



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK KAPANG MFK-25-10
DARI SPONS PR-17-IV-10 PERAIRAN PULAU ROTE
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

**FEBRIAL HIKMAH
0706263864**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK KAPANG MFK-25-10
DARI SPONS PR-17-IV-10 PERAIRAN PULAU ROTE
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**FEBRIAL HIKMAH
0706263864**


**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Febrial Hikmah

NPM : 0706263864

Tanda Tangan : 

Tanggal : 05 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Febrial Hikmah
NPM : 0706263864
Program Studi : Biologi S1
Judul Skripsi : Uji Sitotoksik Ekstrak Kapang MFK-25-10 dari Spons PR-17-IV-10 Perairan Pulau Rote terhadap Sel Kanker Payudara T47D

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (.....)

Pembimbing II : Dr. Ekowati Chasanah, M.Sc. (.....)

Penguji I : Dra. Sitaresmi, M.Sc. (.....)

Penguji II : Dr. rer. nat. Yasman, M.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 05 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas nikmat dan barokah yang dilimpahkan-Nya sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan hingga penyusunan skripsi, sangatlah sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dr. Ekowati Chasanah, M.Sc. selaku Pembimbing I dan II yang telah memberikan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing dan memberikan arahan selama penelitian serta penyusunan skripsi ini;
2. Dra. Sitaresmi, M.Sc. dan Dr. rer. nat. Yasman, M.Sc. selaku Penguji I dan II yang telah menyediakan waktu untuk memberikan saran-saran dalam penulisan dan perbaikan skripsi ini;
3. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi, Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP) yang telah memberikan dukungan seluruh dana dan tempat selama penelitian;
4. Nagao Environment Foundation (NEF) yang telah memberikan beasiswa pendidikan selama saya kuliah di Biologi FMIPA UI;
5. Dr. rer. nat Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI sekaligus Penasehat Akademik (PA), Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, M.U. selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI, Riani Widiarti, M.Si. selaku Koordinator Mahasiswa dan Alumni Departemen Biologi FMIPA UI, Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Koordinator Seminar Departemen Biologi FMIPA UI, dan Dr. Dadang Kusmana, M.S. selaku Ketua Sidang;

6. Seluruh keluarga besar BBRP2B-KP atas duka, suka, semangat yang telah diberikan dalam memperoleh data yang diperlukan;
7. Seluruh keluarga besar Departemen Biologi FMIPA UI, baik staf pengajar, karyawan, maupun mahasiswa/i Biologi angkatan 2004--2009 atas ilmu, pengalaman, dan kenangannya;
8. Sahabat-sahabat Blossom07, baik dari Laboratorium Mikrobiologi, Vaskular, Taksonomi, Genetika, Ekologi, maupun teman-teman satu bimbingan atas ilmu dan persahabatannya.
9. Terakhir dan terdalam penulis ucapkan terima kasih kepada Papa dan Mama yang telah merawat dan mendidik penulis dengan limpahan kasih sayang dan kesabaran. Terima kasih atas dukungan dan penyemangat selalu untuk kak Vera, de Kecil, dan de Ira, serta de'Bebebhz atas segala persahabatan dan kenangannya selama 4 tahun.

Penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 05 Juli 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Febrial Hikmah
NPM : 0706263864
Program Studi : S1 Regular
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Uji Sitotoksik Ekstrak Kapang MFK-25-10 dari Spons PR-17-IV-10 Perairan Pulau Rote terhadap Sel Kanker Payudara T47D

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 05 Juli 2011
Yang menyatakan



(Febrial Hikmah)

ABSTRAK

Nama : Febrial Hikmah
Program Studi : Biologi
Judul : Uji Sitotoksik Ekstrak Kapang MFK-25-10 dari Spons
PR-17-IV-10 Perairan Pulau Rote terhadap Sel Kanker Payudara
T47D

Penelitian bertujuan memperoleh nilai *Inhibition Concentration*₅₀ (IC₅₀) ekstrak kapang MFK-25-10 yang diidentifikasi sebagai genus *Trichoderma*, terhadap sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Medium pertumbuhan kapang dipisahkan antara *broth* dan miselium, diekstrak masing-masing menggunakan pelarut etilasetat (EtOAc) (1:1, v/v) dan campuran diklorometana (DCM) : metanol (MeOH) (1:1, v/v). Pengujian sitotoksik menggunakan Uji MTT dengan seri dosis 1, 5, 25, 125 dan 625 µg/ml. Hasil penelitian dianalisis dengan grafik Probit menghasilkan nilai IC₅₀ untuk ekstrak *broth* sebesar 128,9 µg/ml sedangkan ekstrak miselium sebesar 31 µg/ml. Hasil KLT ekstrak kapang baik *broth* maupun miselium, berhasil dipisahkan dengan menggunakan eluen berupa campuran pelarut DCM dan MeOH dengan perbandingan 15:1 (v/v).

Kata kunci:

*Inhibition Concentration*₅₀ (IC₅₀), kapang, KLT, sel kanker payudara, T47D, sitotoksik, *Trichoderma*, uji MTT.

ABSTRACT

Name : Febrial Hikmah
Study Program: Biology
Title : Cytotoxic Test of MFK-25-10 Mold Extract from PR-17-IV-10
Sponge in Rote Island for Breast Cancer T47D

The purpose of this study was to analyse the IC_{50} value of MFK-25-10 mold extract was identification as *Trichoderma*, for breast cancer T47D in vitro. The growth of mold was separated between broth and mycelium, the broth was extracted using ethylacetat (EtOAc) (1:1, v/v), where mycelium was extracted using dichloromethane (DCM) : methanol (MeOH) (1:1, v/v). Cytotoxic test was carried out using MTT test with dosage 1, 5, 25, 125, and 625 $\mu\text{g/ml}$. The result was analyzed using Probit graph for obtaining IC_{50} value. The result showed that IC_{50} value for broth extract was 128,9 $\mu\text{g/ml}$, while mycelium extract was 31 $\mu\text{g/ml}$. TLC test of mold extract showed that both broth and mycelium were separated using mixture DCM and MeOH solvent with 15:1 (v/v) ratio.

Key words:

*Inhibition Concentration*₅₀ (IC_{50}), mold, TLC, T47D breast cancer cell, cytotoxic, *Trichoderma*, MTT test.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Fungi laut.....	4
2.2 Metabolit sekunder kapang.....	6
2.3 Fermentasi kapang.....	7
2.4 Ekstraksi kapang.....	8
2.5 Uji sitotoksik secara <i>in vitro</i>	9
2.6 Pemisahan senyawa dengan teknik kromatografi.....	10
2.7 Sel kanker payudara T47D.....	11
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	13
3.1 Lokasi dan waktu.....	13
3.2 Alat dan bahan.....	13
3.2.1 Alat.....	13
3.2.2 Bahan.....	14
3.2.2.1 Kapang MFK-25-10.....	14
3.2.2.2 Sel kanker payudara T47D.....	14
3.2.2.3 Medium.....	14
3.2.2.4 Bahan kimia.....	14
3.2.2.5 Bahan habis pakai.....	15
3.3 Cara kerja.....	15
3.3.1 Pembuatan medium.....	15
3.3.1.1 <i>Malt Extract Agar</i> (MEA).....	15
3.3.1.2 <i>Malt Extract Broth</i> (MEB).....	15
3.3.1.3 <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	16
3.3.1.4 Medium kultur lengkap RPMI 1640 sel kanker payudara T47D.....	16
3.3.2 Pembuatan <i>stock culture</i> dan <i>working culture</i>	16
3.3.3 Pengamatan morfologi kapang.....	17
3.3.4 Fermentasi metabolit sekunder kapang.....	17
3.3.5 Ekstraksi metabolit sekunder kapang.....	18
3.3.6 Pembuatan seri dosis.....	18
3.3.7 Uji sitotoksik.....	19

3.3.7.1 <i>Platting</i> sel kanker payudara T47D.....	19
3.3.7.2 Uji MTT.....	20
3.3.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	20
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4.1 Pengamatan morfologi kapang MFK-25-10.....	21
4.2 Fermentasi metabolit sekunder kapang.....	24
4.3 Ekstraksi metabolit sekundfer kapang.....	26
4.4 Uji sitotoksik ekstrak kapang.....	27
4.4.1 Ekstrak <i>broth</i> kapang.....	27
4.4.2 Ekstrak miselium kapang.....	31
4.5 Pemisahan senyawa ekstrak kapang.....	34
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	36
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
DAFTAR REFERENSI.....	37
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

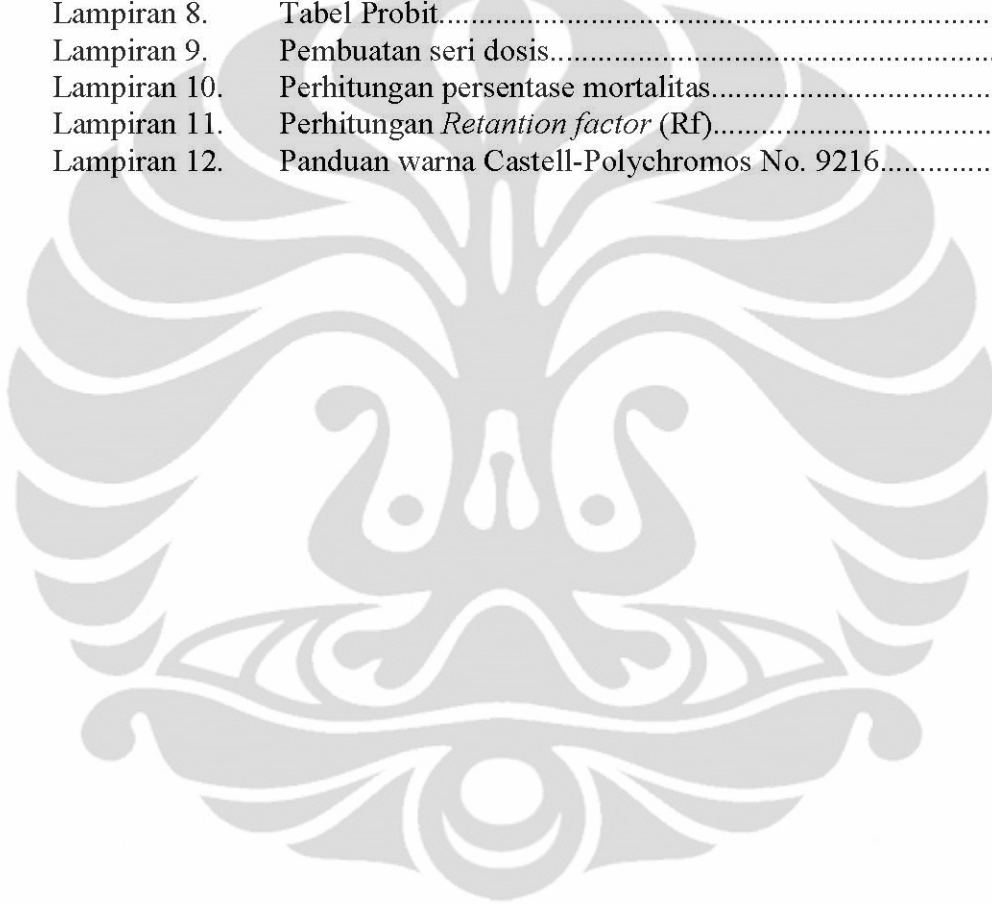
Tabel 4.1(a).	Hasil pengamatan makroskopik kapang MFK-25-10 umur 5 hari dalam medium MEA dan PDA pada suhu 26--28°C.....	21
Tabel 4.1(b).	Hasil pengamatan mikroskopik kapang MFK-25-10 umur 7 hari dalam medium MEA pada suhu 26--28°C.....	24
Tabel 4.4.1(a).	Hasil absorbansi <i>microplate reader</i> $\lambda=570$ nm, ekstrak <i>broth</i> dan miselium kapang MFK-25-10 dengan seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$	29
Tabel 4.4.1(b).	Hasil analisis probit ekstrak <i>broth</i> dan miselium kapang MFK-25-10 dengan seri dosis 1, 5, 25, 125, 625 $\mu\text{g/ml}$	30
Tabel 4.5.	Nilai <i>Retention factor</i> (Rf) ekstrak kapang MFK-25-10.....	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.6.	Regulasi gen represor p53 yang termutasi oleh sinar-X.....	11
Gambar 4.1(a).	Morfologi secara makroskopik kapang MFK-25-10 umur 5 hari dalam medium MEA dan PDA pada suhu 26--28°C.....	22
Gambar 4.1(b).	Pengamatan mikroskopis kapang MFK-25-10 umur 5 hari dalam medium MEA pada suhu 26--28°C perbesaran 1000.	23
Gambar 4.2(a).	Hasil fermentasi kapang MFK-25-10 dalam MEB selama 3 minggu pada suhu 26--28°C secara statis.....	26
Gambar 4.2(b).	Perubahan warna medium MEB selama 3 minggu fermentasi kapang MFK-25-10 pada suhu 26--28°C secara statis.....	26
Gambar 4.4.1(a).	Reaksi reduksi garam tetrazolium (MTT) menjadi kristal formazan.....	28
Gambar 4.4.1(b).	Hasil penambahan MTT 10% terhadap sel kanker payudara T47D setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam perbesaran 20X.....	28
Gambar 4.4.1(c).	Grafik hasil analisis probit ekstrak <i>broth</i> MFK-25-10 seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$	30
Gambar 4.4.2(a).	Hasil penambahan ekstrak miselium kapang MFK-25-10 dengan seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$ setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam perbesaran 20X..	31
Gambar 4.4.2(b).	Grafik hasil analisis probit ekstrak miselium MFK-25-10 seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$	32
Gambar 4.4.2(c).	Mekanisme pengontrolan S fase.....	33
Gambar 4.4.2(d).	Regulasi gen supresor caspase 9 terhadap pembelahan sel...	33
Gambar 4.5.	Pola pemisahan ekstrak miselium kapang MFK-25-10 pada pelat silika dengan UV $\lambda=254$ dan $\lambda=366$ nm.....	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema kerja secara umum.....	42
Lampiran 2.	Pembuatan <i>stock culture</i> dan <i>working culture</i>	43
Lampiran 3.	Fermentasi metabolit sekunder kapang.....	43
Lampiran 4.	Ekstraksi metabolit kapang.....	44
Lampiran 5.	Uji MTT.....	45
Lampiran 6.	Komposisi medium.....	46
Lampiran 7.	Komposisi reagen.....	46
Lampiran 8.	Tabel Probit.....	47
Lampiran 9.	Pembuatan seri dosis.....	47
Lampiran 10.	Perhitungan persentase mortalitas.....	48
Lampiran 11.	Perhitungan <i>Retantion factor</i> (Rf).....	50
Lampiran 12.	Panduan warna Castell-Polychromos No. 9216.....	51



BAB 1 PENDAHULUAN

Kanker merupakan sel yang mengalami perubahan bentuk, sifat, dan kinetik. Zat yang menyebabkan kanker disebut karsinogen. Kanker disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain makanan, bahan kimia, radiasi sinar UV, dan genetik (Boulton & Fidler 2002: 1). Berdasarkan data dari Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Ahli Patologi Indonesia tahun 1998 terhadap 13 rumah sakit di Indonesia, bahwa kanker leher rahim menduduki peringkat pertama, yaitu sekitar 17,2% dari seluruh kasus kanker. Kanker payudara sebesar 12,2%, diikuti dengan kanker kulit sebesar 5,9%, kanker nasofaring sebesar 5,3%, dan kanker rektum sekitar 4,9% (Surat Keputusan Menkes RI 2007: 5).

Kanker payudara banyak diderita oleh wanita. Menurut *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2005, bahwa dari 100.000 wanita sekitar 26 orang menderita kanker payudara. Serangkaian pengobatan yang telah ada, seperti pembedahan, penyinaran, kemoterapi, dan imunoterapi menghasilkan efek samping yang besar. Menurut Spencer *dkk.* (1994) dalam Hsin-Ling Yang *dkk.* (2005: 216), bahwa cara kerja pengobatan yang kurang spesifik dapat merusak dan membunuh sel-sel normal. Oleh karena itu, dibutuhkan bahan aktif alami yang berpotensi sebagai antikanker (Blunt *dkk.* 2007: 31).

Mikroorganisme merupakan salah satu penghasil bahan alami, baik dalam bentuk metabolit primer maupun metabolit sekunder (Munro *dkk.* 1999: 16). Mikroorganisme dapat hidup pada substrat yang spesifik, salah satunya adalah spons. Spons salah satu jenis biota laut yang bersifat *filter feeder*. Nutrisi yang didapat dimanfaatkan untuk kelangsungan hidup (Bröcker 1999: 23). Spons mengeluarkan zat kimia sebagai salah satu bentuk pertahanan diri terhadap pemangsa dan kompetitor. Mekanisme pertahanan diri secara kimiawi tersebut diduga karena adanya peranan mikroorganisme yang hidup di dalam spons (Moore 1999: 653).

