

Sitotoksitas Ekstrak Metanol dan n-Heksan dari Spons Laut *Stylotella aurantium* dan *Callyspongia aerizusa* terhadap Lini Sel HeLa

Riezki Amalia^{1,2,3}, Eli Mirdayani^{1,2}, Syifa Hanifah¹, Nur Diana Hadad¹, Idin Sahidin⁴,
Ajeng Diantini^{1,3}

¹Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

²Laboratorium Riset Translasional Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

³Pusat Unggulan Inovasi Pelayanan Kefarmasian, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

⁴Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari, Indonesia

Abstrak

Spons laut merupakan salah satu sumber utama senyawa bioaktif karena kemampuannya menghasilkan metabolit dengan struktur unik, seperti manzamine A, avarol, dan callyaerin G, yang memiliki aktivitas biologis tinggi sebagai mekanisme pertahanan diri. Dua spesies spons laut yang dilaporkan memiliki potensi aktivitas biologis adalah *Stylotella aurantium* dan *Callyspongia aerizusa*, namun studi mengenai potensi sitotoksitas dan antikanker keduanya masih terbatas. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi potensi sitotoksitas ekstrak metanol dan n-heksan dari *S. aurantium* dan *C. aerizusa* terhadap lini sel kanker serviks HeLa dengan menggunakan metode *water soluble tetrazolium-8* (WST-8). Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak metanol *S. aurantium* memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} sebesar 873.65 $\mu\text{g/mL}$ pada waktu perlakuan 24 jam. Berdasarkan kriteria ISO 10993-5, ekstrak metanol *S. aurantium* pada konsentrasi 1.000 $\mu\text{g/mL}$ dengan waktu perlakuan 24 jam menghasilkan persentase sel viabel sebesar $39,88 \pm 2,88\%$, yang dikategorikan sebagai aktivitas sitotoksitas moderat hingga kuat. Sebaliknya, ekstrak n-heksan *S. aurantium* serta ekstrak metanol dan n-heksan *C. aerizusa* menunjukkan nilai $IC_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$ pada waktu perlakuan 24 jam dan tidak menunjukkan aktivitas sitotoksitas signifikan terhadap sel HeLa pada konsentrasi 1.000 $\mu\text{g/mL}$. Temuan ini mengindikasikan bahwa ekstrak metanol *S. aurantium* memiliki potensi sitotoksik yang layak diteliti lebih lanjut sebagai kandidat antikanker.

Kata kunci: *Callyspongia aerizusa*, HeLa, sitotoksitas, spons laut, *Stylotella aurantium*

Cytotoxicity of Methanol and n-Hexane Extracts from Marine Sponges *Stylotella aurantium* and *Callyspongia aerizusa* against HeLa Cell Lines

Abstract

Marine sponges are a primary source of bioactive compounds due to their ability to produce metabolites with unique structures, such as manzamine A, avarol, and callyaerin G, which exhibit high biological activity as part of their defense mechanisms. Two marine sponge species reported to possess promising biological activities are *Stylotella aurantium* and *Callyspongia aerizusa*, although studies on their cytotoxic and anticancer potential remain limited. This study aimed to evaluate the cytotoxic potential of methanol and n-hexane extracts of *S. aurantium* and *C. aerizusa* against HeLa cervical cancer cell lines using the water-soluble tetrazolium-8 (WST-8) assay. The results showed that the methanol extract of *S. aurantium* exhibited cytotoxic activity with an IC_{50} value of 873.65 $\mu\text{g/mL}$ after 24 hours of treatment. According to ISO 10993-5 criteria, the methanol extract of *S. aurantium* at a concentration of 1,000 $\mu\text{g/mL}$ with 24-hour exposure resulted in a cell viability percentage of $39.88 \pm 2.88\%$, which is categorized as moderate to strong cytotoxic activity. In contrast, the n-hexane extract of *S. aurantium* as well as both methanol and n-hexane extracts of *C. aerizusa* showed IC_{50} values $> 1,000 \mu\text{g/mL}$ after 24 hours of treatment. It did not exhibit significant cytotoxic activity against HeLa cells at a concentration of 1,000 $\mu\text{g/mL}$. These findings indicate that the methanol extract of *S. aurantium* has cytotoxic potential and warrants further investigation as a potential anticancer candidate.

