

## Toxicity and Apoptosis Test of 96% Ethanol Extract of *Agelas Cavernosa* on Vero Cells

Khafid Mahbub<sup>1\*</sup>, Siska Rusmalina<sup>2</sup>, Anik Indriono<sup>3</sup>, Mahfur<sup>1,3</sup>, Rixzal Azis Julian<sup>1</sup>, Dina Achada Maulidya<sup>1</sup>, Ika Vina Dika<sup>1</sup>, Salis Alyatur Rohmaniah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Pekalongan, Pekalongan, Indonesia;

<sup>2</sup>Program Studi D3 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Pekalongan, Pekalongan, Indonesia;

<sup>3</sup>Program Studi S1 Keperawatan, Fakultas Ilmu kesehatan, Universitas Pekalongan, Pekalongan, Indonesia;

### Article History

Received : December 19<sup>th</sup>, 2024

Revised : December 26<sup>th</sup>, 2024

Accepted : January 19<sup>th</sup>, 2025

\*Corresponding Author:

**Khafid Mahbub**, Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Pekalongan, Pekalongan, Indonesia;

Email:

[khafidmahbub1212@gmail.com](mailto:khafidmahbub1212@gmail.com)

**Abstract:** *Agelas cavernosa* sponge is a sponge from the Demospongiae class which includes 90% of all types of sponges. *Agelas cavernosa* sponge is known to have antibacterial activity. Research data on the toxicity and apoptosis test of *Agelas cavernosa* sponge on vero cells as far as researchers know has not been tested. The purpose of this study was to determine the toxicity and apoptosis of *Agelas cavernosa* ethanol extract. The research method was carried out using the MTT Assay method for toxicity testing and the flowsitometry method for apoptosis testing. Alkaloids, flavonoids, saponins, terpenoids, and polyphenols were all detected in the *Agelas cavernosa* ethanol extract, according to the results of phytochemical screening. The apoptosis test yielded vero cell viability of 82.2%, whereas the toxicity test yielded an LC50 value for vero cells of 197.84 ppm.

**Keywords:** *Agelas cavernosa*, apoptosis, toxicity, vero cells.

### Pendahuluan

Indonesia termasuk negara kepulauan terbesar karena dua pertiga wilayahnya merupakan wilayah lautan. Diperkirakan terdapat lebih dari 35 ribu spesies keanekaragaman hayati yang berasal dari laut Indonesia dengan ratusan senyawa bioaktif yang telah diisolasi. Invertebrata laut merupakan penghasil senyawa bioaktif yang tinggi karena memproduksi senyawa metaboli sekunder (Putra, 2023). Lebih banyak zat kimia bioaktif ditemukan dalam spons daripada zat bioaktif berbasis tanaman (Lumempaw *et al.*, 2023). Salah satu jenis makhluk laut adalah spons. Filum Porifera, yang mencakup spons, dibedakan oleh tubuhnya yang berpori dan kemampuan menyaring makanan.

Salah satu spons berasal dari laut Indonesia yaitu *Agelas cavernosa* yang termasuk ke dalam kelas Demospongiae yang merupakan kelas terbesar 90% dari semua jenis spons dan telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri

(Aristiyawan *et al.*, 2017). Spons diketahui memiliki senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid dan steroid yang memiliki beragam aktivitas biologis sebagai sitotoksik dan antiviral (Putra, 2023). Spons laut menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan untuk membunuh sel kanker karena merupakan sumber molekul baru dengan aksi farmakologis atau kualitas berbahaya. Tujuan pengujian toksisitas adalah untuk memastikan efek berbahaya suatu senyawa guna menilai keamanan bahan tersebut untuk penggunaan potensial sebagai obat. Prinsip dari uji toksisitas yaitu bahwa kandungan senyawa bioaktif yang tinggi akan bersifat toksik sedangkan dalam kadar lebih rendah dapat bersifat sebagai obat (Jelita *et al.*, 2020). Uji ini dapat dilakukan dengan metode MTT.

Hasil penelitian Wirmandhiyanti *et al.*, (2013) dari ekstrak spons *Haliclona fascigera* terhadap larva *Artemia salina* L menunjukkan fraksi 5 (F5) mempunyai toksisitas paling tinggi dengan LC50 89,13 ppm. Identifikasi isolate toksik Fs dengan GCMS menunjukkan senyawa

mengandung 2-decenal, 3-eicosene, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanon, dibutil-1,2-benzendikarboksilat, asam heksadekanat, 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide dan dioktil-1,2-benzendikarboksilat.

