

**BIOAKTIVITAS SENYAWA AAPTAMINE PADA SPONS *Aaptos* sp.
SBM-066 DARI TAMAN NASIONAL BUNAKEN, MANADO**

(Tesis)

Oleh

ANNISA ELCENTIA FAJARWATI

NPM 2127011009



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

BIOAKTIVITAS SENYAWA AAPTAMINE PADA SPONS *Aaptos* sp. SBM-066 DARI TAMAN NASIONAL BUNAKEN, MANADO

Oleh

ANNISA ELCENTIA FAJARWATI

Senyawa bioaktif yang berasal dari spons merupakan salah satu sumber potensial dalam perkembangan industri farmasi yang berkelanjutan. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan senyawa dari spons yang memiliki bioaktivitas antikanker tanpa merusak sel normal serta memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri patogen klinis yang resisten. Spons *Aaptos* sp. (SBM-066) berasal dari deposit Laboratorium Genomik, BRIN Cibinong, Bogor. Identifikasi spikula spons dilakukan menggunakan mikroskop dan ekstraksi senyawa menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak kasar dipartisi ke dalam fraksi air dan etil asetat. Penelitian ini secara khusus memfokuskan pada fraksi air (SBM-066-2) untuk analisis lebih lanjut. Fraksi SBM-066-2 diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Uji bioaktivitas antikanker dilakukan menggunakan metode mikrotetrazolium (MTT) terhadap sel kanker kolorektal (Caco-2 dan DLD-1) serta sel normal (HEK293), sedangkan uji antibakteri menggunakan metode KLT bioautografi terhadap bakteri patogen klinis *Staphylococcus aureus* yang resisten. Senyawa aktif dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dan dikarakterisasi dengan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) serta $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ (NMR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa SBM-066-2 memiliki aktivitas sitotoksik sedang sebagai antikanker terhadap sel kanker kolorektal Caco-2 dan DLD-1, tetapi tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel normal HEK293, serta mampu bersifat sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen klinis *S. aureus* yang resisten. Hasil karakterisasi senyawa menggunakan LC-MS/MS dan $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan bahwa senyawa teridentifikasi sebagai aaptamine.

Kata kunci : *Aaptos* sp., bakteri klinis *Staphylococcus aureus* resisten, Caco-2, DLD-1, HEK293, aaptamine.

ABSTRACT

THE BIOACTIVITY OF AAPTAMINE COMPOUND IN THE SPONGE *Aptos* sp. SBM-066 FROM BUNAKEN NATIONAL PARK, MANADO

By

ANNISA ELCENTIA FAJARWATI

Bioactive compound derived from the sponge is one of the potential source for sustainable pharmaceutical industry development. This study aims to discover compounds from sponge with anticancer bioactivity without damaging normal cells, as well as possessing antibacterial properties against resistant clinical pathogenic bacteria. *Aptos* sp. (SBM-066) was collected from the deposit at Genomics Laboratory, BRIN Cibinong, Bogor. Sponge spicules were identified using microscopy and the extraction was conducted using the maceration method with a methanol solvent. The crude extract was partitioned into water and ethyl acetate fractions. This study specifically focused on the water fraction (SBM-066-2) for further analysis. SBM-066-2 was identified using thin-layer chromatography (TLC). The anticancer bioactivity assay was conducted using the microtetrazolium (MTT) method against colorectal cancer cells (Caco-2 and DLD-1) as well as normal cells (HEK293), while the antibacterial assay used the TLC bioautography method against resistant clinical pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*. The active compound was purified using column chromatography and characterized using *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) and $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ (NMR). The results showed that SBM-066-2 had moderate cytotoxic activity as an anticancer agent against colorectal cancer cells Caco-2 and DLD-1, but did not display cytotoxic activity against normal cells HEK293. Additionally, the fraction demonstrated antibacterial potential against resistant clinical pathogenic bacteria *S. aureus*. The characterization through LC-MS/MS and $^1\text{H-NMR}$ revealed that the identified compound was aaptamine.

Keywords: *Aptos* sp., clinical-resistant *Staphylococcus aureus* resistant, Caco-2, DLD-1, HEK293, aaptamine.

**BIOAKTIVITAS SENYAWA AAPTAMINE PADA SPONS *Aaptos* sp.
SBM-066 DARI TAMAN NASIONAL BUNAKEN, MANADO**

**Oleh
ANNISA ELCENTIA FAJARWATI**

Tesis

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

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul Tesis : **BIOAKTIVITAS SENYAWA AAPTAMINE
PADA SPONS *Aptos* sp. SBM-066 DARI
TAMAN NASIONAL BUNAKEN, MANADO**

Nama Mahasiswa : **Annisa Elcentia Fajarwati**

Nomor Pokok Mahasiswa : 2127011009

Program Studi : Magister Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam


MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


Prof. Andi Setiawan, Ph.D.
NIP. 195809221988111001


Peni Ahmadi, Ph.D.
NIP. 198805052020122011

2. Ketua Prodi Studi Magister Kimia


Dr. Nurhasanah, M.Si.
NIP 197412111998022001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

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

Penguji Bukan Pembimbing

Anggota : **Prof. John Hendri, M.S**

Anggota : **Dr. Eng. Ni Luh Gede R. Juliasih, M.Si**

Anggota : **Dr. Nurhasanah, M.Si**

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.
NIP 19710012005011002

3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. H. Burhadi, M.Si.
NIP 196403261898021001

Tanggalulus Ujian Tesis: **08 September 2023**

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN TESIS**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Annisa Elcentia Fajarwati
Nomor Pokok Mahasiswa : 2127011009
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tesis yang berjudul "**Bioaktivitas Senyawa Aaptamine pada Spons *Aaptos* sp. SBM-066 dari Taman Nasional Bunaken**" adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam tesis tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan saya buat dengan sadar dan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana semestinya.

Bandar Lampung, 5 Oktober 2023
Yang Menyatakan,



Annisa Elcentia Fajarwati
NPM 2127011009

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama Annisa Elcentia Fajarwati, dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 25 Mei 1998. Penulis merupakan anak kedua dari pasangan Bapak Susilo Cendrawanto, M.Pd., dan Ibu Dra. Rita Elizabet.

Penulis menyelesaikan pendidikannya di SD Muhammadiyah 1 Bandar Lampung tahun 2010, SMP Negeri 22 Bandar Lampung tahun 2013, dan SMA Al-Kautsar Bandar Lampung tahun 2016. Pada tahun 2016, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung dan menyelesaikannya hingga memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) pada tahun 2021. Penulis melanjutkan studi Magister di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung pada tahun 2021-2023.

Selama studi S2, penulis pernah melakukan berbagai penelitian mengenai antibakteri dan antibiofilm dari ekstrak jamur mangrove namun mengalami kendala sehingga belum bisa dilanjutkan. Penulis kemudian mencoba peruntungan lain dengan menjadi *Research Assistant* pada Kelompok Riset *Cell Biology and Disease Mechanism*, Pusat Riset Vaksin dan Obat, BRIN Cibinong, Bogor dan melakukan riset terkait potensi antikanker dari spons Perairan Indonesia.

“Ada kuasa yang lebih besar dari rencana manusia. Semua tepat sesuai porsinya, semua lewat sesuai mampunya.”
(NKCTHI)

“The bad news is time flies. The good news is you’re the pilot.”
(Michael Altshuler)

“Doamu yang mana, usahamu yang seberapa, kau tak pernah tahu mana yang akan membuahkan hasil. Tugas kita hanya satu untuk keduanya: Perbanyaklah.”
(Anonim)

PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang

Dengan mengucap Alhamdulillahilahirabbil ‘alamin, kupersembahkan karya kecilku ini kepada:

Orangtuaku tercinta

Kepada Papa dan Mama yang selalu mencintai, mendoakan, mendukung, menguatkan, menyemangati, dan percaya kepada anaknya.

Abangku tersayang yang selalu mendukung apa yang telah menjadi pilihan adiknya.

Dengan segala rasa hormat kepada

Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., Ibu Peni Ahmadi, Ph.D, Bapak Prof. Dr. John Hendri, M.S., Ibu Dr. Eng Ni Luh Gede R.J., M.Si, Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si., serta seluruh Dosen Pengajar yang telah membimbing dan memberikan saran yang membangun hingga mencapai gelar Magister.

Sahabat-sahabatku yang telah kebersamai, mendukung, dan memberikan semangat.

Almamater tercinta Universitas Lampung.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah *rabbi 'alamin*. Tiada daya dan upaya melainkan atas kuasa dan izin Allah, sebab hanya dengan kehendak-Nya maka penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Tesis dengan judul **“Bioaktivitas Senyawa Aaptamine pada Spons *Aaptos* sp. SBM-066 dari Taman Nasional Bunaken, Manado”** merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains (M.Si) pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua orangtuaku: Papa Susilo Cendrawanto dan Mama Rita Elizabet atas segala do'a, dukungan, cinta, dan kasih sayang tak terhingga.
2. Abangku tersayang: Yusuf Wilman, Mbak Iparku: Linto Krisna, serta kedua ponakanku: Ammarun Naafian dan Junna Fathussalam, yang telah mendukung, menyemangati, dan mewarnai hari-hariku.
3. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D. selaku Pembimbing I, atas segala ilmu, motivasi, dan kesabaran dalam membimbing sehingga penulis bisa menyelesaikan penelitian dan tesis ini dengan baik.
4. Ibu Peni Ahmadi, Ph.D selaku Pembimbing II, yang telah memberikan kesempatan untuk bergabung dalam proyek riset di Pusat Riset Vaksin dan Obat, BRIN, Cibinong. Terima kasih atas segala bimbingan, masukan, dan dukungannya.
5. Bapak Prof. Dr. John Hendri, M.S., Ibu Dr. Eng Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si, serta Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si., selaku Pembahas yang telah memberikan motivasi, dukungan, serta kritik yang

membangun sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

6. Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si. selaku ketua prodi magister yang telah memberikan arahan dan saran positif selama masa perkuliahan.
7. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu, keteladan, dan semangat kepada penulis selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung.
8. Seluruh staf administrasi Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah membantu dalam menyelesaikan administrasi penulis.
9. Para peneliti di Pusat Riset Vaksin dan Obat BRIN Cibinong, yang telah banyak memberikan bantuan, kritik, saran, dan arahan bagi penulis selama melakukan riset di BRIN Cibinong.
10. Rekan-rekan *Research Assistant* di Pusat Riset Vaksin dan Obat: Tresia, Kak Olga, Felia, Indah, dan Najla, yang telah kebersamai dan membantu selama melakukan riset di Laboratorium Genomik.
11. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam menyelesaikan tesis ini dan mohon maaf apabila tidak bisa disebutkan satu-persatu. Semoga Allah SWT membalas kebaikan kalian, *aamiin*.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan tesis ini masih banyak terdapat kekurangan, namun penulis berharap tesis ini dapat memberikan informasi baru bagi yang membacanya.

Bandar Lampung, Oktober 2023

Penulis,

Annisa Elcentia Fajarwati

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Perairan Laut Indonesia.....	4
2.2 Spons	6
2.3 Klasifikasi Spons	7
2.4 Genus <i>Aaptos</i>	9
2.5 Senyawa Metabolit Sekunder pada Spons.....	10
2.6 Uji Antikanker	11
2.7 Uji Antibakteri.....	13
2.8 Mode Aksi Senyawa Bioaktif.....	13
2.8.1 Antikanker.....	13
2.8.2 Antibakteri	14
2.9 Metode Ekstraksi dan Kromatografi	15
2.9.1 Ekstraksi.....	15
2.9.2 Ekstraksi Cair-cair (Partisi).....	16
2.9.3 Kromatografi.....	17
2.10 Karakterisasi.....	20
2.10.1 <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)</i>	20

2.10.2 <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR).....	26
III. METODE PENELITIAN	30
3.2 Alat dan Bahan	30
3.3 Metode Penelitian.....	31
3.3.1 Biomaterial.....	31
3.3.2 Identifikasi Spikula Spons	31
3.3.3 Ekstraksi Spons	32
3.3.4 Ekstraksi Cair-cair (Partisi).....	32
3.3.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	33
3.3.6 Uji Sitotoksis Antikanker.....	34
3.3.7 Uji Antibakteri	35
3.3.8 Kolom Kromatografi (KK)	36
3.3.9 Karakterisasi Senyawa Bioaktif	36
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1 Identifikasi Spons	40
4.2 Ekstraksi Spons	42
4.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	43
4.4 Aktivitas Sitotoksik Antikanker Metabolit Sekunder dari Spons	45
4.5 Aktivitas Antibakteri Metabolit Sekunder dari Spons.....	47
4.6 Identifikasi Metabolit menggunakan LC-MS/MS.....	49
4.7 Kolom Kromatografi (KK).....	53
4.8 Identifikasi Metabolit menggunakan ¹ H-NMR	54
V. SIMPULAN DAN SARAN	58
5.1 Simpulan.....	58
5.2 Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	68
Lampiran 1. Pembuatan Pereaksi pada KLT.....	69
Lampiran 2. Spektrum ¹ H-NMR SBM-066-2-1.....	70

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data fraksi hasil partisi ekstrak spons SBM-066.	43
2. Nilai IC ₅₀ fraksi SBM-066-2 dan <i>doxorubicin</i> terhadap sel kanker.....	46
3. Identifikasi senyawa pada fraksi SBM-066-2.....	51
4. Data hasil fraksinasi SBM-066-2.....	53
5. Data spektroskopi NMR.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Peta <i>The Coral Triangle</i> (Green <i>et al.</i> , 2011).	4
2. Persentase distribusi senyawa baru dari perairan Indonesia berdasarkan kelas senyawa (Hanif <i>et al.</i> , 2019).	6
3. Organ spons (Yina <i>et al.</i> , 2015).	6
4. Beberapa contoh spikula (a) <i>strongyloxeas/styloids</i> (b) <i>styles/ subtylostyles</i> , (c) ujung <i>styles/subtylostyles</i> yang diperbesar	10
5. Senyawa alkaloid dari Indonesia.....	11
6. Reduksi formazan menjadi formazan MTT (Kumar <i>et al.</i> , 2018).	12
7. Kromatogram ion total dari (a) fraksi n-heksana dan (b) fraksi etil asetat <i>A. suberitoides</i> (Putri <i>et al.</i> , 2023).....	26
8. Struktur dan korelasi HMBC (biru) dan COSY (ungu) dari aaptamine (Luyao <i>et al.</i> , 2021).....	29
9. Diagram alir penelitian.....	39
10. Spons SBM-066	41
11. Bentuk spikula (a) SBM-066 (b) <i>strongyloxeas/styloids</i> (Rützler <i>et al.</i> , 2014).	41
12. Visualisasi KLT dengan fasa diam silika GF ₂₅₄ dan fasa gerak DCM:MeOH (9:1) (a) UV ₂₅₄ (b) Ce(SO ₄) ₂ (c) <i>Dragendorff</i>	44
13. Uji antibakteri (a) referensi KLT (b) zona bening antibakteri	48
14. Kromatogram fraksi air spons <i>Aaptos</i> sp. Ketiga tanda panah menunjukkan keberadaan senyawa aaptamine.....	50
15. Struktur aaptamine	53
16. Struktur aaptamine SBM-066-2-1 (a) warna merah menandakan posisi nomor atom H (b) letak pergeseran kimia dan konstanta kopling.....	56

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bahan alam laut dikenal sebagai sumber baru yang memiliki potensi dalam pengembangan industri farmasi yang berkelanjutan (Hanif *et al.*, 2019). Lingkungan laut merupakan habitat bagi berbagai organisme, seperti ganggang, terumbu karang, spons, dan mikroorganisme (Carroll *et al.*, 2019). Karena adanya persaingan yang tinggi untuk bertahan hidup di lingkungan ekstrem, bahan alam laut menunjukkan struktur kimia dan aktivitas biologis yang berbeda dari lingkungan terestrial. Hal ini ditunjukkan dengan adanya keunikan kerangka, gugus fungsi, dan pusat kiral (Hanif *et al.*, 2019). Meskipun memiliki potensi besar, sebagian besar wilayah laut masih belum dipelajari dengan baik dan banyak dari produk alam laut masih belum dieksplorasi sepenuhnya, sehingga memberikan peluang untuk mendapatkan kebaruan dalam penemuan senyawa bioaktif.