Keywords: *Callyspongia aerizusa*, cytotoxicity, HeLa, marine sponges, *Stylotella aurantium*

Korespondensi: Riezki Amalia, Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia, email: riezki.amalia@unpad.ac.id

Pendahuluan

Spons laut (*marine sponges*) merupakan komponen penting ekosistem terumbu karang, dengan lebih dari 15.000 spesies yang tersebar luas di perairan dunia. Sekitar 45% senyawa bioaktif yang ditemukan di laut berasal dari spons, menjadikannya salah satu sumber utama penemuan obat baru.¹ Spons laut diketahui mampu menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan struktur kimia unik dan aktivitas biologis tinggi, yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap predator maupun kompetitor dalam ekosistem laut.² Berbagai studi telah mendokumentasikan aktivitas farmakologis spons, termasuk sitotoksik, inhibitor kinase, antibakteri, antivirus, antihiperlipidemia, antiproliferasi, imunomodulator, dan antiinflamasi.^{3,4,5} Hingga kini, lebih dari 2.500 metabolit baru berhasil diidentifikasi dari berbagai spesies spons.⁶

Dua spesies spons, *Stylotella aurantium* dan *Callyspongia aerizusa*, banyak ditemukan di perairan Indonesia.⁷ Spons dari famili Halichondriidae, seperti *Stylotella sp.*, diketahui memiliki kepadatan tinggi di area *reef flat*, sementara *C. aerizusa* biasanya tumbuh di habitat dengan substrat keras yang didominasi terumbu karang.^{7,8} Kedua spesies ini menghasilkan berbagai metabolit sekunder, seperti alkaloid, steroid, terpenoid, saponin, dan flavonoid.^{8,9} Secara spesifik, *S. aurantium* dilaporkan memproduksi depsipeptida dan heptapeptida, termasuk wainunamide,⁹ sedangkan *C. aerizusa* menghasilkan peptida siklik seperti callaerin G, callaerin A–F, dan callaerin H.^{10,11} Beberapa senyawa tersebut telah dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap berbagai lini sel kanker dan berpotensi dikembangkan sebagai agen antikanker baru.^{9,12}

Kanker serviks merupakan salah satu kanker dengan angka kejadian tinggi, terutama disebabkan oleh infeksi seksual dengan

tipe tertentu dari human papillomavirus (HPV). Meskipun sebagian besar infeksi HPV dapat sembuh secara spontan, sebagian kecil berkembang menjadi kanker serviks invasif.^{13,14} Pada tahun 2018, tercatat sekitar 570.000 kasus baru kanker serviks di seluruh dunia, dengan 84% di antaranya terjadi di negara berkembang.¹⁵ Kemoterapi masih menjadi salah satu modalitas terapi utama kanker serviks, namun metode ini sering menimbulkan efek samping serius, seperti penekanan sumsum tulang, kerusakan organ vital (hati, ginjal, jantung), gangguan saraf, alopesia, infertilitas, serta risiko kanker sekunder karena toksisitas pada sel normal yang cepat membelah.¹⁶ Selain itu, kemoterapi dapat menyebabkan resistensi obat, serta toksisitas pada jaringan normal yang dapat menyebabkan imunosupresi dan kardiotoxikitas.¹⁷ Oleh karena itu, eksplorasi senyawa bioaktif dari sumber alami dengan mekanisme kerja spesifik, seperti penghambatan proliferasi sel kanker, induksi apoptosis, dan penghambatan angiogenesis, dengan efek samping minimal, menjadi penting dalam pengembangan agen antikanker baru.⁶

Penelitian ini bertujuan melakukan penapisan awal potensi sitotoksitas ekstrak metanol dan n-heksan dari spons *S. aurantium* dan *C. aerizusa* yang dikoleksi dari pesisir pantai Pulau Lara, Teluk Staring, Kecamatan Moramo, Kabupaten Konawe Selatan, Provinsi Sulawesi Tenggara, terhadap lini sel kanker serviks HeLa. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi awal mengenai potensi bioaktivitas kedua spesies spons tersebut sebagai sumber kandidat senyawa antikanker baru.