Hasil penelitian Sondakh *et al.*, (2017) menunjukkan Larva dapat dibunuh secara berurutan dengan beban konsentrasi ekstrak dalam media sebesar 1000 µg/ml, 500 µg/ml, dan 250 µg/ml. Nilai LC<sub>50</sub> ekstrak spons laut, sebagaimana ditentukan oleh analisis probit, adalah 992,468 µg/mL. Alkaloid dan steroid ditemukan dalam ekstrak metanol spons *Haliclona* sp., yang ditemukan bersifat toksik dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 70,1 ppm ketika diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT (Kurniawan, 2021). Selain itu, hasil uji antikanker terhadap sel HeLa dengan metode BSLT oleh spons *Callyspongia aerizusa*, *Haliclona fascigera*, dan *Lanthella basta* memperlihatkan spons *Callyspongia aerizusa* bersifat antikanker dengan LC<sub>50</sub> sebesar 5,5 ppm. Spons *Lanthella basta* memiliki LC<sub>50</sub> sebesar 18,62 ppm, sehingga bersifat antikanker, tetapi spons *Haliclona fascigera* memiliki LC<sub>50</sub> sebesar 44,67 ppm (Swantara, 2013). Namun sejauh penelitian mengenai spons *Agelas cavernosa* belum pernah diteliti mengenai toksisitas dan apoptosis yang dihasilkan.

Crambescidin 800 (C800) dari spons laut *Monanchora viridis* memiliki efek sitotoksik pada lini sel kanker payudara triple negatif (TNBC), menurut temuan studi yang dilakukan oleh Shrestha *et al.* (2018). Lebih jauh lagi, sel-sel TNBC mengekspresikan lebih sedikit siklin D1, CDK4, dan CDK6 sebagai akibat dari penangkapan siklus sel yang diinduksi C800 pada fase G2/M. Pada sel-sel TNBC (T11 dan SUM159PT), dampak ini dikaitkan dengan apoptosis sebagai akibat dari pengurangan fosforilasi jalur Akt/mTOR, NF-κB, dan MAPK. Menurut temuan studi Bashari *et al.*, (2019) ekstrak *Stylissa carteri* menyebabkan apoptosis pada sel-sel HCC-1954 dan mencegah pembentukan sferoid. Di antara beberapa bahan kimia tambahan yang ditemukan dalam ekstrak *S. carteri* adalah 1,2-Benzenediol, Dibutyl phthalate, asam 9,12-Octadecadienoic, dan etil ester.

Salah satu zat yang diduga dapat menyebabkan kanker adalah dibutil ftalat. Zat ini menyebabkan sel kanker payudara berkembang

baik dan menginvasi. Lebih jauh lagi, asam lemak 9,12-Octadecadienoic acid menyebabkan sel glioma dan neuroblastoma manusia mati. Menurut temuan sebuah penelitian oleh Tang *et al.*, (2018), smenospongine (Sme), seskuiterpen aminoquinon alami yang diekstrak dari spons laut *Spongia pertusa* Esper, menghambat pertumbuhan sel yang menyerupai CSC dengan menyebabkan apoptosis intrinsik dan penangkapan G0/G1 dengan meningkatkan kadar fosforilasi p38 dan AMPKα.

Metode paling umum untuk menilai sitotoksitas sel adalah Uji MTT, yang juga dikenal sebagai 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida. Dengan mendeteksi aktivitas enzim mitokondria yang terlarut dalam PBS biru, yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500–600 nm, metode ini bertujuan untuk memastikan kelangsungan hidup sel (Kalangit dan Octarina, 2024). Konsentrasi formazan yang berwarna biru berbanding lurus dengan jumlah sel hidup (Mosmann, 1983). Metode ini memiliki kelebihan seperti kemudahan dan keamanan dalam penggunaannya, serta sering digunakan untuk menilai viabilitas sel dan uji sitotoksitas (Aslantürk *et al.*, 2017).

Tingkat kematian sel dapat diketahui melalui mekanisme apoptosis sel. Apoptosis sel lebih dikenal juga dengan kematian sel yang terprogram. Reseptor kematian (jalur ekstrinsik) dan mitokondria (jalur intrinsik) adalah dua cara dimulainya apoptosis sel. Mekanisme fisiologis berfungsi untuk membasmi sel-sel yang tidak diinginkan selama proses pertumbuhan sel berdampak pada apoptosis sel. Kondensasi kromatin, kerusakan membran plasma, dan penyusutan sel merupakan indikator parameter apoptosis sel (King 2000). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas dan apoptosis spons *Agelas cavernosa* pada sel vero dengan metode MTT Assay serta untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Sehingga dapat dijadikan sebagai sumber bahan terapi farmakologi suatu penyakit yang berasal dari laut.