Fungi merupakan salah satu mikroorganisme yang banyak ditemukan di dalam spons. Manilal *dkk.* (2010: 196), berhasil mengisolasi kapang *Aspergillus clavatus* dari spons *Fasciospongia cavernosa* yang berasal dari India. Blunt *dkk.* (2007: 36), mengisolasi fungi *Saccharopolyspora* sp. dari spons *Mycale plumose*

yang berasal dari Cina. Ekstrak dari fungi tersebut bersifat sitotoksik terhadap berbagai sel kanker pada manusia. Liu *dkk.* (2009) dalam Debbab *dkk.* (2010: 549), telah berhasil mengisolasi kapang *Aspergillus ustus* dari spons *Suberites domuncula* dan bersifat sitotoksik terhadap sel kanker limfoma L5178Y pada konsentrasi 10 µg/ml.

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang yang hidup pada spons memiliki kemampuan sitotoksik terhadap beberapa sel kanker (Debbab *dkk.* 2010: 549). Salah satu mekanisme sitotoksik, yaitu dengan cara menghambat proliferasi sel kanker (Bennet & Montgomery 1967: 112). Mekanisme tersebut dapat melalui mekanisme penghambatan siklus sel dan penginduksian apoptosis sel yang diatur oleh mitokondria. Beberapa obat kemoterapi memanfaatkan gen-gen dalam sel untuk mengaktifkan jalur apoptosis atau kematian sel sendiri (Boulwood & Fidler 2002: 2).

Penelitian Höller (2000: 1354) terhadap senyawa yang dihasilkan oleh kapang yang diisolasi dari beberapa jenis spons, antara lain kapang *Aspergillus niger* yang diisolasi dari spons *Hyrtios proteus* menghasilkan senyawa aktif asperazine. *Trichoderma harzianum* yang diisolasi dari spons *Micale cecilia* menghasilkan senyawa aktif trichoharzin. *T. harzianum* yang diisolasi dari spons *Halichondria okadai* menghasilkan senyawa aktif trichodenone A-C.

Kapang MFK-25-10 telah diisolasi dari spons PR-17-IV-10 yang berasal dari perairan Pulau Rote pada penelitian pendahuluan. Kemampuan sitotoksik ekstrak kapang MFK-25-10 terhadap sel kanker payudara T47D belum diketahui. Kemampuan sitotoksik dapat diketahui berdasarkan nilai *Inhibition Concentration*₅₀ (IC₅₀), yaitu nilai konsentrasi senyawa yang menghambat proliferasi sel sebesar 50%. Nilai IC₅₀ diperoleh dari pengujian ekstrak kapang yang menggunakan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) berdasarkan Freshney (2005: 366--367). Uji MTT merupakan uji sitotoksik kolorimetrik secara *in vitro* menggunakan garam tetrazolium yang akan bereaksi dengan suksinat dehidrogenase di dalam mitokondria. Uji MTT relatif lebih sensitif, akurat, dan dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah banyak dengan waktu singkat. Sel kanker payudara T47D merupakan *continuous cell line* yang memiliki kemampuan replikasi tidak terbatas, homogenitas tinggi,

penanganan di laboratorium mudah, dan dapat diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall *dkk.* 2003: 89).

Kemampuan sitotoksik ekstrak kapang MFK-2510 berdasarkan pada nilai IC_{50} dibandingkan dengan kontrol menggunakan seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak *broth* dan miselium dilihat pemisahan senyawanya dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Eluen yang digunakan merupakan campuran diklorometana (DCM) dengan metanol (MeOH) (15:1, v/v).

Tujuan penelitian adalah mengetahui kemampuan sitotoksik ekstrak kapang MFK-25-10 terhadap sel kanker payudara T47D berdasarkan nilai IC_{50} . Ekstrak kapang MFK-25-10, baik dari *broth* maupun miselium, dipisahkan senyawanya menggunakan metode KLT dengan eluen campuran DCM : MeOH (15:1, v/v). Hipotesis penelitian adalah kapang MFK-25-10 tersebut memiliki kemampuan antikanker terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai $IC_{50} \leq 30$ $\mu\text{g/ml}$ mengikuti garis panduan *American National Cancer Institute* (ANCI) (Itharat *dkk.* 2004: 35). Ekstrak kapang MFK-25-10 dapat dipisahkan dengan baik menggunakan eluen campuran DCM : MeOH (15:1, v/v).

Hasil yang diharapkan adalah kapang MFK-25-10 bersifat antikanker terhadap sel kanker payudara T47D. Selain itu, penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lebih lanjut terhadap fungi laut di Indonesia dan dapat digunakan sebagai bahan aktif alami untuk pengobatan kanker pada umumnya.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fungi Laut

Fungi merupakan organisme eukariot, heterotrof, dan umumnya memiliki dinding sel yang terbuat dari kitin. Fungi menguraikan senyawa organik menjadi senyawa anorganik dengan bantuan enzim. Enzim ekstraselular dihasilkan oleh fungi untuk mengurai senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana agar mudah diabsorpsi (Madigan *dkk.* 2000: 535).

Bentuk fungi dapat uniselular ataupun multiselular (Gandjar *dkk.* 1999: 2). Fungi multiselular memiliki hifa, yaitu struktur berbentuk tabung yang terbentuk dari pertumbuhan spora atau konidia. Hifa dapat berfungsi untuk mengabsorpsi nutrisi dan tumbuh di dalam substrat (Maier *dkk.* 1999: 32). Hifa dapat memiliki septa atau tidak. Hifa yang berseptum dan memiliki satu inti disebut monositik. Hifa yang tidak berseptum dan memiliki banyak inti disebut senositik (Madigan *dkk.* 2000: 535).

Sekitar 50.000 spesies fungi yang telah diketahui, kurang dari 500 spesies merupakan fungi laut dan estuaria (Kohlmeyer & Kohlmeyer 1979: 4--5). Fungi laut memiliki kemampuan hidup dan tumbuh pada konsentrasi air laut (Mabrouk *dkk.* 2008: 14). Fungi laut dapat berperan penting dalam siklus nutrisi sebagai dekomposer (Wang 2006: 547).

Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979: 3--5), membagi fungi laut menjadi dua, yaitu fungi laut obligat dan fakultatif. Fungi laut obligat merupakan kelompok fungi yang hanya dapat tumbuh dan bersporulasi dalam lingkungan laut. Fungi laut fakultatif merupakan kelompok fungi terestrial yang dapat hidup pada lingkungan laut.

Ascomycetes merupakan kelompok fungi yang paling banyak ditemukan di laut (Manilal *dkk.* 2010: 198). *Trichoderma* merupakan salah satu genus yang banyak ditemukan karena memiliki persebaran yang luas baik di darat maupun di laut (Domsch *dkk.* 1980: 271). *Trichoderma* bersifat anaerob fakultatif dan dapat tumbuh secara saprofit ataupun parasit. Miselium aerial bercabang membentuk konidiofor. Konidiofor memiliki banyak cabang dan akan bercabang lagi menjadi

cabang yang lebih pendek membentuk fialid. Reproduksi aseksual berupa konidia berbentuk ovoid yang diproduksi oleh ujung fialid. *Trichoderma* memiliki fase teleomorf yaitu genus *Hypocrea* dengan menghasilkan askospora sebagai reproduksi seksualnya (Samuels 1996: 924). Pertumbuhan koloni cepat dan berwarna putih, kemudian bersporulasi berwarna kuning atau hijau (Gandjar *dkk.* 1999: 120). *Trichoderma* dapat menghasilkan khlamidospora yang umumnya berbentuk subglobosa uniselular (Paul & Clark 1996: 2).

Beberapa jenis *Trichoderma* memiliki karakteristik berbeda-beda untuk mendukung pertumbuhannya. *T. harzianum* toleran terhadap keterbatasan nutrisi. *T. viride* dan *T. polysporum* tidak mampu hidup pada suhu rendah (Domsch *dkk.* 1980: 272). *Trichoderma* yang dikultur dapat tumbuh cepat pada suhu 25--30°C. pH optimum bagi pertumbuhan *Trichoderma* berkisar antara 3--7 dan cenderung asam (Danielson & Davey 2002: 497--498). Faktor lain yang memengaruhi pertumbuhan *Trichoderma* yaitu kelembaban, sedangkan kandungan garam tidak terlalu memengaruhi pertumbuhan (Lavelle & Spain 2001: 56). Sumber karbon utama bagi *Trichoderma* berupa glukosa, sedangkan sumber nitrogen berasal dari ekstrak khamir dan tripton (Paul & Clark 1996: 97).

Karakter morfologi koloni kapang secara makroskopik yang umum diamati adalah warna, warna sebalik koloni, tekstur, *exudate drops*, *radial furrow*, dan zona pertumbuhan (zonasi). Pengamatan morfologi secara mikroskopik meliputi septum hifa, cabang miselium, konidia, konidiofor, dan bentuk fialid (Gandjar *dkk.* 1999: 4).

Spons merupakan *host* yang baik bagi komunitas mikroorganisme. Mikroorganisme mendapatkan nutrisi dan tempat hidup di dalam spons (Thomas *dkk.* 2010: 1418). Spons merupakan organisme *filter feeder*, yaitu menyaring zat terlarut dalam air laut sebagai sumber nutrisi (Bröker 1999: 23). Spons hidup pada substrat padat secara bentik dan memiliki mekanisme pertahanan kimiawi untuk melindungi diri dari kompetitor dan predator (Thomas *dkk.* 2010: 1419). Spons maupun fungi yang hidup didalamnya menghasilkan metabolit aktif (Debbab *dkk.* 2010: 545). Bugni & Ireland (2004: 143--145), telah berhasil mengisolasi senyawa Halichondrin dari spons *Halichondria* sp. dan menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker melanoma B-16 secara *in vitro* dengan

nilai IC_{50} sebesar 93 $\mu\text{g/ml}$. Menurut Moore (1999: 653), bahwa hubungan yang terjadi antara spons dengan mikroorganisme di dalamnya sangat rumit, sehingga sulit membuktikan metabolit aktif tersebut dihasilkan oleh mikroorganisme, spons, atau hasil interaksi keduanya.

Beberapa kapang yang telah diidentifikasi menghasilkan senyawa metabolit sekunder aktif, antara lain Siepmann & Hohnk (1962) dalam Gao (2008: 6095) mengisolasi kapang jenis *Fusarium* sp. dari jaringan spons yang berasal dari laut Atlantik Utara dan berperan penting sebagai pemberi vitamin untuk *host*nya. Amagata *dkk.* (1998) dalam Debbab (2010: 560), berhasil mengisolasi *Trichoderma harzianum* dari spons jenis *Halichondria okadai* dan menghasilkan senyawa aktif trichodenone A-C terhadap sel kanker murine P-388.

2.2 Metabolit Sekunder Kapang

Metabolisme adalah reaksi kimia yang berlangsung di dalam sel. Metabolit merupakan hasil dari proses metabolisme (Pratiwi 2008: 120). Metabolit terdiri atas dua macam, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder (Calvo *dkk.* 2002: 17). Metabolit primer adalah suatu produk akhir yang terbentuk secara intraselular dan sangat esensial bagi kelangsungan hidup (Agusta 2009: 34). Metabolit sekunder berlangsung setelah proses metabolit primer dalam jumlah terbatas dan disekresikan ke luar sel. Metabolit sekunder dapat dibuat dari konversi metabolit primer (Pratiwi 2008: 121 & 130).

Metabolit sekunder diproduksi sampai kapang mencapai fase logaritmik akhir dan memasuki fase stasioner (Bilgrami & Verma 1994: 15). Metabolit sekunder tidak memengaruhi pertumbuhan kapang tetapi dapat menghambat mikroorganisme lain untuk hidup dan tumbuh disekitarnya (Bhilabutra *dkk.* 2007: 753).

Senyawa metabolit sekunder kapang dapat bersifat antikanker. Hasil penelitian Kralj *dkk.* (2007) dalam Debbab *dkk.* (2010: 552), bahwa senyawa metabolit yang dihasilkan oleh fungi *Spicellum roseum* memiliki aktivitas sitotoksik, dengan nilai *Inhibition Concentration*₅₀ (IC_{50}) sebesar 49,83 $\mu\text{g/ml}$ terhadap pembelahan sel kanker neuroblastoma B104 pada tikus.

Metabolit sekunder dari kapang laut yang telah dimanfaatkan, antara lain penicillin yang dihasilkan oleh *Penicillium chrysogenum* sebagai antibakteri. Cephalosporin dihasilkan oleh kapang *Cephalosporium acremonium* yang berfungsi sebagai antibakteri dan Cyclosporin yang dihasilkan oleh *Trichoderma polysporum* berfungsi sebagai immunosupresan (Effendi 2004: 17).

2.3 Fermentasi

Fermentasi merupakan proses yang melibatkan aktivitas mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk. Aktivitas tersebut dapat bersifat fermentatif jika tidak melibatkan O₂ sebagai akseptor elektron terakhir dan bersifat respiratif jika melibatkan O₂ (Black 1999: 169). Aktivitas mikroorganisme bertujuan untuk memecah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan memanfaatkan enzim-enzimnya (Gandjar *dkk.* 1992: 62).

Proses fermentasi terdiri atas berbagai macam tipe, antara lain dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis substrat yang dimetabolisme (Madigan *dkk.* 2000: 593). Berdasarkan substratnya, proses fermentasi dapat dibedakan menjadi dua, yaitu fermentasi substrat padat dan fermentasi substrat cair. Substrat padat contohnya medium agar, daging, beras, sedangkan fermentasi substrat cair contohnya susu, sari buah, dan medium cair (Gandjar *dkk.* 1992: 62).

Fermentasi dapat dikelompokkan menjadi 3, yaitu *batch fermentation*, *fed-batch fermentation*, dan *continuous fermentation*. *Batch fermentation* merupakan sistem tertutup, yaitu proses fermentasi yang menginokulasi mikroorganisme pada wadah yang telah berisi nutrien, yang tidak ditambah lagi ketika fermentasi mulai berlangsung, kecuali penambahan oksigen bagi kapang aerob, antibakteri, dan asam atau basa untuk mengontrol pH. Komposisi medium kultur, konsentrasi biomassa, dan konsentrasi metabolit dibiarkan konstan. *Batch fermentation* merupakan sistem fermentasi yang mudah, yaitu hanya satu kali sterilisasi dengan harga peralatan yang relatif murah. Hasil yang didapatkan berupa metabolit atau produk yang seragam dan konsisten, dengan waktu yang relatif cepat (Glazer & Nikaido 1998: 557). Fermentasi umumnya menggunakan substrat karbohidrat seperti glukosa atau laktosa, kemudian menghasilkan produk berupa alkohol atau

jenis senyawa organik lainnya yang disertai gas CO₂, H₂O, dan konsentrasi H⁺ berlebih (Madigan *dkk.* 2000: 593).

Penamaan proses fermentasi berdasarkan nama hasil akhir yang diperoleh (Gandjar *dkk.* 1992: 62). Produk fermentasi dapat dikelompokkan menjadi 4 jenis, yaitu produk biomassa, enzim, metabolit dan produk transformasi. Kondisi fermentasi, mikroorganismenya, substrat, serta perlakuan yang sesuai, dibutuhkan untuk menghasilkan produk yang optimal (Glazer & Nikaido 1998: 529). Pertumbuhan biomassa dalam medium fermentasi dipengaruhi banyak faktor baik faktor eksternal maupun internal. Jumlah mikroorganismenya dalam fermentasi harus dikendalikan sehingga tidak terjadi kompetisi dalam penggunaan nutrisi. Nutrisi dan produk fermentasi perlu diatur sebab jika berlebihan dapat menyebabkan inhibisi dan represi (Black 1999: 171).

Effendi (2004: 24), melakukan kultivasi biomassa kapang *Penicillium* sp. yang diisolasi dari spons *Ircinia fasciculata*, di dalam medium Wickerham dan difermentasi secara diam pada suhu 20°C. Setelah 26 hari diinkubasi, ditambahkan etil asetat (EtOAc) sebanyak 300 ml, lalu melakukan ekstraksi kapang *Penicillium* sp. tersebut dengan memisahkan antara ekstrak *broth* dan miseliumnya.

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutan terhadap dua cairan berbeda, seperti air dan pelarut organik lain (Verrall & Hudson 1987: 67). Tujuan ekstraksi yaitu menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam sampel. Prinsip ekstraksi berdasarkan perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut, mulai terjadi pada lapisan luar dan berdifusi masuk ke dalam pelarut (Cannell 1998: 2--3).

