

**Kode dan Rumpun Ilmu: 238/Bioteknologi Perikanan
Fokus : Kemaritiman**

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**JUDUL PENELITIAN
POTENSI ANTI DIABETES DAN ANTI KANKER SERVIKS RUMPUT
LAUT SEBAGAI BAHAN PANGAN FUNGSIONAL**

TIM PENGUSUL

**Dr. Ir. Grace Sanger, Msi. ; NIDN. 0009016107 (Ketua)
Dr. Ir. Lena Jeane Damongilala, Msi. ; NIDN. 0021026203 (Anggota)
Ir. Bertie Elias Kaseger ; NIDN. 0023065602 (Anggota)**

**UNIVERSITAS SAM RATULANGI
DESEMBER 2020**

**Dibiayai Oleh:
Direktorat Riset Dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset Dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi Dan Perguruan Tinggi
Sesuai Dengan Kontrak Penelitian Tahun Anggaran 2020
Nomor: 260/Sp2H/AMD/LT/DRPM/2020.**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Potensi Anti Diabetes Dan Anti Kanker Serviks Rumput Laut Sebagai Bahan Pangan Fungsional

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Ir GRACE SANGER, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi
NIDN : 0009016107
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan
Nomor HP : 085399940496
Alamat surel (e-mail) : sanger.grace@yahoo.co.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. Ir LENA JEANE DAMONGILALA M.Si
NIDN : 0021026203
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi

Anggota (2)
Nama Lengkap : BERTIE ELIAS KASEGER
NIDN : 0023065602
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi

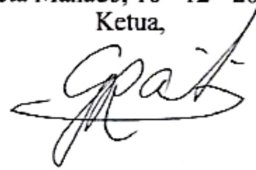
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 102.384.000,-
Biaya Keseluruhan : Rp 0

Mengetahui,
Dekan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan
Unsrat



(Prof. Ir. Farnis B. Boneka, M.Sc)
NIP/NIK 19571229 1985031004

Kota Manado, 18 - 12 - 2020
Ketua,



(Dr. Ir GRACE SANGER, M.Si)
NIP/NIK 196101091986022001

Menyetujui,
Ketua LPPM Unsrat



(Prof. Dr. Charles Lodewijk Kaunang, MS.)
NIP/NIK 195910181986031002

PROTEKSI ISI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi laporan ini dalam bentuk apapun kecuali oleh peneliti dan pengelola administrasi penelitian

LAPORAN AKHIR PENELITIAN MULTI TAHUN

ID Proposal: 49f683a2-7495-41de-830c-c29a53393488
Laporan Akhir Penelitian: tahun ke-3 dari 3 tahun

1. IDENTITAS PENELITIAN

A. JUDUL PENELITIAN

Potensi Anti Diabetes Dan Anti Kanker Serviks Rumput Laut Sebagai Bahan Pangan Fungsional

B. BIDANG, TEMA, TOPIK, DAN RUMPUN BIDANG ILMU

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Kemaritiman	-	Pemanfaatan Sumber Daya Alam (SDA): Non hayati dan hayati berbasis potensi megadiversitas secara berkelanjutan	Bioteknologi Perikanan

C. KATEGORI, SKEMA, SBK, TARGET TKT DAN LAMA PENELITIAN

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Desentralisasi	Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi	SBK Riset Dasar	SBK Riset Dasar	3	3

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama, Peran	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta	H-Index
GRACE SANGER Ketua Pengusul	Universitas Sam Ratulangi	Teknologi Hasil Perikanan		6101143	0
Dr. Ir LENA JEANE DAMONGILALA M.Si Anggota Pengusul 1	Universitas Sam Ratulangi	Teknologi Hasil Perikanan		6101098	0

BERTIE ELIAS KASEGER Anggota Pengusul 2	Universitas Sam Ratulangi	Teknologi Hasil Perikanan	0	0
--	------------------------------	------------------------------	---	---

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra
-------	------------

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
3	Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional	accepted/published	Food Science atau Food science and Technology

Luaran Tambahan

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
3	Paten Sederhana	terdaftar	-

5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya penelitian mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi 12.

Total RAB 3 Tahun Rp. 102,384,000

Tahun 1 Total Rp. 0

Tahun 2 Total Rp. 0

Tahun 3 Total Rp. 102,384,000

Jenis Pembelanjaan	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Analisis Data	Honorarium narasumber	OJ	1	1,500,000	1,500,000
Analisis Data	Tiket	OK (kali)	1	500,000	500,000
Analisis Data	Penginapan	OH	1	300,000	300,000
Analisis Data	HR Pengolah Data	P (penelitian)	2	1,500,000	3,000,000
Analisis Data	Transport Lokal	OK (kali)	2	250,000	500,000
Analisis Data	HR Sekretariat/Administrasi Peneliti	OB	4	100,000	400,000
Analisis Data	Uang Harian	OH	4	150,000	600,000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	OH	4	50,000	200,000
Analisis Data	Biaya analisis sampel	Unit	6	1,100,000	6,600,000

Jenis Pembelanjaan	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	Paket	6	425,000	2,550,000
Bahan	Barang Persediaan	Unit	8	1,220,000	9,760,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Unit	15	1,300,000	19,500,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Publikasi artikel di Jurnal Nasional	Paket	1	3,000,000	3,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	Paket	1	6,000,000	6,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	Paket	1	650,000	650,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	Paket	2	50,000	100,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar internasional	Paket	2	500,000	1,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/Administrasi Peneliti	OB	4	100,000	400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di dalam kantor	OH	4	100,000	400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	OH	4	150,000	600,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya konsumsi rapat	OH	4	50,000	200,000
Pengumpulan Data	Tiket	OK (kali)	1	500,000	500,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Lapangan	OH	3	3,000,000	9,000,000
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	Paket	4	200,000	800,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	OJ	4	2,800,000	11,200,000
Pengumpulan Data	HR Petugas Survei	OH/OR	4	1,000,000	4,000,000
Pengumpulan Data	Transport	OK (kali)	4	250,000	1,000,000
Pengumpulan Data	Penginapan	OH	4	300,000	1,200,000
Pengumpulan Data	HR Sekretariat/Administrasi Peneliti	OB	8	100,000	800,000
Pengumpulan Data	Uang Harian	OH	8	150,000	1,200,000
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di dalam kantor	OH	8	100,000	800,000
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di luar kantor	OH	8	150,000	1,200,000
Pengumpulan Data	Biaya konsumsi	OH	40	50,000	2,000,000
Sewa Peralatan	Obyek penelitian	Unit	2	662,000	1,324,000
Sewa Peralatan	Ruang penunjang penelitian	Unit	2	1,500,000	3,000,000
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	Unit	4	1,500,000	6,000,000
Sewa Peralatan	Transport penelitian	OK (kali)	4	150,000	600,000

6. HASIL PENELITIAN

A. RINGKASAN: Tuliskan secara ringkas latar belakang penelitian, tujuan dan tahapan metode penelitian, luaran yang ditargetkan, serta uraian TKT penelitian.

Kasus dan tingkat kematian akibat Diabetes dan kanker serviks saat ini terus meningkat (WHO, 2018, Bray et al., 2018) Penggunaan obat antidiabetes terus mengakibatkan efek samping bahkan terjadi komplikasi, seperti, kardiovaskuler, kerusakan mata dan ginjal. Demikian juga penggunaan berbagai terapi dalam mengobati kanker serviks, seperti chemoterapi, radioterapi bahkan kombinasi hanya menimbulkan penderitaan seperti: kerontokan rambut, pendarahan bahkan terjadi resistensi terhadap kanker itu sendiri. Berdasarkan beberapa penelitian senyawa alami produk laut, telah terbukti efektif melawan penyakit degeneratif termasuk kanker. Sebab itu senyawa aktif dari rumput laut yang mempunyai aktifitas antidiabetes dan antikanker serviks perlu diisolasi untuk dijadikan senyawa/obat untuk mencegah dan mengobati penyakit-penyakit ini. Isolasi Rumput laut dilakukan dengan tahap : ekstraksi, fraksinasi dan isolasi menggunakan kolom kromatografi dan kromatografi lapis tipis. Karakteristik struktur senyawa menggunakan NMR, FTIR dan MS. Luaran yang ditargetkan adalah nasional dan jurnal internasional bereputasi dengan TKT 4.

B. KATA KUNCI: Tuliskan maksimal 5 kata kunci.

Diabetes, Kanker serviks, ,Isolasi. Karakterisasi

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan sesingkat mungkin. Dilarang menghapus/modifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian dapat berupa data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

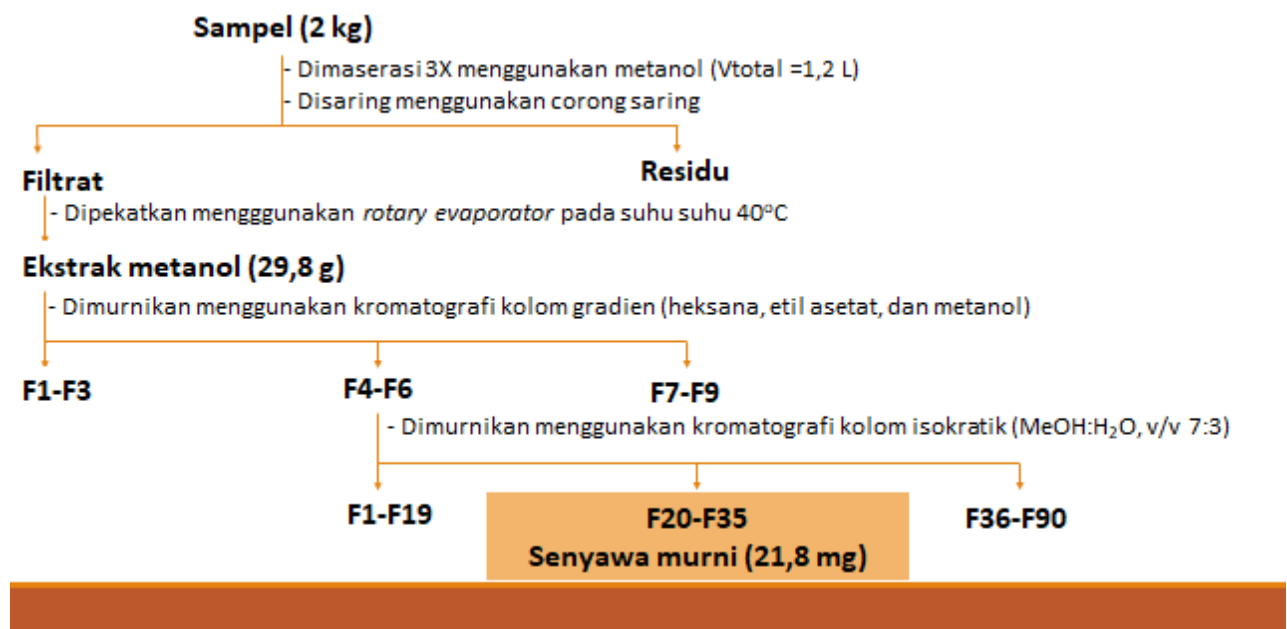
Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian meliputi data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Hasil pelaksanaan penelitian Dasar Unggulan perguruan Tinggi (PDUPT) ini merupakan Tahun terakhir (Tahun ke 3). Adapun hasil yang dicapai terdiri dari: Isolasi senyawa bioaktif ekstrak metanol rumput laut *Sargassum sp* dan Pengujian aktifitas anti diabetes dan antikanker serviks rumput laut *Sargassum sp*.