Salah satu sumber bahan laut yang menjadi perhatian adalah spons. Spons telah dikenal sebagai sumber utama senyawa bioaktif (Mehbub *et al.*, 2014). Berbagai senyawa bioaktif telah diisolasi seperti alkaloid, terpenoid, steroid, dan peptida. Diantara senyawa-senyawa tersebut, alkaloid paling banyak ditemukan (Izzati *et al.*, 2021). Manzamin A, turunan β -karbolin alkaloid, adalah alkaloid yang pertama kali diisolasi dari spons laut *Haliclona* sp. pada tahun 1986 (Baldwin and Whitehead, 1992) memiliki berbagai macam bioaktivitas, seperti antibakteri, anti-malaria dan sitotoksik (Varijakzhan *et al.*, 2021). Sagitol C, jenis alkaloid piridoakridin, yang diisolasi dari *Oceaniapia* sp. memiliki aktivitas sitotoksik terhadap garis sel kanker limfoma tikus L5187Y, sel HeLa, dan garis sel *pheochromocytoma* tikus PC12 (Ibrahim *et al.*, 2013). Halicyclamine B, senyawa

dari *Acanthostrongylophora ingens* menunjukkan aktivitas antimikroba yang selektif terhadap *Staphylococcus aureus* (Esposito *et al.*, 2019).

Senyawa alkaloid juga dapat ditemukan pada spons genus *Aaptos* (Izzati *et al.*, 2021). *Aaptos* merupakan jenis spons laut kosmopolitan yang memiliki penyebaran geografis yang luas dan ditemukan pada berbagai wilayah di seluruh dunia, termasuk Indonesia (Arai *et al.*, 2014). Sifat kosmopolitan dari spons ini membuatnya hidup di berbagai habitat laut yang berbeda, termasuk perairan dangkal hingga laut dalam (He *et al.*, 2020). Kendati spons *Aaptos* hidup di berbagai perairan, sebagian besar wilayah di mana spons ini hidup masih belum banyak diteliti dan dieksplorasi dengan baik sehingga potensi keanekaragaman senyawa bioaktif yang terkandung di dalam spons *Aaptos* bisa menjadi sangat menjanjikan.

Penelitian lebih lanjut tentang spons *Aaptos* dapat membuka jalan bagi penemuan senyawa-senyawa baru yang memiliki bioaktivitas yang menarik dan berkontribusi dalam pengembangan obat-obatan baru, terutama dalam industri farmasi (Kurnianda *et al.*, 2022). Investigasi genus *Aaptos* menunjukkan bahwa alkaloid aaptamine adalah kelompok yang sering ditemukan (He *et al.*, 2020). Beberapa kajian mengenai senyawa aaptamine dan turunannya telah dilaporkan. Arai *et al.* (2014) melaporkan 2-methoxy-3-oxoaaptamine yang diisolasi dari spons *Aaptos* sp. Kupang menunjukkan aktivitas anti-mikobakteri terhadap *Mycobacterium smegmatis* dalam kondisi aerobik dan hipoksia dengan nilai MIC 23 μ M. Trang *et al.* (2021) melaporkan 3-(9-methylhexadecyl)oxy)propane-1,2-diol 2,2,3-dihydro-2,3-dioxoaaptamine yang diisolasi dari *A. aaptos* menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap SK-LU-1 (kanker paru-paru), MCF-7 (kanker serviks), HepG2 (kanker liver), dan SK-Mel-2 (kanker melanoma) dengan nilai IC₅₀ masing-masing 41,27 \pm 2,63; 40,70 \pm 2,65; 34,31 \pm 3,43; dan 36,63 \pm 1,40 μ M. Utkina *et al.* (2021) melaporkan senyawa isoaaptamine yang diisolasi dari *A. aaptos* dapat mengurangi ekspresi enzim dalam sel DLD-1 (adenokarsinoma kolorektal manusia) dari 100% ke 64% pada konsentrasi 5 μ M.

Berdasarkan kajian-kajian literatur yang telah disebutkan, penelitian mengenai potensi senyawa bioaktif spons yang selektif sebagai antikanker terhadap sel kanker kolorektal tanpa merusak sel normal, serta aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen klinis yang resisten terhadap banyak obat (MDR) masih belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa bioaktif spons *Aaptos* sp. dan menguji bioaktivitas ekstrak sebagai antikanker terhadap sel kanker kolorektal (Caco-2 dan DLD-1) dan sel normal (HEK293), serta antibakteri terhadap bakteri patogen klinis *Staphylococcus aureus* resisten. Senyawa bioaktif dikarakterisasi menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS) dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR).

1.2 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengisolasi senyawa bioaktif dari spons *Aaptos* sp. deposit Laboratorium Genomik, BRIN Cibinong, Bogor.
2. Mengetahui bioaktivitas antikanker terhadap sel kanker kolorektal (Caco-2, DLD-1) dan sel normal (HEK293), serta antibakteri terhadap bakteri patogen klinis *Staphylococcus aureus* resisten.
3. Mengidentifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan menggunakan metode kromatografi *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS) dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR).

1.3 Manfaat

Adapun manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat dijadikan landasan untuk mempercepat pengembangan obat baru berbasis potensi sumber daya lokal.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perairan Laut Indonesia

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki perairan laut terbesar, mencakup 10,36 juta km² perairan laut dan pesisir serta termasuk ke dalam *The Coral Triangle* yang menjadi pusat keanekaragaman hayati laut di dunia (Cabral *et al.*, 2012). Wilayah Indonesia terdiri dari 34 provinsi dan perairan seluas 5,79 juta km², dimana 62.600 km² merupakan kawasan yang dilindungi sebagai Taman Nasional (Glaser *et al.*, 2010). Peta wilayah yang masuk ke dalam *The Coral Triangle* dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Peta *The Coral Triangle* (Green *et al.*, 2011).

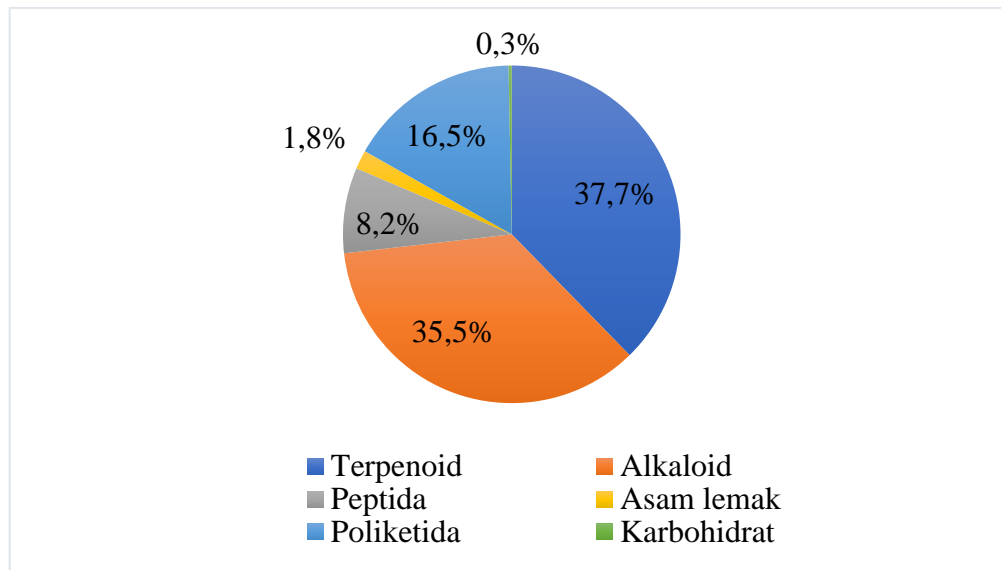
Wilayah geografis yang strategis menawarkan keragaman hayati laut yang sangat tinggi sehingga Indonesia dikenal sebagai *mega-biodiversity* dari organisme laut. Spesies laut menunjang kehidupannya dengan mensintesis metabolit primer dan sekunder. Keadaan lingkungan yang ekstrem menginduksi organisme ini untuk mensintesis beberapa metabolit sekunder dengan sifat kimia yang unik. Metabolit

ini dikenal sebagai mekanisme pertahanan mereka dan juga dilaporkan memiliki beragam aktivitas biologis berperan penting dalam perkembangan penemuan obat (Izzati *et al.*, 2021).

Penelitian mengenai produk yang berasal dari perairan laut Indonesia tahun 1970-an hingga tahun 2017 telah melaporkan sekitar 732 senyawa yang berhasil diisolasi dan sebagian besar diproduksi oleh spons (*Porifera*), tunikata (*Chordata*), dan karang lunak (*Cnidaria*). Sekitar 70% dari total senyawa alam laut baru dihasilkan oleh lima provinsi, meliputi: Sulawesi Utara (33,0%), Sulawesi Selatan (12,7%), Maluku (10,4%), Bali (7,8%), dan Kalimantan Utara (6,6%). Penemuan yang mendominasi di bagian wilayah Timur Indonesia dimungkinkan karena lebih dekatnya dengan wilayah *The Coral Triangle* (Hanif *et al.*, 2019).

Senyawa alam laut Indonesia memiliki keanekaragaman struktur meliputi keunikan kerangka dasar, gugus fungsi, dan pusat kiral. Kajian literatur dari 1970 hingga 2017 melaporkan bahwa telah berhasil diisolasi beragam struktur dari senyawa alam laut Indonesia meliputi 276 terpenoid (37,7%), 260 alkaloid (35,5%), 60 peptida (8,2%), 13 asam lemak dan molekul linier (1,8%), 121 poliketida (16,5%), dan 2 karbohidrat (0,3%) (**Gambar 2**). Diantara berbagai jenis struktur yang ditemukan, terdapat lima jenis kelompok terbesar, meliputi: alkaloid piperidin (48 senyawa), alkaloid tirosin (38 senyawa), alkaloid indol (37 senyawa), poliketida aromatik (34 senyawa), dan kuinon (33 senyawa) (Hanif *et al.*, 2019).

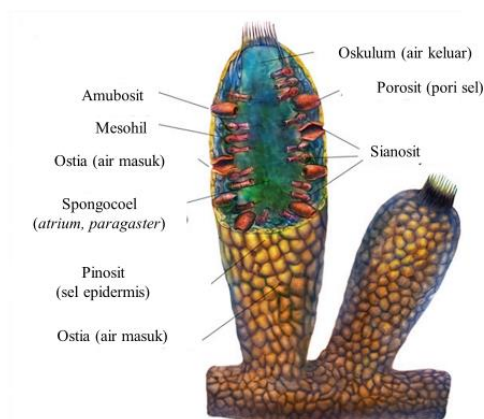
Namun, meskipun sumber daya laut Indonesia memiliki keanekaragaman yang melimpah, pemanfaatannya masih belum optimal. Oleh sebab itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengamati potensi biota laut untuk pengembangan dalam bidang kimia atau farmasi.



Gambar 2. Persentase distribusi senyawa baru dari perairan Indonesia berdasarkan kelas senyawa (Hanif *et al.*, 2019).

2.2 Spons

Spons laut (**Gambar 3**) adalah organisme invertebrata yang terdiri dari lapisan seperti jeli di antara dua lapisan tipis sel dan memiliki kerangka spikula yang terbuat dari silika, kalsium karbonat, dan protein (spongin) (Varijakzhan *et al.*, 2021). Spons laut dikenal sebagai pengumpan filter (*filter feeders*) yang sangat baik dimana air di sekitarnya ditarik ke dalam spons melalui pori-pori kecil yang dikenal sebagai ostia, dan air dikeluarkan melalui lubang yang lebih besar yang dikenal sebagai oskulum (Hentschel *et al.*, 2012).



Gambar 3. Organ spons (Yina *et al.*, 2015).

Terdapat sel-sel spesifik dalam spons laut yang menjalankan fungsi tertentu. Sel-sel berflagela (sianosit) memungkinkan pergerakan air ke satu arah melalui koordinasi flagela. Materi partikulat yang ada di dalam air ditelan oleh amubosit. Sedangkan, mikroorganisme yang melewati ostia tetap berada di mesohil, yang merupakan bagian dalam dari jaringan, sehingga membentuk interaksi simbiosis dengan spons. Simbiosis terdiri dari bakteri, *archaea*, eukariota atau organisme yang lebih besar (Varijakzhan *et al.*, 2021).

Spons laut tidak memiliki pelindung seperti cangkang dan duri sehingga ia mengatasi potensi bahaya dengan menghasilkan senyawa bioaktif. Sintesis metabolit sekunder pada spons tergantung pada berbagai faktor stres, seperti predator, pertumbuhan berlebih dari organisme *fouling*, dan kompetisi dengan organisme lain. Metabolit sekunder ini secara kimiawi memiliki struktur yang beragam dan ada berbagai faktor yang mempengaruhi senyawa dapat diekstraksi dari spons laut, seperti pelarut, polaritas, suhu dan tekanan (Varijakzhan *et al.*, 2021).

2.3 Klasifikasi Spons

Secara umum, spons termasuk filum *Porifera* yang dibagi dalam 3 kelas, meliputi *Calcarea*, *Hexactinellida*, dan *Demospongia*. Adapun ciri-cirinya adalah sebagai berikut.

Calcarea merupakan kelas spons yang terdiri dari kalsium karbonat dan tidak mengandung spongin. Mayoritas spons dari kelas ini memiliki bentuk kecil dan berwarna putih keabu-abuan, meskipun ada beberapa jenis yang berwarna kuning, pink, atau hijau. Kerangka dari kelas *Calcarea* memiliki bentuk spikula triakson dan tidak ada perbedaan antara megasklera dan mikrosklera. Jumlah spons dari kelas *Calcarea* cukup sedikit, hanya sekitar 10% dari total jumlah spons yang hidup di laut (Amir dan Budiyanto, 1996). Salah satu jenis spons yang termasuk ke dalam kelas ini adalah *Leucetta chagosensis* (Sun *et al.*, 2020).

Hexactinellida merupakan kelas spons yang sering dikenal sebagai spons gelas. Strukturnya terdiri dari spikula yang terbuat dari silikat dan tidak mengandung spongin. Spikula ini memiliki bentuk bidang triakson, dimana setiap bidang memiliki dua jari-jari (*Hexactinal*). Spons dari kelas ini umumnya hanya ada di perairan laut yang dalam, yaitu di bawah kedalaman 500 meter (Amir dan Budiyanto, 1996). Beberapa jenis spons dalam kelas ini meliputi: *Conorete pourtalesi* sp. nov, *Verrucocoeloida liberatorii* sp. nov, dan *Dictyoplax lecus* sp. nov (Reiswig and Dohrmann, 2014).

Demospongiae merupakan jenis kelas spons yang paling banyak dijumpai di dunia. Spons dari kelas ini tidak memiliki spikula dengan bentuk triakson seperti yang ditemukan pada kelas *Hexactinellidae* namun memiliki bentuk monoakson atau tetraakson yang terbuat dari silikat. Beberapa jenis spons dalam kelas ini bahkan tidak memiliki spikula sama sekali, melainkan hanya mengandung serat-serat kolagen atau spongin saja. *Demospongiae* memiliki sejumlah senyawa khusus yang aktif secara biologis dengan berbagai aplikasi. Diantaranya, Gukulenin A dari spons *Phorbas gukhulensis* yang memiliki sifat sitotoksik pada garis sel karsinoma ovarium A2780 pada konsentrasi 5 μ M, Manzamenones M dari spons *Plakortis* dengan sifat antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (MIC = 16,0 μ g / mL), topsentin dan bromotopsentin dari genus *Spongosorites* sebagai agen antivirus terhadap virus Herpes simpleks 1 (HSV-1), virus stomatitis vesikular (VSV), dan virus Corona A-59, serta Kalihinenes X dari *Acanthella cavernosa* yang memiliki sifat *antifouling* terhadap *Balanus amphitrite* dengan nilai EC₅₀ 0,49 μ g/mL (Esposito *et al.*, 2022).