Metode

Objek dan bahan penelitian

Lini sel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi Laboratorium Riset

Translasional Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran. Sampel spons laut *S. aurantium* dan *C. aerizusa* dikoleksi dari pesisir pantai Pulau Lara, wilayah perairan Teluk Staring, Provinsi Sulawesi Tenggara. Proses pengambilan sampel dan ekstraksi dilakukan oleh tim dari Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, menggunakan metode yang telah dipublikasikan oleh Mangurana *et al.* (2019).⁸

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cisplatin (Sigma-Aldrich, nomor katalog PHR1624), aqua pro-injection (IKA Pharmindo), medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Sigma-Aldrich), glutamin (Sigma-Aldrich), larutan penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich), Non-Essential Amino Acids (Sigma-Aldrich), fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), phosphate buffer saline (Sigma-Aldrich), larutan trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich), trypan blue (Sigma-Aldrich), dan water-soluble tetrazolium-8 (WST-8) (Dojindo).

Kultur lini sel HeLa

Lini sel HeLa dikultur menggunakan medium RPMI-1640 yang disuplementasi dengan 2 mM glutamin, Non-Essential Amino Acids, larutan penicillin-streptomycin, dan 10% foetal bovine serum (FBS). Kultur sel dipelihara pada suhu 37 °C dengan atmosfer yang mengandung 5% CO₂ dan kelembaban terkontrol.

Uji sitotoksitas

Bahan uji dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO) untuk menghasilkan larutan stok dengan konsentrasi 200.000 µg/mL. Cisplatin dilarutkan dalam aqua pro-injection dengan konsentrasi stok 1.000 µg/mL di dalam *biosafety cabinet*, kemudian disimpan pada suhu 4 °C sebelum digunakan. Larutan kerja dari bahan uji maupun cisplatin dibuat dengan pengenceran menggunakan

medium pertumbuhan lengkap hingga mencapai konsentrasi yang diinginkan.

Uji sitotoksitas dilakukan pada *plate* 96 sumur dengan menanam 3–5×10³ sel/sumur hingga mencapai konfluensi 70–80%. Sel kemudian diperlakukan dengan bahan uji pada konsentrasi akhir 7,8–1.000 µg/mL dan dengan cisplatin pada konsentrasi akhir 0,39–2.000 µg/mL. Setiap perlakuan dilakukan secara triplikat, dengan kontrol pertumbuhan menggunakan DMSO sesuai konsentrasi pengenceran. Konsentrasi maksimum DMSO yang digunakan adalah 1% per sumur. Setelah 24 jam inkubasi, 10 µL reagen WST-8 ditambahkan ke setiap sumur, kemudian diinkubasi kembali selama 2–4 jam. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm menggunakan spektrofotometer Infinite M200 Pro (Tecan, Grodig, Austria). Persentase viabilitas sel dihitung dengan membandingkan nilai absorbansi perlakuan terhadap kontrol sel tanpa perlakuan. Nilai IC₅₀ kemudian ditentukan menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism 10.0.1 dengan metode perhitungan IC₅₀ absolut.

Visualisasi data dan uji statistika

Perbedaan antara dua kelompok dianalisis menggunakan *independent t-test*. Visualisasi serta analisis data dilakukan dengan perangkat lunak GraphPad Prism versi 10.0.1.

Hasil

Sumber spons laut *S. aurantium* dan *C. aerizusa*

Spons laut *S. aurantium* dan *C. aerizusa* yang digunakan dalam penelitian ini dikoleksi dari wilayah perairan Indonesia, tepatnya di pesisir pantai Pulau Lara, Teluk Staring, Kecamatan Moramo, Kabupaten Konawe Selatan, Provinsi Sulawesi Tenggara. Identifikasi dan determinasi spesies spons dilakukan oleh Pusat Studi Laut Dalam

Tabel 1. Klasifikasi *S.aurantium* dan *C. aerizusa*

Klasifikasi	<i>S. aurantium</i>	<i>C. aerizusa</i>
Kingdom	Animalia	Animalia
Filum	Porifera	Porifera
Kelas	Demospongiae	Demospongiae
Subkelas	Heteroscleromorpha	Heteroscleromorpha
Ordo	Suberitida	Haplosclerida
Famili	Holichondriidae	Callyspongiidae
Genus	<i>Stylotella</i>	<i>Callyspongia</i>
Spesies	<i>Stylotella aurantium</i>	<i>Callyspongia aerizusa</i>

dan Laut Dangkal, Universitas Halu Oleo, Kendari, Sulawesi Tenggara. Klasifikasi taksonomi *S. aurantium* dan *C. aerizusa* disajikan pada Tabel 1.

