

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIKANKER  
DARI SPONS TAMAN NASIONAL BUNAKEN, MANADO, TERHADAP  
SEL KANKER PARU-PARU (A549), SERVIKS (HeLa),  
DAN PAYUDARA (MCF-7)**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**NABILA SAKHI AZ-ZAHRA  
2217011052**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2026**

## ABSTRAK

### ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIKANKER DARI SPONS TAMAN NASIONAL BUNAKEN, MANADO, TERHADAP SEL KANKER PARU-PARU (A549), SERVIKS (HeLa), DAN PAYUDARA (MCF-7)

Oleh

NABILA SAKHI AZ-ZAHRA

Spons laut merupakan sumber senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengarakterisasi senyawa bioaktif antikanker dari spons asal perairan Taman Nasional Bunaken, Manado. Ekstraksi dilakukan melalui maserasi menggunakan metanol, diikuti partisi cair-cair dengan etil asetat dan air. Isolasi senyawa aktif menggunakan pendekatan *bioassay-guided isolation* melalui kromatografi kolom terbuka (KKT) dan *solid phase extraction* (SPE) Sep-Pak C<sub>18</sub>. Aktivitas sitotoksik diuji terhadap sel A549, HeLa, dan MCF-7 dengan metode MTT Assay, sedangkan karakterisasi struktur dilakukan menggunakan LC-MS dan <sup>1</sup>H-NMR.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat memiliki aktivitas inhibisi lebih kuat dibandingkan fraksi air. Spons *Hippospongia* sp. menghasilkan empat senyawa yang berhasil diidentifikasi, yaitu *demethylfurospingin-4* (**11**) dengan aktivitas sitotoksik pada sel A549 (IC<sub>50</sub> 0,1292 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 0,00007 µg/mL), dan MCF-7 (IC<sub>50</sub> 0,1 µg/mL); *furospingin-2* (**12**) dengan aktivitas sitotoksik pada sel A549 (IC<sub>50</sub> 3,0 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 54,7 µg/mL), dan MCF-7 (IC<sub>50</sub> 8,4 µg/mL); *dibutyl phthalate* (**14**) dengan aktivitas sitotoksik pada sel A549 (IC<sub>50</sub> 11,6 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 3,7 µg/mL), dan MCF-7 (IC<sub>50</sub> 16,2 µg/mL); serta *hippospondine F* (**15**) dengan aktivitas sitotoksik pada sel A549 (IC<sub>50</sub> 3,1 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 8,7 µg/mL), dan MCF-7 (IC<sub>50</sub> 14,1 µg/mL). Spons *Spongia* sp. menghasilkan satu senyawa yaitu *cyclopeptin* (**17**) dengan aktivitas sitotoksik pada sel A549 (IC<sub>50</sub> 24,85 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 10,58 µg/mL) dan MCF-7 (IC<sub>50</sub> 27,0 µg/mL). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa spons laut Taman Nasional Bunaken berpotensi sebagai sumber metabolit sekunder bioaktif yang dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat antikanker alami.

Kata kunci: A549, HeLa, MCF-7, MTT assay, senyawa antikanker, spons laut

## ABSTRACT

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE ANTICANCER COMPOUNDS FROM MARINE SPONGES OF BUNAKEN NATIONAL PARK, MANADO, AGAINST LUNG (A549), CERVICAL (HeLa), AND BREAST (MCF-7) CANCER CELLS

By

NABILA SAKHI AZ-ZAHRA

Marine sponges are a source of bioactive compounds with potential anticancer activity. This study aimed to isolate and characterize anticancer bioactive compounds from sponges collected from the waters of Bunaken National Park, Manado. Extraction was carried out by maceration using methanol, followed by liquid-liquid partition using ethyl acetate and water. Isolation of active compounds was performed using a bioassay-guided isolation approach through open column chromatography (OCC) and Sep-Pak C<sub>18</sub> solid phase extraction (SPE). Cytotoxic activity was evaluated against A549, HeLa, and MCF-7 cells using the MTT assay, while structural characterization was conducted using LC-MS and <sup>1</sup>H-NMR analyses. The ethyl acetate fraction exhibited stronger inhibitory activity than the aqueous fraction. Sponge *Hippospongia* sp. produced four identified compounds, namely Demethylfurospongin-4 (**11**) with cytotoxic activity against A549 (IC<sub>50</sub> 0.1292 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 0.00007 µg/mL), and MCF-7 (IC<sub>50</sub> 0.1 µg/mL) cells; furospongin-2 (**12**) with cytotoxic activity against A549 (IC<sub>50</sub> 3.0 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 54.7 µg/mL), and MCF-7 (IC<sub>50</sub> 8.4 µg/mL) cells; dibutyl phthalate (**14**) with cytotoxic activity against A549 (IC<sub>50</sub> 11.6 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 3.7 µg/mL), and MCF-7 (IC<sub>50</sub> 16.2 µg/mL) cells; and hippospondine F (**15**) with cytotoxic activity against A549 (IC<sub>50</sub> 3.1 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 8.7 µg/mL), and MCF-7 (IC<sub>50</sub> 14.1 µg/mL) cells. Sponge *Spongia* sp. produced one compound, cyclopeptin (**17**), which exhibited cytotoxic activity against A549 (IC<sub>50</sub> 24.85 µg/mL), HeLa (IC<sub>50</sub> 10.58 µg/mL), and MCF-7 (IC<sub>50</sub> 27.0 µg/mL) cells. These findings demonstrate that marine sponges from Bunaken National Park have strong potential as sources of bioactive secondary metabolites that may be further developed as natural anticancer candidates.

Keywords: A549, HeLa, MCF-7, MTT assay, anticancer compounds, marine sponges

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIKANKER  
DARI SPONS TAMAN NASIONAL BUNAKEN, MANADO, TERHADAP  
SEL KANKER PARU-PARU (A549), SERVIKS (HeLa),  
DAN PAYUDARA (MCF-7)**

**Oleh**

**Nabila Sakhi Az-Zahra**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2026**

**Judul** : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI  
SENYAWA BIOAKTIF ANTIKANKER  
DARI SPONS TAMAN NASIONAL  
BUNAKEN, MANADO, TERHADAP  
SEL KANKER PARU-PARU (A549),  
SERVIKS (HeLa), DAN PAYUDARA  
(MCF-7)**

**Nama** : **Nabila Sakhi Az-Zahra**

**Nomor Pokok Mahasiswa** : **2217011052**


**Jurusan** : **Kimia**

**Fakultas** : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. Komisi Pembimbing

  
**Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.**  
NIP. 195809221988111001

  
**Peni Ahmadi, Ph.D.**  
NIP. 198805052020122011

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

  
**Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.**  
NIP. 19720532000032001

**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

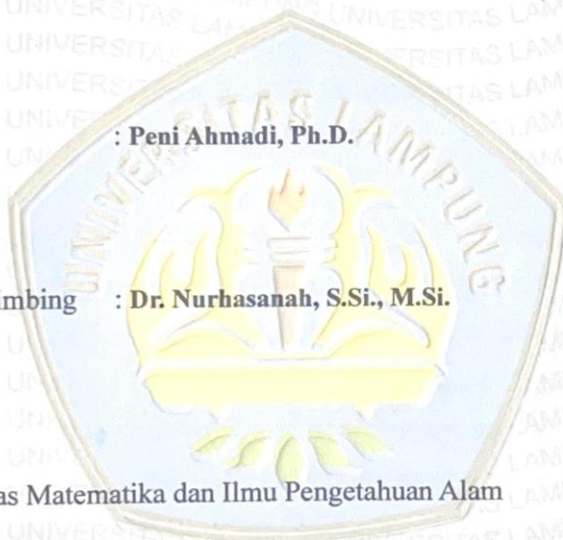
**Ketua : Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.**



**Sekretaris : Peni Ahmadi, Ph.D.**



**Penguji  
Bukan Pembimbing : Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.**



**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**  
NIP. 197110012005011002

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 23 Juni 2026**

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nabila Sakhi Az-Zahra  
NPM : 2217011052  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker dari Spons Taman Nasional Bunaken, Manado, terhadap Sel Kanker Paru-Paru (A549), Serviks (HeLa), dan Payudara (MCF-7)”** adalah benar karya asli saya sendiri, tanpa adanya karya orang lain kecuali yang telah disebutkan dalam daftar pustaka. Selain itu, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh pihak Universitas Lampung untuk kepentingan akademik, selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/penyusun karya ilmiah ini.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 26 Juli 2026  
Yang menyatakan,



Nabila Sakhi Az-Zahra  
NPM 2217011052

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Nabila Sakhi Az-Zahra, lahir di Jatibaru pada 21 Agustus 2003. Penulis merupakan putri tunggal dari pasangan Bapak Suparno dan Ibu Sarwini.

Perjalanan pendidikan penulis dimulai pada tingkat Taman Kanak-Kanak di TK Al-Azhar 10 (2010). Penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang Sekolah Dasar di SD Negeri 3 Jatibaru (2010-2016). Penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Tanjung Bintang (2016-2019). Selanjutnya, penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Tanjung Bintang (2019-2022). Pada tahun 2022, penulis diterima sebagai mahasiswa Program Studi Kimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung, melalui Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung, penulis aktif sebagai Asisten Praktikum Kimia Organik di Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung. Pada tahun 2025, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Kimia Organik, Universitas Lampung dengan topik penelitian "Potensi Tanaman Obat sebagai Antibakteri terhadap Bakteri Resisten". Pada tahun yang sama, penulis juga mengikuti program Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Kelurahan Tanjung Baru, Kecamatan Kedamaian, Kota Bandar Lampung. Selanjutnya, penulis melaksanakan penelitian tugas akhir di Laboratorium Hidrobiologi dan Genomik, Kelompok Riset Cell Biology and Disease Mechanism, Pusat Riset Vaksin dan Obat (PRVO), Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Kawasan Sains dan Teknologi (KST) Dr. (H.C.) Ir. Soekarno, Cibinong, Bogor.

## MOTTO

*“Maka sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.”*

– QS. Al-Insyirah: 5-8 –

*“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”*

– QS. Al-Baqarah: 286 –

*“Dan janganlah kamu (merasa) lemah, dan jangan (pula) bersedih hati, padahal kamu paling tinggi derajatnya, jika kamu orang-orang yang beriman.”*

– QS. Ali-Imran: 139 –

*“Hidup bagaikan pesawat kertas terbang dan pergi membawa impian. Sekuat tenaga dengan hembusan angin terus melaju terbang. Jangan bandingkan jarak terbangnya tapi bagaimana dan apa yang dilalui.”*

– JKT48 –

*“Jika orangtuamu tak memiliki nama besar, untuk dikenang atau dibanggakan, maka besarkanlah nama baikmu.”*

## PERSEMBAHAN



**“Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang”**

*Alhamdulillahirabbil ‘ālamīn*, dengan segala rasa syukur kupersembahkan karya kecil ini sebagai wujud, cinta, bakti, dan tanggung jawab kepada:

**Kedua orang tuaku,**

Bapak Suparno dan Ibu Sarwini, yang telah membesarkanku dengan penuh kasih sayang serta senantiasa memberikan doa dan dukungan tanpa henti.

**Dengan rasa hormat,**

Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D., Ibu Peni Ahmadi, Ph.D., Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., dan seluruh dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik, membimbing, dan membagikan ilmu.

**Keluarga besarku,**

Keluarga Bapak Tawil Sudiro, Keluarga Bapak Kasan Mardi, dan Keluarga Bapak Towi Rejo, yang senantiasa memberikan doa, semangat, dukungan, dan perhatian.

**Seluruh sahabat, rekan penelitian, dan teman-teman seperjuangan,** yang senantiasa memberikan semangat, dukungan, dan perhatian diperjalanan yang penuh perjuangan ini.

**Almamater tercinta Universitas Lampung**

**Diriku sendiri,** yang telah berani melangkah, berjuang dengan penuh semangat, menghadapi setiap kesulitan, dan bertahan hingga saat ini.

## SANWACANA

*Alhamdulillahirabbil'alamīn*, puji syukur ke hadirat Allah *Subhānahu wa Ta'ālā* yang telah melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Antikanker dari Spons Taman Nasional Bunaken, Manado, terhadap Sel Kanker Paru-Paru (A549), Serviks (HeLa), dan Payudara (MCF-7)”** sebagai salah satu syarat dalam meraih gelar Sarjana Sains pada program studi Kimia FMIPA Universitas Lampung. Sholawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada baginda Rasulullah Muhammad *ṣallallāhu 'alaihi wa sallam*, yang kita nantikan syafaatnya di yaumul akhir kelak. *Aamiin yarabbal'alamin*.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, dukungan, doa, serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Suparno dan Ibu Sarwini, yang senantiasa mencurahkan kasih sayang, doa yang tiada putus, serta segala pengorbanan, dukungan, dan kepercayaan dalam setiap langkah penulis. Semoga Allah SWT. senantiasa melimpahkan kesehatan, kebahagiaan, keberkahan, dan umur panjang sehingga senantiasa dapat menyertai setiap langkah dan menyaksikan setiap keberhasilan penulis. *Aamiin yarabbal'alamin*.
2. Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing I, yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing, memberikan arahan, masukan, motivasi, serta ilmu yang sangat berharga bagi penulis, baik selama pelaksanaan penelitian maupun dalam proses penyusunan skripsi ini hingga

dapat terselesaikan dengan baik. Semoga Allah SWT. senantiasa membalas segala kebaikan Bapak dengan pahala yang berlipat ganda serta melimpahkan kesehatan, keberkahan, dan kebahagiaan di mana pun Bapak berada. *Aamiin yarabbal'amin.*

3. Ibu Peni Ahmadi, Ph.D. selaku Dosen Pembimbing II, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk belajar, meneliti, dan berkembang serta membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan kepercayaan, segala ilmu, bimbingan, kepercayaan, kesabaran, perhatian, serta pengalaman berharga yang telah diberikan. Semoga Allah SWT. senantiasa melimpahkan kesehatan, kebahagiaan, keberkahan, dan kesuksesan kepada Ibu beserta keluarga, serta membalas segala kebaikan Ibu dengan pahala yang berlipat ganda. *Aamiin yarabbal'amin.*
4. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembahas, yang dengan penuh perhatian telah meluangkan waktu untuk arahan, masukan, dan perbaikan yang sangat berarti bagi penulis selama proses penyusunan skripsi ini. Semoga Allah SWT. senantiasa melimpahkan rahmat, kesehatan, keberkahan, dan kebahagiaan kepada Ibu, serta membalas segala kebaikan Ibu dengan pahala yang berlipat ganda. *Aamiin yarabbal'amin.*
5. Ibu Prof. Dr. Dra. Ilim, M.S. selaku Dosen Pembimbing Akademik, yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan, dan saran kepada penulis selama menempuh pendidikan di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Semoga Allah SWT. senantiasa melimpahkan kesehatan, keberkahan, dan membalas segala kebaikan Ibu dengan pahala yang berlipat ganda. *Aamiin yarabbal'amin.*
6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
7. Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
8. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik, membimbing, dan membagikan ilmu dengan penuh kesabaran, keikhlasan, serta dedikasi selama penulis menempuh pendidikan.

9. Keluarga Bapak Tawil Sudiro, Keluarga Bapak Kasan Mardi, dan Keluarga Bapak Towi Rejo, yang senantiasa mendoakan, memberikan dukungan dan menguatkan dalam perjalanan pendidikan penulis.
10. Seluruh Bapak dan Ibu guru penulis, serta Oneh Hanifa, Pak Tama, dan Mba Winda, yang telah membekali penulis dengan ilmu yang bermanfaat.
11. Seluruh periset dan rekan penelitian di Laboratorium Hidrobiologi dan Laboratorium Genomik, Shafira, Rama, Yulia, dan Pak Yudha, yang telah membimbing, membantu, dan kebersamai penulis selama penelitian.
12. Masyarakat Terdzolimi: Adesya, Uci, Kadek, Ajeng, Nandia, Zia, Teli, Agnes, Weni, Ulida, dan Rara yang telah menjadi saudara seperjuangan sejak awal perkuliahan, senantiasa menjadi tempat berbagi cerita dan keluh kesah, memberikan dukungan dan semangat, serta menjadi tempat berbagi suka dan duka selama perjalanan pendidikan penulis. Semoga Allah SWT. senantiasa memudahkan setiap langkah, melimpahkan keberkahan, kesuksesan, dan kebahagiaan kepada mereka.
13. ADS *Research* '22: Annisa, Helena, Abizar, Faiz, dan Irham, yang telah menjadi keluarga bagi penulis. Semoga Allah SWT. selalu memudahkan pada setiap kesulitannya.
14. Teman-teman di Laboratorium Kimia Organik, Kak Fendi, Kak Oci, Kak Ibnu, Kak Isti, Kak Fayza, NRG '22, SBR '22, dan HAP '22, yang telah memberikan dukungan, pengetahuan dan pengalaman, serta kebersamaan selama proses penelitian. Semoga Allah SWT. memberikan keberkahan dan kesuksesan.
15. Teman-teman Kelas B "Mari Bersinar", yang telah menjadi bagian dari perjalanan pendidikan penulis serta memberikan kebersamaan, dukungan, dan kenangan indah selama masa perkuliahan yang akan selalu dikenang. Semoga bahagia, dipermudah urusannya, dan sukses selalu.
16. Keluarga besar Jurusan Kimia angkatan 2022 yang telah menjadi bagian dari perjalanan penulis selama menempuh pendidikan.
17. Teman kecil penulis: Yoga dan Tata, yang telah berbagi kebahagiaan sejak masa kecil, senantiasa memberikan dukungan, motivasi, dan semangat, serta menjadi tempat penulis berbagi cerita dan keluh kesah. Semoga Allah SWT. senantiasa

melimpahkan kebahagiaan, kesehatan, kesuksesan, dan kemudahan dalam setiap langkah kalian.

18. Teman-teman sekolah: Abel, Fatih, Kak Julio, Seto, Mas Zakky, Arya, dan Dita, yang senantiasa memberikan dukungan, berbagi ilmu, serta menemani penulis dalam kebersamaan dan perjuangan hingga saat ini. Semoga Allah SWT. senantiasa memudahkan setiap langkah, melimpahkan keberkahan, kesehatan, dan kebahagiaan kepada kalian semua.
19. Kucing-kucing kesayangan penulis: Malika, Mochi, Micko, Cimoy, dan Bawor, yang telah menjadi teman setia, menemani penulis di setiap rasa lelah dan sepi, serta menghadirkan kebahagiaan dalam perjalanan hidup penulis.
20. Dewo Prahara Abiyoso, yang senantiasa hadir menemani setiap proses, memberikan dukungan, kekuatan, serta ketulusan yang tidak pernah berkurang. Terima kasih atas waktu, tenaga, perhatian, dan segala pengorbanan yang telah diberikan sehingga perjalanan ini terasa lebih ringan. Terima kasih telah menjadi tempat pulang yang selalu menghadirkan ketenangan dalam setiap lelah, serta berbagi suka maupun duka selama proses ini. Semoga Allah SWT. senantiasa melindungi, memberkahi, melimpahkan kesehatan, kebahagiaan, dan kemudahan pada setiap langkah kehidupanmu.
21. Almamater tercinta, Universitas Lampung, yang dengan bangga menjadi tempat penulis belajar, berkembang, dan menggapai cita-cita.
22. Seluruh pihak yang terlibat dalam penyusunan skripsi ini dan tidak dapat disebutkan satu per satu. Terima kasih atas seluruh doa, dukungan serta bantuannya.