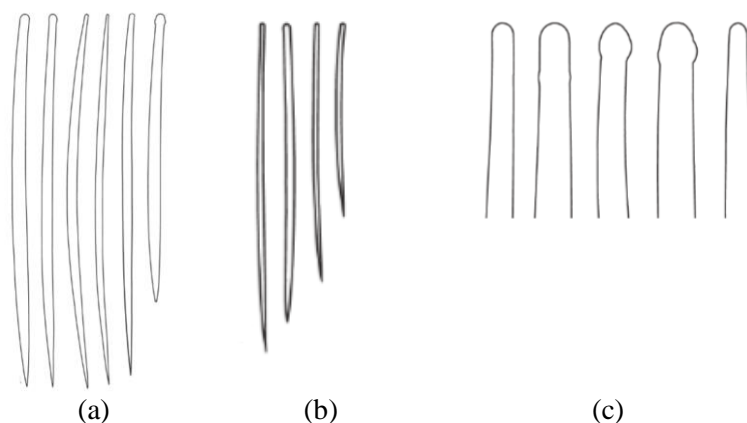
Spons *Aaptos* juga merupakan salah satu kelas spons *Demospongiae* yang sering banyak ditemukan (Mohamad *et al.*, 2017). *Aaptos* tersebar luas di ekosistem laut, termasuk Laut Cina Selatan, Jepang, Indonesia, serta Karibia. Spesies *Aaptos* telah banyak dieksplorasi dan ditemukan sebagian besar mengandung gugus 1H-benzo[d,e][1,6]-naphthyridine alkaloid atau biasa dikenal dengan aaptamine. Aaptamine memiliki berbagai variasi aktivitas farmakologis. Diantaranya, demethyloxyaaptamine menunjukkan sitotoksitas terhadap sel HeLa dengan dosis

efektif 50 (ED₅₀) sebesar 0,87 µg/mL, isoaaptamine sebagai senyawa yang dapat mengobati infeksi *S. aureus* melalui penghambatan aktivitas sortase A.2, serta methylenedioxyaaptamine yang dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik moderat terhadap sel T leukemia dewasa dengan IC₅₀ sebesar 0,29 µM (He *et al.*, 2020).

2.4 Genus *Aaptos*

Genus *Aaptos* adalah jenis spons yang tersebar luas di wilayah ekosistem laut, termasuk Perairan Indonesia. Penelitian hingga tahun 2020 melaporkan bahwa terdapat 62 jenis metabolit sekunder yang telah diisolasi dan dikarakterisasi dari genus *Aaptos*, termasuk *Aaptos aaptos*, *Aaptos suberitoides*, *Aaptos lobata*, *Aaptos ciliate*, *Aaptos nigra*, dan jenis lainnya yang tidak teridentifikasi. Sebagian besar senyawa yang berasal dari *Aaptos* teridentifikasi secara struktural sebagai aaptamine (He *et al.*, 2020).

Spikula dan susunan spikula adalah karakteristik utama untuk menunjukkan kelas spons. Spons *Aaptos* memiliki beberapa jenis spikula yaitu megaskler (spikula berukuran besar) dan mikroskler (spikula berukuran kecil). Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bahwa pada spons *Aaptos* memiliki *strongyloxeas* sebagai spikula primer dan beberapa spikula berbentuk lurus atau melengkung atau *subtylostyles*. Tipe spikula ektosom, jarang ditemukan pada *subtylostyles* (Mohd *et al.*, 2005).

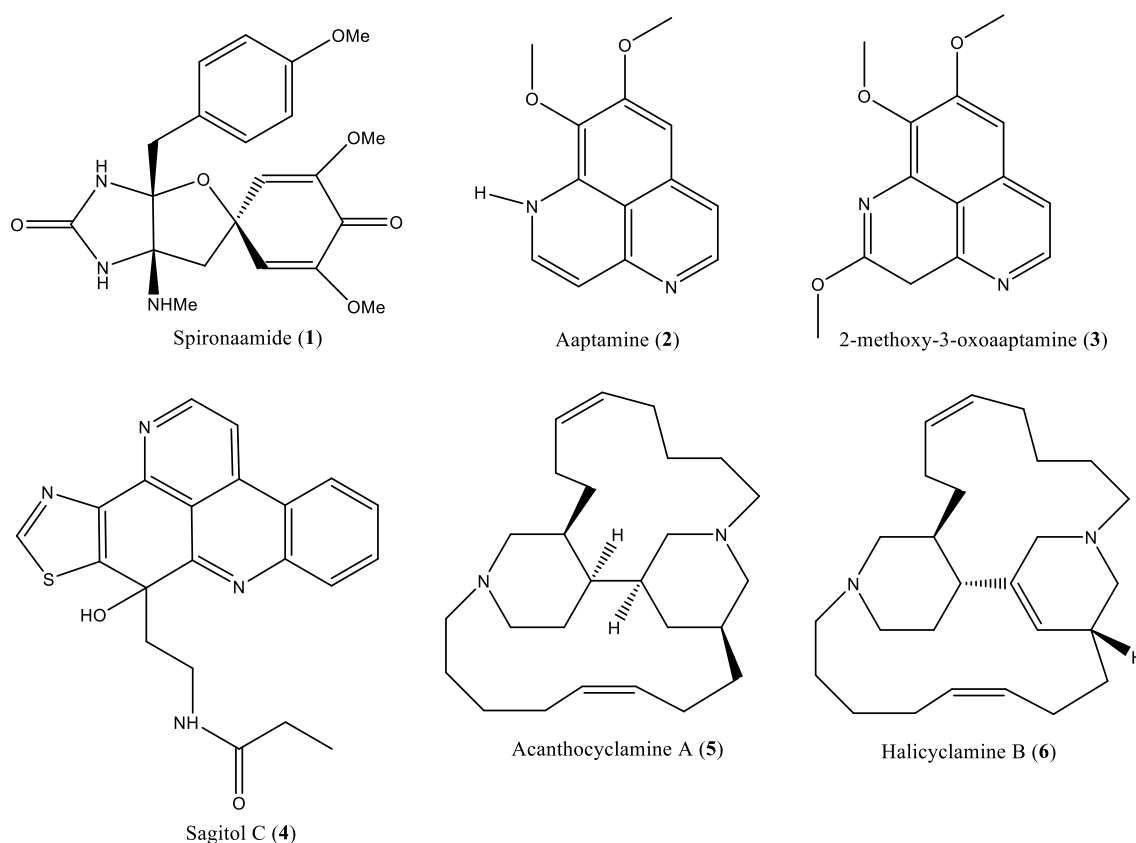


Gambar 4. Beberapa contoh spikula (a) *strongyloxeas/styloids* (b) *styles/subtylostyles*, (c) ujung *styles/subtylostyles* yang diperbesar (Rützler *et al.*, 2014)

2.5 Senyawa Metabolit Sekunder pada Spons

Spons (*Porifera*) menyumbang hampir 30% dari semua produk alami laut Perairan Indonesia yang ditemukan sejauh ini (Mehbub *et al.*, 2014). Senyawa bioaktif dari spons antara lain berasal dari golongan terpenoid, peptida, poliketida, dan alkaloid. Diantara senyawa bioaktif tersebut, alkaloid adalah jenis senyawa yang paling banyak ditemukan (Izzati *et al.*, 2021). Beberapa contoh senyawa alkaloid dari Perairan Indonesia antara lain sebagai berikut. Spironaamidine (**1**) merupakan senyawa alkaloid imidazol baru yang diisolasi dari spons *Leucetta chagosensi* yang berasal dari Perairan Sulawesi Utara menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Bacillus cereus* (Nagasawa *et al.*, 2011). Aaptamine (**2**) merupakan senyawa yang diisolasi dari *Aaptos suberitoides* yang berasal dari Ambon, Kepulauan Maluku, menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap garis sel kanker limfoma tikus L5187Y dengan nilai IC_{50} sebesar 8,5 μ M (Pham *et al.*, 2013). 2-methoxy-3-oxoaaptamine (**3**), senyawa turunan aaptamine, diisolasi dari *Aaptos* sp. yang berasal dari Kupang, Nusa Tenggara Timur, menunjukkan aktivitas antimikroba dalam kondisi aerobik dan hipoksia dengan nilai MIC sebesar 23 μ M (Arai *et al.*, 2014). Sagitol C (**4**) merupakan senyawa piridoakridin alkaloid yang diisolasi dari fraksi etil asetat *Oceaniapia* sp. yang berasal dari Ambon, Kepulauan Maluku diketahui memiliki aktivitas sitotoksik terhadap garis sel kanker limfoma tikus L5187Y, sel HeLa, dan garis sel *pheochromocytoma* tikus PC12 dengan nilai ED_{50} masing-masing 0,7, 0,9,

dan 2,3 μM (Ibrahim *et al.*, 2013). Acanthocyclamine A (5) dan halicyclamine B (6), merupakan senyawa dari *Acanthostrongylophora ingens* yang berasal dari Sulawesi Selatan menunjukkan aktivitas antimikroba yang selektif masing-masing terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (diameter penghambatan masing-masing 12 dan 10 mm pada 100 $\mu\text{g}/\text{disk}$) (Esposito *et al.*, 2019).



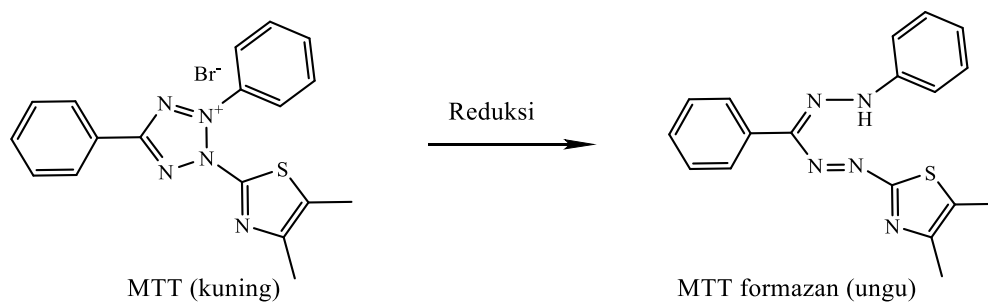
Gambar 5. Senyawa alkaloid dari Indonesia.

2.6 Uji Antikanker

Pengujian antikanker dilakukan dengan metode *microtetrazolium* atau yang dikenal juga sebagai 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT). Metode MTT merupakan pendekatan konvensional untuk menentukan potensi agen obat anti-kanker dalam hal sitotoksisitas, proliferasi, dan aktivasi berdasarkan aktivitas enzim dehidrogenase mitokondria di dalam sel (Mosmann, 1983). Metode

ini memiliki beberapa keunggulan yaitu metode yang sensitif, akurat, biaya relatif rendah, dan waktu yang singkat (Ghasemi *et al.*, 2021).

Pada uji MTT, pewarna kuning yang larut dalam air yang disebut MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromida] direduksi menjadi formazan ungu yang tidak larut melalui aktivitas reduktase mitokondria (**Gambar 5**). Konsentrasi formazan terlarut kemudian ditentukan dengan mengukur kerapatan optiknya pada 570 nm. Pengujian ini menggunakan *96-well plate* dan hasilnya memiliki tingkat akurasi yang baik hingga $\sim 10^6$ sel (Kumar *et al.*, 2018). Kristal formazan tidak larut dalam air, tetapi dapat larut dalam natrium dodesil sulfat (SDS) (Septisetyani *et al.*, 2014). Kristal formazan akan lebih banyak terbentuk jika terdapat lebih banyak sel kanker yang hidup.



Gambar 6. Reduksi formazan menjadi formazan MTT (Kumar *et al.*, 2018).

Pengujian sitotoksik antikanker umumnya digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} adalah konsentrasi suatu senyawa yang menyebabkan 50% hambatan proliferasi sel dalam *in vitro* dan mencerminkan potensial toksisitas senyawa tersebut terhadap sel. Nilai ini digunakan sebagai referensi dalam menguji kinetika sel. Besar nilai IC_{50} dapat mengindikasikan potensial senyawa tersebut sebagai agen sitotoksik. Semakin tinggi nilai IC_{50} , semakin rendah toksisitas senyawa tersebut terhadap sel (Damiani *et al.*, 2019).

2.7 Uji Antibakteri

Pengujian antibakteri yang mudah dilakukan untuk mendeteksi aktivitas sampel adalah uji KLT bioautografi. Pengujian bioautografi termasuk metode skrining yang biasa digunakan untuk deteksi aktivitas antimikroba dan memungkinkan pencarian zat aktif yang ada dalam ekstrak sampel yang memiliki campuran kompleks (Choma and Grzelak, 2011), seperti spons (Varijakzhan *et al.*, 2021). Prinsip dari metode ini adalah pemisahan dan deteksi komponen ekstrak yang dilakukan secara langsung pada plat KLT. Ekstrak diletakkan pada plat KLT dan dielusi dengan pelarut yang sesuai, kemudian diamati di bawah sinar UV dan pereaksi yang disemprotkan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder. Aktivitas antibakteri ditandai dengan adanya zona penghambatan (*clear zone*) di tempat di mana komponen antibakteri berada (Choma and Grzelak, 2011).

2.8 Mode Aksi Senyawa Bioaktif

2.8.1 Antikanker

Senyawa jenis nukleosida, sterol, peroksida, terpen, asam lemak, turunan asam amino, peptida siklik, dan khususnya alkaloid, telah ditemukan memiliki potensi kemopreventif atau antikanker (Calcabrini *et al.*, 2017). Ekstrak spons dapat mencegah pertumbuhan sel kanker dengan mencegah proliferasi sel kanker melalui apoptosis (Varijakzhan *et al.*, 2021). Apoptosis atau kematian sel terprogram adalah mekanisme fisiologis untuk mempertahankan homeostatis seluler. Ini penting untuk perkembangan embrionik, pergantian sel, pematangan sistem kekebalan, dan pengaturan homeostatis seluler, yang merupakan ciri khas kanker (Hanahan and Weinberg, 2011). Beberapa ekstrak spons laut dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik. Jalur intrinsik umumnya dipicu ketika ada kerusakan intraseluler yang sangat besar, seperti kerusakan DNA, stres oksidatif, dan penarikan sitokin (Varijakzhan *et al.*, 2021).

Aaptamine adalah alkaloid yang banyak dijumpai pada berbagai spesies *Aaptos* dan menunjukkan potensi sebagai agen antikanker. Penelitian yang dilakukan oleh

Dyshlovoy *et al.* (2014) menunjukkan bahwa senyawa aaptamine, demethyl (oxy) aaptamine, dan isoaptamine memiliki kemampuan untuk memicu apoptosis pada sel leukemia monositik (THP-1) dengan aktivitas terkuat pada demethyl (oxy) aaptamine dan isoaptamine. Pada sel epidermis murine (JB6 Cl41), ketiga senyawa ini mengaktifkan NF- κ B dan protein aktivator faktor transkripsi-1 (AP-1). NF- κ B dan AP-1 adalah dua kompleks protein yang memiliki peran sebagai inisiator sekaligus penekan tumor. Demethyl (oxy) aaptamine dan isoaptamine juga terbukti mempengaruhi aktivitas transkripsi p53, sementara aaptamin tidak memiliki efek pada p53. Berdasarkan hasil penelitian Dyshlovoy *et al.* (2014) disimpulkan bahwa modulasi AP-1, NF- κ B, dan p53 terlibat dalam apoptosis yang dimediasi oleh aaptamine.