Uji sitotoksitas ekstrak *S. aurantium* dan *C. aerizusa*

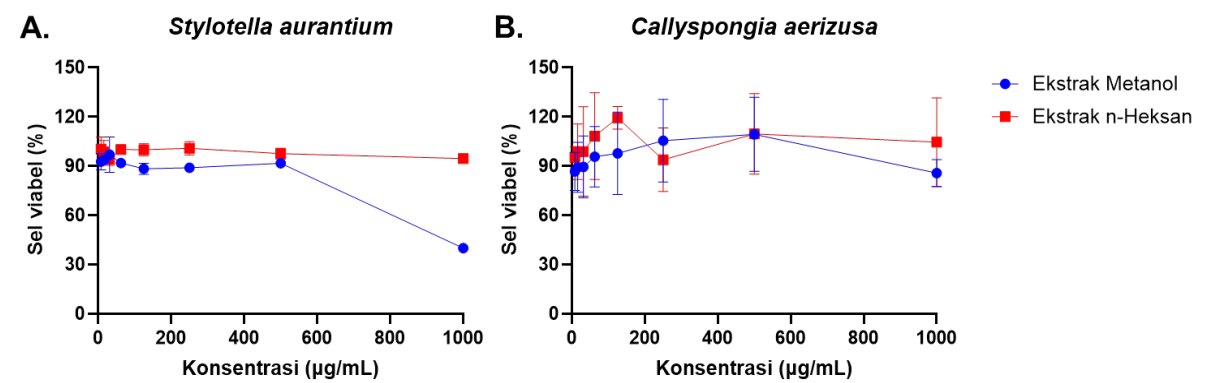
Pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksitas ekstrak metanol dan n-heksan spons laut *S. aurantium* dan *C. aerizusa* untuk mengevaluasi potensi sitotoksitasnya terhadap lini sel kanker serviks HeLa menggunakan metode WST-8. Gambar 1 menunjukkan persentase viabilitas sel HeLa pada berbagai konsentrasi ekstrak (7,8–1.000 µg/mL). Viabilitas sel diukur menggunakan metode WST-8. Pengujian

dilakukan secara triplikat, dan persentase viabilitas dihitung dengan membandingkan hasil perlakuan bahan uji terhadap kontrol sel yang diberi pelarut DMSO (dengan konsentrasi setara pelarut uji).

Sedangkan Tabel 2 menyajikan nilai IC₅₀ dari kedua ekstrak serta cisplatin setelah 24 jam perlakuan. Perbandingan viabilitas sel pada konsentrasi 1.000 µg/mL untuk ekstrak metanol dan n-heksan dari kedua spesies spons ditampilkan pada Gambar 2.

Pembahasan

Teluk Staring dikenal memiliki sumber daya laut yang tinggi, sehingga menjadi sumber mata pencaharian masyarakat setempat dan



Gambar 1. Grafik viabilitas sel HeLa setelah perlakuan ekstrak metanol dan n-heksan spons laut *S. aurantium* dan *C. aerizusa* selama 24 jam.

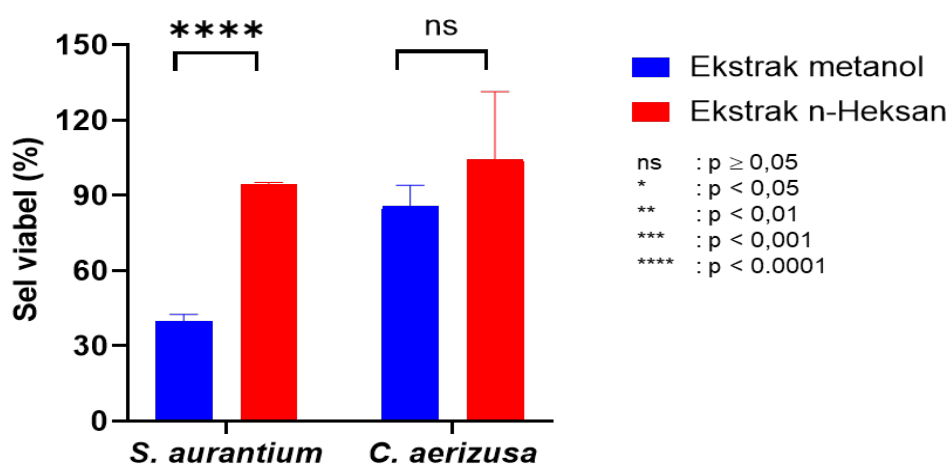
Tabel 2. Nilai IC₅₀ Ekstrak Metanol dan n-Heksan dari *S. aurantium* dan *C. aerizusa*, serta Cisplatin terhadap Lini Sel HeLa Setelah 24 Jam Perlakuan