Bandar Lampung, 26 Juni 2026  
Penulis,

Nabila Sakhi Az-Zahra

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>ix</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan .....	3
1.3. Manfaat .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1. Spons .....	5
2.2. Senyawa Metabolit Sekunder .....	8
2.3. Kanker .....	11
2.3.1. Sel Kanker Paru-Paru (A549) .....	13
2.3.2. Sel Kanker Serviks (HeLa) .....	14
2.3.3. Sel Kanker Payudara (MCF-7) .....	15
2.4. Ekstraksi Senyawa Bioaktif .....	17
2.4.1. Maserasi .....	17
2.5. Fraksinasi .....	19
2.6. <i>Bioassay-guided Isolation</i> .....	21
2.7. Kromatografi .....	22
2.7.1. Kromatografi Kolom .....	23
2.7.2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	25
2.8. <i>Solid Phase Extraction</i> (SPE) .....	29
2.9. Uji Sitotoksitas (MTT <i>Assay</i> ) .....	30
2.10. Karakterisasi Struktur .....	32
2.10.1. <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (LC-MS) .....	32
2.10.2. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR) .....	34
<b>III. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>38</b>
3.1. Tempat dan Waktu .....	38
3.2. Alat dan Bahan .....	38
3.3. Metode .....	39
3.3.1. Biomaterial .....	39
3.3.2. Identifikasi Spikula .....	39
3.3.3. Ekstraksi dan Partisi .....	40

3.3.4. <i>Bioassay-guided Isolation</i> .....	41
3.3.5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	41
3.3.6. Kromatografi Kolom Terbuka (KKT) dengan Silika.....	41
3.3.7. Pemurnian dengan Sep-Pak C <sub>18</sub> .....	42
3.3.8. Kultur Sel dan Kondisi Pemeliharaan.....	42
3.3.9. Uji Sitotoksitas ( <i>MTT Assay</i> ).....	43
3.3.10. Uji <i>Inhibitory Concentration 50</i> (IC <sub>50</sub> ).....	44
3.3.11. Analisis Spektroskopi.....	44
3.3.12. Diagram Alir.....	45
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>47</b>
4.1. Informasi Biomaterial.....	47
4.2. Identifikasi Spikula Sampel.....	51
4.3. Ekstraksi dan Partisi Sampel.....	55
4.4. Skrining Awal Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Sampel dengan <i>MTT Assay</i> .....	58
4.5. <i>Bioassay-guided Isolation</i> Fraksi Aktif.....	60
4.5.1 SBM-037-1.....	61
4.5.1 SBM-038-1.....	62
4.5.1 SBM-046-1.....	63
4.5.1 SBM-049-1.....	63
4.6. Karakterisasi secara Kualitatif dan Kuantitatif Menggunakan Metode KLT dan LCMS serta NMR.....	65
4.6.1 SBM-037-1-4-2.....	67
4.6.2 SBM-037-1-2-2-1.....	72
4.6.3 SBM-037-1-2-2-4.....	76
4.6.4 SBM-037-1-2-5-3.....	82
4.6.5 SBM-049-1-4-2.....	88
4.7. <i>Inhibition Concentration 50</i> (IC <sub>50</sub> ) Fraksi Murni Aktif.....	92
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>95</b>
5.1 Kesimpulan.....	95
5.2 Saran.....	96
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>97</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>109</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data $^{13}\text{C}$ dan $^1\text{H}$ -NMR senyawa yang dihasilkan dari spons <i>Luffariella variabilis</i> .....	36
2. Data sampel.....	48
3. Data spikula sampel spons .....	52
4. Data berat fraksi dan persen rendemen sampel.....	57
5. Data nilai Rf.....	66
6. Karakteristik sampel murni yang diperoleh .....	67
7. Komponen dari sampel SBM-037-1-4-2 yang teridentifikasi pada LC-MS.....	68
8. Data $^1\text{H}$ -NMR sampel SBM-037-1-4-2.....	70
9. Komponen dari sampel SBM-037-1-2-2-1 yang teridentifikasi pada LC-MS. ....	73
10. Data $^1\text{H}$ -NMR Sampel SBM-037-1-2-2-1.....	75
11. Komponen dari sampel SBM-037-1-2-2-4 yang teridentifikasi pada LC-MS .....	78
12. Data $^1\text{H}$ -NMR sampel SBM-037-1-2-2-4 .....	79
13. Komponen dari sampel SBM-037-1-2-5-3 yang teridentifikasi pada LC-MS .....	83
14. Data $^1\text{H}$ -NMR sampel SBM-037-1-2-5-3 .....	85
15. Komponen dari sampel SBM-049-1-4-2 yang teridentifikasi pada LC-MS... ..	89
16. Nilai $\text{IC}_{50}$ sampel terhadap sel kanker.....	92

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bentuk spikula serta spongin yang menjadi ciri pembeda spons (a) <i>Hexactinellida</i> (b) <i>Demospongiae</i> (c) <i>Calcarea</i> (d) Spons.....	6
2. Struktur spons secara umum .....	7
3. Struktur senyawa 1–3 dari <i>Xestospongia testudinaria</i> .....	10
4. Manzamin A (4) dan 8-OH manzamin A (5).....	10
5. Struktur aaptamine (6).....	10
6. (+)- <i>curcuphenol</i> (7) dan <i>dihydrocurcuphenol</i> (8) .....	10
7. Diagram perkiraan jumlah kasus kanker baru dari tahun 2022 hingga 2045 diberbagai benua.....	11
8. Morfologi A549 yang dikultur dalam T-CM dengan mikroskop fase kontras.....	14
9. Morfologi sel kanker serviks manusia HeLa dikultur dalam medium dengan 10 % FBS, diambil dengan mikroskop kontras fase terbalik dengan perbesaran $\times 10$ . Skala batang adalah 50 $\mu\text{m}$ .....	15
10. Morfologi sel kanker serviks manusia MCF-7 dikultur dalam medium dengan 10 % FBS, diambil dengan mikroskop kontras fase terbalik dengan perbesaran $\times 10$ . Skala batang adalah 50 $\mu\text{m}$ .....	17
11. Proses maserasi .....	18
12. Proses fraksinasi pada sebuah labu pemisah dan terbentuknya dua fase yang terpisah.....	20
13. Proses evaporasi dengan <i>rotary vacuum evaporator</i> .....	20
14. <i>Bioassay-guided isolation</i> dan elusidasi struktural produk alami.....	22
15. Pemisahan sampel dengan kromatografi kolom .....	25
16. Proses elusi menggunakan KLT (a) awal elusi dan (b) hasil elusi.....	26
17. Penetapan nilai Rf: (a) senyawa 1; (b) senyawa 2; dan (c) senyawa 3 .....	27
18. Skema kartrid SPE .....	30
19. Mekanisme dasar reduksi MTT menjadi formazan .....	31

20. Diagram skema Kromatografi Cair - Spektrometri Massa (LC-MS).....	33
21. Kromatogram LC-MS yang dihasilkan senyawa dari spons <i>Aaptos suberitoides</i> .....	34
22. Puncak fragmentasi massa pada puncak yang sesuai di RT 4,62 dari spons <i>Aaptos suberitoides</i> .....	34
23. Mekanisme NMR dua dimensi.....	36
24. Senyawa yang dihasilkan dari spons <i>Luffariella variabilis</i> , senyawa <b>9</b> dan senyawa <b>10</b> .....	37
25. Diagram alir metode penelitian.....	46
26. Persentase penghambatan sel kanker oleh fraksi hasil partisi.....	59
27. Persentase penghambatan sel kanker oleh sampel murni .....	64
28. Visualisasi KLT (a) UV <sub>254</sub> nm, (b) UV <sub>366</sub> nm, (c) <i>Cerium</i> (IV) sulfat, (d) Dragendorff (e) Ninhidrin, eluen DCM : MeOH (9:1).....	65
29. Kromatogram sampel SBM-037-1-4-2 .....	68
30. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR sampel SBM-037-1-4-2.....	70
31. Struktur senyawa <i>demethylfurospingin-4</i> ( <b>11</b> ) .....	71
32. Kromatogram sampel SBM-037-1-2-2-1 .....	73
33. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR sampel SBM-037-1-2-2-1 .....	74
34. Struktur senyawa <i>furospingin-2</i> ( <b>12</b> ).....	76
35. Kromatogram sampel SBM-037-1-2-2-4.....	77
36. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR sampel SBM-037-1-2-2-4 .....	79
37. Struktur senyawa <i>furanoterpene</i> ( <b>13</b> ).....	80
38. Struktur senyawa <i>dibutyl phthalate</i> ( <b>14</b> ) .....	81
39. Kromatogram sampel SBM-037-1-2-5-3 .....	83
40. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR sampel SBM-037-1-2-5-3 .....	85
41. Struktur senyawa <i>hippospondine F</i> ( <b>15</b> ) .....	86
42. Struktur senyawa <i>pseudoceratinamide A</i> ( <b>16</b> ) .....	86
43. Kromatogram sampel SBM-049-1-4-2 .....	88
44. Spektrum <sup>1</sup> H-NMR sampel SBM-049-1-4-2.....	90
45. Struktur senyawa <i>cyclopeptin</i> ( <b>17</b> ).....	91

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu tantangan utama bagi kesehatan global. Penyakit ini bukanlah fenomena baru, karena telah dikenal sejak zaman Mesir kuno sebagaimana tercatat dalam papirus. Namun hingga saat ini angka kasusnya terus menunjukkan peningkatan. Menurut laporan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), sekitar satu dari enam kematian global disebabkan oleh kanker, sehingga menjadikannya salah satu permasalahan kesehatan utama di dunia (El-Seedi *et al.*, 2025). Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) pada 2022, tercatat 20 juta kasus baru dengan 9,74 juta kematian akibat kanker pada tahun 2022. Bahkan, diperkirakan pada tahun 2045 beban kanker global dapat mencapai 32,6 juta kasus atau meningkat sekitar 47 % dibandingkan tahun 2020.

Penelitian mengenai kanker dan berbagai metode pengobatannya telah banyak dilakukan, namun angka kematian tetap tinggi akibat resistensi obat, efek samping kemoterapi, dan rendahnya imunitas. Kondisi ini menjadi salah satu faktor diperlukannya strategi baru dalam menekan perkembangan kanker sekaligus meminimalkan efek samping pengobatan (El-Seedi *et al.*, 2025). Bahan alami menjadi salah satu sumber potensial karena mengandung beragam senyawa bioaktif dengan aktivitas medis penting. Senyawa bioaktif dari alam memiliki keanekaragaman struktur kimia yang unik, yang sulit ditiru oleh sintesis. Salah satu sumber alam dengan keunggulan berupa keanekaragaman hayati tinggi adalah ekosistem laut, yang mampu menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan struktur unik. Keunikan metabolit laut, yang sebagian besar belum dieksplorasi menjadikannya sumber menjanjikan untuk pengembangan terapi

kanker baru, dengan banyak kandidat senyawa yang pada saat ini dalam tahap uji praklinis maupun klinis (El-Seedi *et al.*, 2025).

Spons laut merupakan salah satu organisme laut yang sangat potensial dalam penemuan senyawa bioaktif, khususnya sebagai kandidat antikanker. Spons merupakan invertebrata laut yang dikenal sebagai penghasil metabolit sekunder dengan struktur kimia kompleks, seperti alkaloid, steroid, terpenoid, dan flavonoid. Senyawa-senyawa ini telah dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis penting, termasuk sitotoksik, antikanker, antivirus, antimikroba, dan antiinflamasi, sehingga menjadikan spons sebagai target utama dalam eksplorasi obat baru (Zare *et al.*, 2025). Secara global, terdapat sekitar 15.000 spesies spons, dengan sekitar 830 spesies ditemukan di perairan Indonesia. Keanekaragaman ini berkontribusi besar terhadap penemuan senyawa bioaktif, di mana spons diperkirakan menyumbang hampir 45 % dari total senyawa bioaktif laut yang telah diidentifikasi (Mahbub *et al.*, 2025; Walid *et al.*, 2024).

Menurut penelitian terdahulu menunjukkan bahwa spons laut merupakan sumber potensial senyawa bioaktif dengan aktivitas antikanker. Hasil penelitian (Jomori *et al.*, 2019) melaporkan isolasi senyawa diterpena alkaloid ceylonamide G, H, dan I dari *Spongia* sp. asal Biak, dengan ceylonamide G menunjukkan aktivitas sitotoksik paling kuat terhadap sel kanker prostat DU145 ( $IC_{50} = 6,9 \mu M$ ). Penelitian (Arai *et al.*, 2012) berhasil mengisolasi stylissamide X dari *Stylissa* sp. yang mampu menghambat migrasi sel kanker serviks HeLa pada konsentrasi 0,1–10  $\mu M$  tanpa menurunkan viabilitas sel secara signifikan. Penelitian (Fajarwati *et al.*, 2024) juga berhasil mengisolasi aaptamine dari *Aaptos* sp. asal Bunaken yang aktif terhadap sel kanker kolorektal DLD-1 dan Caco-2 dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing 30,3  $\mu g/mL$  dan 236,8  $\mu g/mL$ . Selain itu, (Ibrahim and Mohamed, 2017) melaporkan isolasi ingenine E, alkaloid  $\beta$ -karbolin baru dari *Acanthostrongylophora ingens* asal Sulawesi, yang menunjukkan aktivitas kuat terhadap sel kanker payudara (MCF-7), paru-paru (A549), dan kolon (HCT116). Temuan ini menunjukkan bahwa spons laut Indonesia memiliki potensi besar sebagai sumber senyawa kandidat obat antikanker alami.

Salah satu kawasan laut yang kaya akan keanekaragaman hayati adalah Taman Nasional Bunaken di Sulawesi Utara, yang memiliki terumbu karang seluas 8.010,7 hektar. Topografi terumbu karang yang unik dan berbagai asosiasi biota laut menjadikan kawasan ini ekosistem kompleks dengan nilai ekologis tinggi, dihuni beragam organisme termasuk ikan, Coelenterata (karang batu, karang lunak, anemon), Crustacea (udang, kepiting), Echinodermata (bintang laut, lili laut, bulu babi, teripang), Molluska (kerang, bia, kima), alga laut, spons, *ascidian*, *gorgonia*, dan organisme laut lainnya (Karauwan and Gumolili, 2023). Sebagai bagian dari segitiga karang, perairan Sulawesi Utara yang meliputi Taman Nasional Bunaken, Pulau Bangka di Minahasa Utara, dan Teluk Manado memiliki keanekaragaman organisme laut yang sangat tinggi, termasuk lebih dari 100 spesies spons yang berpotensi menjadi sumber senyawa bioaktif (Caroles *et al.*, 2025; Chairunnisa dkk., 2025).

Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi potensi spons laut dari perairan Taman Nasional Bunaken di Sulawesi Utara, sebagai sumber senyawa bioaktif dengan aktivitas antikanker. Isolasi dan karakterisasi senyawa dilakukan untuk mengungkap metabolit sekunder yang dihasilkan, sehingga dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan kandidat obat baru yang lebih efektif dan minim efek samping.

## **1.2. Tujuan**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Memperoleh identitas spons dari deposit Laboratorium Genomik, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, yang diperoleh dari perairan Taman Nasional Bunaken, Manado.
2. Mendapatkan senyawa bioaktif antikanker dari spons dan mengkarakterisasi senyawa bioaktif antikanker yang diperoleh dengan KLT, LC-MS, serta <sup>1</sup>H-NMR.

3. Mengetahui potensi senyawa metabolit sekunder dari spons Taman Nasional Bunaken terhadap sel A549, HeLa, dan MCF-7.

### **1.3. Manfaat**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Menambah informasi baru tentang spons yang berasal dari perairan Taman Nasional Bunaken di Manado, Sulawesi Utara, serta senyawa bioaktif yang dihasilkannya.
2. Memberikan informasi baru terkait potensi spons di Taman Nasional Bunaken, Manado, Sulawesi Utara sebagai sumber senyawa antikanker yang *sustainability* dan *economic friendly*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Spons

*Porifera* berasal dari bahasa Latin *porus* (berpori) dan *fer* (membawa) yang merupakan hewan multiseluler paling sederhana dengan tubuh berpori yang dikenal sebagai spons (Marzuki, 2018). Spons laut sepenuhnya hidup di perairan dan bersifat *sessile*, sehingga melekat pada substrat tanpa alat gerak aktif (Setiawan dan Hendri, 2022). Sebagai hewan berpori, spons berperan sebagai *filter feeder* yang mampu menyerap, menyaring, serta mengalirkan nutrisi melalui sistem pori dan saluran air pada tubuhnya guna memperoleh makanan (Rozanah dkk., 2023). Secara klasifikasi, spons terbagi menjadi tiga kelas utama, yaitu *Hexactinellida*, *Demospongiae*, dan *Calcarea* (Setiawan dan Hendri, 2022).

#### 1. *Hexactinellida* (spons kaca)

*Hexactinellida* terdiri dari 6 bangsa dan 20 suku (Rozanah dkk., 2023).

*Hexactinellida* adalah spons dengan rangka dari spikula silika (Chairunnisa dkk., 2025).

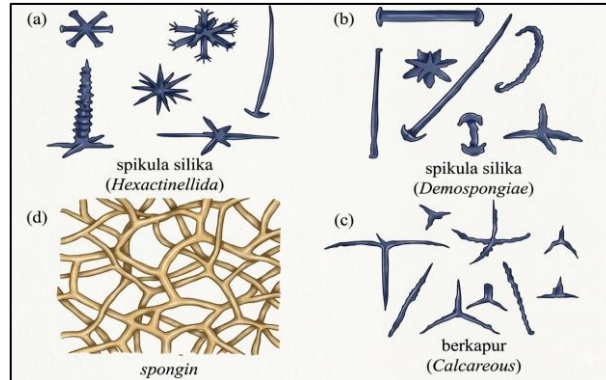
#### 2. *Demospongiae*

*Demospongiae* terdiri dari 15 bangsa dan 92 suku. Kelas *Demospongiae* merupakan kelas spons terbesar yang mencakup 90 % dari seluruh jenis spons dan sangat beragam (Rozanah dkk., 2023). *Demospongiae* adalah kelompok terbesar, dengan rangka dari spongin, spikula silika, atau kombinasi keduanya (Chairunnisa dkk., 2025).

#### 3. *Calcarea* (spons berkapur)

*Calcarea* terdiri dari 5 bangsa dan 24 suku (Rozanah dkk., 2023). *Calcarea* adalah spons dengan rangka dari spikula kalsium karbonat (Chairunnisa dkk., 2025).

Keberadaan dan komposisi spikula serta spongin merupakan ciri pembeda kelas antar spons (Rozanah dkk., 2023). Bentuk perbedaan spikula sebagai pembeda spons dapat dilihat pada Gambar 1.



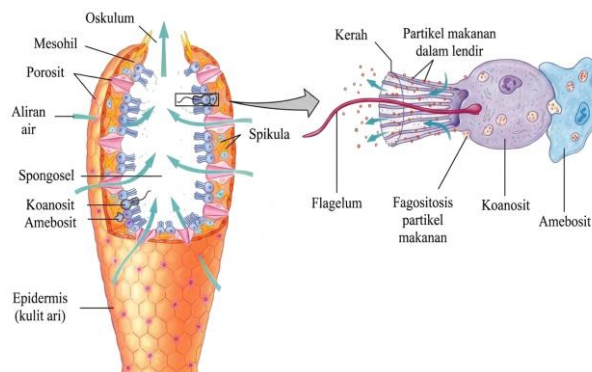
**Gambar 1.** Bentuk spikula serta spongin yang menjadi ciri pembeda spons (a) *Hexactinellida* (b) *Demospongiae* (c) *Calcareous* (d) Spons (Rozanah dkk., 2023).

Ciri khas spons adalah adanya spikula berbahan silika oksida yang menopang kerangka serta sistem saluran air kompleks yang berfungsi sebagai mekanisme *filter feeder*. Spons memiliki sel arkeosit totipoten yang mampu berdiferensiasi layaknya sel punca, serta menghasilkan metabolit sekunder beragam seperti alkaloid, steroid, dan terpenoid dengan aktivitas biologis penting, termasuk sitotoksik, antimikroba, antiinflamasi, dan antikanker. Hingga tahun 2018, spons tercatat sebagai sumber utama senyawa bioaktif baru dibandingkan biota laut lain seperti tunikata, moluska, maupun mikroorganisme (Setiawan dan Hendri, 2022).

Spons laut memiliki ukuran bervariasi, mulai dari seukuran butiran beras hingga mencapai tinggi sekitar 2 meter, dan telah ada sejak sebelum *Cambrian Explosion* dengan bukti fosil berusia 640 juta tahun di Oman. Spons sempat dianggap tumbuhan karena sifatnya yang *sessile*, pada tahun 1765 keberadaan sistem aliran air dalam tubuhnya menegaskan spons sebagai hewan. Spons mampu beregenerasi dengan baik melalui fragmentasi, *gemmule*, maupun reproduksi seksual dengan sifat hermafrodit atau gonokorik. Selain itu, spons menjalin simbiosis mutualistik dengan mikroorganisme seperti *cyanobacteria*, bakteri heterotrofik, dan alga uniseluler yang mendukung kelangsungan hidup sekaligus produksi metabolit

sekunder bioaktif. Mekanisme *filter feeder* yang dapat menyaring lebih dari 70 % bakteri di lingkungannya, spons berperan penting dalam ekosistem terumbu karang serta berfungsi sebagai reservoir alami penghasil senyawa bioaktif bernilai farmasi tinggi (Marzuki, 2018).

Secara umum, tubuh spons tersusun atas oskulum, spongocoel, mesohil, koanosit, amoebosit, dan spikula (Gambar 2), yang membentuk sistem saluran air sehingga berfungsi sebagai *filter feeder*, dengan pencernaan berlangsung melalui fagositosis oleh koanosit. Bentuk spons sangat bervariasi, mulai dari tabung, masif, bercabang, hingga menyerupai cawan atau kubah dengan ukuran dari milimeter hingga hampir satu meter, yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan fisik, kimia, maupun biologis (Marzuki, 2018).



**Gambar 2.** Struktur spons secara umum (Marzuki, 2018).

Mikroanatomi spons ditandai dengan keberadaan sel-sel khusus, seperti arkeosit yang totipoten dan fagositik, koanosit yang mengatur aliran air serta menangkap makanan, serta sklerosit, spongosit, dan kolensit yang membentuk struktur tubuh, dengan mesohil sebagai matriks penyokong berbagai sel amoeboid. Spons juga menjalin simbiosis dengan bakteri dan fungi yang berperan dalam produksi metabolit sekunder bioaktif, biodegradasi, dan bioabsorpsi logam berat. Interaksi ini meningkatkan kemampuan adaptasi spons terhadap lingkungan dinamis sekaligus memperkuat potensinya sebagai sumber senyawa bioaktif bernilai farmasi tinggi (Marzuki, 2018).

Morfologi spons juga mencerminkan perbedaan kondisi hidrodinamika di mana spons hidup, dengan bentuk encrusting biasanya mendominasi pada lokasi yang terekspos dengan perairan terbuka, sementara bentuk tegak biasa di lokasi yang tertutup (Sayor dkk., 2022).