2.8.2 Antibakteri

Secara umum, bakteri dapat dikategorikan berdasarkan struktur dinding selnya, yaitu Gram positif atau Gram negatif (Moo *et al.*, 2019). Dinding sel bakteri Gram-positif terdiri dari lapisan tebal lapisan peptidoglikan yang mengandung asam teikoat, asam lipoteikoat, dan protein yang tertanam di dalam lapisan peptidoglikan, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis yang dikelilingi oleh lapisan membran luar yang mengandung lipopolisakarida.

Senyawa antibakteri dapat bersifat aktif dikarenakan adanya kebocoran isi dalam sel bakteri yang disebabkan oleh terganggunya membran sel melalui pembentukan oksigen reaktif (ROS). ROS juga dapat mengoksidasi protein yang terdapat di dalam sel bakteri dengan mengubah ikatan kovalen yang bertanggung jawab untuk mempertahankan struktur protein yang penting untuk kelangsungan hidup sel (Varijakzhan *et al.*, 2021).

Secara khusus, senyawa antibakteri, salah satunya alkaloid dapat menghambat pertumbuhan bakteri melalui beberapa mekanisme. Diantaranya penghambatan bakteri sintesis asam nukleat dan protein, modifikasi permeabilitas membran sel bakteri, kerusakan membran sel dan dinding sel, penghambatan metabolisme bakteri, dan penghambatan pompa effluks (Yan *et al.*, 2021). Beberapa senyawa

alkaloid yang dapat bersifat sebagai antibakteri adalah alkaloid isokuinolin, piridin, indol, dan steroid. Diantaranya alkaloid tersebut, alkaloid indol dan alkaloid isokuinolin paling banyak ditemukan memiliki aktivitas antibakteri (Yan *et al.*, 2021).

2.9 Metode Ekstraksi dan Kromatografi

2.9.1 Ekstraksi

Untuk menarik senyawa bioaktif dari organisme invertebrata di lingkungan laut diperlukan tahapan ekstraksi yang sesuai. Ekstrak kasar spons diketahui terdiri dari campuran kompleks dari berbagai metabolit, termasuk alkaloid, terpenoid, peptida dan kuinon (Varijakzhan *et al.*, 2021). Metode ekstraksi menggunakan pelarut (maserasi) seringkali digunakan untuk mengisolasi senyawa bioaktif. Metode maserasi melibatkan sampel direndam dalam pelarut dan diaduk dari waktu ke waktu. Pelarut yang digunakan dalam teknik ini terdiri dari pelarut tunggal atau campuran pelarut dengan berbagai macam polaritas. Misalnya, metanol, etanol, triklorometana, aseton dan air. Berdasarkan hukum kesamaan dan *intermiscibility (like dissolves likes)*, pelarut dengan nilai polaritas mendekati polaritas zat terlarut cenderung berkinerja lebih baik dan sebaliknya. Etanol dan metanol adalah pelarut universal yang dapat digunakan untuk ekstraksi (Zhang *et al.*, 2018).

Proses ekstraksi metabolit bioaktif dari spons laut tergantung pada jenis proses ekstraksi yang akan diterapkan seperti pelarut polaritas, suhu dan tekanan. Sebuah penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi pengaruh pelarut terhadap persentase rendemen ekstrak kasar dengan menguji spons *Stylorella aurantium* dan *Halicona molitba* dengan menggunakan metanol dan air sebagai pelarut. Ekstrak metanol dari kedua spons menunjukkan aktivitas antimikroba yang lebih baik terhadap *Bacillus cereus* dibandingkan dengan ekstrak air. Namun, ekstrak air pada kedua spons menunjukkan persentase rendemen yang lebih tinggi. Perbedaan persentase rendemen antara kedua pelarut disebabkan oleh polaritas. Air memiliki polaritas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metanol sehingga lebih banyak senyawa

polar dari spons dapat diekstraksi dan meningkatkan persentase hasil. Perbedaan aktivitas antimikroba antara ekstrak kasar menunjukkan bahwa senyawa bioaktif sebagian besar bersifat semi-polar; dengan demikian ekstraksi senyawa paling mungkin menggunakan metanol karena merupakan pelarut semi-polar (Hutagalung *et al.*, 2014).

Selain itu, studi lainnya menemukan bahwa polaritas pelarut adalah yang paling faktor penting yang mempengaruhi keragaman metabolik dalam ekstrak. Peningkatan polaritas pelarut ditemukan berkorelasi positif dengan keragaman dalam senyawa yang diekstraksi. Pelarut yang lebih polar ditemukan sebagai pelarut yang lebih cocok untuk menghasilkan berbagai macam senyawa dibandingkan dengan pelarut yang memiliki campuran yang lebih nonpolar (Bayona *et al.*, 2018).

Peningkatan suhu juga berpengaruh dalam proses ekstraksi. Ketika ekstraksi dilakukan pada suhu yang lebih tinggi (60-80 °C), terjadi penurunan keanekaragaman kimia dibandingkan dengan suhu yang lebih rendah (30-50 °C). Pada suhu tinggi, kelompok tertentu seperti senyawa berbasis aromatik dapat diekstraksi secara efisien, sedangkan pada suhu rendah, ekstrak akan lebih banyak mengandung keragaman senyawa kimia yang signifikan (Bayona *et al.*, 2018).

2.9.2 Ekstraksi Cair-cair (Partisi)

Ekstrak kasar yang berasal dari organisme laut mengandung campuran senyawa yang sulit dipisahkan. Ekstraksi cair-cair atau yang biasa disebut partisi diperlukan untuk memisahkan campuran senyawa ke dalam dua kepolaran yang berbeda. Metode partisi memiliki beberapa keuntungan yaitu memiliki viskositas yang lebih rendah, biaya yang lebih rendah, dan waktu pemisahan fase yang lebih singkat (Mazzola *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini ekstrak dipartisi menggunakan pelarut polar (air) dan pelarut organik (EtOAc) (Ahmadi *et al.*, 2017). Berdasarkan kajian yang dilakukan oleh Lipinski *et al.* (2001) fraksi polar menunjukkan aktivitas biologis sebagai kandidat

obat yang lebih baik dibandingkan dengan fraksi organik. Fraksi polar memiliki kelarutan yang lebih tinggi dalam air, sehingga lebih mudah larut dalam cairan tubuh dan dapat lebih mudah diserap oleh tubuh. Selain itu, fraksi polar cenderung memiliki permeabilitas yang lebih baik melalui membran sel. Farouk and Shamma (2019) melaporkan bahwa fraksi polar pada senyawa obat cenderung memiliki sifat sitotoksik yang lebih rendah karena memiliki kemampuan yang lebih baik untuk diekskresikan dari tubuh sehingga dapat mengurangi risiko efek samping yang tidak diinginkan jika digunakan sebagai kandidat obat. Lipinski (2000) juga mengemukakan bahwa fraksi polar memiliki sifat yang mirip dengan senyawa-senyawa bioaktif sehingga lebih mungkin untuk berinteraksi dengan target biologis dan berperan sebagai senyawa bioaktif. Berdasarkan kajian-kajian tersebut, penelitian ini difokuskan pada kajian mengenai senyawa yang berada pada fraksi polar.

2.9.3 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan campuran berdasarkan perbedaan dalam distribusi komponen-komponen campuran antara dua fase yang berbeda yaitu fase diam (stasioner) dan fase gerak (Cai, 2014). Prinsip pemisahan metabolit sekunder dengan teknik kromatografi didasarkan pada keterlibatan fase diam dan fase gerak. Fase diam adalah bahan padat yang dapat berikatan dengan senyawa yang disebabkan oleh adanya interaksi ionik, hidrofilik, atau hidrofobik, sedangkan fase gerak adalah pelarut yang digunakan untuk melakukan perjalanan melalui fase diam (Bamunuarachchi *et al.*, 2020). Kromatografi dapat dibagi menjadi beberapa jenis berdasarkan prinsip pemisahan dan karakteristiknya. Beberapa jenis kromatografi yang umum meliputi kromatografi lapis tipis (KLT) dan kolom kromatografi (KK).

2.9.3.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah teknik identifikasi cepat, sensitif, dan murah yang digunakan untuk menentukan jumlah komponen dalam campuran, memverifikasi identitas dan kemurnian senyawa, memantau kemajuan dalam reaksi, menentukan komposisi pelarut untuk pemisahan preparatif, dan

menganalisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom. Fase stasioner berupa plat aluminium dan plat kaca sering digunakan dalam KLT. Plat kaca dikenal sebagai penyangga yang kuat, kaku, dan transparan, serta memiliki ketahanan kimia dan stabilitas panas yang baik. Plat kaca memiliki kelemahan yaitu berat dan ketebalan yang relatif tinggi. Kelemahan lain adalah adanya kerapuhan plat kaca yang membuatnya rentan terhadap kerusakan sehingga plat aluminium foil lebih diunggulkan sebagai fasa diam dalam KLT. Dibandingkan dengan plat kaca, plat foil aluminium memiliki karakteristik tipis, ringan, dan mudah ditangani. Plat ini dapat dipotong dengan mudah. Selain itu, plat aluminium memiliki lapisan adsorben yang kuat dan cocok digunakan dengan eluen yang mengandung konsentrasi air yang tinggi. Namun, perlu diperhatikan bahwa plat aluminium tidak memiliki daya tahan yang sama terhadap bahan kimia seperti kaca, terutama terhadap pereaksi yang mengandung asam kuat, amonia pekat, atau yodium (Cai, 2014).

Penentuan fasa gerak juga berperan penting dalam sistem KLT. Sebagian pelarut terdiri dari campuran beberapa komponen, biasanya hingga lima komponen. Terlepas dari jumlah komponen, sistem pelarut yang dipersiapkan harus homogen tanpa adanya kekeruhan. Pemilihan sistem pelarut melibatkan tiga kriteria utama: kelarutan, kemurnian, dan resolusi. Tahap awal dalam memilih pelarut adalah menilai kelarutannya terhadap sampel. Fase gerak yang dipilih seharusnya memiliki daya larut maksimal bagi sampel, sambil mempertimbangkan keseimbangan antara afinitas sampel terhadap pelarut dan fase diam agar pemisahan dapat dicapai. Peningkatan resolusi mencakup optimasi afinitas antara sampel, pelarut, dan fase stasioner. Sistem pelarut dalam KLT biasanya mengandung pelarut polar dan pelarut nonpolar yang berinteraksi secara kromatografi dengan cara yang berbeda. Sebagian besar sistem pelarut dalam KLT menggabungkan pelarut polar dengan pelarut nonpolar dalam proporsi yang sesuai untuk mencapai kondisi kromatografi yang diinginkan. Substitusi pelarut yang lebih polar sering kali menghasilkan perubahan dalam resolusi, sementara perubahan dalam pelarut yang kurang polar menghasilkan terutama dalam perubahan nilai *retention time* (R_t) dari komponen sampel (Cai, 2014). Pada

penggunaan fasa diam silika, senyawa yang lebih polar memiliki interaksi yang lebih kuat dengan silika sehingga akan menghasilkan nilai R_f yang kecil, sedangkan senyawa yang kurang polar akan bergerak ke arah atas mengikuti prinsip kapilaritas dan akan menghasilkan nilai R_f yang lebih besar (Bele *et al.*, 2011).

Interpretasi komponen pada plat KLT yang telah dielusi menggunakan fasa gerak dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi. Pereaksi ini menghasilkan perubahan warna visual pada daerah tempat unsur-unsur tersebut berada. Penggunaan pereaksi ini membantu mengenali senyawa-senyawa khusus yang mungkin tidak mempunyai warna atau ciri visual yang jelas dalam keadaan normal. Beberapa contoh pereaksi yang umum digunakan dalam KLT meliputi serium (IV) sulfat, *Dragendorff*, dan ninhidrin. Pereaksi serium (IV) sulfat umumnya digunakan sebagai pereaksi oksidimetri dalam pengujian senyawa organik yang dapat dioksidasi (Prashanth and Basavaiah, 2014) dan secara khusus juga efektif untuk mendeteksi alkaloid. Uji positif menghasilkan noda berwarna hitam dengan latar belakang berwarna kuning-putih (Cai, 2014). Pereaksi *Dragendorff* digunakan untuk pengujian senyawa alkaloid (gugus N tersier). Uji positif menghasilkan noda berwarna oranye (Raal *et al.*, 2020). Pereaksi ninhidrin digunakan untuk menunjukkan keberadaan asam amino atau amina (gugus N primer atau sekunder). Uji positif menghasilkan noda berwarna ungu atau kecoklatan (Meyers and Meyers, 2008). Selain pereaksi-pereaksi yang telah disebutkan, sinar UV juga berperan dalam proses identifikasi komponen senyawa yang ada pada KLT. Sinar UV dapat digunakan untuk memvisualisasikan senyawa tertentu pada plat KLT yang mengandung gugus kromofor penyerap UV atau biasa disebut dengan UV-aktif, yang berada pada panjang gelombang pendek (254 nm) atau panjang gelombang panjang (366 nm). Senyawa tersebut menghalangi absorbansi sinar UV oleh indikator fluoresen, menciptakan noda berwarna gelap dengan latar belakang yang terang pada plat KLT. Metode ini sering disebut sebagai UV *shadowing*. UV *shadowing* disebut tidak merusak karena senyawa nonfotolabil umumnya tidak terurai dalam kondisi ini (Meyers and Meyers, 2008).

2.9.3.2 Kolom Kromatografi

Kolom kromatografi merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan campuran zat kimia berdasarkan perbedaan afinitas mereka terhadap fase diam dan fase bergerak. Prinsipnya adalah komponen-komponen campuran akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda melalui suatu media yang terdiri dari fase diam dan fase gerak. Sifat-sifat kolom kromatografi yang berbeda dipengaruhi oleh perbedaan dalam struktur kimia dan sifat-sifatnya, sifat fisikokimia seperti jenis medium (monolitik, berpori, atau tidak berpori), geometri (luas, diameter dan volume pori, serta ukuran dan bentuk partikel), sifat kimiawi (jenis ligan yang terikat dan kerapatannya), dan komposisi pembawa fase diam (silika, polimer, atau karbon) (Žuvela *et al.*, 2019).

Kolom diklasifikasikan berdasarkan mode pemisahan dan yang umum digunakan berupa fase normal (NP) dan fase terbalik (RP). Dalam sistem NP, fase diam yang digunakan lebih polar dibandingkan dengan fase gerak. Ketika campuran diinjeksikan ke kolom, komponen-komponen yang lebih polar akan berinteraksi lebih kuat dengan fase diam, sehingga bergerak lebih lambat dan memiliki waktu retensi yang lebih lama. Komponen yang lebih non-polar akan bergerak lebih cepat melalui kolom, memiliki waktu retensi yang lebih pendek. Dalam sistem RP, fase diam yang digunakan adalah senyawa non-polar berupa C8 atau C18 yang merupakan jenis ikatan alkil-silika, sedangkan fase gerak adalah campuran polar dari satu atau lebih pelarut organik dan air atau larutan penyangga (*buffer*). Waktu retensi dalam sistem RP cenderung meningkat dengan peningkatan hidrofobisitas fase diam dan pengurangan konsentrasi pelarut organik dalam fase gerak. Akibatnya, senyawa-senyawa non polar akan tertahan pada kolom (Jandera, 2011).

2.10 Karakterisasi

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

LC-MS memiliki sensitivitas yang lebih tinggi daripada GC-MS sehingga memungkinkan analisis senyawa non-volatil yang tidak stabil secara termal.

Senyawa gula yang bersifat polar, asam organik nonaromatik, dan berbagai lipid nonpolar terdeteksi dengan LC-MS. MS memberikan informasi berat molekul, dan dapat memberikan massa yang tepat sehingga pengukuran komposisi unsur senyawa dapat ditentukan (Gathungu *et al.*, 2020).