1. Isolasi senyawa bioaktif.

Tahap-tahap Isolasi senyawa aktif ekstrak Metanol *Sargassum sp* adalah sebagai berikut: Pertama-tama dilakukan partisi menggunakan pelarut heksana, etil asetat dan metanol. Setelah itu dilakukan kromatografi lapis tipis, yang bertujuan untuk menentukan eluent yang sesuai untuk dipakai pada elusidasi kromatografi kolom (KK). Sampel sebanyak 29.8 gr dipisahkan dengan metoda kolom kromatografi stepwise 5% (heksana - aseton). Hasil elusidasi pertama diperoleh Sebanyak 9 fraksi (F-1 s/d F-9). Kemudian Fraksi F4 s/d F9 difraksinasi dengan kromatografi kolom isokratik dan menghasilkan 90 fraksi (F-1 s/d F-90). Setiap fraksi hasil KK di KLT kemudian disemprot dengan DPPH 0.05%. setelah itu diamati/dideteksi dibawah sinar UV 254 nm, UV 365 nm dan disemprot dengan H₂SO₄. Hasil elusidasi diperoleh diamati senyawa murni tedeteksi diantara F-21 s/d F23, Kemudian fraksi-fraksi ini dianalisis aktifitas antioksidan DPPH, aktifitas antidiabetes dan aktifitas anti kanker serviks (gambar 1). Selanjutnya isolat dielusidasi dengan NMR, FTIR dan MS.



Gambar 1. Proses Isolasi senyawa bioaktif estrak Rumput *Sargassum sp*.

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metoda kromatografi cair yang paling sederhana. KLT menggunakan prinsip adsorpsi dan kecepatan gerak dari sampel yang ditotolkan diatas fase diam. Adsorpsi dan kecepatan gerak sampel tergantung pada : 1. Sifat senyawa (kemampuan terikat pada fase diam & kemampuan larut pada fase gerak. 2. Sifat fase diam (kekuatan elektrostatis yang menarik senyawa diatas fase diam, 3. Sifat fase gerak (kemampuan melarutkan senyawa [1]

Hasil kolom kromatografi pada fraksi F1 s/d F9 (Tabel 1) diperoleh berat masing-masing fraksi –n-heksana, etil asetat dan metanol sebagai berikut:

Tabel 1. Kromatografi Kolom Fraksi F1 s/d F8 Sargassum sp.

No	Fraksi	Massa
1	n-heksan	0,0009
2	n-heksan	0,0005
3	n-heksan	0,0009
4	Etil Asetat	0,1037
5	Etil Asetat	0,0371
6	Etil Asetat	0,0076
7	Metanol	0,0024
8	Metanol	0,0014

Kemudian Fraksi Fraksi F-4 sampai F-6 serta F7 sampai F-8 dimurnikan menggunakan kromatografi kolom isokratik (MeOH H₂O, v/v 7:3). Hasil kromatografi kolom diperoleh 3 kelompok fraksi, yaitu: Fraksi F-1 s/d F-19; F-20 s/d F-35 dan F-36 s/d F-90. Hasil kolom kromatografi masing-masing di KLT dan diperoleh bahwa Pada Fraksi F-20 s/d F-35 dideteksi terdapat senyawa murni dengan berat 21,8 gr. Hasil fraksinasi F-20- s/d F-35. diperoleh berat masing-masing fraksi dapat dilihat pada Tabel 2.

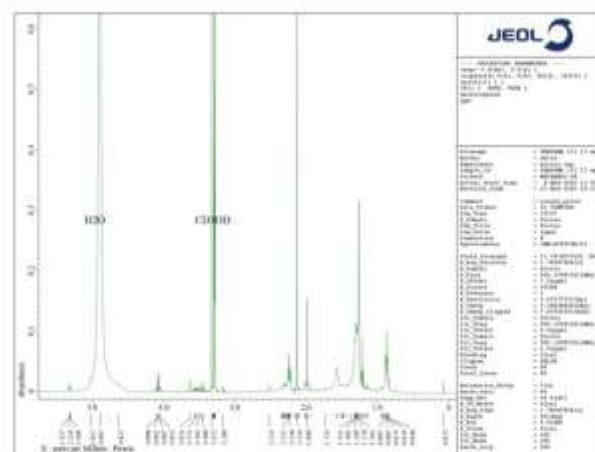
Tabel 2. Kromatografi Kolom Fraksi F-20 s/d F-35

Fraksi	Massa Fraksi (mg)
20	5,7
21	1,4
22	1,3
23	1,7
24	0,6
25	0,4
26	1,2
27	1,0
28	1,4
29	1,4
30	1,4
31	0,5
32	1,2
33	1,2
34	0,2
35	1,2

Sejumlah besar teknis KLT telah dikembangkan dengan berhasil untuk diaplikasikan pada analisa aktifitas antioksidan secara kuantitatif maupun kualitatif, sebuah radikal bebas stabil DPPH sering digunakan untuk tujuan ini. Uji bioautografi ini adalah metoda yang dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu fleksibel, sederhana dan output yang tinggi. Sesudah pemisahan sampel dengan KLT kemudian disemprot dengan reagen DPPH. Foto KLT diuji dengan metoda “Chem Patern 2 Professional Verssion” (sejenis perangkat lunak proses “finger print chromatografi). Hasil Band Warna agak kekuningan pada KLT dikonversi pada peak kromatografi. Respons kromatografi (“peak area”) dari ekstrak langsung dikorelasikan pada kemampuan antioksidan ekstrak. Tujuan proses ini untuk mendapatkan total peak area. Garis dasar dari puncak ditandai secara manual sebagai satu garis awal sampai akhir [2,3]

Menurut Hemström dan Irgum, 2006), kromatografi kolom dapat diterapkan secara langsung pada pemurnian dan pemisahan skala preparatif, sebab setidaknya-tidaknya secara prinsip, orang dapat memilih ukuran kolom dan kandungannya (isinya) agar sesuai dengan dimensi-dimensi sampel yang akan difraksinasi. Pemilihan pelarut pengemulsi merupakan hal yang penting dalam kromatografi kolom. Kromatografi kolom memerlukan waktu yang lama dan bahan yang cukup banyak, karena itu harus dipastikan terlebih dahulu pelarut atau campuran pelarut mana yang dapat menghasilkan pemisahan yang diinginkan. Pengelusan harus secepat-cepatnya untuk meminimumkan difusi, sepanjang terdapat keseimbangan yang baik antara pelarut, linarut dan penyerap. Keseimbangan yang baik memerlukan penyerap yang ukuran partikelnya kecil. Sebaiknya, Jika ukuran partikel sangat kecil berarti pelarut tidak mengalir melalui penyerap dengan cepat [4]

Hasil KK fraksinasi F-20- s/d F-35 kemudian di KLT setelah itu diamati/dideteksi dibawah sinar UV 254 nm, UV 365 nm dan disemprot dengan H₂SO₄. diperoleh senyawa murni setelah. Isolat senyawa murni di uji aktifitas antioksidan DPPH. Selanjutnya isolat dielusidasi dengan FTIR, MS dan NMR, Setelah itu setiap spektum diinterpretasi untuk menentukan rumus dan struktur senyawa. Hasil karakterisasi NMR isolasi , salah satu spektrum dapat dilihat pada Gambar 2. Dibawah ini.



Gambar 2. Spektrum NMR hasil isolasi pertama ekstrak Sargassum sp.

Resonansi magnet inti (NMR) berhubungan dengan sifat magnet dari inti atom. Spektroskopi NMR didasarkan pada penerapan gelombang radio oleh inti tertentu dalam molekul organik, bila molekul ini berada dalam magnet yang sangat kuat dan homogen. Mempelajari molekul senyawa organik secara spektroskopi resonansi magnet inti akan memperoleh gambaran perbedaan sifat magnet dari berbagai inti yang ada dan untuk menduga letak inti tersebut dalam molekul. Infra red adalah alat yang digunakan untuk

mengidentifikasi gugus fungsi didalam senyawa organik. Radiasi IR adalah energi elektromagnetik dengan panjang gelombang lebih panjang dari sinar tampak tetapi lebih pendek dari gelombang mikro. Umumnya panjang gelombang IR berkisar 0.8-100 cm⁻¹ (µm) yang dibagi menjadi : *Near IR* (0.8- 2.5 µm), *Mid IR* (2.5 -15 µm) dan *Far IR* (15 -100 µm). Spektrum Massa digunakan untuk kualifikasi bahan organik volatil dan semi volatil dalam campuran, menentukan berat molekul dan kadang komposisi elemen dari bahan organik yang tidak diketahui dari campuran dan menentukan struktur dari bahan organik dari campuran dengan cara mencocokkan spektrum bahan dengan katalog dan dengan cara interpretasi spektrum [5].

2. Aktifitas antidiabetes dan antikanker serviks

Rumput laut kaya akan senyawa bioaktif seperti, fenolik, polysakarida, PUFA, protein, vitamin dan mineral yang mempunyai aktifitas biologi seperti antioksidan, anti kolesterol, antidiabetes, antitumor dan antikanker [6,7,8]. Hasil analisis aktifitas antioksidan, antidiabetes dan antikanker serviks pada fraksi-fraksi dalam proses isolasi ekstrak metanol rumput laut *Sargassum sp.* dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Aktifitas antioksidan, antidiabetes dan antikanker serviks Pada beberapa fraksi selama proses isolasi

Parameter	Aktifitas
Aktifitas antioksidan DPPH	6 – 12 mg/mL
Aktifitas antidiabetes	5 - 12 mg/mL
Aktifitas anti kanker serviks	150 - 500 µg/ mL

Diabetes adalah penyakit akut, yang ditandai dengan hiperglikemia, yaitu kondisi dimana tingkat glukosa yang ekstrem yang mengalir dalam darah [9]. Diabetes dapat mengakibatkan meningkatnya resiko hipertensi, komplikasi vaskuler kretinisme dan malfungsi ginjal [10]. Hyperglycemia dapat diobati dengan 2 cara yaitu menggunakan injeksi insulin dan pengobatan oral antidiabetes seperti: sulfonilureas, biguanide, thiazolidinedion, dan melalui suplemen makanan fungsional. Makanan fungsional dapat menghambat enzim glukosidase dan amylase juga dapat menghambat absorpsi glukosa penderita Diabetes Type 2 T2DM [11]. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktifitas antidiabetes fraksi-fraksi berkisar 5 mg/mL s/d 12 mg/mL. Berbagai jenis ekstrak rumput laut yang diekstrak dengan beberapa pelarut organik yang potensial menghambat α -amylase and α -glucosidase. Ekstrak acetone *Caulerpa racemosa* dan *Spatoglossum schroederi* mempunyai kemampuan menghambat α -amylase activity, dengan IC 50 of 0.09 mg/mL and 0.58 mg/mL [12]. Fucoidan yang diekstraksi dari *Ascophyllum nodosum* mampu menghambat aktifitas α -glucosidase. Fucoidan dari *Fucus vesiculosus* aktif melawan α -glucosidase. Fucoidan dari *A. nodosum* juga menghambat aktifitas α -amylase sebesar 7% and 100% (5 mg/mL) (IC50 0.12 to 4.64 mg/mL) [13]. 25 Senyawa fenolik *Ascophyllum nodosum* dapat melawan α -glucosidase [14], juga asam lemak dari *Spatoglossum macrodontum* [15].

Didalam tubuh manusia α -amylase and α -glucosidase bereaksi secara simultan mencerna untuk memecah pati melalui pankreatik α -amylase dan absorpsi glucose oleh intestinal α -glucosidase. Pankreatik α -amylase adalah enzim kunci pencernaan pati hydrolysis ikatan α -1,4- glucosidic dan menghasilkan bentuk linier dan cabang malto-oligosaccharida. Reaksi ini diaktifkan oleh α -glucosidases, yang berfungsi penting didalam merombak karbohidrat menjadi glukosa yang menginisiasi postprandial hyperglycemia [16].

Kanker serviks disebabkan oleh infeksi *Human papilloma virus* (HPV) yang menyebabkan kematian tertinggi pada wanita di dunia. HPV terdiri dari lebih dari 200 type

infeksi, diantaranya HPV types 16 dan 18 memiliki resiko tertinggi yang terutama merupakan penyebab 70% kanker serviks [17,18]. Pengobatan standar, seperti kemoterapi, terapi pembedahan, terapi radiasi dan lain-lain, menimbulkan efek samping yang parah dan terjadi kekebalan terhadap sel kanker itu sendiri. Efek samping akibat terapi kanker, seperti: terjadi pendarahan, sensorik abnormal, infertile, kerusakan jaringan dan rambut rontok, karena sitotoksitas pengobatan yang tidak selective [19].