Spons laut	Ekstrak	IC ₅₀
<i>Stylotella aurantium</i>	Metanol	873.65 µg/mL
	n-Heksan	>1000 µg/mL
<i>Callyspongia aerizusa</i>	Metanol	>1000 µg/mL
	n-Heksan	>1000 µg/mL
Kontrol positif	cisplatin	7,49 µg/mL

tujuan wisata lokal.¹⁸ Secara ekologi, Teluk Staring memiliki karakteristik lingkungan laut yang unik dan mendukung keberagaman biota, termasuk spons laut. Wilayah ini telah ditetapkan sebagai Kawasan Konservasi Perairan Daerah (KKPD) oleh Provinsi Sulawesi Tenggara dan terbagi dalam zonasi berdasarkan potensi bioaktif spons yang ditemukan.⁸ Kondisi lingkungan, seperti kedalaman, intensitas cahaya, dan cekaman kimia, berperan penting dalam menentukan komposisi metabolit sekunder spons.^{8,19} Variabilitas lingkungan ini menjelaskan mengapa senyawa bioaktif dari spesies yang sama dapat berbeda profil kimianya, tergantung lokasi dan kondisi

pertumbuhannya.¹⁹

Pada penelitian ini, hanya ekstrak metanol *S. aurantium* yang menunjukkan aktivitas sitotoksik signifikan dengan nilai IC₅₀ 873,65 µg/mL setelah 24 jam, sedangkan ekstrak n-heksan *S. aurantium* serta ekstrak metanol dan n-heksan *C. aerizusa* menunjukkan nilai IC₅₀ >1.000 µg/mL. Hal ini sejalan dengan sifat polaritas pelarut metanol yang mampu mengekstraksi senyawa polar seperti depsipeptida, alkaloid, poliketida, dan peptida siklik. Senyawa-senyawa ini secara luas dilaporkan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap berbagai lini sel kanker.^{9,11} Sebaliknya, n-heksan yang non-polar cenderung mengekstraksi lipid, sterol,



Gambar 2. Perbandingan viabilitas sel HeLa setelah perlakuan dengan ekstrak metanol (biru) dan n-heksan (merah) dari spons laut *S. aurantium* dan *C. aerizusa* pada konsentrasi 1.000 µg/mL selama 24 jam. Data ditampilkan sebagai rata-rata ± standar deviasi (SD) dari tiga ulangan. Analisis statistik dilakukan menggunakan *independent t-test* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

dan terpenoid nonpolar, yang tidak selalu menunjukkan aktivitas sitotoksik langsung.²⁰

Aktivitas sitotoksik yang terdeteksi pada ekstrak metanol *S. aurantium* kemungkinan besar disebabkan oleh senyawa wainunamide (depsipeptida) dan derivatif seskuiterpen karbonimidik, yang sebelumnya telah dilaporkan memiliki aktivitas antiproliferatif kuat.¹² Beberapa penelitian menunjukkan bahwa depsipeptida dari spons memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis melalui gangguan fungsi mitokondria dan penghambatan jalur proliferasi.¹⁰ Hal ini menjelaskan mengapa ekstrak metanol *S. aurantium* menunjukkan persentase viabilitas sel HeLa yang rendah ($39,88 \pm 2,88\%$) pada konsentrasi 1.000 µg/mL, yang dikategorikan sebagai sitotoksitas moderat-kuat sesuai ISO 10993-5.²¹

Ekstrak n-heksan *S. aurantium*, serta ekstrak metanol dan n-heksan *C. aerizusa* menunjukkan persentase viabilitas sel masing-masing sebesar $94,54 \pm 0,65\%$, $85,74 \pm 8,36\%$, dan $104,52 \pm 26,86\%$, sehingga dikategorikan tidak memiliki aktivitas sitotoksik pada konsentrasi 1.000 µg/mL dengan waktu perlakuan 24 jam. Sensitivitas sel dikonfirmasi melalui penentuan nilai IC_{50} cisplatin pada lini sel HeLa dengan waktu perlakuan yang sama, yaitu 7,49 µg/mL. Sebagai pembanding, penelitian lain melaporkan nilai IC_{50} cisplatin sebesar 6,72 µg/mL (22,4 µM) pada perlakuan 24 jam.²²