MS bekerja dengan mengionisasi senyawa untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa terhadap muatannya. Dalam prosedur MS, sampel disuntikkan ke instrumen MS dan mengalami ionisasi. Komponen sampel terionisasi dan membentuk partikel bermuatan (ion). Ion-ion dipisahkan menurut rasio massa terhadap muatannya dalam suatu alat penganalisa oleh medan elektromagnetik. Ion dideteksi dan sinyal ion diproses menjadi spektrum massa (Glish and Vachet, 2003).

Keberhasilan teknik LC-MS ditunjukkan dengan kemampuannya untuk memberikan data tiga dimensi. Pertama, senyawa dipisahkan berdasarkan waktu oleh LC. Ion yang dihasilkan dalam sumber ionisasi kemudian dipisahkan menurut rasio m/z dalam penganalisis massa MS. Terakhir, detektor MS mengukur kelimpahan setiap ion. Dibandingkan dengan detektor LC konvensional, seperti ultraviolet-spektrofotometri tampak (UV-vis) atau fluoresensi, detektor MS memungkinkan identifikasi yang jauh lebih andal dari senyawa yang terelusi dari LC. LC-MS dapat mengurangi risiko identifikasi positif palsu dan analit yang sulit diidentifikasi dapat berhasil ditentukan dalam matriks yang rumit pada tingkat rendah (Kruve *et al.*, 2015).

Penggunaan instrumen analisis LC-MS memerlukan parameter metode dan mekanisme pemisahan yang baik untuk mendapatkan hasil yang diinginkan. Beberapa parameter metode tersebut adalah sebagai berikut.

1. Kolom

Pemisahan yang baik dapat dicapai dengan menggunakan kolom yang sesuai. Pengembangan berbagai sistem MS dengan kolom yang lebih pendek telah menghasilkan pemisahan yang efektif dalam waktu analisis yang singkat. Kolom

dengan ukuran partikel yang lebih rendah (<2 μ m) dalam sistem *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) dapat digunakan pada LCMS. Sistem UPLC beroperasi pada tekanan yang lebih tinggi karena ukuran partikel yang lebih kecil dan lebih selektif dan sensitif sehingga menghasilkan puncak tajam. Meski begitu, sistem UPLC juga memiliki kelemahan tertentu, seperti volume injeksi yang rendah dan umur kolom yang pendek (Zeki *et al.*, 2020).

Kolom yang digunakan pada LC-MS umumnya adalah kolom terbalik C18 (*reversed phase*). Penggunaan kromatografi C18 dapat diandalkan, kuat, dapat digunakan secara berulang, dan memiliki mekanisme pemisahan yang baik pada berbagai macam struktur molekul. Kolom nonpolar seperti C18 lebih cocok untuk analisis metabolomik karena dapat memisahkan senyawa semi-polar seperti asam fenolik, flavonoid, steroid terglisosilasi, alkaloid, dan lainnya (Zeki *et al.*, 2020).

2. Fasa gerak

Sifat fase gerak (pH, kekuatan ionik, dan jenis pelarut) juga penting untuk menentukan kapasitas puncak, resolusi, retensi, bentuk puncak, dan sensitivitas pada MS. Fase gerak yang digunakan untuk analisis dalam LC umumnya terdiri dari pelarut air dan pelarut organik yang dipilih sesuai dengan polaritas analit. Kekuatan fase gerak merupakan parameter penting untuk retensi analit dalam kolom (Zeki *et al.*, 2020).

pH fase gerak juga merupakan faktor lain yang mempengaruhi retensi metabolit, terutama untuk metabolit asam dan basa. Waktu retensi analit bisa dikontrol oleh pH fase gerak dengan mengubah tingkat ionisasi analit. Pemilihan pH yang cocok sangat sulit disebabkan oleh adanya metabolit yang memiliki sifat fisikokimia yang berbeda. Beberapa metabolit akan terelusi dengan puncak *tailing*, sedangkan beberapa diantaranya akan memiliki puncak yang sangat tajam dan puncak simetris tergantung pada pH yang digunakan. Dalam studi metabolomik LC-MS, larutan *buffer* digunakan untuk menstabilkan pH fase gerak sehingga dapat mengontrol bentuk puncak. Penambahan larutan *buffer* akan meningkatkan reproduktifitas

analisis. pH juga mempengaruhi tingkat ionisasi metabolit dalam sistem MS. *Buffer* asam dan *buffer* basa (amonium bikarbonat) masing-masing digunakan dalam mode ionisasi positif dan dalam mode ionisasi negatif untuk meningkatkan efisiensi ionisasi metabolit (Zeki *et al.*, 2020).

3. Instrumen

Sistem LC-MS terdiri dari *liquid chromatography* (LC) dan *mass spectrometry* (MS). Spektrometer massa terdiri dari tiga bagian utama, meliputi:

a. Sumber ionisasi

Sumber ionisasi adalah bagian dari MS yang dapat mengubah molekul sampel fase gas menjadi ion atau dalam kasus ionisasi electrospray dan memindahkan ion yang ada dalam larutan ke fase gas. Pada awalnya untuk menggabungkan sistem LC dengan MS terhalang oleh kesulitan dalam mentransfer molekul analit dari fase cair ke fase gas sebagai ion. Kesulitan-kesulitan ini dapat diatasi oleh penemuan sumber *Atmospheric Pressure Ionization* (API). Sumber API memungkinkan pembentukan ion fase gas langsung dari aliran cairan sehingga memungkinkan untuk menghubungkan LC ke MS. Pada sumber API, tersedia mode ionisasi positif dan negatif, meskipun mode positif lebih banyak digunakan. Ion positif biasanya terbentuk sebagai molekul analit terprotonasi $[M+H]^+$ atau adisi dengan kation (kebanyakan natrium, ammonium atau kalium), misalnya $[M+Na]^+$, atau dapat juga sebagai kation radikal setelah kehilangan elektron $[M^+]$. Pada mode ionisasi negatif, juga berbagai bentuk ionisasi dapat terjadi, meliputi: deprotonasi $[MH]^-$, pembentukan adisi dengan klorida $[M+Cl]^-$, nitrat $[M+NO_3]^-$ atau asetat $[M+CH_3COO]^-$, dan juga anion radikal melalui penambahan elektron (Kruve *et al.*, 2015). Sumber API yang paling umum digunakan meliputi sebagai berikut.

Electrospray Ionisation Source (ESI)

Tipe ionisasi ini digunakan untuk menganalisis senyawa polar, labil, dan memiliki berat molekul tinggi. Ion dalam ESI dihasilkan pada tekanan atmosfer dengan melewati sampel berbasis larutan melalui kapiler kecil (diameter internal $<250 \mu m$) dengan perbedaan potensial relatif terhadap elektroda penghitung pada tegangan

antara ± 500 dan ± 4500 V (Glish and Vachet, 2003). ESI sangat disukai karena memiliki efisiensi ionisasi yang seimbang untuk berbagai kelas senyawa kimia dan merupakan metode *soft ionization*. Metode ESI tidak bergantung pada penguapan pelarut yang cepat karena ion dapat dihasilkan dalam larutan (Forcisi *et al.*, 2013).

Atmospheric-pressure Chemical Ionization (APCI)

Proses dalam APCI terjadi pada tekanan atmosfer melalui reaksi ion/molekul. Keuntungan APCI adalah kurang rentan terhadap gangguan matriks dari garam. APCI juga memiliki keuntungan lebih dari ESI bahwa analit polar lemah tidak ada sebagai ion *preformed* dalam larutan dapat dengan mudah terionisasi, yang membuat APCI dan ESI saling melengkapi (Glish and Vachet, 2003).

Atmospheric Pressure Photo-ionisation (APPI)

APPI memungkinkan analisis beberapa senyawa bermassa molekul rendah dan tidak polar yang tidak dapat terionisasi oleh ESI. APPI juga memungkinkan penerapan laju aliran fase gerak yang lebih tinggi hingga ~ 2 mL/menit sehingga memperpendek waktu analisis dibandingkan ESI (Glish and Vachet, 2003).

b. Penganalisa Massa (*Mass Analyzer*)

Penganalisa massa digunakan untuk mengurutkan ion berdasarkan massanya dengan menerapkan medan elektromagnetik. Ada banyak penganalisa massa berbeda yang dapat digunakan dalam LC-MS, meliputi: *single quadrupole*, *triple quadrupole*, *ion trap*, *Time-of-Flight* (ToF) dan *Quadrupole Time-of-Flight* (QToF). QToF paling banyak digunakan untuk analisis senyawa metabolit sekunder. Kombinasi ini memungkinkan resolusi tinggi massa molekul dan pola fragmentasi metabolit dalam spektrum MS/MS. Kedua data ortogonal ini (fragmentasi dan massa molekul resolusi tinggi) mengurangi anotasi palsu dalam LC-MS (Zeki *et al.*, 2020).

Penganalisa QToF akan mempercepat ion yang telah diekstraksi sebelumnya ke kecepatan tinggi oleh medan listrik ke dalam penganalisa yang terdiri dari tabung yang panjang dan lurus. QToF dapat memisahkan ion berdasarkan kecepatan.

Kecepatan yang dicapai oleh ion akan berbanding terbalik dengan nilai m/z nya. Ion dengan nilai m/z yang lebih tinggi membutuhkan lebih banyak waktu untuk melewati penganalisa sedangkan ion yang lebih kecil akan mencapai detektor lebih cepat. *Quadrupole* bertindak sebagai *filter* massa dimana ion terfragmentasi dipisahkan ke dalam ToF menurut rasio m/z . QToF memungkinkan untuk menganalisis massa mulai 0-20000 m/z dengan resolusi tinggi dan presisi. QToF menjadi alat yang efisien untuk karakterisasi senyawa bioaktif yang bisa membaca massa ion hingga 4 desimal (Glish and Vachet, 2003).

c. Detektor

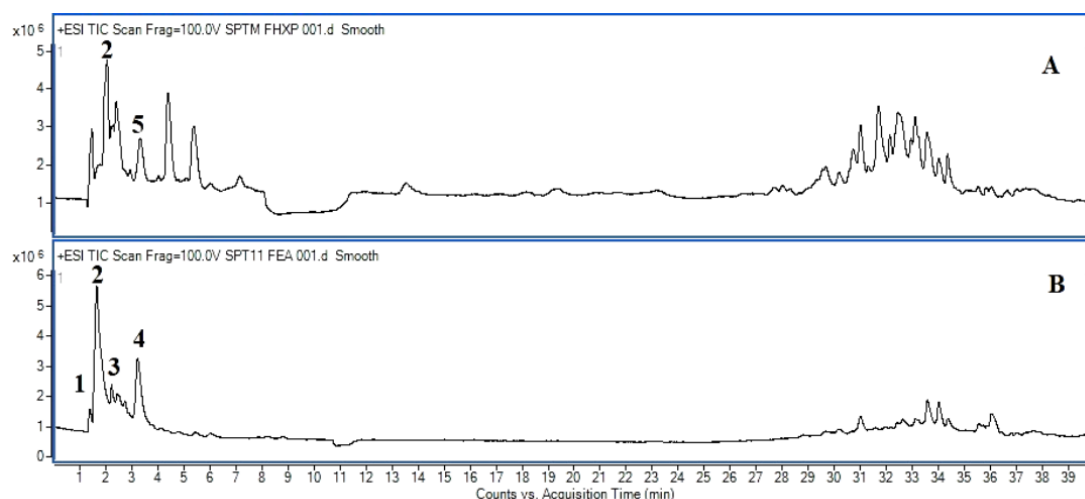
Pada sistem LCMS, detektor berfungsi sebagai alat untuk proses identifikasi dan kuantifikasi komponen dalam campuran berdasarkan nilai m/z dan waktu retensi. Pada penelitian ini digunakan detektor MS. Detektor MS digunakan dalam LC-MS untuk mendeteksi dan mengidentifikasi senyawa berdasarkan rasio massa dan muatan ion-ion. Pada detektor MS/MS berarti ion yang diperoleh dari sampel tidak langsung terdeteksi untuk mendapatkan sinyal tetapi beberapa diantaranya (disebut ion prekursor) dipilih dari spektrum, terfragmentasi, dan akhirnya ion produk terdeteksi. Penggunaan MS/MS lebih unggul dibandingkan dengan MS konvensional dan memungkinkan identifikasi analit yang lebih andal (tingkat positif palsu lebih rendah) serta rasio *signal-to-noise* yang lebih tinggi (Kruve *et al.*, 2015).

LC/MS berperan untuk meningkatkan sensitivitas dan mempercepat analisis serangkaian senyawa spons laut (Kumar *et al.*, 2012). Penggunaan teknik kromatografi LC-MS terkait spons secara umum bertujuan untuk menentukan profil kimia dari sampel. Beberapa penelitian pada spons melaporkan bahwa penggunaan LC-MS menghasilkan profil kimia yang kompleks, sehingga membutuhkan *database* spektra untuk membantu proses identifikasi (Samirana *et al.*, 2022).

Metode pendekatan berbasis spektrometri massa (LC-MS dan LC-MS/MS) untuk analisis sistematis senyawa dari spons laut *Spongosorites halichondriodes* pertama kali dilaporkan oleh Kumar *et al.* (2012). Senyawa yang berhasil diidentifikasi

meliputi turunan asam kolat tri dan tetra hidroksi ester, citrinolakton A, isokumarin, dan asam *glikyrrhetic*, serta turunan triterpenoid pentasiklik yang untuk pertama kalinya ditemukan pada spons laut *Halichondriidae*.

Investigasi senyawa menggunakan LC-MS/MS juga dilakukan terhadap spons *Aaptos suberitoides* dari Tulamben, Bali, Indonesia, seperti yang terlihat pada **Gambar 7**. Analisis LC-MS/MS mengidentifikasi senyawa alkaloid yaitu pada fraksi etil asetat terdeteksi demethyalaaptamine (1), aaptamine (2), isoaptaamine (3), dan 8,9,9-trimethoxy-9*H*-benzo[de] [1,6]naphthyridine (4) pada waktu retensi masing-masing 1,52, 1,67, 2,92 dan 3,22 menit. Aaptamine (2) juga diidentifikasi dalam fraksi n-heksana bersama dengan demethyloxyaaptamine (5) (Putri *et al.*, 2023).



Gambar 7. Kromatogram ion total dari (a) fraksi n-heksana dan (b) fraksi etil asetat *A. suberitoides* (Putri *et al.*, 2023).

2.10.2 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Spektroskopi resonansi magnetik nuklir (NMR) adalah salah satu teknik yang berujuan untuk memberikan informasi tentang informasi kimia regio/stereo pada senyawa yang dapat dikristalisasi. Data yang diperoleh adalah proton NMR satu dimensi (1D) (¹H-NMR) yang dapat digunakan dalam identifikasi sinyal, seperti pergeseran kimia dan bentuk sinyal, homonuklir (¹H-¹H) konstanta kopling, dan

integral sinyal (rasio intensitas sinyal dari senyawa yang sama) (Garcia-Perez *et al.*, 2020).

Keterbatasan utama dari NMR adalah sensitivitasnya yang rendah sehingga spektra ^1H -NMR dari ekstrak umumnya didominasi oleh sinyal molekul primer yang sangat melimpah di setiap organisme. Oleh karena itu, diperlukan 2D NMR untuk mendispersi sinyal ke dalam dua dimensi sehingga dapat meningkatkan resolusi dan mengatasi masalah tumpang tindih. Tipe NMR 2D yang digunakan umumnya adalah korelasi 2D homonuklir dan 2D heteronuklir, seperti ^1H - ^1H *J-resolved* (J-Res), ^1H - ^1H *Correlation Spectroscopy* (COSY), ^1H - ^1H *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY), ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Single-Quantum Coherence* (HSQC), dan ^1H - ^{13}C *Multiple Bond-Correlation* (HMBC) (Garcia-Perez *et al.*, 2020).