## Bahan dan Metode

### Bahan penelitian

Bahan penelitian adalah Spons *Agelas cavernosa* yang diambil dari Gili Layar NTB,

Indonesia, etanol 96%, aquadest, Dimetil sulfoksida (DMSO), DMEM, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), M199, trypsin-0.25%, dan Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) tanpa CaCl<sub>2</sub> dan MgCl<sub>2</sub>.

## Metode penelitian

### Identifikasi Spons

Sampel spons diidentifikasi di Laboratorium produk alam laut, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia.

### Ekstraksi Spons *Agelas cavernosa*

Ekstraksi sampel spons *Agelas cavernosa* menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% pada suhu kamar selama 24 jam. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali dengan pelarut yang sama. Menguapkan ekstrak etanol menggunakan rotary evaporator vakum hingga diperoleh ekstrak kental, lalu dikeringkan menggunakan waterbath dan menghitung rendemennya (Mukhriani, 2014).

## Uji Fitokimia

### Uji flavonoid

20 mg ekstrak spons *Agelas cavernosa* ditambah dengan beberapa tetes NaOH 10% dan diamati perubahan warna yang terjadi (Simaremare, 2014).

### Uji alkaloid

20 mg ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* ditambah larutan HCl dan larutan *Dragendroff*. Amati perubahan warna dan endapan yang terbentuk (Simaremare, 2014).

### Uji terpenoid dan steroid

g ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* ditambah beberapa tetes larutan Liebermann burcang, amati perubahan warna yang terjadi (Simaremare, 2014).

### Uji saponin

20 mg ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa*, tambahkan 20 mL air panas dan kocok secara vertical. Amati busa yang terbentuk (Simaremare, 2014).

### Uji polifenol

Menambahkan 20 mg ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* dengan 10 tetes FeCl 1% dan

diamati perubahan warna yang terjadi (Simaremare, 2014).

## Uji toksisitas

### Propagasi Sel

Mengambil sel vero dari nitrogen cair kemudian diamkan hingga cair. Memindahkan ke tube 15mL dan menambahkan PBS sampai 10 mL. tube disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Supernatant dibuang, pellet ditambahkan media komplete sampai 10 mL. kemudian dikultur pada cawan petri dan dipelihara dalam incubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C.

### Platting

Sel vero yang sudah di konvuls dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 5 mL, diulangi sebanyak 2 kali hingga sisa media komplete hilang. Tambahkan tripsin 0,1% sebanyak 2 mL dan diinkubasi selama 3-5 menit. Sesekali diamati dibawah mikroskop dan digoyangkan untuk membantu pelepasan sel. Sel yang sudah terlepas dimasukkan pada tube 15 mL dengan media komplete sebanyak 2 mL dan PBS sampai 10 mL. tube disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, tube ditambahkan media komplete 1-3 mL, kemudian disuspensikan sel dan dihitung kepadatan sel menggunakan hemositometer. Sel yang telah ditentukan kepadatannya dimasukkan ke dalam tube tambahkan media komplete sampai 15 mL kemudia disuspensikan kembali dan di platting di dalam sumuran microplate 96 well sebanyak 100µm pada tiap sumuran diinkubasi selama 24 jam.

### Preparasi sampel dan pengenceran

Menimbang ekstrak etanol *Agelas cavernosa* 10 mg (diperoleh 6,7 mg) dilarutkan dengan DMSO 100µL. media diencerkan dengan konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25 ppm.

### Treatment

Membuang media pertumbuhan sel sebelumnya, dibilas dengan PBS sebanyak 100µL dan dimasukan 100µL media yang telah dicampur dengan ekstrak dengan masing-masing

konsentrasi yang telah dibuat. Tiap microplate diberi control sel dan diinkubasi selama 24 jam dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%.

#### Proses MTT Assay

Larutan treatment dalam microplate dibuang setelah proses inkubasi. Dimasukkan larutan MTT (1 mL + 9 mL media) sebanyak 100µL dalam tiap sumuran. Diinkubasi kembali selama 4 jam untuk melihat reaksi sel. Pemberhentian proses MTT dilakukan dengan memberikan SDS 10% sebanyak 100µm tanpa membuang MTT. Microplate disimpan di dalam box pada suhu ruang selama satu malam.