Senyawa alami dari produk laut telah terbukti dapat menghambat pembentukan dan perkembangan kanker dan dapat mengobati infeksi akibat resistensi terhadap obat. Selain itu, senyawa alamiah mempunyai senyawa kemoterapi yang harganya dapat dijangkau dan tersedia dengan mudah [20]. Aktifitas anti-kanker kanker senyawa turunan produk laut memiliki mekanisme seluler dan molekuler yang berbeda, seperti perlindungan DNA, modulasi siklus sel, induksi apoptosis dan autofagi, penghambatan angiogenesis, migrasi, invasi serta pembentukan metastasik [21].

Aktifitas antikanker serviks 150 µg/mL – 500 µg/mL. Beberapa senyawa bioaktif rumput laut menunjukkan mempunyai aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker serviks (HeLa/SiHa), antara lain: Senyawa 25-hydroperoxy-6β-hydroxycholesta-4, 23(E)-dien-3-one dari alga hijau *Galaxaura marginata* [22]. Senyawa lectin dari rumput Laut merah *Eucheuma serra* dan senyawa Bis (2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether (BDDE) dari rumput laut coklat *Leathesia nana* [20].

Aktifitas antikanker serviks polysakarida (3,6-anhydro-L-galaktosa and D-galaktosa) dari *Gp. lemaneiformis* sebesar IC₅₀ 50 µg/mL. Polysakarida merupakan kunci senyawa antitumor [23]. Senyawa polysakarida sulfat, seperti heparin banyak ditemukan pada rumput laut coklat [24]. Polysakarida sulfat, karagenan banyak pada rumput laut merah [25]. (Gambar 2). Pada konsentrasi 250–2500 µg/mL κ-carrageenan dan λ-carrageenan menghentikan siklus sel dan memperlambat fase G1 dan G2/M. both G1 and G2/M phases [26]. Obat anti HPV terutama obat oral hormonal seperti: acyclovir, ganciclovir, interferon and interleukin Obat anti HPV terutama obat oral hormonal seperti: acyclovir, ganciclovir, interferon and interleukin [27].

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa hasil isolasi ekstrak metanol *Sargassum sp* lebih potensial sebagai sumber senyawa antikanker serviks, karena mempunyai aktifitas yang tinggi, dibandingkan sebagai antidiabetes, karena persen penghambatan enzim ekstrak *Sargassum sp*. rendah alfa glukosidase rendah. *Sargassum sp* mengandung senyawa anti kanker serviks yang dapat melawan Virus HPV 16/18. Karena *Sargassum sp* banyak tumbuh diperairan Indonesia sehingga potensial dimanfaatkan untuk menjadi obat antikanker serviks.

D. STATUS LUARAN: Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta unggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui Simlitabmas.

Luaran wajib berupa jurnal Internasional bereputasi (Scopus) masih dalam proses dengan Judul: “ *anti-cervical cancer activity of seaweeds from North Sulawesi*”. Sedangkan Luarannya berupa Jurnal nasional bereputasi yang dimasukkan pada Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan (JPHPI-IPB Bogor) sedang dalam proses, dengan judul *aktifitas anti kanker rumput laut Gracilaria sp dan Sargassum sp.....*

E. PERAN MITRA: Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (untuk Penelitian Terapan, Penelitian Pengembangan, PTUPT, PPUPT serta KRUPPT). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti

dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui Simlitabmas.

F. KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Pelaksanaan penelitian dimulai bulan Januari sampai Maret, kemudian mulai bulan April sampai Oktober tidak dapat dilakukan penelitian karena pandemi Coviks 19 laboratorium di UNPAD Bandung dan IPB bogor ditutup. Walaupun mengalami penundaan tetapi proses isolasi dan pengukuran aktifitas antidiabetes dan antikanker serviks dapat dilaksanakan.

G. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA: Tuliskan dan uraikan rencana penelitian di tahun berikutnya berdasarkan indikator luaran yang telah dicapai, rencana realisasi luaran wajib yang dijanjikan dan tambahan (jika ada) di tahun berikutnya serta *roadmap* penelitian keseluruhan. Pada bagian ini diperbolehkan untuk melengkapi penjelasan dari setiap tahapan dalam metoda yang akan direncanakan termasuk jadwal berkaitan dengan strategi untuk mencapai luaran seperti yang telah dijanjikan dalam proposal. Jika diperlukan, penjelasan dapat juga dilengkapi dengan gambar, tabel, diagram, serta pustaka yang relevan. Jika laporan kemajuan merupakan laporan pelaksanaan tahun terakhir, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai.

H. DAFTAR PUSTAKA: Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan kemajuan yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

1. Hadad, P. and Hadad, P. 2002. Sampel Preparation in Chromatography, *Journal of Chromatography Library*. 1-930 p.
2. Wang, J. Yong-De and Fang, Y. 2012. TLC Screening Antimicrobial Extracts from Fifteen Bamboo Species and Identification Antioxidant Flavon Glycosidase from Leaves *Bambusa Textiles* MC Clure, *Molecules*. ISSN, 2420-3049.
3. Laponik, B. Wondra, A.G. and Prosek, M. 2004. Comparison of TLC and Spectrofotometric Method for Evaluation of the Antioxidant Activity of Grape and Berry Antioxidant. *J. Planar Chromatografi* ,**3**, 207-212,
4. Hemström, P. and Irgum, K. (2006). "Hydrophilic Interaction Chromatography". *Journal of Separation Science*, **29** (12): 1784–821.
5. Supratman, U. 2010. Elusidasi Struktur Senyawa Organik. Metoda Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik. *Widya Padjadjaran*. 404 hal.
6. Debbarama, J., Rao, B. M., Murthy, L. N., Mathew, S., Venkateshwarlu, G., & Ravishankar, C. (2016). Nutritional profiling of the edible seaweeds *Gracilaria edulis*, *Ulva lactuca* and *Sargassum sp.* *Indian J. Fisheries*, **63**(3): 81–87.
7. Praiboon, J., Palakas, S., Noiraksa, T., Miyashita, K. (2019). Seasonal variation in nutritional composition and anti-proliferative activity of brown seaweed, *Sargassum oligocystum*. *J Appl Phycol* 30:101–111.
8. Ganesan, A. R., Triwari, U., and Rajauria, G. (2019). Seaweed and Nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Science and Human wellness*, **8**(3): 252-263.
9. Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP. et al. (2007) Metabolites from Algae with Economical Impact. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: *Journal of Toxicology & Pharmacology*. **146**: 60-78.
10. Oh JH, Kim J, and Lee Y.2016. Anti-inflammatory and anti-diabetic effects of brown seaweeds in high-fat diet-induced obese mice. *Journal Nutrition Research &*

Practice. **10(1)**: 42–48.

11. Hardoko I, Titri Siratantri T, Eveline, Yogabuana M, Olivia S. 2014. An In Vitro Study of Antidiabetic Activity of *Sargassum Duplicatum* and *Turbinaria Decurens* Seaweed *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* **3(2)**:13-18.
12. Teixeira VL, Rocha FD, Houghton PJ, Kaplan MA, Pereira RC. 2007 α -Amylase inhibitors from Brazilian seaweeds and their hypoglycaemic potential. *Journal of Fitoterapia*. **78**:35–36.
13. Kim KY., Nguyen T.H., Kurihara H., and Kim S.M., 2009. Alpha-glucosidase inhibitory activity of bromophenolpurified from the red alga *Polyopes lancifolia*. *Journal Food Science* : **75(5)**:45-50.
14. Apostolidis E., Karayannakis PD, Kwon YI, Lee CM, Seeram NP. 2011. Seasonal variation of phenolic antioxidant-mediated α -glucosidase inhibition of *Ascophyllum nodosum*. *Plant Foods Human Nutrition*. **66**:313–319.
15. Gosch BJ, Paul NA, de Nys R, Magnusson M. 2015. Seasonal and within-plant variation in fatty acid content and composition in the brown seaweed *Spatoglossum macrodontum* (Dictyotales, Phaeophyceae) *Journal Applied. Phycology*. **27**:387–398.
16. Unnikrishnan P S, Suthindhiran K and Jayasri M A 2015 Antidiabetic potential of marine algae by inhibiting key metabolic enzymes. *Journal Frontiers in Life Science* **8**; 148-159
17. Bray, F., Jacques, F. J. M. E., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries *CA: A cancer Journal for Clinicians* **69(6)**: 394-424.
18. Dhamodharan, P., Ponnusamy, N., Odumpatta, R., Lulu, S., and Arumugam, M. (2018). Computational investigation of marine bioactive compounds against E6 oncoprotein of Human Papilloma Virus-HPV16. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **8(4)**: 23-32.
19. Chatterjee, S., Manjunder, I., Sempay, S., Paul, S., and Kundu, R. (2015). A Comparative Account of proliferative effect of *Catenella Repens* on different Cervical-cancer cell line. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Science and Research* **3(3)**: 203-214.
20. Ercolano, G., De, Cicco., P., and Ianaro, A. (2019). New Drugs from the Sea: Pro-Apoptotic Activity of Sponges and Algae Derived Compounds. *Marine Drug*, **17(31)**: 1-31
21. Ruiz-Torres, V., Encinar, J. A., Herranz-Lopez, M., Perez-Sanchez, A., Galiano, V., Barrajon-Catalan, E., Micol, V. (2017). An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs. *Molecules*, **22(7)**: 1037.
22. Majunder, I., Subhabrata, P., Rita, K. (2015). Anti-Cancerous And-Tumorous Activity Of Algae-A Review. *Molecule* **3(2)**:72-89
23. Kang, Y., Hua, Li., Jun, Wu., Xiaoting, Xu., Xue, Sun., Xiaodong, Zhao., Nianjun, Xu. (2016). Transcriptome Profiling Reveals the Antitumor Mechanism of Polysaccharide from Marine Algae *Gracilariopsis lemaneiformis*. *PLoS ONE*, **11(6)**: 1-16.
24. Hsu H.Y. and Hwang P.A. 2019. Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. *Clin. Translational. Medicine*. **8**:15
25. Rushdi, M. I., Iman, A. M., Abdel-Rahman, Saber, H., Attia, E. Z., Wedad, M., Abdelraheem, Hashem, A., Madkour, Hossam, M., Hassan, H. M., Abeer H., Elmaidomy A. H., and Abdelmohsen, U. R. (2020). Pharmacological and natural products diversity of the brown algae genus *Sargassum*. *Royal Society of Chemistry*

Advance, **10**: 24951–24972.

26. Prasedya, E. S., Miyake, M., Kobayashi, D., Hazama, A. (2016). Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by Fucci imaging. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16** (270): 1-9.
 27. Pal and Kundu R. (2019). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Frontiers in Microbiology*, **10**(3116): 1-15.
- dst.

Dokumen pendukung luaran Wajib #1

Luaran dijanjikan: Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional

Target: accepted/published

Dicapai: Submitted

Dokumen wajib diunggah:

1. Bukti submit
2. Naskah artikel

Dokumen sudah diunggah:

1. Bukti submit
2. Naskah artikel

Dokumen belum diunggah:

- Sudah lengkap

Nama jurnal: Bioflux

Peran penulis: first author | EISSN: 1844-9166

Nama Lembaga Pengindek: Scimagor

URL jurnal: <http://www.bioflux.com.ro/aacI>

Judul artikel: Anti Cervical Cancer Activity of Seaweeds obtained from coastal Area In North Sulawesi Utara, Indonesia.

Anti Cervical Cancer Activity Of Seaweeds Obtained From Coastal Area Of North Sulawesi, Indonesia

¹Grace Sanger, ²Lexy K. Rarung, ³Jan R. Assa
¹Verly Dotulong, ¹Lena J. Damongilala and ¹Djuhria Wonggo.

¹Department of Fishery product Technology, Faculty of Fishery and Marine Science, Sam Ratulangi University. Manado 95115. ²Department of Fishery Social Economic, Faculty of Fishery and Marine Science, Sam Ratulangi University. Manado 95115.

³Departement of Agriculture product Technology. Faculty of Agriculture. Sam Ratulangi University. Manado 95115.