Faktor-faktor yang memengaruhi laju ekstraksi yaitu persiapan sampel, waktu ekstraksi, kuantitas pelarut, suhu pelarut dan tipe pelarut (Cannell 1998: 5). Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai cara, seperti maserasi, perkolasi, sokhletasi dan refluks. Maserasi menggunakan pelarut untuk digunakan sebagai rendaman bersama sampel yang telah digerus atau dipotong menjadi bagian lebih

kecil. Perkolasi dan sokhletasi menggunakan alat bantuan yang bertujuan untuk mengekstrak, yaitu perkolat dan sokhlet. Sedangkan refluks menggunakan pelarut dengan suhu pada titik didihnya (Natori *dkk.* 1991: 281).

Liu *dkk.* (2009: 549) dalam Debbab *dkk.* (2010: 548), berhasil mengekstrak kapang *Aspergillus ustus* menggunakan pelarut organik etil asetat (EtOAc) dan dapat menghambat aktivitas sel kanker murine lymphoma cell line L5178Y pada konsentrasi 10 µg/ml. Hernandez *dkk.* (1999: 12) dalam Gao *dkk.* (2008: 6093) meneliti aktivitas sitotoksik ekstrak heksan, diklorometan, dan metanol terhadap empat sel tumor manusia dan menghasilkan kesimpulan, bahwa ekstrak heksan dan diklorometan mempunyai aktivitas sitotoksik yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak metanol.

2.5 Uji Sitotoksik MTT

Uji 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) merupakan metode kolorimetrik menggunakan pereaksi MTT berupa garam tetrazolium (Rode *dkk.* 2010: 82). Pereaksi akan dipecah menjadi kristal formazan yang berwarna ungu oleh enzim suksinat tetrazolium reduktase dalam jalur respirasi sel hidup pada mitokondria (Voloshko *dkk.* 2008: 102). Konsentrasi formazan dapat ditentukan secara spektrofotometri dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup (Freimoser 1999: 3728).

Metode MTT relatif lebih cepat, sensitif, akurat, dan dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar. Metode ini tidak dapat diaplikasikan untuk sampel yang berwarna karena warna sampel akan menyerap sinar UV, sehingga absorbansi yang diperoleh menjadi lebih besar dari yang seharusnya dan hasil pengamatan uji antikanker menjadi tidak valid (Rode *dkk.* 2010: 85). Oleh karena itu, perlu digunakan kontrol, yaitu kontrol sampel, medium dan sel, sehingga absorbansi warna kristal formazan yang larut akan sebanding dengan jumlah sel hidup (Freshney 2005: 365).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀), yaitu nilai konsentrasi senyawa yang menghambat proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Suatu

ekstrak dikatakan mempunyai efek antiproliferasi yang signifikan apabila mempunyai nilai $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ mengikuti garis panduan *American National Cancer Institute* (ANCI) (Itharat *dkk.* 2004: 35).

Nilai IC_{50} dapat dihitung dengan menggunakan analisis Probit. Analisis Probit merupakan persamaan regresi yang digunakan untuk dua jenis variabel (Bhar 2010: 1). Uji MTT menggunakan dua variabel, yaitu konsentrasi sampel dan mortalitas sel sehingga nilai IC_{50} dapat ditentukan. Analisis Probit merubah persentase mortalitas menjadi bentuk Probit, yaitu sesuai Tabel Probit. Konsentrasi ekstrak dalam $\mu\text{g/ml}$ ditransformasikan menjadi bentuk logaritma. Persamaan regresi digunakan untuk mencari nilai IC_{50} (Fox 2008: 256).

2.6 Sel Kanker Payudara T47D

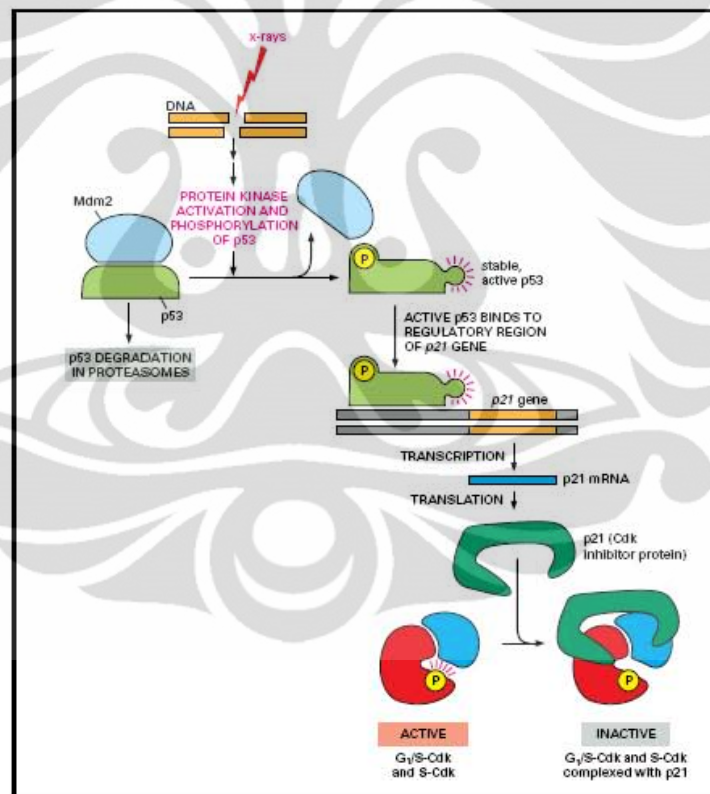
Sel kanker payudara T47D merupakan *continous cell line* berbentuk seperti sel epitel, diisolasi dari jaringan kanker duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Sel tersebut banyak digunakan dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi tidak terbatas, homogenitas tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall *dkk.* 2003: 89). Menurut Boulwood & Fidler (2002: 1), bahwa 70--90% kanker manusia disebabkan oleh faktor lingkungan, termasuk makanan, alkohol, polusi udara, bahan kimia, radiasi dan sinar ultraviolet.

Keseimbangan sel-sel di dalam tubuh dipengaruhi beberapa faktor yaitu proto onkogen, gen supresor, dan gen apoptosis (Gressner *dkk.* 2005: 2458). Proto onkogen menyebabkan sel berploriferasi, gen supresor memberi isyarat untuk menghentikan proliferasi, dan gen apoptosis memberi isyarat untuk bunuh diri pada program kematian sel (Hughes & Mehmet 2003: 7).

Mutasi dan perubahan genetik lain dapat menyebabkan ketidakseimbangan dalam pengaturan gen (Rode 2010: 22). Mutasi dapat menyebabkan proto onkogen diekspresikan secara berlebihan dan berubah menjadi onkogen. Onkogen menyebabkan proliferasi yang berlebihan. Kerusakan pada gen supresor karena mutasi, yaitu gen p53, menyebabkan imortalitas sel sehingga terjadi kanker

(Gambar 2.6). Mekanisme tersebut juga terjadi pada kanker payudara (Boutwold & Fidler 2002: 1--2).

Pengobatan kanker payudara dilakukan dengan serangkaian pengobatan, meliputi pembedahan, penyinaran, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi imunologi (Bennet & Montgomey 1967: 29). Salah satu contoh obat kemoterapi, yaitu *Capecitabine*, obat antikanker oral yang diaktivasi oleh enzim yang ada pada sel kanker sehingga hanya menyerang sel kanker saja. Selain itu, obat antikanker yang telah diperdagangkan adalah *Doxorubicin*. Obat tersebut menyerang secara langsung ke DNA topoisomerase sel kanker. Sel kanker payudara T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doxorubicin (Frederick *dkk.* 1990: 34). Oleh sebab itu, penelitian menggunakan doxorubicin sebagai kontrol positif.



Gambar 2.6. Regulasi gen represor p53 yang temutasi oleh sinar-X

[Sumber: Alberts *dkk.* 2002: 1008.]

2.7 Pemisahan Senyawa dengan Teknik Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kepolaran (Cannell 1998: 209). Komponen akan dipisahkan antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam dapat berupa cairan dan padatan. Fase gerak atau eluen dapat berupa cairan atau gas. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak melarutkan zat komponen campuran.

Eluen berperan penting dalam proses elusi larutan untuk melewati fase diam atau adsorban. Interaksi antara adsorban dengan eluen sangat menentukan terjadinya pemisahan komponen. Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut. Eluen digolongkan menurut ukuran kekuatan teradsorpsinya pelarut pada adsorban. Penggolongan ini disebut sebagai deret eluetropik pelarut (Cannell 1998: 210).

Kromatografi terbagi menjadi beberapa jenis, antara lain kromatografi padatan cair, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, kromatografi eksklusif, dan kromatografi pasangan ion. Kromatografi padatan cair tergantung pada teradsorpsinya zat padat pada adsorben yang polar seperti silika gel. Salah satu contoh dari kromatografi ini yaitu kromatografi lapis tipis (KLT) (Miller 2005: 338).

Kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam berbahan gel silika yang dicampur dengan CaSO_4 untuk menambah daya lekat partikel gel silika pada adsorban. KLT relatif lebih cepat, efisien dan sensitif walaupun konsentrasi senyawa rendah, sehingga dapat dipisah dan terdeteksi (Sawney & Singh 2006: 199 & 201).

Pairet *dkk.* (1995: 915) menggunakan plat gel silika dengan eluen CH_2Cl_2 : MeOH (19:1, v/v) untuk memisahkan ekstrak kapang *Penicillium sclerotiorum*, terutama senyawa azaphilone. Burkhardt *dkk.* (1996: 432) menggunakan KLT analitik gel silika dengan eluen CHCl_3 : MeOH (9:1, v/v), untuk mengelusi ekstrak *Streptomyces griseoviridis*, khususnya mengekstrak senyawa lactone dan cineromycin B.

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Instrumen, Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP) dan Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi FMIPA UI. Penelitian berlangsung selama empat bulan, mulai bulan Februari hingga bulan Mei 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah pisau steril, *Eppendorf*, spatula, jarum tanam tajam, pinset, korek api, penggaris, pensil, *drawing pen* 0,1 [Snowman], *conical tube*, *cryotube*, rak tabung reaksi, mikropipet 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l [ROSI], tip [AXYGEN], mikroplat 96 well, kamera [Nikon], Erlenmeyer 250 ml, 500 ml [Pyrex], cawan petri 100 ml [Pyrex], pipet tetes, gelas ukur 50 ml, 100 ml [Pyrex], tabung reaksi 100 ml [Pyrex], gelas objek, kaca penutup, botol Duran 1000 ml, labu corong pisah, gelas beaker 100 ml, 500 ml [Pyrex], pembakar spirtus, corong pisah, autoklaf [All American No. 25X], oven [GFL 1601], *Laminar Air Flow* (LAF) [Hirayama Manufacturing Cooperation-Japan], *Deep Freezer* [Snijders Scientific b.v.], mikroskop binokuler [Olympus], mikroskop *inverted* [Olympus], *microplate reader* [Labsystems iEMS Reader MF], lemari pendingin [Clasio], sentrifugator, vortex [Thermolyne tipe Maxi Mix II], inkubator CO₂, timbangan digital [Presica], timbangan analitik [Mettler AE 100], kompor listrik [Maspion], *freeze dried* [LABCONCO], sonikator [BRANSON], *vacuum rotary evaporator* [BÜCHI], nitrogen evaporator, dan TLC-kit.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Kapang MFK-25-10

Kapang MFK-25-10 merupakan koleksi dari Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP). Kapang diisolasi secara langsung (*direct method*) dari spons PR-17-IV-10 dari perairan Pulau Rote oleh peneliti BBRP2B-KP di Laboratorium Bioteknologi pada penelitian pendahuluan.

3.2.2.2 Sel kanker payudara T47D

Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker payudara T47D yang merupakan koleksi dari Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP).

3.2.2.3 Medium

Medium yang digunakan adalah *Malt Extract Agar* (MEA) sebagai medium pertumbuhan dan identifikasi, *Malt Extract Broth* (MEB) sebagai medium fermentasi, *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai medium identifikasi, *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 sebagai medium kultur sel kanker payudara T47D dan uji sitotoksik MTT.

3.2.2.4 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah *malt extract* [Merck], pepton [OXOID], PDA (Merck), agar [OXOID], NaCl [Merck], KCl [Merck], Na₂SO₄ [Merck], MgCl₂.6H₂O [Merck], CaCl₂ [Merck], air laut, *streptomycine sulfate* [Merck], laktofenol, alkohol 70%, akuades, gliserol, *Dimethylsulfoxide* (DMSO), *Fetal Bovine Serum* (FBS), etil asetat (EtOAc), metanol (MeOH), diklorometana

(DCM), pereaksi MTT, penisilin-streptomisin, fungizon, tripsin-EDTA, *Sodium Duodesil Sulphate* (SDS) dan HCl 1 ml.

3.2.2.5 Bahan habis pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah kertas saring Whatman No.41, tisu, kapas, aluminium foil, karet, label, parafilm dan plastik tahan panas.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Pembuatan medium

3.3.1.1 *Malt Extract Agar* (MEA)

Pembuatan medium MEA untuk penumbuhan dan identifikasi isolat berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 78). Sebanyak 6 g malt extract, 1 g pepton, dan 3 g agar dilarutkan dalam *Artificial Sea Water* (ASW) hingga volume akhir mencapai 200 ml. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril ditambahkan antibiotik *streptomycine sulphate* 50 mg pada saat suhu medium berkisar antara 40--45°C. Medium dikocok hingga homogen, dituang secara aseptis ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Derajat keasaman (pH) medium diukur dengan kertas pH universal (*range* 0--14) sebelum dan setelah steril, sekitar 6,8--7,2.

3.3.1.2 *Malt Extract Broth* (MEB)

Pembuatan medium MEB untuk fermentasi isolat berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 78). Sebanyak 30 g malt extract dan 5 g pepton dilarutkan dalam air laut steril hingga volume akhir mencapai 1000 ml. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril ditambahkan antibiotik *streptomycine sulphate* 250 mg pada saat suhu medium berkisar antara 40--45°C dan medium dikocok hingga homogen. Derajat

keasaman (pH) medium diukur dengan kertas pH universal (*range* 0--14) sebelum dan setelah steril, sekitar 6,8--7,2.

3.3.1.3 *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Pembuatan medium PDA untuk identifikasi isolat berdasarkan petunjuk yang terdapat dalam kemasan. Sebanyak 39 g PDA dilarutkan dalam 500 ml akuades, dan dipanaskan sampai mendidih. Medium ditambahkan akuades hingga volume akhir mencapai 1.000 ml. Medium disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril ditambahkan antibiotik *streptomycine sulphate* 250 mg pada saat suhu medium berkisar antara 40--45°C. Medium dikocok hingga homogen, dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, dan dibiarkan mengeras. Derajat keasaman (pH) medium diukur dengan kertas pH universal (*range* 0--14) sebelum dan setelah steril, sekitar 6,7--6,9.

3.3.1.4 Medium kultur lengkap RPMI 1640 sel kanker payudara T47D

Medium bubuk RPMI 1 bungkus (10,4 g) dilarutkan dalam 950 ml akuabides steril. NaHCO₃ sebanyak 2,2 g ditambahkan dan diaduk hingga tercampur rata, akuabides steril ditambahkan kembali hingga volume menjadi 1 L. pH diukur dengan pH optimum sekitar 7,0—7,4. Medium difiltrasi dengan menggunakan *hand vacuum pump* dengan filter 0,2 µm. Hasil filtrasi ditampung dalam botol Duran 1000 ml, diberi label dan disimpan pada suhu 4°C. Setelah itu, *penicilin-streptomycin* dan *Fetal Bovine Serum* (FBS) dicairkan terlebih dahulu pada suhu 26--28°C. FBS sebanyak 10 ml dituang ke dalam botol Duran 100 ml dan ditambahkan antibiotik *penicilin-streptomycin* sebanyak 1 ml. Medium cair *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 ditambahkan hingga volume 100 ml. Botol medium diberi label dan disimpan di kulkas pada suhu 4°C.

3.3.2 Pembuatan *stock culture* dan *working culture*

Isolat yang telah dipreservasi ditumbuhkan pada MEA dalam cawan petri dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 26--28°C. Isolat yang tumbuh diinokulasi kembali pada MEA tegak dan miring dalam tabung reaksi. *Stock culture* dan *Working culture* ditumbuhkan secara *streak* dan disimpan pada suhu 4°C dan 26--28°C (Lampiran 2).