#### Uji Apoptosis

##### Preparasi sampel

Tripsinasi sel pada microplate 6 well dengan dengan Tripsin-EDTA 0,25%, di resuspensi pada media kultur lengkap dan dipindahkan pada tabung 15 mL, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit, dibuang supernatant dan diresuspensi Kembali pelet dengan PBS sebanyak 2 mL.

##### Pewarnaan

Ambil 50 µl dari 1 ml larutan sampel & masukkan pada microtube 1,5 ml yang berisi 500 µl PBS, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Resuspensi sel pada 50 µl larutan pewarna AnnV-PI pada PBS (1 µl larutan stok Annexin V (2.5 mg/ml) ; 1 µl larutan stok PI (2.5 mg/ml) ; 50 µl PBS 1X). Diinkubasi selama 40 menit pada suhu 37°C, diambahkan 3 ml PBS, peletkan sel (1500 rpm, 5 menit) dan buang supernatant. Diresuspensi sel pada 500 µl PBS untuk analisis dengan Flowsitometri.

#### Analisis data

##### Uji Toksisitas

Hasil pembacaan treatment dilakukan menggunakan instrument elisa/microplate reader dengan output berupa data absorbansi pada tiap sumuran, hasil yang diperoleh digunakan untuk menentukan LC50.

##### Uji Apoptosis

Data hasil penelitian ini dianalisis untuk mengetahui jumlah sel yang hidup dari kematian sel yang telah terprogram menggunakan instrumen flowsitometri.

#### Hasil dan Pembahasan

##### Identifikasi spons

Hasil analisis dari laboratorium menunjukkan spons yang digunakan adalah spons *Agelas cavernosa* dengan susunan taksonomi masuk dalam kelas Demospongiae.

##### Ekstraksi spons *Agelas cavernosa*

Spons *Agelas cavernosa* sebanyak 408,87g berat basah diekstraksi dengan metode perendaman (maserasi) menggunakan pelarut etanol 96%. Berat ekstrak yang diperoleh sebanyak 11,82 gram, sehingga rendemen yang diperoleh adalah 2,89% terhadap berat basah sampel.

##### Skrining fitokimia

Hasil uji skrining fitokimia ekstrak etanol *Agelas cavernosa* tersaji pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil uji skrining fitokimia ekstrak etanol *Agelas cavernosa*

Pengujian	Pereaksi	Hasil teori	Hasil uji	Ket
Alkaloid	Hcl + Dragendroff	Merah bata	Merah bata	Positif (+)
Flavonoid	NaOH 10%	Kuning pekat, coklat	Kuning kecoklatan	Positif (+)
Polifenol	FeCl <sub>3</sub> 1%	Coklat, biru, atau hijau kehitaman	Coklat pekat	Positif (+)
Saponin	Air panas	Terbentuk busa stabil 1-10 cm	Busa 1,8 cm (stabil)	Positif (+)
Steroid	Liebemann-burchand	Biru, hijau	Merah kecoklatan	Negatif (-)
Terpenoid	Liebemann-burchand	Merah kecoklatan, ungu	Merah kecoklatan	Positif (+)

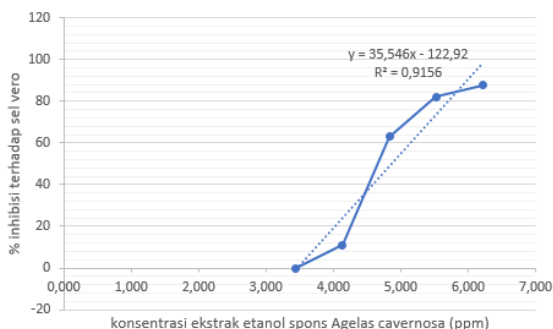
#### Uji toksisitas

Hasil uji toksisitas ekstrak etanol 96% spons *Agelas cavernosa* terhadap sel Vero pada Tabel 2. Sel Vero dengan viabilitas sel pada konsentrasi 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL,

200 µg/mL dan 250 µg/mL memiliki persentase inhibisi sel masing-masing sebesar 0%, 10,88%, 62,98%, 81,98%, dan 87,66%. Adapun persamaan regresi yang diperoleh ditampilkan pada gambar 1.