Corresponding author: Grace Sanger: sanger.grace@unsrat.ac.id

Abstract

Seaweeds constitute some of the most important source of bioactive substaces, which have biological activity and potential medicinal uses against degenerative diseases, such as anti tumor and anticancer. Objectives of the study is to oberserve cytotoxic activity of *G. Salicornia*, *T.decurens*, *H.macroloba* and *L.cetularoides* to against HeLa cell (ATCC CCL 2) using MTT assay. Total Phenolic Content (TPC), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, Ferrous reducing activity power (FRAP). also were analized. The seaweeds were extracted using ethanol. The result showed, the Cytotoxic activity (IC₅₀) of extract to against Hela cell was *G.salicornia* (432,63 µg/mL), *T. decurens* (41,027 µg/mL), *H. macroloba* (137,38) dan *L.cetularoides* (78,53 µg/mL). *L.cetularoides* was highest TPC, DPPH and FRAP . The results suggest that *T.decurens* and *L.cetularoides* could be used as source of bioactive compound to prevent and treatment cervical cancer deseases.

Key word: Cervical-Cancer, Phenol, Antioxidant.

Introduction

Carcinoma of the uterine cervix is the third most common female cancer worldwide, According to the data of GLOBOCAN project in 2018 estimated from a total of 569,847 new cases and 311,365 death cases were recorded. The majority of cases are squamous cell carcinoma followed by adenocarcinomas. In Indonesia Cervical cancer is the second most common female cancer in women aged 15 to 44 years. Women at risk for cervical cancer 95.9 million, with annual number of cervical cancer cases, 32,469 and 18,279 millions deaths¹. Cervical cancer is caused by human papilloma virus (HPV) which responsible for all of cervical cancer cases. Cervical cancer is vicious tumor that grows in women reproductive organs which located in upper genital tract between uterus and vagina. At early stages of cervical cancer, this disease is usually asymptomatic. If symptoms do occur, the most common manifestation would be unusual vaginal bleeding². HPV is considered as a very common virus that can be easily transmitted through sexual contact, regardless of sex. The high risk strains specially are HPV-16 and 18 subtypes, which are known to be responsible for more than 70% of the cases³.

Various treatments have been made to cure cancer including surgery, chemotherapy, radiotherapy and targeting therapy. But, all of these procedures may lead to double disadvantages into patients, such as vomiting, malaise, anemia and susceptibility with infection and lower immune systems and also the treatments need high cost due to import medicine⁴.

Therefore, it requires novel innovation to provide medicines from natural products which spread over in Indonesia and has antiproliferative agent toward cancer cell. The potential anticancer activity of marine-derived compounds relies on different cellular and molecular mechanisms, including DNA protection, cell-cycle modulation, induction of apoptosis and autophagy, inhibition of angiogenesis, migration, invasion and metastasis formation⁵.

Seaweeds constitute some of the most important reservoirs of bioactive substances, such as Phenolic compounds, polysaccharides, PUFA, Protein, vitamin and mineral, which have biological activity and potential medicinal uses against cancer, tumor thrombosis, diabetes, inflammation and other degenerative diseases^{6,7,8}. Numerous macroalgae have shown potent cytotoxic activities and certain authors have suggested the consumption of algae as a chemopreventive agent against several cancers². Many bioactive of seaweeds showed cytotoxic activity against cervical cancer cell (HeLa/SiHa cell), including: 25-hydroperoxy-6 β -hydroxycholesta-4, 23(E)-dien-3-one from green alga *Galaxaura marginata*¹⁰. Lectin compounds from red alga *Eucheuma serra* and Bis (2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether (BDDE) from brown alga *Leathesia nana* (Ercolano *et al.*⁵).

Nowadays, seaweed-related products are used widely, not only as health foods, but also in clinical drugs for the prevention and treatment cancer¹¹. Seaweeds have been reported to reduce the risk of cancer in animal studies, which may involve effect on cell proliferation and antioxidant activity. The mechanism of anticancer activity through which algae exert their effects is complex because of their remarkable structural diversity, which entails multiple interactions¹².

Natural products evidencing apoptotic activity have attracted a great deal of attention as new leads for anticancer alternative and complementary preventive or therapeutic agents¹³. The administration of seaweed powder or extract reduced the incidence rate of cervical cancer cell proliferation in *in vitro* and *in vivo* animal models (Gomes *et al.*,¹¹). Indonesia possesses the largest diversity of seaweeds species in the world. Despite this great biodiversity, North Sulawesi, Indonesian seaweeds are relatively underexploited with regard to discoveries of active biological substances. In view of the great biological diversity of cancer, we screened five tropical seaweeds to show their effective antiproliferative activities in inducing cell death for further potential application as sources of novel drugs for antitumor therapy.

METHOD

Materials

Biosafety Cabinet Level-2, (Nuair, USA), Inkubator CO₂ (Binder, Germany), A Centrifuge equipment (Tommy, Japan), *Inverted Microscope* (Nikon, Japan) flask T25 (Corning, USA), Tabung 15 mL (Corning, USA), Tabung 1.5 mL (Axygen, USA), Perangkat hemositometer equipment, Improved Neubauer, *96-wells Tissue Culture Plate* (Corning, USA), *12-wells Tissue Culture Plate* (Corning, USA), Micropipet, 200 ul, 1000 ul (Gilson, USA), Pipet tips 200 ul, 1000 ul (Axygen, USA).

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (Gibco, USA) *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Hyclone, USA), Penisilin-streptomisin (Invitrogen, USA), *Phosphate buffer saline* (PBS), (Gibco, USA), Trypsin (Gibco, USA), DMSO (Sigma USA), Etanol (Merck, Germany), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide MTT (Sigma, USA). All other solvents and chemicals were of analytical grade.

Preparation of the Seaweed Extracts

Four species of seaweeds were collected along the coast of North Sulawesi, Indonesia. The seaweeds were washed with water, cut into small pieces. Five hundred grams of dried sample was suspended in 1 L ethanol by shaking for 24 h in the dark. The solvent extracts were then filtered and rotary-evaporated at 45 - 50°C. The resulting ethanol extracts (EE) were then dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and kept at +4°C until further use. Stock solution of EE (20 mg/mL) prepared by dissolving in 50% methanol was diluted with Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) prior to use to obtain the desired concentration. The major final concentration of methanol used for treatment was 0.5% (v/v).

Cytotoxicity activity

Cytotoxicity activity of EE was determined using the MTT assay as previously described by Gomez *et al.*¹¹. The MTT assay is based on the reduction of MTT by mitochondrial dehydrogenases of viable cells to a purple formazan product. HeLa cervical adenocarcinoma cells (ATCC CCL-2) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS (Sigma) and antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin). Cells were maintained as monolayer cultures in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. HeLa cells were seeded at a density of 5 × 10⁶ for 75 cm³ flasks. In order to do experimentation, HeLa cells were harvested and seeded into 96-well plates at a density of 5 × 10³ cells/well in 100 µL medium FCS free incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 hours. The medium was then removed and 100 µL of test solution (EE) in various concentrations and 100 µL of medium containing 5% FCS (MM) was added into the plate. Cells were grown under these conditions for 72 h at 37 °C at 5% CO₂. Cells overlaid with only MM were used as control. After incubation, traces of EE were removed by washing the cells twice with 200 µL PBS and applying MTT (5 mg/mL) dissolved in 100 µL of fresh medium to determine the effects of the EE on cell viability. Cells were then incubated for 4 h at 37 °C, 5% CO₂. The MTT-formazan product dissolved in 100 µL of ethanol was estimated by measuring the absorbance at 570 nm in a Multiskan Ascent Microplate Reader (ThermoLabsystems, Franklin, MA, USA).

Total phenolic content (TPC).

The TPC of the extracts was determined using the Follin Ciocalteu reagent according to the method of Sanger *et al.*¹⁴. Briefly, 75% of Follin Ciocalteu's phenol reagent (1 mL) was added to 0.1 mL of extract (0.1 g dry sample in 10 mL methanol) and vortexed. Next, 7% Na₂CO₃ (1 mL) was added and the reaction mixture was incubated at room temperature for 30 minutes. The absorbance was read at 750 nm using a spectrophotometer (Shimadzu type 1240, Japan). TPC was expressed as µg gallic acid equivalent (GAE) g⁻¹ dried extract.

DPPH radical scavenging assay.

The DPPH-scavenging capacity of the extracts was measured based on the scavenging potential of stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals by the seaweeds antioxidants. The capacity of the extracts to scavenge the DPPH radical was determined by the method of Sanger *et al.*¹⁴. Briefly, 2 mL of 0.93 µM DPPH in methanol was added to 0.5 mL extract of varying dilutions. The mixture was then vortexed and left in the dark for 20 minutes at room temperature. The absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer (Shimadzu type 1240, Japan). Vitamin C were used as control positive. Antioxidant activity was expressed as a percentage of the DPPH scavenging activity relative to the control.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP).

The seaweeds extract antioxidant activities at various dilutions were determined by using FRAP assay following the method of Sanger *et al.*¹⁴, with modifications. 1 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 1 mL of K₃[Fe(CN)₆] (1%) were mixed with 1 mL of extracts. The reaction mixture was incubated at 50°C for 20 minutes, after which 1 mL of 10% TCA was added and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. 1 mL of solution from the upper layer was mixed with 1 mL of sterile water and 0.5 mL of 0.1 % FeCl₃·6H₂O. The absorbance was measured at 700 nm. BHT was used as a positive control. The FRAP value was expressed as µg GAE g⁻¹.

RESULT AND DISCUSSION

Anti cervical cancer activity

The results of the cytotoxicity activity tested and observing cellular morphological change showed that ethanol extract of all these four seaweed species tested had cytotoxicity activity against cervical cell line. (Figure 1 and 2). The Cytotoxic activity (IC₅₀) of extract to against Hela cell was *G.salicornia* (432,63 µg/mL), *T. decurens* (41,027 µg/mL), *H. macroloba* (137,38) dan *L.cetularoides* (78,53 µg/mL).

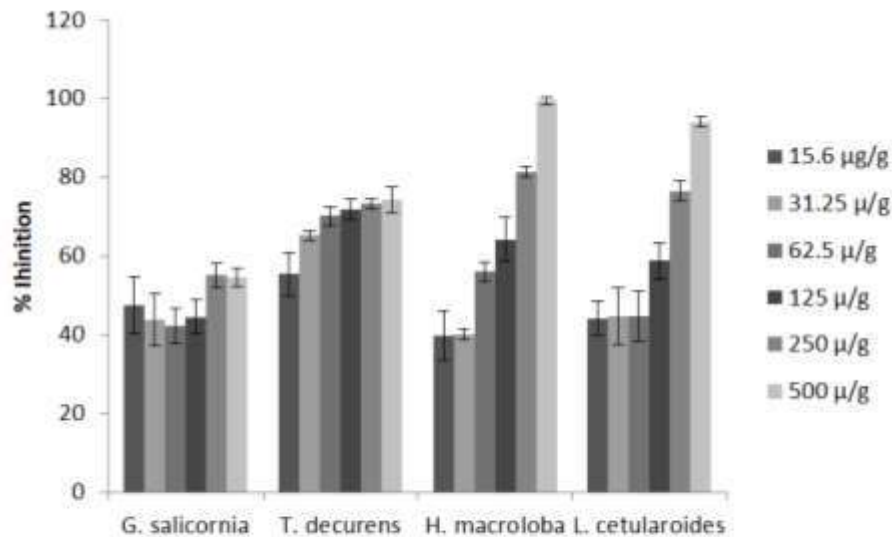


Figure 1. Cytotoxicity Activity of *G. Salicornia*, *T. decurens*, *H. macroloba* and *L. cetularoides* against HeLa cells