## 2.2. Senyawa Metabolit Sekunder

Spons laut merupakan biota *sessile* yang tidak memiliki alat gerak maupun sistem pertahanan mekanik, sehingga untuk melindungi diri dari tekanan lingkungan dan serangan predator, organisme ini menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan hasil biosintesis turunan dari metabolit primer yang berperan bukan untuk pertumbuhan atau perkembangan, melainkan sebagai senyawa pertahanan dan adaptasi. Hingga saat ini, telah diketahui lebih dari 200.000 jenis metabolit sekunder dengan keragaman struktur, jalur biosintesis, dan asal-usul biologisnya (Hersila dkk., 2023).

Spons menjadi biota laut penghasil metabolit sekunder terbanyak, bahkan dibandingkan invertebrata laut lainnya. Berbagai kelompok senyawa telah berhasil diisolasi dari spons, antara lain alkaloid, terpenoid, asetogenin, senyawa nitrogen, peptida siklik, serta halida siklik. Senyawa-senyawa tersebut terbukti memiliki aktivitas biologis penting, seperti antimikroba, antivirus, antikanker, dan antiinflamasi, sehingga potensial dikembangkan sebagai bahan baku obat-obatan modern. Produksi metabolit sekunder pada spons juga berkaitan erat dengan tekanan ekologis yang dihadapi, misalnya banyaknya predator dan kondisi lingkungan terumbu karang yang menuntut mekanisme adaptasi. Struktur tubuh spons yang dilengkapi sistem saluran air memungkinkan penyaringan partikel makanan, oksigen, serta pengeluaran sisa metabolisme, sekaligus memfasilitasi interaksi dengan lingkungan. Adaptasi fisiologis inilah yang diduga memengaruhi tingginya keragaman senyawa bioaktif pada spons, menjadikannya reservoir alami metabolit sekunder dengan nilai farmasi yang signifikan, khususnya dalam pengembangan obat untuk penyakit kronis dan degeneratif (Marzuki, 2018). Spons laut merupakan salah satu biota penghasil metabolit sekunder dengan

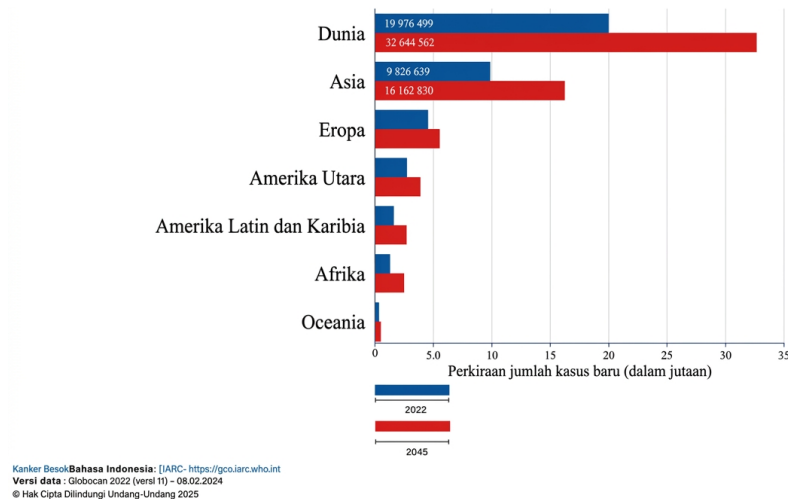
struktur kimia beragam dan aktivitas biologis yang penting. Senyawa yang paling banyak ditemukan adalah terpenoid dan steroid, yang termasuk kelompok lipid dengan variasi struktur luas. Kelompok lainnya adalah alkaloid, yaitu senyawa organik yang mengandung nitrogen, umumnya berbentuk cincin kompleks, dan dikenal memiliki aktivitas biologis tinggi sehingga potensial sebagai kandidat obat. Selain itu, poliketida juga menjadi metabolit sekunder menarik yang dihasilkan spons maupun mikroorganisme simbiotiknya. Senyawa poliketida ini bahkan telah banyak dilaporkan sebagai sumber bioaktif baru dengan nilai farmasi tinggi. Keragaman metabolit sekunder tersebut menegaskan peran spons sebagai sumber utama senyawa bioaktif laut dengan prospek besar dalam pengembangan obat-obatan modern (Setiawan dan Hendri, 2022).

Beberapa senyawa bioaktif telah berhasil diisolasi dari spons *Xestospongia testudinaria* yang dikoleksi di perairan Son Cha, Lang Co, Vietnam, dan menunjukkan potensi sebagai agen antikanker. Senyawa-senyawa tersebut (Gambar 3) meliputi: *Langcosterol A* (**1**), *Xestosterol* (**2**), serta *24-hydroperoxy-24-vinyl cholesterol* (**3**), yang ketiganya menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker A549, MCF-7, dan HeLa dengan nilai  $IC_{50}$  berkisar antara 20,0–68,0  $\mu$ M (Nguyen *et al.*, 2018). Dua senyawa alkaloid (Gambar 4), Manzamin A (**4**) dan 8-OH Manzamin A (**5**), berhasil diisolasi dari spons *Petrosia* sp. asal Teluk Bunaken, Manado, melalui fraksi kloroform dan terbukti menghambat proliferasi sel kanker manusia secara *in vitro*. Identifikasi struktur dilakukan dengan spektroskopi UV, IR, MS, NMR, serta kromatografi KLT dibandingkan data literatur (Alam *et al.*, 2005). Aaptamine (**6**) (Gambar 5) adalah senyawa alkaloid dari spons *Aaptos* sp. asal Taman Nasional Bunaken, Sulawesi Utara, yang menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolorektal DLD-1 ( $IC_{50}$  30,3  $\mu$ g/mL) dan Caco-2 ( $IC_{50}$  236,8  $\mu$ g/mL) (Fajarwati *et al.*, 2024). (+)-*curcuphenol* (**7**) dan *dihydrocurcuphenol* (**8**) (Gambar 6) merupakan senyawa seskuiterpen dari spons laut *Myrmekioderma* sp. asal Bitung, Sulawesi Utara, yang menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel A549 ( $IC_{50}$  31,52 dan 37,60  $\mu$ g/mL) serta HeLa ( $IC_{50}$  30,83 dan 50,27  $\mu$ g/mL) (Ahmadi *et al.*, 2026).



### 2.3. Kanker

Kanker merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia. Berdasarkan data *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) (Gambar 7) tahun 2022, tercatat sekitar 20 juta kasus baru kanker dengan jumlah kematian mencapai 9,74 juta jiwa. Angka tersebut menunjukkan bahwa kanker masih menjadi ancaman serius terhadap kesehatan masyarakat global. Proyeksi beban kanker pada masa mendatang menunjukkan peningkatan yang signifikan. Pada tahun 2045, jumlah kasus baru diperkirakan akan mencapai 32,6 juta kasus, atau mengalami kenaikan sekitar 47 % dibandingkan tahun 2020. Sejalan dengan itu, jumlah kematian akibat kanker diprediksi meningkat hingga 16,9 juta jiwa.



**Gambar 7.** Diagram perkiraan jumlah kasus kanker baru dari tahun 2022 hingga 2045 di berbagai benua (GLOBOCAN 2025).

Kanker merupakan penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel-sel abnormal yang berkembang secara cepat dan tidak terkendali. Tidak seperti sel normal yang hanya membelah diri untuk menggantikan sel yang mati atau rusak, sel kanker terus membelah meskipun tidak dibutuhkan, sehingga menimbulkan penumpukan sel baru yang membentuk tumor ganas. Sel kanker memiliki kemampuan invasif, yaitu menyusup ke jaringan sekitarnya, serta bersifat metastasis dengan menyebar melalui jaringan ikat, aliran darah, maupun sistem limfatik hingga mencapai organ vital dan tulang belakang. Kondisi ini menyebabkan kerusakan pada jaringan

normal, menekan fungsi organ, dan mengganggu sistem fisiologis tubuh. Kanker dapat berkembang di hampir semua jaringan dan organ, mulai dari permukaan tubuh hingga bagian dalam. Pada kanker yang muncul di permukaan, gejala lebih mudah terdeteksi dan penanganan dapat dilakukan lebih cepat. Sebaliknya, jika berkembang di organ dalam, kanker sering kali sulit diketahui karena tidak menimbulkan gejala pada tahap awal, dan gejala baru muncul ketika telah mencapai stadium lanjut, sehingga pengobatan menjadi lebih sulit dan prognosis semakin buruk (Maharani, 2012). Kanker merupakan penyakit multifaktorial yang dipengaruhi oleh faktor genetik, lingkungan, dan gaya hidup. Faktor genetik dapat meningkatkan kerentanan seseorang terhadap kanker, sedangkan faktor lingkungan meliputi paparan zat karsinogen dan kondisi sekitar yang memicu perubahan seluler. Selain itu, pola hidup yang tidak sehat juga berkontribusi terhadap peningkatan risiko kanker. Interaksi ketiga faktor tersebut berperan penting dalam proses terjadinya kanker serta menjadi dasar dalam strategi pencegahan dan pengendalian penyakit ini (Digambiro dan Parwanto, 2024).

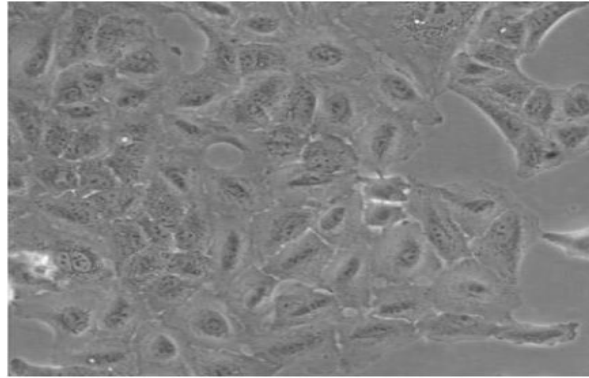
Pengobatan kanker meliputi pembedahan, kemoterapi, radioterapi, dan terapi hormonal yang terus berkembang seiring kemajuan teknologi, namun masing-masing memiliki keterbatasan. Pembedahan efektif untuk tumor lokal, tetapi keberhasilannya dipengaruhi ukuran, lokasi, metastasis, serta risiko *minimal residual disease* (MRD). Kemoterapi dan terapi hormonal sering terkendala resistensi akibat mutasi genetik, perubahan jalur pensinyalan, atau heterogenitas tumor, sehingga efektivitasnya berkurang. Radioterapi modern seperti *Intensity Modulated Radiation Therapy* (IMRT) dan *Stereotactic Body Radiation Therapy* (SBRT) meningkatkan presisi penyinaran, namun tetap menimbulkan risiko resistensi dan toksisitas jaringan sehat. Selain itu, seluruh terapi tersebut dapat menyebabkan efek samping serius, mulai dari neurotoksisitas, gangguan gastrointestinal, hematologis, hingga kardiovaskular, yang membatasi penggunaannya secara jangka panjang (Zafar *et al.*, 2025). Eksplorasi metabolit sekunder dari ekosistem laut menjadi langkah penting dalam upaya menemukan senyawa baru yang berpotensi dikembangkan sebagai kandidat terapi antikanker yang lebih efektif dan inovatif (El-Seedi *et al.*, 2025).

### 2.3.1. Sel Kanker Paru-Paru (A549)

Kanker paru-paru adalah penyakit ganas yang ditandai dengan pertumbuhan sel abnormal pada jaringan paru-paru yang berkembang cepat dan dapat menyebar ke organ lain. Penyakit ini umumnya ditandai dengan batuk kronis, sesak napas, nyeri dada, suara serak, dan penurunan berat badan tanpa sebab. Berdasarkan jenisnya, kanker paru-paru terbagi menjadi *non-small cell lung cancer* (NSCLC) yang lebih sering terjadi, meliputi adenokarsinoma, karsinoma sel skuamosa, dan karsinoma sel besar, serta *small cell lung cancer* (SCLC) yang lebih agresif dengan laju metastasis tinggi. Faktor risiko utamanya adalah kebiasaan merokok, baik aktif maupun pasif, disertai paparan polusi udara, zat karsinogenik seperti asbes dan radon, serta predisposisi genetik yang meningkatkan kerentanan terhadap penyakit ini (Maharani, 2012).

Sel A549 merupakan lini sel kanker paru-paru tipe adenokarsinoma yang pertama kali diisolasi dari jaringan paru-paru seorang pasien berusia 58 tahun pada tahun 1972 di Amerika Serikat. Lini sel ini berasal dari epitel alveolar tipe II sehingga mempertahankan fungsi khas seperti produksi surfaktan, menjadikannya model penting untuk mempelajari fisiologi paru, toksikologi, infeksi virus, serta mekanisme kanker paru. Dari sisi morfologi, A549 berbentuk poligonal atau kuboidal dengan sitoplasma luas dan nukleus besar, konsisten dengan ciri sel epitel alveolar. Sel ini memiliki kemampuan proliferasi yang tinggi dengan waktu penggandaan populasi sekitar 22–24 jam pada kondisi kultur optimal.

Karakter biologis A549 yang menonjol adalah ekspresinya terhadap molekul epitelial seperti E-cadherin, protein surfaktan, dan berbagai faktor pertumbuhan yang berperan dalam tumorigenesis. Penelitian modern, A549 digunakan secara luas sebagai model *in vitro* untuk mengevaluasi efek sitotoksik obat antikanker, mekanisme invasi dan metastasis, serta interaksi dengan sistem imun. Selain itu, sel ini juga banyak digunakan dalam studi infeksi virus pernapasan, termasuk SARS-CoV-2, karena sifatnya yang menyerupai jaringan epitel alveolar manusia (Canals *et al.*, 2022; Petiti *et al.*, 2024). Berikut merupakan morfologi dari sel kanker A549 (Gambar 8).



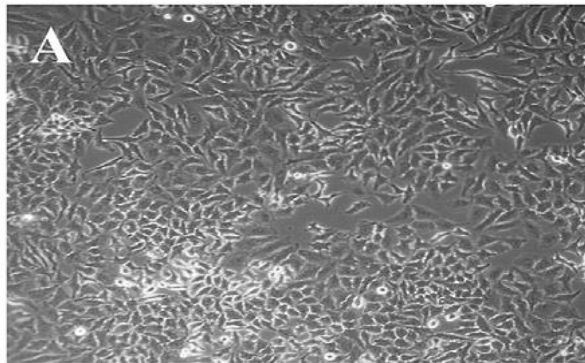
**Gambar 8.** Morfologi A549 yang dikultur dalam T-CM dengan mikroskop fase kontras (Canals *et al.*, 2022).

### 2.3.2. Sel Kanker Serviks (HeLa)

Kanker serviks adalah kanker yang menyerang leher rahim, bagian bawah uterus yang terhubung dengan vagina, dan umumnya berkembang perlahan dari perubahan prakanker pada jaringan serviks. Pada tahap awal sering tanpa gejala, namun pada stadium lanjut dapat muncul perdarahan abnormal, nyeri panggul, keputihan berlebih, dan nyeri saat berhubungan seksual. Jenis utama kanker serviks meliputi karsinoma sel skuamosa yang paling sering, adenokarsinoma, serta tipe campuran yang lebih jarang. Faktor risiko utamanya adalah infeksi *Human Papillomavirus* (HPV) berisiko tinggi, disertai faktor lain seperti perilaku seksual berisiko, merokok, imunitas rendah, dan riwayat reproduksi tertentu, sehingga pencegahan melalui deteksi dini dan vaksinasi HPV sangat penting (Maharani, 2012).

Sel HeLa merupakan lini sel manusia pertama yang berhasil dikultur secara kontinu dan hingga kini menjadi salah satu model penelitian biomedis yang paling luas digunakan. Lini sel ini berasal dari adenokarsinoma serviks seorang pasien bernama Henrietta Lacks pada tahun 1951 yang pertama kali dikembangkan oleh George Gey di Johns Hopkins Hospital. Karakteristik utama HeLa adalah sifatnya yang immortal, mampu bertahan hidup dan membelah tanpa batas dalam kondisi kultur *in vitro*, sehingga menjadikannya model penting dalam studi kanker, biologi sel, genetika, virologi, toksikologi, hingga pengembangan obat. Kontribusi

besar HeLa antara lain dalam pengembangan vaksin polio, penelitian mekanisme kanker dan virus onkogenik seperti HPV, serta pengujian keamanan berbagai agen bioaktif. Secara morfologi, sel HeLa termasuk tipe epitelial dengan bentuk yang bervariasi bergantung pada kondisi kultur, mulai dari pipih, poligonal, hingga menyerupai fibroblast, dengan ciri khas berupa sitoplasma luas dan nukleus besar. Pada fase pembelahan sel tampak bulat, sedangkan dalam medium bebas serum sel mengalami retraksi sitoplasma dengan morfologi lebih kecil dan waktu penggandaan populasi lebih lama ( $\pm 57,5$  jam) dibandingkan 31–48 jam pada medium yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS). Fleksibilitas morfologis ini menjadikan HeLa sebagai sistem model yang sangat berharga untuk mempelajari respons seluler terhadap perubahan kondisi lingkungan maupun paparan senyawa bioaktif (Malakpour-Permlid *et al.*, 2025; Souren *et al.*, 2022). Berikut merupakan morfologi dari sel kanker HeLa (Gambar 9).



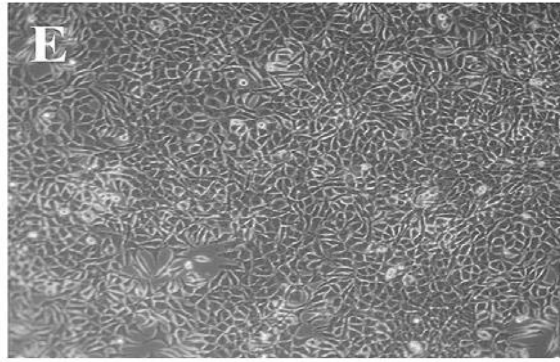
**Gambar 9.** Morfologi sel kanker serviks manusia HeLa dikultur dalam medium dengan 10 % FBS, diambil dengan mikroskop kontras fase terbalik dengan perbesaran  $\times 10$ . Skala batang adalah 50  $\mu\text{m}$  (Malakpour-Permlid *et al.*, 2025).

### 2.3.3. Sel Kanker Payudara (MCF-7)

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang paling sering dialami oleh wanita dan ditandai dengan pertumbuhan abnormal sel-sel pada jaringan payudara. Penyakit ini dapat menimbulkan gejala berupa munculnya benjolan di payudara, perubahan bentuk atau ukuran payudara, keluarnya cairan dari puting, perubahan pada kulit payudara, hingga rasa nyeri. Kanker payudara memiliki

beberapa tipe berdasarkan asal sel yang terlibat, antara lain karsinoma duktal yang bermula dari saluran susu, karsinoma lobular yang berasal dari kelenjar penghasil susu, serta tipe lainnya yang lebih jarang. Faktor risiko terjadinya kanker payudara dipengaruhi oleh kombinasi aspek genetik, hormonal, gaya hidup, serta lingkungan, seperti riwayat keluarga dengan kanker, mutasi gen BRCA1 dan BRCA2, usia, paparan estrogen berkepanjangan, obesitas, pola makan tidak sehat, konsumsi alkohol, serta paparan radiasi (Maharani, 2012).

Sel kanker MCF-7 merupakan salah satu lini sel kanker payudara manusia yang paling banyak digunakan dalam penelitian biomedis. Lini sel ini pertama kali diisolasi pada tahun 1970 dari cairan pleura pasien wanita penderita adenokarsinoma payudara metastatik berusia 69 tahun di Michigan Cancer Foundation, sehingga dinamakan *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7). Sel MCF-7 bersifat epitelial dan mempertahankan banyak karakteristik sel kanker payudara, termasuk ekspresi reseptor estrogen (ER+), yang menjadikannya model penting untuk mempelajari mekanisme kanker payudara yang bergantung pada hormon. Karakteristik ini membuat MCF-7 banyak digunakan dalam penelitian tentang terapi endokrin, resistensi obat, serta pengujian agen antikanker berbasis hormon. Secara morfologis, MCF-7 memiliki bentuk epitelial poligonal dengan sitoplasma yang relatif luas dan nukleus menonjol. Sel ini dapat tumbuh berkelompok membentuk koloni dengan adhesi kuat antar sel. Melalui kultur standar, MCF-7 memperlihatkan fenotipe yang konsisten, namun dapat mengalami variasi morfologi dan proliferasi tergantung pada komposisi medium dan stimulasi hormonal. Dari sisi biologis, MCF-7 menunjukkan proliferasi yang terkontrol oleh estrogen, sehingga sering digunakan untuk mempelajari jalur pensinyalan hormon, interaksi reseptor estrogen dengan ligan, serta respons terhadap terapi seperti tamoxifen (Aniogo *et al.*, 2022; Malakpour-Permlid *et al.*, 2025). Berikut merupakan morfologi dari sel kanker MCF-7 (Gambar 10).



**Gambar 10.** Morfologi sel kanker serviks manusia MCF-7 dikultur dalam medium dengan 10 % FBS, diambil dengan mikroskop kontras fase terbalik dengan perbesaran  $\times 10$ . Skala batang adalah 50  $\mu\text{m}$  (Malakpour-Permlid *et al.*, 2025).