3.3.3 Pengamatan morfologi kapang

Pengamatan morfologi kapang secara makroskopik dan mikroskopik dilakukan berdasarkan Gandjar *dkk.* (1999: 4--5). Isolat berumur 5 hari pada medium PDA dan MEA diamati secara langsung. Karakter morfologi koloni kapang yang diamati secara makroskopik, antara lain diameter koloni, tekstur (granular, velvety, bludru), warna koloni (hijau, kuning, hitam), zonasi (ada/tidak), *radial furrow* (ada/tidak), *exudate drop* (ada/tidak), sebalik koloni (ada/tidak), dan zona pertumbuhan (ada/tidak). Sedangkan pengamatan morfologi kapang secara mikroskopik menggunakan laktofenol *cotton blue*. Isolat ditransfer dengan menggunakan jarum tanam tajam ke gelas objek dan ditutup dengan kaca penutup. Preparat dilewatkan di atas api apabila masih terdapat agar medium. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan memerhatikan hifa (berseptum, bercabang), bentuk spora aseksual, fialid, dan konidiofor. Data dicocokkan dengan kunci identifikasi berdasarkan Samson *dkk.* (1999).

3.3.4 Fermentasi metabolit sekunder kapang

Akuades steril sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam *working culture* kapang MFK-25-10 berumur 7 hari pada medium MEA lalu kapang dikerik. Spora kapang sekitar $2\text{--}3 \times 10^8$ CFU/ml dimasukkan ke dalam 9 ml MEB dan diinkubasi pada suhu 26--28°C selama 48 jam sebagai *starter I*. *Starter I* dituang ke dalam 90 ml MEB dan diinkubasi kembali selama 48 jam pada suhu 26--28°C

sebagai *starter* II. *Starter* II dituang ke dalam 900 ml MEB dan diinkubasi selama 3 minggu pada suhu 26--28°C tanpa pengocokan (Lampiran 3).

3.3.5 Ekstraksi metabolit sekunder kapang

Miselium kapang yang telah difermentasi selama 3 minggu disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 41 dan dipisahkan dengan *broth*. Miselium diekstrak menggunakan DCM dan MeOH (1:1, v/v) dan disonikasi selama 60 menit. Campuran DCM dan MeOH diambil untuk dievaporasi hingga kering. Sedangkan *broth* diekstrak menggunakan EtOAc (1:1, v/v) lalu dimasukkan ke dalam labu corong pisah. *Broth* dibuang dan EtOAc ditampung di Erlenmeyer dan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga kering. Ekstrak kasar baik dari miselium maupun *broth* dipindahkan ke masing-masing botol vial dan diberi label. Ekstrak kasar dievaporasi lagi menggunakan evaporator nitrogen hingga pelarut benar-benar kering. Berat ekstrak kasar ditimbang dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C (Lampiran 4).

3.3.6 Pembuatan seri dosis

Ekstrak kasar sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 µl *Dimethylsulfoxide* (DMSO). Larutan ekstrak kasar diencerkan dengan medium kultur *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 hingga volume menjadi 1 ml untuk digunakan sebagai *stock extract*. Ekstrak uji dibuat seri dosis 1, 5, 25, 125 dan 625 µg/ml dari *stock extract* dan diencerkan menggunakan medium RPMI 1640 hingga volume masing-masing menjadi 1 ml. Ekstrak uji konsentrasi 1 µg/ml dibuat dengan memipet 0,1 µl dari *stock extract*. Ekstrak uji konsentrasi 5 µg/ml dibuat dengan memipet 0,5 µl dari *stock extract*. Ekstrak uji konsentrasi 25 µg/ml dibuat dengan memipet 2,5 µl dari *stock extract*. Ekstrak uji konsentrasi 125 µg/ml dibuat dengan memipet 12,5 µl dari *stock extract*. Ekstrak uji konsentrasi 625 µg/ml dibuat dengan memipet 62,5 µl dari *stock extract* (Lampiran 7).

3.3.7 Uji sitotoksik

3.3.7.1 *Platting* sel kanker payudara T47D

Sel kanker payudara T47D dalam *flask* dikeluarkan dari inkubator CO₂ dan dibuang medium kulturnya. *Phosfat Bovine Saline* (PBS) sebanyak 3 ml ditambahkan ke dalam *flask* untuk mencuci sel dari medium yang tersisa lalu dibuang. Tripsin EDTA sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam *flask* untuk melepaskan sel dari permukaan *flask* dan diinkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO₂. Setelah sel lepas, ditambahkan medium lengkap RPMI sebanyak 4 ml ke dalam *flask* serta resuspen. Sel dipindahkan ke dalam tabung konikal dan disentrifugasi pada 20.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan pelet diambil serta ditambahkan 1 ml RPMI, resuspen. Sel diambil sebanyak 50 µl dan diencerkan 20x dengan medium RPMI. Sel diambil sebanyak 10 µl dan dihitung dengan menggunakan kamar hitung Neubauer. Sel dimasukkan 100 µl dalam *microplate* yaitu sebanyak 2×10^4 sel/well. *Plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C (Freshney 2005: 366--367).

3.3.7.2 Uji MTT

Sel kanker payudara T47D yang telah di-*platting* dalam *microplate* dikeluarkan dari inkubator CO₂. Konfluensi sel diamati di bawah mikroskop *inverted*. Medium kultur dibuang lalu larutan ekstrak dimasukkan ke dalam setiap *well* dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Setelah 24 jam, reagen MTT medium kultur dibuang dan ditambahkan 0,5 mg/ml dimasukkan sebanyak 100 µl ke dalam *well* dengan medium kultur yang telah dibuang sebelumnya dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 4 jam (Wahab *dkk.* 2009: 73). Apabila formazan telah terbentuk, SDS 10% ditambahkan sebanyak 100 µl/well. *Microplate* dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam tempat gelap pada suhu 26°C--28°C selama 24 jam (Lampiran 5). Setelah 24 jam, absorbansi dibaca dengan menggunakan *microplate reader*

dengan panjang gelombang 570 nm. Persentase (%) mortalitas sel dihitung berdasarkan nilai absorbansi tersebut menggunakan rumus:

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{(\text{k. sel} - \text{k. medium}) - (\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak})}{\text{k. sel} - \text{k. medium}}$$

Persentase mortalitas ditransformasi menjadi bentuk Probit dengan menggunakan Tabel Probit. Sedangkan konsentrasi ekstrak dihitung nilai lognya. Grafik Probit dibuat dengan menggunakan program Microsoft Excel 2007 dan dianalisis nilai IC_{50} berdasarkan persamaan regresinya.

3.3.8 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan berdasarkan Gibbons & Gray (1990) dalam Cannel (1998: 210--211). Plat KLT yang telah dilapisi oleh gel silika 60F₂₅₄, dibuat garis melintang lurus 1 cm dari dasar plat. Larutan uji baik dari *broth* maupun miselium kapang ditotolkan 2--5 μ l dengan diameter 1--2 mm pada garis. Plat KLT dimasukkan ke dalam wadah yang telah berisi pelarut EtOAc atau DCM : MeOH (15:1, v/v) yang telah jenuh. Mulut wadah ditutup agar pelarut tidak menguap. Pelarut secara kapiler akan naik ke bagian atas plat setelah 10--15 menit. Perpindahan titik larutan uji ditandai di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, lalu hasilnya difoto. Nilai *Retention factor* (Rf) dihitung dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak solut (cm)}}{\text{jarak pelarut (cm)}}$$

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengamatan Morfologi Kapang MFK-25-10

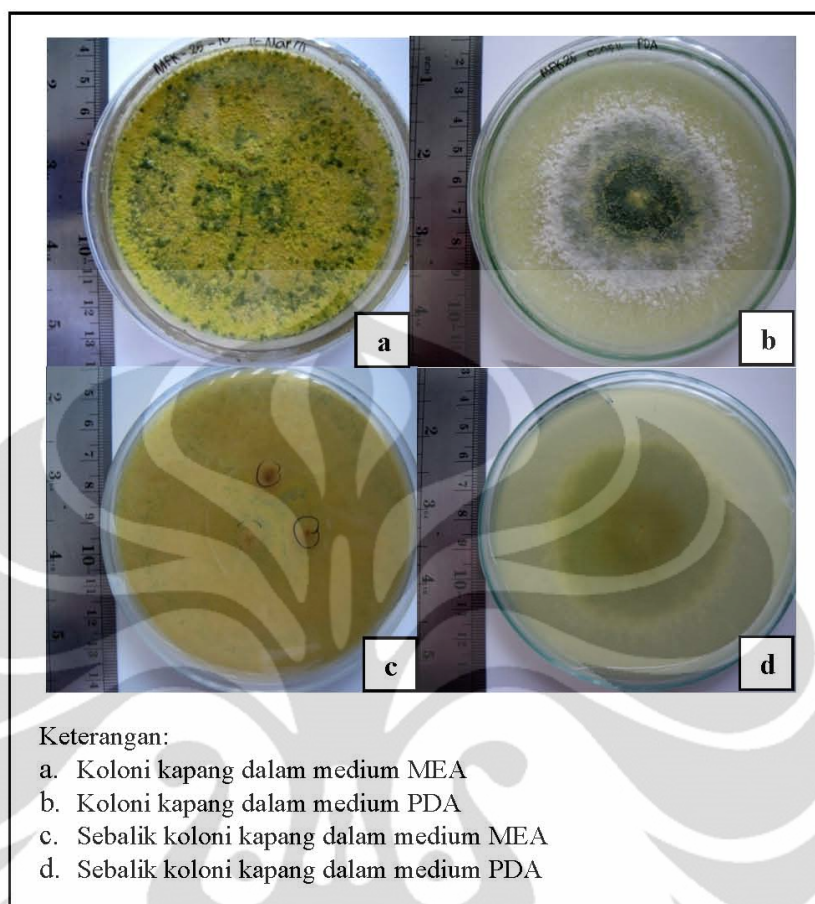
Pengamatan morfologi kapang MFK-25-10 dilakukan pada biakan berumur 5 hari dalam medium MEA dan PDA yang diinkubasi pada suhu 26--28°C. Koloni kapang pada medium MEA memiliki diameter 9 cm menunjukkan warna koloni kuning, memiliki tekstur granular, tidak terbentuk warna sebalik koloni, tidak terdapat *growing zone*, *radial furrow* dan zonasi, sudah mulai terbentuknya *exudate drops* berwarna kuning bening (Gambar 4.1(b) dan Tabel 4.1(a)). Koloni kapang pada medium PDA memiliki diameter 6 cm menunjukkan warna koloni hijau, memiliki tekstur granular, tidak terbentuk warna sebalik koloni, terdapat *growing zone* tetapi tidak ada *radial furrow*, zonasi, dan *exudate drops* (Gambar 4.1(a) dan Tabel 4.1(a)).

Tabel 4.1(a). Hasil pengamatan makroskopik kapang MFK-25-10 umur 5 hari dalam medium MEA dan PDA pada suhu 26--28°C

Medium	Warna	Sebalik koloni	Tekstur	<i>Exudate drops</i>	Zonasi	<i>Radial furrow</i>	<i>Growing zone</i>	Diameter (cm)
MEA	Kuning	Tidak berwarna	Granular	Ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	9
PDA	Hijau	Tidak berwarna	Granular	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Ada	6

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Bourguignon (2008: 21) menumbuhkan isolat *Trichoderma* dari akar bawang dalam medium MEA, menghasilkan warna koloni hijau menjadi kuning pada umur 5 hari dengan diameter 6 cm, sebalik koloni yang tidak berwarna, tidak terbentuk zonasi, dan telah menghasilkan *exudate drops* berwarna bening.



Gambar 4.1(a). Morfologi secara makroskopik kapang MFK-25-10 umur 5 hari dalam medium MEA dan PDA pada suhu 26--28°C

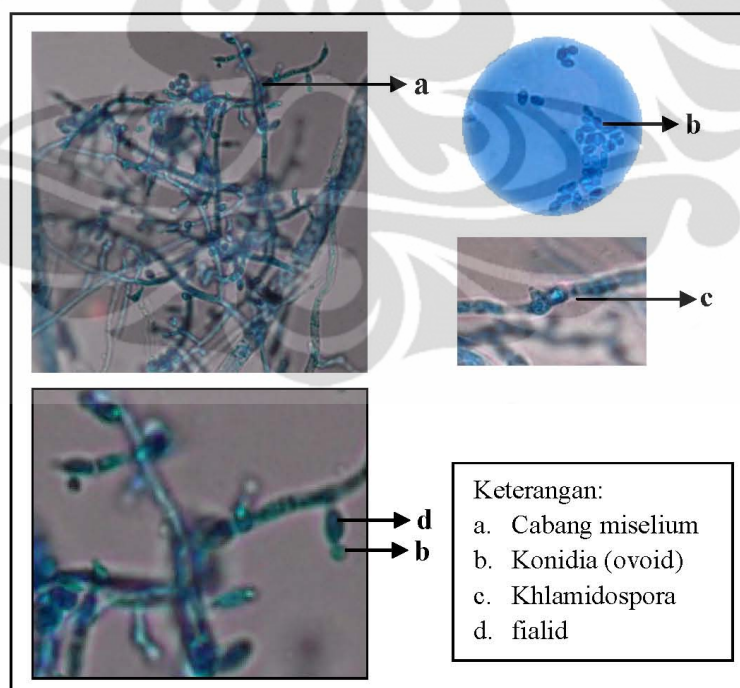
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Pertumbuhan kapang MFK-25-10 dalam medium MEA lebih cepat dibanding dalam medium PDA. Media MEA berbahan dasar *malt extract* dan pepton. *Malt extract* merupakan gula disakarida dari dua gugus glukosa sebagai sumber karbon, sedangkan pepton sebagai sumber nitrogen yang berfungsi dalam sintesis protein dan DNA (Danielson & Davey 2002: 496). Komposisi PDA antara lain sari kentang dan gula dextrosa yang merupakan monosakarida. Gula dextrosa seharusnya lebih mudah untuk diabsorpsi dibandingkan disakarida (*malt extract*). *Trichoderma* mampu mendegradasi gula sederhana maupun gula kompleks atau polisakarida, seperti pati, selulosa, dan pektin (Domsch *dkk.* 1980: 59). Polisakarida dapat terdegradasi karena *Trichoderma* pada umumnya

mensekresikan enzim *polysaccharase* yang mampu menguraikan rantai panjang gula menjadi lebih sederhana (Klein & Eveleigh 1998: 64).

Trichoderma memiliki kemampuan metabolisme nitrogen baik yang sederhana maupun kompleks, seperti asam-asam amino (alanin, asam aspartik, asam glutamat) (Danielson & Davey 2002: 498). Nitrogen kompleks tersebut dapat terdegradasi dengan adanya enzim-enzim hidrolitik protease yang disekresikan oleh *Trichoderma* (Griffin 1994: 67). Oleh sebab itu, sintesis protein di dalam kapang dapat terjadi dengan mudah pada medium yang kompleks sekalipun, misalnya MEA.

Pengamatan mikroskopik kapang MFK-25-10 dilakukan pada isolat yang berumur 5 hari pada medium MEA. Perbesaran 1000 kali dapat terlihat fialid yang berbentuk langsing dan menggembung di bawah. Spora berbentuk ovoid atau seperti bulat telur. Miselium bercabang-cabang dan terbentuk khlamidospora (Gambar 4.1(b) dan Tabel 4.1(b)). Menurut Gandjar *dkk.* (1999: 120), bahwa khlamidospora ditemukan dalam miselium dari koloni yang sudah tua, terletak interkalar atau terminal, berbentuk bulat, tidak berwarna, dan berdinding halus.



Gambar 4.1(b). Pengamatan mikroskopis kapang MFK-25-10 umur 5 hari dalam medium MEA pada suhu 26--28°C perbesaran 1000X

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.1(b). Hasil pengamatan mikroskopik kapang MFK-25-10 umur 5 hari dalam medium MEA pada suhu 26--28°C

Karakteristik	Keterangan
Miselium	Bercabang dan berdinding halus
Konidia	Ovoid, tanpa ornamentasi, dan berwarna kuning
Konidiofor	Halus dan tidak berwarna
Fialid	Langsing menggebung dibawah

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Karakter-karakter morfologi kapang MFK-25-10 sesuai dengan karakter genus *Trichoderma* dalam Samson *dkk.* (1999: 124) dan Gandjar *dkk.* (1999: 144). Pertumbuhan koloni *Trichoderma* akan mencapai lebih dari 5 cm dalam waktu 9 hari pada medium Oatmeal Agar (OA). Koloni semula tidak berwarna (hialin), kemudian putih kehijauan, dan terakhir berwarna hijau. Konidiofor dapat bercabang menyerupai piramid, yaitu pada bagian bawah terdapat cabang lateral, sedangkan bagian ujung percabangan bertambah pendek. Fialid tampak langsing dan panjang, konidia berbentuk semibulat hingga oval, dan berdinding halus.