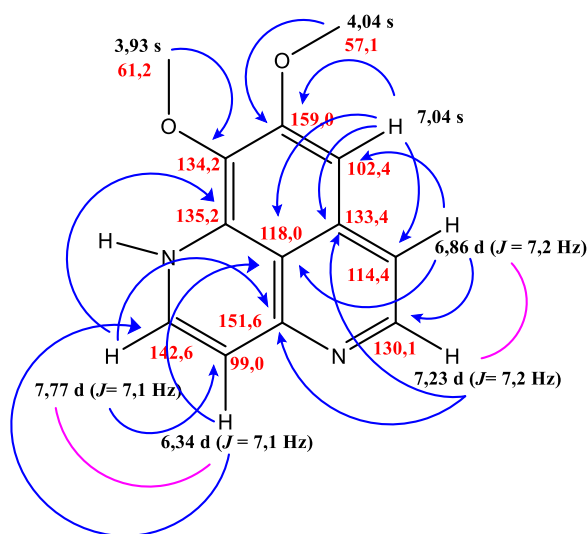
Pelarut dan frekuensi alat dalam instrumen NMR adalah beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil dalam spektroskopi NMR. Perubahan pelarut menyebabkan perubahan besar dalam pergeseran kimia, kopling dispersi sinyal, tumpang tindih, dan bentuk garis serta kompleksitas keseluruhan spektrum NMR (Beyer *et al.*, 2010). Sedangkan, frekuensi yang digunakan juga dapat mempengaruhi resolusi spektrum, yaitu kemampuan untuk memisahkan puncak-puncak yang berdekatan. Semakin tinggi frekuensi, semakin tinggi resolusinya, yang memungkinkan identifikasi lebih baik dari puncak-puncak yang terdekat. Pada frekuensi rendah, beberapa puncak dalam spektrum ^{13}C -NMR dapat tumpang tindih, sehingga interpretasi menjadi lebih sulit. Selain itu, frekuensi instrumen juga memengaruhi jumlah inti atom yang menjadi terpolarisasi dan menghasilkan sinyal dalam spektrum. Pada frekuensi yang lebih tinggi, lebih banyak inti atom dapat terpolarisasi, sehingga meningkatkan sensitivitas deteksi. Peningkatan resolusi spektrum juga dapat dilakukan dengan meningkatkan kekuatan medan magnet karena medan magnet yang lebih tinggi akan memberikan dispersi sinyal yang lebih baik. Namun, proses peningkatan medan magnet pada instrumen NMR berlangsung secara perlahan dan memerlukan biaya yang tinggi sehingga masih sulit untuk diterapkan (Zeng *et al.*, 2020).

Proses *shimming* dalam NMR juga diperlukan untuk mendapatkan spektrum NMR yang berkualitas tinggi. *Shimming* merupakan proses penyesuaian medan magnet eksternal untuk menciptakan lingkungan medan magnet yang lebih homogen di sekitar sampel sehingga inti atom dalam sampel dapat mengalami resonansi dengan presisi. Hal ini akan menghasilkan spektrum NMR yang lebih jelas dan resolusi yang tinggi (Cheng *et al.*, 2022). Medan magnet yang sangat homogen harus dicapai dengan *shimming* aktif dan / atau pasif. *Shimming* aktif dan pasif biasanya akan menghomogenkan medan magnet di sekitar pusat magnet dengan membatalkan suku yang lebih tinggi dari deret harmonik daripada suku ke-0. Keberadaan medan magnet yang seragam sangat penting dikarenakan perbedaan intensitas medan magnet di berbagai bagian magnet dapat mengakibatkan pelebaran garis spektrum NMR dan mengurangi ketajaman resolusinya (Noguchi, 2014).

Aplikasi NMR telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi struktur kompleks dari spons laut (Reynolds and Mazzola, 2015), salah satunya struktur senyawa aaptamine. Senyawa aaptamine pertama kali teridentifikasi oleh Nakamura *et al.* (1982) pada spons *Aaptos aaptos* menggunakan spektra NMR pada 270 MHz untuk ^1H -NMR dengan pelarut polar DMSO- d_6 . Sinyal ^1H -NMR menampilkan sinyal karakteristik spesifik untuk dua metoksi terisolasi 8-OCH₃ (δ_{H} 4,03, s) dan 9-OCH₃ (δ_{H} 3,86, s), dua set proton berpasangan pada H-2 (δ_{H} 7,90, brd, $J=6,5$ Hz) dan H-3 (δ_{H} 6,52, d, $J = 6,5$ Hz), serta H-5 (δ_{H} 7,45, d, $J = 7,3$ Hz) dan H-6 (δ_{H} 6,93, d, $J = 7,3$ Hz), dan satu proton terisolasi H-7 (δ_{H} 7,18, s).

Penggunaan NMR berhasil mengidentifikasi senyawa aaptamine pada spons *Xestospongia* sp., yang dilakukan menggunakan Bruker AVANCE 400 pada 400,13 MHz untuk ^1H -NMR dengan pelarut nonpolar CDCl₃. Sinyal ^1H -NMR menampilkan sinyal karakteristik spesifik untuk dua metoksi terisolasi 8-OCH₃ (δ_{H} 3,93, s) dan 9-OCH₃ (δ_{H} 3,77, s), dua set proton berpasangan pada H-2 (δ_{H} 7,80, d, $J=7,0$ Hz) dan H-3 (δ_{H} 6,49, d, $J = 7,0$ Hz), serta H-5 (δ_{H} 7,30, d, $J = 7,1$ Hz) dan H-6 (δ_{H} 6,78, d, $J = 7,1$ Hz), dan satu proton terisolasi H-7 (δ_{H} 7,02, s) (Calcul *et al.*, 2003).

Kombinasi NMR juga telah berhasil mengidentifikasi struktur aaptamine yang berasal dari fraksi metanol spons *Stylissa* sp. menggunakan spektrometer Bruker AVANCE II pada 600 MHz untuk ^1H -NMR dan 150 MHz untuk ^{13}C -NMR dengan pelarut polar metanol- d_4 . Sinyal ^1H dan ^{13}C -NMR mendeteksi sinyal untuk lima metina aromatik ($\sim\delta_{\text{H}}$ 6-7 ppm) dan dua gugus O-metil ($\sim\delta_{\text{H}}$ 3-4 ppm). Data COSY dan konstanta kopling untuk lima proton aromatik H-2 (δ_{H} 7,77, d, $J = 7,1$ Hz), H-3 (δ_{H} 6,34, d, $J = 7,1$ Hz), H-5 (δ_{H} 7,23, d, $J = 7,2$ Hz), H-6 (δ_{H} 6,86, d, $J = 7,2$ Hz), dan H-7 (δ_{H} 7,04, s) menunjukkan adanya tiga cincin benzena yang menyatu. Korelasi HMBC dari gugus metoksi (δ_{H} 4,04) ke karbon kuartener C-8 (δ_{C} 159,0) dan gugus metoksi lainnya (δ_{H} 3,93) ke C-9 (δ_{C} 134,2) membenarkan lokasi yang ditetapkan dari kedua gugus metoksi ini. Kombinasi dari data korelasi COSY dan HMBC membentuk struktur aromatik polisiklik planar (Luyao *et al.*, 2021). Data-data tersebut disajikan pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Struktur dan korelasi HMBC (biru) dan COSY (ungu) dari aaptamine (Luyao *et al.*, 2021).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Juli tahun 2023 di Laboratorium Genomik, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Bogor. Analisis LC-MS/MS dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik POLRI, Sentul, Bogor. Analisis spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) dilakukan di Laboratorium NMR BRIN Serpong, Tangerang Selatan.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas di antaranya: labu ukur, gelas ukur, tabung reaksi, corong pisah, corong gelas, pipet tetes, gelas kimia, Erlenmeyer, dan botol vial. Alat-alat lainnya seperti sarung tangan steril, tisu, kertas saring Whatman, mikrotip 100 μL , microtip 200 μL , mikropipet, *microplate* 96-well permukaan datar IWAKI, spatula, *microtube* steril 1,5 mL, plastik *wrap*, spidol SNOWMAN, dan label.

Alat-alat instrumentasi meliputi: *autoclave*, *laminar air flow*, lampu UV, *freezer storage*, inkubator CO₂, seperangkat alat Rotavapor BUCHI, *freeze drying* Lyovapor L-200 BUCHI, neraca analitik Sartorius Entris 224-1S, mikroskop Euromex Holland, *software* DinoCapture 2.0, sentrifus, *microplate reader*, dan *haemocytometer*. Peralatan untuk kromatografi meliputi: lampu UV₂₅₄, plat KLT aluminium silika gel F₂₅₄ MERCK, plat KLT kaca silika gel F₂₅₄ MERCK, *chamber*, pipa kapiler, gelas ukur 5mL, dan kolom Agilent *Bond Elute* C18 EWP.

Instrumentasi untuk karakterisasi meliputi *Liquid Chromatography Mass Spectrometer* (LC-MS/MS) yang dilengkapi dengan ACQUITY UPLC® H-Class System (*waters*, USA), kolom ACQUITY UPLC® HSS C18 (1,8 µm 2.1x100mm) (*waters*, USA), dan Xevo G2- S QTOF Mass Spectro (*waters*, USA), *software* MassLynx V4.1, serta spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) JEOL tipe JNM-ECZ500R/S1.

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aquades, metanol p.a (MeOH), etil asetat p.a (EtOAc), dimetil sulfoksida p.a (DMSO), natrium hipoklorit (NaOCl), alkohol 70%, pereaksi serium (IV) sulfat, ninhidrin, dan *Dragendorff*. Bahan pengujian antikanker meliputi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), tiga sel kanker (Caco-2, DLD-1, dan HEK293), kontrol positif *doxorubicin*, natrium dodesil sulfat (SDS), dan pereaksi 3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Biomaterial

Spesimen spons yang digunakan merupakan deposit spons dengan kode SBM-066 yang berada di Laboratorium Genomik, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Bogor, yang sebelumnya diperoleh dari Likuan 3, Taman Nasional Bunaken, Manado, pada bulan September 2022. Berdasarkan hasil kajian pendahuluan yang telah dilakukan oleh peneliti Pusat Riset Vaksin dan Obat, BRIN Cibinong, Bogor, sampel tersebut berpotensi sebagai antikanker terhadap sel kanker kolorektal DLD-1 sehingga diperlukan kajian lebih lanjut mengenai potensi bioaktivitas lainnya serta identifikasi struktur senyawanya.

3.3.2 Identifikasi Spikula Spons

Identifikasi jenis spons dilakukan berdasarkan pengamatan bentuk spikula dengan merujuk kepada metode Rowe and Doty (1977). Sebanyak tiga bagian spons kira-kira 1 cm³ ditempatkan dalam vial ukuran 5 mL yang berisi NaOCl dan dibiarkan

selama 15 - 20 menit agar spikula dapat dipisahkan. Setelah mendapatkan endapan spikula, NaOCl diambil secara hati-hati dengan menggunakan pipet tetes. Endapan spikula yang tersisa pada dasar vial dibilas dengan aquades, didiamkan selama 5 menit, lalu aquades tersebut dibuang. Tahapan ini diulangi sebanyak 3 kali. Endapan spikula diberi alkohol 70% sebanyak 1 mL, didiamkan selama 5 menit, kemudian alkohol dibuang. Endapan spikula diambil dan ditempatkan pada kaca preparat hingga mengering untuk menghindari pembiasan kemudian spikula diamati menggunakan mikroskop untuk mengidentifikasi spesiesnya. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop Euromex Holland pada perbesaran 100x dan 400x. Visualisasi hasil mikroskop dilakukan menggunakan *software* DinoCapture 2.0.

3.3.3 Ekstraksi Spons

Ekstraksi sampel spons dilakukan merujuk pada Ahmadi *et al.* (2017) dengan modifikasi pelarut. Sebanyak 80,94 g spons dipotong kecil-kecil dan ditimbang menggunakan neraca analitik. Sampel yang telah ditimbang dimaserasi dalam pelarut MeOH selama 24 jam dan diulangi hingga 3 kali pengulangan. Semua filtrat hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring Whatman, digabungkan ke dalam satu wadah Erlenmeyer, dan pelarut MeOH diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Kondisi *evaporator* yang digunakan berada pada tekanan vakum 100 mbar, suhu *chiller* 6°C, suhu *water bath* 35°C, dan rotasi 60 rpm.

3.3.4 Ekstraksi Cair-cair (Partisi)

Filtrat MeOH hasil evaporasi dipartisi menggunakan etil asetat (EtOAc) dan aquades (H₂O) untuk memisahkan antara komponen polar (MeOH-H₂O) dan semi polar (EtOAc) (Ahmadi *et al.*, 2017).

3.3.4.1 Fraksi Etil Asetat

Filtrat etil asetat hasil partisi dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* pada tekanan vakum 95 mbar, suhu *chiller* 6°C, suhu *water bath* 35°C, dan rotasi 60 rpm untuk mendapatkan fraksi SBM-066-1.

3.3.4.2 Fraksi Air

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 dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan fraksi SBM-066-2. Kondisi *evaporator* yang digunakan untuk menguapkan MeOH yaitu berada pada tekanan vakum 100 mbar, suhu *chiller* 6°C , suhu *water bath* 35°C , dan rotasi 60 rpm.

3.3.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT dilakukan menggunakan fase diam plat alumunium silika gel F254. Adapun fasa gerak yang digunakan dengan fase gerak diklorometana (DCM) : metanol (MeOH) (9:1). Lebih lanjut, ekstrak direaksikan dengan pereaksi spesifik serium (IV) sulfat, *Dragendorff*, dan ninhidrin. Pembuatan pereaksi pada KLT dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

Proses elusi pada KLT dilakukan pada *chamber*. Komponen senyawa yang telah terelusi disinari dengan lampu UV_{254 nm} untuk melihat ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa. Plat KLT kemudian disemprotkan dengan pereaksi serium sulfat dan dikeringkan di atas *hotplate* hingga timbul bercak komponen senyawa. Uji positif dengan pereaksi serium sulfat akan menimbulkan noda berwarna coklat kehitaman.

