Wahyuono, S. 2003. Bioactivity screening of sponge collected from Bunaken, Manado by brine shrimp lethality test against *Artemia salina* Leach. *Majalah Farmasi Indonesia*, 14(1): 238–243.
- Baran, W., Szepietowski, J.C. and Szybejko-Machaj, G. 2005. Expression of p53 protein in psoriasis. *Acta Dermatoven APA*. 14(3): 79–83.
- Berninghausen, O. and Leippe, M. 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 65(9): 3615–3620.
- Choi, H.J., Bae, S.J., Kim, N.D., Jung, J.H. and Choi, Y.H. 2004. Induction of apoptosis by dideoxypetrosynol A, a polyacetylene from the sponge *Petrosia* sp. in human skin melanoma cells. *Int. J. Mol. Med*. 14(6): 1091–1096.
- Cernochova, D., Pospisilova, E. and Cylarova, D. 2004. Expression p53, p63 and p73 in the orofacial region of human embryos. *Biomed. Papers*. 148(2): 203–204.
- Faulkner, D.J. 2000. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 17: 7–55
- Faulkner, D.J., Unson, M.D. and Bewley, C.A. 1994. The chemistry of some sponges and their symbionts. *Pure & Appl. Chem*. 66: 1883–1990.