4.2 Fermentasi Metabolit Sekunder Kapang

Sebelum dilakukan fermentasi pada medium cair 1 L dalam botol fermentasi 3 L, isolat ditumbuhkan terlebih dahulu dalam media MEA miring selama 7 hari. MEB 10 ml dijadikan *starter* 1 dan MEB 100 ml merupakan *starter* 2 dengan waktu inkubasi selama 48 jam. *Starter* digunakan sebagai proses aklimatisasi kapang sebelum dimasukkan ke dalam volume yang lebih besar. Sehingga mikroorganisme diasumsikan sudah dalam fase log ketika dimasukkan dalam kultur yang lebih besar.

Kultur diinkubasi pada suhu 26--28°C selama 3 minggu secara statis. Hal tersebut bertujuan mengurangi buih pada medium ketika dilakukan pengocokkan, sehingga pertumbuhan kapang tidak optimal. MEA mengandung malt extract serta pepton yang dapat bereaksi dan dapat menghasilkan buih. *Batch fermentation* dilakukan dalam fermentasi kapang karena mudah, tidak perlu

mengganti medium lalu mensterilisasi kembali. Hasil yang didapatkan berupa metabolit atau produk yang seragam dan konsisten (Glazer & Nikaido 1998: 557). Fermentasi kapang dari spons secara *batch* dan tanpa pengocokan juga dilakukan oleh Effendi (2004: 24), yaitu melakukan kultivasi biomassa kapang *Penicillium* sp. yang diisolasi dari spons *Ircinia fasciculata*, di dalam medium cair Wickerham dan difermentasi secara diam pada suhu 20°C selama 26 hari.

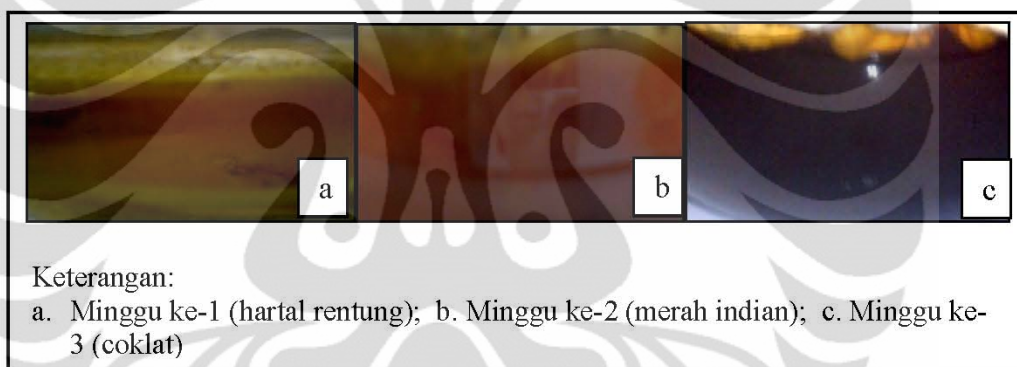
Hasil fermentasi kapang dalam medium MEB pada suhu 26--28°C selama 3 minggu secara *batch fermentation*, yaitu pada minggu ke-1 koloni kapang tumbuh dan bersporulasi sekitar sepertiga dari luas permukaan labu fermentasi. Medium fermentasi berwarna hantal rentung. pH awal sekitar 7,4. Minggu ke-2 kapang telah menutupi hampir 2/3 dari permukaan labu fermentasi. Selain itu, metabolit sekunder telah disekresikan ke atas permukaan, yaitu *exudete drops* yang berwarna kuning bening. Medium fermentasi berwarna merah indian. Kapang pada minggu ke-3 telah menutupi sebagian besar permukaan labu fermentasi [Gambar 4.2(a)]. Medium berwarna coklat dan pH yang menurun dan cenderung asam yaitu 5,8.

Pertumbuhan yang cepat pada kapang tersebut dipengaruhi oleh nutrisi, suhu, serta pH. *Malt Extract Broth* (MEB) mengandung *malt extract* dan pepton, berfungsi dalam metabolisme dan pertumbuhan kapang. Warna medium berubah seiring bertambahnya minggu fermentasi (Gambar 4.2(b)). Perubahan tersebut dikarenakan perombakan ekstrak malt menjadi gula yang lebih sederhana. Selain itu, perubahan pada medium juga disebabkan bercampurnya medium dengan metabolit sekunder yang dikeluarkan oleh kapang MFK-25-10 ke lingkungan. Akhir fermentasi umumnya menghasilkan produk berupa alkohol atau jenis senyawa organik lainnya yang disertai gas CO₂, H₂O, dan konsentrasi H⁺ berlebih sehingga cenderung asam (Madigan *dkk.* 2000: 593).



Gambar 4.2(a). Hasil fermentasi kapang MFK-25-10 dalam MEB selama 3 minggu pada suhu 26--28°C secara statis

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Keterangan:

a. Minggu ke-1 (hartal rentung); b. Minggu ke-2 (merah indian); c. Minggu ke-3 (coklat)

Gambar 4.2(b). Perubahan warna medium MEB selama 3 minggu fermentasi kapang MFK-25-10 pada suhu 26--28°C secara statis

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.3 Ekstraksi Metabolit Sekunder Kapang

Ekstraksi merupakan upaya mendapatkan komponen kimia (metabolit sekunder) pada kapang yang akan diujikan. Ekstraksi yang tidak tepat dapat memengaruhi bioaktivitas komponen yang diujikan. Oleh karena itu, dalam ekstraksi perlu diperhatikan penggunaan pelarut dan metode ekstraksi yang sesuai dengan sifat fisikokimia komponen yang terkandung dalam isolat. Selain itu, faktor ekologi dan umur isolat juga dapat memengaruhi kandungan metabolit sekunder dan bioaktivitasnya.

Pemilihan etil asetat (EtOAc) pelarut semi polar, metanol (MeOH) pelarut polar dan diklorometana (DCM) pelarut nonpolar diharapkan dapat menarik seluruh senyawa metabolit sekunder dari ekstrak kapang. Berat basah kapang MFK-25-10 yaitu sekitar 51,7 g, sedangkan berat kering setelah sekitar 9,3 g. Sedangkan setelah dievaporasi, ekstrak kasar dari miselium kapang MFK-25-10 menghasilkan berat kering sekitar 4,1 g dan 1,7 g berat kering ekstrak dari *broth*. Ekstrak kering yaitu ekstrak yang tidak mengandung pelarut lagi, diperoleh dari penimbangan berat yang telah konstan.

Berat kering ekstrak kapang MFK-25-10 yang berasal dari miselium lebih besar. Hal tersebut dikarenakan adanya garam-garam yang berasal dari miselium. Selain itu, pelarut MeOH yang bersifat polar dan DCM yang bersifat nonpolar, sehingga seluruh senyawa polar maupun nonpolar dapat tertarik maksimal. Sedangkan pelarut EtOAc pada *broth* bersifat semipolar, sehingga cenderung senyawa semipolar yang dapat tertarik. Tidak menutup kemungkinan senyawa cenderung polar atau nonpolar. Nursyid *dkk.* (2010: 103), menggunakan pelarut DCM dan MeOH untuk mengekstraksi miselium kapang MFW-01-08 yang diisolasi dari *Ascidia aplidium*. Serta mengekstrak *broth* dengan menggunakan pelarut EtOAc.

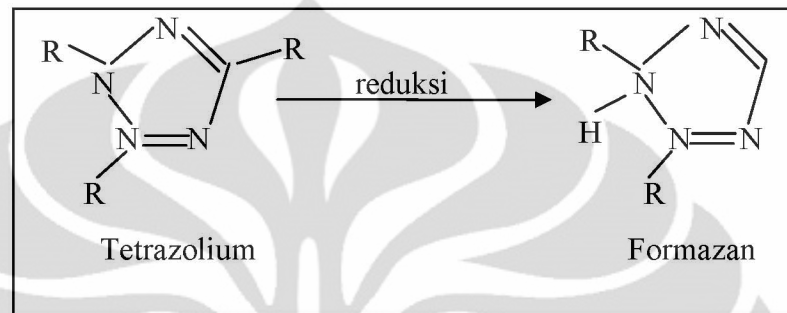
Ekstraksi kapang dengan cara memisahkan antara *broth* dan miselium bertujuan agar dapat mengetahui letak metabolit yang aktif sehingga untuk proses ekstraksi dalam jumlah besar, hanya mengekstrak *broth* atau miseliumnya saja. Effendi (2004: 24) melakukan kultivasi biomassa kapang *Penicillium* sp. dengan memisahkan antara ekstrak *broth* dan miseliumnya. Hasil akhirnya, ekstrak dari miselium lebih banyak dibanding *broth*.

4.4 Uji Sitotoksik Ekstrak Kapang

4.4.1 Ekstrak *broth* kapang

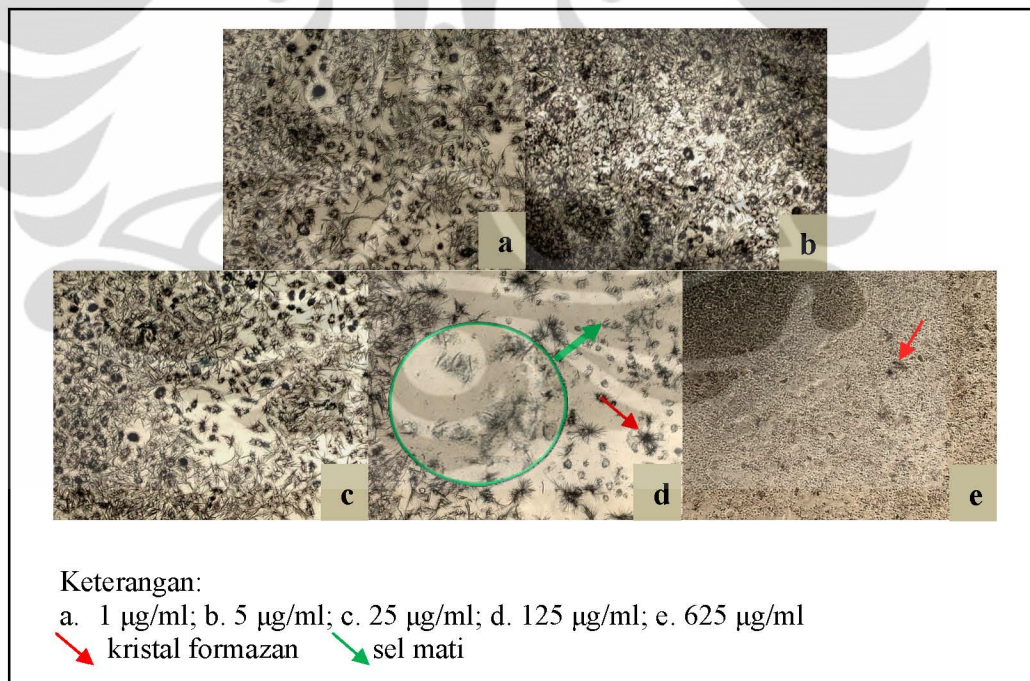
Hasil pembacaan absorbansi *microplat reader* dengan panjang gelombang 570 nm terhadap ekstrak *broth* kapang MFK-25-10, menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka nilai absorbansi semakin rendah [Tabel 4.4.1(a)].

Nilai absorbansi berhubungan dengan kristal formazan yang berwarna ungu, yang terbentuk setelah pemberian garam tetrazolium atau MTT yang berwarna kuning. Formazan mengindikasikan bahwa sel hidup, yaitu sel yang mampu mereduksi MTT menjadi kristal formazan pada sistem suksinat dalam mitokondria [Gambar 4.4.1(a)].



Gambar 4.4.1(a). Reaksi reduksi garam tetrazolium (MTT) menjadi kristal formazan

[Sumber: Rode *dkk.* 2010: 83 yang telah dimodifikasi.]









Gambar 4.4.1(b). Hasil penambahan MTT 10% terhadap sel kanker T47D setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam perbesaran 20X

[Sumber: dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.4.1(a). Hasil absorbansi *microplate reader* $\lambda=570$ nm, ekstrak *broth* dan miselium kapang MFK-25-10 dengan seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.990	-	0.984	0.210	0.217	0.990	0.937	0.973	0.219	0.217	1.028	0.233
B	1.021	-	0.955	0.213	0.220	0.974	0.928	0.950	0.212	0.208	0.994	0.220
C	0.965	0.960	0.986	0.214	0.208	0.881	0.824	0.861	0.209	0.219	1.010	0.218
D	0.905	0.912	0.931	0.217	-	0.209	0.210	0.243	0.211	-		
E	0.194	0.191	0.199	0.184	0.197	0.222	0.223	0.226	0.218	-		
F	0.464	0.464	0.489	0.232	0.224							
G	0.972	0.987	1.009	0.232	0.239							
H												

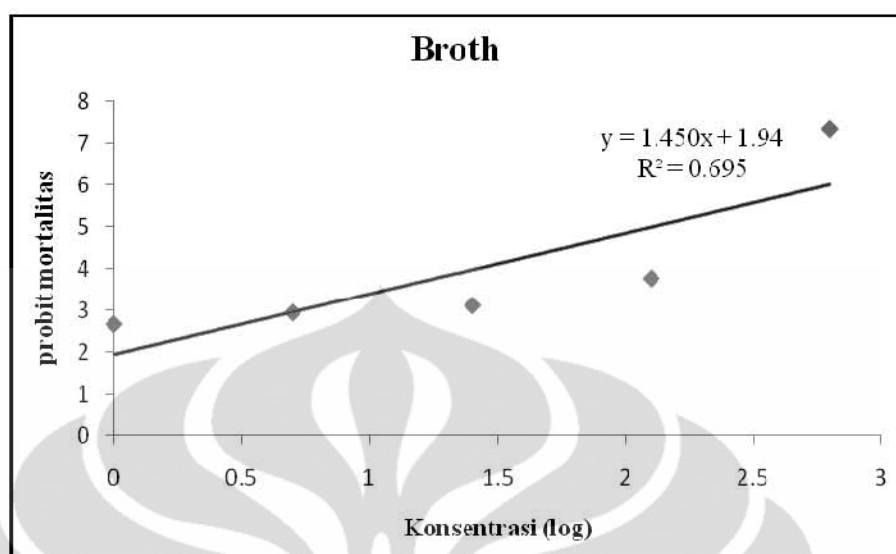
Keterangan:

 Ekstrak <i>broth</i> -kontrol	 Kontrol positif (doxorubicin)	 Kontrol sel	- Error
 Ekstrak miselium-kontrol	 Kontrol DMSO	 Kontrol medium	

[Sumber: *Microplate reader* yang telah dimodifikasi.]

Nilai absorbansi berbanding terbalik dengan persentase mortalitas sel. Konsentrasi ekstrak yang semakin tinggi menghasilkan absorbansi yang semakin rendah dan persentase mortalitas sel yang semakin tinggi. Ekstrak *broth* kapang pada konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ menghasilkan persentase mortalitas sebesar 12,9%, konsentrasi 5 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 9,2%, konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 9,8%, konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 19,7%, dan konsentrasi 625 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 99,5%.

Grafik Probit hubungan antara konsentrasi ekstrak *broth* kapang MFK-25-10 terhadap persentase mortalitas sel, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan tingkat persentase mortalitas sel. Nilai *slope* persamaan regresi pada grafik menunjukkan bahwa dalam kenaikan setiap 1,450 konsentrasi ekstrak memengaruhi satu unit mortalitas sel. Nilai R^2 sebesar 0,695 menunjukkan bahwa peningkatan persentase kematian dipengaruhi oleh konsentrasi [Gambar 4.4.1(c)].