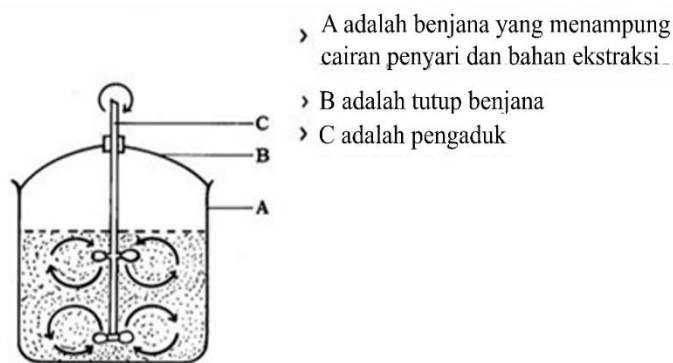
## 2.4. Ekstraksi Senyawa Bioaktif

Ekstraksi adalah pengambilan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang menjadi target untuk dipisahkan dari biomassa atau ampas atau bagian yang tidak diperlukan karena sifatnya yang mengganggu baik dalam penyajian maupun karena mengganggu efektivitas khasiat dari bahan aktifnya. Prinsip proses ekstraksi dimulai dengan proses pembukaan jaringan atau dinding sel dengan perlakuan panas, yang dilanjutkan dengan proses penarikan senyawa target menggunakan pelarut organik yang sesuai, berdasarkan prinsip kedekatan sifat kepolaran/polaritas dari senyawa dan pelarut (Nugroho, 2017). Metode ekstraksi yang umum digunakan untuk mengekstrak spons adalah metode maserasi.

### 2.4.1. Maserasi

Maserasi adalah metode tradisional untuk mengekstraksi metabolit sekunder menggunakan pelarut. Prosesnya melibatkan perendaman bahan dalam pelarut, biasanya pelarut organik seperti etanol atau metanol, dalam jangka waktu lama, biasanya beberapa hari hingga minggu. Pelarut mengekstrak metabolit sekunder yang diinginkan, yang sering kali berupa pigmen, rasa, dan wewangian, dari bahan. Ekstrak yang diperoleh melalui maserasi kemudian disaring dan

dipekatkan hingga diperoleh senyawa murni atau ekstrak pekat. Metode ini biasa digunakan dalam industri makanan, kosmetik, dan farmasi untuk produksi produk alami. Melalui proses ini, bahan padat (*maserand*) direndam dalam pelarut (seperti alkohol, air, atau minyak) dalam jangka waktu lama (biasanya beberapa jam atau hari) agar senyawa yang diinginkan dapat larut. Pelarut kemudian dipisahkan dari *maserand* dengan penyaringan atau sentrifugasi (Nurani dkk., 2014). Contoh proses maserasi dapat dilihat pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Proses maserasi (Nurani dkk., 2014).

Metode maserasi memiliki beberapa keuntungan, antara lain efisiensi ekstraksi yang lebih baik karena waktu perendaman yang lama memungkinkan senyawa terekstraksi lebih maksimal. Proses ini juga berlangsung pada suhu rendah sehingga cocok untuk mengawetkan senyawa peka panas. Selain itu, penggunaan pelarut yang lebih sedikit dan dapat didaur ulang menjadikan metode ini lebih ramah lingkungan. Maserasi juga meningkatkan rasa dan aroma produk karena ekstraksi senyawa berlangsung lebih sempurna, serta mengurangi risiko kontaminasi karena minimnya manipulasi bahan (Nurani., 2014).

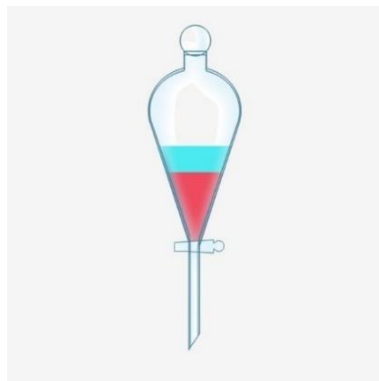
Kelemahan metode maserasi adalah kurang efisien dari segi waktu dan rendemen. Satu kali ekstraksi memerlukan waktu sekitar 1 hari sampai dengan satu minggu, tergantung pada jenis bahan yang diekstrak, semakin kuat jaringan dan dinding sel pada bahan maka membutuhkan waktu yang lebih panjang. Selain itu, maserasi juga membutuhkan pelarut dengan volume yang lebih banyak, dan peluang hilangnya senyawa metabolit selama proses juga lebih banyak, karena menempel pada bahan, menempel pada kertas saring, menempel pada bejana.

Ada kemungkinan terjadinya perubahan struktur kimia dari metabolit yang tidak stabil karena lamanya proses dan kontak dengan air atau pelarut (Nugroho, 2017).

## 2.5. Fraksinasi

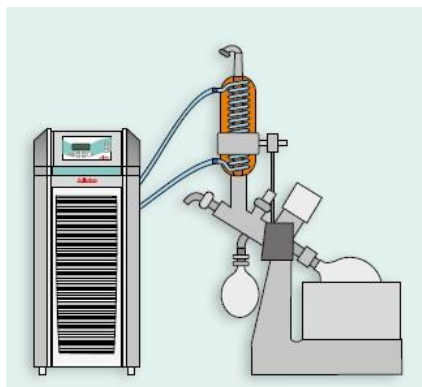
Fraksinasi berasal dari kata *fraction* atau bagian, secara harfiah dapat diartikan sebagai mekanisme untuk memilah-milah atau memisah-misahkan suatu kumpulan/kesatuan menjadi beberapa bagian (*fraction/part*) atau lebih mudahnya dapat dikatakan sebagai proses pembagian kelompok. Fraksinasi memiliki berbagai tujuan. Fraksinasi dapat ditujukan untuk mendapatkan fraksi (bagian) tertentu dari suatu ekstrak, di mana bagian itulah yang merupakan fraksi aktif, dan perlu dipisahkan dari fraksi lainnya yang kurang aktif. Tujuan lainnya adalah dalam rangka mendapatkan ekstrak yang lebih murni, sehingga perlu dihilangkan senyawa-senyawa lain yang mengotori atau mengganggu. Fraksinasi juga diperlukan ketika akan melakukan isolasi atau pemisahan satu senyawa metabolit sekunder tunggal (Nugroho, 2017).

Fraksinasi dapat dilakukan dengan beberapa teknik, salah satu metode yang umum digunakan adalah ekstraksi cair-cair (*liquid-liquid extraction*) dengan bantuan labu pemisah (*separating funnel*). Melalui metode ini, ekstrak yang telah dilarutkan dalam suatu pelarut dicampur dengan pelarut lain yang tidak dapat bercampur (*immiscible*) dan memiliki polaritas berbeda. Setelah kedua pelarut dicampur dan dikocok, campuran didiamkan hingga terbentuk dua lapisan (fase) yang terpisah: pelarut dengan massa jenis lebih rendah berada di atas, sedangkan yang lebih tinggi berada di bawah. Senyawa-senyawa dalam ekstrak akan terdistribusi di antara kedua fase tersebut berdasarkan kesesuaian polaritasnya dengan masing-masing pelarut. Senyawa yang lebih polar cenderung larut di pelarut polar, sedangkan senyawa non-polar larut di pelarut non-polar. Proses ini menghasilkan dua fraksi yang masing-masing mengandung kelompok senyawa berbeda. Penggunaan labu pemisah memungkinkan pemisahan kedua fraksi tersebut secara fisik dengan lebih efisien (Nugroho, 2017). Contoh proses fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 12.



**Gambar 12.** Proses fraksinasi pada sebuah labu pemisah dan terbentuknya dua fase yang terpisah (Nugroho, 2017).

Setelah pemisahan, masing-masing fraksi biasanya mengalami proses pengentalan atau pengeringan. Tahapan ini dilakukan dengan evaporasi menggunakan alat seperti *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan pelarut dari fraksi, menghasilkan bentuk pasta atau cairan kental. Untuk memperoleh fraksi dalam bentuk padatan, proses dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan *freeze dryer* (pengering beku). Hasil akhirnya adalah fraksi ekstrak dalam bentuk padat yang siap untuk analisis atau pemanfaatan lebih lanjut (Nugroho, 2017). Contoh proses evaporasi dapat dilihat pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Proses evaporasi dengan *rotary vacuum evaporator* (Nugroho, 2017).

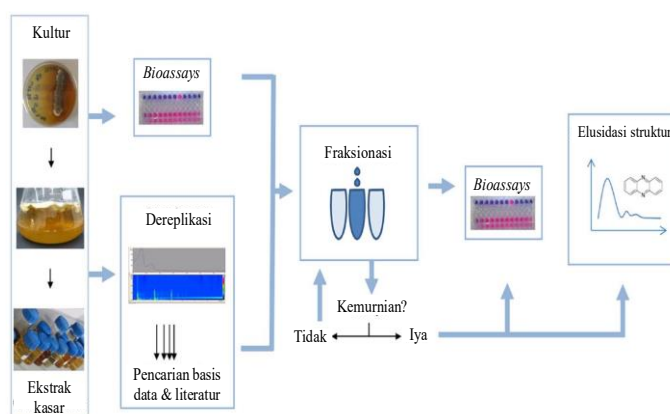
## 2.6. *Bioassay-guided Isolation*

*Bioassay* merupakan metode untuk mengukur konsentrasi atau potensi suatu zat berdasarkan pengaruhnya terhadap sel atau jaringan hidup dengan membandingkan respons antara sampel uji dan standar pada sistem biologis yang sesuai. Pengujian ini dapat dilakukan terhadap ekstrak, fraksi, atau isolat yang memiliki target aktivitas farmakologis tertentu. Prinsip utamanya adalah penggunaan hasil aktivitas biologis sebagai dasar pengelompokan fraksi menuju tahap isolasi, yang dikenal dengan konsep *bioassay-guided isolation*. Konsep ini berfokus pada penentuan dan seleksi senyawa dengan aktivitas biologis paling dominan guna memperoleh senyawa paling aktif secara efisien, sehingga dapat mempercepat proses uji, mengurangi jumlah sampel, dan menekan biaya penelitian (Rollando dkk., 2022).

*Bioassay-guided isolation* dibedakan menjadi lima jenis, yaitu uji respons bertingkat, uji kuantitas dan kualitas, metode titik pencocokan, uji interpolasi, dan *bioassay* multipoin, yang masing-masing digunakan untuk memperkirakan potensi, menilai kekuatan aktivitas, mencocokkan dosis, membandingkan hasil uji, serta meningkatkan akurasi melalui pengulangan. Berdasarkan jumlah dan kapasitas sampel, terdapat dua jenis *bioassay*, yaitu primer dan sekunder. *Bioassay* primer digunakan untuk skrining awal fraksinasi dan isolasi produk alami dengan jumlah sampel besar, sedangkan *bioassay* sekunder digunakan pada tahap pra-klinis dan klinis dengan kapasitas lebih kecil dan biaya lebih tinggi. Penelitian ini menggunakan pendekatan *bioassay* primer karena menghasilkan data yang lebih lengkap, komprehensif, dan valid (Rollando dkk., 2022).

*Bioassay-guided isolation* merupakan metode isolasi senyawa bioaktif dari ekstrak alami dengan menggunakan uji bioaktivitas sebagai penuntun utama pada setiap tahap pemisahan. Metode ini menggabungkan pengujian biologis (*bioassay*) dan fraksinasi kimia, di mana hasil uji bioaktivitas menentukan arah isolasi senyawa aktif. Prosesnya dimulai dari ekstraksi bahan alami yang memiliki potensi biologis, seperti antibakteri, antikanker, antivirus, atau antiparasit, kemudian dilakukan pengujian *in vitro* untuk menilai kemampuannya

menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Hasil pengujian digunakan sebagai dasar fraksinasi dengan teknik kromatografi hingga diperoleh fraksi paling aktif. Fraksi tersebut kemudian dimurnikan dan diidentifikasi menggunakan spektroskopi, untuk mengetahui struktur dan konfigurasi molekulnya. Prinsip utama metode ini ialah setiap tahap pemisahan dikendalikan oleh hasil uji bioaktivitas, sehingga pengujian biologis menjadi pemandu dan teknik kimia digunakan untuk pemisahan serta karakterisasi senyawa (Tan and Salleh, 2024). Proses *bioassay-guided isolation* dapat dilihat pada Gambar 14.



**Gambar 14.** *Bioassay-guided isolation* dan elusidasi struktural produk alami (Reich and Labes, 2017).

## 2.7. Kromatografi

Kromatografi merupakan alat untuk memisahkan campuran senyawa-senyawa kimia, sehingga perlu diketahui teori dan mekanisme proses pemisahan yang berbeda-beda. Pemisahan terjadi pada kromatografi memakai dua fase yang tidak bercampur yang selalu berada dalam sistem campuran, yang dikenal sebagai fase gerak dan fase diam. Fase diam biasanya berupa padatan atau cairan yang didukung oleh padatan. Sederhananya, pemisahan kromatografi memiliki dasar yang sama dengan sifat magnetik besi fase diam adalah magnet dan fase gerak adalah besi. Proses pemisahan dirancang seefektif mungkin sehingga efisiensinya mendekati 100 %. Teknik pemisahan ini berguna untuk memisahkan sampel dengan rentang densitas yang sangat dekat (Salamah dan Guntarti, 2023).

Kromatografi, terdiri dari dua suku kata *chromos* (pewarna) dan *graphos* (gambar) pewarna pertama kali ditemukan oleh seorang ahli botani Rusia dalam proses pemisahan zat kimia dari tanaman. Secara garis besar kromatografi yaitu alat pemisah yang berbeda dengan cara pemisahan yang berdasar sifat kimia dan sifat fisika atau pemisahan cair cair. Pemisahan yang terjadi kromatografi juga menggunakan dua fase yang tidak tercampur tetapi selalu dalam satu sistem yang bercampur, yang dinamakan fase gerak dan fase diam yang umumnya berupa zat padat atau zat cair yang didukung oleh zat padat (Salamah dan Guntarti, 2023).

Secara garis besar, kromatografi dirancang sesuai dengan sifat fase zat yaitu padat, cair dan gas. Cairan dan gas merupakan fase cair yang selalu bergerak atau mengalir sehingga perlakuan utama dalam teknik kromatografi ini adalah gerakan, sedangkan padatan sangat padat dengan molekul dan keras dan tetap sehingga dianggap statis. Keadaan sangat khusus memungkinkan kromatografi cair untuk menganggap fase stasioner tetap diam, sedangkan gas berperan sebagai zat yang bergerak. Tergantung dari sifat fase zatnya, kromatografi dirancang terdiri dari tiga bagian, yaitu kromatografi gas-cair (GLC), cair-cair, dan cair-padat (Salamah dan Guntarti, 2023).

1. Gas cair: sampel dapat berupa gas ataupun cair.
2. Cair cair dan cair padat: sampel dapat berupa cair.

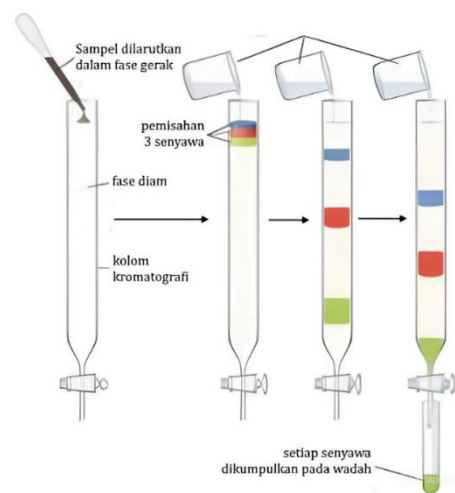
Klasifikasi kromatografi berdasarkan caranya, kolom dan planar. Pemisahaan kolom, menggunakan alat yaitu kaca, kemudian diinjeksikan dengan fase diam sehingga pada prinsipnya sama dengan kolom yang dilalui fase gerak (Salamah dan Guntarti, 2023).

### **2.7.1. Kromatografi Kolom**

Pada dasarnya kromatogafi kolom sama dengan kromatografi planar. Hanya fase diamnya dimasukkan ke tempat yang berbentuk kolom. Diameter kolom 1 –2 cm, dengan panjang kolom bervariasi. Bila kita mempelajari sifat kimia-fisika, tentang kelarutan suatu senyawa kimia dalam pelarut air maupun pelarut organik, senyawa tersebut terlihat mempunyai perbedaan kelarutan. Teknik aplikasi

kromatografi kolom sederhana biasanya digunakan untuk analisis preparatif, dan pemisahan awal sebelum menggunakan teknik kromatografi lainnya. Ada 3 metode untuk mengisi fase diam pada kolom sederhana, yaitu: metode kering, pada metode kering, kolom diisi dengan fase diam kering, diikuti dengan penambahan fase gerak yang disiramkan pada kolom sampai benar-benar basah. Metode basah, pada metode basah, bubuk (*slurry*) disiapkan dengan mencampurkan eluen pada serbuk fase diam dan dimasukkan secara hati-hati pada kolom. Langkah ini memerlukan kehati-hatian maksimal agar gelembung udara tidak terbentuk. Larutan senyawa organik dipipet di bagian atas fase diam, kemudian eluen dituangkan pelan-pelan melewati kolom. Metode campuran, yaitu fase diam dan fase gerak dicampurkan diluar kemudian baru dimasukkan ke dalam kolom (Salamah dan Guntarti, 2023).

Kromatografi kolom merupakan teknik pemisahan yang menggunakan fasa diam berupa padatan, seperti silika gel, alumina, karbon aktif, dan bahan adsorben lainnya, serta fasa gerak berupa cairan, misalnya aseton, etanol, dan pelarut organik lain. Prinsip kerja kromatografi kolom didasarkan pada kemampuan fasa gerak untuk membawa campuran senyawa melewati fasa diam di dalam kolom, sehingga terjadi interaksi berupa adsorpsi antara senyawa-senyawa dalam cuplikan dengan permukaan padatan. Perbedaan kekuatan interaksi tersebut menyebabkan setiap komponen tertahan dalam waktu yang berbeda pada fasa diam, sehingga kecepatan migrasi masing-masing komponen bervariasi dan pemisahan dapat terjadi (Nur Rafida Akub *et al.*, 2025). Proses kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 15.



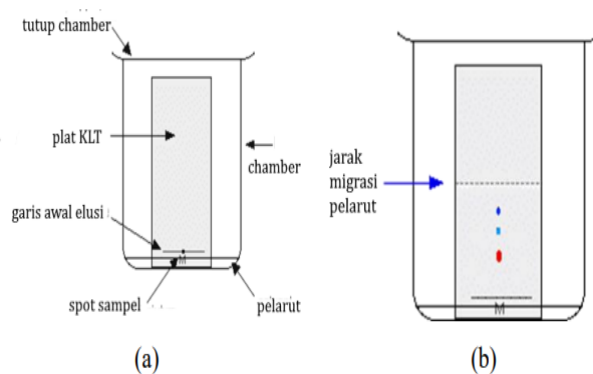
**Gambar 15.** Pemisahan sampel dengan kromatografi kolom (Salamah dan Guntarti, 2023).

### 2.7.2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah metode analisis di mana fase gerak (*mobile phase*) melewati fase diam (*stationary phase*) sedemikian rupa sehingga suatu campuran zat dapat dipisahkan menjadi komponen-komponennya. Istilah "kromatografi lapis tipis" *Thin Layer Chromatography* (TLC), yang diperkenalkan oleh E. Stahl pada tahun 1956, merujuk pada proses pemisahan kromatografi di mana fase diam terdiri dari lapisan tipis yang diaplikasikan pada substrat padat atau yang disebut juga sebagai "penyangga".

Syarat utama untuk dapat menggunakan metode ini adalah bahwa zat atau campuran zat yang akan dianalisis harus larut dalam pelarut tunggal atau campuran pelarut (Hahn-Deinstrop, 2007). Analisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengamati pemisahan komponen sampel berdasarkan perbedaan tingkat polaritas antara senyawa target dengan sistem pelarut yang digunakan. Metode ini memberikan informasi mengenai komposisi kimia sampel melalui interpretasi pola kromatogram yang dihasilkan. Penggunaan KLT dalam penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi keberadaan gugus-gugus senyawa yang telah terdeteksi positif pada analisis sebelumnya (Bayani *et al.*, 2023).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi antara dua fase, yaitu fase diam (plat) dan fase gerak (eluen) (Carolina *et al.*, 2022). Proses identifikasi menggunakan KLT bertujuan untuk mengamati pemisahan sampel berdasarkan perbedaan polaritas antara sampel dengan pelarut (eluen). Hal ini memberikan gambaran awal komposisi kimia berdasarkan pola kromatogram. KLT dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil positif yang diperoleh dari skrining fitokimia yang menunjukkan adanya gugus senyawa (Bayani *et al.*, 2023). Proses eludasi saat KLT dapat dilihat pada Gambar 16.