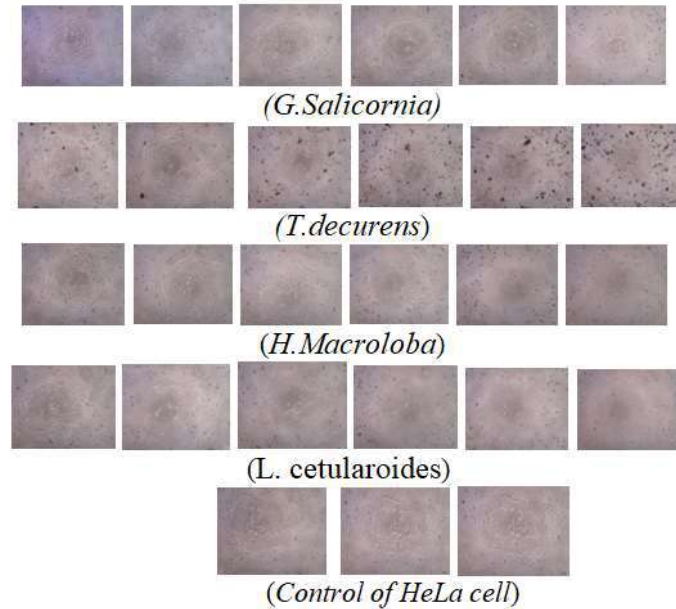


Figure 2. Morfology of the HeLa cell in ethanol extract of *G. Salicornia*, *T. decurens*, *H. macroloba* and *L. cetularoides*

Brown algae *T. decurens* showed the best activity against cervical cancer cell. Fucoidans and laminarans represent the most abundant polysaccharides in the cell wall of various species of brown algae, and the principle carbohydrate reserve¹⁵. Recently, a number of studies have obtained interesting results regarding the anticancer properties of fucoidans both in vitro and in vivo, in different types of cancers. Clinical trials of patients with breast, cervical, renal, and hepatic carcinomas showed a significant improvement in tumour regression among patients who received an alternative medicine treatment regimen based on fucoidan administration¹⁶. Brown alga *S. boveanum* in hexane, trichlorometana and butanol fraction showed cytotoxic activity against HeLa cell, each IC_{50} $150.3 \pm 23.10 \text{ mg mL}^{-1}$, IC_{50} $37,0 \pm 147.3 \text{ mg mL}^{-1}$, ekstrakloroform sebesar IC_{50} $110.4 \pm 33.67 \text{ mg mL}^{-1}$ and IC_{50} $1025.0 \pm 15.20 \text{ mg mL}^{-1}$ (Rushdi *et al.*¹⁷).

L. cetularoides showed have activity against servical cancer cell, The genus Laurencia is a rich source of structurally unique secondary metabolites, characterized by a relatively high degree of halogenation and core terpene structures. The halogenated metabolites from Laurencia possess several biological activities, such as antifeedant, anthelmintic, antimalarial, antifouling, antimicrobial and cytotoxicity¹⁸. Two halogenated sesquiterpenes (obtusol and elatol) isolated from *L. dendroidea* showed a great antiproliferative activity on colorectal adenocarcinoma cells (Colo-205) obtained through the induction of apoptosis¹⁹.

Green algae *H. macroloba* have activity against HeLa cell, that presented inhibitory activity of approximately 55% in $15.6 \mu\text{g/mL}$ that later tended to rise to nearly 75% after $500 \mu\text{g/mL}$ of extract under the experimental conditions used). Alkaloids isolated from seaweeds include indoles and indoles analogues, quinone, 2-phenylethylamine and 2,7-naphthyridine derivatives, , mainly bromine- and chloride-containing, are dominant in Chlorophyta (green seaweeds). the bisindole caulerpin or caulerpine isolated mainly from green algae genus *Caulerpa*, *Codium decortatum* and *Halimeda incrassata*²⁰.

G. salicornia promoted a modest inhibition (40% to 55%) of the HeLa cell viability. Although the *G. salicornia* extracts studied here were not effective as antiproliferative agents, but other studies show that seaweed extracts do have anticancer activity. Methanolic extract of

Gracilaria corticata was used against HepG2 and human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells the average inhibitory activity was 91% and 93%, respectively, using 500 µg/mL of extract. The IC₅₀ values calculated for methanol extract of *G. cornicata* on MCF-7, HeLa, MDA-MB-231, HepG2, and HT-29 cells was 30 ± 0.2, 37 ± 0.2, 53 ± 0.5, 102 ± 0.2, and 250 ± 0.0 µg/ml after treatment for 24 h, respectively. *G. cornicata* have cytotoxic activity against cervical cancer cell of IC₅₀ 125.9 (µg/ml) (Ghannadi *et al.*²¹). At present, treatment cervical cancer with chemotherapy have been developed by using nanoparticle method. 90% silver nitrite 0.1 M in 10 mL dilute in water extract of *G. cornicata* became 100 mL can against hepatic cancer (HepG2)²². Penggunaan Zn pada ekstrak *G. edulis* added with Zn have cytotoxic activity against SiHa cell²³ and also by using gold in making AuNPs Sargassum extract showed effective in against HeLa cell²⁴.

Total Phenolic Content

TPC of ethanol extracts for the five seaweeds are presented in Figure 3. The results show that the highest amount of TPC was *L. cetularoides*, followed with *H. macroloba*, *T. decurens* and *G. salicornia*, each value were 0.193± 0.04, 1.165±0.103; 1.911±0.19; 2.051±0.43 µg GAE g⁻¹.

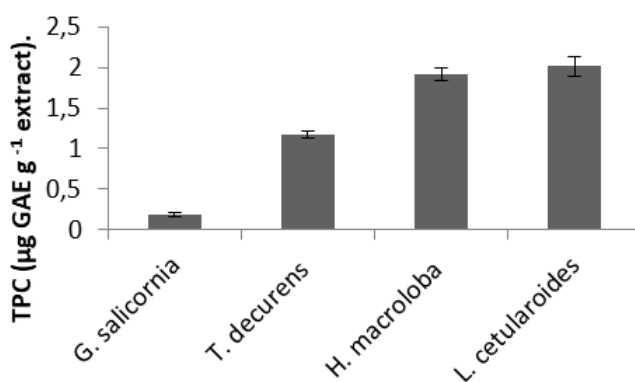


Figure 3. TPC in ethanol extract of *G. Salicornia*, *T. decurens*, *H. macroloba* and *L. cetularoides*

Phenolic compounds are composed of a single aromatic ring bearing one or more hydroxyl group to a polymeric structure of this simple unit and exhibit a large broad of biological activities. The most common subclasses of polyphenols in seaweeds are halogenated phenols, catechins, flavonols, and phlorotannins, being this last more common in brown seaweed while bromophenols, polyphenolic compounds with one or more bromine substituents, are most commonly found in red seaweeds (Rocha *et al.*²⁰). Thomas and Kim²⁵, for example, affirm that the antiproliferative activity in seaweed depends on the total polyphenol content. However, despite these finds, relatively little is known about the chemical identity of the bioactivity compounds of these seaweed and to date, scientific documentation of their bioactivity compounds are rare or non-existent. Therefore, we quantified the levels of phenolic compounds of ethanol extract and posteriorly, we have established a correlation between the amount of these compounds in the ethanol and the cytotoxic activity of these extracts. the correlation between showed a positive correlation. *T. decurens*, *H. macroloba* and *L. cetularoides* have high TPC also have higher anti cervical activity than *G. salicornia* that has lower of TPC. In general, phenolic compounds possessed specific physical, chemical and biological activities that make them useful

as drugs. Phenolics were also responsible for the for the antimicrobial, anti-inflammatory, anti-viral, anticancer actions ²⁶ .

DPPH Scavenging radical activity.

This study shows that the extract of five seaweeds exhibit DPPH scavenging activity (Figure 4), the most effective being *L. cetularoides*, followed by *G. salicornia*, *H. macroloba*, and *T. decurens* with the following IC₅₀ values: 0.48 ±0.023; 1.32±0.96; 2.88±0.24; 3.59±0.25 mg mL⁻¹, respectively.

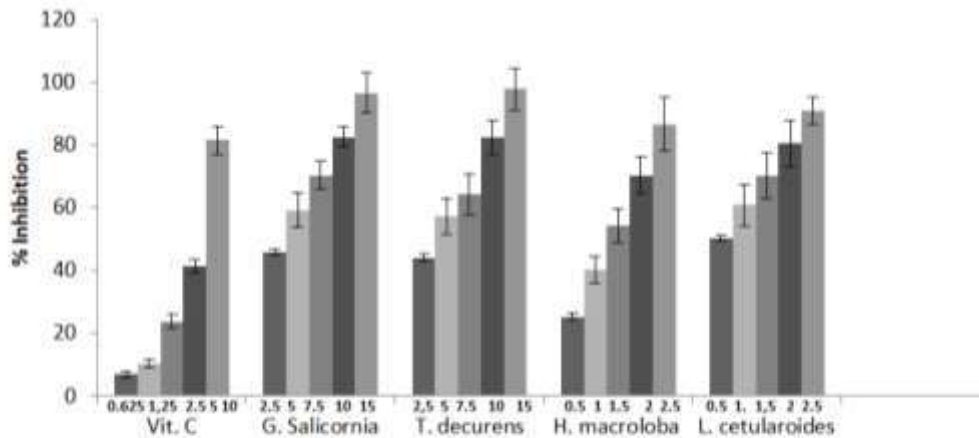


Figure 4. DPPH Radical Scavenging activity of Vit C. (0.625- 10 µg/g extracts) *G. Salicornia* (2.5-15 mg/mL), *T. decurens* (2.5-15 mg/mL) , *H. macroloba* (0.5-2.5 mg/mL) and *L. cetularoides* (0.5-2.5 mg/mL.)

An alga antioxidant-mediated mechanism enhances the host's defence by increasing natural killer-cell activity, activation of nonspecific immune system, inhibition of the cell growth in the G₁ phase, inducing terminal differentiation, inhibition of the complex process of angiogenesis and induction of apoptosis were hypothesized as contributing factors in the inhibition of carcinogenesis. Dietary fiber which has been involved in the development of many chronic diseases including cancer. Therefore Modification in dietary habits for reducing the incidence of these diseases, especially by increasing consumption of functional foods rich in antioxidants are increasingly supported (Nauvar *et al.* ¹²).

Ferric Reducing activity Power (FRAP)

The antioxidant activity in FRAP was measured based on the capability of the antioxidant compounds in the sample to reduce ferric (III) to ferrous (II) in a redox-linked colourimetric reaction that involve single electron. FRAP assay was electron donor and it finished the oxidation chain reaction by reducing the oxidized intermediates into the stable form²⁷. Fig. 5. shows that the highest reducing power was *L. cetularoides* (17.65±0.71 µM Fe²⁺ mg⁻¹ extract) and the lowest was *G. salicornia* (5.301±0.23 µM Fe²⁺ mg⁻¹ extract). Polyphenols are reducing agent, and together with other dietary reducing agent such as vitamin C, E and carotenoid, referred to as antioxidant, protect the body's tissues against oxidative stress and

connected pathologies such as cancer, coronary heart disease and inflammation²⁸. The ethanolic extract of *K. alvarezii* showed higher inhibitory effect than did the positive control, BHT. This might be due to the presence of ascorbic acid and Vitamin A (β -carotene) content in the extract of *K. alvarezii*²⁹. The reducing power property indicates that the antioxidant compounds are electron donor and can decrease the oxidized intermediates of the lipid peroxidation process, so that they can perform as primary and secondary antioxidants²⁷.