Pengamatan komponen senyawa lebih lanjut dapat dilakukan dengan pereaksi spesifik *Dragendorff* dan ninhidrin. Pereaksi *Dragendorff* digunakan untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid yang ditandai dengan terbentuknya noda berwarna jingga pada plat KLT, sedangkan pereaksi ninhidrin digunakan untuk mengetahui adanya senyawa asam amino yang ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada plat KLT. Noda KLT yang timbul dihitung nilai *retention factor* (R_f)

nya untuk mengetahui distribusi tingkat kepolaran masing-masing komponen dalam sampel. Adapun rumusnya adalah sebagai berikut :

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

3.3.6 Uji Sitotoksis Antikanker

3.3.6.1 Pengujian pada Fraksi

Pengujian sitotoksik senyawa dikaji untuk fraksi SBM-066-2. Fraksi SBM-066-2 dilakukan pengujian sitotoksik sel menggunakan dua sel kanker kolorektal (Caco-2 dan DLD-1) dan satu sel normal (HEK293). Suspensi sel kanker kolorektal (Caco-2 dan DLD-1) dan sel normal (HEK293) dalam *Dulbelco's Modified Eagle Medium* (DMEM) dipanen pada konfluensi 70-80% dan disentrifugasi pada 1200 rpm/25°C selama 3 menit. Sel-sel dihitung di bawah mikroskop menggunakan *haemocytometer* dan kemudian dimasukkan ke dalam 96 *wells* dengan kepadatan 1×10^5 sel per-mL. Sel diinkubasi pada 37°C dengan 5% CO₂ selama 24 jam untuk memungkinkan penempelan sel. Sel yang tidak menempel dibuang dengan hati-hati. Pada *wells* kemudian ditambahkan ekstrak spons dengan serial konsentrasi pengenceran (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/mL) dan diinkubasi lebih lanjut selama 72 jam. Pereaksi MTT (5 µg/mL) ditambahkan ke dalam setiap *wells* dan diinkubasi pada 5% CO₂, 37°C selama 4 jam. Media sel dan campuran MTT dibuang, dan kristal formazan keunguan dilarutkan dalam natrium dodesil sulfat (SDS) dan diinkubasi lebih lanjut di lingkungan yang gelap. Absorbansi dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Semua percobaan dilakukan dalam rangkap tiga. Konsentrasi penghambatan 50% (IC₅₀) sampel dihitung dengan analisis statistik. Viabilitas sel ditentukan dengan menggunakan rumus di bawah ini:

$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{Absorbansi sel yang diberi perlakuan}}{\text{Absorbansi sel tanpa diberi perlakuan}} \times 100\%$$

3.3.6.2 Pengujian pada Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah *doxorubicin* yang diuji sitotoksitas selnya menggunakan dua sel kanker kolorektal (Caco-2 dan DLD-1) dan satu sel normal (HEK293). Tahapan pengujian sama seperti yang dilakukan pada pengujian fraksi SBM-066-2. Perbedaan hanya ada pada konsentrasi yang digunakan yaitu menggunakan serial pengenceran dengan konsentrasi 8; 4; 2; 1; 0,5; dan 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

3.3.7 Uji Antibakteri

3.3.7.1 Bakteri Uji

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri patogen klinis *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari deposit Unit Pelayanan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung, Bandar Lampung. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan memiliki sifat resisten terhadap *amoxicillin* (25 μg), *ciprofloxacin* (5 μg), dan *clindamycin* (2 μg) (Setiawan *et al.*, 2022)

3.3.7.2 Pembuatan Media Agar

Media agar yang digunakan untuk uji antibakteri adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA). MHA sebanyak 3,8 g dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, kemudian panaskan hingga mendidih. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 30 menit. MHA dibiarkan hingga suhunya turun, dituangkan ke cawan petri yang telah disterilkan, dan didiamkan hingga mengeras sembari disinari dengan lampu UV selama 30 menit.

3.3.7.3 Metode Antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan menggunakan metode KLT bioautografi. Pengujian mengacu pada metode Chomnawang *et al.* (2009) dengan beberapa modifikasi meliputi fase gerak, konsentrasi, pereaksi, dan bakteri uji. Fraksi SBM-066-2 dengan konsentrasi 0,5 mg/mL dielusi menggunakan kromatografi lapis tipis

(KLT). Plat kaca silika gel GF₂₅₄ digunakan sebagai fasa diam dan n-Heksana: EtOAc (7:3) sebagai fasa gerak. Plat KLT tersebut diuji dengan menggunakan pereaksi *Dragendorff* untuk visualisasi alkaloid. Plat KLT dikeringkan dengan hati-hati untuk menghilangkan semua pelarut sebelum diletakkan pada media MHA dan dibiarkan semalaman pada 37°C. Zona bening yang dihasilkan pada media agar dibandingkan dengan R_f dari bercak terkait pada plat KLT referensi. Penelitian ini menggunakan teknik KLT bioautografi untuk mengetahui secara visual zona bening penghambatan pertumbuhan bakteri. Dalam penelitian ini, kami menggunakan bakteri patogen klinis *Staphylococcus aureus* resisten.

3.3.8 Kolom Kromatografi (KK)

Sebagian fraksi SBM-066-2 (250 mg) dilakukan fraksinasi lanjut menggunakan kromatografi kolom (KK) untuk mengurangi pengotor (*impurity*) pada sampel sebelum dianalisis lebih lanjut menggunakan ¹H-NMR. Teknik kromatografi kolom dilakukan menggunakan fasa diam *reversed phase* (RP-C18), sedangkan fasa gerak yang digunakan berdasarkan urutan kepolaran pelarut (aquades 100%, MeOH 25%, MeOH 50%, MeOH 75%, dan MeOH 100%).

3.3.9 Karakterisasi Senyawa Bioaktif

Fraksi SBM-066-2 dikarakterisasi menggunakan *Liquid Chromatography Mass Spectrometer* (LC-MS/MS) untuk mengetahui berat molekul dan pola fragmentasi senyawa. Identifikasi proton pada fraksi dilakukan menggunakan spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) ¹H-NMR.

3.3.9.1 *Liquid Chromatography Mass Spectrometer* (LC-MS/MS)

3.3.9.1.1 Kondisi LC

Identifikasi metabolit dalam sampel dilakukan dengan dua kali injeksi LC-MS. Ekstrak sampel yang diinjeksikan adalah 5 µL per injeksi. Tahapan analisis dimulai dengan menyaring ekstrak sampel yang telah dilarutkan dengan metanol menggunakan *syringe filter* 0,22 µm lalu dimasukkan ke dalam botol vial. Sampel selanjutnya diinjeksikan ke dalam sistem LC. Sistem LC dilengkapi dengan

ACQUITY UPLC® H-Class System (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) (Waters, USA), kolom ACQUITY UPLC® HSS (*High Strength Silica*) C18 (1,8 µm 2.1x100mm) (Waters, USA), fasa gerak meliputi: campuran aquades + 5 mM amonium format (A) dan asetonitril + 0,05 % asam format (B), serta laju alir 0,2 mL/menit (*step gradien*) dan *running* selama 23 menit.

3.3.9.1.2 Kondisi MS

Sistem MS yang digunakan adalah Xevo G2- S QToF (*Two Generation Quadrupole time-of-flight Mass Spectrometry*) (Waters, USA) dilengkapi dengan mode *Electrospray Ionisation Source* (ESI). Ionisasi dilakukan dalam mode ion positif. Kondisi MS yang digunakan sebagai berikut: suhu sumber MS diatur pada 100°C, suhu gas desolvasi diatur pada 350°C dengan aliran gas desolvasi 793 L/jam. Parameter pemindaian penuh MS diatur untuk mengumpulkan massa mulai dari 50 hingga 1200 m/z untuk memperoleh semua puncak massa. Energi tumbukan yang digunakan 4 V untuk pemindaian energi rendah dan 25-60 V untuk pemindaian energi tinggi. Kedua data yang dikumpulkan diatur dalam mode *centroid* dan dikontrol dengan *software* Masslynx V4.1.

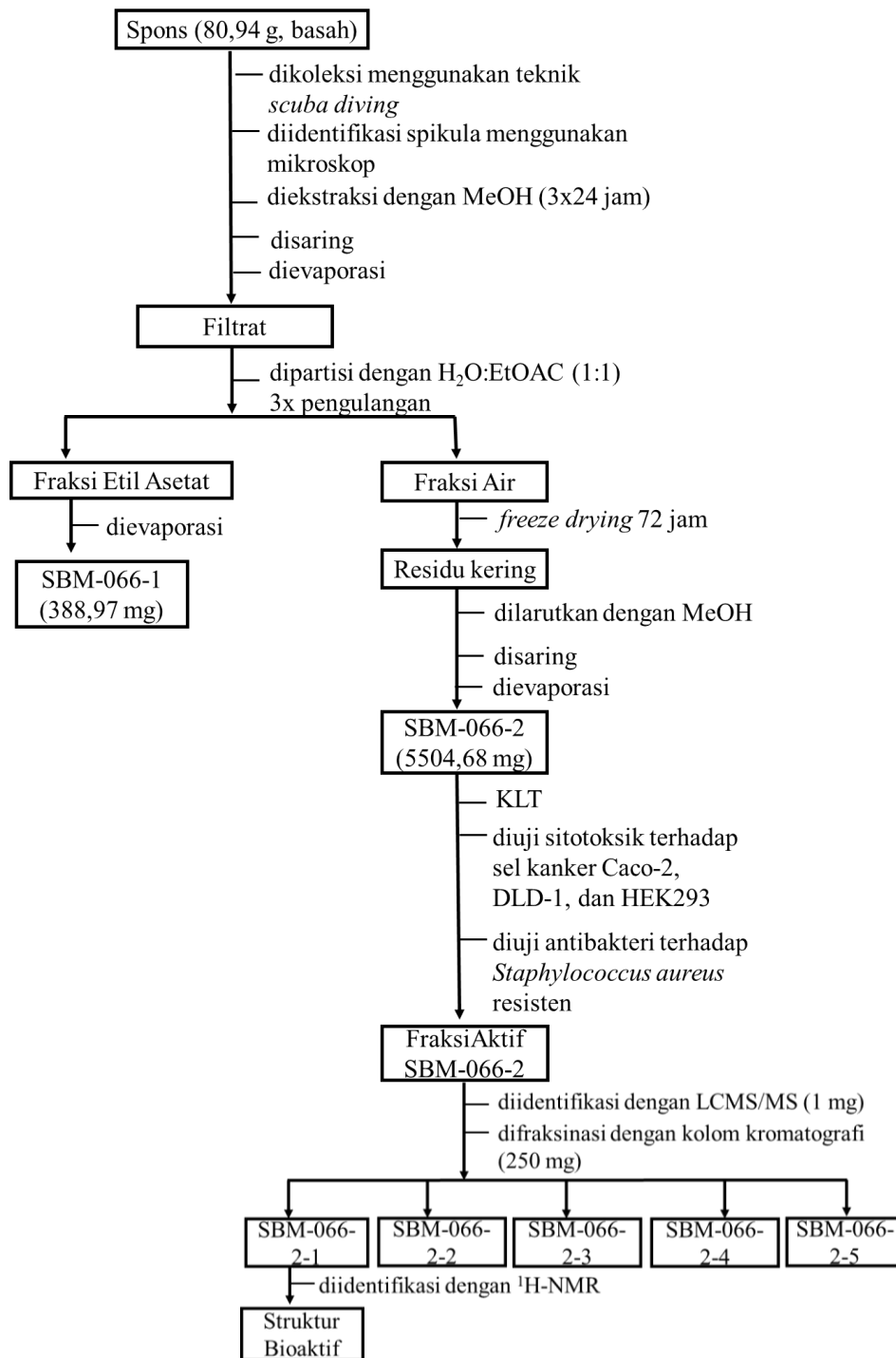
3.3.9.1.3 Data Analisis

Hasil data kromatogram diproses menggunakan MassLynx V4.1. Tahapan analisis dimulai dengan mengkonfirmasi kromatogram dalam bentuk *Base Peak Ion* (BPI) sehingga mudah dibaca dan dianalisis. Setiap puncak dianalisis satu per satu untuk mendapatkan spektra yang akan digunakan untuk mendapatkan rumus molekul yang terkandung di dalamnya. Setiap atom H (hidrogen) pada rumus molekul yang terbaca oleh program dikurangi satu untuk mendapatkan rumus molekul yang sesuai dalam *database*. Hal ini dikarenakan instrumen LC-MS/MS yang digunakan memiliki ion positif. Rumus molekul yang sesuai dengan *database* akan memunculkan nama senyawa dari rumus tersebut. Nama-nama senyawa tersebut dikelompokkan sesuai dengan golongan utamanya menggunakan *database* PubChem (Fitmawati *et al.*, 2019).

3.3.9.2 *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Konfirmasi struktur dilakukan menggunakan ^1H -NMR 500 MHz dengan pelarut metanol- d_4 dan TMS (Tetrametilsilan) sebagai standar. Sampel dianalisis menggunakan spektrofotometer JEOL tipe JNM-ECZ500R/S1.

Secara lengkap diagram alir penelitian dapat dilihat pada **Gambar 9**.



Gambar 9. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Telah berhasil diisolasi senyawa bioaktif jenis alkaloid pada fraksi air (SBM-066-2) yang berasal dari deposit spons *Aaptos* sp. yang berada di Laboratorium Genomik, BRIN Cibinong, Bogor.
2. Fraksi SBM-066-2 memiliki aktivitas sitotoksik sedang sebagai antikanker terhadap sel kanker kolorektal Caco-2 dan DLD-1, tetapi tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel normal HEK293, serta mampu bersifat sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen klinis *S. aureus* yang resisten pada konsentrasi 0,5 mg/mL dengan diameter zona hambat ± 5 mm.
3. Hasil karakterisasi senyawa menggunakan LC-MS/MS dan $^1\text{H-NMR}$ pada fraksi air *Aaptos* sp. (SBM-066-2) menunjukkan bahwa senyawa teridentifikasi sebagai aaptamine.

5.2 Saran

Berdasarkan dari hasil data penelitian, fraksi air SBM-066-2 memiliki potensi sebagai agen antikanker dan antibakteri, maka diperlukan kajian lebih lanjut mengenai mekanisme aksi antikanker dan antibakteri, serta kajian mengenai *Structure-Activity Relationships* (SARs) dari senyawa yang didapatkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi, P., Haruyama, T., Kobayashi, N., Joy De Voogd, N., and Tanaka, J. 2017. Spongian Diterpenes from the Sponge *Hyattella* aff. *inassayinalis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 874: 9.
- Amir, I., dan Budiyanto, A. 1996. Mengenal Spons Laut (Demospongiae) Secara Umum. *Oseana*, XXI(2): 15–31.
- Arai, M., Han, C., Yamano, Y., Setiawan, A., and Kobayashi, M. 2014. Aaptamines, Marine Spongian Alkaloids, as Anti-dormant Mycobacterial substances. *Journal of Natural Medicines*, 68(2): 372–376.
- Baldwin, J. E., and Whitehead, R. C. (1992). On the Biosynthesis of Manzamines. *Tetrahedron Letters*, 33(15): 2059–2062.
- Bamunuarachchi, N. I., Khan, F., and Kim, Y.-M. (2020). Antimicrobial Properties of Actively Purified Secondary Metabolites Isolated from Different Marine Organisms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22(7): 920–944.
- Bayona, L. M., Videnova, M., and Choi, Y. H. (2018). Increasing Metabolic Diversity in Marine Sponges Extracts by Controlling Extraction Parameters. *Marine Drugs*, 16(10).
- Bele, A. A., Khale, A., Archana, M., and Bele, A. (2011). An Overview on Thin Layer Chromatography. *International Journal of Pharmaceutival Sciences and Research*, 2(2): 256–267.
- Beyer, T., Schollmayer, C., and Holzgrabe, U. (2010). The Role of Solvents in The Signal Separation for Quantitative ¹H NMR Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(1): 51–58.
- Cabral, R., Cruz-Trinidad, A., Geronimo, R., and Aliño, P. (2012). Opportunities and Challenges in The Coral Triangle. *Environmental Science and Technology*, 46(15): 7930–7931.
- Cai, L. (2014). Thin layer chromatography. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 6.3.1-6.3.18.