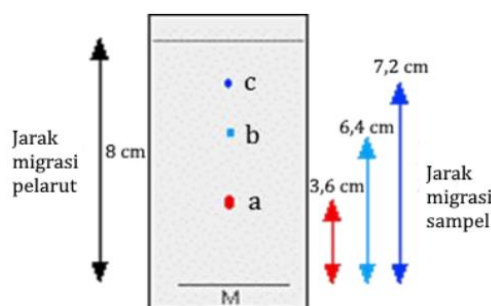


**Gambar 16.** Proses elusi menggunakan KLT (a) awal elusi dan (b) hasil elusi (Salamah dan Guntarti, 2023).

Komponen-komponen senyawa yang dianalisis dapat dipisahkan dan dibedakan berdasar harga *Retention Factor*/Faktor retensi ( $R_f$ ).  $R_f$  didefinisikan sebagai perbandingan jarak migrasi suatu senyawa dengan jarak migrasi suatu pelarut (eluen) pada suatu waktu yang sama. Nilai  $R_f$  ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, komposisi pelarut, dan sebagainya. Pengamatan KLT kadang kala memerlukan suatu pereaksi yang disemprotkan pada plat KLT agar spot dapat teramati secara visual (Salamah dan Guntarti, 2023). Nilai  $R_f$  dapat digunakan sebagai indikator tingkat polaritas, di mana senyawa dengan nilai  $R_f$  rendah bersifat lebih polar dibandingkan senyawa dengan nilai  $R_f$  tinggi (Bayani *et al.*, 2023). Pada uji KLT, senyawa-senyawa yang bersifat non-polar akan bermigrasi lebih jauh dan menghasilkan nilai faktor retensi ( $R_f$ ) yang lebih tinggi. Hasil analisis KLT menunjukkan terbentuknya bercak-bercak dengan intensitas warna dan nilai  $R_f$  yang bervariasi pada setiap fraksi. Pada uji KLT diperoleh

hasil berupa bercak warna pada plat dengan intensitas warna dan nilai Rf yang berbeda-beda. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh kandungan kimia dalam ekstrak yang kemungkinan memiliki konsentrasi yang lebih kecil sehingga tidak dapat terdeteksi. Sementara itu, nilai Rf yang diperoleh digunakan sebagai parameter untuk menentukan tingkat kepolaran relatif senyawa-senyawa yang terkandung dalam fraksi. Rumus perhitungan nilai Rf sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$



**Gambar 17.** Penetapan nilai Rf: (a) senyawa 1; (b) senyawa 2; dan (c) senyawa 3 (Salamah dan Guntarti, 2023).

Pada uji KLT, terdapat beberapa perlakuan dan reagen yang digunakan untuk mengidentifikasi lebih spesifik. Pengamatan pada panjang gelombang UV<sub>254</sub> nm menunjukkan bahwa plat KLT mengalami fluoresensi, sementara bercak sampel terlihat gelap (Narsa *et al.*, 2022). Fenomena pemadaman (quenching) bercak di bawah sinar UV<sub>254</sub> nm mengindikasikan adanya penyerapan cahaya ultraviolet oleh komponen dalam sampel, yang menunjukkan keberadaan senyawa dengan sistem ikatan rangkap terkonjugasi. Pola distribusi komponen yang teramati bervariasi pada setiap fraksi. Kemampuan menyerap sinar UV ini disebabkan oleh keberadaan gugus kromofor dalam struktur molekul, berupa ikatan rangkap dua atau ikatan rangkap tiga yang terkonjugasi. Khususnya, senyawa aromatik dengan struktur cincin benzen diketahui memiliki absorpsi maksimal pada panjang gelombang 254 nm (Setiawan *et al.*, 2025). Hasil berbeda diperoleh pada pengamatan menggunakan UV<sub>366</sub> nm, di mana bercak sampel menunjukkan fluoresensi sedangkan latar plat tampak gelap (Narsa *et al.*, 2022). Munculnya

cahaya berpendar pada kondisi ini mengindikasikan perbedaan karakteristik kimia antar fraksi. Fluoresensi terjadi akibat interaksi antara radiasi UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom, meliputi hidroksil ( $-\text{OH}$ ), karbonil ( $=\text{O}$ ), amino ( $-\text{NH}_2$ ), dan metoksi ( $-\text{OCH}_3$ ). Keberadaan gugus auksokrom menyebabkan pergeseran batokromik (pergeseran pita absorpsi menuju panjang gelombang lebih besar) disertai peningkatan intensitas (Setiawan *et al.*, 2025). Secara mekanisme, fluoresensi yang teramati merupakan emisi cahaya yang terjadi saat elektron tereksitasi kembali ke tingkat energi dasar setelah sebelumnya terangkat ke tingkat energi lebih tinggi, dengan melepaskan energi berupa radiasi cahaya tampak.

Pereaksi serium (IV) sulfat berfungsi sebagai reagen universal untuk mendeteksi berbagai senyawa organik dengan tingkat polaritas yang beragam, ditandai dengan terbentuknya bercak berwarna coklat kehitaman (Bahri *et al.*, 2024). Munculnya warna merah jingga atau coklat setelah pemanasan merupakan hasil dari pembentukan ikatan kovalen koordinasi akibat oksidasi gugus fungsi organik (dari gugus keton menjadi karboksilat), sementara ion serium (IV) dalam  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  mengalami reduksi dari  $\text{Ce}^{4+}$  menjadi  $\text{Ce}^{3+}$  (Ferdinan *et al.*, 2021). Identifikasi senyawa alkaloid, digunakan pereaksi Dragendorff yang spesifik terhadap kelompok nitrogen tersier. Keberadaan alkaloid ditunjukkan oleh munculnya bercak berwarna oranye hingga coklat dengan latar belakang kuning pada pengamatan sinar tampak (Bahri *et al.*, 2024). Mekanisme reaksi melibatkan pembentukan ikatan kovalen koordinat antara pasangan elektron bebas pada atom nitrogen alkaloid dengan ion  $\text{K}^+$  dari pereaksi, menghasilkan kompleks berwarna oranye hingga coklat (Ferdinan *et al.*, 2021).

Pereaksi ninhidrin digunakan untuk mendeteksi golongan peptida, yaitu molekul yang terbentuk dari beberapa asam amino yang terikat melalui ikatan peptida. Ninhidrin menghasilkan warna merah keunguan ketika bereaksi dengan asam amino, amina primer, dan amina sekunder. Namun, reaksi dengan prolin dan hidroksiprolin memberikan warna kuning, berbeda dengan asam amino primer yang menghasilkan warna ungu (Syarifuddin dan Sulistyani, 2019). Mekanisme reaksi ninhidrin melibatkan serangan nukleofilik dari gugus amino nonprotonasi

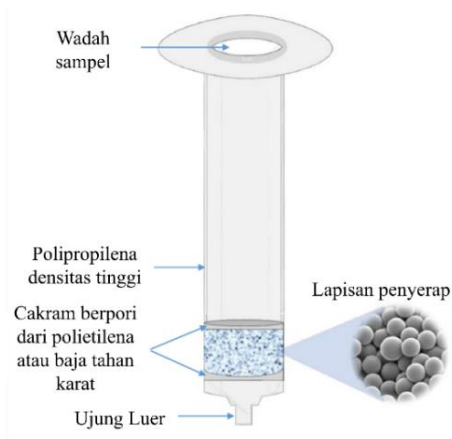
terhadap gugus hidroksil ninhidrin hidrat. Pembentukan kompleks ungu Ruhemann memerlukan dua molekul ninhidrin untuk setiap molekul asam amino. Proses pemanasan bertujuan untuk mendenaturasi protein sehingga rantai polipeptida terpecah menjadi unit-unit penyusun yang lebih kecil, mempercepat laju reaksi dengan pereaksi ninhidrin (Rahayu *et al.*, 2020).

## **2.8. Solid Phase Extraction (SPE)**

*Solid Phase Extraction* (SPE) merupakan teknik preparasi sampel yang digunakan untuk memisahkan, memurnikan, dan memekatkan analit dari matriks kompleks dengan memanfaatkan fase padat sebagai penyerap. Metode ini diperkenalkan sejak 1940-an melalui penggunaan arang sebagai adsorben, kemudian berkembang pesat pada 1970-an dengan komersialisasi kartrid berbasis silika pada tahun 1977 dan disk SPE pada tahun 1989. Prinsip dasar SPE adalah distribusi analit antara fase cair dan fase padat, di mana senyawa target akan ditahan oleh sorben padat melalui mekanisme interaksi kimia tertentu, seperti *reversed-phase*, *normal-phase*, atau pertukaran ion, kemudian dilepaskan kembali melalui proses elusi menggunakan pelarut yang sesuai (Mahdavijalal *et al.*, 2024).

Prosedur kerja SPE terdiri dari empat tahap, yaitu pengkondisian sorben, pemuatan sampel, pencucian, dan elusi. Volume sampel yang dapat digunakan bervariasi antara 500  $\mu\text{L}$  hingga 50 mL, tergantung pada kapasitas sorben. Sorben mampu menahan analit hingga sekitar 5 % dari massanya tanpa menimbulkan *breakthrough*. Konfigurasi umum yang digunakan adalah kartrid SPE berisi 500 mg sorben dalam tabung suntik 3–5 mL untuk pemurnian sampel lingkungan dalam volume besar, sedangkan kartrid kecil 100 mg dalam tabung 1 mL digunakan untuk sampel biologis karena lebih sensitif dan membutuhkan volume elusi lebih sedikit. Aliran sampel dilakukan dengan tekanan positif menggunakan piston atau tekanan negatif dengan *vacuum manifold*, dan saat ini telah tersedia sistem otomatis berbasis robotik untuk pemrosesan banyak sampel sekaligus. Dibandingkan metode konvensional, SPE memiliki kelebihan berupa efisiensi waktu, kebutuhan pelarut lebih sedikit, hasil ekstraksi yang lebih bersih dan

selektif, serta kompatibilitas tinggi dengan instrumen kromatografi cair maupun gas (Badawy *et al.*, 2022). Proses *solid phase extraction* dapat dilihat pada Gambar 18.



**Gambar 18.** Skema kartrid SPE (Badawy *et al.*, 2022).

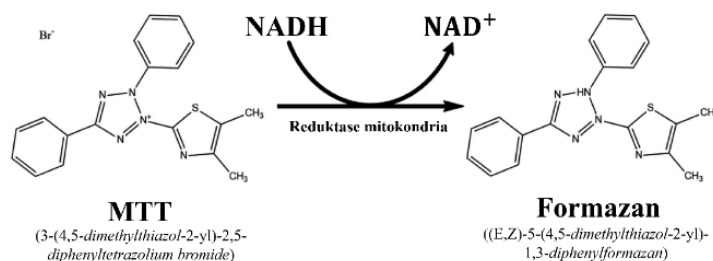
## 2.9. Uji Sitotoksisitas (MTT Assay)

MTT *assay* merupakan metode kolorimetri yang paling banyak digunakan dalam penelitian biologi sel dan farmasi untuk menilai aktivitas metabolik, viabilitas, proliferasi, serta sitotoksisitas obat. Reagen MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) adalah garam mono-tetrazolium yang terdiri dari inti cincin tetrazole kuaterner bermuatan positif yang mengandung empat atom nitrogen yang dikelilingi oleh tiga cincin aromatik termasuk dua gugus fenil dan satu cincin tiazolil. Reduksi MTT menghasilkan gangguan pada inti cincin tetrazole dan pembentukan molekul tak larut dalam air berwarna ungu-biru yang disebut formazan. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) dapat menembus membran sel dan direduksi oleh sel metabolik aktif menjadi kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut. Reaksi reduksi ini dikatalisis oleh enzim dehidrogenase dengan donor elektron utama berupa NAD(P)H, sehingga hasilnya mencerminkan aktivitas metabolisme sel. Kristal formazan yang terbentuk kemudian dilarutkan menggunakan pelarut organik seperti dimetil sulfoksida (DMSO), lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer mikroplat pada panjang gelombang sekitar 570 nm.

Absorbansi yang tinggi menunjukkan jumlah formazan yang besar, yang berkorelasi dengan jumlah sel hidup atau aktivitas metabolik sel (Ghasemi *et al.*, 2021).

MTT *assay* pertama kali dikembangkan oleh Mosmann pada tahun 1983 dan sejak itu menjadi metode standar untuk menilai viabilitas sel, proliferasi, dan toksisitas obat. Penggunaannya meluas tidak hanya pada kultur sel mamalia, tetapi juga pada mikroorganisme seperti bakteri dan fungi. Pada prokariot, reduksi MTT terutama berkaitan dengan aktivitas enzim dehidrogenase, meskipun mekanismenya belum sepenuhnya dipahami. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa metode ini dapat dioptimalkan untuk memberikan hasil yang sebanding dengan metode kultur konvensional dengan waktu analisis yang lebih singkat (Muljadi *et al.*, 2022).

Mekanisme kerja MTT melibatkan reduksi tetrazolium di berbagai organel sel, seperti mitokondria, retikulum endoplasma, membran plasma, dan lipid sitosolik, sehingga hasilnya mencerminkan metabolisme sel secara keseluruhan. Namun, interpretasi hasil dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain kepadatan sel awal, konsentrasi MTT, lama inkubasi, komposisi media kultur, serta keberadaan senyawa uji yang dapat mengganggu reaksi reduksi atau pembacaan optik. Peningkatan jumlah sel tidak selalu menghasilkan peningkatan absorbansi yang linier, dan inkubasi MTT yang terlalu lama dapat menyebabkan toksisitas serta kerusakan mitokondria (Ghasemi *et al.*, 2021). Mekanisme Reduksi MTT Menjadi Formazan dapat dilihat pada Gambar 19.



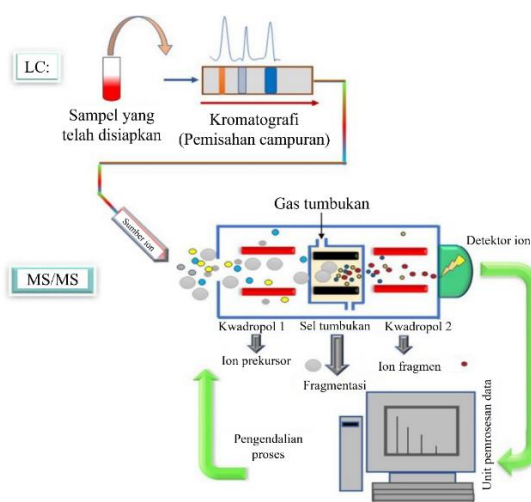
**Gambar 19.** Mekanisme dasar reduksi MTT menjadi formazan (Kamiloglu *et al.*, 2020).

## 2.10. Karakterisasi Struktur

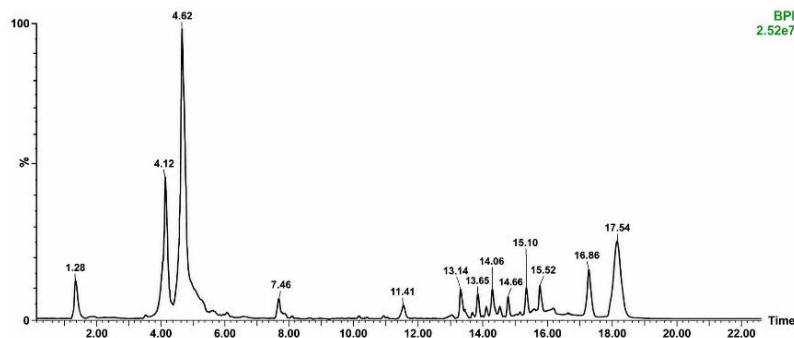
### 2.10.1. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)*

*Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC–MS)* merupakan instrumen analisis yang menggabungkan teknik pemisahan kromatografi cair dengan kemampuan deteksi spektrometri massa, sehingga memungkinkan identifikasi serta kuantifikasi senyawa dalam campuran kompleks secara akurat. Prinsip kerja LC–MS diawali dengan pemisahan molekul melalui kromatografi cair berdasarkan perbedaan interaksi senyawa dengan fase diam dan fase gerak. Eluen hasil pemisahan dialirkan ke sistem antarmuka, kemudian diionisasi menggunakan teknik seperti *Electrospray Ionization (ESI)* atau *Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)*. Ion yang terbentuk selanjutnya diarahkan ke analisator massa untuk ditentukan rasio massa terhadap muatan ( $m/z$ ), sehingga dihasilkan spektrum massa yang memberikan informasi mengenai berat molekul, struktur kimia, maupun konsentrasi relatif suatu senyawa (Ardrey, 2003). Keunggulan LC–MS terletak pada sensitivitas dan selektivitasnya yang tinggi serta kemampuannya mendeteksi senyawa dalam jumlah yang sangat kecil. Instrumen ini efektif untuk menganalisis molekul polar, nonvolatil, hingga biomolekul kompleks seperti protein, peptida, metabolit, dan obat-obatan tanpa memerlukan proses derivatisasi yang biasanya diperlukan pada teknik lain, misalnya GC–MS. Oleh karena itu, LC–MS dipandang sebagai instrumen yang sangat fleksibel dalam bidang analisis kimia modern (Ardrey, 2003). Seiring perkembangan teknologi, LC–MS tidak hanya berfungsi sebagai alat identifikasi, tetapi juga menjadi instrumen utama dalam penelitian metabolomik, toksikologi, forensik, pengawasan keamanan pangan, serta pemantauan lingkungan. Inovasi pada antarmuka ionisasi bertekanan atmosfer memungkinkan analisis sampel biologis kompleks tanpa perlakuan awal yang rumit, dengan hasil resolusi tinggi, akurasi massa presisi, dan kecepatan analisis yang efisien. Hal ini menjadikan LC–MS sebagai instrumen yang berkontribusi besar dalam penelitian biomedis, farmasi, dan ilmu lingkungan modern (Alanazi, 2025).

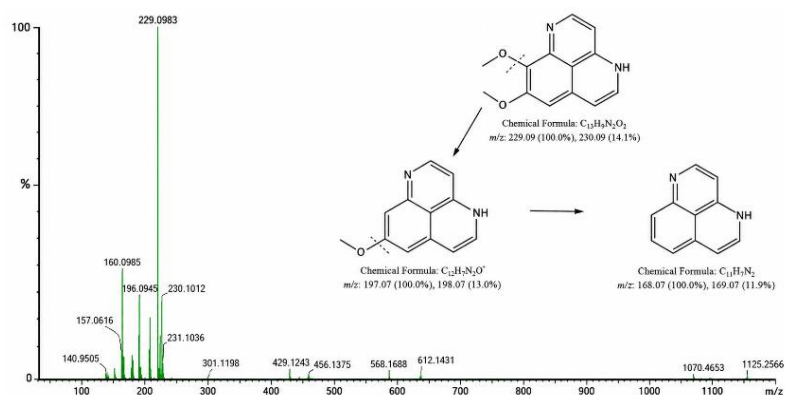
Penentuan jenis struktur senyawa dapat diidentifikasi menggunakan LC-MS dengan menampilkan data waktu retensi dan dengan waktu retensi yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan adanya variasi sifat fisikokimia dari senyawa dalam sampel. Setiap puncak pada kromatogram LC-MS merepresentasikan ion molekul yang telah terpisah berdasarkan karakteristik kimianya, seperti tingkat kepolaran, rasio massa terhadap muatan ( $m/z$ ), serta kekuatan interaksi antara senyawa dengan fase diam dan fase gerak (Rusli *et al.*, 2022). Jumlah puncak yang muncul pada sampel mencerminkan beragamnya kandungan senyawa di dalamnya. Hal ini juga menandakan bahwa sampel tersebut berupa campuran yang kompleks, sehingga bioaktivitas yang diamati tidak disebabkan oleh satu senyawa tunggal (Correia *et al.*, 2025). Berikut merupakan proses saat analisis LCMS (Gambar 20), kromatogram hasil analisis LCMS (Gambar 21), dan penentuan senyawa (Gambar 22).



**Gambar 20.** Diagram skema Kromatografi Cair - Spektrometri Massa (LC-MS) (Alanazi, 2025).



**Gambar 21.** Kromatogram LC-MS yang dihasilkan senyawa dari Spons *Aaptos suberitoides* (Hardhiyuna *et al.*, 2024).



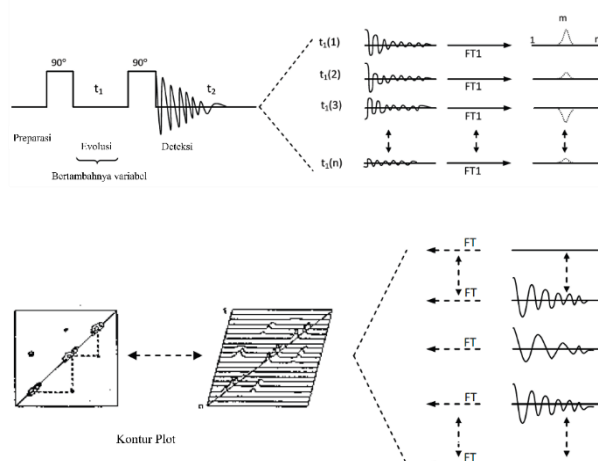
**Gambar 22.** Puncak fragmentasi massa pada puncak yang sesuai di RT 4,62 dari spons *Aaptos suberitoides* (Hardhiyuna *et al.*, 2024).

### 2.10.2. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) merupakan salah satu teknik analisis modern yang sangat penting dalam penentuan struktur molekul dengan ketelitian hingga tingkat atom. Prinsip dasarnya bertumpu pada sifat spin inti atom, di mana variasi kecil pada lingkungan elektronik lokal suatu molekul menghasilkan perbedaan karakteristik, seperti pergeseran kimia yang berkaitan dengan gugus fungsional tertentu. Keunggulan utama NMR terletak pada kemampuannya untuk memberikan informasi konektivitas antar atom, termasuk hubungan berupa kopling dan interaksi antar inti, serta pemanfaatan efek *overhauser* inti (NOE) untuk mengukur jarak spasial antar inti hingga  $\leq 5 \text{ \AA}$ .