Gambar 4.4.1(c). Grafik hasil analisis probit ekstrak *broth* kapang MFK-25-10 seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$

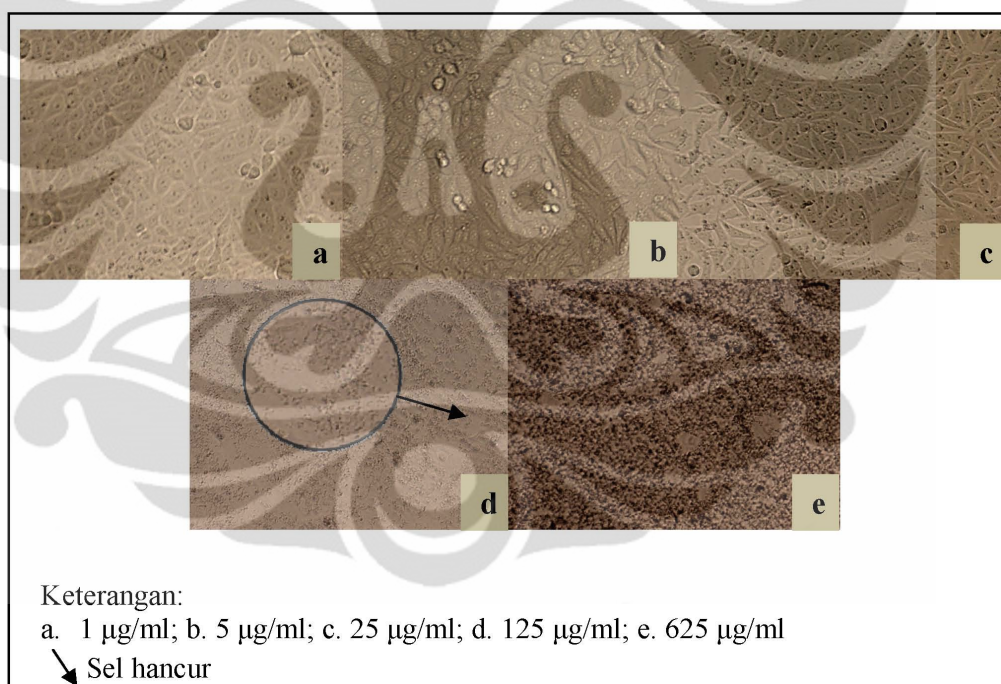
Hasil probit mortalitas dengan seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$ pada ekstrak *broth* menghasilkan persamaan $y = 1,450x + 1,94$. Persamaan tersebut didapat nilai *Inhibition Concentration*₅₀ (IC_{50}) sebesar 128,9 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 4.4.1(b). Hasil analisis probit ekstrak *broth* dan miselium kapang MFK-25-10 dengan seri dosis 1, 5, 25, 125, 625 $\mu\text{g/ml}$

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Mortalitas (%)		Log konsentrasi (x)	Probit mortalitas (y)	
	B	M		B	M
1	1.8	4.8	0	2.67	2.25
5	2	5.8	0.699	2.95	3.36
25	3.6	18.6	1.398	3.12	4.08
125	11.2	98.7	2.097	3.77	7.05
625	99.6	99.2	2.796	7.33	7.33
Persamaan	<i>Broth</i>		$y = 1,450x + 1,94$ $IC_{50} (y=5) = 128,9 \mu\text{g/ml}$		
	Miselium		$y = 1,981x + 2,044$ $IC_{50} (y=5) = 31 \mu\text{g/ml}$		

4.4.2 Ekstrak miselium kapang

Hasil absorbansi ekstrak miselium kapang MFK-25-10. menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka nilai absorbansi semakin rendah sehingga persentase mortalitas sel yang dihasilkan semakin tinggi. Ekstrak miselium pada konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ menghasilkan persentase mortalitas sebesar 15,9%, konsentrasi 5 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 14,9%, konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 26,4, konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 99,7%, dan konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 99,3%. Sel mati memiliki morfologi cenderung membulat dan terpisah dengan sel lainnya (Rode 2010: 25). Sel hancur pada konsentrasi 125 dan 625 $\mu\text{g/ml}$. Sel sudah tidak berbentuk pipih atau bulat, tetapi menjadi potongan-potongan kecil tidak beraturan [Gambar 4.4.2(a)].

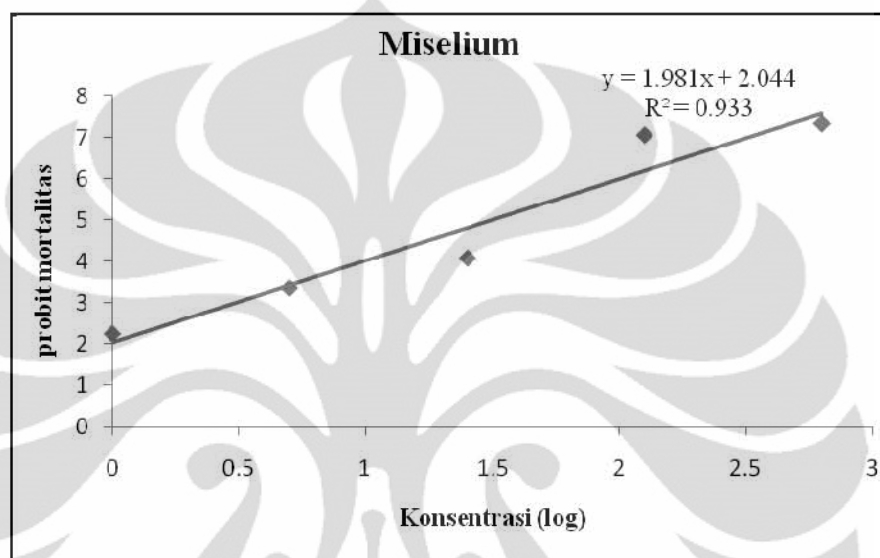


Gambar 4.4.2(a). Hasil penambahan ekstrak miselium kapang MFK-25-10 dengan seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$ setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam perbesaran 20X

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Grafik Probit hubungan antara konsentrasi ekstrak miselium kapang MFK-25-10 terhadap persentase mortalitas sel, menunjukkan bahwa peningkatan

konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan tingkat persentase mortalitas sel. Nilai *slope* persamaan regresi pada grafik menunjukkan bahwa dalam kenaikan setiap 1,981 konsentrasi ekstrak dapat memengaruhi satu unit mortalitas sel. Nilai R^2 sebesar 0,933 menunjukkan bahwa peningkatan persentase kematian dipengaruhi oleh konsentrasi [Gambar 4.4.2(b)].

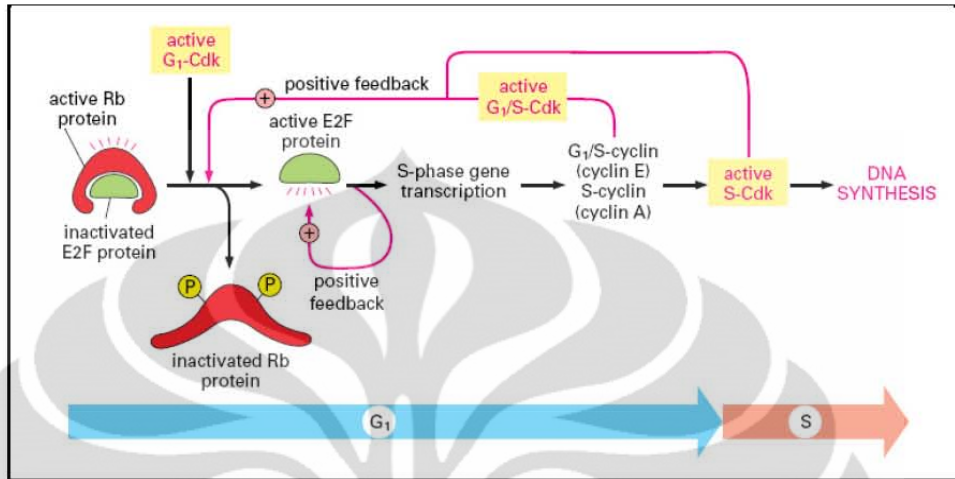


Gambar 4.4.2(b). Grafik hasil analisis probit ekstrak miselium kapang MFK-25-10 seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$

Hasil persentase mortalitas dengan seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$ pada ekstrak miselium menghasilkan persamaan $y = 1,981x + 2,044$. Persamaan tersebut menghasilkan nilai *Inhibition Concentration*₅₀ (IC_{50}) sebesar 31 $\mu\text{g/ml}$. Menurut Itharat *dkk.* (2004: 35), apabila $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ maka senyawa tersebut bersifat sitotoksik dan berpotensi sebagai antikanker. Berdasarkan Itharat *dkk.* (2004: 35), bahwa ekstrak dari miselium kapang MFK-25-10 tidak bersifat sitotoksik dan berpotensi sebagai antikanker, akan tetapi masih memiliki kemampuan sitotoksik karena dapat melisisikan sel kanker payudara T47D.

Kemampuan ekstrak miselium kapang MFK-25-10 dalam penghambatan proliferasi diduga karena adanya kandungan senyawa-senyawa trichoharzin (polipeptida), tricopolyns (lipopeptida), dan trichodenone (cycloalkenoid). Senyawa-senyawa tersebut memiliki kemampuan menghambat aktivitas fosforilasi Rb, sehingga terjadi pengikatan faktor transkripsi E2F dan

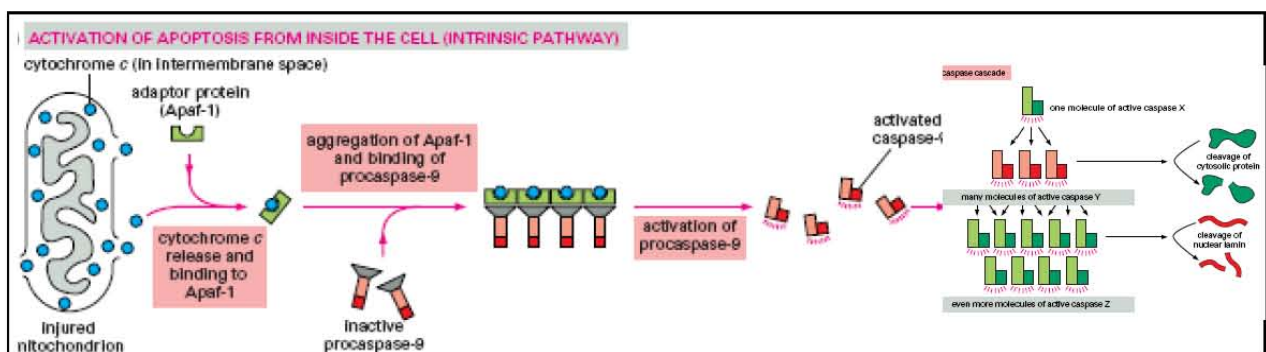
menyebabkan terjadinya penghentian siklus sel pada fase G1/S (Höller 2000: 1354--1357) [Gambar 4.4.2(c)].



Gambar 4.4.2(c). Mekanisme pengontrolan S fase

[Sumber: Alberts *dkk.* 2002: 1005.]

Apoptosis sel diduga karena ekstrak dapat merusak membran sel sehingga ekstrak masuk dan menuju mitokondria. Membran mitokondria rusak dan sitokrom c yang terdapat di dalam membran luar mitokondria menuju sitoplasma sel. Sitokrom c yang berikatan dengan protein Apaf-1 akan mengaktifasi enzim procaspase 9 untuk membentuk caspase 9. Caspase 9 akan mengaktifasi caspase lain yang berperan dalam fase degradasi pada apoptosis sel (King 2000: 7). Selain pada mitokondria, enzim caspase juga terletak pada organel-organel lain, antara lain lisosom dan aparatus Golgi (Rode 2010: 25). Mekanisme caspase 9 pada mitokondria dapat dilihat pada Gambar 4.4.2(d).



Gambar 4.4.2(d). Regulasi enzim caspase 9 terhadap mekanisme apoptosis sel

[Sumber: Alberts *dkk.* 2002: 1012--1013.]

Hasil dari nilai IC_{50} dari ekstrak *broth* dan miselium kapang MFK-25-10, bahwa ekstrak tersebut tidak bersifat antikanker terhadap sel kanker payudara T47D, karena nilai $IC_{50} \geq 30 \mu\text{g/ml}$. Berdasarkan garis panduan *American National Cancer Institute* (ANCI) dalam Itharat *dkk.* (2004: 35), bahwa suatu ekstrak bersifat antikanker apabila memiliki nilai $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$. Akan tetapi, ekstrak dari kapang MFK-25-10 atau genus *Trichoderma* mampu menghentikan proliferasi sel dan melisiskan sel kanker payudara T47D yang masih hidup pada konsentrasi 31--128,9 $\mu\text{g/ml}$.

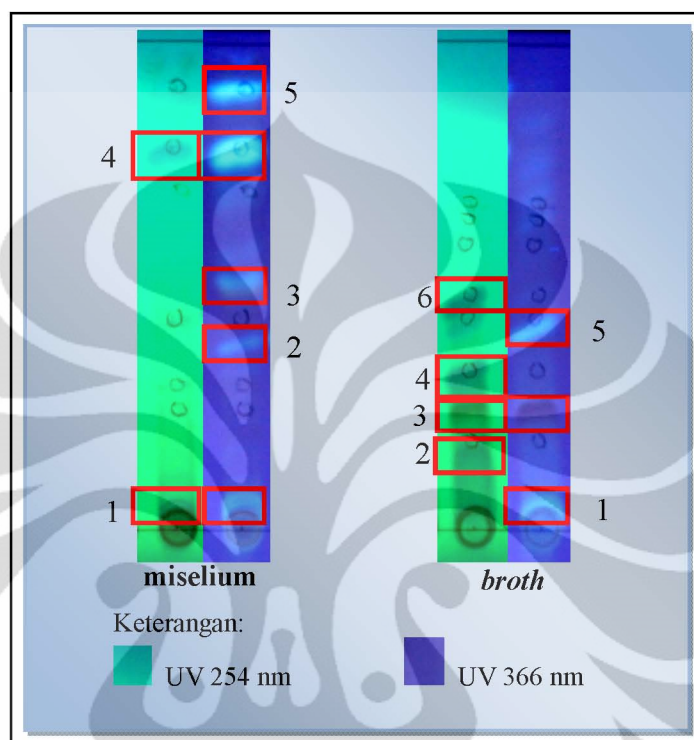
4.5 Pemisahan Senyawa Ekstrak Kapang

Pemisahan senyawa dari ekstrak kasar kapang MFK-25-10 menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Eluen yang digunakan adalah campuran antara diklorometana (DCM) dan metanol (MeOH) dengan perbandingan 15 : 1. Campuran eluen DCM dan MeOH (15:1) berhasil memisahkan dengan baik senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar kapang. Menurut Miller (2005: 338), bahwa pemisahan yang optimal sangat ditentukan oleh fase diam dan fase gerak yang cocok untuk ekstrak yang akan dipisahkan. Hasil elusi menunjukkan senyawa yang terkandung sebagian besar merupakan golongan senyawa nonpolar.

Pola pemisahan senyawa dari ekstrak kasar miselium maupun *broth* kapang MFK-25-10 menggunakan pelat silika lalu disinari UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm, menunjukkan pola yang hampir sama. Ekstrak kasar miselium kapang pada panjang gelombang 254 nm menghasilkan satu bercak senyawa polar dan dua bercak senyawa nonpolar. Sedangkan pada panjang gelombang 366 nm menghasilkan satu bercak senyawa polar dan empat bercak senyawa nonpolar. Ekstrak kasar kapang dari *broth* pada panjang gelombang 254 nm menghasilkan empat bercak senyawa nonpolar. Sedangkan pada panjang gelombang 366 nm menghasilkan satu bercak senyawa polar dan enam bercak senyawa nonpolar [Gambar 4.5(a)].

Nursyid *dkk.* (2010: 120), berhasil memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak kapang yang diisolasi dari perairan Wakatobi, menggunakan

KLT dengan pelarut DCM : MeOH (15:1, v/v). Hasilnya pada panjang gelombang 254 nm terlihat jelas pemisahan senyawanya, yaitu sebanyak 5 spot, sedangkan panjang gelombang 366 nm hanya 3 spot.



Gambar 4.5. Pola pemisahan ekstrak miselium-*broth* kapang MFK-25-10 pada pelat silika dengan UV $\lambda=254$ dan $\lambda=366$ nm

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.5. Nilai *Retention factor* (Rf) ekstrak kapang MFK-25-10

Spot	Rf	
	Miselium	Broth
1	0.05	0.06
2	0.38	0.16
3	0.5	0.25
4	0.8	0.3
5	0.9	0.4
6	-	0.5

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kapang MFK-25-10 berhasil diidentifikasi sebagai genus *Trichoderma*.
2. Ekstrak kapang MFK-25-10 tidak bersifat antikanker terhadap sel kanker payudara T47D, yaitu dengan nilai $IC_{50} \geq 30 \mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} dari ekstrak *broth* sebesar $128,9 \mu\text{g/ml}$ dan nilai IC_{50} dari ekstrak miselium sebesar $31 \mu\text{g/ml}$ pada seri dosis 1, 5, 25, 125, dan 625 $\mu\text{g/ml}$.
3. Ekstrak kapang MFK-25-10 baik dari miselium maupun *broth* dapat dipisahkan dengan baik pada pengujian KLT menggunakan eluen DCM : MeOH (15:1, v/v).

5.2 Saran

1. Ekstrak miselium kapang *Trichoderma* diuji secara *in vivo* dan pada sel-sel kanker lain.
2. Dilakukan fraksinasi ekstrak miselium kapang *Trichoderma* untuk mengetahui senyawa spesifik yang bersifat sitotoksik tersebut.