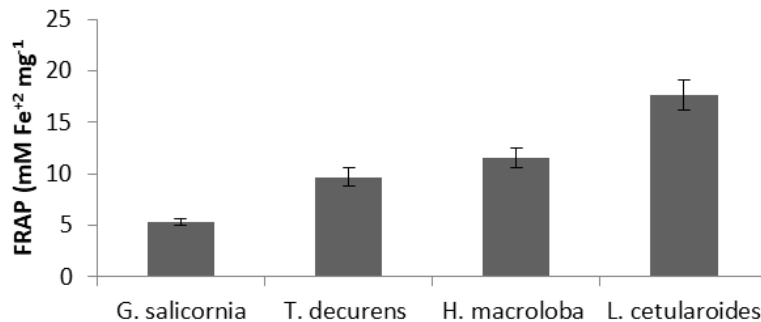


Figure 5. FRAP in ethanol extract of *G. Salicornia*, *T. decurens*, *H. macroloba* and *L. cetularoides*

Marine algae- derived products play an important role in preventing inflammatory reactions and carcinogenesis by modulating the effects of oxidative stress (Taskin *et al.*⁹). Various dietary antioxidants have shown remarkable promise as effective agents for chronic disease prevention and treatment by reducing oxidative stress (Rahman *et al.*⁴). Polysaccharides and terpenoids in brown algae are considered as promising bioactive molecules for anticancer drugs, Marine algae are also rich sources of unsaturated fatty acids and these fatty acids were also reported to block growth and systemic spread of human breast cancer^{3,15}. Several sulphated macroalgal polysaccharides (e.g. fucoidans, translaminan, ulvan) reducing cell proliferation and terpenes (e.g. caulerpenynes from *Caulerpa taxifolia*, mediterraneol from *Cystoseira mediterranea*, meroterpenes and usneoidone E and Z from *Cystophora usneoides*) inhibiting mitotic cell division. Sesquiterpene from *C. xaxifolia* are found antiproliferative against KB cell and colorectal cancer lines⁵. Red alga *Procarnium corallorhiza* and *procarnium cornutum* contain polyoxygenated monoterpene was able to induce apoptosis in breast cell lines and induce necrosis. Demosterol from Green algae *Galaxaura marginata* showed cytotoxicity against lymphocytic leukemia and human lung adenocarcinoma epithelial cell line. Various sterol from *Porphyra* sp. effective control proliferation of breast cell line. Sulfate polysaccharide fucoidan, extract of *Sargassum mclurei* showed anticancerous activity against DLD-1 colon cancer cell line⁹.

Seaweeds have long been used traditionally in Asian foods and folk medicine for centuries. They have become a valuable vegetable (fresh or dried) and an important food ingredient in the human diet. Most recently seaweeds have been utilized in Japan as raw materials in the manufacture of many seaweed food products such as jam, cheese, wine, tea, soup and noodles³⁰. Antioxidant systems are proposed to be involved in carcinogenesis because of its capability to damage the reactive oxygen species. Reactive oxygen species cause unrepaired or misrepaired damage in DNA, leads to the mutations. Antioxidant flavonoids such as quercetin and apigenin are stated to be potent inhibitors of cell proliferation. quercetin and apigenin

inhibited the growth of melanoma and influenced the invasive and metastatic potential in mice. Furthermore, it has been reported that flavonoids obstructed the angiogenesis in the human body. Angiogenesis inhibitors showed a strong effect on various steps in angiogenesis, such as the proliferation and migration of endothelial cells and lumen formation²⁷

The marine heparinoid polysaccharides are similar to heparin in structure, and possess GAG-like biological properties, which contain alginates, ulvans, and their sulfated derivatives, as well as the dextran sulfate and chitosan sulfate (Kang *et al.*³¹). Many previous studies have indicated that some marine heparinoid polysaccharides such as alginic acid and fucoidan could effectively block HPV pseudovirion infection just like heparin (Wang *et al.*³) Furthermore, Buck *et al.*³² reported that the sulfated polysaccharide agar derived from red algae could also effectively block HPV pseudovirion infection with the IC50 value of 0.27 µg/ml.

CONCLUSION.

G. Salicornia, *T. decurens*, *H. macroloba* and *L. cetularoides* extracts have demonstrated cytotoxic activity on HeLa cells. *L. cetularoides* showed the highest content of TPC, DPPH and FRAP. Thus *T. decurens* and *L. cetularoides* could be used as source of bioactive compound to prevent and treatment cervical cancer diseases. *T. decurens* could be further developed as a potent new anticervical cancer agents.

REFERENCE

1. Bray, F., Jacques, F. J. M. E., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries CA: A cancer Journal for Clinicians **69**(6): 394-424.
2. Pal and Kundu R. (2019). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. Frontiers in Microbiology, **10**(3116): 1-15.
3. Wang S.H , Zhang X.S , Guan H.S and Wang W., 2014. Potential Anti-HPV and Related Cancer Agents from Marine Resources: An Overview. Mar. Drugs 2014, 12, 2019-2035;
4. Rachman H.S., , Othman H.H. and Rasedee Bdllah R. 2016. A novel gold biodegradable nanoparticles reduced by *Sargassum glaucescens*: Preparation, characterization and anticancer activity J Tradi Med Clin Natur 2016, 5:2.
5. Ercolano, G., De, Cicco., P., and Ianaro, A. (2019). New Drugs from the Sea: Pro-Apoptotic Activity of Sponges and Algae Derived Compounds. Marine Drug, **17**(31): 1-31
6. Debbarama, J., Rao, B. M., Murthy, L. N., Mathew, S., Venkateshwarlu, G., & Ravishankar, C. (2016). Nutritional profiling of the edible seaweeds *Gracilaria edulis*, *Ulva lactuca* and *Sargassum sp.* Indian J. Fisheries, **63**(3): 81–87
7. Praiboon, J., Palakas, S., Noiraksa, T., Miyashita, K. (2019). Seasonal variation in nutritional composition and anti-proliferative activity of brown seaweed, *Sargassum oligocystum* J Appl Phycol **30**:101–111.
8. Ganesan, A. R., Triwari, U., and Rajauria, G. (2019). Seaweed and Nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. Food Science and Human wellness, **8**(3): 252-263.
9. Taskin E, Z. Caki Z. M. Ozturk Mand E. Taskin 2010. Assessment of in vitro antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean sea African Journal of Biotechnology Vol. 9(27), pp. 4272-4277,
10. Majunder, I., Subhabrata, P., Rita, K. (2015). Anti-Cancerous And-Tumorous Activity Of Algae-A Review **3**(2):72-89

11. Gomes D.L, Cinthia Beatrice Silva Telles C.B.S , Costa M.S.S.P Jailma Almeida-Lima J., Leandro Silva Costa 1,4, Tatjana Souza Lima Keesen 5 and Hugo Alexandre Oliveira Rocha1,2Methanolic Extracts from Brown Seaweeds *Dictyota cilliolata* and *Dictyota menstrualis* Induce Apoptosis in Human Cervical Adenocarcinoma HeLa Cells *Molecules* 2015, 20, 6573-6591;
12. Namvar F., Baharara J. and Mahdi A.A. 2014. Antioxidant and Anticancer Activities of Selected Persian Gulf Algae. *India Journal Clinic Biochemistry*: 29(1):13–20
13. Kim, S.-K.; Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J. Funct. Foods*: 2, 1–9.
14. Sanger G., Rarung L.K., Kaseger B.E., Assa J.R. , Agustin A.T. 2019. Phenolic content and antioxidant activities of five seaweeds from North Sulawesi, Indonesia. *AAACL Bioflux*. 12(6): 2041-2950.
15. Imbs, T.I.; Ermakova, S.P.; Malyarenko Vishchuk, O.S.; Isakov, V.V.; Zvyagintseva, T.N. 2016Structural elucidation of polysaccharide fractions from the brown alga *Coccophora langsdorfii* and in vitro investigation of their anticancer activity. *Carbohydr. Polym.* 2016, 135, 162–168.
16. Nishimoto, S. Clinical Improvement in Cancer Patients through Integrative Medicine Supplemented Mainly with Low-Molecular Fucoidan. The Fourth Report. *J. Int. Soc. Life Inf. Sci.* 2016, 34, 153.
17. Rushdi, M. I. , Iman, A. M., Abdel-Rahman, Saber, H., Attia, E. Z., Wedad, M., Abdelraheem, Hashem, A., Madkour, Hossam, M., Hassan, H. M., Abeer H., Elmaidomy A. H., and Abdelmohsen, U. R. (2020). Pharmacological and natural products diversity of the brown algae genus *Sargassum*. *Royal Society of Chemistry Advance*, 10: 24951–24972
18. Dias, D.A.; Urban, S. Phytochemical studies of the southern Australian marine alga, *Laurencia elata*. *Phytochemistry* 2011, 72, 2081–2089.
19. Barcellos Marini, M.; Rodrigues de Freitas, W.; Lacerda da Silva Machado, F.; Correa Ramos Leal, I.; Ribeiro Soares, A.; Masahiko Kanashiro, M.; Frazao Muzitano, M. Cytotoxic activity of halogenated sesquiterpenes from *Laurencia dendroidea*. *Phyther. Res. PTR* 2018, 32, 1119–1125.
20. Roca H. A, Seca A.M.L and Pinto D.C.G.A. Seaweed Secondary Metabolites In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. *Molecule. MPDP*: 1-27.
21. Ghannadi, A., Leila, Shabani, L., Yegdaneh. (2016). A Cytotoxic, antioxidant and phytochemical analysis of *Gracilaria* species from the Persian Gulf. *Advanced Biomedical Research*, 5(1): 1-5.
22. Supraja, N., Pravada, R. N. V. K. V., Soundariya, M., Babujanarathanan, R. (2016). Synthesis Characterization and dose dependent antimicrobial and anti-cancerous activity of phycogenic silver nanoparticles against human hepatic carcinoma (HepG2). *AIMS Bioengineering*, 3: 425-440.
23. Mohamed, A. R. B., Gowdhani, B., Mohamed, J. M. S., Archunan, G., Suganthy, N.(2019). Anticancer potential of zinc oxide nanoparticles against cervical carcinoma cells synthesized via biogenic route using aqueous extract of *Gracilaria edulis*. *Material Science and Engineering: C*.Vol.3
24. Ajdari, Z., Rahman, H., Shameli, K., Abdullah, R., Abd Ghani, M. A., Swee Yeap, S., Abbasiliasi, S., Ajdari, D., & Ariff, A. (2016). Novel Gold Nanoparticles Reduced by *Sargassum glaucescens*: Preparation, Characterization and Anticancer Activity. *Molecule*, 21(123): 1-17.

25. Thomas, N.V.; Kim, S.K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011, 32, 325–335.
26. Deyab M, Taha Elkatony and Fatma Ward Qualitative and Quantitative Analysis of Phytochemical Studies on Brown Seaweed, *Dictyota dichotoma* International Journal of Engineering Development and Research 2016 IJEDR | Volume 4, Issue 2 | ISSN: 2321-9939 (www.ijedr.org)
27. Sanger G., Widjanarko S. B., Kusnadi J., Berhimpon S., 2013 Antioxidant Activity of Methanol Extract of Seaweeds Obtained from North Sulawesi. *Food Science and Quality Management* 19:63-70.
28. Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G., Mathe'G., (2002). Polyphenols: Do They Play A Role in The Prevention of Humans Pathologies? *Review.Biomed.Pharmaco.* 56:200-207. 29..
29. Fayaz M, Namitha K.K., Chidambara Murthy K.N., Swamy M., Sarada R., Khanam S, et al. 2005.Chemical Composition, Iron Bioavailability, and Antioxidant Activity of *Kappaphycusalvarezzi* (Doty).*J.Agric Food Chem.*53:792-797.
30. Ashwini, S., and Manjula, S. (2017). A study on the ethanolic extracts of red seaweed *corticata* (j.agardh) j. Agardh, to assess the antiproliferative activity and morphological characterization of apoptosis on hela cell lines. *International Journal of Phytomedicine*, 9(3): 436-442.
31. Kang, Y., Hua, Li., Jun, Wu., Xiaoting, Xu., Xue, Sun., Xiaodong, Zhao., Nianjun, Xu. (2016). Transcriptome Profiling Reveals the Antitumor Mechanism of Polysaccharide from Marine Algae *Gracilariopsis lemaneiformis*. *PLoS ONE*, 11(6): 1-16.
32. Buck, C.B.; Thompson, C.D.; Roberts, J.N.; Muller, M.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. 2006. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathog.* 2, 69.

Submit a manuscript

Dari: Grace Sanger (sanger.grace@yahoo.co.id)

Kepada: zoobiomag2004@yahoo.com

Tanggal: Sabtu, 9 Januari 2021 21.57 WIB

TO: INTERNATIONAL JOURNAL OF THE BIOFLUX SOCIETY

I do hope you can help me to receive my article to publish it in your journal, The title if the article is: ***Anti Cervical Cancer Activity of Seaweeds Obtained from Coastal Area of North Sulawesi Indonesia***. I need your suggestion for reviewing the manuscript. God bless you,
Best regard, Grace Sanger, Faculty of Fisheries and Marine Science, Sam Ratulangi University, Manado. Indonesia.