Keunggulan yang dimiliki NMR menjadikannya instrumen esensial dalam menentukan dan mengonfirmasi struktur senyawa kompleks. Selain itu, metode ini memiliki kelebihan lain berupa persiapan sampel yang relatif sederhana, tingkat reproduibilitas yang tinggi, sifat non-destruktif, serta kemampuan kuantifikasi relatif tanpa memerlukan standar internal. Walaupun sensitivitasnya cenderung lebih rendah dibandingkan teknik berbasis spektrometri massa (MS), NMR tetap unggul karena mampu menyajikan informasi struktural yang komprehensif tanpa dibatasi polaritas, volatilitas, maupun keberadaan kromofor. Data yang dihasilkan, misalnya melalui proton NMR satu dimensi ( $^1\text{H-NMR}$ ), dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi pergeseran kimia, bentuk sinyal, konstanta kopling homonuklir ( $^1\text{H-}^1\text{H}$ ), serta rasio intensitas sinyal.

Keterbatasan utama NMR adalah sensitivitasnya yang rendah, sehingga spektrum  $^1\text{H-NMR}$  pada sampel kompleks sering kali didominasi oleh sinyal dari molekul primer yang melimpah. Setiap jenis proton memiliki nilai pergeseran kimia (*chemical shift*) yang berbeda dan berada dalam rentang tertentu yang khas. Rentang ini terbatas, sehingga setiap proton hanya akan muncul pada daerah ppm tertentu dalam spektrum  $^1\text{H-NMR}$ . Oleh karena itu, nilai pergeseran kimia dapat digunakan sebagai petunjuk untuk mengenali jenis proton yang menghasilkan sinyal tersebut (Pavia *et al.*, 2021). Untuk mengatasi hal tersebut, digunakan pendekatan dua dimensi (2D NMR) yang mampu meningkatkan resolusi melalui pembedahan sinyal dalam dua dimensi. Jenis 2D NMR yang lazim dipakai mencakup korelasi homonuklir seperti *J-resolved* (J-Res), *Correlation Spectroscopy* (COSY), dan *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY), serta korelasi heteronuklir seperti *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) dan *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC), yang secara keseluruhan memungkinkan analisis struktur molekul dilakukan secara lebih detail dan akurat (Garcia-Perez *et al.*, 2020; Li and Xiang, 2025). Berikut merupakan mekanisme NMR dua dimensi (Gambar 23) dan contoh data hasil NMR (Tabel 1).

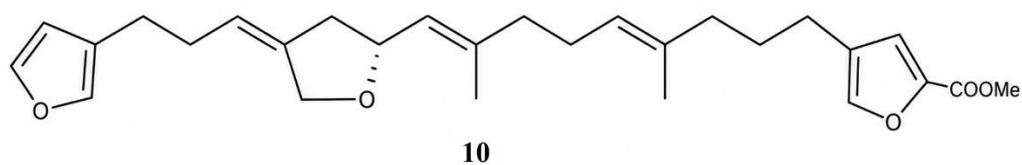
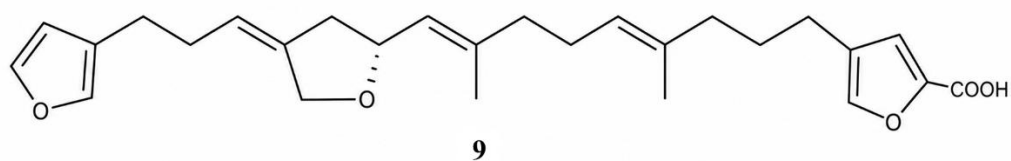


**Gambar 23.** Mekanisme NMR dua dimensi (Jenie dkk., 2014).

**Tabel 1.** Data  $^{13}\text{C}$  dan  $^1\text{H}$ -NMR senyawa yang dihasilkan dari spons *Luffariella variabilis* (Ahmadi *et al.*, 2017).

No.	9			10		
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)		
1	167.0	s -	-	166.5	s -	-
2	119.0	s -	-	128.2	s -	-
3	106.0	d -	6.38 brs	140.0	d -	6.63 brd (6.7)
4	156.4	s -	-	23.8	t a	2.34 m
	-	-	-	-	- b	2.21 ddd (3.1, 6.7, 17.7)
5	38.1	t -	3.28 s (2H)	81.9	d -	4.30 dd (3.1, 12.9)
6	130.9	s -	-	38.9	s -	-
7	127.2	d -	5.24 m	31.8	t $\alpha$	1.56 m
	-	-	-	-	- $\beta$	1.30 m
8	26.3	t -	2.16 m (2H)	17.4	t -	1.51 m (2H)
9	39.2	t -	2.06 m (2H)	37.8	t $\alpha$	0.97 dt (3.1, 12.6)
	-	-	-	-	- $\beta$	1.67 m
10	139.7	s -	-	38.9	s -	-
11	124.9	d -	5.24 m	46.6	d -	1.73 dd (2.6, 11.3)
12	75.9	d -	4.56 dt (8.4, 5.9)	17.5	t $\alpha$	1.55 m
	-	-	-	-	- B	1.47 m

13	39.4	t	a	2.58 dd (5.9, 15.0)	41.6	t	$\alpha$	1.65 m
-	-	-	b	2.23 m	-	-	B	1.70 m
14	139.8	s	-	-	73.0	s	-	-
15	119.2	d	-	5.33 m	58.8	d	-	1.05 brs
16	29.9	t	-	2.16 m (2H)	26.0	t	a	1.68 m
-	-	-	-	-	-	-	b	1.54 m
17	24.6	t	-	2.48 t (7.5) (2H)	28.4	t	a	2.44 m
-	-	-	-	-	-	-	b	2.39 m
18	124.5	s	-	-	125.4	s	-	-
19	110.9	d	-	6.26 brs	110.9	d	-	6.29 brs
20	142.7	d	-	7.34 brs	142.6	d	-	7.35 brt (1.5)
21	138.9	d	-	7.21 brs	138.6	d	-	7.25 brs
22	68.3	t	a	4.39 d (13.0)	30.5	q	-	1.18 s
-	-	-	b	4.20 d (13.0)	-	-	-	-
23	16.7	q	-	1.70 brs	15.9	q	-	1.03 s
24	15.9	q	-	1.60 brs	17.4	q	-	0.87 s
25	147.7	d	-	7.96 brs	16.9	q	-	1.92 s



**Gambar 24.** Senyawa yang dihasilkan dari spons *Luffariella variabilis*, senyawa **9** dan senyawa **10** (Ahmadi *et al.*, 2017).

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hidrobiologi, Pusat Riset Vaksin dan Obat, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Bogor, Jawa Barat pada bulan Agustus 2025 – Februari 2026. Analisis LC-MS dilaksanakan di Laboratorium Genomik, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Jawa Barat, Indonesia. Analisis NMR dilaksanakan di Laboratorium Kimia Maju, KST B.J. Habibie, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Serpong.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, aluminium foil, sarung tangan steril, tisu, kertas saring *Whatman*, vial, mikrotip, mikropipet, *microtube* steril 1,5 mL, label, *chamber*, *hot plate*, plat KLT aluminium silika gel F<sub>254</sub> MERCK, *plate 96 well*, *Rotary Vacuum Evaporator* (Rotavapor Buchi R-300) dilengkapi dengan *chiller* dan *heating bath*, *freeze dryer* (BUCHI Lyovapor L200), mikroskop (Olympus SZX7), Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge, lampu UV, *Bio Safety Cabinet* (BSC) (Thermo Scientific™ 1300 Series Class II, Type A2), inkubator CO<sub>2</sub> (Binder CB-S 170), hemositometer atau *automated cell counter* (Corning® Cell Counter), sentrifus (Eppendorf Centrifuge 5430 R), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) (triple quad LCMSMS Shimadzu 8060), *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) (Avance® NEO 700MHz).

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel spons laut deposit Laboratorium Genomik, BRIN Cibinong yang diperoleh dari perairan Alung Benua dan Cela-Cela Point, Pulau Bunaken, Taman Nasional Bunaken, Manado, Sulawesi Utara, Indonesia. Metanol (MeOH), n-Heksana, Etil asetat (EtOAc), diklorometana (DCM), akuades, pereaksi Dragendorff, ninhidrin, serium (IV) sulfat [Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>], dan dimetilsulfoksida (DMSO), larutan natrium hipoklorit (NaOCl), Doxorubicin, silika gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), sel A549, HeLa, dan MCF-7 yang diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC, USA), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco, Jerman) yang disuplementasi dengan 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS; Sigma-Aldrich), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida; Sigma-Aldrich, Jerman), larutan *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DBS), tripsin, *trypan blue*.

### **3.3. Metode**

#### **3.3.1. Biomaterial**

Sampel spons yang digunakan merupakan koleksi spons dengan kode SBM-037, SBM-038, SBM-046, SBM-047, dan SBM-049 yang merupakan deposit Laboratorium Genomik, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Bogor. Sampel tersebut diisolasi dari dua titik pengambilan di Taman Nasional Bunaken, Manado, Sulawesi Utara pada bulan September 2022, yaitu SBM-037 dan SBM-038 diambil dari perairan Alung Benua (0,161842° LU; 124,75826° BT), sedangkan SBM-046, SBM-047, dan SBM-049 diambil dari Cela-Cela Point (0,161202° LU; 124,76807° BT).

#### **3.3.2. Identifikasi Spikula**

Identifikasi jenis spons dilakukan melalui pengamatan morfologi spikula dengan metode yang diadaptasi dari (Rowe *and* Doty, 1977). Potongan spons berukuran ± 1 cm<sup>3</sup> dimasukkan ke dalam vial 5 mL yang berisi larutan natrium hipoklorit

(NaOCl), kemudian dibiarkan selama 15–20 menit hingga spikula terpisah dari jaringan. Setelah terbentuk endapan spikula, larutan natrium hipoklorit (NaOCl) dibuang secara hati-hati menggunakan pipet tetes. Endapan yang tertinggal dibilas dengan akuades, didiamkan selama 5 menit, lalu pengotor yang larut dalam akuades dibuang; prosedur ini dilakukan sebanyak tiga kali. Selanjutnya, endapan spikula ditambahkan alkohol 70% sebanyak 1 mL, dibiarkan selama 5 menit, kemudian alkohol dibuang. Spikula yang diperoleh dipindahkan ke kaca preparat hingga kering untuk menghindari efek pembiasan, kemudian diamati di bawah mikroskop Olympus SZX7 dengan perbesaran 100x dan 400x.

### 3.3.3. Ekstraksi dan Partisi

Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan (Fajarwati *et al.*, 2024) dengan modifikasi. Sampel spons basah dipotong kecil-kecil ( $\pm$ ) 1 cm dan ditimbang. Sampel yang sudah ditimbang dimaserasi dalam metanol (MeOH) selama 24 jam dan diulangi sebanyak 3 kali. Semua filtrat hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring *Whatman*, digabungkan ke dalam erlenmeyer, dan pelarut metanol (MeOH) diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Kondisi evaporator yang digunakan berada pada tekanan vakum 100 mbar, suhu *chiller* 6 °C, suhu *water bath* 40 °C, dan rotasi 90 rpm. Residu yang diperoleh kemudian dipartisi secara menyeluruh menggunakan etil asetat (EtOAc) dan akuades (H<sub>2</sub>O), untuk memisahkan antara komponen polar (MeOH-H<sub>2</sub>O), dan semipolar (EtOAc).

Filtrat etil asetat hasil partisi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada tekanan vakum 100 mbar, suhu *chiller* 6 °C, suhu *water bath* 40 °C, dan rotasi 90 rpm. Sementara itu, filtrat air hasil partisi dievaporasi untuk menguapkan pelarut MeOH. Filtrat kemudian disimpan pada *freezer* suhu -80 °C selama 72 jam hingga membeku. Filtrat yang membeku dikeringkan menggunakan *freeze dry* dengan kondisi tekanan *ice condenser* 0,150 mbar dan suhu *ice condenser* -54 °C selama 72 jam hingga didapatkan residu kering. Residu dilarutkan menggunakan pelarut MeOH, disaring, dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Kondisi

*evaporator* yang digunakan untuk menguapkan MeOH yaitu berada pada tekanan vakum 100 mbar, suhu *chiller* 6 °C, suhu *water bath* 40 °C, dan rotasi 90 rpm.

#### **3.3.4. Bioassay-guided Isolation**

Proses *bioassay-guided isolation* dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan (Fajarwati *et al.*, 2024) dengan modifikasi. Fraksinasi terhadap ekstrak spons pada fraksi etil asetat dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom terbuka (*open column chromatography*). Sementara itu, fraksi air dimurnikan serta difraksinasi menggunakan Sep-Pak C<sub>18</sub>. Fraksi-Fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitas sitotoksitasnya terhadap sel kanker menggunakan uji MTT *Assay* untuk menentukan persentase inhibisi, serta dianalisis melalui kromatografi lapis tipis (KLT) dengan berbagai campuran pelarut sebagai fase gerak.

#### **3.3.5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Proses kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan (Fajarwati *et al.*, 2024) dengan modifikasi. Uji KLT dilakukan untuk mengidentifikasi komponen yang terdapat dalam ekstrak, dilakukan analisis menggunakan fase diam plat aluminium silika gel F<sub>254</sub>. Fase gerak yang digunakan adalah campuran diklorometana (DCM) : metanol (MeOH) (9:1). Plat KLT kemudian diekspos di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Lebih lanjut, ekstrak direaksikan dengan pereaksi spesifik serum (IV) sulfat (Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), Dragendorff, dan ninhidrin. Setelah itu, pelat dipanaskan dan nilai R<sub>f</sub> dihitung berdasarkan pola noda yang terbentuk.

#### **3.3.6. Kromatografi Kolom Terbuka (KKT) dengan Silika**

Proses kromatografi kolom terbuka dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan (Fajarwati *et al.*, 2024) dengan modifikasi. Fraksi etil asetat spons

difraksinasi menggunakan kromatografi kolom terbuka (KKT) dengan fase diam berupa silika normal untuk mengurangi pengotor (*impurity*) sebelum dilakukan analisis lebih lanjut. Pemisahan dilakukan secara bertahap menggunakan fase gerak *n*-Heksana, kemudian dilanjutkan dengan diklorometana (DCM), etil asetat (EtOAc), dan metanol (MeOH). Setiap fraksi dihitung nilai rendemennya.

### 3.3.7. Pemurnian dengan Sep-Pak C<sub>18</sub>

Proses pemurnian dengan Sep-Pak C<sub>18</sub> dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan (Fajarwati *et al.*, 2024) dengan modifikasi. Pemurnian lebih lanjut dilakukan terhadap fraksi air spons menggunakan Sep-Pak C<sub>18</sub>. Sampel dielusi secara bertahap dengan beberapa jenis eluen, yaitu 100 % H<sub>2</sub>O, 25 % MeOH dalam H<sub>2</sub>O, 50 % MeOH dalam H<sub>2</sub>O, 75 % MeOH dalam H<sub>2</sub>O, dan 100 % MeOH. Setiap masing-masing fraksi dihitung beratnya, kemudian diidentifikasi lebih lanjut.

### 3.3.8. Kultur Sel dan Kondisi Pemeliharaan

Proses kultur sel dan kondisi pemeliharaan sel dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan (Fajarwati *et al.*, 2024) dengan modifikasi. Penelitian ini menggunakan 3 jenis sel yaitu A549, HeLa, dan MCF-7 yang diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC, USA). Semua lini sel dipelihara dalam medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco, Jerman) yang disuplementasi dengan 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS; Sigma-Aldrich), 1,5 % *Penicillin/Streptomycin* (Sigma-Aldrich), dan 0,5 % *Fungizone* (Sigma-Aldrich). Sel-sel tersebut dikultur dalam inkubator sel pada suhu 37 °C dengan kondisi atmosfer yang mengandung 5 % CO<sub>2</sub>, sehingga tercipta lingkungan optimal untuk pertumbuhan sel.

Sel yang telah dikultur sebelumnya digunakan sebagai sumber subkultur. Proses subkultur diawali dengan mencuci permukaan wadah kultur menggunakan 3 mL larutan *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS), setelah media lama

dibuang ke dalam larutan NaOCl 10 %. Selanjutnya, ke dalam wadah kultur ditambahkan 900  $\mu\text{L}$  *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) untuk menjaga kondisi sel selama proses disosiasi, kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  larutan tripsin guna melepaskan sel dari permukaan wadah. Proses ini dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37 °C dengan kadar CO<sub>2</sub> sebesar 5 % selama  $\pm 3$  menit. Setelah inkubasi, kondisi sel diamati menggunakan mikroskop. Jika sel telah terlepas sempurna, suspensi sel dipindahkan ke dalam tabung falcon 15 mL, kemudian dibilas menggunakan 1 mL media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *complete*. Suspensi tersebut disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 250 rpm dan suhu 25°C. Endapan hasil sentrifugasi kemudian dihomogenkan kembali dengan 1 mL media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *complete*.

Tahap berikutnya adalah perhitungan viabilitas sel menggunakan hemositometer pada alat *Corning® Automated Cell Counter*. Sebanyak 10  $\mu\text{L}$  larutan *trypan blue* dimasukkan ke dalam mikrotube kosong, kemudian ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  suspensi sel dan dihomogenkan. Campuran tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam hemositometer untuk dilakukan penghitungan menggunakan *CytoSmart Cell Counter*. Pewarna *trypan blue* berfungsi membedakan antara sel hidup dan sel mati, di mana sel hidup tidak menyerap pewarna, sedangkan sel mati akan terwarnai. Persentase viabilitas sel (*cell viability*) kemudian dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Jumlah Sel Hidup}}{\text{Jumlah Total Sel}} \times 100 \%$$

### 3.3.9. Uji Sitotoksisitas (MTT Assay)

Proses uji sitotoksisitas dilakukan berdasarkan metode mikrodilusi yang dilaporkan (Ahmadi *et al.*, 2026) dengan modifikasi. Sel kanker A549, HeLa, dan MCF-7 diinkubasi pada suhu 37 °C dalam atmosfer 5 % CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Sel yang telah dikultur dimasukkan ke dalam *well* pada *microplate* dan diinkubasi

selama 24 jam. Fraksi spons disiapkan dengan diencerkan dalam 10.000 ppm DMSO. Setiap *well* pada *microplate* ditambahkan 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  sampel fraksi spons dengan konsentrasi akhir 10.000 ppm. Media kultur sel diinkubasi kembali 72 jam pada suhu 37 °C dalam atmosfer 5 %  $\text{CO}_2$ . Setelah masa inkubasi selesai, larutan MTT dengan konsentrasi 5 mg/mL ditambahkan ke tiap *well* dan diinkubasi 4 jam pada suhu 37 °C dalam atmosfer 5 %  $\text{CO}_2$ . Campuran medium dan residu MTT dibuang, kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dalam DMSO, dan larutan diinkubasi dalam kondisi gelap tertutup aluminium foil. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang 570 nm selama 15 detik. Pengujian dilakukan tiga kali ulangan (*triplo*). Doxorubicin digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi yang disesuaikan dengan sampel. Persentase inhibisi (% inhibisi) dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100 \%$$

### 3.3.10. Uji *Inhibitory Concentration 50* ( $\text{IC}_{50}$ )

Proses uji  $\text{IC}_{50}$  dilakukan dengan metode yang dilaporkan (Ahmadi *et al.*, 2026) dengan modifikasi. Fraksi spons yang menunjukkan nilai inhibisi tinggi, setelah proses pemurnian, sampel dilakukan uji  $\text{IC}_{50}$ . Sel kanker dimasukkan dengan sampel fraksi terpilih yang telah dilarutkan dalam DMSO pada konsentrasi 100; 50; 25; 10; 1; dan 0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Perlakuan terhadap sel dilakukan dengan prosedur yang sama seperti pada uji MTT *Assay* dan pada sel kanker yang sama. Nilai  $\text{IC}_{50}$  ditentukan berdasarkan kurva hubungan antara konsentrasi fraksi dan persentase inhibisi sel.

### 3.3.11. Analisis Spektroskopi

Sampel yang sudah dilakukan uji  $\text{IC}_{50}$ , dilanjutkan analisis karakterisasi menggunakan *Liquid Chromatography Mass Spectrometer* (LC-MS) dan *Nuclear*

*Magnetic Resonance* (NMR). Proses analisis spektroskopi dilakukan berdasarkan metode yang dilaporkan (Fajarwati *et al.*, 2024) dengan modifikasi.