DAFTAR REFERENSI

- Agusta, K.L.2009. *Biologi dan kimia jamur endofitik*. Institut Teknologi Bandung (ITB), Bandung: 7a + 103 hlm.
- Alberts, B., A.Johnson, J.Lewis, M.Raff, & K.Roberts. 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. Garland Science, New York: xiii + 1145 hlm.
- Bennet, L.L.Jr. & J.A. Montgomery. 1967. *Design of anticancer agents*. Academic Press., New York: 127 hlm.
- Bhar, L. 2010. *Probit analysis*. Library Avenue, New Delhi: 110 hlm.
- Bhilabutra, W., T. Techhowisan, J.F. Peberdy & S. Lumyong. 2007. Antimicrobial activity of bioactive compounds from *Periconia siamensis* CMUGE015. *Res. J. of Microbiol.* **2** (10): 749--755.
- Bilgrami, K.S. & R.N. Verma. 1994. *Physiology of fungi*. 2nd ed. Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi: x + 507 hlm.
- Black, J.G. 1999. *Microbiology: Principles and exploration*. 5th ed. John Wiley, New York: xii + 769 hlm.
- Blunt, J.W, B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G., Munro, P.T., Northcote, & M.R. Prinsep. 2007. Marine natural product. *Nat. Prod. Rep.* **24**: 31--86.
- Boulwood, J. & C. Fidler. 2002. *Molecular analysis of cancer*. Humana Press., Totowa, New Jersey: ix + 301 hlm.
- Bourguignon, E. 2008. Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems (thesis). Lincoln University, Canterbury: xvi + 235hlm.
- Bröker, K. 1999. *Biological aspect of the production of secondary metabolites in sponge-microorganisms symbiosis: function and origin of natural products and difficulties in studying them*. Tesis, Institute of Taxonomix Zoology University of Amsterdam, Amsterdam: xii + 68 hlm.
- Bugni, S. & C.M. Ireland. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganism. *Nat. Prod. Rep.* **21**: 143--163.
- Burdall, E.S., M.A Hanby., Landsdown & V. Speirs. 2003. Breast cancer cell line. *Breast Cancer Res.* **5**(2): 89-95.

- Burkhardt, K., H. Fiedler, & Zeeck. 1996. Metabolite pattern analysis of *Streptomyces griseoviridis*. *J. Antibiot.* **49**: 432--437.
- Calvo, A.M., R.A. Wilson, J.W. Bok, & N.P. Keller. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 447--459.
- Cannell, R.J.P. 1998. *Natural products isolation*. Humana Press., New Jersey: ix + 465 hlm.
- Danielson, R.M. & C.B. Davey. 2002. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil. Biol. Chem.* **5**: 495--504.
- Debbab, A., A.H. Aly, W.H. Lin & P. Proksch. 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microbial Biotech.* **3** (5): 544--563.
- Domsch, K.H., W. Gams, & T.H. Anderson. 1980. *Compendium of soil fungi*. Academic Press., London: xvi + 796 hlm.
- Effendi, H. 2004. Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of sponge -derived fungi collected from the Mediterranean sea (Italy) and Bali (Indonesia). Disertasi, Dusseldorf: xi + 222 hlm.
- Fox, J. 2008. *Applied regression analysis and generalized linear models*. 2nd ed. Sage, Los Angeles: xi + 354 hlm.
- Freimoser, F.M. 1999. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl. and Environ. Microbiol.* **3727--3729**.
- Frederick, C.A., L.D., Williams, & J.H. Rich. 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes. *Biochem* **29**: 2538--2549.
- Freshney, R.I. 2005. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey: xxv + 627 hlm.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 87 hlm.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K.V. Tweel-Vermeulen, A. Oetari, & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xiii + 134 hlm.

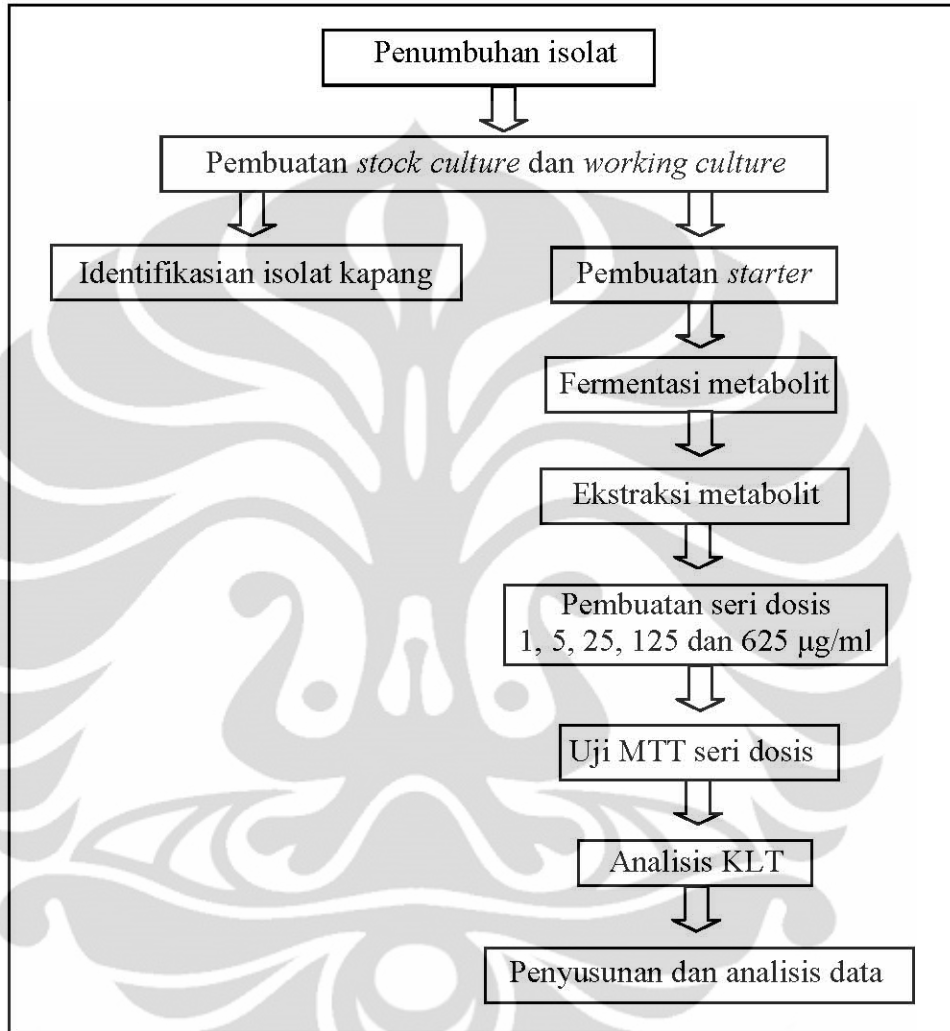
- Gao, Z., B. Li, C. Zheng, & G. Wang. 2008. Molecular detection of fungal communities in the Hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **74** (19): 6091--6101.
- Glazer, A.N. & H. Nikaido. 1998. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. W.H. Freeman and Company, New York: xviii + 662 hlm.
- Gressner, O., T. Schilling, & T. Lorenz. 2005. Induced apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *The EMBO J.* **24**: 2458--2471.
- Griffin, D.H. 1994. *Fungal physiology*. 2nd ed. Wiley, New York: xii + 258 hlm.
- Höller, U., A.D. Wright, & S. Draeger. 2000. Fungi from marine sponges: diversity and biological activity. *Mycol. Res.* **104** (11): 1354--1365.
- Hsin-Ling Yang, Chee-Shan Chen, & Wei-Huei Chang. 2005. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cell. *Elsevier* **23** : 215--227.
- Hughes, D. & H. Mehmet. 2003. *Cell proliferation and apoptosis*. BIOS Scientific Publishers Ltd., UK: xviii + 369 hlm.
- Itharat, A., P. Houghton, Eno-Amooquaye, Burke, J.H. Sampson, & A. Raman. 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacol* **90**: 33--38.
- King, M.W. 2004. Tumor suppressor and cancer, IU School of Medicine. *Sergio Marchesini*: 1--11.
- Klein, D. & E. Eveleigh. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. *J. Microbiol.* **8**: 57--69.
- Kohlmeyer, J. & E. Kohlmeyer. 1979. *Marine mycology the higher fungi*. Academic Press., Inc., London: xiii + 685 hlm.
- Lavelle, P. & A. Spain. 2001. *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers, Boston: viii + 214 hlm.
- Mabrouk, M.A., H.K. Zeinab, R.H. Eman, A.Y. Amani, & A.A.E.A. Abeer. 2008. Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Varicosporina ramulosa*. *Malaysian J. of Microbiol* **4** (1): 14--24.

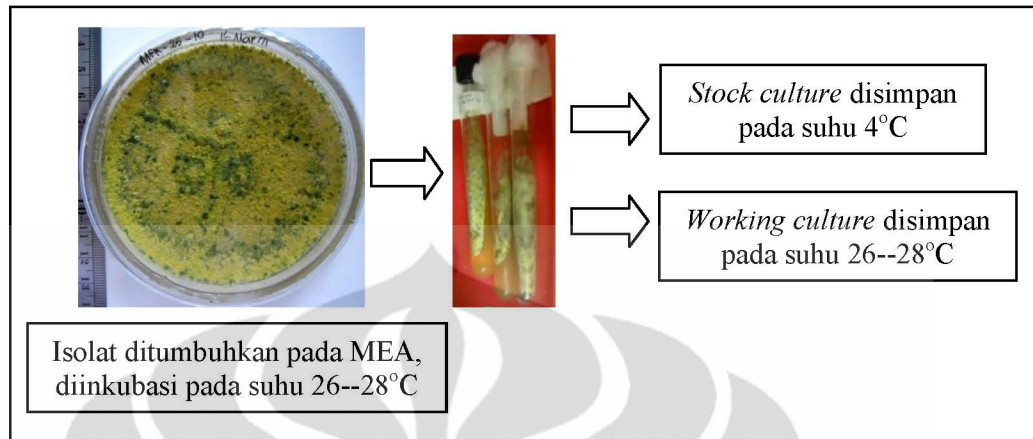
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, & J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganisms*. 9th ed. Prentice Hall International, Inc., London: 879 hlm.
- Maier, R.M., I.L. Pepper, & C.P. Gerba. 1999. *Environmental microbiology*. Academic Press., Canada: xix + 570 hlm.
- Manilal, A., B. Sabarathnam, G.S. Kiran, S. Sujith, C. Shakir & J. Selvin. 2010. Antagonistic potentials of marine sponge associated fungi *Aspergillus clavatus* MFD15. *Asian J. of Medical Scien.* **2** (4): 195-200.
- Moore, B.S. 1999. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae. *Nat. Prod. Rep.* **16**: 653--674.
- Miller, J. M. 2005. *Chromatography: concepts and contrasts*. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xix + 490 hlm.
- Muniarsih, T. & A. Rasyid. 2010. Potensi bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Barrang Lompo (Makassar) sebagai sumber bahan antibakteri. *Oceanol. dan Limnol. di Indonesia* **36** (3): 281--292.
- Munro, M.H.G., J.W. Blunt, E.J. Dumdei, S.J.H. Hickford, R.E. Lill, S.Li, C.N. Battersgill & A.R. Duckworth. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Of Biotech.* **70**: 15--25.
- Natori, S., N. Ikekawa, & M. Suzuki. 1991. *Extraction and isolation of biologically active compounds*. Wiley, New York: 396 hlm.
- Nursid, M., A. Pratitis & E. Chasanah. 2010. Kultivasi kapang MFW-01-08 yang diisolasi dari *Ascidia Aplidium longithorax* dan uji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara T47D. *Prosiding Seminar Nasional Pengelolaan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* **5** (2): 103--121.
- Pairat, L., I. Chetland, & W. Katzer. 1995. Azaphilones with endoteline receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot* **48**: 913--918.
- Paul, E. & F. Clark. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press., San Diego: 134 hlm.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi farmasi*. Erlangga, Jakarta: xiv + 223 hlm.

- Rode, H.J., D. Doris, & I. Frost. 2010. *Apoptosis, cell death, and cell proliferation*. 3rd ed. Roche, England: viii + 164 hlm.
- Samson, R.A., E.S. Hoekstra, & A.N. Van Oorschot. 1999. *Introduction to food-borne fungi*. 2nd ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures: 247 hlm.
- Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus*. *Mycol. Res.* **100**: 923--935.
- Sawhney, S.K. & R. Singh. 2006. *Introductory practical biochemistry*. Alpha Science International, Ltd., Hisar, India: xviii + 443 hlm.
- Surat Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 430. 2007. *Pedoman pengendalian penyakit kanker*. Jakarta: 23 hlm
- Thomas, T.R.A., D.P. Kavlekar & P.A. LokaBharathi. 2010. Marine drugs from sponge-microbe association-a review. *Marine Drugs* **8**: 1417--1468.
- Verrall, M.S. & M.J. Hudson. 1978. *Separations for biotechnology*. Ellis Horwood, UK: xiv + 389 hlm.
- Voloshko, L., J. Kopecky, T. Safronova, A. Pljusich, N. Titova, P. Hrouzek, & V. Drabkova. 2008. Toxins and other bioactive compounds produced by cyanobacteria in Lake Ladoga. *Estonian J. of Ecol.* **57** (2): 100--110.
- Wang, G. 2006. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **33**: 545--551.

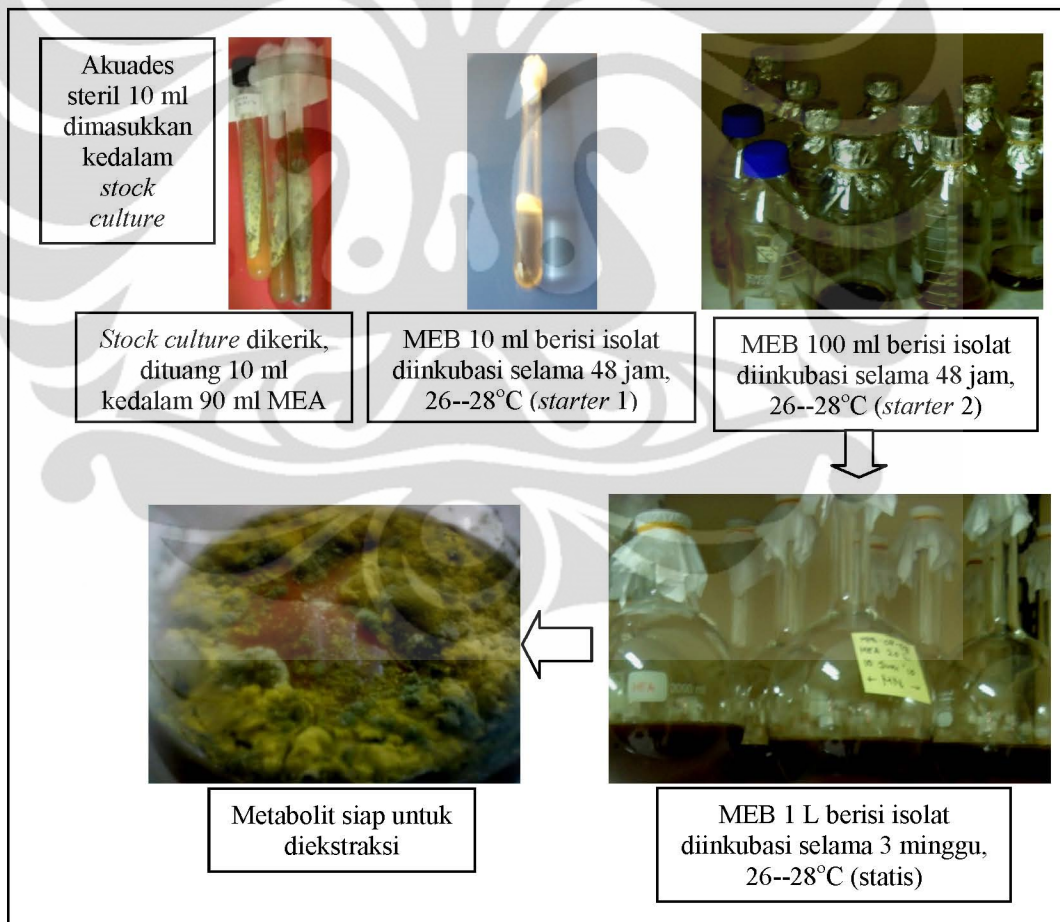
LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja secara umum