Hasil penelitian ini juga sejalan dengan studi Ibrahim *et al.* (2010) yang menunjukkan bahwa peptida siklik dari *C. aerizusa* (callyaerins) memiliki aktivitas sitotoksik, meskipun pada penelitian ini ekstrak *C. aerizusa* tidak menunjukkan efek signifikan ($IC_{50} > 1.000$ µg/mL).¹⁰ Hal ini dapat disebabkan oleh rendahnya konsentrasi senyawa bioaktif pada fraksi kasar atau adanya perbedaan habitat dan kondisi ekologis yang mempengaruhi biosintesis metabolit sekunder. Penelitian terdahulu menyebutkan

bahwa aktivitas sitotoksik ekstrak spons laut sangat bergantung pada metode ekstraksi dan kondisi lingkungan tempat spons tumbuh.³

Penelitian ini telah menjawab pertanyaan utama mengenai potensi sitotoksitas ekstrak *S. aurantium* dan *C. aerizusa* terhadap sel HeLa, dengan menunjukkan bahwa ekstrak metanol *S. aurantium* adalah kandidat paling potensial untuk pengembangan agen antikanker. Namun, penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, seperti belum dilakukan pemurnian senyawa aktif dan pengujian mekanisme seluler yang mendasari efek sitotoksitasnya. Oleh karena itu, penelitian selanjutnya perlu fokus pada fraksinasi ekstrak metanol *S. aurantium*, identifikasi senyawa aktif menggunakan LC-MS/MS atau NMR, serta pengujian jalur apoptosis atau nekrosis yang terlibat. Selain itu, perbandingan dengan lini sel kanker lainnya dapat memperkuat validitas potensi antikanker ekstrak ini.

Simpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa spons laut *S. aurantium* dan *C. aerizusa* dari Teluk Staring, Sulawesi Tenggara, memiliki profil kandungan bioaktif yang berbeda, yang tercermin dari variasi aktivitas sitotoksiknya terhadap lini sel kanker serviks HeLa. Dari empat ekstrak yang diuji, hanya ekstrak metanol *S. aurantium* yang menunjukkan aktivitas sitotoksik ($IC_{50} = 873,65$ µg/mL), dengan penurunan viabilitas sel hingga $39,88 \pm 2,88\%$ pada konsentrasi 1.000 µg/mL, yang dikategorikan sebagai sitotoksitas moderat-kuat (ISO 10993-5). Sebaliknya, ekstrak n-heksan *S. aurantium* serta kedua ekstrak *C. aerizusa* tidak menunjukkan efek sitotoksik signifikan ($IC_{50} > 1.000$ µg/mL). Perbedaan aktivitas ini mengindikasikan variasi kandungan metabolit sekunder antarspesies. *S. aurantium* mengandung depsipeptida dan seskuiterpen karbonimidik,

sedangkan *C. aerizusa* didominasi peptida siklik seperti callyaerins. Temuan ini menegaskan bahwa pelarut polar seperti metanol lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa bioaktif potensial. Hasil penelitian ini memberikan dasar ilmiah untuk pengembangan lead compound antikanker berbasis spons laut Indonesia melalui fraksinasi, identifikasi senyawa aktif, serta studi mekanisme aksi molekuler.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Universitas Padjadjaran yang telah memberikan pendanaan untuk menyusun review artikel ini melalui Hibah Internal Unpad-Academic Leadership Grant (ALG).

Pendanaan

Penulisan artikel ini didanai oleh Universitas Padjadjaran melalui Hibah Internal Unpad-Academic Leadership Grant (ALG) tahun 2022 yang diberikan kepada AD.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dalam penulisan artikel ini.