### **1. *Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC-MS)***

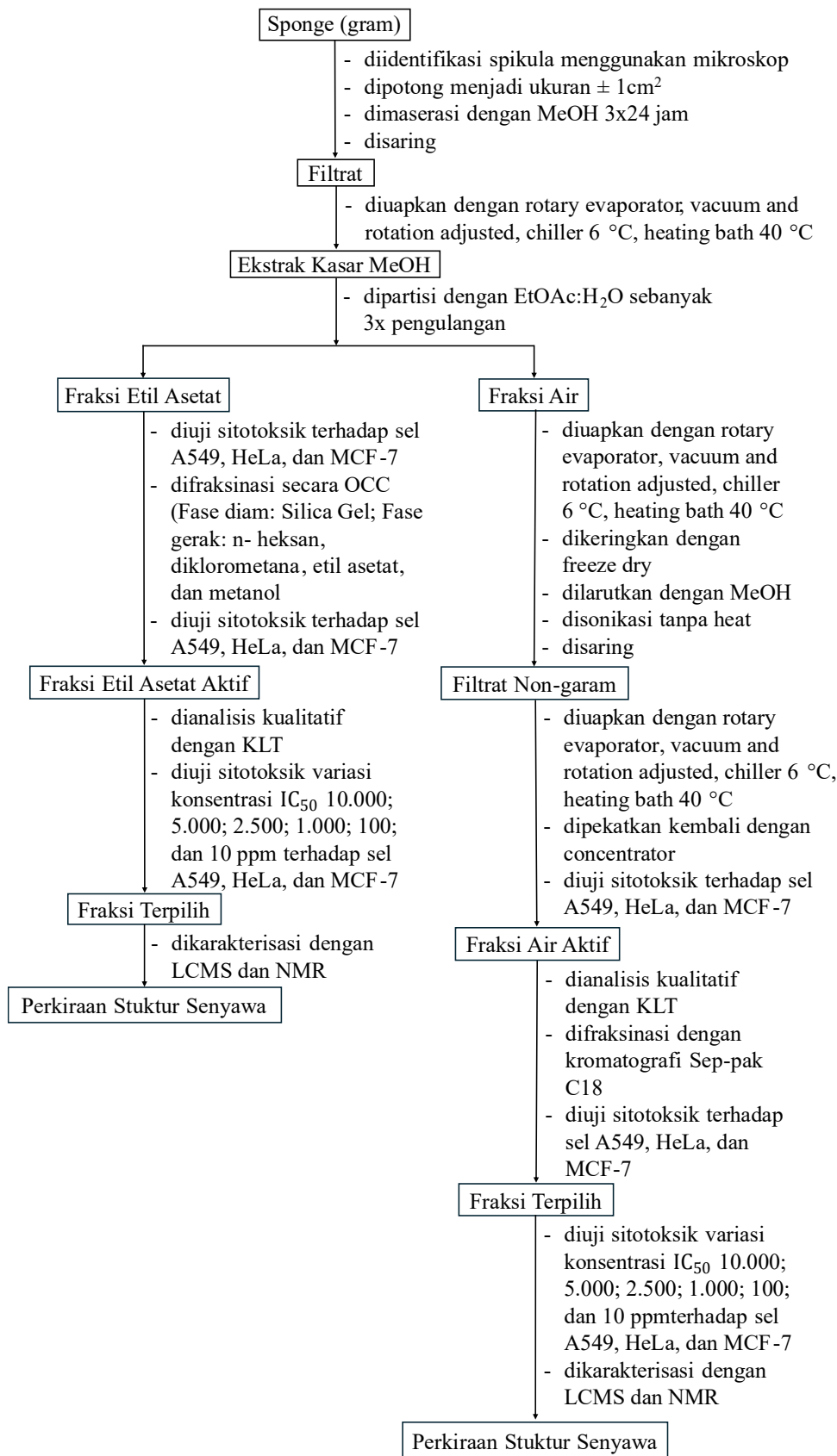
Identifikasi metabolit pada sampel dilakukan menggunakan instrumen LC-MS, diinjeksi masing-masing 2  $\mu\text{L}$  dengan waktu *running* 20 menit setiap sampelnya. Sebelum analisis, ekstrak yang telah dilarutkan dalam metanol disaring menggunakan *syringe* filter 0,22  $\mu\text{m}$ , kemudian dimasukkan ke dalam vial untuk diinjeksi ke sistem LC. Analisis menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) (triple quad LCMS MS Shimadzu 8060) dengan kolom Shim-pacx XR-ODS III (1,6  $\mu\text{m}$ ) 50L x 2.0, fase gerak campuran metanol dan air. Analisis ini menggunakan metode *positive* untuk *ion adduct*. Selanjutnya sistem MS diatur dengan menggunakan perangkat lunak Mastrenova (Fajarwati *et al.*, 2024).

### **2. *Nuclear Magnetic Resonance (NMR)***

Konfirmasi struktur dilakukan menggunakan  $^1\text{H-NMR}$  700 MHz dengan pelarut deuterokloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) untuk fraksi semi polar dan  $\text{CD}_3\text{OD}$  untuk fraksi polar. Sampel dianalisis menggunakan instrumen Avance® NEO 700MHz NMR. Interpretasi data menggunakan perangkat lunak Mastrenova (Fajarwati *et al.*, 2024).

#### **3.3.12. Diagram Alir**

Secara menyeluruh alur penelitian ini dapat digambarkan pada diagram alir penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 25.



**Gambar 25.** Diagram alir metode penelitian.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dan hasil yang didapatkan, diperoleh beberapa poin kesimpulan sebagai berikut.

1. Lima spons asal Taman Nasional Bunaken berhasil diidentifikasi spesiesnya yaitu, SBM-037, SBM-038, SBM-046, SBM-047, dan SBM-049 masing-masing termasuk dalam spesies *Hippospongia* sp., *Acanthella* sp., *Leucetta* sp., *Ascidian* sp., dan *Spongia* sp.
2. Penelitian ini berhasil mengisolasi senyawa bioaktif antikanker berhasil dari dua spesies spons melalui pendekatan *bioassay-guided isolation* yang dikarakterisasi menggunakan KLT, LC-MS, dan <sup>1</sup>H-NMR, sehingga diperoleh empat senyawa yang berhasil diidentifikasi dari *Hippospongia* sp. yaitu, *demethylfurospingin-4* (**11**), *furospingin-2* (**12**), *dibutyl phthalate* (**14**), dan *hippospondine F* (**15**), serta satu senyawa dari *Spongia* sp., yaitu *cyclopeptin* (**17**).
3. Senyawa **11** menunjukkan aktivitas sitotoksik sangat kuat terhadap ketiga sel kanker. Senyawa **12** menunjukkan aktivitas sitotoksik kuat terhadap sel A549, MCF-7 dan lemah terhadap sel HeLa. Senyawa **14** dan **15** memiliki aktivitas sitotoksik kuat terhadap ketiga sel. Senyawa **17** dengan aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel A549, MCF-7 dan aktivitas sitotoksik kuat terhadap sel HeLa. Hasil ini membuktikan bahwa spons laut Taman Nasional Bunaken, berpotensi sebagai sumber metabolit sekunder bioaktif yang dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat antikanker alami.

## 5.2 Saran

Berdasarkan hasil data penelitian, terdapat beberapa hal yang dapat disarankan untuk penelitian selanjutnya, sebagai berikut.

1. Perlu dilakukan analisis struktur lanjutan seperti 2D-NMR dan HRMS untuk mengkonfirmasi penentuan struktur senyawa secara menyeluruh.
2. Seluruh sampel menunjukkan aktivitas signifikan terhadap sel kanker sehingga perlu dilakukan kajian lanjutan untuk mengetahui mekanisme kerja senyawa, serta uji sitotoksik terhadap sel normal untuk mengkaji potensi dan keamanannya sebagai kandidat obat antikanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adewal, M. A. K., Abdullah, A., Zamani, N. P., Arafat, D., Ayu, I. P., dan Subhan, B. 2025. Potential Antioxidant Activity of Sea Sponge *Stylissa carteri* Extract. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 28(3): 245–253. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v28i3.60270>.
- Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., Shabbir, M., Khan, K., Trembley, J., and Alruwaili, N. W. 2022. Bioassay-guided Isolation and Characterization of Lead Antimicrobial Compounds from *Acacia hydaspica* Plant Extract. *AMB Express*. 12(1): 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01501-y>.
- Ahmadi, P., Higashi, M., De Voogd, N. J., and Tanaka, J. 2017. Two Furanosesterterpenoids from the Sponge *Luffariella variabilis*. *Marine Drugs*. 15(249): 1–8. <https://doi.org/10.3390/md15080249>.
- Ahmadi, P., Setiawan, F., Praditya, D. F., Hadi, T. A., Rahmawati, S. I., Bayu, A., Setiawan, A., Hendri, J., and Yunovilsa Putra, M. 2026. A New (+)-curcuphenol Derivative From the Indonesian Marine Sponge *Myrmekioderma* sp.: Dual Cytotoxic Apoptotic and Antiviral Activities Against A549, HeLa, and DENV-2. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2026.2627634>.
- Alam, G., Astuti, P., Sari, D., Wahyuono, S., and Hamman, M. T. 2005. Structure Elucidation of Bioactive Alkaloid Compounds Isolated from Sponge *Petrosia* sp. Collected from Bunaken Bay, Manado. *Indo. J. Chem*. 5(2): 177–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.22146/ijc.21828>.
- Alanazi, S. 2025. Recent Advances in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC–MS) Applications in Biological and Applied Sciences. *Analytical Science Advances*. 6(1): 1–12. <https://doi.org/10.1002/ansa.70024>.
- Alvarez, B., Van Soest, R. W. M., and Rützler, K. 1998. *A Revision of Axinellidae (Porifera: Demospongiae) of the Central West Atlantic Region*. Smithsonian Institution Press. Washington. 1-56.
- Aniogo, E. C., George, B. P., and Abrahamse, H. 2022. Characterization of Resistant MCF-7 Breast Cancer Cells Developed by Repeated Cycles of Photodynamic Therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 13(2): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.964141>.

- Arai, M., Yamano, Y., Fujita, M., Setiawan, A., and Kobayashi, M. 2012. Styliissamide X, A New Proline-rich Cyclic Octapeptide as an Inhibitor of Cell Migration, from an Indonesian Marine Sponge of *Stylissa* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 22(4): 1818–1821. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.023>.
- Ardrey, R. E. 2003. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: an Introduction*. John Wiley & Sons Ltd. Bognor Regis. 1-288.
- Azevedo, F., Padua, A., Moraes, F., Rossi, A., Muricy, G., and Klautau, M. 2017. Taxonomy and Phylogeny of *Calcareous* Sponges (Porifera: *Calcarea: Calcinea*) from Brazilian Mid-shelf and Oceanic Islands. *Zootaxa*. 4311(3): 301–344. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4311.3.1>.
- Badawy, M. E. I., El-Nouby, M. A. M., Kimani, P. K., Lim, L. W., and Rabea, E. I. 2022. A Review of the Modern Principles and Applications of Solid-Phase Extraction Techniques in Chromatographic Analysis. *Analytical Sciences*. 38(12). 1457–1487. <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00190-8>.
- Bahri, S., Fajarwati, A. E., Setiawan, A., Hendri, J., Yuwono, S. D., Ambarwati, Y., and Zainul, R. 2024. Steroid Compounds from *Endophytic (Penicillium* sp.) of Mangrove *Avicennia marina*. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*. 7(2): 402–425. <https://doi.org/10.26655/JMCHEMSCI.2024.2.12>.
- Bashari, M. H., Huda, F., Tartila, T. S., Shabrina, S., Putri, T., Qomarilla, N., Atmaja, H., Subhan, B., Sudji, I. R., and Meiyanto, E. 2019. Bioactive Compounds in the Ethanol Extract of Marine Sponge *Stylissa carteri* Demonstrates Potential Anti-Cancer Activity in Breast Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 20(4): 1199–1206. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.4.1199>.
- Bauvais, C., Bonneau, N., Blond, A., Pérez, T., Bourguet-Kondracki, M. L., and Zirah, S. 2017. Furanoterpene Diversity and Variability in the Marine Sponge *Spongia officinalis*, from Untargeted LC-MS/MS Metabolomic Profiling to Furanolactam Derivatives. *Metabolites*. 7(2): 1–20. <https://doi.org/10.3390/metabo7020027>.
- Bayani, F., Kurniasari, B. A., Hamdani, A. S., Yuliana, D., Wahyuni, I., and Mujaddid, J. 2023. Identification of Secondary Metabolite Compounds from *Melandean (Bridelian micrantha)* Leaf Extract. *Hydrogen: Jurnal Kependidikan Kimia*. 11(6): 858–873. <https://doi.org/10.33394/hjkk.v11i6.9879>.
- Canals, J., Navarro, A., Vila, C., Canals, J. M., Díaz, T., Acosta-Plasencia, M., Cros-Font, C., Han, B., He, Y., and Monzó, M. 2022. Human Embryonic Mesenchymal Lung-Conditioned Medium Promotes Differentiation to Myofibroblast and Loss of Stemness Phenotype in Lung Adenocarcinoma Cell Lines. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 41(37): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02206-z>.

- Caroles, M. M. O., Sumilat, D. A., Schaduw, J. N. W., Boneka, F. B., Rimper, J. R. T. S. L., and Kumampung, D. R. H. 2025. Diversity of *Ascidians* on Eastern Bunaken Island Manado City Manado. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*. 13(2): 157–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.35800/jplt.13.2.2025.62200>.
- Carolina, F., Nastiti, K., and Rizali, M. 2022. Thin Layer Chromatography of Secondary Metabolite Profiles and Determination of Total Flavonoid Levels of the Sawi Langit (*Vernonia Cinerea L.*) Extract that Growing on Peatlands. *Journal of Advances in Medicine and Pharmaceutical Sciences (JAMAPS)*. 1(1): 23–31. <https://doi.org/10.36079/lamintang.jamaps-0101.427>.
- Chairunnisa, Shupaeroh, H. Y., Hasanah, H., Sa'adah, S., dan Choirunisyah, Z. 2025. Filum Porifera: Dari Keindahan Laut untuk Wisata, Ekonomi Lokal, hingga Keseimbangan Ekosistem di Indonesia. *Pendas: Jurnal Ilmiah Pendidikan Dasar*. 10(2): 1740–1752. <https://doi.org/https://doi.org/10.23969/jp.v10i2.24714>.
- Chandra, P. C., Made, N., dan Astuti, W. 2024. Potensi Aktivitas Farmakologis Daun Tumbuhan Tujuh Jarum (*Pereskia bleo (Kunth) DC*) sebagai Terapi Alternatif. *Jurnal Ilmu Farmasi Nusantara*. 1(2): 45–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.24843/JIFN.2025.v01.i02.p04>.
- Chen, M., Zhang, X., Wang, H., Lin, B., Wang, S., and Hu, G. 2015. Determination of Rutin in Rat Plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Application to Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatographic Science*. 53(4): 519–525. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu078>.
- Cimino, G., Stefano, S. DE, Minale, L., and Fattorusso, E. 1972. Minor C-21 Furanoterpens from the Sponges *Spongia officinalis* and *Hippospongia communis*. *Tetrahedron*. 28(2): 267–273. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020\(72\)80132-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020(72)80132-7).
- Correia, M. S. P., Othman, A., and Zamboni, N. 2025. Fast, General-Purpose Metabolome Analysis by Mixed-Mode Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analyst*. 150(22): 4955–4961. <https://doi.org/10.1039/d5an00641d>.
- De Giulio, A., De Rosa, S., Di Vincenzo, G., and Zavodnik, N. 1989. Terpenoids from the North Adriatic Sponge *Spongia officinalis*. *Journal of Natural Products*. 2(6): 1258–1262. <https://doi.org/https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np50066a010>.
- Diastuti, H., Mufida, Z. L., dan Purwati. 2024. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) serta Uji Aktivitas terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Sains Dan Edukasi Sains*. 7(1): 29–36. <https://doi.org/10.24246/juses.v7i1p29-36>.

- Digambiro, R. A., dan Parwanto, E. 2024. *Pedoman Penelitian Kanker*. Penerbit Lakeisha. Klaten. 1-254.
- Ehrlich, H., Wysokowski, M., Zóltowska-Aksamitowska, S., Petrenko, I., and Jesionowski, T. 2018. Collagens of Poriferan Origin. *Marine Drugs*. 16(3): 1-21. <https://doi.org/10.3390/md16030079>.
- El-Desoky, A. H., Kato, H., Angkouw, E. D., Mangindaan, R. E. P., De Voogd, N. J., and Tsukamoto, S. 2016. Ceylonamides A-F, Nitrogenous Spongian Diterpenes That Inhibit RANKL-Induced Osteoclastogenesis, from the Marine Sponge *Spongia ceylonensis*. *Journal of Natural Products*. 79(8): 1922–1928. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00158>.
- El-Seedi, H. R., Refaey, M. S., Elias, N., El-Mallah, M. F., Albaqami, F. M. K., Dergaa, I., Du, M., Salem, M. F., Tahir, H. E., Dagliaa, M., Yosri, N., Zhang, H., El-Seedi, A. H., Guo, Z., and Khalifa, S. A. M. 2025. Marine Natural Products as a Source of Novel Anticancer Drugs: An Updated Review (2019–2023). *Natural Products and Bioprospecting*. 15(13): 1–43. <https://doi.org/10.1007/s13659-024-00493-5>.
- Fajarwati, A. E., Hardhiyuna, M., Ningsih, F. N., Hermawan, A., Putri, D. D. P., Fatimah, N., Bayu, A., Setiawan, A., Arbi, U. Y., Murniasih, T., Rosyidah, A., Hadi, T. A., Putra, M. Y., and Ahmadi, P. 2024. Aaptamine, Isolated from the Bunaken National Park's Sponge, *Aaptos* sp., Promotes Cell Cycle Arrest and Induces Necrotic Cell Death of Colorectal Cancers. *Acta Chimica Slovenica*. 71(4): 619–626. <https://doi.org/10.17344/acsi.2024.8779>.
- Fan, D. X., Luo, X. C., Ding, Y. F., Liu, L. Y., Wang, X., Pan, J. Y., Ji, Y. Y., Wang, J., Li, C., Hong, L. L., and Lin, H. W. 2024. Isolation and Absolute Configuration of Alkylpyridine Alkaloids from the Marine Sponge *Hippospongia lachne*. *Phytochemistry*. 220(11): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2024.114017>.
- Fang, T., Wang, Y., Ma, Y., Su, W., Bai, Y., and Zhao, P. 2006. A Rapid LC/MS/MS Quantitation Assay for Naringin and its Two Metabolites in Rats Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 40(2): 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.07.031>.
- Ferdinan, A., Rizki, F. S., dan Rahmawati, N. 2021. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Etanol Daun Pandan Hutan Jenis Baru (*Freycinetia sessiliflora*). *Jurnal Komunitas Farmasi Nasional*. 1(2): 110–119. <https://doi.org/10.36387/jifi.v4i1.642>.
- Fernández, R., Dherbomez, M., Letourneux, Y., Nabil, M., Verbist, J. F., and Biard, J. F. 1999. Antifungal Metabolites from the Marine Sponge *Pachastrissa* sp.: New Bengamide and Bengazole Derivatives. *Journal of Natural Products*: 62(5): 678–680. <https://doi.org/10.1021/np980330l>.

- Garcia-Perez, I., Posma, J. M., Serrano-Contreras, J. I., Boulangé, C. L., Chan, Q., Frost, G., Stamler, J., Elliott, P., Lindon, J. C., Holmes, E., and Nicholson, J. K. 2020. Identifying Unknown Metabolites Using NMR-Based Metabolic Profiling Techniques. *Nature Protocols*. 15(8): 2538–2567. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0343-3>.
- Garrido, L., Zubía, E., Ortega, M. J., and Salvá, J. 1997. Notes New Furanoterpenoids from the Sponge *Spongia officinalis*. *Journal of Natural Product*. 60(8): 794–797. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/NP970160X>.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., and Kempson, I. 2021. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(12837): 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>.
- Global Cancer Observatory. 2025. GLOBOCAN 2022. Cancer Today. Diakses pada 15 Agustus 2025 dari <https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/bars?mode=population>.
- Güven, O., Mentеше, E., Yılmaz, F., Güner, A., Emirik, M., and Çalışkan, N. 2025. Evaluation of Antiproliferative Activity and Molecular Modeling Studies of Some Novel Benzimidazolone-Bridged Hybrid Compounds. *Pharmaceuticals*. 18(12): 1-33. <https://doi.org/10.3390/ph18121899>.
- Hahn-Deinstrop, E. 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. 1-331.
- Hardhiyuna, M., Arbi, U. Y., Zuraida, Z., and Ahmadi, P. 2024. Aaptamine-rich Fraction from the Indonesian Marine Sponge, *Aaptos suberitoides*, Exhibits a Cytotoxic Effect on DLD-1 Colorectal Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 25(5): 1737–1743. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2024.25.5.1737>.
- Hassan, W. H. B., El Sayed, Z. I., Al-Wahaibi, L. H., Abdel-Aal, M. M., Abdel-Mageed, W. M., Abdelsalam, E., and Abdelaziz, S. 2023. Metabolites Profiling and In Vitro Biological Characterization of Different Fractions of *Cliona* sp. Marine Sponge from the Red Sea Egypt. *Molecules*. 28(4): 1–27. <https://doi.org/10.3390/molecules28041643>.
- Hermawan Pradekso, R., Ayuningrum, D., dan Wahyu Purnomo, P. 2025. Analisis Tutupan Tunicata (Kelas: *Ascidacea*) Di Kawasan Taman Nasional Kepulauan Seribu Dengan Menggunakan *Coral Point Count* with *Excel extensions (CPCe)*. *Journal of Maquares*. 12(2): 95–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.14710/marj.v12i2.50508>.
- Hersila, N., Chatri, M., Vauzia, dan Irdawati. 2023. Senyawa Metabolit Sekunder (Tanin) pada Tanaman sebagai Antifungi. *Jurnal Embrio*. 15(1): 16–22. <https://doi.org/https://doi.org/1031317/embrio>.