- Calcabrini, C., Catanzaro, E., Bishayee, A., Turrini, E., and Fimognari, C. (2017). Marine Sponge Natural Products with Anticancer Potential: An Updated Review, *Marine Drugs*, 15(10): 310.
- Calcul, L., Longeon, A., Mourabit, A. Al, Guyot, M., and Bourguet-Kondracki, M. L. (2003). Novel Alkaloids of The Aaptamine Class from an Indonesian Marine Sponge of the Genus *Xestospongia*. *Tetrahedron*, 59(34), 6539–6544.
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., and Prinsep, M. R. (2019). Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, 36(1): 122–173.
- Chabowska, G., Barg, E., and Wójcicka, A. (2021). Biological Activity of Naturally derived Naphthyridines. *Molecules*, 26(14): 4324.
- Chen, C., Gonzalez, F. J., and Idle, J. R. (2007). LC-MS Based Metabolomics in Drug Metabolism. *Drug Metabolism Review*, 39(2–3): 581–597.
- Cheng, Y. T., Jouda, M., and Korvink, J. (2022). Sample-centred Shimming Enables Independent Parallel NMR Detection. *Scientific Reports*, 12(1).
- Choma, I. M., and Grzelak, E. M. (2011). Bioautography Detection in Thin-layer Chromatography. *Journal of Chromatography*, 1218(19): 2684–2691.
- Chomnawang, M. T., Surassmo, S., Wongsariya, K., and Bunyapraphatsara, N. (2009). Antibacterial Activity of Thai Medicinal Plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 80(2): 102–104.
- Damasuri, A. R., Sholikhah, E. N., and Mustofa. (2020). Cytotoxicity of ((E)-1-(4-aminophenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one) on HeLa cell line. *Indonesian Journal of Pharmacology and Therapy*, 1(2).
- Damiani, E., Solorio, J. A., Doyle, A. P., and Wallace, H. M. (2019). How Reliable are in Vitro IC₅₀ Values? Values Vary with Cytotoxicity Assays in Human Glioblastoma Cells. *Toxicology Letters*, 302: 28–34.
- Dračínský, M., and Bour, P. (2010). Computational Analysis of Solvent Effects in NMR Spectroscopy. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(1): 288–299.
- Dyshlovoy, S. A., Fedorov, S. N., Shubina, L. K., Kuzmich, A. S., Bokemeyer, C., Keller-Von Amsberg, G., and Honecker, F. (2014). Aaptamines from the Marine Sponge *Aaptos* sp. Display Anticancer Activities in Human Cancer Cell lines and Modulate AP-1-, NF- κ B-, and p53-dependent Transcriptional Activity in Mouse JB6 Cl41 Cells. *BioMed Research International*, 2014: 1–7.

- Esposito, G., Mai, L. H., Longeon, A., Mangoni, A., Durieu, E., Meijer, L., Soest, Van, R., Costantino, V., and Bourguet-Kondracki, M. L. (2019). A Collection of Bioactive Nitrogen-containing Molecules from The Marine Sponge *Acanthostrongylophora ingens*. *Marine Drugs*, 17(8): 472.
- Esposito, R., Federico, S., Bertolino, M., Zupo, V., and Costantini, M. (2022). Marine Demospongiae: A Challenging Treasure of Bioactive Compounds. *Marine Drugs*, 20(4), 3–17.
- Farouk, F., and Shamma, R. (2019). Chemical Structure Modifications and Nano-Technology Applications for Improving ADME-Tox Properties, A Review. *Archiv Der Pharmazie*, 352(2): 1800213.
- Fitmawati, F., Khairunnisa, K., Resida, E., Emrizal, E., and Mustika, R.R. (2019). The Secondary Metabolite Diversity Analysis of Three *Mangifera Foetida* L. Varieties Based on Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). *Journal of Physics: Conference Series*, 1351(1).
- Forcisi, S., Moritz, F., Kanawati, B., Tziotis, D., Lehmann, R., and Schmitt-Kopplin, P. (2013). Liquid Chromatography-mass Spectrometry in Metabolomics Research: Mass Analyzers in Ultra High Pressure Liquid Chromatography Coupling. *Journal of Chromatography*, 1292: 51–65.
- Gan, J. H., Hu, W. Z., Yu, H. B., Yang, F., Cao, M. X., Shi, H. J., Kang, Y. F., and Han, B. N. (2015). Three New Aaptamine Derivatives from The South China Sea Sponge *Aaptos aaptos*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17(12), 1231–1238.
- 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.
- Gathungu, R. M., Kautz, R., Kristal, B. S., Bird, S. S., and Vouros, P. (2020). The Integration of LC-MS and NMR for The Analysis of Low Molecular Weight Trace Analytes in Complex Matrices. *Mass Spectrometry Reviews*, 39(1–2): 35–54.
- 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(23): 12827.
- Glaser, M., Baitoningsih, W., Ferse, S. C. A., Neil, M., and Deswandi, R. (2010). Whose Sustainability? Top-down Participation and Emergent Rules in Marine Protected Area Management in Indonesia. *Marine Policy*, 34(6): 1215–1225.

- Glish, G. L., and Vachet, R. W. (2003). The Basics of Mass Spectrometry in The Twenty-first Century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2):140–150.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., and Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 107.
- Hamada, T., Matsumoto, Y., Phan, C. S., Kamada, T., Onitsuka, S., Okamura, H., Iwagawa, T., Arima, N., Tani, F., and Vairappan, C. S. (2019). Aaptamine-Related Alkaloid from The Marine Sponge *Aaptos aaptos*. *Natural Product Communications*, 14(9): 1934578X19863935.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5): 646–674.
- Hanif, N., Murni, A., Tanaka, C., and Tanaka, J. (2019). Marine Natural Products from Indonesian Waters. *Marine Drugs*, 17(6): 364.
- He, Q., Miao, S., Ni, N., Man, Y., and Gong, K. (2020). A Review of the Secondary Metabolites From the Marine Sponges of The Genus *Aaptos*. *Natural Product Communications*, 15(9): 1934578X20951439.
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M., and Taylor, M. W. (2012). Genomic Insights into The Marine Sponge Microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9): 641–654.
- Hooper, J. N. A., Soest, R. W. M. van., and Willenz, P. (2002). *Systema Porifera : A guide to The Classification of Sponges*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Hutagalung, R. A., Victor, Karjadidjaja, M., Prasasty, V. D., and Mulyono, N. (2014). Extraction and Characterization of Bioactive Compounds from Cultured and Natural Sponge, *Haliclona molitba* and *Stylotella aurantium* Origin of Indonesia. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 14–18.
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Elkhayat, E. S., Fouad, M. A., and Proksch, P. (2013). Sagitol C, A New Cytotoxic Pyridoacridine Alkaloid from The Sponge *Oceanapia* sp. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51(2): 229–232.
- Izzati, F., Warsito, M. F., Bayu, A., Prasetyoputri, A., Atikana, A., Sukmarini, L., Rahmawati, S. I., and Putra, M. Y. (2021). Chemical Diversity and Biological Activity of Secondary Metabolites Isolated from Indonesian Marine Invertebrates. *Molecules*, 26(7).
- Jandera, P. (2011). Stationary and Mobile Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1–2): 1–25.

- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., and Leito, I. (2015). Tutorial Review on Validation of Liquid Chromatography-mass Spectrometry Methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870(1): 29–44.
- Kumar, M. S., Pandita, N. S., and Pal, A. K. (2012). LC-MS/MS as A Tool for Identification of Bioactive Compounds in Marine Sponge *Spongosorites halichondriodes* (Dendy 1905). *Toxicon*, 60(6): 1135–1147.
- Kumar, P., Nagarajan, A., and Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by The MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6): 469–471.
- Kurnianda, V., Wisna, U. J., and Musman, M. (2022). Biodiversity of The Indonesian Marine Sponge Genus *Aaptos* with Molecular Networking Approach. *E3S Web of Conferences*, 339: 03002.
- Lipinski, C. A. (2000). Drug-like Properties and The Causes of Poor Solubility and Poor Permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1): 235–249.
- Lipinski, C. A., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (2001). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46: 3–26.
- Luyao, H., Luesch, H., and Uy, M. (2021). GPCR Pharmacological Profiling of Aaptamine from The Philippine Sponge *Stylissa* sp. Extends Its Therapeutic Potential for Noncommunicable Diseases. *Molecules*, 26(18): 5618.
- Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E., and Ljubimova, J. Y. (2013). Nanomedicine Therapeutic Approaches to Overcome Cancer Drug Resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14): 1866–1879.
- Mazzola, P. G., Lopes, A. M., Hasmann, F. A., Jozala, A. F., Penna, T. C. V., Magalhaes, P. O., Rangel-Yagui, C. O., and Pessoa, A. (2008). Liquid-liquid extraction of biomolecules: An Overview and Update of The Main Techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(2): 143–157.
- Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C., and Zhang, W. (2014). Marine Sponge Derived Natural Products Between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. *Marine Drugs*, 12(8): 4539–4577.
- Meyers, C. L. F., and Meyers, D. J. (2008). Thin-layer Chromatography. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 34(1), A–3D.

- Mohamad, H., Sifzizul Tengku Muhammad, T., Andriani, Y., Bakar, K., Ismail, N., Saidin, J., Latip, J., Musa, N., and Parenrengi, A. (2017). Potential Secondary Metabolites from Marine Sponge *Aaptos aaptos* for Atherosclerosis and Vibriosis Treatments. *Natural Product Communications*, 12(8): 1934578X1701200819.
- Mohd, K. S., Mohamad, H., Saidin, J., and Shaharom, F. (2005). Identification and Chemical Profiling of Marine Sponges from Terengganu Island: A Preliminary Study. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 9(3): 449–452.
- Moo, C.-L., Yang, S.-K., Yusoff, K., Ajat, M., Thomas, W., Abushelaibi, A., Lim, S.-H.-E., and Lai, K.-S. (2019). Mechanisms of Antimicrobial Resistance (AMR) and Alternative Approaches to Overcome AMR. *Current Drug Discovery Technologies*, 17(4): 430–447.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2): 55–63.
- Mukhriani. (2014). Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, VII(2): 361–367.
- Nagasawa, Y., Kato, H., Rotinsulu, H., Mangindaan, R. E., de Voogd, N. J., and Tsukamoto, S. (2011). Spiroamidine, A New Spiroquinone-containing Alkaloid from The Marine Sponge *Leucetta microraphis*. *Tetrahedron Letters*, 52(41), 5342–5344.
- Nakamura, H., Kobayashi, J. I., Ohizumi, Y., and Hirata, Y. (1987). Aaptamines. Novel benzo [de][1, 6] naphthyridines from The Okinawan Marine Sponge. *Journal of the Chemical Society*, 1: 173–176.
- Nakamura, H., Kobayashi, J. I., Ohizumi, Y., and Hirata, Y. (1982). Isolation and Structure of Aaptamine A Novel Heteroaromatic Substance Possessing α -blocking Activity from The Sea Sponge *Aaptos aaptos*. *Tetrahedron Letters*, 23(52): 5555–5558.
- Noguchi, S. (2014). Formulation of The Spherical Harmonic Coefficients of The Entire Magnetic Field Components Generated by Magnetic Moment and Current for Shimming. *Journal of Applied Physics*, 115(16).
- Pham, C. D., Hartmann, R., Müller, W. E. G., De Voogd, N., Lai, D., and Proksch, P. (2013). Aaptamine Derivatives from The Indonesian Sponge *Aaptos suberitoides*. *Journal of Natural Products*, 76(1): 103–106.
- Prashanth, K. N., and Basavaiah, K. (2014). Quantitative Spectrophotometric Determination of Propranolol Hydrochloride in Pharmaceuticals using Cerium(IV) sulphate as Oxidimetric Pereaksit. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section A - Physical Sciences*, 84(1): 27–35.

- Putri, H. R., Kristiana, R., Mudianta, I. W., Setiawan, E., Widyawaruyanti, A., Nuengchamnong, N., Suphrom, N., and Suciati, S. (2023). Metabolite Profile and In vitro Cholinesterase Inhibitory Activity of Extract and Fractions of *Aaptos suberitoides*. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 11(1): 129–136.
- Raal, A., Meos, A., Hinrikus, T., Heinämäki, J., Romāne, E., Gudienė, V., Jakštas, V., Koshovyi, O., Kovaleva, A., Fursenco, C., Chiru, T., and Nguyen, H. T. (2020). Dragendorff's Pereaksit: Historical Perspectives and Current Status of A Versatile Pereaksit Introduced Over 150 Years Ago at The University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Pharmazie*, 75(7): 299–306.
- Rajivgandhi, G., kumar, S. N., Ramachandran, G., and Manoharan, N. (2019). Marine Sponge Alkaloid Aaptamine Enhances The Anti-bacterial and Anti-cancer Activity against ESBL Producing Gram Negative Bacteria and HepG2 Human Liver Carcinoma Cells. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17: 628–637.
- Rashid, F. N. A. A., Asari, A., Mohamad, H., and Mohd Nor, S. M. (2014). Synthesis and Antibacterial Study of Aaptamine Derivatives. *Asian Journal of Chemistry*, 26(20): 6903–6907.
- Reiswig, H. M., and Dohrmann, M. (2014). Three New Species of Glass Sponges (Porifera: *Hexactinellida*) from The West Indies, and Molecular Phylogenetics of Euretidae and Auloplacidae (Sceptrulophora). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 171(2): 233–253.
- Reynolds, W. F., and Mazzola, E. P. (2015). Nuclear Magnetic Resonance in The Structural Elucidation of Natural Products. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 100: 223–309.
- Rosmiati, Parenrengi, A., and Suryati, E. (2015). Marine Sponge *Aaptos subertoides*, Its Potential Source of Natural Antibacterial for Controlling *Vibrio harveyi* on Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Culture. *Indonesian Aquaculture Journal*, 10(1), 33–40.
- Rowe, F. W. E., and Doty, J. E. (1977). *The Shallow Water Holothurians of Guam*
- 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.
- Samirana, P. O., Jenie, R. I., Murti, Y. B., and Setyowati, E. P. (2022). Application of Metabolomics on Marine Sponges and Sponge-associated microorganisms: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(7): 18–33.

- Septisetyani, E. P., Ningrum, R. A., Romadhani, Y., Wisnuwardhani, P. H., and Santoso, A. (2014). Optimization of Sodium Dodecyl Sulfate as A Formazan Solvent and Comparison of 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) Assay with WST-1 Assay in MCF-7 Cells. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 25(4), 245.
- Setiawan, A., Lutfiah, R., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Hendri, J., and Arai, M. (2022). Antibacterial Activity of EtOAc Extract from Marine-derived Fungus *Aspergillus nomiae* A12-RF against Clinical Pathogen Bacteria, *Staphylococcus aureus*. *AAFL Bioflux*, 15(3): 1413–1421.
- Sun, X. H., Zhao, R. P., Chen, Y., Li, S., and Tang, W. Z. (2020). Polyacetylenic Alcohols and Alkaloid Derivatives from A Calcareous Marine Sponge, *Leucetta chagosensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 88.
- Utkina, N., Likhatskaya, G., Malyarenko, O., Ermakova, S., Balabanova, L., Slepchenko, L., and Bakunina, I. (2021). Effects of Sponge-derived Alkaloids on Activities of The Bacterial α -d-Galactosidase and Human Cancer Cell α -n-acetylgalactosaminidase. *Biomedicines*, 9(5).
- van der Zanden, S. Y., Qiao, X., and Neefjes, J. (2021). New Insights into The Activities and Toxicities of The Old Anticancer Drug Doxorubicin. *FEBS Journal*, 288(21): 6095–6111.
- Varijakzhan, D., Loh, J. Y., Yap, W. S., Yusoff, K., Seboussi, R., Lim, S. H. E., Lai, K. S., and Chong, C. M. (2021). Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. *Marine Drugs*. 19(5): 256.
- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., and Li, M. (2021). Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A review. *Antibiotics*, 10(3): 318.
- Yina, Z., Zhu, M., Davidson, E. H., Bottjer, D. J., Zhao, F., and Tafforeau, P. (2015). Sponge Grade Body Fossil with Cellular Resolution Dating 60 Myr before The Cambrian. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(12): E1453–E1460.
- Zeki, Ö. C., Eylem, C. C., Reçber, T., Kır, S., and Nemetlu, E. (2020). Integration of GC–MS and LC–MS for Untargeted Metabolomics Profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 190.
- Zeng, Q., Chen, J., Lin, Y., and Chen, Z. (2020). Boosting Resolution in NMR Spectroscopy by Chemical Shift Upscaling. *Analytica Chimica Acta*, 1110: 109–114.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., and Ye, W. C. (2018). Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1).

Žuvela, P., Skoczylas, M., Jay Liu, J., Baczek, T., Kaliszan, R., Wong, M. W., and Buszewski, B. (2019). Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*, 119(6): 3674–3729.

Żwir-Ferenc, A., and Biziuk, M. (2006). Solid Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies* ·, 15(5): 677–690.