Daftar Pustaka

1. Elhady SS, El-Halawany AM, Alahdal AM, Hassanean HA, Ahmed SA. A New Bioactive Metabolite Isolated from the Red Sea Marine Sponge Hyrtios erectus. *Molecules*. 2016;21(1):82.
2. Melikoglu M. Current status and future of ocean energy sources: a global review. *Ocean Eng*. 2018;148:563–73.
3. El-Demerdash A, Atanasov AG, Horbanczuk OK, Tammam MA, Abdel-Mogib M, Hooper JNA, et al. Chemical diversity and biological activities of marine sponges of the genus Suberea: a systematic review. *Mar Drugs*. 2019;17(2):115.
4. Wahyuni W, Fristiohady A, Malaka MH, Malik F, Yusuf MI, Leorita M, Sadarun B, Saleh A, Musnina WOS, Sabandar CW, Sahidin I. Effects of Indonesian marine sponges ethanol extracts on the lipid profile of hyperlipidemic rats. *J Appl Pharm Sci*. 2019;9(10):1–8.
5. Fristiohady A, Wahyuni W, Malaka M, Madu D, Muthalib D, Munasari D, Purnama L, Sadarun B, Ilyas M, Sahidin S. Ethanolic extract of *Xestospongia* sp. induces CD4+ and CD14 cells levels on Wistar male rat infected with *Staphylococcus aureus*. *Pharmacol Clin Pharm Res*. 2020;5:56–61.
6. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020;83(3):770–803.
7. Marzuki I. Eksplorasi Spons Indonesia Seputar Kepulauan Spermonde. Makassar: Nas Media Pustaka; 2018.
8. Mangurana WOI, Yusnaini Y, Sahidin S. Analisis LC-MS/MS (Liquid Chromatograph Mass Spectrometry) dan metabolit sekunder serta potensi antibakteri ekstrak n-heksana spons *callyspongia aerizusa* yang diambil pada kondisi tutupan terumbu karang yang berbeda di perairan teluk stiring. *Jurnal Biologi Tropis*, 2019;19(2):131–141.
9. Gogineni V, Hamann MT. Marine natural product peptides with therapeutic potential: Chemistry, biosynthesis, and pharmacology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2018;1862(1):81–196.
10. Hadisaputri YE, Nurhaniefah AA, Sukmara S, Zuhrotun A, Hendriani R, Sopyan I. *Callyspongia* spp.: Secondary Metabolites, Pharmacological Activities,

- and Mechanisms. *Metabolites*. 2023;13(2):217.
11. Ibrahim, AH, Attia EZ, Hajjar D, Anany MA, Desoukey SY, Fouad MA, Kamel MS, Wajant H, Gulder TAM, Abdelmohsen UR. New Cytotoxic Cyclic Peptide from the Marine Sponge-Associated *Nocardiosis* sp. UR67. *Mar Drugs*. 2018;16(9):290.
 12. Martignago CCS, Soares-Silva B, Parisi JR, Souza e Silva LC, Granito RN, Mussi Ribeiro A, Renno ACM, Sousa LRF, Campos Aguiar AC. Terpenes extracted from marine sponges with antioxidant activity: A systematic review. *Nat Prod Bioprospect*. 2023;13(23):1–12.
 13. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical Cancer. *Lancet*. 2019; 393(10167):168–182.
 14. Basu P, Banerjee D, Singh P, Bhattacharya C, Biswas J. Efficacy and Safety of Human Papillomavirus Vaccine for Primary Prevention of Cervical Cancer: A Review of Evidence from Phase III Trials and National Programs. *South Asian J Cancer*. 2013;2(4):187–192.
 15. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre, LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
 16. Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R. Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Front Pharmacol*. 2018;9:245.
 17. Khan SU, Fatima K, Aisha S, Malik S. Unveiling the mechanisms and challenges of cancer drug resistance. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):109.
 18. Efendi I, Armid A, Emiyarti E. Akumulasi Logam Timbal (Pb) pada Sedimen Teluk Staring Sulawesi Tenggara. *Jurnal Sapa Laut (Jurnal Ilmu Kelautan)*. 2021;6(3):211–16.
 19. Nurhaniefah AA, Sagitasa S, Aulia S, Hadisaputri YE. *Callyspongia* sp.: Secondary Metabolites, Pharmacological Activities, and Its Mechanisms. *Indonesian Journal of Biological Pharmacy*. 2022;2(2):104–120.
 20. Varijakzhan D, Loh JY, Yap WS, Yusoff K, Seboussi R, Lim SHE, et al. Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. *Mar Drugs*. 2021;19(5):246.
 21. International Organization of Standardization (ISO). Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity (ISO 10993-5:2009). Geneva: ISO;2021.
 22. Becit M, Dilsiz SA, Başaran N. Interaction of curcumin on cisplatin cytotoxicity in HeLa and HepG2 carcinoma cells. *Istanbul J Pharm*. 2020;50(3):202–210.