**Tabel 2.** Data toksisitas ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* terhadap sel vero

Konsentrasi	% Viabilitas sel hidup	% Inhibisi
31,25	100,00	0
62,5	89,13	10,88
125	37,02	62,98
250	18,02	81,98
500	12,34	87,66



**Gambar 1.** Grafik data toksisitas ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* terhadap sel vero

### Uji Apoptosis

Pengukuran perubahan morfologi sel menggunakan flowsitometri adalah dengan mencari perubahan pada forward (FSC) dan side scatter (SSC). Saat sel mengalami apoptosis, FSC dan SSC akan berkurang, sedangkan sel yang nekrosis awalnya membengkak sebelum akhirnya terjadi pemecahan. Namun, FSC dan SSC tidak akan selalu memungkinkan untuk membedakan antara sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis, jadi dalam menggunakan metode ini harus dengan kehati-hatian. Hasil uji Apoptosis ekstrak etanol 96% spons *Agelas cavernosa* terhadap sel Vero dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil yang diperoleh akan tertera dan divisualisasikan secara selektif karakteristik dari masing-masing sel sebagai hasil eliminasi dari partikel yang tidak diinginkan.

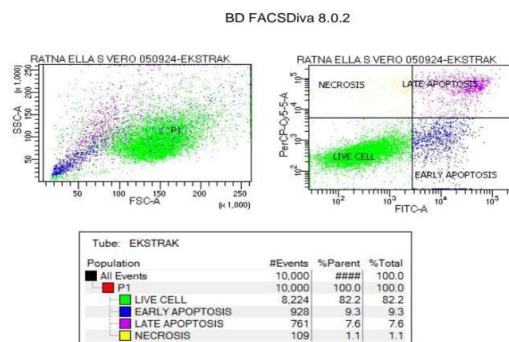
### Analisis data

#### Uji toksisitas

Hasil analisis data dari uji toksisitas dihasilkan nilai LC50 terhadap sel vero sebesar 197,84 ppm.

#### Uji Apoptosis

Hasil analisis data dari uji apoptosis dihasilkan viabilitas sel vero sebesar 82,2%.



**Gambar 2.** Hasil pengujian apoptosis ekstrak etanol *Agelas cavernosa* terhadap sel vero

### Pembahasan

#### Identifikasi spons

Hasil identifikasi determinasi yang diperoleh menunjukkan sampel spons merupakan spons *Agelas cavernosa*. Hal tersebut berkesesuaian dengan referensi yang sudah ada yaitu di kepulauan Lombok Indonesia banyak memiliki keanekaragaman sponge yang masuk dalam famili Demospongiae (Kurnianda *et al.*, 2018; Van Soest, 1989).

#### Ekstraksi spons

Jumlah rendemen pada proses ekstraksi sebesar 2,89% terhadap berat basah sampel spons. Hasil rendemen yang didapatkan lebih besar dibandingkan dengan penelitian sebelumnya pada ekstrak *Agelas cervicornis* yaitu sebesar 1,64% (Denatri *et al.*, 2023). Perbedaan jumlah rendemen yang dihasilkan dipengaruhi oleh kepolaran pelarut (Mahbub *et al.*, 2023). Penggunaan pelarut yang berbeda pada penelitian sebelumnya mempengaruhi jumlah rendemen yang dihasilkan. Persentase jumlah rendemen yang dihasilkan menunjukkan komponen senyawa bioaktif pada ekstrak (Mahbub *et al.*, 2023).

#### Skrining fitokimia

##### Uji Alkaloid

Berdasarkan hasil uji alkaloid, sampel tersebut mengandung alkaloid. Garam bismut yang mudah terhidrolisis membentuk ion bismutyl (BiO+), adanya endapan merah atau jingga yang terbentuk selama penyiapan reagen dragendorff dimana bismut nitrat dilarutkan dengan HCl untuk mencegah reaksi hidrolisis menunjukkan hasil uji alkaloid positif (Marliana,

2005 dalam Pardede.A, 2013). Penambahan HCL 2N bertujuan untuk mengeliminasi protein.

#### *Uji Flavonoid*

Proses oksidasi-reduksi antara sampel flavonoid dengan logam magnesium sebagai reduktor menghasilkan warna kuning, yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* positif mengandung flavonoid (Fauziah, 2008). Uji dengan NaOH 10% Pergeseran warna akan terjadi ketika beberapa tetes NaOH 10% ditambahkan untuk melakukan uji fitokimia ini. Zat kimia Kristin, turunan senyawa flavon, terurai menjadi molekul asetofenon akibat reagen NaOH 10% yang bertindak sebagai katalis basa, yang menyebabkan perubahan (Theodora *et al.*, 2019).