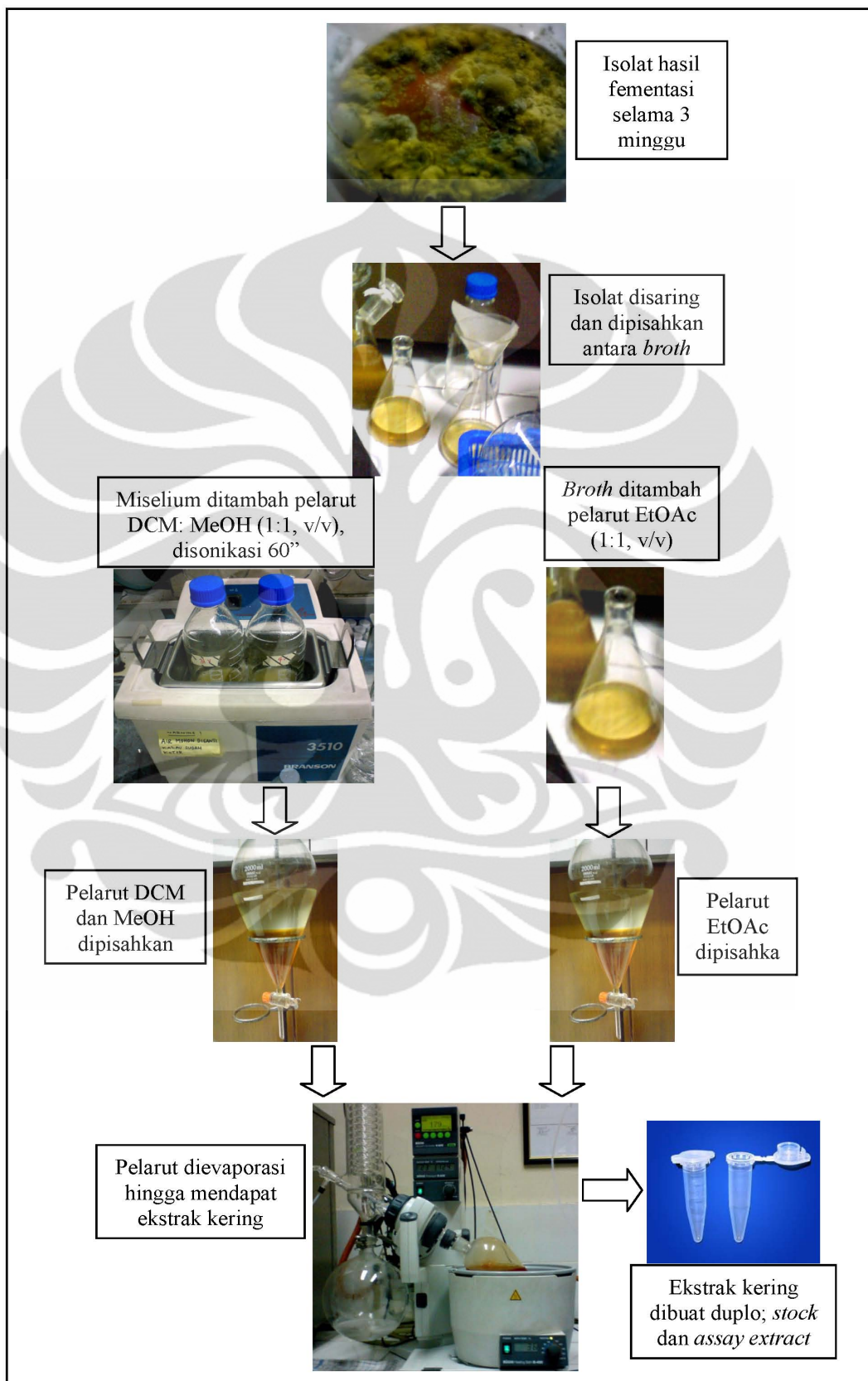


Lampiran 2. Pembuatan *stock culture* dan *working culture*

Lampiran 3. Fermentasi metabolit sekunder kapang

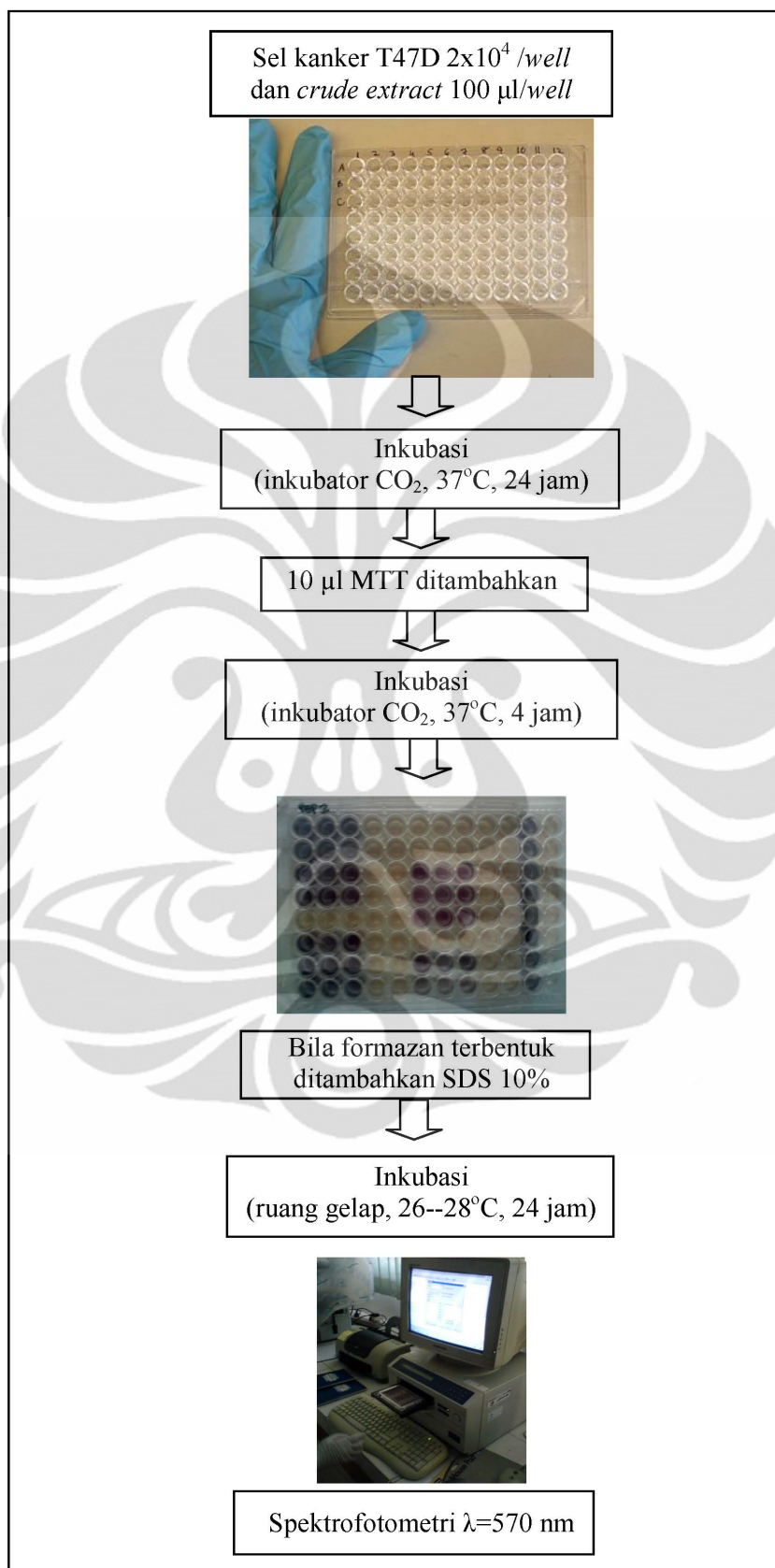


Lampiran 4. Ekstraksi metabolit kapang



Universitas Indonesia

Lampiran 5. Uji MTT



Lampiran 6. Komposisi medium

Komposisi	Konsentrasi	Jumlah
<i>Malt Extract Agar (MEA)</i>		1000 ml
<i>Malt Extract</i>	30 g	
Pepton	5 g	
Agar	15 g	
Akuades	1000 ml	
pH	5,6 ± 0,2	
<i>Potato Dextrose Agar (PDA)</i>		1000 ml
Kentang	200 g	
Dekstrosa	10 g	
Agar	15 g	
Akuades	1000 ml	
pH	6,7 ± 0,2	
Medium kultur lengkap		100 ml
RPMI 1640	100 ml	
FBS	10%	
<i>Penicillin-Streptomycin</i>	1%	

[Sumber: Gandjar *dkk.* 1999: 132; Freshney 2005: 367.]

Lampiran 7. Komposisi reagen

Komposisi	Konsentrasi	Jumlah
SDS 10%		50 ml
SDS	5 g	
HCl 0,01 N	42,7 µl	
H ₂ O	50 ml	
MTT		1 ml
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	50 mg	
<i>Phosphate-Buffered Saline (PBS)</i>	1 ml	

Cat: MTT bersifat toksik, kerjakan dalam lemari asap dan gunakan sarung tangan.

[Sumber: Freshney 2005: 521.]

Lampiran 8. Tabel Probit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	--	2.67	2.95	3.12	2.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

Lampiran 9. Pembuatan seri dosis

Stock extract 10 mg ekstrak + 100 µl DMSO + 900 RPMI (10.000 µg/ml)

Perhitungan untuk membuat:

1 µg/ml

$$\frac{1 \mu\text{g/ml}}{10.000 \mu\text{g/ml}} \times 1000 \mu\text{l} = 0,1 \mu\text{l}$$

10.000 µg/ml

Jadi, 1 µl diambil dari *assay extract*
diencerkan dalam 999,9 µl RPMI

125 µg/ml

$$\frac{125 \mu\text{g/ml}}{10.000 \mu\text{g/ml}} \times 1000 \mu\text{l} = 12,5 \mu\text{l}$$

10.000 µg/ml

Jadi, 125 µl diambil dari *assay extract*
dan diencerkan dalam 987,5 µl RPMI

5 µg/ml

$$\frac{5 \mu\text{g/ml}}{10.000 \mu\text{g/ml}} \times 1000 \mu\text{l} = 0,5 \mu\text{l}$$

10.000 µg/ml

Jadi, 5 µl diambil dari *assay extract*
dan diencerkan dalam 995,5 µl RPMI

625 µg/ml

$$\frac{625 \mu\text{g/ml}}{10.000 \mu\text{g/ml}} \times 1000 \mu\text{l} = 62,5 \mu\text{l}$$

10.000 µg/ml

Jadi, 625 µl diambil dari *assay extract*
dan diencerkan dalam 937,5 µl RPMI

25 µg/ml

$$\frac{25 \mu\text{g/ml}}{10.000 \mu\text{g/ml}} \times 1000 \mu\text{l} = 2,5 \mu\text{l}$$

10.000 µg/ml

Jadi, 25 µl diambil dari *assay extract*
dan diencerkan dalam 997,5 µl RPMI

Lampiran 10. Perhitungan persentase mortalitas

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{(\text{k. sel} - \text{k. medium}) - (\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak})}{\text{k. sel} - \text{k. medium}} \times 100\%$$

$$\text{k. sel} = \frac{1.026 + 0.994 + 1.010}{3} = 1.011$$

$$\text{k. medium} = \frac{0.233 + 0.220 + 0.218}{3} = 0.224$$

$$\text{k. sel} - \text{k. medium} = 1.011 - 0.224 = 0.787$$

1. 1 $\mu\text{g/ml}$ B

$$\text{ekstrak} = \frac{0.990 + 0.984}{2} = 0.987$$

$$\text{k. ekstrak} = \frac{0.210 + 0.217}{2} = 0.214$$

$$\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak} = 0.987 - 0.214 = 0.773$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.773}{0.787} \times 100\% = 1.6\%$$

2. 5 $\mu\text{g/ml}$ B

$$\text{ekstrak} = \frac{1.021 + 0.955}{2} = 0.988$$

$$\text{k. ekstrak} = \frac{0.213 + 0.220}{2} = 0.217$$

$$\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak} = 0.988 - 0.217 = 0.771$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.771}{0.787} \times 100\% = 2\%$$

3. 25 $\mu\text{g/ml}$ B

$$\text{ekstrak} = \frac{0.965 + 0.960 + 0.986}{3} = 0.970$$

$$\text{k. ekstrak} = \frac{0.214 + 0.208}{2} = 0.211$$

$$\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak} = 0.970 - 0.211 = 0.759$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.759}{0.787} \times 100\% = 3.6\%$$

4. 125 µg/ml B

$$\text{ekstrak} = \frac{0.905 + 0.912 + 0.931}{3} = 0.916$$

$$\text{k. ekstrak} = 0.217$$

$$\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak} = 0.916 - 0.217 = 0.699$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.699}{0.787} \times 100\% = 11.2\%$$

5. 625 µg/ml B

$$\text{ekstrak} = \frac{0.194 + 0.191 + 0.199}{3} = 0.195$$

$$\text{k. ekstrak} = \frac{0.184 + 0.197}{2} = 0.192$$

$$\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak} = 0.195 - 0.192 = 0.003$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.707 - 0.003}{0.787} \times 100\% = 99.6\%$$

6. 1 µg/ml M

$$\text{ekstrak} = \frac{0.990 + 0.937 + 0.973}{3} = 0.967$$

$$\text{k. ekstrak} = \frac{0.219 + 0.217}{2} = 0.218$$

$$\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak} = 0.967 - 0.218 = 0.749$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.749}{0.787} \times 100\% = 4.8\%$$

7. 5 µg/ml M

$$\text{ekstrak} = \frac{0.974 + 0.928 + 0.950}{3} = 0.951$$

$$\text{k. ekstrak} = \frac{0.212 + 0.208}{2} = 0.21$$

$$\text{ekstrak} - \text{k. ekstrak} = 0.951 - 0.21 = 0.741$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.741}{0.787} \times 100\% = 5.8\%$$

8. 25 µg/ml M

$$\text{ekstrak} = \frac{0.881 + 0.824 + 0.861}{3} = 0.855$$

$$k. \text{ekstrak} = \frac{0.209 + 0.219}{2} = 0.214$$

$$\text{ekstrak} - k. \text{ekstrak} = 0.855 - 0.214 = 0.641$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.641}{0.787} \times 100\% = 18.6\%$$

9. 125 µg/ml M

$$\text{ekstrak} = \frac{0.209 + 0.210 + 0.243}{3} = 0.221$$

$$k. \text{ekstrak} = 0.211$$

$$\text{ekstrak} - k. \text{ekstrak} = 0.221 - 0.211 = 0.01$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.01}{0.787} \times 100\% = 98.7\%$$

10. 625 µg/ml M

$$\text{ekstrak} = \frac{0.222 + 0.223 + 0.226}{3} = 0.224$$

$$k. \text{ekstrak} = 0.218$$

$$\text{ekstrak} - k. \text{ekstrak} = 0.224 - 0.218 = 0.006$$

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{0.787 - 0.006}{0.787} \times 100\% = 99.2\%$$

Lampiran 11. Perhitungan *Retention factor* (Rf)

$$R_f = \frac{\text{jarak solut (cm)}}{\text{jarak pelarut (cm)}}$$

Broth:

$$\frac{0.4 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.06 \text{ cm}$$

$$\frac{1 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.16 \text{ cm}$$

$$\frac{1.5 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.25 \text{ cm}$$

$$\frac{2 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.3 \text{ cm}$$

$$\frac{2.6 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.4 \text{ cm}$$

$$\frac{3 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.5 \text{ cm}$$

Miselium:

$$\frac{0.3 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.05 \text{ cm}$$

$$\frac{2.3 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.38 \text{ cm}$$

$$\frac{3 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.5 \text{ cm}$$

$$\frac{4.8 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.8 \text{ cm}$$

$$\frac{5.5 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.9 \text{ cm}$$

Universitas Indonesia

Lampiran 12. Panduan warna Castell-Polychromos No. 9216

101 Putih	136 Ungu loh	171 Hijau muda
104 Kuning	137 Ungu terung	173 Hijau zaitun
105 Kuning langsung	139 Ungu muda	174 Hijau cemara
106 Kuning kunyit	141 Biru Delft	175 Sepia
107 Kuning limau	144 Biru kobalt muda	176 Coklat
108 Kuning kepodang	146 Biru langit	180 Coklat jangat
109 Kuning jenar	147 Biru muda	182 Hartal coklat
113 Jingga muda	148 Biru jelah	183 Hartal emas
115 Jingga tua	149 Biru Cina	184 Hartal
117 Merah merona	150 Biru Berlin	187 Hartal rentung
118 Merah marak	151 Biru Prusia	189 Kayu manis
121 Merah dadu	153 Biru merak	190 Merah Venetia
124 Merah serah mawar	155 Balu	191 Merah Pompei
126 Merah serah tua	159 Hijau rumput	192 Merah Indian
127 Merah serah muda	161 Hijau tembaga	194 Lembayung
128 Merah mengkudu mawar	162 Hijau jelah	195 Abu-abu muda
129 Merah mengkudu jambon	163 Hijau zamrud	196 Abu-abu perak
131 Merah daging medium	167 Hijau getah	197 Nilajada
133 Merah anggur	168 Hijau lumut	198 Hitam sabak
134 Merah lembayung	170 Hijau apel	199 hitam