- Ibrahim, S. R. M., and Mohamed, G. A. 2017. Ingenine E, a new cytotoxic  $\beta$ -carboline alkaloid from the Indonesian sponge *Acanthostrongylophora ingens*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 19(5): 504–509. <https://doi.org/10.1080/10286020.2016.1213723>.
- International Organization for Standardization. 2009. ISO 10993-5:2009. Biological Evaluation of Medical Devices. Diakses pada 03 Maret 2026 dari <https://www.iso.org/standard/36406.html>.
- Ito, T., Nguyen, H. M., Win, N. N., Vo, H. Q., Nguyen, H. T., and Morita, H. 2018. Three New Sesquiterpene Aminoquinones from a Vietnamese *Spongia* sp. and their Biological Activities. *Journal of Natural Medicines*. 72(1): 298–303. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1130-5>.
- Javaid, R., Khan, A. A., Leghari, Q. ain, Tasleem, F., Khan, M., Nazir, A., Haider, S., and Khan, A. H. 2025. Extraction and Characterization of Alkaloids from Traditional Medical Herbs for Anticancer Application. *Journal of Medical & Health Sciences Review*. 2(3): 4620–4644. <https://doi.org/https://doi.org/10.62019/bva3he95>.
- Jenie, U. A., Kardono, L. B. S., Rumampuk, R. J., dan Darmawan, A. 2014. *Teknik Modern Spektroskopi NMR: Teori dan Aplikasi dalam Elusidasi Struktur Molekul Organik*. LIPI Press. Jakarta. 1-263.
- Jomori, T., Setiawan, A., Sasaoka, M., and Arai, M. 2019. Cytotoxicity of new diterpene alkaloids, ceylonamides G-I, isolated from Indonesian marine sponge of *Spongia* sp. *Natural Product Communications*. 14(6). 1–7. <https://doi.org/10.1177/1934578X19857294>.
- Jug, U., Naumoska, K., Metličar, V., Schink, A., Makuc, D., Vovk, I., Plavec, J., and Lucas, K. 2020. Interference of Oleamide with Analytical and Bioassay Results. *Scientific Reports*. 10(1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59093-1>.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., and Capanoglu, E. 2020. Guidelines for Cell Viability Assays. *Food Frontiers*. 1(3). 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>.
- Karauwan, M. A. J., and Gumolili, Y. J. H. 2023. Identification of the Condition of the Shipwreck as a Diving Tourism Object in the Waters of “Tawara” Bunaken National Park, North Sulawesi Province. *Jurnal Ilmiah Platax*. 11(2): 702–709. <https://doi.org/10.35800/jip.v10i2.52089>.
- Kumalasari, E., Septia, A., Febrianti, D. R., dan Aisyah, N. 2023. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol dan Fraksi Etanol, Fraksi Kloroform, Fraksi n-Heksana, Fraksi Air, serta Fraksi Etil Asetat dari Daun Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.). *Jurnal Ilmiah Manuntung: Sains Farmasi Dan Kesehatan*. 9(2). 173–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.51352/jim.v9i2.678>.

- Li, Q., and Xiang, J. 2025. Applications of High-Field Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in Chemical Research. *Journal of Magnetic Resonance Open*. 23(100199): 2666–4410. <https://doi.org/10.1016/j.jmro.2025.100199>.
- Losung, G., Losung, F., Lintang, R. A. J., Tilaar, S. O., Wullur, S., dan Manoppo, H. 2022. Aktivitas Antibakteri dari Spons Asal Perairan Pulau Bantong, Bolaang Mongondow Timur. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*. 10(1): 81–88. <https://doi.org/10.35800/jplt.10.1.2022.55003>.
- Lukowiak, M., Van Soest, R., Klautau, M., Pérez, T., Pisera, A., and Tabachnick, K. 2022. The Terminology of Sponge Spicules. *Journal of Morphology*. 283(12): 1517–1545. <https://doi.org/10.1002/jmor.21520>.
- Lumempow, F. Y., Yudistira, A., dan Suoth, E. J. 2023. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Spons *Stylissa carteri* yang Diperoleh dari Pulau Manado Tua. *Pharmacy Medical Journal*. 6(1): 1-7. <https://doi.org/10.35799/pmj.v6i1.43086>.
- Maharani, S. 2012. *KANKER: Mengenal 13 Jenis Kanker dan Pengobatannya*. Katahati. Sleman. 1-188.
- Mahbub, K., Rusmalina, S., Indriono, A., Mahfur, M., Julian, R. A., Maulidya, D. A., Dika, I. V., and Rohmaniah, S. A. 2025. Toxicity and Apoptosis Test of 96 % Ethanol Extract of *Agelas cavernosa* on Vero Cells. *Jurnal Biologi Tropis*. 25(1): 190–198. <https://doi.org/10.29303/jbt.v25i1.8262>.
- Mahdavijalal, M., Petio, C., Staffilano, G., Mandrioli, R., and Protti, M. 2024. Innovative Solid-Phase Extraction Strategies for Improving the Advanced Chromatographic Determination of Drugs in Challenging Biological Samples. *Molecules*. 29(2278): 1–28. <https://doi.org/10.3390/molecules29102278>.
- Maisaroh, D. S., Sa'adah, N., dan Sakhi, H. A. 2024. Eksplorasi Agen Antibakteri Ekstrak Spons Laut yang Diambil dari Perairan Sekitar PLTU Paiton, Probolinggo. *Jurnal Perikanan Unram*. 14(1): 10–19. <https://doi.org/10.29303/jp.v14i1.677>.
- Malakpour-Permlid, A., Rodriguez, M. M., Zór, K., Boisen, A., and Oredsson, S. 2025. Advancing Humanized 3D Tumor Modeling Using an Open-Access Xeno-Free Medium. *Frontiers in Toxicology*. 7(15): 1–15. <https://doi.org/10.3389/ftox.2025.1529360>.
- Manconi, R., and Pronzato, R. 2016. *Phylum Porifera, Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates: Keys to Nearctic Fauna*. Elsevier. Amsterdam. 39–83.
- Marzuki, I. 2018. *Eksplorasi Spons Indonesia: Seputar Kepulauan Spermonde*. Nas Media Pustaka. Makassar. 1-236.

- Muljadi, M., Cheng, C. M., and Shen, C. J. 2022. Development of a Tetrazolium-Derived Paper-Based Diagnostic Device as an Early, Alternative Bacteria Screening Tool. *Micromachines*. 13(1): 1–12. <https://doi.org/10.3390/mi13010044>.
- Muna, L. N., dan Maulidina, F. 2022. Penghambatan Proliferasi Sel Kanker Payudara T47D oleh Ekstrak Air Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dan *Doxorubicin* dengan Metode MTT Assay. *Jurnal Farmasi Sains Dan Terapan*. 9(2): 99–104. <https://doi.org/10.33508/jfst.v9i2.4361>.
- Murai, K., Morishita, M., Nakatani, R., Kubo, O., Fujioka, H., and Kita, Y. 2007. Concise Total Synthesis of (-)-Spongotone A. *Journal of Organic Chemistry*. 72(23). 8947–8949. <https://doi.org/10.1021/jo701668s>.
- Musdalipah. 2023. Eksplorasi Keanekaragaman Spons Asal Wilayah Pesisir Sulawesi Tenggara sebagai Bahan Baku Obat. *Warta Farmasi*. 2(11): 1–8. <https://doi.org/10.46356/wfarmasi.v8i1>.
- Narsa, A. C., Salman, A. A., dan Prabowo, W. C. 2022. Identifikasi Metabolit Sekunder dan Profil Farmakognosi Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L) Sebagai Bahan Baku Farmasi Terbaru. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*. 4(6): 645–653. <https://doi.org/10.25026/jsk.v4i6.1551>.
- Nascimento, E., Cavalcanti, T., and Pinheiro, U. 2019. A New Species of *Acanthella Schmidt*, 1862 (Porifera, Demospongiae, Dictyonellidae) from Northeast Region, Brazil. *Zootaxa*. 4552(2): 291–295. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4555.2.12>
- National Cancer Institute Standard Anticancer Agents. 2026. NCI 2021. Dataset of the NCI Standard Anticancer Agents. Diakses pada 03 Maret 2026 dari <https://datarepository.wolframcloud.com/resources/NCI-Standard-Anticancer-Agents/>.
- Nguyen, H. M., Ito, T., Win, N. N., Vo, H. Q., Nguyen, H. T., and Morita, H. 2018. A New Sterol from the Vietnamese Marine Sponge *Xestospongia testudinaria* and Its Biological Activities. *Natural Product Research*. 33(8): 1175–1181. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1465057>.
- Nitty, A. R., dan Hafiludin, H. 2025. Total Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol *Gracilaria* sp. Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom. *Journal of Marine Research*. 14(1): 18–30. <https://doi.org/10.14710/jmr.v14i1.46338>.
- Nugroho, A. 2017. *Buku Ajar: Teknologi Bahan Alam* (Pertama). Lambung Mangkurat University Press. Banjarmasin. 1-168.
- Nur Rafida Akub, Nurhayati Bialangi, Weny J.A Musa, Yuszda K. Salimi, Wiwin Rewini Kunusa, dan Ahmad Kadir Kilo. 2025. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Daun Pletekan (*Reullia tuberosa* L.). *Pentagon: Jurnal Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam*. 3(1): 28–37. <https://doi.org/10.62383/pentagon.v3i1.392>.

- Nurani, L. H., Edityaningrum, C. A., Guntarti, A., dan Zainab. 2014. *Teknik Ekstraksi dan Analisis Kimia Tumbuhan Obat* (Pertama). UAD Press. Yogyakarta. 1-126.
- Nurdiani, E., Masriani, Rasmawan, R., Muharini, R., dan Sartika, R. P. 2023. Sitotoksisitas dan Selektivitas Fraksi Kayu Batang Simpup Air (*Dillenia suffruticosa* (Griff.) Martelli) Terhadap Sel Kanker Payudara. *Al-Kauniah: Jurnal Biologi*. 17(1): 190–200.  
<https://doi.org/10.15408/kauniah.v17i1.31299>.
- Nurfadilah, N. D., Bulan, D. E., R, M. S., dan Anwar, L. 2023. Identifikasi Jenis Sponge di Perairan Pulau Panjang Kota Bontang, Kalimantan Timur. *Jurnal Laot Ilmu Kelautan*. 5(1): 1-10. <https://doi.org/10.35308/jlik.v5i1.7113>.
- Okaiyeto, K., Kerebba, N., Rautenbach, F., Kumar Singh, S., Dua, K., and Oguntibeju, O. O. 2023. UPLC-ESI-QTOF-MS Phenolic Compounds Identification and Quantification from Ethanolic Extract of *Myrtus communis* ‘Variegatha’: In Vitro Antioxidant and Antidiabetic Potentials. *Arabian Journal of Chemistry*. 16(2): 1–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104447>.
- Orhan, I., Şener, B., Kaiser, M., Brun, R., and Tasdemir, D. 2010. Inhibitory Activity of Marine Sponge-Derived Natural Products Against Parasitic Protozoa. *Marine Drugs*. 8(1): 47–58. <https://doi.org/10.3390/md801004>.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., and Kriz, G. S. 2021. *Introduction to Spectroscopy*, Brooks/Cole Cengage Learning (4th Edition). Brooks/Cole Cengage Learning. Belmont. 102-680.
- Petiti, J., Caria, S., Revel, L., Pegoraro, M., and Divieto, C. 2024. Standardized Protocol for Resazurin-Based Viability Assays on A549 Cell Line for Improving Cytotoxicity Data Reliability. *Cells*. 13(1959): 1–12.  
<https://doi.org/10.3390/cells13231959>.
- Piao, S. J., Zhang, H. J., Lu, H. Y., Yang, F., Jiao, W. H., Yi, Y. H., Chen, W. S., and Lin, H. W. 2011. Hippolides A-H, Acyclic Manoalide Derivatives from the Marine Sponge *Hippospongia lachne*. *Journal of Natural Products*. 74(5): 1248–1254. <https://doi.org/10.1021/np200227s>.
- Pronzato, R., Dorcier, M., Sidri, M., and Manconi, R. 2003. Morphotypes of *Spongia officinalis* (*Demospongiae*, *Dictyoceratida*) in two Mediterranean populations. *Italian Journal of Zoology*. 70(4): 327–332.  
<https://doi.org/10.1080/11250000309356538>.
- Pummarin, S., Madared, N., Kayem, S., Orzechowski, S., Teesalu, T., Moya, S., and Boonla, C. 2024. Different Doxorubicin Sensitivity Across Various Human Cancer Cell Lines. *Trends in Sciences*. 21(12): 1–12.  
<https://doi.org/10.48048/tis.2024.8566>.

- Ragini, K., Fromont, J., Piggott, A. M., and Karuso, P. 2017. Enantiodivergence in the Biosynthesis of Bromotyrosine Alkaloids from Sponges? *Journal of Natural Products*. 80(1): 215–219.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01038>.
- Rahayu, W. S., Utami, P. I., dan Haryadin, F. 2020. Analisis Asam Amino dengan Metode KCKT dan Agen Penderivat Ninhidrin. *Pengembangan Sumber Daya Menuju Masyarakat Madani Berkearifan Lokal*. 154–157.
- Reich, M., and Labes, A. 2017. How to Boost Marine Fungal Research: A First Step Towards a Multidisciplinary Approach by Combining Molecular Fungal ecology and Natural Products Chemistry. *Marine Genomics*. 36(13): 57–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2017.09.007>.
- Riesgo, A., Cavalcanti, F. F., Kenny, N. J., Rios, P., Cristobo, J., and Lanna, E. 2018. Integrative Systematics of Clathrinid Sponges: Morphological, Reproductive and Phylogenetic Characterisation of A New Species of *Leucetta* from Antarctica (Porifera, *Calcarea*, *Calcinea*) With Notes on the Occurrence of Flagellated Sperm. *Invertebrate Systematics*. 32(4): 827–841.  
<https://doi.org/10.1071/IS17033>.
- Rollando, Monica, E., dan Afthoni, H. M. 2022. *Desain Uji Senyawa Aktif Bahan Alam*. CV. Seribu Bintang. Malang. 1-13.
- Rowe, F. W. E., and Doty, J. E. 1977. The Shallow-Water Holothurians of Guam. *Micronesica*. 13(2): 217-250.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.24198/IJBP.V311.39865>.
- Rozanah, A., Febrianingsih, R. I., Larasati, A. O., and Hadisaputri, Y. E. 2023. Literarute Review: Cultivation Method Optimization of *Demospongiae* Sponge and its Symbiont Bacteria. *Indonesian Journal of Biological Pharmacy*. 3(1): 33–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.24198/IJBP.V311.39865>.
- Rusli, H., Putri, R. M., and Alni, A. 2022. Recent Developments of Liquid Chromatography Stationary Phases for Compound Separation: From Proteins to Small Organic Compounds. *Molecules*. 27(3): 1-20.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27030907>.
- Rützler, K., Piantoni, C., Van Soest, R. W. M., and Díaz, M. C. 2014. Diversity of Sponges (Porifera) from Cryptic Habitats on the Belize Barrier Reef near Carrie Bow Cay. *Zootaxa*. 3805(1): 1–129.  
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3805.1.1>.
- Salamah, N., dan Guntarti, A. 2023. *Analisis Instrumen: Kromatografi dan Elektroforesis (Pertama)*. UAD Press. Yogyakarta. 1-136.
- Sánchez-Díez, M., Romero-Jiménez, P., Alegría-Aravena, N., Gavira-O'Neill, C. E., Vicente-García, E., Quiroz-Troncoso, J., González-Martos, R., Ramírez-Castillejo, C., and Pastor, J. M. 2025. Assessment of Cell Viability in Drug Therapy: IC50 and Other New Time-Independent Indices for Evaluating Chemotherapy Efficacy. *Pharmaceutics*. 17(2): 1-22.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17020247>.

- Sayori, N., Tururaja, T. S., dan Kolibongso, D. 2022. Komunitas Spons (Porifera) pada Ekosistem Terumbu Karang di Manokwari, Indonesia. *Jurnal Kelautan Tropis*. 25(3): 400–410. <https://doi.org/10.14710/jkt.v25i3.14098>.
- Setiawan, A., dan Hendri, J. 2022. *Senyawa Bioaktif Spons: Struktur dan Bioaktivitas*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Bandar Lampung. 1–84
- Setiawan, A., Setiawan, F., Susanti, S., Setiawan, W. A., Ahmadi, P., Pangestu, R., Hendri, J., and Juliasih, N. L. G. R. 2025. Chemical Profile of The Ethyl Acetate Extract of *Aspergillus sydowi*, 22-PLP1-F1, as Antibacterial Agent Against Clinically Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Multidisciplinary Applied Natural Science*. 5(1): 184–199. <https://doi.org/10.47352/jmans.2774-3047.238>.
- Setiawan, E., Relex, D., and Marshall, D. J. 2021. Shallow-water Sponges from a High-Sedimentation Estuarine Bay (Brunei, Northwest Borneo, Southeast Asia). *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*. 6(3): 1–17. <https://doi.org/10.22146/JTBB.66435>.
- Shafeian, E., Mostafavi, G. P., Farimani, M. M., Moradi, M. A., and Nazemi, M. 2022. Extraction and Investigation of Biological Activities of Dioctyl Phthalate and Dibutyl Phthalate from Marine Sponge *Haliclona (Soestella) caerulea* Larak Island, Persian Gulf. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 21(5): 1141–1155. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2022.127710>.
- Souren, N. Y., Fusenig, N. E., Heck, S., Dirks, W. G., Capes-Davis, A., Bianchini, F., and Plass, C. 2022. Cell Line Authentication: A Necessity for Reproducible Biomedical Research. *The EMBO Journal*. 41(14): 1–9. <https://doi.org/10.15252/emboj.2022111307>.
- Staszków, A., Swarczewicz, B., Banasiak, J., Muth, D., Jasiński, M., and Stobiecki, M. 2011. LC/MS Profiling of Flavonoid Glycoconjugates Isolated from Hairy Roots, Suspension Root Cell Cultures and Seedling Roots of *Medicago truncatula*. *Metabolomics*. 7(4): 604–613. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0287-2>.
- Steffen, K., Proux-Wéra, E., Soler, L., Churcher, A., Sundh, J., and Cárdenas, P. 2023. Whole Genome Sequence of the Deep-Sea Sponge *Geodia barretti* (Metazoa, Porifera, *Demospongiae*). *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 13(10): 1–9. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad192>.
- Suhaenah, A., Pratama, M., dan Amir, A. H. W. 2021. Penetapan Kadar Flavonoid Fraksi Etil Asetat Daun Karet Kebo (*Ficus elastica*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *As-Syifaa Jurnal Farmasi*. 13(1): 48–54. <https://doi.org/10.33096/jifa.v13i1.761>.
- Susilowati, R. A., Sunarni, T., dan Indrayati, A. 2025. Uji Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Daun Dollu (*Dodonaea viscosa Jacq.*) terhadap Sel Kanker Payudara T47D serta Ekspresi Protein p53 dan Bcl-2. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia (JMPI)*. 11(2): 634–647. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v11i2.837>.

- Tan, L. T., and Salleh, N. F. 2024. Marine Cyanobacteria: A Rich Source of Structurally Unique Anti-Infectives for Drug Development. *Molecules*. 29(22): 1–60. <https://doi.org/10.3390/molecules29225307>.
- Walid, M., Nila Oktaviani, Julian, R. A., Rohmah, S. A., Achada, D., Dika, I. V., and Mahfur, M. 2024. Anti-Inflammatory Activity Assay of Ethanol Extract of *Agelas cavernosa* Sponge using Protein Denaturation Method. *Jurnal Biologi Tropis*. 24(4): 452–458. <https://doi.org/10.29303/jbt.v24i4.7661>.
- Yarnold, J. E., Hamilton, B. R., Welsh, D. T., Pool, G. F., Venter, D. J., and Carroll, A. R. 2012. High Resolution Spatial Mapping of Brominated Pyrrole-2-aminoimidazole Alkaloids Distributions in the Marine Sponge *Stylissa flabellata* via MALDI-Mass Spectrometry Imaging. *Molecular BioSystems*. 8(9): 2249–2259. <https://doi.org/10.1039/c2mb25152c>.
- Yuliani, E., Kurnia, D., dan Nurrahmi, F. 2022. Karakteristik dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) pada Berbagai Jenis Pelarut. *Jurnal Analis Kimia-STABA*. 06(01): 13–18. <https://jurnal.staba.ac.id/JAK/article/view/148/46>.
- Zafar, A., Khatoon, S., Khan, M. J., Abu, J., and Naeem, A. 2025. Advancements and Limitations in Traditional Anti-Cancer Therapies: A Comprehensive Review of Surgery, Chemotherapy, Radiation Therapy, and Hormonal Therapy. *Discover Oncology*. 16(607): 1–20. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-02198-8>.
- Zare, A., Afshar, A., Mussin, N. M., Kaliyev, A. A., Aringazina, R. A., Tanideh, N., Mahdipour, M., Rahmanifar, F., Zhussupova, Z., Baizakov, B. T., and Tamadon, A. 2025. Uncovering Novel Anti-Lung Cancer Compounds: Insights from Marine Sponge-Derived Agents: A Bibliometric Review. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 50(5): 278–303. <https://doi.org/10.30476/ijms.2024.103270.3646>.
- Zhou, C., Xie, Z., Lei, Z., Huang, Y., and Wei, G. 2018. Simultaneous Identification and Determination of Flavonoids in *Dendrobium officinale*. *Chemistry Central Journal*. 12(1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0403-8>.
- Zhou, M., Peng, B. R., Tian, W., Su, J. H., Wang, G., Lin, T., Zeng, D., Sheu, J. H., and Chen, H. 2020. 12-Deacetyl-12-epi-Scalaradial, a Scalarane Sesterterpenoid from a Marine Sponge *Hippospongia* sp., Induces Hela Cells Apoptosis via MAPK/ERK Pathway and Modulates Nuclear Receptor Nur77. *Marine Drugs*. 18(7): 1–13. <https://doi.org/10.3390/MD18070375>.