#### *Uji Polifenol*

Ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* positif mengandung polifenol dengan terbentuknya warna coklat kehitaman. Terbentuk warna coklat, biru, atau hijau karena penambahan  $\text{FeCl}_3$  10% pada pengujian polifenol.

#### *Uji Saponin*

Ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* positif mengandung saponin karena ada busa permanen dengan ketinggian 1,8 cm saat digojog bersama air dan penambahan HCl 2N. Saponin pada saat digojok terbentuk buih karena adanya gugus hidrofil berikatan dengan air (Simaremare, 2014).

#### *Uji Steroid dan terpenoid*

Ekstrak diencerkan dalam kloroform dan kemudian dicampur dengan reagen Liebermann-Bouchard (asam asetat anhidrat- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) untuk uji steroid dan triterpenoid. Uji terpenoid menghasilkan hasil positif, sedangkan uji steroid menghasilkan hasil negatif. Sementara asam sulfat menghidrolisis air, yang kemudian bergabung dengan turunan asetil untuk menghasilkan cincin kecokelatan yang menunjukkan adanya fitosterol, asam asetat glisial ditambahkan dengan tujuan membentuk turunan asetil (Meigaria *et al.*, 2016).

#### *Uji Toksisitas*

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan nilai  $\text{LC}_{50}$ , yaitu konsentrasi yang dapat membunuh 50% sel dari populasinya.

Toksisitas ekstrak etanol *Agelas cavernosa* terhadap sel vero dapat dipastikan menggunakan nilai  $\text{LC}_{50}$ . Setelah sel vero diwarnai menggunakan metode uji MTT dan dianalisis menggunakan pembaca ELISA, nilai  $\text{LC}_{50}$  ditentukan. Garis sel ginjal monyet hijau Afrika (*Cercopithecus aethiops*) adalah sumber sel vero ini. Sel-sel mempertahankan interaksi penghambatannya karena mereka tetap tidak berubah. Sel-sel ini berhenti berkembang biak dan mulai binasa saat mereka bersentuhan dengan penghambatan. Karena sel vero mengembangkan lapisan tunggal yang konfluen, sangat penting untuk memantau dan mensubkulturinya. Kultur sel vero yang tumbuh secara aktif berlipat ganda kira-kira setiap 24 jam.

Reduksi garam tetrazolium kuning MTT oleh sistem reduktase merupakan ide mendasar di balik teknik pengujian MTT. Semakin banyak sel hidup, semakin pekat warna ungu yang dihasilkan oleh reagen MTT, yang berubah menjadi ungu saat terpapar pada sel hidup dan tidak larut dalam air. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa saat MTT terpapar pada sel hidup, ia berubah menjadi suksinat tetrazolium, garam formazan yang merupakan komponen rantai pernapasan mitokondria dan menghasilkan enzim dehidrogenase, yang membentuk kristal formazan. Hipotesis dari penelitian ini terbukti bahwa ekstrak etanol *Agelas cavernosa* terhadap sel vero memiliki nilai toksisitas  $\text{LC}_{50}$  toksik. Nilai viabilitas sel terbesar secara berurutan yang dihasilkan adalah konsentrasi 31,25ppm, 62,5ppm, 125ppm, 250ppm, dan 500ppm dengan hasil masing-masing sebesar 100%, 89,13%, 37,02%, 18,02%, dan 12,34% dengan nilai  $\text{LC}_{50}$  sebesar 197,84 ppm termasuk ke dalam kategori toksik (Meyer, 1982).

Temuan penelitian menunjukkan bahwa semakin banyak ekstrak etanol *Agelas cavernosa* yang digunakan, semakin sedikit warna ungu yang dihasilkan; warna ungu merupakan ukuran jumlah sel hidup (Senthilraja & Kathiresan, 2015). Garam tetrazolium dimetabolisme oleh enzim dehidrogenase dalam mitokondria sel hidup, yang memecah cincin tetrazolium dan mengubah tetrazolium menjadi formazan ungu yang larut dalam air (Haryoto *et al.*, 2013). Artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol *Agelas cavernosa* maka tingkat kematian sel vero semakin besar.