Manucript By. Grace Sanger..docx
886.1kB

Dokumen pendukung luaran Tambahan #1

Luaran dijanjikan: Paten Sederhana

Target: terdaftar

Dicapai: Terdaftar

Dokumen wajib diunggah:

1. Deskripsi dan spesifikasi paten sederhana
2. Dokumen pendaftaran (lengkap dengan nomor pendaftaran paten sederhana) dari Kemenkumham atau institusi perlindungan paten sederhana lainnya

Dokumen sudah diunggah:

1. Deskripsi dan spesifikasi paten sederhana
2. Dokumen pendaftaran (lengkap dengan nomor pendaftaran paten sederhana) dari Kemenkumham atau institusi perlindungan paten sederhana lainnya

Dokumen belum diunggah:

-

Nama Paten POTENSI ANTI KANKER SERVIKS RUMPUT LAUT *Halymenia durvilae*
DAN METODA EKSTRAKSINYA

Pemegang Paten: Grace;Sanger;dkk;Sentra;KI;Universitas;Sam;Ratulangi;Manado

No Pendaftaran: P00202010167

No Granted: -

Deskripsi

POTENSI ANTI KANKER SERVIKS RUMPUT LAUT *Halymenia durvilae* DAN METODA EKSTRAKSINYA

5 Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan kapasitas rumput laut *H. durvilae* untuk melawan sel kanker serviks pada beberapa konsentrasi ekstrak serta kandungan senyawa fitokimia *H.durvilae*. Invensi ini juga berhubungan dengan metode ekstraksi
10 ekstrak rumput *H. durvilae* menggunakan beberapa pelarut.

Latar belakang

Insiden kanker saat ini terus meningkat hal ini disebabkan karena meningkatnya populasi lanjut usia, keadaan ekonomi dan
15 gaya hidup yang tidak sehat (IARC) Prediksi menunjukkan bahwa pada Tahun 2030, 13 juta orang akan meninggal karena kanker. Tiga perempat kematian terjadi di negara berpenghasilan rendah dan menengah. Di Indonesia Kanker serviks dan kanker payudara merupakan jenis kanker yang banyak diderita wanita. Berdasarkan
20 data GLOBOCAN kanker serviks menduduki peringkat ke 2 dalam jumlah kasus dan tingkat kematian sesudah kanker payudara. Proyek tahun 2018, kasus kematian akibat kanker serviks sebesar 18.279 dari total 32.469 kasus kanker baru. (Globocan, 2018).

Meskipun kemajuan signifikan telah dibuat, namun terapi
25 kanker yang sepenuhnya efektif masih jauh dari pencapaian (Asco, 2018). Heterogenitas kanker (Lartigue 2018) dan perkembangan resistensi terhadap obat antikanker (Nikolaou, et al., 2018) kanker merupakan salah satu masalah utama yang harus diatasi. Padahal, pengobatan kanker biasanya terdiri dari kombinasi
30 terapi, sesuai dengan karakteristik dan stadium tumornya, termasuk pembedahan, radio dan kemoterapi yang terbaru imunoterapi (Sun et al., 2017). Oleh sebab itu, saat ini sedang berkembangnya obat-obatan. untuk target spesifik terkait kanker, dipadukan dengan pemahaman yang efektif tentang hubungan obat

dengan biologi tumor manusia, menjadi kunci dalam upaya penyembuhan kanker (Senapati et al., 2018).

5 Salah satu sumber utama obat adalah senyawa alami, yang telah menunjukkan potensi yang cukup besar dalam terapi kanker (Tores et al. 2017, Seca dan Pinto 2018). Faktanya, sepertiga dari dua puluh obat teratas saat ini berasal dari sumber alami, termasuk tumbuhan dan spesies laut, dan di antara 175 molekul kecil yang disetujui untuk mengobati kanker, 49% merupakan senyawa alami atau langsung diturunkan (Newman, 2016).

10 Rumput laut kaya akan terpenoid, alkaloid, polifenol, steroid, pigmen dan polisakarida dan beberapa uji biologis menunjukkan bahwa beberapa dari metabolit ini memiliki aktivitas farmakologis yang menjanjikan (Sun et al., 2018) termasuk dalam terapi kanker (Alvest, et al., 2018).

15 Rumput laut kaya akan senyawa bioaktif seperti, fenolik, polysakarida, PUFA, protein, vitamin dan mineral yang mempunyai aktifitas biologi seperti antioksidan, antitumor dan antikanker (Debbarama et al., 2016; Primboon et al, 2018; Ganesan et al, 2019). Beberapa senyawa bioaktif rumput laut menunjukkan
20 mempunyai aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker serviks (HeLa/SiHa).

Rumput Laut *H. durvylae* mengandung pigmen phycoerythrin dan phycoyanin yang menghasilkan warna merah cerah serta mempunyai aktifitas antioksidan, yang dapat meredam radikal bebas DPPH dan
25 bersifat sebagai pengkelat logam (Sanger et al., 2017). Telah ditemukan juga aktifitas antioksidan TEAC (*Trolox equivalent antioxidant Capacity*) dan FRAP (*Ferric Reducing antioxidant power*) ekstrak metanol alga laut *H.durvila*e masing-masing sebesar $1,67 \pm 0,04 \text{ mM.mg}^{-1}$ dan $182,29 \pm 13,35 \text{ } \mu\text{mol.mg}^{-1}$ ekstrak
30 kering (Matanjun et al., 2007). *H. durvila*e mengandung spingosin (Muranidhar et al., 2003) merupakan sumber Yodium yang tinggi 0,255% dengan LD₅₀ 119,1489 \pm 4,9873 g/kg pada tikus dan telah diformulasi menjadi tablet (Lakshmi et al., 2006).

35 Senyawa 25-hydroperoxy-6 β -hydroxycholesta-4, 23(E)-dien-3-one dari alga hijau *Galaxaura marginata* (Majunder et al., 2015).

Senyawa lectin dari rumput Laut merah *Eucheuma serra* dan senyawa Bis (2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether (BDDE) dari rumput laut coklat *Leathesia nana* (Ercolano et al., 2019). Potensi antikanker makroalga *H.durvilae* Sp menginspirasi kami untuk melakukan studi yang bertujuan untuk mengembangkan hasil alam laut Indonesia yang berfokus pada eksplorasi *G. salicornia* yang banyak terdapat di wilayah pesisir Indonesia, termasuk Sulawesi Utara, sebagai obat.

Invensi aktifitas antikanker serviks rumput laut telah dilaporkan, *G. cornicata* mempunyai aktifitas sitotoksik melawan sel Hela sebesar IC_{50} 125.9 ($\mu\text{g/ml}$) (Ghannadi et al., 2016). Fraksi heksana dan diklorometana *S. angustifolium* mempunyai aktifitas sitotoksik terhadap sel Hela sebesar IC_{50} 62.5186 $\mu\text{g/mL}$ dan 134,7 $\mu\text{g/mL}$ (Vaseghi et al., 2018). *S. boveanum* mempunyai aktifitas sitotoksik pada sel Hela, pada ekstraksi menggunakan heksana aktifitas sitotoksik sebesar IC_{50} $150.3 \pm 23.10 \text{ mg mL}^{-1}$, triklorometana sebesar IC_{50} $37,0 \pm 147.3 \text{ mg mL}^{-1}$, ekstrakloroform sebesar IC_{50} $110.4 \pm 33.67 \text{ mg mL}^{-1}$ dan ekstrak butanol sebesar IC_{50} $1025.0 \pm 15.20 \text{ mg mL}^{-1}$ (Rushdi et al., 2020). Mekanisme sitotoksik *Gracilaria* sp dan *Sargassum* sp dapat dilihat pada Tabel 1. Saat ini, pengobatan kanker-serviks dengan cara kemoterapi menggunakan nanopartikel telah dikembangkan saat ini. 90% perak nitrat 0.1 M dan 10 mL ditambahkan dalam ekstrak air *G. cornicata* menjadi 100 mL menjadi AgNPs, mempunyai aktifitas antikanker (HepG2) (Supraja et al., 2016). Penggunaan Zn pada ekstrak *G. edulis* mempunyai aktifitas sitotoksik melawan sel SiHa (Mohamed et al., 2019) demikian juga penggunaan emas pada pembuatan ekstrak *S. glaucescens* menghasilkan larutan AuNPs yang terbukti efektif melawan sel hela (Ajdari et al., 2016). Fucosantin yang diisolasi dari *S. filipendula* menghambat sel kanker serviks HeLa melalui induksi apoptosis mitokondria ke dalam sitosol dan pada saat yang sama menurunkan faktor anti apoptosis Bcl-2 dan meningkatkan tingkat faktor penginduksi apoptosis bax (Zailanie et al., 2015). Senyawa 25-hydroperoxy-6 β -hydroxycholesta-4, 23(E)-dien-3-one

dari alga hijau *Galaxaura marginata* (Majunder et al., 2015). Senyawa lectin dari rumput Laut merah *Eucheuma serra* dan senyawa Bis (2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether (BDDE) dari rumput laut coklat *Leathesia nana* (Ercolano et al., 2019).
 5 Invensi tentang aktifitas anti kanker serviks *H.durvilae* serta senyawa fitokimia belum dilaporkan.

Ringkasan Invensi

10 Invensi ini menghasilkan aktifitas anti kanker serviks dan kandungan fitokimia rumput laut *H.durvilae*. Aktifitas anti kanker serviks dianalisis dengan menggunakan beberapa konsentrasi ekstrak. Uji aktifitas antikanker serviks menggunakan sel HeLa (ATCC CCL2). Kandungan fitokimia terdiri dari alkaloid (menurut metoda Wagner, Meyer dan Gragondorf), steroid, flavonoid,
 15 tannin, saponin, triterpenoid dan Hydroquinon.

Invensi ini berhubungan juga dengan metoda ekstraksi rumput laut *H.durvilae*. Proses ekstraksi menggunakan pelarut metanol dengan konsentrasi 70%. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan pengulangan 3 kali. Kemudian dilakukan
 20 fraksinasi dengan beberapa pelarut non-polar, semi polar dan polar, proses fraksinasi dilakukan secara bertingkat.

Metode ekstraksi sampel rumput laut *H.durvilae* menurut invensi ini melalui tahapan sebagai berikut:

- a. Preparasi *H.durvilae* segar
 25 Rumput laut dibersihkan dengan hati-hati menggunakan air mengalir, yaitu air laut dan air tawar.
- b. Proses ekstraksi
 Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelrut metanol dengan cara maserasi.
- 30 c. Proses fraksinasi
 Fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana, chloroform dan air. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat. Fraksi yang diperoleh di saring kemudian dievaporasi pada suhu 40.
- d. Pengujian kandungan fitokimia

Penggunakan kandungan fitokimia menggunakan metoda Harbourn, 1966, yang dimodifikasi.

e. Pengujian aktifitas antikanker serviks

Pengujian antikanker serviks menggunakan metoda Silvester, 1968, yang dimodifikasi

Uraian Lengkap Invensi

Rumput Laut *H. durvilae* diambil dari perairan Sulawesi Utara. Rumput laut yang masih segar harus ditangani dengan hati-hati, karena tekstur rumput laut ini mudah sekali hancur. Apabila tekturna telah pecah maka, secara bioaktif yang terkandung didalamnya akan mengalir keluar. Metode ekstraks rumput laut merah *Halymenia durvilae* menurut invensi ini melalui tahapan sebagai berikut:

15 a. Preparasi *H.durvilae*

Rumput laut segar dibersihkan dan dicuci bersih dengan air mengalir dengan hati-hati, untuk mengeluarkan kotoran meliputi: pasir, kerang-kerangngan dan tanaman lain yang masih menempel serta garam-ragam.

20 b. Proses Ekstraksi

Rumput laut yang telah bersih kemudian ditimbang, setelah itu diblender, kemudian di ekstraksi dengan cara maserasi. Sebanyak 1 kg rumput laut dilarutkan dalam 2 liter metanol setelah itu direndam selama 24 jam. Proses maserasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan selalu menggunakan pelarut yang baru. Maserat yang diperoleh dari 3 kali maserasi. Maserat ditampung kemudian disaring dengan menggunakan kertas Whatman No. 1. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan rotari evaporator dengan suhu 40°C. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian disimpan dalam lemari es untuk kemudian di analisis kandungan fitokima dan aktifitas antikanker serviks.