## Uji Apoptosis

Flow cytometer digunakan untuk mengevaluasi sel vero untuk apoptosis. Melalui perubahan pada membran plasma, propidium iodida (PI) dan Annexin V sering digunakan untuk mengidentifikasi apakah sel nekrotik, apoptotik, atau hidup (Rieger *et al.*, 2011). Inti sel dapat diwarnai dengan PI. Permeabilitas membran menentukan kapasitas PI untuk memasuki sel; karena membran plasma utuh, PI tidak dapat mewarnai inti sel hidup atau sel yang mengalami apoptotik dini (Vermees *et al.*, 2000). Annexin V adalah protein yang bergantung pada kalsium yang dapat mengikat fosfatidilserin (PS). Permeabilitas membran plasma akan menurun jika sel mendekati akhir apoptosis dan nekrosis. Hal ini akan memungkinkan PI melewati membran, memasuki inti sel, dan menciptakan fluoresensi merah (Rieger *et al.*, 2011).

Fluoresimetri juga akan memungkinkan untuk mendeteksi perubahan morfologi sel dengan lebih akurat. Selain perubahan morfologi, fase akhir apoptosis juga dapat dicirikan oleh fragmentasi DNA. Setiap titik pada plot ini mewakili satu sel secara individual, sel yang dilihat dapat ditentukan jenis dan juga ukurannya, namun juga akan di plotkan berdasarkan kelompoknya masing-masing. Hasil uji apoptosis menggunakan flowsitometri didapatkan jenis dan hasil plot per karakteristik sel yang disajikan dalam grafik 4 bilik dan diberi perlakuan. Kompartemen flowsitometri dapat menganalisis dan memproses sekitar 10.000 sel dalam waktu kurang dari satu menit. Sel vero yang telah dikelompokkan meliputi 4 populasi, yaitu sel sehat sebanyak 82,2%, apoptosis awal sebanyak 9,3%, apoptosis akhir sebanyak 7,6% dan nekrosis sebanyak 1,1%.

## Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa* bersifat toksik karena memiliki LC50 197,84 ppm dan memiliki viabilitas sel vero pada uji apoptosis sebesar 82,2%.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis sampaikan kepada DRTPM Kementerian Pendidikan, Kebudayaan,

Riset, dan Teknologi yang telah mendanai kegiatan penelitian ini.

## Referensi

- Aristyawan, D. A., Sugianto, N. E., & Suciati. (2017). Potensi Antibakteri dari Ekstrak Etanol Spons.pdf. In *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia* (Vol. 4, pp. 39–43).
- Aslantürk, Ö., Çelik, T., Karabey, B., & Karabey, F. (2017). Active phytochemical detecting, antioxidant, cytotoxic, apoptotic activities of ethyl acetate and methanol extracts of *Galium aparine* L. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 15(6), 1-16. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2017/32762>
- Bashari, M. H., Huda, F., Tartila, T. S., Shabrina, S., Putri, T., Qomarilla, N., Atmaja, H., Subhan, B., Sudji, I. R., dan Meiyanto, E. (2019). Bioactive Compounds in the Ethanol Extract of Marine Sponge *Stylissa carteri* Demonstrates Potential Anti-Cancer Activity in Breast Cancer Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 20(4), 1199–1206. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.4.1199>
- Denatri, A. H., Maisaroh, D. S., Kartika, A. G. D., Susanti, O., & Munir, M. (2023). Antibacterial activities of the extracts of sponge *Agelas cervicornis* against bacteria *Staphylococcus aureus*. *Journal of Marine Resources and Coastal Management*, 4(2), 1-6. [10.29080/mrcm.v4i2.1592](https://doi.org/10.29080/mrcm.v4i2.1592). <https://doi.org/10.29080/mrcm.v4i2.1592>
- Haryoto, Muhtadi, Indrayudha, P., Azizah, T., Suhendi, A., & Haryoto, Muhtadi, Peni Indrayudha, Tanti Azizah, A. S. (2013). Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn) Terhadap Sel HeLa, T47D dan WiDR. *Jurnal Penelitian Saintek*, 18, 21–28.
- Jelita, S. F., Setyowati, G. W., & Ferdinand, M. (2020). Uji toksisitas infusa *acalypha siamensis* dengan metode brine shrimp lethality test (bslt). *Farmaka*, 18(1), 14-22.
- Kalangit, R. B. (2024). Metode uji sitotoksitas biomaterial dengan bentuk scaffold padatan dan berpori spons. *Jurnal Kedokteran Gigi Terpadu*, 6(1), 53-56.

- <https://doi.org/10.25105/jkgt.v6i1.20886>  
Kurnianda, V., Ramadhan, M. R., Karina, S., Agustina, S., Ulfah, M., Octavina, C., Mardiah, A., Syahliza, F., & Purnawan, S. (2018). An indole alkaloid produced by Indonesian's marine sponge *Raspailia ramosa* as an inhibitory of the panc-1 cell adapted to nutrient starvation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 216(1). <https://doi.org/10.1088/17551315/216/1/012042>
- Kurniawan, M. R., Sapar, A., & Aritonang, A. B. (2021). Uji toksisitas dan uji fitokimia spons *Haliclona* sp. asal pulau lemukutan kabupaten bengkayang kalimantan barat. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 9(1).
- Mahbub, K., Walid, M. ., Mutiananda, F., & Fatoni, N. (2023). Formulasi Sediaan Mouthwash Ekstrak Daun Bakau (*Rhizophora Apiculata* Blum). *Jurnal Farmasetis*, 12(3), 277–284. <https://doi.org/10.32583/far.v12i3.960>
- Meigaria, K. M., Mudianta, I. W., & Martiningsih, N. W. (2016). Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan ekstrak aseton daun kelor (*Moringa oleifera*). *Wahana Matematika dan Sains: Jurnal Matematika, Sains, dan Pembelajarannya*, 10(2), 1-11.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E.Jacobsen, L.B., Nichols, D.E, And McLaughlin, J.L. (1982). Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica* 45 (05): 31–34. [10.1055/s-2007-971236](https://doi.org/10.1055/s-2007-971236)
- 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. [https://doi.org/10.1016/00221759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/00221759(83)90303-4)
- Tetti, M. (2014). Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2). <https://doi.org/10.24252/kesehatan.v7i2.55>
- Putra, M. Y. (2023). *Keanekaragaman Senyawa Bahan Alam dari Invertebrata Laut Indonesia dan Potensinya sebagai Bahan Baku Obat* (1st ed.). Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), pp:7-8
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (50), 2597. <https://doi.org/10.3791/2597>
- Senthilraja, P., & Kathiresan, K. (2015). In vitro cytotoxicity MTT assay in vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of marine yeast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 80–84. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50313>
- Shrestha, S., Sorolla, A., Fromont, J., Blancafort, P., & Flematti, G. R. (2018). Crambescidin 800, isolated from the marine sponge *Monanchora viridis*, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Marine drugs*, 16(2), 53. <https://doi.org/10.3390/md16020053>
- Simaremare, eva susanty. (2014). Skrining Fitokimia Daun Gatal (*Laportea decumana* (roxb.) Wedd). *Pharmacy*, 11(01), 98–107.
- Sondakh, R. M., Posangi, J., & Wowor, P. M. (2017). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Spons Laut (*Callispongia aerizusa*) terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test. *eBiomedik*, 5(2). <https://doi.org/10.35790/ebm.v5i2.18312>
- Swantara, M. D., Rita, W. S., & Sibarani, J. (2013). Potensi Antikanker Isolat Toksik Tiga Spons Indonesia. *Indonesian Journal of Cancer*, 7(4). <https://doi.org/10.33371/ijoc.v7i4.311>
- Tang, J., Wu, W., Yang, F., Liu, L., Yang, Z., Liu, L., Tang, W., Sun, F., dan Lin, H. (2018). Marine sponge-derived spongespongine preferentially eliminates breast cancer stem-like cells via p38/AMPK $\alpha$  pathways. *Cancer medicine*, 7(8), 3965–3976. <https://doi.org/10.1002/cam4.1640>
- Theodora, C. T., Gunawan, I. W. G., & Swantara, I. M. D. (2019). Isolasi dan identifikasi golongan flavonoid pada ekstrak etil asetat daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.)'. *Jurnal Kimia*, 13(2), 131. <https://doi.org/10.24843/JCHEM.2019.v13.i02.p02>
- Van Soest, R. W. M. (1989). *The Indonesian*



- sponge fauna: A status report. *Netherlands Journal of Sea Research*, 23(2), 223–230.  
[https://doi.org/10.1016/0077-7579\(89\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0077-7579(89)90016-1)
- Vermees, I., Haanen, C., & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of immunological methods*, 243(1-2), 167-190.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00233-7)
- Wirmandiyanti, K. D., Manurung, M., & Swantara, I. M. D. (2013). Uji Toksisitas Dan Identifikasi Ekstrak Spons *Haliclona fascigera* Terhadap Larva *Aritemia salina* L. *Cakra Kimia*, 1(1), 20–25