35 c. Proses Fraksinasi

Alga laut *H.durvilae* segar sebanyak 3 kg diblender menjadi butiran-butiran yang sangat kecil, agar senyawa kimia yang

tekandung dapat terekstraksi dengan baik. Sampel kemudian diekstraksi dengan cara maserasi dalam suhu ruang dengan pelarut metanol 70% (1:2 b/v) selama 24 jam, sebanyak tiga kali. Menurut Nazir *et al.* 2011, ekstrak pekat metanol ini didekantasi dengan etil asetat sebanyak 3 kali, kemudian dievaporasi, Selanjutnya ekstrak pekat yang diperoleh dilarutkan dalam akuades dan dipartisi secara bertingkat/ berkesinambungan dalam corong pisah dengan menggunakan pelarut *n*-heksana sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi air dipartisi dengan kloroform, sehingga diperoleh fraksi kloroform dan fraksi air. Fraksi-fraksi hasil partisi (*n*-heksana, kloroform dan air) diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40°C. Kemudian semua ekstrak dan fraksi alga laut dianalisis kandungan fitokimia dan aktifitas anti-kanker serviks.

5

10

15

d. Pengujian Fitokimia

e. Pwengujian Aktifitas kanker serviks.

Hasil analisis fitokimia ekstrak metanol dan fraksi *n*-heksana, chlorofom dan air *H.durvilae* pada invensi ini dapat dilihat pada Tabel 1.

20

Table 1. Phytochemical constituents in methanol extract, hexane, chloroform and water fraction of *H.durvilae*

25

30

Phytochemical Constituents	Extract and fractions			
	Methanol	Hexane	Chloroform	water
Alkaloids-Wagner	-	-	-	-
-Meyer	-	-	-	-
Dragondodorf	-	-	-	-
Steroids	+	+	+	+
Flavonoids	+	+	+	+
Tannins	-	-	-	-
Saponins	+	-	-	-
Triterpenoids	+	+	+	+
Hidroquinons	+	-	-	+

Hasil analisis aktifitas antikanker serviks ekstrak metanol dan fraksi *n*-heksana, chlorofom dan air *H.durvilae* pada invensi ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktifitas Penghambatan sel kanker serviks (sel HeLa (ATCC CCL2) ekstrak metanol, fraksi n-heksana, kloroform dan air H. durvilae

Konsentrasi (mg/mL)	<i>Ekstrak metanol</i> (%)	<i>Fraksi n- heksana</i> (%)	<i>Fraksi kloroform</i>	<i>Fraksi air</i> (%)
10	90.4	92.9	92.2	92.6
8	74.8	93.4	92.3	92.8
6	64.1	93.6	92.3	93.1
4	52.6	94.2	93.2	93.0

5

Berdasarkan hasil analisis kandungan fitokimia menunjukkan bahwa H. durvilae mengandung senyawa bioaktif steroid, flavonoid, triterpenoid dan hydroquinon. Senyawa-senyawa fitokimia ini memberikan pengaruh pada aktifitas biofungsional rumput laut H. durvilae. H. durvilae mempunyai aktifitas cytotoksik melawan sel kanker serviks HeLa(ATCC CCL2).

Penerapan dalam industri

Rumput laut H. Durvilae mengandung senyawa bioaktif untuk dapat mencegah dan juga mengobati penyakit kanker serviks. Ekstrak dan fraksi H.durvilae dapat dimanfaatkan pada makanan dan minuman sebagai sumber pangan fungsional.

Rumput laut H.durvilae dapat tumbuh melimpah di Indonesia dan dapat dikultur sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber bahan pangan fungsional secara industri untuk mencegah kankerservik di Indonesia.

25

Klaim

Rumput laut *H.durvilae* mengandung senyawa fitokimia dan mempunyai aktifitas melawan kanker serviks. Senyawa bioaktif rumput laut *H.durvilae* dapat diperoleh dengan cara ekstraksi dan maserasi. Dengan menggunakan pelarut metanol, n-heksana, chloroform dan air. Metode untuk memperoleh senyawa bioaktif dar *H. durvilae* dengan tahapan:

- a. Menyiapkan rumput laut merah *Halymenia durvilae* dengan cara dicuci bersih secara hati-hati dan cepat menggunakan air mengalir untuk mengeluarkan garam yang tersisa, dibilas dengan air mengalir.
- b. Eksraksi. *H.durvilae* diblender setelah itu diekstraksi dengan pelarut metanol 70% dengan perbandingan 1:2 (b/V), dengan cara maserasi sebanyak 3 kali. maserat yang diperoleh kemudian disaring setelah itu dievaporasi. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian diuji kandungan fitokimia dan aktifitas antikanker serviks.
- c. Fraksinasi. *H. durvilae* terlebih dahulu disektrasi dengan metanol 70%, kemudian difraksinasi secara bertingkat menggunakan pelarut - heksana, chloroform dan air. Kemudian disaring dengan kertas whatman no.1 setelah itu dievaporasi menggunakan vaccum rotary evaporator. Ekstrak kental dan fraksi kemudian diuji kandungan fitokimia dan aktifitas antikanker serviks.
- d. Kandungan Fitokimia *H. durvilae* teridri dari: steroid, flavonoid, triterpenoid dan hydroquinon dan aktifitas anti kanker serviks pada konsentrasi 4, 6, 8 dan 10 mg/mL ekstrak metanol *H.durvilae* masing-masing sebesar 90,4; 74,8; 64,1 dan 52.6%. sedangkan untuk semua fraksi *H. durvilae* berkisar 92,2- 94,6%
- e. Ekstrak dan Fraksi *H.durvilae* mengandung senyawa bioaktif yang potensil dapat melawan kanker serviks dan potensil untuk diisolasi menjadi novel obat antikanker serviks dimasa depan.

Abstrak**POTENSI ANTI KANKER SERVIKS RUMPUT LAUT *Halymenia durvilae*
DAN METODA EKSTRAKSINYA**

5 Rumput laut laut *H.durvlae* mengandung senyawa
fitokimia yang dapat mencegah penyakit penyakit kanker
serviks, merupakan suatu alternatif yang dapat digunakan
untuk mengobati penyakit kanker serviks menggunakan bahan
alami yang tidak mempunyai efek samping. Seperti berbagai
10 terapi yang digunakan saat ini yang justru mengakibatkan
suatu penderitaan yang besar. Invensi ini menghasilkan
metoda ekstraksi senyawa bioaktif yang terbukti dapat
melawan sel kanker serviks. Kandungan senyawa fitokimia
rumput laut segar *H. durvilae* menggunakan pelarut metanol,
15 n-heksana, chloroform dan air terdiri dari steroid,
flavonoid, triterpenoid dan hydroquinon. Aktifitas anti-
kanker serviks yang diuji menggunakan sel HeLa (ATCC CCL2)
menunjukkan bahwa pada konsentrasi 4, 6, 8 dan 10 mg/mL
ekstrak metanol *H.durvilae* masing-masing sebesar 90,4;
20 74,8; 64,1 dan 52.6%. sedangkan untuk semua fraksi *H.*
durvilae berkisar 92,2- 94,6%. Dari invensi ini dapat
disimpulkan bahwa rumput laut *H.durvilae* dapat dijadikan
sumber bahan alami yang mengandung senyawa bioaktif untuk
melawan sel kanker serviks. Dimasa depan perlu suatu novel
25 untuk mengisolasi senyawa aktif *H.durvilae* untuk dijadikan
obat potensial untuk melawan kanker, yang dapat dikembangkan
secara industri.

FORMULIR PERMOHONAN PENDAFTARAN PATEN INDONESIA
APPLICATION FORM OF PATENT REGISTRATION OF INDONESIA

Data Permohonan (Application)

Nomor Permohonan <i>Number of Application</i>	: P00202010167	Tanggal Permohonan <i>Date of Submission</i>	: 18-Dec-2020
Jenis Permohonan <i>Type of Application</i>	: PATEN	Jumlah Klaim <i>Total Claim</i>	: 5
		Jumlah halaman <i>Total page</i>	: 7
Judul <i>Title</i>	: POTENSI ANTI KANKER SERVIKS RUMPUT LAUT <i>Halymenia durvilae</i> DAN METODA EKSTRAKSINYA		
Abstrak <i>Abstract</i>	: Rumput laut laut H.durvlae mengandung senyawa fitokimia yang dapat mencegah penyakit penyakit kanker serviks, merupakan suatu alternatif yang dapat digunakan untuk mengobati penyakit kanker serviks menggunakan bahan alami yang tidak mempunyai efek samping. Seperti berbagai terapi yang digunakan saat ini yang justru mengakibatkan suatu penderitaan yang besar. Invensi ini menghasilkan metoda ekstraksi senyawa bioaktif yang terbukti dapat melawan sel kanker serviks. Kandungan senyawa fitokimia rumput laut segar H. durvilae menggunakan pelarut metanol, n-heksana, chloroform dan air terdiri dari steroid, flavonoid, triterpenoid dan hydroquinon. Aktifitas anti-kanker serviks yang diuji menggunakan sel HeLa (ATCC CCL2) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 4, 6, 8 dan 10 mg/mL ekstrak metanol H.durvilae masing-masing sebesar 90,4; 74,8; 64,1 dan 52.6%. sedangkan untuk semua fraksi H. durvilae berkisar 92,2- 94,6%. Dari invensi ini dapat disimpulkan bahwa rumput laut H.durvilae dapat dijadikan sumber bahan alami yang mengandung senyawa bioaktif untuk melawan sel kanker serviks. Dimasa depan perlu suatu novel untuk mengisolasi senyawa aktif H.durvilae untuk dijadikan obat potensial untuk melawan kanker, yang dapat dikembangkan secara industri		

Permohonan PCT (PCT Application)

Nomor PCT <i>PCT Number</i>	:	Nomor Publikasi <i>Publication Number</i>	:
Tanggal PCT <i>PCT Date</i>	:	Tanggal Publikasi <i>Publication Date</i>	:

Pemohon (Applicant)

Name (Name)	Alamat (Address)	Surel/Telp (Email/Phone)
Sentra KI Universitas Sam Ratulangi	Jl. Kampus Unsrat, Manado	085341940978 sentraki@unsrat.ac.id

Penemu (Inventor)

Nama (Name)	Warganegara (Nationality)	Alamat (Address)	Surel/Telp. (Email/Phone)
Grace Sanger	Indonesia	Jln. Laut Galilea, Kleak Lingkungan V	sanger.grace@yahoo.com 085399940496
Lexy Karel Rarung	Indonesia	Jln. Laut Galilea, Kleak Lingkungan V	lexyrarung@unsrat.ac.id 085256579950
Jan Rudolf Assa	Indonesia	Jln.C.H. Taulu No. 41 Titiwungen Utara, Sario	assayannce@yahoo.co.id 082194112140

Data Prioritas (Priority Data)**Negara
(Country)****Nomor
(Number)****Tanggal
(Date)****Korespondensi (Correspondence)****Nama
(Name)****Alamat
(Alamat)****Surel/Telp.
(Email/Phone)**

Universitas Sam Ratulangi

Jl. Kampus Unsrat, Manado

sentraki@unsrat.ac.id
085341940978**Lampiran (Attachment)**

KLAIM

ABSTRAK

SURAT PENGALIHAN HAK ATAS INVENSI

SURAT PERNYATAAN KEPEMILIKAN INVENSI OLEH INVENTOR

DOKUMEN LAINNYA

DESKRIPSI

Detail Pembayaran (Payment Detail)

No	Nama Pembayaran	Sudah Bayar	Jumlah Data
1.	Pembayaran Permohonan Paten	<input checked="" type="checkbox"/>	-
2.	Pembayaran Kelebihan Deskripsi	<input type="checkbox"/>	-
3.	Pembayaran Kelebihan Klaim	<input type="checkbox"/>	-
4.	Pembayaran Percepatan Pengumuman	<input type="checkbox"/>	-
5.	Pembayaran Pemeriksaan Substantif	<input type="checkbox"/>	-

Jakarta, 18 Desember 2020

Pemohon / Kuasa

Applicant / RepresentativeTanda Tangan / SignatureNama Lengkap / Fullname